



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METİLPARABEN MARUZİYETİNİN ZEBRA BALIĞI
EMBRİYOLARI ÜZERİNDEKİ BİYOKİMYASAL VE
EPIGENETİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

PERİHAN SEDA ATEŞ KALKAN
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. EBRU IŞIK ALTURFAN

İSTANBUL- 2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Perihan Seda Ateş Kalkan





Bu tez Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonu tarafından SAG-C-DRP-170419-0141 no'lu proje ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca desteğini ve ilgisini her zaman hissettiğim, bana hep yeni kapılar açan, yoluma ışık tutan değerli danışman hocam

Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan’a,

YÖK 100/2000 bursu ile doktora eğitimim boyunca bana maddi desteği sağlayan
YÖK’e

2214-A yurt dışı araştırma bursu sayesinde çalışmalarımın bir kısmını Birmingham
Üniversitesi’nde yürütmemi sağlayan **TÜBİTAK’a**

Tezimin İngiltere ayağını beraber yürüttüğüm, bana laboratuvarının kapısını açan ve
desteğini esirgemeyen sayın **Prof. Dr. Ferenc Mueller’e**

Birmingham Üniversitesi’ne adım attığım ilk günden beri pozitif enerjisi ve bilgi
birikimiyle her zaman yanımda olan sevgili çalışma arkadaşım

Dr. Ada Jimenez-Gonzalez’e,

Marmara Üniversitesi’nde yardımlarını esirgemeyen
tüm çalışma arkadaşlarıma ve hocalarıma

Değerli meslektaşlarım ve arkadaşlarım

Dolay Damla Çelik, Dr. Gamze Bildik Elcik ve Tuğçe Ayık’a,

Desteğini ve varlığını hep yanımda hissettiğim sevgili eşim **Fatih Kalkan’a,**

Ve son olarak beni yetiştiren ve bugünlere getiren **aileme,**

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xviii
RESİM LİSTESİ.....	xix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xx
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1 Endokrin Sistem.....	5
4.1.1 Steroid hormonların moleküler mekanizması	6
4.1.1.1 Nükleer reseptör ailesi.....	6
4.1.1.2 Östrojen, progesteron ve androjen reseptörleri	7
4.1.2 Hormonal homeostazda endokrin metabolizmasının rolü.....	8
4.2 Endokrin Bozucu Kimyasalların Genel Özellikleri	9
4.2.1 Endokrin bozucu kimyasalların sınıflandırılması	10
4.3 Endokrin Bozucu Kimyasalların Etki Mekanizması.....	12
4.3.1 Aril hidrokarbon reseptörü (AhR'ler)	13
4.4 Endokrin Bozucu Kimyasalların Sağlığa Etkileri	14
4.4.1 EBK'ler ve lipit metabolizması.....	15
4.4.2 EBK'ler ve apoptoz.....	16
4.4.3 EBK'lerin üreme sistemine ve cinsiyet gelişimine etkileri.....	18
4.4.4 EBK'ler ve kanser ilişkisi	19
4.5 Parabenlerin Genel Özellikleri.....	20

4.5.1 Parabenlerin biyotransformasyonu, farmakodinamiği ve biyoizlemesi....	23
4.5.2 Parabenlerin toksik etkileri	25
4.6 Epigenetik	27
4.6.1 DNA metilasyonu	27
4.6.2 Histon modifikasyonları.....	29
4.6.2.1 Histon metilasyonu	31
4.6.2.2 Histon asetilasyonu	31
4.6.2.3 Histon fosforilasyonu	31
4.6.2.4 Histon ubiquitinasyonu	32
4.6.2.5 Histon S-nitrosilasyonu	32
4.6.2.6 Histon sumolasyonu	33
4.6.3 Kodlama yapmayan RNA'lar (ncRNA'lar)	33
4.7 Vitellogenin ve EBK'ler	33
4.8 Oksidatif Stres ve EBK'ler.....	35
4.9 Zebra Balıkları ve EBK Çalışmalarında Kullanımları	36
4.10 EBK Araştırmalarında Transkriptomik Analizler ve Biyoinformatik	38
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	41
5.1. Zebra Balıkları Bakım ve Beslenme Prosedürü	41
5.2. Kullanılan Cihazlar	42
5.3. Kullanılan Kimyasallar	43
5.4 Zebra Balıklarından Embriyo Eldesi.....	44
5.5. Maruziyet Uygulanması	45
5.6 Lokomotor Aktivite Testi (Roberts ve ark., 2019).....	46
5.7. Homojenat Hazırlama	46
5.8. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi	46
5.8.1 Total protein tayini (Lowry ve ark., 1951).....	46
5.8.2 Lipit peroksidasyon (LPO) tayini (Ledwozyw ve ark., 1986)	48
5.8.3. Total nitrik oksid tayini (Miranda ve ark., 2001).....	49
5.8.4. GST aktivitesi tayini (Habig ve ark., 1981)	51
5.9 In Situ Hibridizasyon Metodu	52
5.9.1 Prob üretimi.....	52
5.9.2 In situ hibridizasyon protokolü (Thisse ve ark., 2008)	54
5.9.2.1 Fiksasyon	54
5.9.2.2 Rehidrasyon basamağı	55

5.9.2.3 Permeabilizasyon basamağı	55
5.9.2.4 Prehibridizasyon basamağı	56
5.9.2.5 Hibridizasyon basamağı	56
5.9.2.6 Yıkama/Preinkübasyon- Antikor ile İnkübasyon ve Tespit	56
5.10 Oil Red O Metodu (Kim ve ark., 2015)	58
5.11 Gen İfadesi Analizi (RT-PCR).....	59
5.11.1 cDNA sentezi	60
5.11.2 RT-PCR analizi	60
5.11.3. Delta delta C _t metodu ile veri analizi	61
5.12 ChIP (kromatin immün çöktürme) Metodu (Brind'Amour ve ark., 2015)....	62
5.12.1 Embriyoların hazırlanması	62
5.12.2 Manyetik beادلere antikor bağlanması	62
5.12.3 Kromatin kesimi.....	63
5.12.4 Manyetik immün çöktürme	64
5.12.5 Yıkama basamağı.....	64
5.12.6 DNA izolasyon basamağı.....	65
5.12.7 PCR basamağı	66
5.12.8 ChIP-PCR veri analizi.....	67
5.13 Akridin Orange Metodu ile Apoptoz Analizi (Van Ham ve ark., 2010).....	68
5.14 RNA-seq Yöntemi.....	68
5.14.1 RNA-seq için kütüphane hazırlanması	68
5.14.2 RNA-seq analizi	70
6. BULGULAR	71
6.1 LC50 Dozu Sonuçları.....	71
6.2 Kontrol ve MP Gruplarının Malformasyon Yüzdesi ve Morfolojileri.....	71
6.3 Kontrol ve MP Gruplarının 120 saate Kadar Mortalite Yüzdesi Grafiği.....	72
6.4 Lokomotor Aktivite Sonuçları	72
6.5 Biyokimyasal Parametre Sonuçları (LPO, NO ve GST).....	73
6.6 Kontrol ve MP Gruplarında LC50 Dozunun Koryondan Çıkış Süresine Etkisi Sonuçları	74
6.7 RT-PCR Analizi Sonuçları.....	75
6.7.1 24 saatlik embriyolar için RT-PCR sonuçları	75
6.7.2 48 saatlik embriyolar için RT-PCR sonuçları	76
6.7.3 72 saatlik embriyolar için RT-PCR sonuçları	77
6.8 İn Situ Hibridizasyon Sonuçları	78

6.9 Akridin Orange ile Apoptoz Analizi Sonuçları.....	79
6.10 Oil Red O metoduyla Lipit Birikimleri Analizi	80
6.11 H3K27ac Histon Markında Gen Bazlı Değişimlerin Analizi	81
6.12 RNA-seq Sonuçları	82
6.12.1 RNA-seq sonucu anlamlı derecede değişen bütün genlerin listesi	82
6.12.2 RNA-seq sonuçları için PCA ve MA grafiği	93
6.12.3 RNA-seq sonuçlarında anlatımı en çok değişen 20 genin heatmapi.....	94
6.12.4 Gen ontoloji sonuçlarına göre oluşturulan gen kümeleri (cluster).....	95
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	96
8. KAYNAKLAR	108
9. EKLER.....	129
EK-1 Yayınlanan Makale.....	129
10. ÖZGEÇMİŞ.....	130

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

(H₂O₂): Hidrojen peroksit

(NO): Nitrik oksit

(O₂⁻): Superoksit anyonu

(O₂): Oksijen

(OH[•]): Hidroksi radikali

5mC: 5 metil sitozin

α: Alfa

a2m1: Alfa-2-makroglobulin-like geni

actb1: Beta aktin geni

afp4: Antifreeze protein tip IV geni

AhR: Aril hidrokarbon reseptörü

aldh9a1a.1: Aldehit dehidrojenaz 9 family, member A1a, tandem duplicate 1 geni

aldocb: Aldolaz C, fruktoz-bifosfat, b geni

AP: Alkilfenol

apc2: Adenomatosis poliposis coli 2 geni

APE: Alkilfenolik etoksilat

apoa1a: Apolipoprotein A-Ia geni

apoa2: Apolipoprotein A-II geni

apoa4b.2: Apolipoprotein A-IV b, tandem duplicate 2 geni

apoba: Apolipoprotein Ba geni

apobb.1: Apolipoprotein Bb 1 geni

apoc1l: Apolipoprotein C-I like geni

apoc2: Apolipoprotein C-II geni

apoea: Apolipoprotein Ea geni

apoeb: Apolipoprotein Eb geni

apom: Apolipoprotein M geni

ARNT: AhR nükleer translokator

ATP: Adenozin trifosfat

atp5g3b: ATP sentaz, H⁺ transporting, mitokondriyal F0 kompleks, subunit c3 (subunit 9) b geni

atp5h: ATP sentaz, H⁺ transporting, mitokondriyal Fo kompleks, subunit d geni

atp8: ATP sentaz 8 geni

β: Beta

bach2b: BTB ve CNC homoloji 1, basic lözin zipper transkripsiyon faktör 2b geni

BaP: Benzo[a]piren

baz2ba: Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2Ba

BBP: Benzil butil ftalat

Bç: Baz çifti

bhmt: Betaine-homosistein metiltransferaz geni

BPA: Bisfenol A

BPF: Bisfenol F

brd2a: Bromodomain containing 2a geni

c3a.1: Komplement component c3a, duplicate 1 geni

c5: Komplement component 5 geni

c9: Komplement component 9 geni

Ca²⁺: Kalsiyum iyonu

cahz: Karbonik anhidraz geni

CAR: Constitutive androstane reseptör

casp2: Kaspaz 2 geni

casp3a: Kaspaz 3a geni

casp8: Kaspaz 8 geni

CAT: Katalaz

ccnd1: Siklin D1 geni

ccng1: Siklin G1 geni

cDNA: Kopya DNA

CDNB: 1-kloro-2,4-dinitro-benzen

celf2: cugbp, Elav-like family member 2

ces2: Karboksilesteraz 2 (bağırsak, karaciğer) geni

cfh: Kompleman faktör H geni

chac1: ChaC, cation transport regülatör homolog 1 geni

ChIP: Kromatin immün çöktürme
ChIP-seq: Kromatin immün çöktürme- dizileme
ciarta: Sirkadiyan ilişkili transkripsiyon represörü geni
ckma: Kreatin kinaz, kas a geni
ckmb: Kreatin kinaz, kas b geni
COX1: Sitokrom c oksidaz subunit I geni
cox4i1: Sitokrom c oksidaz subunit IV izoform 1 geni
cp: Ceruloplasmin geni
crybb1l2: Crystallin, beta B1, like 2 geni
crygm2d10: Crystallin, gama M2d10 geni
crygm2d12: Crystallin, gama M2d12 geni
crygm2d15: Crystallin, gama M2d15 geni
crygm2d16: Crystallin gama M2d16 geni
crygm2d6: Crystallin, gama M2d6 geni
crygm2d7: Crystallin, gama M2d7 geni
csnk1db: Kazein kinaz 1, delta b geni
C_t: Eşik döngü sayısı
ctsba: Katepsin Ba geni
DBP: Dibutil ftalat
DDBJ: DNA Database of Japan
DDT: Dikloro difenil trikloroethan
ddx18: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polipeptit 18 geni
ddx39ab: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polipeptit 39Ab geni
DEHP: Di-2-etilheksil ftalat
DEP: Dietil ftalat
DES: Dietilstilbestrol
DINP: Di-izononil ftalat
DNA: Deoksiribo nükleik asit
DnHP: Di-n-heksil ftalat
DNMT: DNA metil transferaz
drap1: DR1-ilişkili protein 1 (negatif kofaktör 2 alfa)
EBK: Endokrin bozucu kimyasal

eef1a1l1: Ökaryotik translasyon elongasyon faktör 1 alfa 1, like 1 geni
eef2b: Ökaryotik translasyon uzama faktörü 2b geni
eef2k: Ökaryotik elongasyon faktör 2 kinaz geni
EGE: Etilen glikol eterler
ef5a: Ökaryotik translasyon initiation faktör 5A
EMBL: European Molecular Biology Laboratory
eno3: Enolaz 3, (beta, kas) geni
ER: Östrojen reseptörü
ER α : Östrojen reseptör α
ER β : Östrojen reseptör β
evpla: Envoplakin a geni
f2: Koagülasyon faktör II (trombin) geni
f5: Koagülasyon faktör V geni
FABP: Yağ asidi bağlayıcı protein
fabp1b.1: Yağ asidi bağlanma proteini 1b, tandem duplicate 1 geni
fabp2: Yağ asidi bağlanma protein 2, intestinal geni
fbp1b: Fruktoz 1-6 bifosfataz 1b geni
fetub: Fetuin B geni
fga: Fibrinojen alfa zincir geni
fgb: Fibrinojen beta zincir geni
fgg: Fibrinojen gama zincir geni
FSH: Folikül uyarıcı hormon
gapdh: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz geni
gas5: Growth arrest-specific 5 geni
gatm: Glisin amidinotransferaz (L-arjinin:glisin amidinotransferaz) geni
GFP: Yeşil floresan protein
ghra: Growth hormon reseptör a geni
GPO: Glutasyon peroksidaz
GPR30: G protein bağlı reseptör
GRx: Glutasyon reduktaz
GSH: L-Glutasyon
GST: Glutasyon S-transferaz

H3K27ac: Histon 3, lizin 27 asetilasyonu
hao1: Hidroksiasit oksidaz (glikolat oksidaz) 1 geni
HAT: Histon asetil transferaz
hbae3: Hemoglobin alfa embriyonik-3 geni
HBCD: Hekzabromosiklodekan
HCl: Hidroklorik asit
hhata: Hedgehog açıltransferaz-benzeri, a geni
hist1h4l: Histon 1, H4, like geni
hmgb2b: High mobility group box 2b geni
HMT: Histon metil transferaz
hnrpl: Heterojen nuclear ribonükleoprotein L geni
HRE: Hormon cevap elemanı
id1: DNA bağlanma inhibitörü 1 geni
itih2: İnter-alfa-tripsin inhibitör ağır zincir 2 geni
K: Kontrol
K₂HPO₄: Dipotasyum hidrojen fosfat
kctd15a: Potasyum kanalı tetramerization domain containing 15a geni
kD: Kilo dalton
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KH₂PO₄: Potasyum dihidrojen fosfat
LBD: Ligand bağlanma domaini
lc25a42: Solute carrier family 25, member 42 geni
LC50: Populasyonun yarısını öldürmek için gerekli konsantrasyon
lgals1l1: Lektin, galaktosit-bağlanma, soluble, 1 (galektin 1)-like 1 geni
lipf: Gastrik lipaz geni
lncRNA: Uzun kodlama yapmayan RNA
LOC100334599: hemoglobin embriyonik subunit alfa geni
LOC402866: Trichohyalin geni
LOC558044: Spectrin, beta, non-eritrositik 1 geni
LPO: Lipit peroksidasyonu
Lv: Lipovitellin
MDA: Malondialdehit

mibp2: Kasa özgü beta 1 integrin bağlanma proteini 2 geni
miRNA: Mikro RNA
MP: Metilparaben
mRNA: Mesajcı ribo nükleik asit
mt2: Metallothionein 2 geni
mybphb: Miyozin bağlanma proteini Hb geni
myh9a: Miyozin, ağır zincir 9a, kas dışı geni
myhz1.2: Miyozin, ağır polipeptit 1.2, iskelet kası geni
Na₂HPO₄: Disodyum hidrojen fosfat
NaCl: Sodyum klorür
Na-EDTA: Sodyum etilendiamin tetraasidik asit
NaOH: Sodyum hidoksit
NCBI: National Center for Biotechnology Information
ncRNA: Kodlama yapmayan RNA
ND5: NADH dehidrojenaz subunit 5 geni
ndrg2: NDRG family member 2 geni
NEDD: N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorü
NGS: Yeni nesil dizileme
nme2b.1: NME/NM23 nucleozit difosfat kinaz 2b, tandem duplicate 1 geni
nme2b.2: NME/NM23 nükleozit difosfat kinaz 2b, tandem duplicate 2 geni
NR: Nükleer reseptör
pabpc4: Poly(A) bağlanma proteini, sitoplazmik 4 geni
PAH: Polisiklik aromatik karbon
PBDE: Polibromlu difenil eter
PBS: Fosfat tampon tuzu tablet
PCA: Temel bileşen analizi
PCB: Poliklorlu bifeniller
PCDF: Poliklorlu dibenzo furan
PCE: Perkloroetilen
pck2: Fosfoenolpiruvat karboksikinaz 2 (mitokondiyal) geni
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
PFA: Paraformaldehit

pgk1: Fosfogliserat kinaz 1 geni
pH: Hidrojenin gücü
pHBA: Parahidroksibenzoik asit
pHHA: p-hidroksipurik asit
PIC: Proteaz inhibitör kokteyli
pik3r2: Fosfoinositid-3-kinaz, regulatory subunit 2 (beta) geni
piRNA: Piwi-interacting RNA
pla2g15: Fosfolipaz A2, grup XV geni
plxna3: Plexin A3 geni
pmp22b: Periferal miyelin protein 22b geni
ponzr3: Plac8 onzin related protein 3 geni
PP: Propilparaben
PPAR: Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptörler
ppiaa: Peptidilpropil izomeraz Aa geni
ppp1r14c: Protein fosfataz 1, regulatory (inhibitör) subunit 14C geni
psma4: Proteazom subunit alfa 4 geni
PTM: Post translasyonel modifikasyon
Pv: Fosfitin
pvalb2: Parvalbumin 2 geni
pvalb9: Parvalbumin 9 geni
PXR: Pregnane X reseptörü
rab1ba: zRAB1B, member RAS onkogen ailesi a geni
rbp5: Retinol bağlanma protein 1a geni
RNA: Ribo nükleik asit
ROT: Reaktif oksijen türleri
rpl11: Ribozomal protein L11 geni
rpl12: Ribozomal protein L12 geni
rpl13: Ribozomal protein L13 geni
rpl19: Ribozomal protein L19 geni
rpl21: Ribozomal protein L21 geni
rpl22: Ribozomal protein L22 geni
rpl24: Ribozomal protein L24 geni

rpl32: Ribozomal protein L32 geni
rpl34: Ribozomal protein L34 geni
rpl4: Ribozomal protein L4 geni
rpl5b: Ribozomal protein L5b geni
rpl7a: Ribozomal protein L7a geni
rpl9: Ribozomal protein L9 geni
rplp0: Ribozomal protein, large, P0
rplp1: Ribozomal protein, large, P1 geni
rplp2: Ribozomal protein, large P2 geni
rplp2l: Ribozomal protein, large P2, like geni
rps11: Ribozomal protein S11 geni
rps15: Ribozomal protein S15 geni
rps25: Ribozomal protein S25 geni
rps27a: Ribozomal protein S27a geni
rps3a: Ribozomal protein S3A geni
rps4x: Ribozomal protein S4, X-linked geni
rps8a: Ribozomal protein S8a geni
rps9: Ribozomal protein S9 geni
rpsa: Ribozomal protein SA geni
RS: Tiyil radikalleri
RSO: Sülfonil radikali
RT-PCR: Gerçek zamanlı PCR
RXR: Retinoid X reseptörü
ryr3: Ryanodine reseptör 3 geni
sepp1a: Selonoprotein P geni
serpina1l: Serine (veya sistein) proteinaz inhibitör, clade A (alfa-1 antiproteinaz, antitripsin), member 1, like geni
serpinc1: Serpin peptidaz inhibitör, clade C (antitrombin), member 1 geni
serpinh1b: Serpin peptidaz inhibitör, clade H (heat shock protein 47), member 1b geni
SHR: Steroid hormon reseptörü
siRNA: Small interfering RNA

slc1a2b: Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamat transporter), member 2b geni

slc25a5: Solute carrier family 25 (mitokondriyal carrier; adenin nukleotit translocator), member 5 geni

slc27a2a: Solute carrier family 27 (yağ asidi transporter), member 2a geni

slc3a2a: Solute carrier family 3 (amino asit transporter ağır zincir), member 2a geni

slc43a2a: Solute carrier family 43 (amino asit sistem L transporter), member 2a geni

slc43a2b: Solute carrier family 43 (amino asit sistem L transporter), member 2b geni

smyhc1: Slow miyozin ağır zincir 1 geni

snrpg: Small nukleer ribonukleoprotein polipeptid G geni

SOD: Superoksit dismutaz

srsf1b: Serin/ arjinin-rich splicing faktör 1b geni

StAR: Steroidojenik akut düzenleyici protein

SULF: Sülfaniamid

SUMO: Small ubiquitin-like modifier

TBA: Triklorasetik asit

TBBPA: Tetrabromobisfenol A

TCA: Tiyobarbürük asit

TCE: Trikloretilen

tdh: L-treonin dehidrojenaz geni

tfa: Transferrin a geni

tnnc1b: Troponin C tip 1b geni

ttni1a1: Troponin I, iskelet, slow like geni

tnnt2d: Troponin T2d, kardiyak geni

tox2: TOX high mobility group box family member 2 geni

tpt1: Tümör protein, translasyonel-kontrol 1

ttnb: Titin b geni

tuba8l4: Tubulin, alfa 8 benzeri 4 geni

ube2ia: Ubikitin-conjugating enzim E2Ia geni

ubr5: Ubikitin protein ligaz E3 component n-recogin 5 geni

VCl₃: Vanadyum (III) Klorür

vtg: Vitellogenin geni

vtnb: Vitronektin b geni

ybx1: Y box bağlanma proteini 1 geni

ywhaqa: Tirozin 3-monooksijenaz/triptofan 5-monooksijenaz aktivasyon protein,
theta polipeptit a geni

ZnSO₄: Çinko sülfat



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1: Bazı EBK'ler, alt grupları ve kullanım alanları	10
Tablo 2: Kadınların kişisel bakım ürünlerinden maruz kaldığı paraben dozları.....	22
Tablo 3: Bazı histon modifikasyonları ve transkripsiyonel aktivite üzerindeki etkileri	30
Tablo 4: Deneylerde kullanılan cihazlar	42
Tablo 5: Kullanılan kimyasallar listesi.....	43
Tablo 6: Total protein tayin yöntemi	48
Tablo 7: Lipit peroksidasyon tayin yöntemi	49
Tablo 8: Nitrik oksit tayin yöntemi	50
Tablo 9: GST tayin yöntemi.....	51
Tablo 10: İn situ hibridizasyon probu için kullanılan primer dizileri	52
Tablo 11: DIG-Labeling reaksiyonunda kullanılan kimyasallar.....	53
Tablo 12: Permeabilizasyon basamağı için gerekli süreler	55
Tablo 13: Gen anlatım düzeyleri ölçülen genlere ait primer dizileri	59
Tablo 14: cDNA sentezi için kullanılan bileşenler (I)	60
Tablo 15: cDNA sentezi için kullanılan bileşenler (II)	60
Tablo 16: RT-PCR reaksiyon bileşenleri	61
Tablo 17: RT-PCR döngü ayarları	61
Tablo 18: Kromatin kesimi için gerekli master miks karışımı.....	63
Tablo 19: ChIP metodunda kullanılan primer dizileri	66
Tablo 20: Kontrol ve MP gruplarının 48. saatteki RNA-seq sonuçları.....	92

RESİM LİSTESİ

Resim 1: ZEBTEC Mini Akvaryum sistemi	41
Resim 2: Zebra balığı çiftleştirme tankı	45
Resim 3: Elektroforezde vitellogenin bant görüntüsü	53
Resim 4: Kontrol ve MP gruplarının somite evresindeki apoptotik hücreleri.....	79
Resim 5: Kontrol ve MP gruplarında Oil Red O metoduyla tespit edilen lipit birikimleri.....	80



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: EBK'lerin etki mekanizması	9
Şekil 2: Parabenlerin genel kimyasal yapısı	21
Şekil 3: Kontrol ve MP gruplarının malformasyon yüzdesi grafiği ve morfolojileri.	71
Şekil 4: Kontrol ve MP gruplarının 120 saate kadar mortalite yüzdesi grafiği..	72
Şekil 5: Kontrol ve MP gruplarının lokomotor aktivite sonuçlarının karşılaştırması grafiği.	72
Şekil 6: Kontrol ve MP gruplarının LPO, NO seviyeleri ve GST aktiviteleri grafiği.	73
Şekil 7: Kontrol ve MP gruplarının 120 saat boyunca koryondan çıkma yüzdesi grafiği	74
Şekil 8: Kontrol ve MP gruplarının 24. saatte mRNA anlatım grafiği.....	75
Şekil 9: Kontrol ve MP gruplarının 48. saatte mRNA anlatım grafiği.....	76
Şekil 10: Kontrol ve MP gruplarının 72. saatte mRNA anlatım grafiği.....	77
Şekil 11: Kontrol ve maruziyet gruplarının <i>vtg</i> anlatımı açısından karşılaştırılması grafiği ve morfolojileri.	78
Şekil 13: Kontrol ve MP gruplarının PCA ve MA grafiği	93
Şekil 14: Kontrol ve MP gruplarında anlatımı en çok değişen 20 genin heatmapi. ..	94
Şekil 15: Anlatımı artan genlerin cluster grafiği	95
Şekil 16: Anlatımı azalan genlerin cluster grafiği	95

Metilparaben Maruziyetinin Zebra Balığı Embriyoları Üzerindeki Biyokimyasal ve Epigenetik Etkilerinin Araştırılması

Öğrenci Adı: Perihan Seda Ateş Kalkan

Danışman Adı: Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan

Anabilim Dalı: Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Çalışmamızın amacı; metilparaben maruziyetinin yaratabileceği olumsuz etkilerin moleküler, biyokimyasal ve epigenetik düzeyde araştırılmasıdır.

Gereç ve yöntem: Zebra balığı embriyolarında LC50 doz belirlenerek lokomotor aktivite testi, RT-PCR ile apoptoz ve metilasyonla ilgili genlerin ifadeleri belirlenmiştir. Apoptotik hücreler akridin, lipid birikimleri oil red o boyaması, vitellogenin in situ hibridizasyon ile saptanmıştır. Biyokimyasal parametreler spektrofotometrik yöntemle, H3K27ac histon modifikasyonundaki değişimler kromatin immün çöktürme (ChIP) metoduyla saptanmıştır. RNA-dizileme NGS (yeni nesil dizileme); analizi için BlueBee biyoinformatik programı kullanılmıştır. Anlatımı değişen genlerin gen ontoloji ve gen kümelendirme analizi DAVID biyoinformatik web sitesi aracılığıyla yapılmıştır.

Bulgular: Belirlenen LC50 dozlarında metilparaben maruziyeti; perikardiyal ödem, pigmentasyon ve kuyruk defektleri ile embriyo hareketlerinde azalmaya neden olmuştur. Apoptoz ve metilasyon ile ilişkili genlerin anlatımında değişimler, apoptotik hücreler, vitellogenin ile lipid birikimde, lipid peroksidasyonu ve nitrik oksid düzeyinde artış; glutatyon s-transferaz aktivitesinde ise azalma belirlenmiştir. Maruziyet grubunda H3K27ac histon modifikasyonları anlamsız, 172 genin anlatım seviyesi ise anlamlı seviyede değişmiştir. Anlatımı anlamlı ölçüde değişen gen kümeleri translasyon, lipid metabolizması, koagülasyon ve enerji metabolizması olarak belirlenmiştir.

Sonuç: İncelenen dozlarda metilparaben maruziyeti histon modifikasyonlarını değiştirmezken apoptoz ve oksidan hasara neden olmuş, translasyon, lipid, koagülasyon ve enerji metabolizması ile ilgili gen ifadelerini değiştirmiştir.

Anahtar kelimeler: Metilparaben, endokrin bozucular, RNA dizileme, apoptoz, zebra balığı

Investigation of Biochemical and Epigenetic Effects of Methylparaben Exposure on Zebrafish Embryos

Name of the Student: Perihan Seda Ateş Kalkan

Name of the Supervisor: Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan

Department: Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy

2. SUMMARY

Objective: The aim of our study is to investigate the adverse effects of methylparaben exposure at molecular, biochemical and epigenetic levels.

Materials and methods: LC50 dose was determined, locomotor activity test, expression of genes associated with apoptosis and methylation was determined by RT-PCR method. Apoptotic cells were determined by acridine orange staining method and lipid accumulations were determined by oil red o staining. Vitellogenin was detected by in situ hybridization. Biochemical parameters were determined by spectrophotometric methods and changes in H3K27ac histone modification by chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. RNA-seq was performed by NGS (next-generation sequencing) method and the BlueBee bioinformatics program was used for analysis. Gene ontology and gene cluster analysis of significantly changed genes were made on the DAVID bioinformatics website.

Results: Methylparaben exposure caused pericardial edema, pigmentation and tail defects, decreased movements. Changes in gene expressions associated with apoptosis and methylation, apoptotic cells, lipid accumulation, vitellogenin expression, increased lipid peroxidation nitric oxide levels; decreased glutathione s-transferase activities were observed. Changes in H3K27ac histone modifications were not significant but expressions of 172 genes significantly changed related to translation, lipid metabolism, coagulation, and energy metabolism according to the gene clusters analysis.

Conclusion: Methylparaben exposure caused apoptosis, oxidant damage, did not change histone modifications but changed gene expressions related to translation, lipid metabolism, coagulation, and energy metabolism.

Keywords: Methylparaben, endocrine disruptors, RNA-seq, apoptosis, zebrafish

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Endokrin bozucu kimyasallar (EBK) günümüzde insan sağlığı açısından en popüler konulardan biridir. Endokrin bozucular, kimyasal yapıları sebebiyle hormon benzeridirler ve hormonları taklit ederek etkilerini östrojenik, antiöstrojenik, androjenik veya antiandrojenik olarak gösterebilirler (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2009). Bazı araştırmalar bu maddelerin obezite, diyabet, kanser, infertilite ve endometriozise neden olduğunu göstermektedir.

EBK'ler sucul ortamlarda yaygın olarak bulunmaktadırlar ve omurgalıların gelişiminde, fizyolojik homeostazın sağlanmasında istenmeyen etkiler yaratabilirler. Küçük boyutu ve üreme kolaylığı nedeniyle, zebra balığı embriyonik aşamada ksenoöstrojenik potansiyel testlerinde en sık kullanılan balık türlerinden biridir ve EBK'lerin etkilerinin araştırılması için önerilen model organizmalardandır (Segner, 2009).

Parabenler, antimikrobiyal aktiviteye sahip bir koruyucu madde ailesinde bulunan p-hidroksibenzoik asitin esterleridir. 1920'den beri kozmetik, ilaç ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Farklı parabenlerin (benzil-, butil-, izobutil-, etil-, metil-, propil-, izopropilparaben) antimikrobiyal etkileri alkil zincir uzunluğuna göre değişmektedir. Parabenler, yutma, inhalasyon veya dermal temas yoluyla emilir. Ağız yoluyla alındığında, bağırsak ve karaciğerde esterazlar tarafından parahidroksibenzoik aside (PHBA) metabolize edilir ve ilk 24 saatte idrarla (% 80-85) atılırlar (Błędzka ve ark., 2014).

Parabenlerin östrojen reseptörlerine bağlanma afinitelerine sahip olduğu bilinmektedir (Vo ve ark., 2010). Hayvanlarda yapılan akut toksisite çalışmaları, parabenlerin önemli ölçüde toksik olmadığını göstermiştir (Final Amended Report, 2008). Tüm bunlara rağmen, ölümcül olmayan dozların altındaki dozlara kronik maruziyetin etkileri hala bilinmemektedir ve literatürde metilparabenin (MP) etkileri üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır.

Erken embriyonik evrede MP maruziyeti önemli bir sorundur, parabenlerin maternal kan, plazma ve amniyotik sıvıda yüksek konsantrasyonda bulunduğu tespit edilmiştir (Zhao ve ark., 2017). MP'nin folikülojenezi ve FSH seviyelerini etkilediği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2017). Buna ek olarak, bir zebra balığı üreme toksisitesi çalışmasında, MP'nin histopatolojik etkilere neden olduğu belirlenmiştir (Hassanzadeh, 2017).

Epigenom; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve miRNA anlatımı gibi, doğru bir transkriptomik profili tanımlamak için dinamik olarak etkileşime giren bir takım kromatin düzenleyiciler tarafından oluşturulur (Fleisch ve ark., 2012). Epigenetik regülasyonun etkisiyle gen anlatımında değişiklikler meydana gelebilir. EBK'lere maruz kalma, epigenomun şekillenmesinde önemli bir rol oynar. DNA metilasyonu, gen ekspresyonunun ve kromozomal stabilitenin düzenlenmesinde rol oynayan en yaygın epigenetik mekanizmalardan biridir. DNA metilasyon paternlerindeki değişiklikler, kanser de dahil olmak üzere çeşitli karmaşık hastalıklarda rol oynamaktadır. DNA metilasyonu seviyelerinin tespiti açısından DNA metil transferazlar (DNMT ailesi) kullanılmaktadırlar (Zama ve Uzumcu, 2009). Literatürde embriyonik dönemde EBK maruziyetinin epigenetik kontrol mekanizmalarını etkileyebildiğine dair birçok bulgu vardır. EBK'ler histon modifiye edici enzimler gibi endokrin sisteminin epigenetik regülasyonunu sağlayan düzenleyicilerin katalitik gücünde veya ekspresyon seviyelerinde değişiklik meydana getirebilirler (Casati, 2015).

Çalışmamızın amacı; metilparaben maruziyetinin yaratabileceği olumsuz etkilerin moleküler, biyokimyasal ve epigenetik düzeyde araştırılmasıdır. Çalışmamızda en başta MP için LC50 dozunun tespit edilmesi, herhangi bir malformasyona sebep olup olmadığının belirlenmesi ve endokrin bozucu etkisinin olup olmadığının aydınlatılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçların altında yatan mekanizmayı araştırmak amacıyla apoptoz, lipid metabolizması, histon modifikasyonları, oksidan-antioksidan sistem ve transkriptom analizi konularına odaklanılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Endokrin Sistem

Vücut; hepsi bir bütün halinde çalışan ve iletişim kuran, farklı özelliklere sahip milyonlarca hücreden oluşmaktadır. Bunu sağlamak amacıyla hücreler ve organlar arasında hücrelerarası iletişim mekanizması bulunmaktadır. Sinir sistemindeki iletişim direkt, hızlı ve kısa ömürlü sinyallerle sağlanmaktadır. Buna karşılık, endokrin sistem vücudun birçok farklı yerinde çok sayıda hücre arasında daha yavaş, daha uzun süreli iletişime izin verir (Jabobs ve ark., 2017). Endokrin sinyal iletimi sırasında, bir grup salgı hücresi (yani bir bez) kana güçlü bir kimyasal aracı (bir hormon) salgılar. Salgılanan hormon hedef hücrelere kan yolu ile taşınır. Endokrin sistem; metabolizma, büyüme ve üreme gibi bazal süreçleri düzenleyen çok yönlü bir sinyal geri bildirim sistemine katkıda bulunur. Büyüyen fetüs ve bebekte gelişmemiş durumdadır ve bu nedenle özellikle erken yaşamda toksik maddelere karşı savunmasızdır.

Endokrin sistemin başlıca bezleri; hipofiz, tiroid, paratiroid, pankreas, gastrointestinal sistem, adrenal, üreme (testis ve yumurtalıklar), hipotalamus ve epifizdir. Hipotalamus ve epifiz bezi diğer birçok endokrin bezin faaliyetlerini kontrol etmede rol oynar.

Hormonlar insan vücudunda endojen olarak üretilir. Eksojen kimyasallar endojen hormonları taklit edebilir ve homeostazın sürdürülmesindeki süreçleri bozabilirler. Endojen hormonlar iki çeşittir. Peptid hormonlar amino asitlerden meydana gelirler, aktif hormona ihtiyaç duyulana kadar inaktif olarak üretilip, depo edilirler (gastrin gibi). Steroid hormonların ise hepsinin spesifik bir yapısı vardır. Belirli etkinliklerin kilidini açmak için tasarlanmış bir yapıdadırlar, bu tür hormonların bağlandığı reseptörler steroid hormon reseptörü (SHR) olarak adlandırılırlar. Suda çözünür peptid hormonlarının aksine steroid hormonları lipofiliktir ve bu nedenle etkilerini göstermek için hücre zarlarından kolayca geçebilirler. Birbirleriyle kombinasyon halinde, büyüme, gelişme ve organ fizyolojisinin düzenlenmesinde rol oynarlar (Jabobs ve ark., 2017).

4.1.1 Steroid hormonların moleküler mekanizması

4.1.1.1 Nükleer reseptör ailesi

Birçok farklı steroid hormon tipi vardır ve dolayısıyla birçok farklı SHR bulunmaktadır. Tümü geniş bir sınıf olan nükleer reseptör (NR) ailesindendir. NR ailesi aşırı miktarda bulunan endojen hormonları ve eksojen maddeleri (zenobiyotikler) temizleyen; pregnane X reseptörü (PXR), constitutive androstane reseptör (CAR), ve peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptörler (PPAR'lar) gibi reseptörleri içermektedir. Reseptörler protein yapıdadır ve diğer proteinler gibi DNA'dan üretilmektedirler. Tüm hücreler bütün reseptör tiplerini üretme kabiliyetine sahiptir fakat gen anlatımındaki farklılıklar, belli hücre ve doku tiplerinde üç veya dört hormon reseptöründen fazla reseptör üretimine izin vermez (Gard, 1998). Bu da hormonların hedef dokulardaki seçiciliğinden kaynaklandığını düşündürmektedir. NR'lerin aktivasyonu yağ, glukoz, kolesterol, safra asitleri, endojen hormon, zenobiyotik metabolizmasındaki gen anlatım seviyelerini düzenler.

NR ailesin ortak yapısal özellikleri vardır. Yüksek oranda korunmuş DNA bağlanma bölgesi NR'yi belli DNA bölgelerinden hedef alır bu bölgelere hormon yanıt elemanı (HRE) denir. Ligand binding domain (LBD) hormon veya kimyasal taklitçiyle direkt olarak etkileşime geçer. LBD hormon bağımlı transkripsiyonel aktivasyon domainidir. LBD hormon bağlanması ile aktif bir hale geldiğinde moleküler şalter görevi görerek, koaktivatör proteinleri çağırıp hedef genlerde transkripsiyonu sağlar. Bir hormonun NR'yi etkinleştirmek için LBD'ninkine özgü bir konfigürasyonda olmalıdır, bu durum anahtar ve kilit hipotezi olarak bilinir. Bazı hormonlar veya kimyasal taklitler tam olarak uygun şekilde değildir, ancak NR ile etkileşim kurabilirler. Bu tür etkileşimler NR'nin yeteneğini etkileyebilir. Bu tür etkileşimler LBD'ye erişimi engelleyerek, NR'nin bir yanıt üretme yeteneğini etkileyip kısmi aktivasyon (agonizm), kısmi baskılama (antagonizm) veya tam baskılamaya neden olabilirler (Weigel, 1996).

Uzun zamandır kabul edilen bir teoriye göre hormon yokluğunda her bir NR, şaperon kompleksiyle (reseptörü koruyan proteinler içeren) ilişki halindedir. Steroid hormonların NR'ye bağlanması konformasyonel değişikliğin meydana gelmesine

sebebe olur. Bu değişim şaperon kompleksi ayırarak NR'nin dimerize olmasına neden olur. Homodimer iki identik molekülden oluşmaktadır bu süreç homodimerizasyon olarak adlandırılır. Bir heterodimer iki farklı molekülden oluşur ve süreç heterodimerizasyon olarak adlandırılır. NR dimerlerinin HRE'ye bağlanması gen anlatımının aktivasyonuna veya represyonuna neden olur (Alberts ve ark., 1997; Weigel, 1996).

4.1.1.2 Östrojen, progesteron ve androjen reseptörleri

Östrojen reseptörleri (ER) NR'ler arasında en çok çalışılmış SHR'lerdendir (Thornton, 2001). Farklı genler tarafından kodlanan farklı alt tipleri mevcuttur. İzoformları arasında tanımlanan ilk iki alt tipi ER alfa (ER α) ve ER beta (ER β)'dır (Brzozowski, 1997). 450 milyon yıl önce çeneli omurgalıların ortaya çıkışından sonra, progesteron reseptörü gelişti. Bunu, farklı izoformlarda bulunan androjen reseptörü (AR) izledi. Özel fizyolojik süreçlerin androjenler ve kortikoidler tarafından düzenlenmesi bu olaylardan sonra ortaya ıktı. Hem ER hem de AR varyantları yalnızca çekirdekte değil, aynı zamanda hücrenin sitoplazmasında da bulunmaktadır.

Bir böcek ilacı olan dikloro difenil trikloroethan (DDT) ile kadınlardaki meme kanseri ve erkeklerdeki androjen bağlantılı üreme sistemi hastalıkları arasında bağlantı olduğunun keşfedilmesinin ardından ER'ler ve AR'ler EBK'lerle ilgili çalışmalarda en çok ilgi gören konular arasında yer aldılar. Temel etki biçimleri transkripsiyonel regölasyon şeklinde olmasına rağmen gen anlatımını DNA'ya bağlanmadan dolaylı olarak da etkileyebilirler. ER'ler, AR'ler ve progesteron reseptörleri ligandları tarafından aktive edilerek homodimerize olurken diğer birçok NR'ler belirli yolakları aktive ederek heterodimerize olurlar. SHR'ler ve diğer NR'lerin tümü, farklı ligand bağlanma ve aktivasyon formatlarına sahiptir; aynı zamanda seçiciliği kolaylaştırmak veya bastırmak için hem benzer hem de farklı şaperon proteinlere ve yardımcı düzenleyicilere sahiptirler (Jacobs ve ark., 2017)

ER'ler hem erkek hem de dişilerde meme bezleri, kemik, beyin ve vasküler sistem gibi birçok doku ve organda farklı biyolojik etkilere aracılık etmektedir. Bu nedenle, ER α ve ER β farklı doku dağılımı ve farklı fizyolojik fonksiyonlar gösterdiğinden,

endokrin bozucular dokuya bağılı olarak agonist veya antagonist etki gösterebilirler. ER alt tiplerinin yapısal özelliklerindeki ve ligand bağlanma afinitesindeki önemli farklılıklar göz önüne alındığında, endokrin bozucular, ER'lerin üçüncül yapısında konformasyonel değişikliklere neden olarak kofaktörlerin çağırılmasını etkileyebilir. Bu da sonuç olarak ER-hedef genlerin ekspresyonunun modülasyonunda kritik adımlardır (Yang ve ark., 2015).

4.1.2 Hormonal homeostazda endokrin metabolizmasının rolü

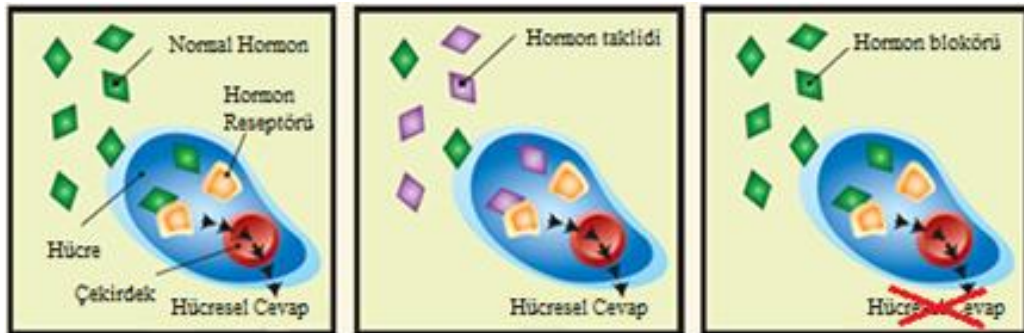
SHR'ler, diğer NR'ler ve şaperon proteinler biyoaktif hormonların salınımını ve bozulumunu kontrol eden hormonal homeostazın sağlanmasında görevlidir. Steroid hormonlar, metabolitleri, sindirilmiş bitki ve hayvan steroidleri ve biyoaktif ksenobiyotik bileşikler öncelikle karaciğerde sitokrom P450 tarafından enzimatik indirgeme ve oksidasyon yoluyla metabolize edilir. Çoğu P450 geniş substrat aktivitesine sahiptir ve metabolik yollarla koordine halindedir. P450'leri indükleyen bazı reseptörler (PPAR'lar gibi) ligand spesifiktirler, diğerleri daha geniş özgülüğe ve düşük ligand afinitesine sahiptirler. Bu şekilde metabolize edici enzimlerin üretimini tetikleyen kümeleşmiş substrat seviyesini kontrol edip toksik maddelere karşı savunma mekanizması geliştirilebilir. EBK'ler ve diğer ksenobiyotikler tarafından P450 indüklenmesi, endojen regülasyon yollarının etkilenmesine ve istenmeyen fizyolojik sonuçlara sebep olabilir (Jacobs ve ark., 2017).

P450cc ve aromataz (CYP17A1, CYP19A1) gibi steroidojenik yolak enzimlerinin progesteron ile testosteronun aktif formlarının üretilmesinde ve kolesterol estradiol çevriminde görevleri vardır. Mitokondri içine kolesterol transferini düzenleyen ve dolayısıyla steroid hormonların üretiminde hız sınırlayıcı basamak olan steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR), aynı zamanda modüle edilebilen önemli bir steroidojenik mekanizmadır. Diğer ilgili ancak reseptörden bağımsız steroid enzim sistemleri arasında sülfotransferazlar ve N-asetiltransferaz 1 gösterilebilir (Jacobs ve ark., 2017).

4.2 Endokrin Bozucu Kimyasalların Genel Özellikleri

EBK'ler; endokrin sistemi etkileyen, gelişim, üreme, nörolojik ve immünolojik yönden istenmeyen etkilere sahip olan kimyasallardır. Bu kimyasallar, homeostazdan sorumlu doğal hormonların üretimini, salınımını, taşınmasını, metabolizmasını ve bağlanmasını etkiler ve bu nedenle 1991 yılında ilk kez ABD Çevre Koruma Ajansı tarafından endokrin bozucular olarak adlandırıldılar (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2009). Bu kimyasallara ayrıca endokrin modülatörler, endokrin taklitçiler, çevresel hormonlar ve endokrin aktif bileşikler de denmektedir. EBK'ler; plastik şişeler, metal yiyecek kutuları, deterjanlar, alev geciktiriciler, yiyecekler, oyuncaklar, kişisel bakım ürünleri ve böcek ilaçları gibi birçok üründe bulunabilmektedirler (Yang ve ark., 2015). EBK'lerin insan sağlığı üzerindeki etkilerine ilişkin bilimsel bilgi hala sınırlı olmakla beraber, istenmeyen etkilerinin olduğu kanıtlamış birçok çalışma bulunmaktadır. Bazı araştırmalar bu maddelerin obezite, diyabet, kanser, infertilite ve endometriozise neden olduğunu göstermektedir.

EBK'ler ayrıca karsinojenler, nörotoksik maddeler ve ağır metaller gibi klasik toksik maddelerden de ayrılır çünkü direkt olarak kan hormon seviyelerine müdahale edebilirler. Genel olarak, EBK'ler lipofiliktir ve kısmen taklit ettikleri endojen hormon ligandına yapısal olarak benzer. Bazen yüksek maruziyet dozları hiçbir etkiye sebep olmazken düşük veya orta seviyedeki dozlar daha büyük etkilere neden olabilir (monotonik olmayan doz tepkileri) (Şekil 1). Bunun nedeni ise aynı EBK'nin, konsantrasyona bağlı olarak birden fazla etki şekline sahip olabilmesi ve hem agonist hem de antagonist olarak hareket edebilmesidir (Kabir ve ark., 2015).



Şekil 1: EBK'lerin etki mekanizması

4.2.1 Endokrin bozucu kimyasalların sınıflandırılması

Yaygın olarak kullanılan EBK'ler aşağıda yer alan Tablo 1'de kategorize edilerek verilmiştir.

Tablo 1: Bazı EBK'ler, alt grupları ve kullanım alanları

Potansiyel EBK	Kimyasal Alt Grup	Uygulama Alanları
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'ler)		Fosil yakıtların veya biyoyakıtların yakılmasında yan ürün olarak ortaya çıkar
Poliklorlu organik bileşikler	- Poliklorlu bifeniller (PCB'ler) - Dioksinler, furanlar, poliklorlu naftalinler - Oktaklorostiren	- PCB'ler 1970'lere kadar yalıtım ve soğutma sıvıları olarak kullanıldı. - Dioksinler ve oktaklorostiren atık yakma ve endüstriyel işlemlerin yan ürünleridir.
Pestisitler	- Organoklorinler - Karbamatlar Organofosfatlar - Tribütilin - Piretroid - Diğer	- Tarım uygulamaları - Haşere uzaklaştırma - Ahşap koruma
Ftalatlar	- di-2-etilheksil ftalat (DEHP) - di-izononil ftalat (DINP) - di-n-heksil ftalat (DnHP) - Benzil butil ftalat (BBP) - Dibutil ftalat (DBP) - Dietil ftalat (DEP)	Plastikleştirici olarak kullanılmaktadırlar.

Organik çözücüler	- Etilen glikol eterler (EGE'ler) - Stiren - Tolüen - Ksilen - Trikloretillen (TCE) - Perkloroetilen (PCE)	- Boya, yapıştırıcı, tiner, reçine gibi ürünlerde kullanılan; EGE'ler, toluen, ksilen - Polistiren plastiklerde ve reçine üretiminde kullanılan; stiren - Metal yağ giderme ve diğer endüstriyel temizlik işlemlerinde kullanılan; TCE ve PCE.
Bisfenol A (BPA)		Polikarbonat plastik ve epoksi reçine üretimi.
Alkilfenolik bileşikler	- Alkilfenolik etoksilatlar (APE'ler) - Alkilfenoller (AP'ler)	- APE'ler iyonik olmayan yüzey aktif maddelerdir. - AP'ler, APE'lerin üretim sürecinde kullanılır.
Bromlu alev geciktiriciler	- Polibromlu difenil eterler (PBDE'ler) - Tetrabromobisfenol A (TBBPA) - Hekzabromosiklodekan (HBCD)	Polimer ve tekstil üretimi ve elektroniklerde kullanılmaktadır.
Metaller ve metaloidler	- Arsenik - Kadmiyum - Bakır - Kurşun - Cıva	Madencilik, arıtma, eritme, böcek ilaçları, elektronik üretimi, inşaat, tıp endüstrisi.

Parabenler	• Parabenler	• Kozmetik ve farmasötiklerde koruyucu olarak kullanılmaktadır.
Benzofenonlar		• Kozmetik ve plastiklerde kullanılan bir UV filtresidir. Ayrıca matbaacılık, boya, mobilya ve ahşap kaplamalarda kullanılır.
Siklik metil siloksanlar		• Kozmetikte, kişisel bakım ve temizlik ürünlerinde kullanılmaktadırlar.
Perfloroalkiller	• Perflorooktanoik asit • Perflorooktan sülfonat	• Yapışmaz kaplamalarda, leke engelleyicilerde, tekstilde kullanılır.

4.3 Endokrin Bozucu Kimyasalların Etki Mekanizması

Çoğu çalışma EBK'lerin özellikle ER'ler ve androjen reseptörü olmak üzere nükleer reseptör ailesinin üyeleri tarafından aracılık edilen hormonal sinyallerin düzenlediği süreçlere odaklanmıştır. Ek olarak, tiroid hormonu reseptörlerinin ve daha yakın zamanda retinoid X reseptörünün (RXR) ve PPAR'ler EBK eyleminin hedefleri olduğu gösterilmiştir. EBK'ler bu sistemleri birkaç farklı yolla etkileyebilir, örneğin reseptör sinyallemesine doğrudan müdahale ederek veya diğer sinyal yollarını, özellikle birçok ksenobiyotik maddenin metabolizmasında rol oynayan bir reseptör olan aril hidrokarbon reseptörünü (AhR) aktive ederek etkileyebilirler.

EBK'lerin ER α veya ER β ile düşük bağlanma afinitesine sahip olduğu düşünülse de, bu kimyasallar dünyada yaygın olarak tüketilmektedir. EBK'ler genellikle bu kimyasalların endojen hormonlar olarak hareket etmesini sağlayan fenolik bir yapıya sahiptir. Sonuç olarak, EBK'ler agonist veya antagonist olarak steroid hormon reseptörleri ile etkileşime girebilirler (Shanle ve ark., 2011). Endokrin taklitçiler ER'ler ve diğer NR'ler arasındaki ER α aracılı transkripsiyonel aktiviteyi ve büyüme faktörü modülasyonunu bozabilirler. Ayrıca ER α ve G protein bağlı reseptör (GPR30) aracılığıyla ER α bağımlı kinaz yollarını da uyarabilirler (Watson ve ark., 2006).

EBK'ler ER'lere bağlanarak hedef genlerin transkripsiyon seviyelerini genomik veya genomik olmayan yollarla değiştirebilirler. ER'lerin genomik yolu, nükleer translokasyona uğrayan ve bunun üzerine östrojen cevap elemanlarına bağlanan transkripsiyonel süreçlerin modülasyonu ile tanımlanır, bu da hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesine yol açar (Manavathi ve Kumar, 2006). Genomik olmayan yol ise, sitozoldeki ER'lerin yanıtından farklı olan steroid hormon reseptörlerinden başlayarak sinyal transdüksiyonunu içerir. Bu genomik olmayan sinyaller, ikincil habercilerin veya kinazların aktivasyonunu sağlayarak GPR30'u indükleyerek estradiol ve EBK'lere aracılık eder. Bu bağlamda, son çalışmalar GPR30'un in vivo ve in vitro hem normal hem de kanser hücrelerinde EBK'ler tarafından indüklenen proliferatif etkilerde rol oynadığını göstermiştir. Bu nedenle, GPR30 sinyal yolu, EBK'lerin anormal östrojenle ilişkili sinyal yanıtına neden olabileceği sinyal iletim mekanizmaları arasına dahil edilmektedir (Vivacqua ve ark., 2006).

4.3.1 Aril hidrokarbon reseptörü (AhR'ler)

AhR, ligandla aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür ve ksenobiyotik maruziyete hücrel tepkinin anahtar düzenleyicisidir. bHLH-PAS proteinleri ailesine aittir, her yerde ifade edilir ve evrim boyunca iyi korunmuşlardır. Dioksinler, PCDF, PCB gibi organik bileşiklerin yanı sıra 3-metilkolantren, benzo[a]piren (BaP) ve benzoflavon gibi polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) da AhR'yi aktive ettikleri bilinmektedir (Poland ve Knutson, 1982).

AhR ve NR'lerin transkripsiyonel aktivasyonu çok benzerdir. Ligandın yokluğunda, reseptörler ya sitoplazmada ya da hücre çekirdeğinde şaperonlar ve / veya yardımcı baskılayıcılar içeren bir kompleks içinde bulunur (Petrulis ve Perdew, 2002). Ligand bağlanması, baskılayıcı kompleksin ayrılmasına, transkripsiyonel koaktivatörlerin görevlendirilmesine ve reseptör dimerizasyonuna yol açan konformasyonel değişiklikleri tetikler (Hankinson, 2005). NR'ler, RXR ile homodimerize olur veya heterodimerize olurken, AhR, zorunlu ortağı AhR nükleer translokator (ARNT) ile dimerize olur. Bu, nihayet NR veya AhR hedef genlerinin gen transkripsiyonuna yol açar (Swanson, 2002).

Dioksinler ve diğer AhR ligandları esas olarak anti-östrojeniktir ancak zayıf östrojenik aktivite de sergileyebilir (Ohtake ve ark., 2003). AhR ve ER'lerin çoğu hidrofobik ligand olan çok çeşitli kimyasallara bağlanırlar. En dikkate değer AhR ligandları çevresel kimyasallardır ve endojen bir ligand henüz tanımlanmamıştır (Nguyen ve ark., 2008). AhR ve ER'yi bağlayabilen kimyasalların birçoğu ortaktır. Son zamanlarda tamoksifen gibi farmasötik anti-östrojenlerin ve diğer birçok östrojenik ligandın AhR'yi aktive ettiği ve ER α veya ER β ekspresyonu olmayan meme kanseri hücrelerinde CYP1A1 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Dusell ve ark., 2010). Östrojenik ligandlar olarak bilinen daidzein ve genistein gibi diyet flavonoidlerinin, AhR'yi aktive edebildiği çalışmalarda gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2003).

4.4 Endokrin Bozucu Kimyasalların Sağlığa Etkileri

İnsan aktivitesi sonucu çevreye salınan maddeler insan ve hayvan endokrin sistemini etkileyebilir. Endokrin-aktif maddeler doğal olarak var olabileceği gibi insan üretimi ilaçlar, böcek ilaçları, endüstride kullanılan kimyasallar, tüketim ürünleri ve endüstriyel atıklar şeklinde de var olabilirler. “Endokrin aktif madde” tanımı direkt ve indirekt olarak endokrin sistemi ve dolayısıyla hedef organı ve dokuları etkileyen maddeler için kullanılmaktadır. Etkinin olumsuz olup olmadığı etkinin türüne, doza ve arka plandaki fizyolojik durumuna bağlıdır. Maruz kalınan kaynak sınırlı ise veya maruz kalınan madde suda çözünabilir formdaysa genelde bu eksojen madde metabolize edilerek vücuttan atılır, bu durum genelde bitki kökenli östrojenler (fitoöstrojen) için geçerlidir. Benzer şekilde erişkinlerde doğum kontrol hapları gibi

farmasötiklerin kullanımına ara verilmesinden sonra da vücut kendi dengesine yeniden döner. Ancak genç kızlar için zamansız maruziyet erken ergenliğe neden olabilir. Bu tür bir bozulma, olumsuzlukla sonuçlandığında EBK terimine dahil edilir: "Bir endokrin bozucu, endokrin sistemin işlevlerini değiştiren eksojen bir madde veya karışımdır ve sonuç olarak organizmada veya alt popülasyonlarında istenmeyen sağlık problemlerine sebep olur" (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2009).

Endokrin sistemin bozulması; adet döngüsü, menopoz, andropoz, ergenlik gibi birçok fizyolojik sürecin etkilenmesine neden olabilir. Sonuç olarak da gelişimsel bozukluklara, kansere, immün ve sinir sistem fonksiyon bozukluklarına neden olabilir (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2009).

Kritik gelişme döneminde EBK maruziyeti olursa, gelecek nesillere aktarılabilecek derin ve kalıcı etkiler ortaya çıkabilir. İnmemiş testisler (kriptorşidizm), anüs ile üreme organları arasındaki mesafenin kısalması (anogenital mesafe) ve idrar deliğinin anormal konumu (hipospadias) gibi ürüme organlarında meydana gelen gelişim anomalileri geri döndürülemezdir ve sadece ameliyatla düzeltilebilir. EBK'ler sperm kalitesini düşürebilir ve infertiliteye neden olabilirler. Bilişsel gelişim zarar görebilir; IQ eksiklikleri ve dikkat eksikliği bozuklukları ortaya çıkabilir. Vücuttaki endokrin süreçler ve dokular da spesifik olarak etkilenebilir ve bunlara ek olarak EBK'ler obezite, diyabet ve stres ile de yakından ilişkilendirilmektedirler. Bu tür olumsuz etkiler bireysel olduğu kadar popülasyon seviyelerinde de görülebilir, EBK'lerin çarpık cinsiyet oranlarına neden olduğu, (dişi/erkek oranı) hem yaban hayatı hem de insan popülasyonları için rapor edilmiştir (Kabir ve ark., 2015).

4.4.1 EBK'ler ve lipit metabolizması

Kontamine gıda ve su tüketimi, havadan gelen kirleticilerin solunması, insanların EBK'lere maruz kalmasının başlıca kaynaklarıdır ve adipojenizin uygunsuz bir şekilde uyarılmasının yanı sıra lipit metabolizmasını ve enerji dengesini bozarak obezitenin başlamasına önemli ölçüde katkıda bulunur (Grün ve Blumberg, 2009). Lipit birikimini ve adipogenezi uygun olmayan bir şekilde düzenleyen ve teşvik eden tüm bu EBK'ler "obezojenler" olarak tanımlanır (Grün ve Blumberg, 2007). Son yıllarda lipit metabolizmasını etkileyebilecek yeni bileşiklerin eklenmesiyle

obezojenik bileşiklerin listesi önemli ölçüde genişledi. EBK'lere maruz kalma, adipositlerin boyutunu ve sayısını doğrudan artırabilir veya dolaylı olarak bazal metabolik hızı ve hormonal iştah kontrolünü etkileyebilir (Heindel ve ark., 2017). Hipotalamus-hipofiz-adrenal üçlüsü; sindirim sisteminde, yağ dokusunda ve beyinde üretilebilen çeşitli monoaminergic, peptiderjik ve endokannabinoid sinyaller tarafından düzenlenen uyaranlarla iştah ve tokluğun kontrol edilmesinde önemli bir rol oynar. Tüm bu sinyaller, potansiyel obezjenik EBK'lerin aday hedefleridir. Karaciğer, yağ ve bağırsak gibi pek çok dokuda rolü çok önemli kabul edilen lipitler, enerji ihtiyacı durumunda kullanılıncaya kadar biriktirilir ve depolanır (Nielson ve Rutter, 2018). Enerji dengesini, besin alımını, büyümeyi, üremeyi ve sağlığı yöneten esansiyel yağ asitlerinin kaynağı olarak diyetle lipit alımının temel rolünü ortaya çıkarmak için şimdiye kadar birçok çalışma yapılmıştır. Lipit birikiminin düzensizliği; Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve hiperlipidemi dahil olmak üzere birçok metabolik sendromun temelini oluşturur (Dongiovanni ve Valenti, 2015). Potansiyel EBK'lere fetal veya erken doğum sonrası maruz kalma, yaşamın ilerleyen dönemlerinde obezite üzerindeki kalıcı etkilere neden olabilmektedir.

Son yıllarda, peroksizom proliferatörleri olarak bilinen bir grup ksenobiyotik bileşiğin incelenmesi, nükleer reseptörlerin yeni bir alt ailesi olarak PPAR'lerin keşfedilmesine yol açmıştır (Isseman ve Green, 1990). PPAR'ler RXR ile dimerize olup adipogenez, glukoz, lipit ve kolesterol metabolizmasında rol oynayan genlerin anlatımını kontrol eden PPAR'a duyarlı DNA düzenleyici elemanlara bağlanırlar (Varga ve ark., 2011). ER α 'ya benzer şekilde, son zamanlarda PPAR'lerin genomik olmayan, hızlı bir sinyal yolağını aktive edebildiği gösterilmiştir (Luconi ve ark., 2010). Şimdiye kadar birçok çalışma, potansiyel EBK'lere yanıt olarak ER-genomik olmayan hızlı yolağın aktivasyonunu aydınlatmıştır, fakat PPAR-genomik olmayan sinyalleme aktif etme kabiliyetlerine ilişkin bilgiler hala eksiktir (Luconi ve ark., 2010).

4.4.2 EBK'ler ve apoptoz

Apoptoz, normal olarak gelişim ve yaşlanma sırasında, dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için yani homeostazın sağlanması için gerekli programlı hücre ölümüdür. Çok hücreli organizmalarda, homeostaz, hücre proliferasyonu ve

hücre ölümü arasındaki denge yoluyla sürdürülür. Viral olarak enfekte ve hasar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılmasındaki rolü nedeniyle apoptoz, hastalıkların önlenmesinde merkezi bir role sahiptir. Apoptoz, ayrıca zararlı maddelerden hücreler zarar gördüğünde bir bağışıklık cevabı olarak veya savunma mekanizması olarak ortaya çıkabilir. Apoptozu tetikleyebilecek hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyaran ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücreler aynı uyarana yanıt olarak ölmeyebilirler. Radyasyon veya kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarına neden olur ve bu da p53'e bağlı bir yolla apoptotik ölümeye yol açabilir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, bazı hücrelerde apoptotik ölümeye yol açabilir, ancak diğer hücreler etkilenmeyebilir ve hatta uyarılabilirler. Apoptoz; DNA fragmentasyonu, sitoplazmik yoğunlaşma, nükleer piknoz, kromatin yoğunlaşması, sitoskeletal çöküş ile karakterize bir olaydır (Norbury ve Hickson, 2001).

1993 yılında, *C. Elegans*'a ait ced-3 geninin, insan interleukin-1 β -dönüştürücü enzime benzer bir sistein proteazı kodladığı gösterilmiştir. İnterleukin-1 β -dönüştürücü enzimin (daha sonra kaspaz-1 olarak yeniden adlandırıldı) aşırı ekspresyonunun, memeli hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. *C. elegans*'ın memeli kaspaz-1 ve CED-3'ün yapısal ve işlevsel benzerliği, memelilerde çok sayıda kaspaz aile üyesinin keşiflerine ve araştırma faaliyetlerinin artmasına neden oldu. İnsanlarda 12 tane ayrı kaspaz tanımlanmıştır. Kaspazlar ilk olarak prokaspaz şeklinde sentezlenirler ve daha sonra belirli kısımları uzaklaştırılarak aktif kaspaz formunu almaları sağlanır (Elmore, 2007). Kaspazların apoptoz basamaklarındaki rolü apoptotik uyaranlarla aktive olmak (effektör) ve apoptozu başlatmak adına bu uyarıya cevap olarak proapoptotik sinyaller oluşturmaktır. Kaspazlar bir p20 büyük alt birim ve bir p10 küçük alt birim içeren inaktif zimojenler olarak sentezlenir. Kaspazlar, bilinen ana işlevlerine dayanarak, pro-apoptotik ve proinflamatuvar olmak üzere iki sınıfta gruplandırılabilirler. Pro-apoptotik kaspazların (kaspaz-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) esas olarak hücre ölümü sinyal transdüksiyonuna aracılık ettiği bilinirken, pro-inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5, -11, -12) inflamasyon sırasında sitokin olgunlaşmasını düzenler. Kaspazların anormal aktivasyonu veya aktivasyonunun olmaması, kanser, otoimmün hastalıklar, sepsis, immün yetmezlik ve nörodejeneratif bozukluklar dahil bir dizi patolojiye yol açar.

Kaspaz-3, effektör kaspazların en önemlisi olarak kabul edilir ve başlatıcı kaspazlarından herhangi biri tarafından etkinleştirilir (kaspaz-8, kaspaz-9 veya kaspaz-10). Kaspaz-3 spesifik olarak endonükleaz CAD'i aktive eder. Çoğalan hücrelerde CAD, inhibitörü ICAD ile kompleks halindedir. Apoptotik hücrelerde, aktive edilmiş kaspaz-3, CAD ve ICAD'yi birbirinden ayırır (Sakahira ve Nagata, 1998). CAD daha sonra çekirdeklerdeki kromozomal DNA'yı bozar ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur. Kaspaz-3 ayrıca hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve hücrenin apoptotik cisimlere parçalanmasını indükler.

BPA, nonilfenol ve dioksinin apoptozu tetiklediği ve kaspaz anlatım seviyelerini değiştirdiği birçok çalışmada gösterilmiştir (Urriola-Muñoz ve ark., 2018; Chen ve ark., 2010)

4.4.3 EBK'lerin üreme sistemine ve cinsiyet gelişimine etkileri

Balık popülasyonlarında dişilerin artan üstünlüğü, sadece bilim insanları için değil, çevre otoriteleri için de bir endişe konusu haline geldi. Örneğin, Almanya'da Berlin'in geniş su kanallarında, balık popülasyonunun %70'i dişidir. Aynı balıkta hem erkek hem de dişi özelliklerin varlığı interseks olarak adlandırılmaktadır. İnterseks balıklar endokrin sistemin bozulması sonucu ortaya çıkmaktadırlar. Endokrin sistemin bozulması; beyin ve sinir sistemi ile üreme sisteminin gelişimi ve işlevi ile çevredeki stres faktörlerine yanıtlar üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir (Arcand-Hoy ve Benson, 1998).

Balıkların çoğunda cinsiyetin belirlenmesi genetik kontrol altındadır. Cinsiyet seks kromozomları tarafından döllenmenin ardından belirlenir. Fakat bazı balıklarda otozom kromozomlar (cinsiyetten sorumlu bazı genler tarafından) tarafından da belirlenebilmektedir. Balıktaki cinsel farklılaşmanın memeli sistemlerine benzer olduğuna inanılmaktadır, testis belirleyici faktörün varlığı veya yokluğu erkek ve dişi farklılaşmasını sağlamaktadır. Over veya testis gelişiminden sonra ikincil seks karakterleri hormonal kontrol tarafından sağlanmaktadır. Sucul yaşamda östrojen veya androjenlere maruziyetin cinsiyet gelişimine olan etkisi uzun yıllardır bilinmektedir. Genetik olarak erkek olan balıklar dişi gonadlarına sahip olabilirken, genetik olarak dişi olan balıklar erkek balık olarak davranabilmektedirler. Bu da

potansiyel olarak genetik olarak aynı cinsiyete sahip olarak balıkların çiftleşme ihtimalini ortaya çıkarmaktadır. Genetik olarak erkek olan bir balık fenotip olarak dişi görünen fakat genetik olarak erkek olan bir bireyle çiftleştiğinde tamamen erkek bir popülasyon meydana getirecektir. Aynı durum tam tersi için de geçerlidir, genotip olarak dişi olan bir balık, fenotip olarak erkek fakat genotip olarak dişi olan bir balık ile çiftleştiğinde oluşacak yavruların tamamı dişi olacaktır. Bu da türler içinde dengesiz dişi/erkek oranına neden olabilir (Arcand-Hoy ve Benson, 1998).

Birçok çalışma BPA maruziyetinin rodent gelişiminde cinsiyet oluşumunu etkilediği bildirilmiştir. Ve bu bölgeler pre ve perinatal olarak EBK maruziyetinden etkilenebilirler. Cinsiyetle alakalı etkiler ergenlik döneminden önce bile gözlenebilir. Gelişmekte olan hipotalamusun BPA'ya maruziyeti kaynaklı, cinsiyete özgü hassasiyeti vardır; preoptik alan ve mediobazal hipotalamus en çok çalışılan ve güçlü bir şekilde etkilenen bölgelerdir (Martini ve ark., 2010). Farelerde prenatal dönemde yapılan bir çalışmada düşük veya yüksek dozda BPA veya DES'ye maruz kalmanın erkek fareleri daha da hipermaskülen dişi fareleri ise maskülen hale getirdiği tespit edilmiştir (Rubin ve ark., 2006). Serebral korteks, hipokampus ve hipotalamus rodent beyinde bulunan dimorfik bölgelerdir.

4.4.4 EBK'ler ve kanser ilişkisi

Endokrin bozucuların kanserdeki rolünü araştıran çeşitli çalışmalar vardır. Meme kanseri ve prostat kanseri, endokrin bozucuların neden olduğu tipik kanserlerdir (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2009). Tamamlanan çeşitli çalışmalara rağmen, kanserdeki endokrin bozucuların doğrudan rolleri tam olarak anlaşılamamıştır. Birçok araştırmacı, endokrin bozucuların yarattığı fizyolojik dengesizliğin kansere neden olabileceği sonucuna varmıştır. Genellikle endokrin bozucuların kadınlara erkeklerden daha zararlı olduğu düşünülmektedir ve bu sebeple çoğu çalışma endometrial kanser ve yumurtalık kanserine odaklanmaktadır (Caserta ve ark., 2008).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, tüm kanserlerin yaklaşık % 20'si çevresel faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bu faktörler arasında birçok kimyasal gerçekten iyi tanınan kanserojenlerdir (Hardonnière ve ark., 2017). Gelişmenin kritik aşamalarında

endokrin bozuculara maruz kalma, normal hormonal sinyalizasyonu engeller ve değişmiş gen ifadesine neden olur. 1950’lerde düşük önleme amacıyla kullanılan, sentetik bir östrojen olan dietilstilbestrole (DES) gebelikte maruz kalmanın; genital sistemde uyarılmış değişikliklere ve vajinada berrak hücreli karsinom geliştirmeye sebep olabileceği ayrıca DES’ye maruz kalan kadınların kız çocuklarında vajina ve servikte adenozis görüldüğü gibi, berrak hücreli adenokarsinom riskinin normal populusyona göre fazla olduğu gözlenmiştir (Verloop ve ark., 2017).

BPA ve metoksiklora maruziyetin, insan meme kanseri hücrelerinin büyümesine ve östrojen reseptörü bağımlı sinyalizasyonu etkileyerek hücre döngüsü ile ilişkili genlerden olan *siklin D1* ve *p21* ekspresyonunun değişmesine neden olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 2012).

PCB maruziyeti ile prostat kanseri mortalitesi arasında daha önce gözlemlenen ilişkiler bir çalışmada doğrulanmamıştır (Ruder ve ark., 2017). Bununla birlikte, 4,5 yıllık takip süresince PCB’lerle alakalı yapılan bir çalışmada 67 melanom vakası tespit edildi ve PCB'lere maruz kalmanın, dört kat artmış malign melanom riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bertke ve ark., 2016).

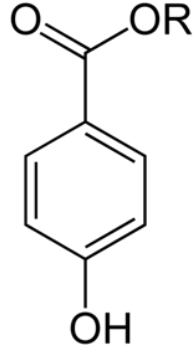
PBDE-209’un göğüs, yumurtalık ve rahim ağzı kanseri hücrelerinin büyümesinin ve apoptozunun düzenlenmesindeki etkileri ile ilgili olarak, S fazını veya G2 / M fazını indükleyerek hücre döngüsü düzenlenmesini değiştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, PBDE-209, göğüs kanseri hücre hattında tamoksifen kaynaklı hücre apoptozunu kısmen baskıladığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2012).

Parabenlerin de insan meme kanseri hücre hatlarında hücre büyümesini ve çoğalmasını artırdığı farklı in vitro çalışmalar gösterilmiştir (Lillo ve ark., 2017).

4.5 Parabenlerin Genel Özellikleri

Antifungal ve antibakteriyel ajanlar olarak kullanılan, bir grup para-hidroksibenzoik asit esteri olan parabenler (Şekil 2), kişisel bakım ürünlerinde (şampuanlar, makyaj malzemeleri, diş macunu, nemlendiriciler, güneş koruyucular vb.), gıda maddelerinde ve ilaçlarda koruyucu olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Matwiejczuk ve ark., 2020). Kozmetik ürünlerin içerebileceği paraben oranları

Avrupa kozmetik birliğine göre tek ester için % 0,4 ve ester karışımları için % 0,8 olarak bildirilmiştir.



Paraben_____	R_____
Metilparaben	- CH ₃
Etilparaben	- CH ₂ CH ₃
Propilparaben	- CH ₂ CH ₂ CH ₃
Bütilparaben	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃

Şekil 2: Parabenlerin genel kimyasal yapısı

Bazı bilimsel çalışmalar, endokrin sistemin etkilenmesini 70 yıldan uzun süredir kullanılan parabenler ile ilişkilendirdiğinden, parabenofobi tüm dünyaya hızla yayılmaya başladı. Medya ve basın, çoğunlukla kamuoyu üzerindeki yüksek etkileri nedeniyle işleri daha da kötüleştirdi. Parabenlerin kötü ünü, günümüzde toplumun alternatif olarak neyin kullanıldığını gerçekten düşünmeden sadece paraben içermeyen ürünleri satın almasına neden oldu. Parabenler kozmetikte çoğunlukla topikal preparatlarda bulunurken, farmasötiklerde çeşitli formülasyonların parçasıdırlar. Yaygın olarak kullanılan parabenler; metilparaben (E numarası E218), etilparaben (E214), propilparaben (E216), butilparaben ve heptilparaben (E209)'dir. Daha az yaygın kullanılan parabenler arasında izobutilparaben, izopropilparaben, benzilparaben ve bunların sodyum tuzları bulunur. Genellikle metil-, etil- ve propilparaben kombinasyon halinde kullanılırken; özellikle metil- ve propilparaben kişisel bakımda ve farmasötiklerde büyük oranda birlikte kullanılmaktadır (Brand ve ark., 2017).

3297 kadın üzerinde yapılan bir çalışmaya göre kozmetik ürünler içerisinde parabene en fazla maruz kaldığımız ürünlerin başında vücut kremleri ve vücut losyonları gelmektedir (Tablo 2). Ayrıca bu çalışmaya göre 22 kişisel bakım ürününden

tamamını kullanan bir kadının günlük maruz kalacağı paraben miktarı 4,1137 mg/kg olarak belirlenmiştir (Cowan-Ellsberry ve Robison, 2009)

Tablo 2: Kadınların kişisel bakım ürünlerinden maruz kaldığı paraben dozları

Ürün	Maruziyet (mg/kg/gün)		
	Metilparaben	Etilparaben	Propilparaben
Allık	0,0006	0,0003	0,0002
Vücut kremi	0,5367	0,5367	0,2683
Vücut losyonu	0,5367	0,5367	0,2683
Duş jeli	0,004	0,0004	0,0042
Saç kremi	0,0042	0	0,0021
Eyeliner	0,0002	0,0003	0,0007
Makyaj temizleyici	0,004	0	0,002
Far	0,0014	0,0007	0,0005
Pudra	0,0033	0,0025	0,0017
Yüz serumu	0,0084	0,0166	0,0083
Yüz temizleyiciler	0,0167	0	0,01
Yüz maskesi	0,1333	0	0
Yüz nemlendiricisi	0,0533	0,0533	0,0267
Fondöten	0,07	0,4	0,05
Saç şekillendirici	0,042	0,008	0,04
El losyonu	0,12	0,1167	0,06
Saç spreyi	0,0068	0	0
Ruj	0,0289	0	0,027
Maskara	0,0013	0,0008	0,0005
Gece kremi	0,0267	0,0267	0,0133
Şampuan	0,0055	0	0,0055
Tonik	0,0007	0	0
Göz altı kremi	0,0067	0,005	0,0083
Total maruziyet	1,6114	1,7047	0,7976

Daha önce, antimikrobiyal etkinlikleri nedeniyle, enjeksiyonlarda ve oftalmik preparatlarda parabenler bulunurken, günümüzde olası tahrişleri önlemek için bu tür kullanımlar azaltılmıştır (Sheskey ve ark., 2017). Parabenler, özellikle gram-pozitif bakteri ve mantarlara (küfler dahil) karşı geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve geniş pH aralığında kimyasal olarak kararlı ve etkilidir. Parabenler kokusuz ve tatsızdır, bu da onları oldukça tercih edilir kılar. Parabenlerin antimikrobiyal aktivitesi, metilparabenden butilparabene kadar alifatik zincirlerinin uzunluğu ile artar. Zincir uzunluğu arttıkça çözünürlük azalmaktadır bunun üstesinden de çeşitli paraben tuzları kullanılarak gelinmektedir. Parabenlerin stabilitesi, polisorbitat 80 gibi iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin varlığında önemli ölçüde azalır. Ayrıca, hidroksipropil selüloz, metilselüloz, bentonit, magnezyum trisilikat, talk, kitre, sodyum aljinat, sorbitol ve atropin gibi diğer bazı bileşiklerle uyumsuzluklar gözlenmiştir. Bu nedenle, daha iyi antimikrobiyal etkinlik elde etmek için parabenler genellikle diğer antimikrobiyal maddelerle kombinasyon halinde kullanılır (Sheskey ve ark., 2017).

Darbre ve ark. tarafından kanserli meme dokusunda parabenlerin tespit edilmesinden sonra parabenler birçok bilim insanı için araştırma odağı haline geldi ve çoğunlukla parabenler “kötü” olarak nitelendirildi. Tekrarlı doz-toksikite testleri, tekrarlı oral maruziyet testlerinden sağlığı ciddi manada tehdit eden sonuçlar çıkmamasına rağmen (Hessel ve ark., 2018; Avrupa Komisyonu (EC)); idrar, kan, meni, yağ dokusu, plasenta, amniyotik sıvı ve anne sütü gibi çeşitli biyolojik numunelerde de parabenlerin keşfedilmesi (Fisher ve ark., 2017) paraben kullanımına karşı bir önyargı oluşmasına neden oldu. Başlangıçtan itibaren ele alınması gereken şey, parabenleri EBK olarak işaret eden bilimsel çalışmalar çoğunlukla oral maruziyet yoluna sahipken, topikal yolun daha az yaygın kullanılmasıdır (Janjua ve ark., 2008). Topikal yol ihmal edilmemelidir, çünkü çok sayıda kozmetik ve farmasötik preparat sadece bu şekilde kullanılmaktadır.

4.5.1 Parabenlerin biyotransformasyonu, farmakodinamiği ve biyoizlemesi

Paraben biyotransformasyon çalışmaları, parabenlerin %90'ından fazlasının idrarda konjugatlar (glukuronid ve sülfat konjugatları) olarak atıldığını, buna karşılık sadece küçük bir kısmının konjuge edilmeden kaldığını bildirmiştir (Ye ve ark., 2006).

Konjuge parabenlerin biyolojik aktiviteye sahip olmadığı düşünülmektedir. Parabenlerin deriye nüfuzu çeşitlilik göstermektedir ve türler arasında da farklılık göstermektedir. Ek olarak, topikal olarak uygulanan propilparabenin (tüm insan vücuduna) yalnızca %0,9'u serbest formda idrarda geri kazanılabilir. Bu da alifatik zincir uzadıkça artan parabenlerin değişken lipofilitesi, cilt katmanlarının değişik kalınlıkta olması, formülasyonda kullanılan çözücülerin çeşidi, sınırlı maruz kalma süresi, deride bulunan esterazlar ile parabenlerin hidroliz olması gibi nedenlerle açıklanabilir. Oral maruziyet yolundan veya deri tarafından emilen parabenler, pHBA ve p-hidroksipurik aside (pHHA) hidrolize edilir. pHHA, hayvanlarda ve insanlarda bulunan parabenlerin bir biyotransformasyon ürünüdür. İnsanlar, tirozin metabolizmasının bir ürünü olarak endojen olarak da pHHA üretir (Final Amended Report, 2008).

Yapılan bir çalışmada, parabenlerin farmakokinetik ve toksikokinetik değerlendirmeleri için kullanılabilen bir propilparaben (PP) farmakokinetik modeli geliştirdi. Kısaca, ağızdan verilen PP hızla emildi (<2 saat) ve hızla ve tamamen ortadan kaldırıldı; terminal yarılanma ömrü, yani vücutta maddenin kalan fraksiyonunun yarısının elimine edilmesi için geçen süre 2,9 saat olarak hesaplandı. pHBA, pHHA ve serbest PP, konjuge PP'den biraz daha hızlı elimine edilirken, % 39'luk oral PP biyoyararlanımı (emilen dozun bir kısmı olarak ifade edilir) yalnızca kaba bir tahmindir (Shin ve ark., 2019). Bunların tümü göz önüne alındığında, ciltten paraben absorpsiyonunun derecesinin yüksek olmadığı ve dolayısıyla biyoyararlanımının düşük olmasının beklenmektedir. Öte yandan, bazı veriler, parabenlerin in vivo dermal absorpsiyonunun iddia edildiğinden daha etkili olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu konuda kesin bir cevap verebilmek için daha fazla farmakokinetik ve toksikokinetik çalışmalara kesinlikle ihtiyaç vardır.

Ek olarak, Çinli kadınlarda gerçek örneklerin ölçümüne dayanan günlük toplam paraben maruziyetine ilişkin yeni veriler (gıda maddeleri, kozmetikler ve farmasötikler yoluyla), günlük maruziyetin 0.326 mg kg^{-1} olduğunu bildirmektedir (Ma ve ark., 2013).

Toksikolojide dozun zehri zehir yaptığı düşüncesi EBK'lere uygulanamaz, çünkü bunların farmakolojik etkileri tipik bir reseptör aracılı etki mekanizması tarafından

yönetilmez. Başka bir deyişle, en küçük EBK dozu bile hücre proliferasyonuna sebep olabilirken, daha yüksek bir doz ters etkiye sahip olabilir (hücre büyümesinin engellenmesi gibi).

İnsan idrarının analizi, doğrudan parabenlere maruz kalmayı yansıtır ve iyi bir biyozileme yöntemi olarak hizmet eder. Böyle bir çalışma, Amerikan popülasyonunun % 99' unda parabenlerin tespit edildiğini ortaya koydu. En çok kullanılan paraben grubundan metil- ve propilparaben en sık tespit edilenlerdi. Erkeklerle kıyasla kadınların 3 kat daha yüksek metilparaben değeri ve yedi kat daha yüksek propilparaben değeri vardı. Dahası, siyah popülasyon beyaza kıyasla daha fazla maruziyete sahipti ve denekler arasında sağlık durumunda hiçbir farklılık gözlenmemiştir (Calafat ve ark., 2010). İdrarda paraben tespitine rağmen, yazarlar idrardaki ölçülebilir paraben seviyesinin insan sağlığı için bir risk oluşturmadığı konusunda hemfikirdir. Ek olarak, göğüs tümörü, seminal plazma, yağ dokusu, anne sütü, plasenta ve kordon kanında da parabenler tespit edilmiştir, bu da genel popülasyonun kaçınılmaz olarak günlük yaşamda parabenlere maruz kaldığını göstermektedir.

4.5.2 Parabenlerin toksik etkileri

Parabenler uzun süre zararsız kabul edildi ve bu nedenle koruyucu olarak yaygın şekilde kullanıldılar. Fakat günümüzde endokrin bozucu potansiyellerinden kaynaklanan endişe nedeniyle paraben güvenliği hakkında tartışma devam etmektedir. Daha önce belirtildiği gibi, parabenler *in vitro* östrojenik aktiviteye sahiptir ancak çok düşük seviyededir. Parabenlerde alifatik zincir uzunluğu arttıkça östrojenik aktivite de artmaktadır. Yapılan bir çalışmada estradiolle kıyaslandığında sırasıyla; metil-, etil-, propil-, bütillparaben 2.5×10^6 , 1.5×10^5 , 3×10^4 , 1×10^4 kat daha az ER'ye bağlanma potansiyeli vardır (Routledge ve ark., 1998).

Metil-, propil- ve butilparabenin 5 hafta süreyle (günde 100 mg kg^{-1} olacak şekilde) dişi sıçanlara oral olarak uygulandığı bir çalışmada, sonuçlar parabenlerin yumurtalık disfonksiyonunu hızlandırdığını, folikülojenezi ve steroidogenezi bozduğunu gösterildi (Lee ve ark., 2017).

Bir başka çalışmada parabenlerin *in vivo* östrojenik aktivitesi, dişi sıçan uterusunun genişlemesinin izlenmesiyle değerlendirildi. Üç gün boyunca oral olarak metil- ve butilparaben uygulandıktan sonra, ne metilparabenin (günde 800 mg kg⁻¹'e kadar) ne de butilparabenin (günde 1200 mg kg⁻¹'e kadar) verildiğinde rahimde genişlemeye neden olmadığı görülmüştür (Vo ve Jeung, 2009).

Butilparaben (Oishi, 2001) ve propilparabende (Oishi, 2002) yapılan iki farklı çalışmada iki paraben türünün erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri araştırıldı. 4-6 haftalık kemirgen erkekler (sıçanlar ve fareler) 4 hafta boyunca günde 15, 150 ve 1500 mg kg⁻¹'e kadar parabenlerle beslendi. Çalışma, sperm üretimi, sperm rezervi, epididimis kitlesi, testisler, prostat ve testosteron seviyesinin ölçülmesinden oluşuyordu. En düşük dozda paraben alımı herhangi bir etki göstermezken, daha yüksek dozla her iki türde de testosteronu düşürdü. Ayrıca, en yüksek dozda butilparaben alımına sahip sıçanlarda epididimis kütlelerinde %15 azalma olurken, farelerde % 15 artış vardı. Yapılan benzer bir çalışmada ise testosteron seviyelerinde, spermatogenezde herhangi bir değişiklik olmadığı ve paraben dozlarına bağlı herhangi istenmeyen bir etkinin olmadığı sonucuna varıldı (Hoberman ve ark., 2008).

Yayınlanan bir derlemeye göre obesojenler olarak adlandırılan kimyasalların endokrin sistem, enerji metabolizması ve adipoz dokuya etkisi olabileceği ortaya konmuştur. Bu makalede parabenlerin obesojenik potansiyele sahip olduğu ve obezitenin birçok hastalığa kanser de dahil olmak üzere neden olabileceği açıklanmıştır (Darbre, 2017).

Yapılan bir çalışmada idrarda tespit edilen parabenlerle, üreme çağındaki ve çocuk sahibi olmak isteyen erkeklerin sperm kaliteleri arasında bir ilişki olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ve parabenlerin üriner konsantrasyon ile infertilite arasında pozitif korelasyon gösterilmiştir (Smarr ve ark., 2017). Fakat bir başka çalışmaya göre üriner paraben konsantrasyonu ile *in vitro* fertilizasyon başarısı arasında bir bağlantı olmadığı gösterilmiştir (Mínguez-Alarcón ve ark., 2019).

4.6 Epigenetik

1942 yılında ilk kez Waddington tarafından ortaya atılan “epigenetik” terimi genotipte değişiklik olmaksızın fenotipte meydana gelen değişiklikler olarak tanımlandı. Günümüzde artık biliyoruz ki epigenetik, DNA dizisinde değişiklik meydana gelmeksizin kromatin adaptasyonundan kaynaklanan değişimlerdir.

Kromatin immüno-çöktürme ve yeni nesil dizileme analizleri (ChIP-seq) gibi metotların da gelişmesiyle, epigenom profilinin aydınlatılması hız kazandı. Epigenom profillemenin hız kazanmasıyla enhancer ve promotör gibi DNA kontrol elementleri de daha iyi anlaşılabilir hale geldiler. DNA dizileme analizleriyle hastalık mekanizmaları da daha anlaşılabilir hale geldi. Bilinen çoğu epigenetik modifikasyonun çoğu geri dönüşü olabilen değişimlerdir ve bu sebeple adaptif bir sisteme sahip olan epigenetik mekanizmalar tedavi metotlarına önemli kapılar açmayı vaat etmektedirler. Epigenetik günümüzde modern biyolojiye dair en inovatif alanlarından biridir.

Epigenetiğin temelleri, 1869-1926 yılları arasında Miescher, Flemming, Kossel ve Heitz’in nükleik asitleri, kromatin ve histon proteinlerini tanımlamasıyla atıldı. Bunlar da ökromatin ve heterokromatin arasındaki farkların ortaya çıkarılmasına öncülük ettiler. Bunları Muller’in *Drosophila melanogaster*’de ve McClintock’un mısırdaki transposable elementler hakkında yaptığı çalışmalar izledi ve non-Mendelian kalıtımın da temelleri atılmış oldu. X kromozomu inaktivasyonu ve imprinting’in de keşfedilmesiyle aynı nükleusun içinde var olan eş genetik materyallerin bile bazısının aktif diğerinin inaktif olabileceği anlaşılmış oldu (Allis ve Jenuwein, 2016).

Son zamanlarda EBK’ler ve epigenetik mekanizmalar arasındaki ilişkiyi aydınlatmak için birçok çalışma yapılmış olsa da sayıca yetersizdir.

4.6.1 DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, bir metil grubunun DNA metiltransferazları (DNMT’ler) ile DNA’nın sitozin halkasının C-5 konumuna kovalent transferini içeren kalıtsal bir epigenetik işarettir. Somatik hücrelerde DNA metilasyonunun %98’i CpG

dinükleotidlerinde görülürken, embriyonik kök hücrelerde total metilasyonun çeyreği CpG dinükleotidi olmayan bölgelerde gerçekleşmektedir (Gruenbaum ve ark., 1982). DNA metilasyonu zigot gelişimi esnasında ortadan kaldırılırken embriyo aşamasında ve daha ilerde dinamik bir yapıya sahiptir. DNA metilasyonu normal gelişim için elzemdir; genomik imprinting, X-kromozomu inaktivasyonu, repetitif element transkripsiyonu ve transpozisyonu gibi olaylarda rolü vardır ve işlevini yerine getiremediği takdirde kanser gibi hastalıkların meydana gelmesine sebep olabilir.

DNA'da meydana gelen modifikasyonlar ilk kez 1948 yılında keşfedildi. DNA metilasyonunun özellikle 5-metilsitozinin (5mC) gen regülasyonundaki önemi 1970'lerin ortalarında Holliday ve Pugh tarafından ortaya konuldu. 1980'de DNA metilasyonu ve gen baskılanması arasında bağlantı olduğu keşfedildi ve CpG adalarının varlığı anlaşıldı (Bird ve ark., 1985). İlk "epigenetik ilaç" olan 5-azasitidin, DNA metilasyonunu inhibe etmek ve gen anlatımını değiştirmek amacıyla fibroblast hücre hattında denendi (Taylor ve Jones, 1979). Daha sonra kanserde DNA hipometilasyonu ve tümör baskılayıcı genlerde DNA hipermetilasyonunun varlığını keşfedildi (Feinberg ve Vogelstein, 1983; Feinberg ve Tycko, 2004). Fare DNA metiltransferaz 1 (DNMT1) enziminin klonlanmasıyla da metiltransferazların önemi anlaşılmış oldu. Aynı zaman dilimi içinde DNA-metil bağlama proteini MeCP2 (metil-CpG-bağlama proteini 2) keşfedildi. DNA metilasyonu ve 5mC birçok organizmada aydınlatılmış oldu (Meehan ve ark., 1989).

DNA metilasyonu, DNMT ailesi tarafından düzenlenir. DNMT'ler genomik bütünlüğün sağlanmasında önemli rol oynar ve işlevlerini yerine getirememeleri kromozom instabilitesi ve tümör gelişimi ile sonuçlanır. DNMT'lerin X-kromozomu inaktivasyonu ve transposable elementler üzerinde "transkripsiyonel susturma" etkisi kromozom stabilitesinin korunması için önemlidir. DNA metiltransferaz ailesinde yapılan delesyon çalışmalarında özellikle tekrar dizilerinde ve genom stabilizasyonunda önemli oldukları ortaya çıkarıldı. *Dnmt3a* ve *Dnmt3b*'ün beraber knockout edilmesinin telomer rekombinasyonuna neden olduğu ortaya konuldu. DNMT3B özellikle perisentromerik satellit tekrarlarının stabilizasyonunda önemlidir. DNMT3B yetersizliği perisentromik bölgede genişlemeye ve yeniden düzenlenmeye sebep olur. ICF (İmmünyetersizlik, sentromer instabilitesi ve yüz

anomalileri) sendromu *DNMT3*’de meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (Allis ve Jenuwein, 2016).

4.6.2 Histon modifikasyonları

Histonlar, DNA’nın paketlenmesinden sorumlu olan büyük ölçüde korunmuş proteinlerdir. Sekiz histon molekülünün etrafına sarılmış yaklaşık 146 baz çifti (bç) uzunluğundaki sarmal DNA, nükleozom adı verilen bazal birimleri oluşturur. DNA, hücre çekirdeğine sığması için nükleozomlara sıkıştırılmalıdır. Nükleozom yapısına katılan histon proteinleri; H1, H2A, H2B, H3 ve H4’dır. İkişer adet H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteininin oluşturduğu yapıya histon oktameri adı verilmektedir. Histon oktameri etrafına 147 bç uzunluğunda DNA molekülü 1.7 tur yapacak şekilde sarılmıştır, bu yapı nükleozom koru ya da kor partikülü olarak adlandırılır. H1 proteini, DNA molekülünün kor partiküle girdiği ve çıktığı yere bağlanır ve böylece nükleozom yapısı tamamlanmış olur. Nükleozom 11 nm çapında ve disk şeklindedir. Paketlenmede bir sonraki aşama 30 nm fibril yapısının oluşmasıdır, fibril yapı 6 adet nükleozomun radial olarak yerleştiği bir yapıdır ve sarmal olarak devam eder (Alavian-Ghavanini ve ark., 2018).

DNA ve histon arasındaki bağlanma biçimi kromatinin “gevşek” (düşük bağlanma afinitesi) veya “sıkı” (yüksek bağlanma afinitesi) paketlenmiş oluşunu belirler. Heterokromatin ve ökromatin, sırasıyla histonların etrafına sıkıca veya gevşek bir şekilde paketlenmiş DNA’dan oluşan kromatin yapısına karşılık gelir. Heterokromatin transkripsiyonel olarak inaktifken, ökromatin transkripsiyonel olarak aktiftir. Kromatinin sıkı veya kompakt yapıda oluşu gen anlatımının düzenlenmesinde büyük önem taşımaktadır bu da histonların post-translasyonel modifikasyonu (PTM) mümkündür. PTM’lere örnek olarak lizinin asetillenmesi transkripsiyon aktivasyonuna neden olurken, lizinin metilasyonu pozisyona bağlı olarak transkripsiyonun aktivasyonuna veya deaktivasyonuna neden olabilmektedir. Gen ifadesinin PTM’ler tarafından düzenlenmesi, kromatin üzerindeki PTM işaretlerini ekleyen (writer), kaldıran (eraser) veya tanıyan (reader) büyük protein kompleksleri tarafından yönetilir (Bannister ve Kouzarides, 2011).

Histon modifikasyonlarının araştırılmasıyla hücrel süreçler ve hastalık sebepleri aydınlatılabilir. Anormal modifikasyonlar; kanser, otoimmün hastalıklar, inflamatuvar ve nörolojik hastalıklarla ilişkilendirilmişlerdir. Tablo 3’de bazı histon modifikasyon tipleri ve transkripsiyona olan etkileri verilmiştir.

Tablo 3: Bazı histon modifikasyonları ve transkripsiyonel aktivite üzerindeki etkileri

Modifikasyon Tipi	Kısaltma	Transkripsiyona Etkisi
Histon asetilasyonu		
Histon 3 panasetilasyonu	H3ac	Aktive edici
Histon 4 panasetilasyonu	H4ac	Aktive edici
Histon 3 lizin 4 asetilasyonu	H3K4ac	Aktive edici
Histon 3 lizin 9 asetilasyonu	H3K9ac	Aktive edici
Histon 3 lizin 14 asetilasyonu	H3K14ac	Aktive edici
Histon 3 lizin 18 asetilasyonu	H3K18ac	Aktive edici
Histon 3 lizin 27 asetilasyonu	H3K27ac	Aktive edici
Histon 4 lizin 16 asetilasyonu	H4K16ac	Aktive edici
Histon metilasyonu		
Histon 3 lizin 4 metilasyonu	H3K4me1	Aktive edici
Histon 3 lizin 4 dimetilasyonu	H3K4me2	Aktive edici
Histon 3 lizin 4 trimetilasyonu	H3K4me3	Aktive edici
Histon 3 lizin 9 dimetilasyonu	H3K9me2	Baskılayıcı
Histon 3 lizin 9 trimetilasyonu	H3K9me3	Baskılayıcı
Histon 3 lizin 27 trimetilasyonu	H3K27me3	Baskılayıcı
Histon 3 lizin 36 trimetilasyonu	H3K36me3	Aktive edici
Histon 3 lizin 79 metilasyonu	H3K79me1	Aktive edici
Histon fosforilasyonu		
Histon 3 serin 10 fosforilasyonu	H3S10ph	Aktive edici
Histon ubikitinasyonu		
Histon 2A ubikitinasyonu	H2Aub	Baskılayıcı

4.6.2.1 Histon metilasyonu

Histon metilasyonu olarak bilinen mekanizma, metil gruplarının histon metiltransferazlar (HMT'ler) yoluyla histon proteinlerine transferini içeren bir post-translasyonel epigenetik modifikasyondur. HMT'ler lizin metiltransferazlar ve arjinin metiltransferazları içerirler. Metil grupları özellikle N-terminal uçlara eklenir. Histon metilasyonu ve demetilasyonu kromatin yapısını değiştirerek gen anlatımını düzenler (Cheng, 2014).

Histonlara kaç tane metil grubunun eklendiği ve hangi açıdan eklendiği transkripsiyonun aktive veya deaktive oluşunu belirler. Histon proteinlerinde bulunan amino asitlere 1 (mono-metilasyon), 2 (di-metilasyon) veya 3 tane metil grubu (tri-metilasyon) eklenebilir. Histon 3 kuyruğundaki metilasyonun epigenetik düzenlemede çok önemli bir rolü vardır. Histon 3 lizin 4 (H3K4) tri-metilasyonu ökaryotlarda promotör bölgelerini belirler. Histon H4, lizin 20 (H4K20me1) üzerinde monometile edildiğinde, bu yaygın histon modifikasyonu, kromatinin kompakt hale gelmesine neden olur. Kromatin yapısının kısıtlanması, transkripsiyonun oluşmasını engeller ve gen ekspresyonunu azaltır. Alternatif olarak, histon H3'ün arjinin 17 (H3R17me1) üzerindeki monometilasyonu, transkripsiyonel aktivasyona yol açar (Cheng, 2014).

4.6.2.2 Histon asetilasyonu

Histon asetilasyonu, karşıt etkilere sahip histon asetiltransferazlar (HAT'lar) ve histon deasetilazlar (HDAC'ler) tarafından düzenlenir. HAT'lar asetil coA'dan asetil grubunun, histon kuyruğundaki lizin kalıntısına transferini katalizlerler. Bu da histonlardaki pozitif yükün zayıflamasına, histon ve DNA arasındaki bağın zayıflamasına neden olur. Bu da kromatini daha az kompakt hale getirerek transkripsiyona daha ulaşılabilir kılar. HDAC'lar lizin kalıntılarındaki asetil kalıntılarını silerek gen anlatımını baskılama görevi görürler (Grunstein, 1997).

4.6.2.3 Histon fosforilasyonu

Histon fosforilasyonu, karşıt etkiye sahip iki tür enzim tarafından kontrol edilir. Kinazlar fosfat grupları eklerken, fosfatazlar fosfatları uzaklaştırırlar. Fosforile

edilmiş histonların en az üç işlevi bilinmektedir; DNA hasarı onarımı, mitoz ve mayoz ile ilişkili kromatin kompaktlaşmasının kontrolü ve transkripsiyonel aktivitenin düzenlenmesi (histon asetilasyonuna benzer). Histon asetilasyonu ve metilasyonu ile karşılaştırıldığında, histon fosforilasyonu diğer histon modifikasyonları ile beraber çalışır ve aralarındaki karşılıklı etkileşimler için bir aracı gibidir. Örneğin, histon H3 fosforilasyonu (özellikle H3S10ph), aynı histonun (H3K9ac ve H3K14ac) iki amino asit kalıntısında asetilasyon seviyelerini doğrudan etkileyebilir. Ayrıca, H3S10ph, H4K16ac ile etkileşim yoluyla transkripsiyonel aktivasyonu indükleyebilir (Rossetto ve ark., 2012).

4.6.2.4 Histon ubikitinasyonu

Protein ubikitinasyonu, ökaryotlarda birçok hücre sinyal yolağında hücreyel fonksiyonun hemen hemen her yönünü düzenleyen önemli bir post-translasyonel modifikasyondur. Ubikitin, ubikuitin-proteazom sistemi tarafından substrat proteinlerine konjuge edilen, böylece hedef proteinlerin stabilitesini ve dönüşümünü düzenleyen 8.5 kD'lik bir proteindir. Histon ubikitinasyonu, histon ubikuitin ligazları tarafından gerçekleştirilir ve ubikitine özgü peptidazlar tarafından uzaklaştırılabilir. Monoubikitinasyonu; protein translokasyonunda, DNA hasar sinyalizasyonunda ve transkripsiyonun düzenlemesinde kritik bir role sahiptir. Histon 2A mono-ubikitinasyonu (H2Aub) daha çok gen susturulması ile ilişkilidir. Histon 2B'nin mono-ubikitinasyonu (H2Bub) da transkripsiyon aktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir (Schwertman ve ark., 2016) Poli-ubikitinasyon belirli sinyal yolaklarında proteinleri degradasyon veya aktivasyon için işaretler. Histon fosforilasyonuna benzer şekilde, histon ubikitinasyonu ile diğer histon modifikasyonları arasında bağlantı vardır. Örneğin, histon H3'ün mono-ubikitinasyonu aynı histonun asetilasyonunu indükleyebilir (Cao ve Yan, 2012)

4.6.2.5 Histon S-nitrasilasyonu

Histon deasetilazlara sistein rezidüsünden nitrosil –NO- grubunun eklenmesi olayıdır. Bu olay katalitik aktiviteyi etkiler ve bunun neticesinde kromatinden korepresörlerin ayrılmasına neden olur (İzmirli, 2013).

4.6.2.6 Histon sumolasyonu

SUMO (small ubiquitin-like modifier) 1, 2, 3 proteinlerinin ubikitin ile birleşmesi olayıdır. Ubikutine benzer bir protein olan SUMO proteinleri lizin rezidülerinden proteinlere bağlanır ve bu olay neticesinde protein degradasyonu engellenir (İzmirli, 2013).

4.6.3 Kodlama yapmayan RNA'lar (ncRNA'lar)

Genomik bilginin sadece yaklaşık %1'i proteinlere çevrilir (Lee, 2012). Kalan genom uzun bir süre "hurda" DNA olarak kabul edildi. Protein olarak kodlanmayan RNA'ları oluşturan genler non-coding RNA (ncRNA) olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte, dizileme ve moleküler biyoloji tekniklerindeki gelişmeler, translasyonu gerçekleştirmeyen genomun %70-90'ının da transkripte edildiğinin keşfedilmesine yol açtı. ncRNA'lar gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrası düzenler ve homeostazın sağlanmasında büyük rolleri vardır. ncRNA'lar uzunluklarına göre uzun (lncRNA, 200 bp ile 100 kb) ve kısa (miRNA, siRNA ve piRNA dahil ≤ 30 bp) olarak sınıflandırılır. ncRNA'ların birçok biyolojik süreçte çok önemli roller oynadığı kabul edilmektedir. mRNA düzeylerinin miRNA aracılı downregülasyonunun keşfi Craig C. Mello ve Andrew Fire'a 2006'da Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'nü kazandırdı. Günümüzde birçok araştırma ncRNA'lar ve epigenetik regülasyon arasındaki ilişkiyi aydınlatmak için yürütülmektedir. ncRNA'lar epigenetik modifiye edicilerin seviyelerini doğrudan etkileyebilir, spesifik lokuslarda epigenetik düzenleme için epigenetik modifiye ediciler kullanabilir veya kodlama yapan RNA'larda olduğu gibi ncRNA'ların anlatımını, epigenetik modifikasyonlar (DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu) tarafından düzenleyebilir (Singh ve Campbell, 2013).

4.7 Vitellogenin ve EBK'ler

Balıklarda folikül büyümesi previtellojenik ve vitellojenik aşamalardan oluşmaktadır. Vitellojenik büyüme eksojen yolk proteinlerinin oosit içinde büyümesiyle karakterizedir. Vitellogenesis terimi ise oosit büyümesiyle alakalı birçok diğer prosesleri içeren bir süreç olarak kullanılmaktadır. Dölllenmiş bir

yumurtanın vitellüsü oositin gelişmesini desteklemek için gereken birçok besin kaynağını içinde barındırır. Buna göre, “yolk (yumurta sarısı)” embriyo için gerekli, endojen olarak sentezlenmiş veya maternal olarak aktarılmış; proteinler, şekerler, lipitler, vitaminler ve minerallerden oluşan çeşitli bir karışım içerir. Buna ek olarak teleost yumurtaları steroidler, lipofilik hormonları, immünoglobulinler, vitellogenin reseptörlerini kodlayan maternal mRNA’lar, yolk-proses enzimleri ve diğer biyoaktif molekülleri de içermektedirler (Patiño, ve Sullivan, 2002).

Vitellogenin homodimer formda kanda dolaşan 350-600 kDa büyüklüğünde bir glikofosfoproteindir. Vitellogenin; tavukta, *Xenopus laevis*de ve kemikli balıklarda büyüyen oosit tarafından alındıktan sonra lipovitellin (Lv) ve fosfitin (Pv) isimli iki tip yolk proteininin üretiminden sorumludur. Lipovitellinin kütlece %20’si lipitten oluşmaktadır. Lv’nin temel görevi embriyonik gelişim için gerekli amino asit ve lipit kaynağını oluşturmaktır. Pv’nin %50’si serinden oluşmaktadır ve fosfat grubu kalsiyum iyonuna kovalent olarak bağlıdır. Pv gelişmekte olan embriyonun iskelet gelişimi ve metabolik fonksiyonu için ihtiyacı olan mineralleri sağlar (Hiramatsu ve ark., 2005).

Vitellogenin, yumurtlayan memelilerde E₂ estradiol cevap olarak karaciğerde üretilip kana verilir ve daha sonra büyüyen oosit tarafından alınıp ooplazma içinde depolanmış bir dizi yolk proteinlerine dönüştürür. Vitellogenin, sucul ortamlarda östrojenik maddelere maruziyetin önemli bir biyobelirteçidir. Çünkü; vitellogenenezin indüksiyonu östrojene veya östrojenik kimyasallara spesifik bir yanıttır, vitellogenin üretim mekanizması iyi bir şekilde bilinmektedir, vitellogenin sentezi östrojen miktarıyla doğru orantılı olarak artmaktadır, vitellogenin olgunlaşan dişi balıkların kanında doğal olarak bulunurken erkek veya immatür balıkların kanında bulunmaz, vitellogenin erkek ve genç balıklarda eksojen östrojen veya östrojenik EBK’ler tarafından indüklenebilir bu nedenle vitellogeninin yavru veya erkek balıkların kanında bulunması zenobiyotik östrojenlerin varlığına işarettir (Hiramatsu ve ark., 2005).

4.8 Oksidatif Stres ve EBK'ler

Reaktif oksijen türleri (ROT), mitokondriyal oksidatif metabolizma sırasında ayrıca ksenobiyotiklere, sitokinlere ve bakteriyel istilaya hücrel yanıtta üretilir. Oksidatif stres klasik olarak oksidan ve antioksidan sistemdeki dengesizlik olarak tanımlanır (Lushchak, 2014). Oksidatif stres, makromoleküler hasara neden olur ve ateroskleroz, diyabet, kanser, nörodejenerasyon ve yaşlanma gibi çeşitli durumlarında rol oynar. Paradoksal olarak, biriken kanıtlar, ROT'ler aynı zamanda hücre çoğalmasında ve hayatta kalmada kritik sinyal molekülleri olarak hizmet ettiğini gösterir.

Yapılarında eşlenmemiş elektron bulunduran molekül, iyon veya radikaller "ROT" olarak adlandırılır. Bu elektronlar yüksek bir enerji barındırdıkları için ROT fazlasıyla reaktiftir. ROT radikal olanlar ve radikal olmayanlar şeklinde iki çeşittir. Radikal olanlara; nitrik oksit (NO), süperoksit (O_2), hidroksil radikali (OH), tiyil radikalleri (RS), sülfonil radikaller (RSO) örnek verilebilir. Radikal olmayanlara ise; hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen, hipoklorid, nitronyum örnek verilebilir (Liou ve Storz, 2010).

Hücrel ROT, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sürecinde olduğu gibi endojen olarak üretilir veya ksenobiyotik bileşikler gibi eksojen kaynaklarla etkileşimlerden de kaynaklanabilir. ROT, hücrel antioksidan savunma sistemini baskıladığında, ister ROT seviyelerinde bir artış veya hücrel antioksidan kapasitesinde bir azalma yoluyla olsun, oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres, nükleik asitlerin, proteinlerin ve lipitlerin doğrudan veya dolaylı ROS aracılı hasarına neden olur ve karsinogenez, nörodejenerasyon, ateroskleroz, diyabet ve yaşlanma ile ilişkilendirilmiştir. Doku bütünlüğünün sağlanabilmesi için, oluşan ROT'un endojen glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPO), glutatyon S transferaz (GST), glutatyon reduktaz (GRx), katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve diğer antioksidanlar (A,C,E vitaminleri gibi) tarafından nötralize edilmeleri gerekir (Urso ve Clarkson, 2003).

İlginç bir şekilde, oksidatif stres ve EBK'lere maruz kalma aynı sağlık problemleriyle ilişkilendirilmiş olsa da nadiren paralel olarak incelenmektedir. Örneğin hem

oksidatif stres hem de EBK maruziyetleri metabolik sendrom, insülin direnci, diyabet, obezite ve kardiyovasküler komplikasyonlar ile ilişkilendirilmiştir (Lang ve ark., 2008; Bonomini ve ark., 2015). Bir çalışmada artan reaktif oksijen türleri üretimi, oksidatif strese neden olan moleküller ve farelerde insülin direnci arasında nedensel bir ilişki olduğuna dair kanıtlar sağlamıştır (Houstis ve ark., 2006). Başka bir çalışmada, BPA'ya doğum öncesi maruziyetin farelerde insülin direncini uyardığını göstermiştir (Alonso-Magdalena ve ark., 2010). Hem oksidatif stres hem de EBK'ler, yetişkin başlangıçlı metabolik hastalıklarla ilişkili iki risk faktörü olan intrauterin büyüme kısıtlaması ve erken doğum ile ilişkilendirilmiştir (Peter ve ark., 2008; Ferguson ve ark., 2014). Bununla birlikte, az sayıda çalışma prenatal EBK maruziyetinin etkisine aracılık eden oksidatif stres yollarını incelemiştir.

Son çalışmalar, çeşitli EBK'ler ile oksidatif stres arasında ilişkiler olduğunu bildirmiştir (Sulkowski ve ark., 2012; Watkins ve ark., 2015). Örneğin, fetalat kaynaklı üreme toksisitesi hem sıçanlarda hem de insanlarda oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir (Ferguson ve ark., 2014; Shono ve Taguchi, 2014). Timerosal, tributiltin ve benzen perinatal maruziyetin sıçanlarda ve farelerde oksidatif stres üretiminde rol oynadığı tespit edilmiştir. Hastalık gelişimindeki rolü ve EBK maruziyetleriyle bağlantıyı destekleyen artan kanıtlar düşünüldüğünde, oksidatif stres özellikle doğum öncesi maruziyetler bağlamında çalışmaya değerdir.

4.9 Zebra Balıkları ve EBK Çalışmalarında Kullanımları

Zebra balıkları (*Danio rerio*), sazangiller (Cyprinidae) familyasından, doğal yaşam alanı Asya olan, yaklaşık 4–6 cm boyunda, yumurtlayarak çoğalan tropikal bir balık türüdür. Genellikle 80 ile 180 arasında yumurta bırakır ve yumurtalarına kendisi bakar (Dai ve ark., 2014).

Genetik çalışmalar için ideal bir model organizmadır. Streisinger ve ekibi hidrostatik basınç ve ısı şoku kullanarak homozigot diploid zebra balıkları elde ettiklerini açıkladıktan sonra zebra balıklarında yapılan genetik çalışmalar hızla artmıştır (Streisinger ve ark., 1981). 1996'da Driever ve ekibi ile Haffter ve ekibi zebra balıklarındaki mutasyonlar için geniş kapsamlı bir tarama yaptıklarını bildirdiler. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar zebra balıklarının model organizma olarak

kullanılmasının yolunu iyice açmış oldu (Driever ve ark., 1996; Haffter ve ark., 1996).

Zebra balıklarının model organizma olarak kullanılmasının birçok avantajı vardır; bakımları kolaydır, boyutları küçüktür, embriyo gelişimi dışardadır, üreme döngüleri kısadır ve embriyoları şeffaftır. Bunlara ek olarak zebra balıkları insan genomuyla büyük bir homoloji göstermektedir. Hastalıklarla ilişkilendirmiş insan genlerinin %75'inden fazlasının zebra balıklarında da benzerlerine sahip olduğu bilinmektedir. Bütün bu sebeplerden dolayı; genetik, gelişim, toksikoloji, farmakoloji, DNA hasar tamiri, kanser ve diğer hastalıklar için ideal bir model organizmadır (Dai ve ark., 2014).

Zebra balıkları eko-çevresel izleme çalışmaları için model organizma olarak kullanılabilir. Toksik ağır metaller, endokrin bozucu kimyasallar ve organik kirleticiler gibi kirleticilerin etkilerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Yeni teknolojilerin de gelişmesiyle yapılan çalışmaların hassasiyetleri artmıştır. Lusiferaz ve yeşil floresan proteinin (GFP) de ortaya çıkmasıyla transgenik teknoloji büyük oranda gelişmiştir ve bilime büyük katkılar sağlamaktadır (Dai ve ark., 2014).

Endokrin bozucuların toksisitesinin izlenmesinde genelde yabani tip zebra balıkları kullanılmasına rağmen, düşük hassasiyette olduklarından dolayı dezavantajları da bulunmaktadır. Son zamanlarda transgenik zebra balık hatlarının gelişmesiyle bu dezavantajın önüne geçilmiştir. Araştırmacılar farklı çevresel kirleticileri tespit etmek için çeşitli belirteçler kullanmaktadırlar. Rekombinant plazmitlerin mikroenjeksiyonundan sonra zebra balığı hattı floresan protein genini kendinden sonraki kuşaklara aktaracağı için görüntülemeye rahatlıkla kullanılabilirler. 2005 yılında geliştirilen bir yöntemle EBK'lerin varlığını tespit etmek için, koryonik gonadotropin promotörünün kontrolü altında GFP işaretli bir transgenik medaka balığı suşu üretildi (Kurauchi ve ark., 2005). Fakat juvenil ve erişkin medakalarda düşük GFP tespit edildi. Aynı sene EBK'lerin varlığını *vtg1* geni promotörü GFP işaretli bir medaka hattı yaratıldı (Zeng ve ark., 2005). Daha sonra *vtg* promotörü klonlanarak östrojen benzeri maddelere karşı duyarlı bir transgenik zebra balığı hattı

yaratıldı (Chen ve ark., 2010). Koryonik gonadotropin ve *vgt1* geni dokuya özgü olup yalnızca karaciğerde GFP anlatımına sebep olmaktadırlar

Geleneksel kimyasal analizlerin dışında, karşılaştırmalı gonadal morfoloji ve histolojik teknolojiler, mRNA ve koryonik gonadotropin ve vitellogenin protein seviyelerinin tespiti gibi biyolojik yöntemler de oldukça gelişmiştir. Bu sebeple zebra balıkları, endokrin bozucu konsantrasyonunu tespit etmek, EBK'lerin üreme ve sinir sisteminde yarattığı toksik etkileri araştırmak için kullanılabilecek ideal bir model organizmadır.

4.10 EBK Araştırmalarında Transkriptomik Analizler ve Biyoinformatik

Son teknolojik gelişmeler ile bilimde benzeri görülmemiş bir devrim gözlemlendi ve büyük miktarda "omik" veriler elde edildi. Biyolojideki asıl zorluk muazzam miktarda elde edilen veriyi sistematik bir şekilde anlamlı hale getirmektir. "Yeni biyoloji çağı" biyoinformatik ve hesaplamalı biyolojinin büyük önem kazanmasına neden oldu. Bütün biyolojik bilgiler ve veri tabanları, dizi analizleri, moleküler modellemeler ve sistem biyolojisi biyoinformatiği destekler niteliktedir. Biyoinformatiğin multidisipliner karakteri nedeniyle biyoinformatik; verileri organize etmek, analiz etmek, anlamak, görselleştirmek ve depolamak için hesaplama araçlarının kullanımı olarak tanımlanabilir. Yeni nesil dizileme teknolojilerinin (NGS) gelişimi; gen anlatımı çalışmalarının, metilasyon çalışmalarının ve epigenetik markerların analizlerinin yapılmasının önünü açmış oldu (Ritchie ve ark., 2015).

Biyolojik dizi karşılaştırması için yaygın olarak kullanılan ve gerekli olan hizalama (alignment), NGS teknolojileri tarafından üretilen verilerin kullanılabilirliğini arttırmıştır. Bu süreç, iki veya daha fazla nükleotid dizisinin veya amino asitlerin karşılaştırılmasından oluşur. Hizalama teknikleri, tüm genom analizi için gereklidir. farklı genomlar veya aynı türler arasında karşılaştırma yapmayı ve varyasyonları belirlememizi sağlar (Diniz ve Canduri, 2017).

Elde edilen büyük miktardaki verilerin organizasyonu ve depolanması elzem hale gelmiştir. Bu sebeple biyolojik bilgilerin depolandığı ve bilim camiasının erişimini

sağlayabildiği çeşitli veri tabanları oluşturulmuştur. 2017 Ocak ayındaki verilere göre 1739 biyolojik veri tabanı bulunmaktadır. Biyoinformatik tarafından kullanılan bilgi kaynakları; ham DNA dizileri, protein dizileri, makromoleküler yapıları ve genom dizileme verileridir. En çok bilinen ve kullanılan nükleotid dizi ve protein veri tabanları; metabolik haritaların yorumlanması için “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (KEGG), National Center for Biotechnology Information (NCBI), DNA Database of Japan (DDBJ), European Molecular Biology Laboratory (EMBL)’dır. Bu veri tabanları, Uluslararası Nükleotid Sekans Veritabanı İşbirliği (INSDC) üyeleridir ve günlük olarak yenilenmektedirler (Diniz ve Canduri, 2017).

Bir hücre, doku veya organizmanın RNA içeriğinin dizilemesi (RNAseq), global RNA anlatım profillerini sorgulamak için yenilikçi bir tekniktir. Transkriptom, belirli bir zamanda bir doku içindeki hücresel aktiviteyi yansıtır. Varsayımlardan etkilenmeyen genom çapında ekspresyon çalışmaları, endokrin bozulmasının etkilerini araştırmak için tarafsız bir yaklaşım sağlayabilir. RNA-Seq, bir hücrede ifade edilen tüm genleri tespit etmek ve ölçmek için tercih edilen yöntem haline gelmektedir (Maher ve ark., 2009; Ozsolak ve Milos 2011; Wang ve ark., 2009).

Zebra balığı, referans genomu iyi karakterize edildiğinden, EBK'lere yanıt olarak transkriptom incelemesi için çekici bir modeldir (Howe ve ark., 2013). Zebra balığı genomundaki ve insan genomundaki birçok anahtar transkripsiyon faktörünün, kinazların ve diğer düzenleyici proteinlerin korunması sayesinde, kirlenici maddelerin deniz ortamındaki etkilerini değerlendirmek ve sağlık riski değerlendirmesi için mükemmel bir modeldir. Ek olarak, EBK'lere yanıt olarak zebra balıklarının RNAseq analizi terapötik yaklaşım sağlama potansiyeline sahiptir.

RNA-Seq, tamamlayıcı DNA'nın (cDNA) kısa fragmanlarının dizilenmesine ve referans genomla karşılaştırılmasına olanak sağlar. Mikroarray analizinden farklı olarak, RNA-Seq, transkripsiyon başlatma bölgelerinin ve splice varyantlarının tanımlanmasını, ekson ve splice izoform anlatımının kesin niceliksel belirlenmesine izin verir. RNA-Seq'in mikroarray tabanlı tespit yöntemlerine göre bir başka avantajı, yeni transkriptleri tanımlama yeteneğidir. Çoğu RNA-Seq yaklaşımında, RNA ekstrakte edilir ve PolyA + mRNA molekülleri, poli-T oligo-nükleotid bağlı manyetik boncuklar kullanılarak zenginleştirilir. mRNA parçaları ve çift sarmallı

cDNA'ya dönüştürülür. Illumina (veya başka bir platform) platforma özel adaptörler DNA'ya bağlanır ve high-throughput dizileme dizilime gerçekleştirilir. Illumina dizileme ile, 35 bp - 150 bp uzunluğunda kısa parçalar üretilir ve ardından referans genomu hizalanır. RNA-Seq, özellikle az miktardaki transkriptlerini mikrodizi analizine kıyasla çok daha fazla hassasiyet ile tespit edebilir (Baker ve Hardiman, 2014).

RNA-Seq teknolojisinin gerçekçi ve nesnel sonuçlar verdiği kabul edilmektedir. Fakat RNA-Seq; numune toplama ve stabilizasyonu, RNA ekstraksiyonu, fragmentasyon, cDNA sentezi, adaptör ligasyonu, amplifikasyon, saflaştırma ve dizilemeyi içeren karmaşık çok adımlı bir süreçtir, bu da uzun bir proses olduğu için oldukça hassasiyet isteyen bir yöntemdir. Tercih edilen fragmentasyon bölgeleri, değişken primer ve etiket nükleotid kompozisyon etkileri nedeniyle transkriptom boyunca sekans derinliğinde değişkenlik olduğu için parçalar tek tip olarak örneklenmez ve dizilenmez (Hansen ve ark., 2010). Bunun önüne geçmek için “veri normalizasyonu” yaklaşımları kullanılmaktadır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Zebra Balıkları Bakım ve Beslenme Prosedürü

Çalışmamızda Boğaziçi Üniversitesi'nden temin edilen ve ZEBTEC akvaryum sisteminde barındırılan yetişkin yabani tip AB suşu zebra balıkları kullanılmıştır. Zebra balıkları bilgisayar kontrollü ZEBTEC akvaryumda barındırılmıştır (Resim 1). Günde 14 saat gün ışığına, 10 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sistemi kurularak sirkadiyen ritimleri oluşturulmuştur. Sıcaklık ve nem sırasıyla 28 ± 1 °C ve % 61 olarak ayarlanmış ve otomasyon sistemle sabit tutulmuştur. Sistemin suyunun pH'sı 6,9-7,2 arası ayarlanmış ve sabit tutulmuştur. Fiziksel ve UV sistemlerini içeren filtrasyon sistemi ile balıkların ortam temizliği sağlanmıştır. Günde iki kez kuru yem ve bir kez de canlı yem ile toplam üç kez beslenmişlerdir.



Resim 1: ZEBTEC Mini Akvaryum sistemi

5.2. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazlar Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4: Deneylerde kullanılan cihazlar

Vortex (V-1 PLUS)	pH metre (Hanna HI 2211)
Santrifüj (Sigma 1-16K)	Magnetik karıştırıcı (Witeg Wisd Hotplate Stirrer, MSH)
Spektrofotometre (Shimadzu UV-120-02)	Hassas terazi (Shimadzu ATX224)
RT-PCR (Rotor Gene-Q Qiagen)	Otomatik pipetler (Rainin)
DNA-RNA izolasyon cihazı (QIAcube, Qiagen)	Etüv (Nüve EN 400)
Homojenizatör (Tissuelyser LT, Qiagen)	Distile su cihazı (Elga Option-Q Ultra saf su sistemi)
Buzdolabı (İndesit TAA 12 V)	Sterio Discovery V8 mikroskop (Zeiss)
Akvaryum (Zebtec mini sistem)	Su banyosu (Memmert WNB45)
NanoDrop (Thermo Fisher ND-2000)	Elektroforez Amersham pharmatica- EPS 601

5.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda kullandığımız maddeler analitik saflıktadır. Sigma, Merck, Fisher Bioreagents, Acros, Biovision, TRC Canada ve Bio-Optica firmalarından tedarik edilmiş ve kullanılmıştır (Tablo 5).

Tablo 5: Kullanılan kimyasallar listesi

Sodyum karbonat	MERCK 1.06392.1000
Sodyum hidroksit	MERCK 1.06482.1000
Bakır (III) sülfat	FISHER CHEMICAL C/8600/50
Sodyum potasyum tartarat	MERCK 1.08087.1000
Folin çözeltisi	SIGMA F9252
Sodyum klorür	SIGMA S9888
Albumin	SIGMA A3912
Tiyobarbürük asit (TBA)	SIGMA T5500-25G
Triklorasetik asit (TCA)	ACROS 421451000
Hidroklorik asit	MERCK 1.00317.2500
n-bütanol	FISHER BIOREAGENTS B/4800/17
Çinko sülfat heptahidrat	MERCK 1.08883.1000
Vanadyum (III) Klorür	ACROS 197000250
Sülfaniamid (SULF)	SIGMA S9251
N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür (NEDD)	MERCK 1.06237.0025
Dipotasyum hidrojen fosfat	SIGMA P2222-100G
Potasyum dihidrojen fosfat	SIGMA P5655-100G
Disodyum hidrojen fosfat	SIGMA 255793-10G
Sodyum Etilendiamin tetraasedik asit (Na-EDTA)	SIGMA E4884-100G
Riboflavin	FISHER BIOREAGENTS BP167-50
o-dianisin	ACROS 407890050
L-Glutatyon (GSH)	SIGMA G4251-5G
1-kloro-2,4-dinitro-benzen (CDNB)	ACROS 160511000
Formaldehit	SIGMA 252549
Etanol	MERCK 1009862500
Metanol	SIGMA 322415
Aseton	SIGMA 90872
Etil-3-aminobenzoat metansulfonat	SIGMA A5040

(Tricaine)	
Fosfat Tampon Tuzu Tablet (PBS)	SIGMA P4417-100TAB
Metilparaben	SIGMA 47889
Heparin	SIGMA H-3393
Tween-20	SIGMA P-1379
Formamid	MERCK 1.09684.1000
Natriyum Sitrat	SIGMA C3674
Proteinaz K	ROCHE 1092766
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	SIGMA N6639
5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate (BCIP)	SIGMA B-8503
Pronaz	SIGMA P6911
Paraformaldehit (PFA)	P-6148
1-phenyl-2-thiourea (PTU)	SIGMA P7629
DIG RNA Labeling Mix (UTP)	ROCHE 1277073
Oil Red O	SIGMA 26125
Metilselüloz	SIGMA 9004-67-5
İzopropanol	SIGMA 109827

5.4 Zebra Balıklarından Embriyo Eldesi

Zebra balıkları fotoperiyodik üreme gösterir. Şafakla beraber ışığın ortaya çıkması ile üreme davranışını başlatırlar. Işıkla beraber erkek ve dişi zebra balıkları, koordine halde yumurtlama ve sperm salınımına yol açan belirgin kur hareketleri sergiler. Erkek zebra balıkları, daha ince vücut yapıları, vücutları boyunca gümüşü bantlar, ve bantlar üzerinde turuncu ile kırmızımsı renk tonları ile dişilerden ayırt edilebilir. Üretilen çok sayıda yumurta nedeniyle, dişiler şişmiş karınlarıyla tanınabilir.

Embriyo eldesi için bir gece önceden aktif erkek balıklar ve karnı şişkin gözüken dişiler seçilerek çiftleştirme tanklarına alınır. Çiftleştirme tankları düz olabileceği gibi Resim 2’de görüldüğü gibi kavisli de olabilmektedir. Dişilere erkeklerin oranı 2:1 olacak seçilen balıklar aralarına aparat konarak ayrılırlar (dişilerle erkeklerin karışmasını önlemek için). Yeterli embriyo eldesi için çok sayıda çiftleştirme tankı kullanılmıştır. Sabah ışığı ile uyarılan balıkların çiftleşmesi amacıyla aradaki aparat yarım saat sonra ortadan kaldırılır ve aralıklı olarak tankın dibi kontrol edilir. Döllenmiş embriyolar eşleştirme tankları altında delikler bulunan bölme sayesinde tankın dibinde toplanır ve döllenmiş ve uygun gelişim düzeyindeki embriyolar stereo

mikroskop altında seçilerek ayrılır. Embriyolar E3 embriyo ortamında 28 °C'de etüvde saklanır.



Resim 2: Zebra balığı çiftleştirme tankı

5.5. Maruziyet Uygulanması

Parabenler ve zebra balıkları üzerinde yapılmış yeterince çalışma bulunmaması sebebiyle %50 mortaliteye (LC50) neden ölümcül konsantrasyonu hesaplamak amacıyla 5 farklı metilparaben dozu seçilmiştir. (5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L). Organik çözücü olarak aseton tercih edilmiş olup, OECD kuralları gereği çözücü, çözelti içinde %0,01 oranında kullanılmıştır. Embriyolar 24 kuyucuklu platelerin içine her bir kuyucuğa 20 embriyo olacak şekilde konmuşlardır. Ve her bir doz için 4 tekrar çalışılmıştır. 120 saat boyunca izlenen embriyolarda meydana gelen anomaliler Zeiss Sterio Discovery V8 mikroskopta görüntülenip ve ölüm-kalım oranı her gün not edilmiş ve her kuyucuğun çözeltisi her gün değiştirilmiştir. 5 günün sonunda mortalite değerlerinin Probit analizi ile değerlendirilmesiyle LC50 dozu tespit edilmiş ve çalışmanın geri kalanında bu doz kullanılarak devam edilmiştir.

5.6 Lokomotor Aktivite Testi (Roberts ve ark., 2019)

Maruziyet grubu ve kontrol grubu arasında hareketliliğe dair değişiklik olup olmadığını belirlemek için lokomotor aktivite testi uygulanmıştır. Pergelle birbirine eşit uzunlukta çizilmiş çizgilerden oluşan bir kâğıt petrinin altına konur ve 72 saatlik zebra balığı (embriyolar genelde 48 saatin sonunda koryondan çıktığı için 72 saatlikler tercih edilmiştir) embriyosu petrinin merkezine yerleştirilir. Sivri uçlu bir cisim yardımıyla kuyruklarına dokunulur ve kat ettikleri mesafe ölçülerek not edilir.

5.7. Homojenat Hazırlama

Maruziyet sonrası embriyolar oksidan/antioksidan parametre tayini için sakrifiye edilerek demir bilyeler ve homojenizatör yardımıyla homojenize edilmişleridir. Bu işlem öncesinde hayvanlara anestezi uygulanmıştır. Anestezi işlemi için tricaine (Sigma A5040) kimyasalı kullanılmıştır. Tricaine çözeltisi, 400 mg Tricaine, 97.9 ml distile su, 2,1 ml 1 M Tris ile hazırlanarak pH: 7'ye ayarlanmıştır. 1 ml PBS çözeltisinin içine 100 embriyo olacak şekilde hazırlanan homojenatlar -20 °C'de kullanılacağı güne kadar muhafaza edilmiştir.

5.8. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi

5.8.1 Total protein tayini (Lowry ve ark., 1951)

Bu metotta önce proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona sokulur. Daha sonra fosfomolibdik- fosfotungstik asit reaktifi (folin reaktifi) ile indirgenir. Oluşan mavi rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

Gerekli Çözeltiler

A çözeltisi: Sodyum karbonat çözeltisi (% 2 g, 0,1 N NaOH'teki); 0.4 g NaOH biraz suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır. 2 g sodyum karbonat hazırlanan 0,1 N NaOH çözeltisinde çözülür ve hacmi 100 ml'ye 0,1 N NaOH çözeltisi ile tamamlanır.

Bakır sülfat çözeltisi (%1 g): 1 g bakır sülfat biraz distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Sodyum potasyum tartarat çözeltisi (%2 g): 2 g sodyum potasyum tartarat biraz distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. B çözeltisi: %1 g lık Bakır sülfat çözeltisi ile %2 g lık Sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanılır.

C çözeltisi: 50 ml A çözeltisi ve 1 ml B çözeltisi karıştırılarak kullanılır. Folin çözeltisi: 100 g sodyum tungstat, 25 g sodyum molibdat $\times 2H_2O$, 50 ml %85 g lik fosforik asid, 100 ml derişik HCl ve 700 ml distile su bir balona konularak 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Soğutulur. Üzerine 150 g Li_2SO_4 ilave edilip, geri soğutucu altında 15 dk daha kaynatılır. Soğuduktan sonra, 5-6 damla brom katılır. (çözelti bozuksa renk siyahlaşır, bu durumda çözelti tekrar hazırlanır, bozuk değilse renk sarı yeşil olur). Çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır ve kullanılır. Koyu renkli şişede saklanır, uzun süre dayanır.

Serum fizyolojik (%0,9 g NaCl): 0,9 g NaCl biraz suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır. Protein stok standart çözeltisi (%100 mg lık albumin çözeltisi): 100 mg albumin biraz serum fizyolojik de çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlanır.

Protein stok standart çözeltisi (%100 mg lık albumin çözeltisi): 100 mg albumin biraz serum fizyolojik de çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlanır.

Protein çalışma standart çözeltileri: Stok çözeltilerden uygun hacimler alınarak %5, 15, 25 mg albumin ihtiva edecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

5 deney tübü alınarak numune (N), standart 1 (St1), standart 2 (St2), standart 3 (St3) ve kör (K) olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 6: Total protein tayin yöntemi

	Numune (N)	St1 %5 mg Albumin	St2 %10 mg Albumin	St3 %15 mg Albumin	Kör (K)
Albumin (%100mg)	-	25 µl	50 µl	75 µl	-
Doku homojenatı (veya süpernatant)	10 µl	-	-	-	-
Serum fizyolojik	490 µl	475 µl	450 µl	425 µl	0.5 ml
Toplam hacim	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Vortekste karıştırılır.					
C çözeltisi	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Vortekste iyice karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.					
Folin ayırıcı	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml

Vortekste iyice karıştırılır, oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk. bekletilir. 30 dk sonunda 500 nm’de cam küvette köre karşı absorbanslar kaydedilir. Standart grafiği çizilir. Doku protein miktarı hesaplanır.

5.8.2 Lipit peroksidasyon (LPO) tayini (Ledwozyw ve ark., 1986)

LPO ürünü olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli Çözeltiler

NaOH (1 M): 4 gram NaOH tartılır, biraz distile suda çözülür, hacmi 100 ml ye distile su ile tamamlanır.

TBA çözeltisi (0.047 M): 500 mg TBA ile 6 ml 1 M lık NaOH ile karıştırılır. Üzerine 69 ml distile su ilave edilir.

Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1,22 M, 0,6 M HCl deki): 20 ml TCA (% 100 g TCA) ile 5 ml HCl (% 37 g lık, d=1,19 g/dl lik HCl) karıştırılır ve hacmi distile su ile 100 ml ye tamamlanır.

n-butanol: Orijinal şişesinden kullanılır.

Deneyin Yapılışı

2 tane deney tübü alınarak numune ve kör olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 7: Lipit peroksidasyon tayin yöntemi

	Numune	Kör
Doku homojenatı	0.25 ml	-
Distile su	-	-
TCA	1.25 ml	-
Vortekste karıştırılır ve 15 dk bekletilir.		
TBA	0.75 ml	-
Vorteks ile karıştırılır ve 30 dk kaynar su banyosunda inkübe edilir.		
n-butanol	2 ml	1 ml

İlave edilir. Vortekslenir ve 10 dk. 3000 rpm’de santrifüj edilir. 1ml butanol fazı alınarak 532 nm’de cam küvette köre karşı absorbanslar kaydedilir. MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak sonuçlar hesaplanır.

5.8.3. Total nitrik oksid tayini (Miranda ve ark., 2001)

Nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite indirgenir. Nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamine dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazoniyum bileşiği oluşur. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm’ de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Gerekli Çözeltiler

0,3 M NaOH çözeltisi: 0,6 g NaOH tartılır, bir miktar distile suda çözülür ve üzeri distile su ile 50 ml' ye tamamlanır.

%10'luk ZnSO₄: 5 g ZnSO₄ yada 8,9 g ZnSO₄.7 H₂O tartılır bir miktar distile suda çözülür ve üzeri distile su ile 50 ml tamamlanır.

1 M HCl: 4,20 ml HCl çekilir ve üzeri distile su ile 50 ml ye tamamlanır.

VCl₃: 0,4 g VCl₃ bir miktar 1 M HCl de çözülür ve üzeri aynı çözelti ile 50 ml' ye tamamlanır.

%5' lik HCl: 2,86 ml % 37'lik HCl çekilir ve üzeri distile su ile 25 ml ye tamamlanır.

%2'lik SULF(Sülfanilamid): 0,5 g Sülfanilamid tartılır, 25ml %5' lik HCl içerisinde çözülür.

%0,1'lik NEDD(N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür): 0,025 g NEDD tartılır. Bir miktar deiyonize suda çözülür ve üzeri deiyonize su ile 25 ml' ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Doku homojenatı 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. 0,3 ml süpernatant alınır, üzerine 0,3 ml 0,3 M NaOH ilave edilir. Oda sıcaklığında 5 dk beklenir. 0,3 ml %10'luk ZnSO₄ ilave edilir. Vortekslenir. +4'de 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Üst faz alınır ve +4'de 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. İki adet deney tübü anılır, kör ve numune olarak işaretlenerek aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 8: Nitrik oksit tayin yöntemi

	Numune	Kör
Deproteinize Sıvı	0,3 ml	-
Distile Su	-	0,6 ml
VCl ₃	0,3 ml	0,3 ml
SULF	0,15 ml	-
NEDD	0,15 ml	-
30 dk 37 °C'de etüvde inkübe edilir.		

Köre karşı 540 nm’de absorbans kaydedilir. Sonuçlar $53000 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ ekstinsiyon katsayısı ile $\mu\text{mol/ L}$ cinsinden hesaplanır.

5.8.4. GST aktivitesi tayini (Habig ve ark., 1981)

GST aktivitesi tayini, GSH ve 1-kloro-2,4-dinitro-benzenin (CDNB) konjugasyonu ile oluşan ürünün, 340 nm’deki absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanır.

Gerekli Çözeltiler

Sodyum fosfat tamponu (0,2 M, pH= 6,5): 0,534 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 2,3 gram KH_2PO_4 ayrı ayrı biraz distile suda çözülür ve birbirine karıştırılır ve hacim distile su ile 100 ml’ye tamamlanır (hacim 100 ml ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, 1M NaOH ile pH 6,5’e ayarlanır).

Glutasyon (GSH) (60 mM): 1,84 gram glutasyon biraz distile suda çözülür ve hacmi 100 ml’ye tamamlanır.

1-klor-2,4-dinitro-benzen (CDNB) (60 mM): Absolü etanolde taze hazırlanır. 1,22 gram CDNB tartılır ve biraz etanolde çözülür. Sonra hacmi 100 ml’ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

%10 gramlık doku homojenti 10 dak. 4000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınır ve 1/40 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır. Numune ve kör olarak işaretlenmiş iki tüp alınır ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 9: GST tayin yöntemi

	Numune	Kör
Dilue süpernatant	0,5 ml	--
SF veya Distile Su	--	0,5 ml
Fosfat Tamponu	1,5 ml	1,5 ml
GSH çözeltisi	0,05 ml	0,05 ml
CDNB çözeltisi	0,05 ml	0,05 ml
Distile su	0,90 ml	0,90 ml
Toplam Hacim	3 ml	3 ml

Karıştırılır. 3 dakika süre (0., 1., 2., 3. dakikalarda) ile karışımın 340 nm’de (25 °C) absorbansları izlenir ve kaydedilir. Absorbans artışı hesaplanır. Glutasyon ve CDNB’nin konjugasyonu sonucu oluşan ürün için saptanmış olan ekstrinksiyon katsayısı $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ kullanılarak sonuçlar aşağıdaki gibi hesaplanır. Enzimsel konjugasyon sonucundan, enzimsel olmayan konjugasyon değerleri çıkarılır.

5.9 In Situ Hibridizasyon Metodu

5.9.1 Prob üretimi

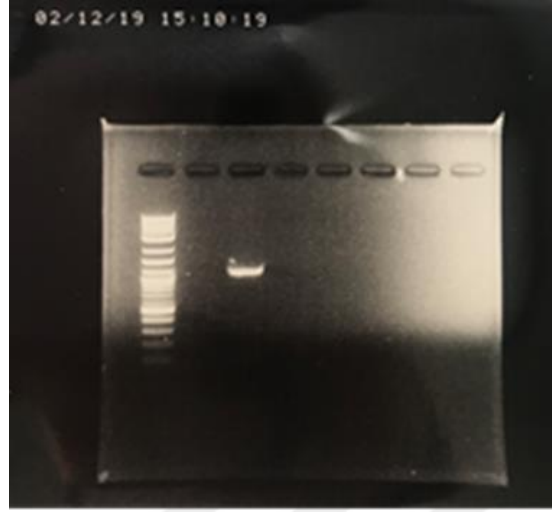
In situ hibridizasyon yöntemi ile EBK varlığının göstergesi olarak anlatımı artan *vtg1*’in varlığını tespit etmek amacıyla RNA probu dizayn edilmiştir. Zebra balıklarında karaciğer oluşumu 72. Saatten itibaren başladığı ve *vtg1* anlatımı karaciğerde olduğu için 72 saate ulaşan 10 adet embriyo homojenat haline getirilerek trizol ile RNA izolasyonu yapıldı. RNA cDNA’ya çevrildikten sonra PCR ile daha önceden dizayn edilen *vtg*’ye özgü primerler ile istenilen bölgesi çoğaltıldı. Çoğalan bölgenin doğruluğunu kontrol etmek adına jel elektroforezi yöntemiyle validasyonu yapıldı. PCR ile çoğaltılan bölge clean-up kiti ile istenmeyen moleküller (dntpler vb) uzaklaştırıldı. Daha sonra in vitro transkripsiyon metodu ile elde edilen PCR ürünü DIG ile işaretli bir RNA haline getirildi. Elde edilen RNA, RNA clean-up kitiyle temizlenerek kullanılabilir hale getirildi. Bu şekilde elde edilen prob, in situ hibridizasyon yönteminde kullanılarak *vtg1* anlatımının olduğu bölge tespit edildi.

Tablo 10: İn situ hibridizasyon probu için kullanılan primer dizileri

Sol primer: CTGTTGTGCTTGCCTTGACT

Sağ primer: TAATACGACTCACTATAGGGTACCAACAGCAGGAAGAGC

Resim 3: Elektroforezde vitellogenin bant görüntüsü



Elektroforezle PCR doğrulandıktan sonra RNA DIG ile işaretli hale getirilir ve aşağıdaki prosedür izlenir.

Tablo 11: DIG-Labeling reaksiyonunda kullanılan kimyasallar

Kullanılanlar	Miktar	Final Konsantrasyonu
cDNA	2.5µl	100-200 ng
5x Transkripsiyon bufferı	1µl	1X
DTT 0.1M	0.5µl	10 mM
DIG-RNA labeling mix (UTP)	0.5 µl	
RNasein (40U/µl)	0.25 µl	10 U
T3 or T7 RNA polimeraz (20U/µl)	0.25 µl	5U

Yukarıda tabloda bulunan kimyasallar karıştırılır ve 37°C’de 2 saat bekletilir. Reaksiyonu durdurmak için 1 µl Turbo Dnase 1 eklenir ve RNA clean-up kitle prob temizlenerek kullanılır hale getirilir.

5.9.2 In situ hibridizasyon protokolü (Thisse ve ark., 2008)

5.9.2.1 Fiksasyon

1- Fikse edilecek embriyoların aynı evrede olmasına dikkat edilerek seçilir ve maksimum 8 embriyo olacak şekilde eppendorflara alınır (daha fazla sayıda embriyo konulursa prob her hayvana erişemez ve boyanmaz).

2- Eğer embriyolar hala koryon içerisindeyseler forsips veya pronaz ile koryonlarından çıkartılırlar. Pronaz ile çıkartılıyorsa sık sık embriyoların koryondan çıkıp çıkmadıkları pastör pipeti ile yavaşça pipetaj yaparak kontrol edilir.

3- Koryondan çıktıktan sonra E3 ile 4-5 kez pronaz yıkanır ve uzaklaştırılır. (Eğer 24 saatten büyük embriyolar kullanılacaksa örnekler hangi maddeye maruz bırakılıyorsa 24. saatten sonra her gün 200X'lik PTU'dan 50 µl 10 ml çözelti içine eklenir, eğer bu basamağı atlanırsa embriyolarda pigment oluşur ve in situ hibridizasyonla boyanan yerler ile pigmentler ayırt edilemez)

4- Embriyoların üzerini geçecek kadar %4'lük PFA (paraformaldehit) eklenir (yaklaşık 400 µl eklenmesi yeterli). Eppendorflar shakera konur ve 20 dakika beklenir.

5- PFA, PBST ile 2 kez yıkanır.

6- PBST yerine %25 Metanol+ %75 PBST (1/4 oranında) eklenir, 5 dakika beklenir bu esnada eppendorfları hafifçe sallanır.

7- Bir önceki çözelti uzaklaştırılır yerine;-%50 Metanol + %50 PBST eklenir (1/1) , 5 dakika beklenir ve eppendorflar hafifçe sallanır.

8- Bir önceki çözelti uzaklaştırılır yerine; %75 Metanol + %25 PBST eklenir (4/1), 5 dakika beklenir ve eppendorflar hafifçe sallanır.

9- Bir önceki çözelti uzaklaştırılır yerine; %100 Metanol eklenir ve bu basamakta istenirse örnekler -20 °C'de saklanabilir ve in situ yapılmak istendiğinde tekrar çıkartılabilir.

5.9.2.2 Rehidrasyon basamağı

1- %100 metanol içinde olan örnekler -20 °C'den çıkartılır ve metanol ortamdan uzaklaştırılır yerine; %75 Metanol + %25 PBST eklenir, 5 dakika beklenir ve eppendorflar hafifçe sallanır.

2- Bir önceki çözelti uzaklaştırılır yerine; %50 Metanol + %50 PBST eklenir, 5 dakika beklenir ve eppendorflar hafifçe sallanır.

3- Bir önceki çözelti uzaklaştırılır yerine; %25 Metanol+ %75 PBST eklenir, 5 dakika beklenir ve eppendorflar hafifçe sallanır.

4- Bir önceki çözelti uzaklaştırılır ve son olarak 2 kez PBST ile yıkanır ve eppendorflar hafifçe sallanır.

5.9.2.3 Permeabilizasyon basamağı

1- Proteinleri uzaklaştırmak amacıyla 5 µg/ml Proteinaz K uygulanır (2ml PBST + stoktan 0,5 µl 20 mg/ml). Proteinaz K farklı büyüklükteki hayvanlar için farklı sürelerde uygulanır. Proteinaz K solüsyonu eppendorflara eklenir ve shakerda gerekli sürelerde bekletilir (Tablo 12).

Tablo 12: Permeabilizasyon basamağı için gerekli süreler

10-12 saatlik embriyolara 4 dakika
18-24 saatlik embriyolara 6 dakika
24-34 saatlik embriyolara 8 dakika
36-38 saatlik embriyolara 10 dakika
42-48 saatlik embriyolara 12-14 dakika
52 saatlik embriyolara 16 dakika
58-60 saatlik embriyolara 18 dakika
68-72 saatlik embriyolara 20 dakika

2- Gerekli sürenin sonunda embriyolar 3 kez PBST ile yıkanır.

3- %4'lük PFA ile oda sıcaklığında 20 dakika boyunca fiksasyon yapılır. (Proteinaz K dan sonra hayvanların dağılmasını önlemek adına)

4- 3 kez PBST ile embriyolar yıkanır.

5.9.2.4 Prehibridizasyon basamağı

1- Sıcak su banyosu 67 °C'ye ayarlanır.

2- 300 µl Hyb- (hibridizasyon çözeltisi) eklenir sıcak su banyosuna örnekler konur ve 5 dakika beklenir.

3- Hyb- solüsyonu Hyb+ ile değiştirilir ve 1 saat sıcak su banyosunda bekletilir.

5.9.2.5 Hibridizasyon basamağı

1 saatin sonunda prob eklenir ve sıcak su banyosunda 67 °C'de 1 gece bekletilir. (Eğer daha önce sulandırılmış bir prob kullanılacaksa sulandırılmış probdan en az 120 µl olacak şekilde her bir örneğe eklenir ve prehibridizasyon basamağında eklenen Hyb+ solüsyonu mümkün olduğunca ortamdan uzaklaştırılır, eğer Hyb+ solüsyonu örnek içinde çok fazla her defasında prob sulanacaktır ve zamanla özelliğini yitirecektir. Eğer kendi yaptığımız daha önce kullanmadığınız sulandırılmamış bir prob kullanacaksa Hyb+ solüsyonundan 120 µl örnek bırakılır ve 1-2 µl probunuzdan bu sıvı içine eklenir.)

5.9.2.6 Yıkama/Preinkübasyon- Antikor ile İnkübasyon ve Tespit

1- Örneklerin içinde bulunduğu prob çözeltisi ortamdan alınarak bir başka eppendorfa aktarılır ve -20 °C'de muhafaza edilir (aynı prob defalarca kez kullanılabilir).

1- Sıcak su banyosunda 2 kez 30 dakika boyunca %50 Formamide + 2x SSCT çözeltisi ile örnekler yıkanır.

2- Bir önceki çözelti ortamdan uzaklaştırılır ve örnekler sıcak su banyosunda 1 kez 15 dakika boyunca 2x SSCT çözeltisi ile yıkanır.

3- Bir önceki çözelti ortamdan uzaklaştırılır ve örnekler sıcak su banyosunda 2 kez 30 dakika 0.2X SSCT ile yıkanır.

4- Örnekler iki kez PBST ile yıkanır.

5- Örnekler en az 1 saat oda sıcaklığında, yeni hazırlanmış bloklama bufferıyla bloklanır ve shakerda sallanır.

6- 1 saat bloklanan örneklerden bloklama solüsyonu uzaklaştırılır ve bir fazladan hazırlanan bloklama solüsyonuna 10 ml bloklama solüsyona 1µl Fab antibody eklenir ve örneklerimize Fab antibody içeren çözeltiden konur. (Örnekler eppendorf içerisinden pastör pipeti yardımıyla kuyucuklu plate'e taşınır ve bu basamak orada gerçekleştirilir)

7- Örnekler buzdolabında (+4 °C'de) 1 gece bekletilir.

8- Ertesi gün örnekler PBST ile 5-6 kez 5-10 dakika bekleyerek yıkanır. (Shakerda, oda sıcaklığında)

9- Örnekler staining solüsyonu ile 3 kez 5'er dakika yıkanır.

10- Proben bağlandığı bölgeyi renkli ve görünür kılmak için staining solüsyonunun 1 ml'sine 4 µl NBT+ 3 µl BCIP olacak şekilde eklenir ve örneklerle (her bir kuyucuğa) 1'er ml bu çözeltiden konur.

11- Plate alüminyum folyoya sarılır ve her 15 dakikada bir boyanıp boyanmadığı mikroskopta kontrol edilir. Eğer uzun süre renk oluşumu gözlemlenmediyse örnekler buzdolabına kaldırıp ertesi gün boyanması beklenir. Daha hızlı boyanma için etüv 37°C'ye getirilip örnekler buraya kaldırılabilir. Örneklerin boyanması için çok uzun süre beklenirse arka planda koyu mor renk meydana gelebilir.

12- Örneklerde beklenen bölgede renk oluşumu gözlemlendikten sonra 3 kez PBST ile yıkanır ve PFA ile yeniden fikse edilir, bu şekilde örnekler buzdolabında saklanabilir.

Çözeltilerin İçeriği

20x SSC

175,3 g NaCl, 88,2 g Natriyum Sitrat 1 L suda çözülür

Hyb-

%50 Formamid, 5x SSC, %0,1 Tween-20

Hyb+

Hyb-, 50 µg/ml Heparin, 5 mg/ml torula RNA

Staining Solüsyonu

100 mM Tris pH 9,5 (50 ml 1M stok/500 ml), 50 mM MgCl₂ (25 ml 1M stok/500 ml), 100 mM NaCl (16,7 ml 3M stok/500 ml), %0.1 Tween-20

Bloklama Solüsyonu

%10 goat serum+ %90 PBST, 2 mg/ml albumin

5.10 Oil Red O Metodu (Kim ve ark., 2015)

Lipit birikmelerini tespit etme amacıyla oil red metodu kullanılmıştır. Bu çalışmada 5 günlük zebra balığı embriyoları tercih edilmiştir. 5 günlük embriyolar %4 PFA ile bir gece 4 °C'de fikse edildi. PBST (PBS+%0.005 Tween-20) ile kısa süreli yıkandıktan sonra 3 kez 10 dakika boyunca PBS ile yıkandı. Daha sonra %60 izopropanol ile 1 saat boyunca inkübe edildiler. Daha sonra %0,3 Oil red, % 60'lık izopropanolün içinde hazırlandıktan sonra embriyolar 75 dakika boyunca bu solüsyona maruz bırakıldı. Renk oluşumu gözlendikten sonra embriyolar PBST'ye transfer edildi. Lipit birikmeleri mikroskop altında, %1 metilselüloz içinde görüntülenip fotoğraflanmıştır.

5.11 Gen İfadesi Analizi (RT-PCR)

Maruziyet sonrası gen ifadeleri analizi için 24, 48 ve 72 saatlik embriyolar seçilerek RLT Lizis tamponu içinde enjektör yardımı ile homojenize edilmiştir. Bu homojenatlardan mRNA elde edilerek (RNA-easy micro kit, Qiagene kullanılarak manuel olarak yapıldı) cDNA sentezi yapılmış ve daha sonrasında *casp2*, *casp3*, *casp8*, *dnmt3a* ifade düzeyleri RT SYBR Green kiti (Qiagene, Almanya) kullanılarak Rotor Gene-Q (Qiagene, Almanya) ile analiz edilmiştir.

RNA-easy micro kit ile elde edilen RNA kalite ve konsantrasyonu NanoDrop ile kontrol edilmiştir. cDNA eldesi SuperScript™ IV kiti ile gerçekleştirilmiştir.

Analiz edilecek genlerin ifadeleri, RT2 SYBR Green Master Mix karışımına elde edilen cDNA örneklerinin eklenmesi şeklinde Rotor-Gene Q cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Housekeeping gen olarak *actb1* kullanılmıştır. Örnekler 3 tekrarlı çalışılmıştır.

Tablo 13: Gen anlatım düzeyleri ölçülen genlere ait primer dizileri

RT-PCR Analizi Yapılan Genlerin Primer Dizileri 5'-->3	
<i>casp2</i>	F: tgtcacacctgcgaaaagac
	R: aattctggtgtgcaggggaag
<i>casp3a</i>	F: aaggactttgatcgaggac
	R: taatctgcgcaactgtctgg
<i>casp8</i>	F: tattcaagcctgccaaggag
	R: ccgatcaggaaatcagcttc
<i>dnmt3</i>	F: gtcattgtggtttggtgatgg
	R: aacgggctgtttgttagg

5.11.1 cDNA sentezi

cDNA sentezi için kullanılan bileşenler aşağıdaki gibidir;

Tablo 14: cDNA sentezi için kullanılan bileşenler (I)

Bileşenler	Miktar
RNA	5 µg'a kadar
Nükleaz- free su	totalde 11 µl
Random hexamer	1 µl
dntp	1 µl

Karıştırılır ve 5 dakika 65 °C'de inkübe edilir ve 1 dakika buza alınır. Daha sonra Tablo 15'deki karışım hazırlanır ve ilk karışımın üzerine eklenir.

Tablo 15: cDNA sentezi için kullanılan bileşenler (II)

Bileşenler	Miktar
5x SSIV buffer	4 µl
100mM DDT	1 µl
Rnasin	1 µl
Revers Transkriptaz	1 µl

Eklenen karışım önce 10 dakika oda sıcaklığında daha sonra termo-cycle'da 10 dakika 50-55 °C ve 10 dakika 80 °C'de inkübe edilir ve cDNA hazır hale getirilir.

5.11.2 RT-PCR analizi

- 1) Sybr green miksi, cDNA, primerler ve nükleaz-free su buz üzerinde eritilir.
- 2) Tablo 16'da belirtildiği üzere toplam reaksiyon miktarı 10 µl olacak şekilde bileşenlerin uygun miktarları ile karışım hazırlanır.

Tablo 16: RT-PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Syber Green	5 µl
İleri (F) Primer (10 µM)	0,5 µl
Geri (R) Primer (10 µM)	0,5µl
Nükleaz-free su	3 µl
cDNA	1 µl

3) Karışım hazırlandıktan sonra pipetleme yöntemi ile karıştırılıp, spin yapılır.

4) Karışımlar Rotor-Gene Q cihazına yerleştirilip Tablo 17’de belirtilen döngü serilerinde reaksiyon gerçekleştirilir.

Tablo 17: RT-PCR döngü ayarları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Enzim aktivasyonu	95°C	10 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	40
Tutunma/Uzama	60°C	60 sn	

5.11.3. Delta delta C_t metodu ile veri analizi

Verilerin analizi house keeping gen *actb1* ile normalizasyona dayalı delta delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) metodu kullanılarak yapılmıştır.

Bu yöntem ile PCR’da belirlenen eşik değer döngü sayısı (threshold cycle number = C_t), kontrol ve araştırılan gen için karşılaştırılır. Kontrol (referans) ile incelenecek gen bölgesi arasındaki C_t değer farklılığı housekeeping gen ile normalize edilip $\Delta\Delta C_t$ oranı belirlenerek bulunur. “Housekeeping” genler tüm çekirdekli hücrelerde aktif olarak bulunan genlerdir ve bunlara spesifik primerlerle amplifiye edilerek belirlenirler. Bu amaçla kullanılan gen bölgeleri arasında β -aktin, albumin, β -globin,

hipoksantin fosforibozil transferaz sayılabilir. Karşılaştırmalı C_t metodu aynı zamanda $2^{-[\Delta\Delta C_t]}$ olarak bilinmektedir (Yuan ve ark., 2008).

$$[\Delta\Delta C_t] = [\Delta C_t]_{\text{örnek}} - [\Delta C_t]_{\text{referans}}$$

Bu formülde $[\Delta C_t]$, örnek; ilgilenilen örneğe ait C_t değeri ile housekeeping genin C_t değer farklılığıdır. $[\Delta C_t]$, referans ise kontrole ait C_t değeri ile housekeeping genin C_t değer farklılığıdır (Yuan ve ark., 2008).

5.12 ChIP (kromatin immün çöktürme) Metodu (Brind'Amour ve ark., 2015)

5.12.1 Embriyoların hazırlanması

Çalışmamız doğrultusunda histon modifikasyonlarının maruziyet grubundaki değişimini incelemek amacıyla ChIP metodu kullanılmıştır. Çalışmamızda 48 saatlik embriyolar tercih edilmiş olup, mikroskop altında 10'ar adet seçilerek koryondan çıkmayanlar pronaz veya forsips yardımıyla koryondan çıkartılıp eppendorflara alındılar. Tricaine solüsyonuyla anestezi edildiler. Daha sonra üzerlerine 1 ml hücre dissociation solüsyonu (Gibco 13151014) eklendi ve birçok kez enjektör yardımıyla çekilip bırakılmak suretiyle iyice ezildiler. 500 g ,4 °C'de 8 dakika santrifüj edildiler. Kalan yolk keselerini de ortamdan uzaklaştırmak için 1 kez daha hücre dissociation solüsyonuyla yıkandılar. Daha sonra 1x PBS+ 1x PIC (proteaz inhibitör kokteyli) eklenerek 500 g ,4 °C'de 8 dakika santrifüj edildiler ve böylece yalnızca hücreler elde edilmiş oldu. Bu basamakta pellet -80 °C'de istendiği kadar saklanabilir.

5.12.2 Manyetik beادلere antikor bağlanması

Her bir örnek için; protein A kaplı 10 µl bead solüsyonu (Dynabeads 10001D) alınarak soğuk 50 µl ChIP solüsyonuyla 2 kez yıkanır. Her bir örnek için 110 µl ChIP solüsyonu ile 0,75 µg H3K27ac antikoru (abcam, ab4729) karıştırılır. 10 µl manyetik beادلın kromatin bağlama kapasitesi 3 µg'dır. Tüpler soğuk odada 4°C'de 40 rpm'de sürekli dönen bir mekanizmada en az 3 saat tutulur.

5.12.3 Kromatin kesimi

1- %30 epibolyden genç embriyolar ve her bir örnek için; 20 µl nuclei ekstaksiyon solüsyonu (Sigma NUC-101) ve 2 µl %1 Triton/ %1 DOC, %30 epibolyden sonraki embriyolar için 10 µl nuclei ekstaksiyon solüsyonu ve 1 µl %1 Triton/ %1 DOC hazırlanır ve karıştırılır.

2- Master miks Tablo 18'deki gibi hazırlanır.

Tablo 18: Kromatin kesimi için gerekli master miks karışımı

	%30 epibolyden genç embriyolar için	%30 epibolyden sonraki embriyolar için
Mnase master buffer 10x	4 µl	5 µl
100 mM DTT	0,8 µl	1 µl
PEG5000	-	5 µl
MNase	1 µl (5U/ µl)	1 µl (2U/ µl)
H ₂ O	8,2	23
Total	14	35

3- Master miks her bir örneğe eklenir ve kısa bir pipetaj yapılır.

4- 7 dakika oda sıcaklığında beklenir.

5- 5,5 µl Mnase stop solüsyonu (100 mM EDTA) eklenir kısa bir vorteks yapılır ve örnekler buza alınır.

6- 5,5 µl %1 Triton/ %1 DOC örneklere eklenir, kısa bir vorteks yapılır ve 15 dakika buzda tutulur.

7- Totalde 200 µl'ye erişecek şekilde ChIP solüsyonu eklenir. 13000 rpm, 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kenara ayrılır ve kesilmiş kromatinimiz elde edilir. Ayrılan süpernatantın 20 µl'si input örneği olarak ayrılıp buzdolabında saklanır.

8- Her bir örneğe 5 µl olacak şekilde ChIP solüsyonuyla yıkanan manyetik beadler 180 µl kesilmiş kromatine eklenir ve 2 saat boyunca soğuk odada 4 °C’de sürekli dönen bir mekanizmada çevrilir böylece kromatine spesifik olmayan bağlanmalar engellenmiş olur.

9- 2 saatin sonunda örnekler manyetik racka konur ve kromatin başka bir eppendorfa transfer edilir.

5.12.4 Manyetik immun çöktürme

1- Antikor bağlanan beadlerin bulunduğu eppendorflara kısa bir spin yaptırılarak bütün sıvının eppendorfun dibine düşmesi sağlanır.

2- Örnekler manyetik racka yerleştirilir ve süpernatant uzaklaştırılır, elimizde antikor bağlı beadler kalmış olur.

3- Kesilmiş kromatinlerin bulunduğu örnekler antikor bağlı beادلere eklenir ve soğuk odada 40 rpmde 1 gece sürekli dönen bir mekanizmada çevrilir.

5.12.5 Yıkama basamağı

1- Örneklerle kısa bir spin yaptırılarak bütün sıvının eppendorfun dibine düşmesi sağlanır.

2- Örnekler manyetik racka konarak 1 dakika beklenir ve sıvı ortamdan uzaklaştırılır. Böylece beادلere yalnızca araştırdığımız histon modifikasyonunu içeren kromatin parçaları yapışmış olur.

3- Her bir örnek 2 kez 100 µl soğuk düşük tuz içerikli buffer ve 2 kez de 100 µl yüksek tuz içerikli buffer ile yıkanır.

4- Her bir örneğe 100 µl ve buzdolabında sakladığımız input örneklerine de 80 µl elution buffer eklenir ve 65 °C’de 1,5 saat inkübe edilir.

5- Örnekler manyetik racka alınır 1 dakika beklenir ve sıvı agaroz içeren PhaseLock tüplere alınır. Böylece kromatinin manyetik beadlerden ayrılması sağlanmış olur.

5.12.6 DNA izolasyon basamağı

- 1- PhaseLock tüplerdeki agarozun aşağıya inmesi amacıyla spin ettirilir.
- 2- Her bir örneğe 100 µl fenol kloroform izoamil alkol eklenir ve vorteks ettirilerek örneklerle fenol kloroformun karışması sağlanır.
- 3- Örnekler 13000 g, oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilir.
- 4- Süpernatant yeni eppendorflara alınır.
- 5- Her bir örneğe 10 µl 3M NaOAc ve 1 µl glikojen eklenir ve DNA'nın ağırlaştırılıp çökmesi sağlanır.
- 6- Her bir örneğe 1 ml soğuk %100 EtOH eklenir ve örnekler vortekslenir.
- 7- Örnekler -20 °C'de bir gece bekletilir.
- 8- Ertesi gün örnekler 13000 g 30 dakika 4 °C'de santrifüj edilir ve DNA'nın çöktürülmesi sağlanır.
- 9- Süpernatant ortamdan uzaklaştırılır ve her bir örneğe 1ml %70 EtOH eklenir ve 5 dakika beklenir ve yeniden 13000 g'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edilir.
- 10- EtOH ortamdan uzaklaştırılır ve tüplerin içinde kalan alkolün uçması için 5 dakika oda sıcaklığında beklenir.
- 11- Alkolü uçurulan örneklerin üzerine 20 µl elution buffer eklenir ve DNA elde edilmiş olur.

ChIP metodunda kullanılan çözeltilerin içerikleri aşağıdaki gibidir;

ChIP buffer: 100 µl Tris, 750 µl NaCl, 20 µl 0,5 M EDTA, 5 µl Triton X-100, 100 µl 50x PIC, 50 µl PMSF (100 mM), 3,98 ml ddH₂O

Düşük tuz içerikli buffer: 100 µl 100 mM EDTA, 750 µl 1M NaCl, 50 µl Triton X-100, 25 µl %20 SDS, 100 µl 1M Tris, 3,995 ddH₂O

Yüksek tuz içerikli buffer: 100 µl 100 mM EDTA, 2,5 ml 1M NaCl, 50 µl Triton X-100, 25 µl %20 SDS, 100 µl 1M Tris, 2,245 µl ddH₂O

Elution buffer: 100 µl 1M NaHCO₃, 100 µl %10 SDS, 800 µl ddH₂O

5.12.7 PCR basamağı

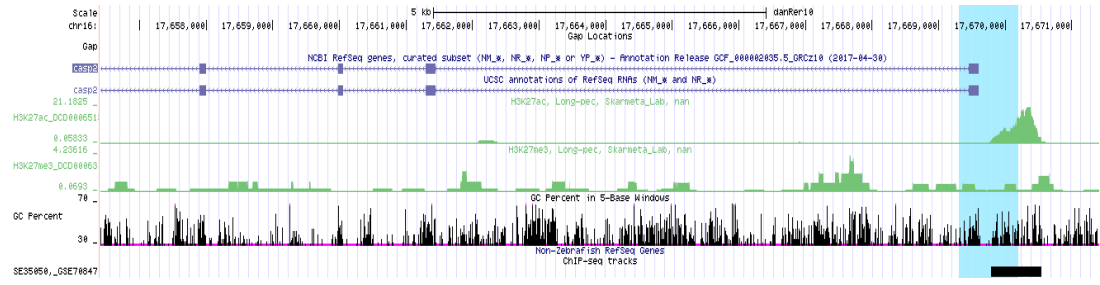
Histon modifikasyonları gene özgü çalışılmaktadır. Bu sebeple biz de RT-PCR ile anlatım düzeylerini tespit ettiğimiz *casp2*, *casp3*, *dnmt3a*, *vtg1* genlerindeki H3K27ac histon markını ve gen anlatımındaki değişimin histon modifikasyonlarıyla ilişkisi olup olmadığını araştırdık. Bu amaçla kullandığımız primer dizileri aşağıdaki gibidir;

Tablo 19: ChIP metodunda kullanılan primer dizileri

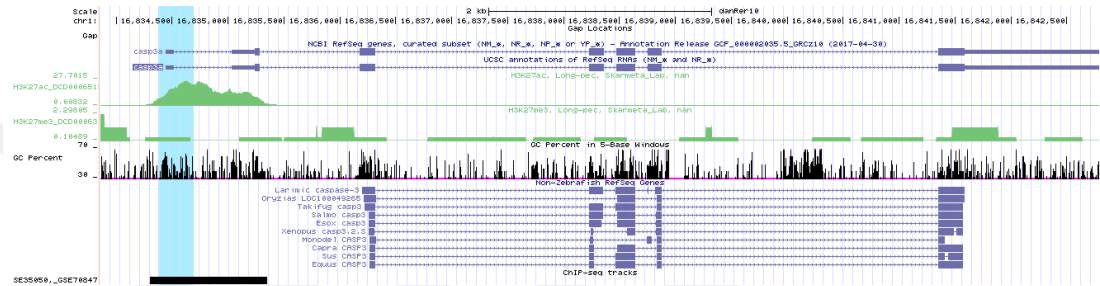
<i>casp2</i>	F: TAATGCTCTCTGCCATGCTG
	R: TGCTGCAGGATTTAGTGGTG
<i>casp3a</i>	F: ATATCGCCCGCATACACTTC
	R: GAAGACGCTTACCGAGAACC
<i>dnmt3a</i>	F: AGAGCCAGACACACATGCAC
	R: ACCCTCTGTGACCAATCAGC
<i>vtg1</i>	F: TACCCACGAGGGCTACAGTC
	R: CACTTGGTCAGCAAGAAAATCA

Bu genlerden *casp2*, *casp3a* ve *dnmt3a* pozitif kontrol amaçlı kullanılırken *vtg1* ve laboratuvarında hali hazırda bulunan ve negatif kontrol olarak kullanılan *tyr* geni de kullanılmıştır. Primerler seçilirken H3K27ac histon markını aktif ve inaktif olduğu bölgelere dikkat edilmiştir zebrafish genom browser kullanılmıştır (<https://genome.ucsc.edu/>, Erişim tarihi: 15 Ağustos 2020). Seçilen primerlerin genom browserdaki görüntüleri aşağıdaki gibidir ve mavi ile aydınlatılan bölge primerlerin seçildiği bölgeyi ifade etmektedir.

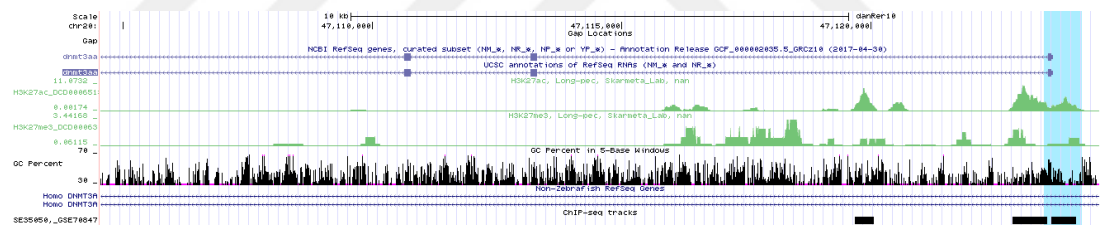
casp2



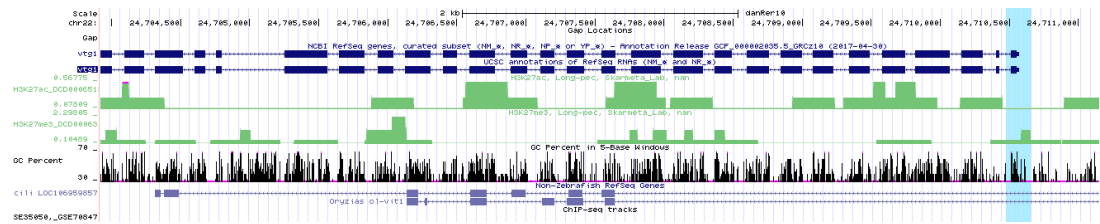
casp3a



dnmt3a



vtg1



PCR için kullanılan bileşenler her örnek başına; 0,5 µl forward primer, 0,5 µl reverse primer, 1 µl DNA ve 8 µl su/syber green şeklindedir.

5.12.8 ChIP-PCR veri analizi

ChIP-qPCR verilerinin, kromatin miktarı, immünopresipitasyon etkinliği ve DNA geri kazanımı dahil çeşitli değişenler için normalize edilmesi gereklidir.

Farklı farklı analiz metodları olmakla beraber biz yüzde input metodunu tercih ettik. Bu analiz yöntemine göre ChIP'den elde edilen sinyaller input örneğinden elde edilen sinyallere bölünür. Bu input örneği, ChIP'de kullanılan kromatin miktarını temsil eder. Yani başta input örneği olarak ayırdığımız belli bir histon modifikasyonunu içermeyen total kromatin örneklerinin öncelikle C_t değerlerinin normalize edilmesi gereklidir ve aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\Delta C_t [\text{normalize ChIP}] = C_t [\text{ChIP}] - \{C_t [\text{Input}] - \log_2 (\text{Sulandırma Faktörü})\}$$

Bizim örneklerimizde total örneğin %10'u input örneği olarak ayrıldığı için sulandırma faktörü 10 dur ve $\log_2 10$ değeri 3.32'ye tekabül eder ve her örnek için bu şekilde hesaplanmıştır. Özet olarak; 3 tekrarlı çalışılan örnekler için ortalama değer hesaplanır, input örneklerinin normalizasyonu için ortalama input C_t değerinin 3,32 çıkarılır ve daha sonra bu değer yeniden ortalama ChIP C_t değerinden çıkarılır. Bulunan sonuç % $\log_2$ input – ChIP olarak ifade edilir.

5.13 Akridin Orange Metodu ile Apoptoz Analizi (Van Ham ve ark., 2010)

Yaşayan farklı evredeki embriyolarda apoptoz, akridin orange (Sigma) boyama metodu ile bakılmıştır. Bu metot ile embriyolar oda sıcaklığında bir nükleik asit seçici kromatin boyası olan 5 $\mu\text{g/ml}$ akridin orange boyasına 10 dakika maruz bırakılmış ve E3 çözeltisi ile yıkanmıştır. Embriyolar mikroskop altında incelenmeden 3 dakika önce tricaine'e maruz bırakılarak anestezi edilmişlerdir. Daha sonra embriyolar floresan mikroskobu (Zeiss V16 Axio Zoom microscope, 546 nm filtre) altında incelenerek apoptotik hücreler görüntülenmiştir.

5.14 RNA-seq Yöntemi

5.14.1 RNA-seq için kütüphane hazırlanması

RT-PCR yöntemiyle yalnızca belli sayıda genin anlatım seviyeleri tespit edilebilmektedir. RNA dizileme yönteminde ise kontrol ve maruziyet grubu arasındaki gen anlatım seviyeleri farkı tüm transkriptom açısından değerlendirilebilmektedir. Biz de bu amaçla maruziyet grubunun fenotipte yarattığı değişimlerin altında yatan sebebi araştırma amaçlı RNA-seq metodunu kullandık.

RNA-seq metodu Birmingham Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiş olup, örnekler dizilemeden sorumlu üniteye gönderilmiştir. Dizileme için 48 saatlik embriyolar kullanılmıştır. Aseton-kontrol ve metilparaben gruplarından ikişer adet örnek dizilenmiştir. Her bir grup için 10'ar embriyo kullanılmıştır. Embriyolar mikroskop altında seçildikten sonra total RNA izolasyonu Qiagen micro kit ile gerçekleştirildi. Örneklerin RNA konsantrasyonları ölçüldü ve yaklaşık 70 ng/ µl'dir. Daha sonra örnekler -80 °C'ye kaldırılıp, kütüphane oluşturma basamağına kadar orada tutuldular.

Bundan sonraki basamaklar Birmingham Üniversitesi içerisinde yer alan dizileme ünitesindeki görevliler tarafından gerçekleştirilmiştir. Kütüphane oluşturma basamağından önce izole ettiğimiz RNA'nın kalitesi Agilent Bioanalyzer ile ölçülmüştür. RNA kalitesi; RNA Bütünlük Numarası (RIN) denen ve 1 ile 10 arasında derecelendirilen bir değer ile anlaşılır. 10 en az bozulmayı ifade etmektedir ve en yüksek kalitededir. RIN, jel elektroforezi ve 28S ile 18S ribozomal bant oranlarının analizini kullanarak numune bütünlüğünü tahmin eder. Bizim örneklerimiz için bu değer 9 olarak ölçülmüştür ve dizilemeye uygun görülmüştür.

Kütüphane hazırlanırken; "QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina" kiti kullanılmıştır. Ve bu kit ile 4.5 saatte kütüphane oluşturulabilmektedir. Kit, girdi olarak total RNA kullanır, bu nedenle önceden poli (A) zenginleştirilmesi veya rRNA uzaklaştırma gibi basamaklar gerekmemektedir. 1. basamak ters transkripsiyon basamağıdır. cDNA kitaplığı oluşturma, Illumina'ya özgü Read 2 bağlayıcı dizisini içeren oligo dT hazırlama ile başlar. 3' poli (A) kuyruklu RNA; olgun, işlenmiş, kodlama dizileridir. Poli (A) seçimi, RNA'yı bir substrata kovalent olarak bağlanmış poli (T) oligomerlerle, tipik olarak manyetik boncuklarla karıştırarak gerçekleştirilir. Poli (A) seçimi, kodlamayan RNA'yı elemiş olur. rRNA, bir hücredeki RNA'nın % 90'ından fazlasını temsil ettiği için ortamdan uzaklaştırılmalıdır eğer tutulursa transkriptomdaki diğer verileri bastırır. İlk iplik sentezinden sonra RNA ortamdan uzaklaştırılır ve cDNA elde edilmiş olur. İkinci iplik sentezi, rastgele primer bağlaması ve DNA polimeraz ile gerçekleştirilir. Rastgele primer, Illumina'ya özgü Read 1 bağlayıcı dizisini içerir. Birinci ve ikinci iplik sentezi arasında hiçbir saflaştırma gerekmez. İkinci iplik

sentezini, protokolü otomasyonla uyumlu hale getiren bir manyetik boncuk esaslı saflaştırma aşaması izler. Diğer bir basamak olan kütüphane amplifikasyonu sırasında, cluster üretimi için gerekli adım dizileri tanıtılır. Çoğullama (multiplexing), 96 mevcut i7 endeksi ve 96 i5 endeksi kullanılarak 9216 örneğe kadar barkod kombinasyonu ile gerçekleştirilebilir. Daha sonra NGS okumaları, poli (A) kuyruğuna doğru üretilir.

5.14.2 RNA-seq analizi

QuantSeq veri analizi BlueBee® biyoinformatik platformunda gerçekleştirilmiştir. BlueBee platformuna FASTQ formatındaki veriler yüklenerek kırpma (trimming), hizalama (alignment) ve kalite kontrol basamaklarının gerçekleşmesi sağlanır.

Dizileme sonucu elde ettiğimiz ham verilerde istenmeyen diziler bulunmaktadır. Doğru analiz için bu dizilerin elenmesi gerekmektedir. Bu işlem için dizilenen bölgelerden adaptörler atılır, poli A kuyrukları kaldırılır. Bu basamak BlueBee’de bulunan Bbtools aracı ile yapılır. FastQC aracı, dizileme okuma kalitesi için bir rapor oluşturur. Nogroup argümanı, 50bç'den uzun okumalar için baz gruplamasını devre dışı bırakır.

Daha sonra hizalama basamağı için BlueBee içinde yer alan STAR aracı kullanılır ve BAM formatındaki hizalama dosyası elde edilir. STAR, kırpılmış okumaları referans genoma hizalar. Samtools index komutu, hizalanmış okuma BAM dosyalarının dizinlenmiş sürümlerini oluşturur; hizalanmış okuma verilerinin daha hızlı işlenmesine ve görselleştirilmesine olanak tanır. Daha sonra HTSeq aracıyla gen anlatımı miktar tayini yapılır. RseQC aracıyla da analizi yapılan veri haritalanmış olur. Analiz tamamlandıktan sonra farklı şekilde ifade edilen genlerin listesi, en çok anlatımı değişen 20 genin heat mapi ve PCA, MA grafikleri elde edilir.

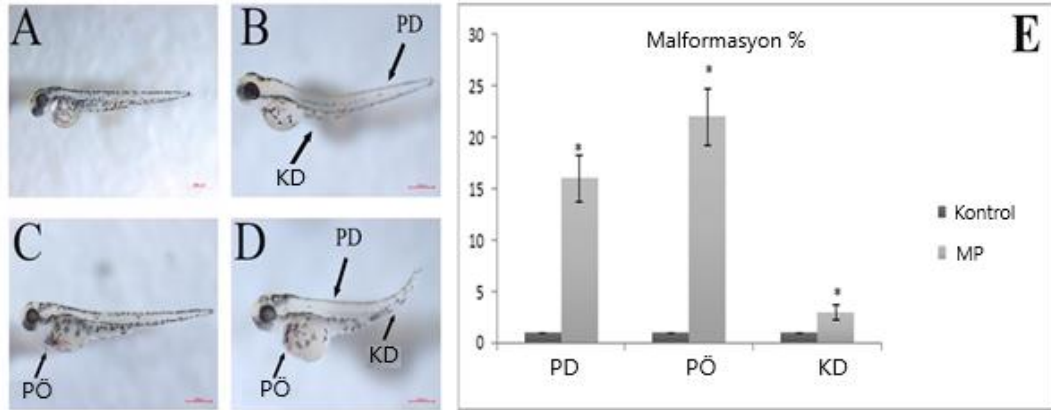
6. BULGULAR

6.1 LC50 Dozu Sonuçları

LC50 dozu; 24.saat ve 48.saat için 72,23 mg/L, 72.saat 68 mg/L, 96.ve 120 saat için 66 mg/L olarak hesaplanmıştır bu sebeple bundan sonraki çalışmalar için etkili bir doz seçmek adına 50 mg/L ile çalışmalara devam edilmiştir.

6.2 Kontrol ve MP Gruplarının Malformasyon Yüzdesi ve Morfolojileri

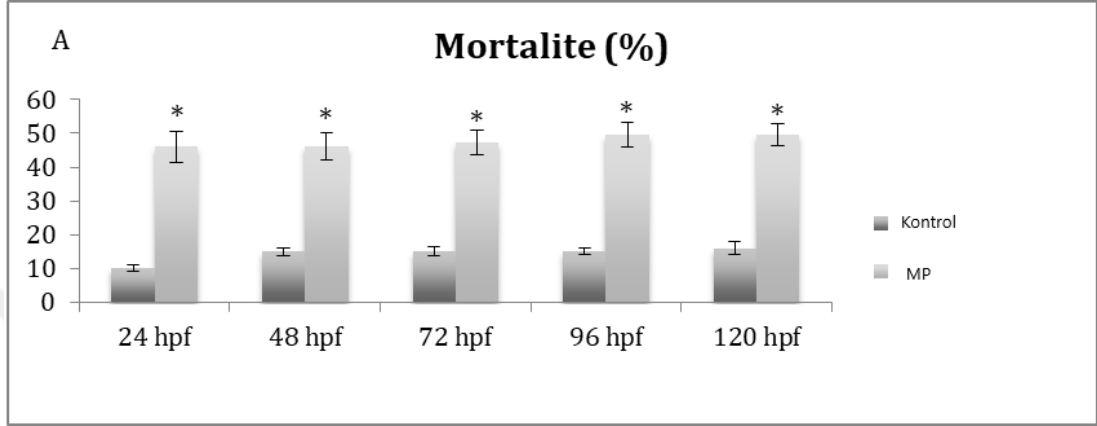
Kontrol ve maruziyet grubunun 72 saatteki görüntüleri ve malformasyon yüzdesi aşağıdaki gibidir. 72 saatin sonunda paraben grubunda; pigmentasyon defekti, perikardiyal ödem ve kuyruk defekti gözlemlenmiştir. Her üç defekt paraben grubunda anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 3: Kontrol ve MP gruplarının malformasyon yüzdesi grafiği ve morfolojileri. A: 72 hpf'de kontrol embriyosunun morfolojisi; B-D: MP'ye maruz kalan embriyoların morfolojileri (Zeiss Discovery V8, Almanya). E: MP'ye maruz kalan zebra balığı embriyolarında gözlenen bireysel morfolojik anormalliklerin kümülatif yüzdeleri. KD: Kuyruk defekti; PÖ: Perikardiyal ödem; PD: Pigmentasyon defekti. *, kontrol ve maruziyet grubu arasındaki istatistiksel bir farkı göstermektedir ($p < 0.05$). Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir.

6.3 Kontrol ve MP Gruplarının 120 saate Kadar Mortalite Yüzdesi Grafiği

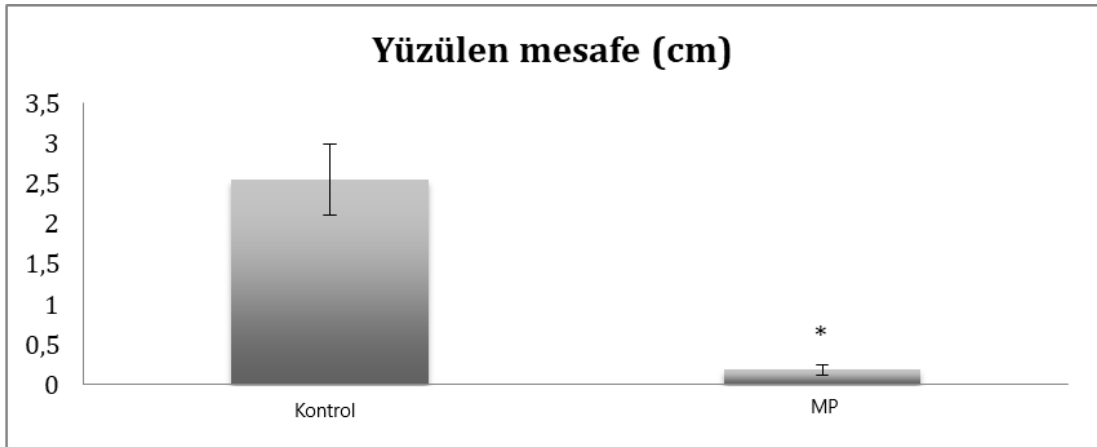
LC50 dozu hesaplandıktan sonra kullandığımız 50 mg/L dozunun kontrol ve MP gruplarında yarattığı mortalite yüzdesi aşağıda verilmiştir. MP grubunda 24 hpf'den 120 hpf'ye kadar her günde anlamlı derecede artmış mortalite gözlemlenmiştir.



Şekil 4: Kontrol ve MP gruplarının 120 saate kadar mortalite yüzdesi grafiği. Veriler, üç bağımsız deneyden ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir, *, $p < 0.05$, kontrol ve maruziyet grubu arasındaki istatistiksel bir farkı göstermektedir.

6.4 Lokomotor Aktivite Sonuçları

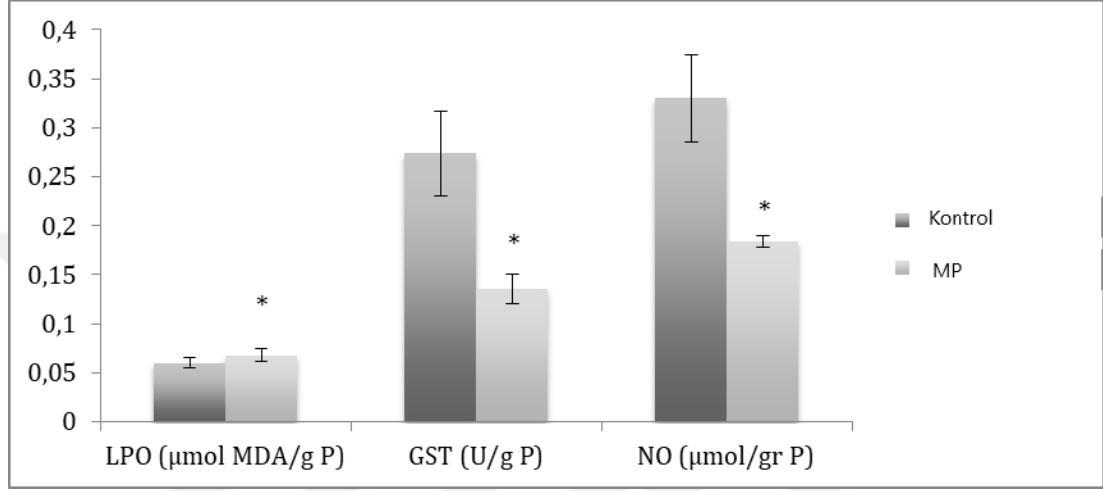
72 saatlik embriyolarda yapılan lokomotor aktivite testi sonuçları aşağıda verilmiştir. Maruziyet grubunda yüzülen mesafe anlamlı derecede ($p < 0.05$) azalmıştır.



Şekil 5: Kontrol ve MP gruplarının lokomotor aktivite sonuçlarının karşılaştırması grafiği. Kontrol (n = 72) ve MP grubu (n = 80) olmak üzere çalışılmıştır. *, $p < 0.05$ kontrol ve maruziyet grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

6.5 Biyokimyasal Parametre Sonuçları (LPO, NO ve GST)

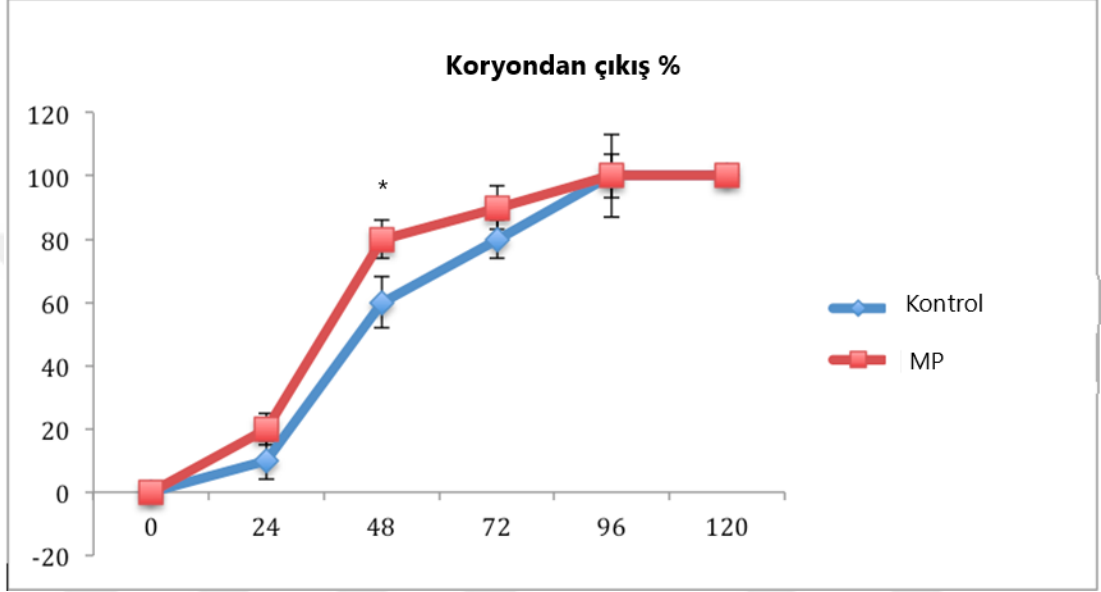
72 saatlik embriyolarda yapılan biyokimyasal parametre sonuçları aşağıda verilmiştir. Malondialdehit (MDA) olarak ölçülen LPO düzeyi maruziyet grubunda anlamlı derecede artarken ($p < 0,05$), GST ve NO seviyesi anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 6: Kontrol ve MP gruplarının LPO, NO seviyeleri ve GST aktiviteleri grafiği. 72 hpf zebra balığı embriyoları pool yapılarak ve tekrarlı çalışılmıştır ($n = 5$, grup başına 100 embriyo). Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. *, $p < 0,05$ kontrol ve maruziyet grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. LPO: Lipit peroksidasyonu, GST: Glutasyon S-transferaz, NO: Nitrik oksit

6.6 Kontrol ve MP Gruplarında LC50 Dozunun Koryondan Çıkış Süresine Etkisi Sonuçları

120 saat boyunca izlenen kontrol ve metilparaben gruplarının koryondan çıkış süreleri aşağıdaki verilmiştir. Koryondan çıkış yüzdesi 48. saatte maruziyet grubunda anlamlı derecede ($p < 0,05$) artmıştır.

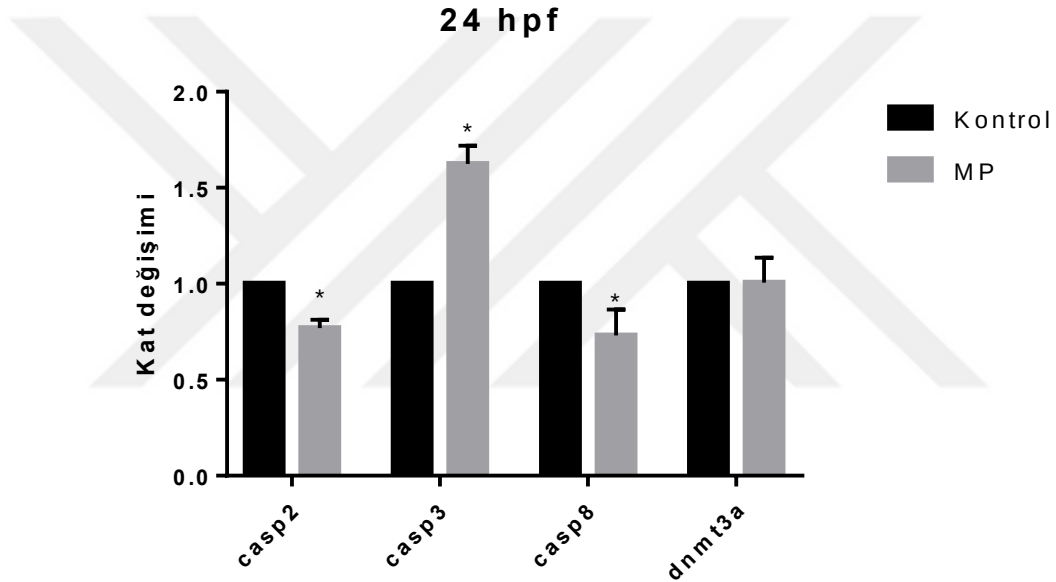


Şekil 7: Kontrol ve MP gruplarının 120 saat boyunca koryondan çıkma yüzdesi grafiği. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. * $p < 0,05$ kontrol ve maruziyet grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

6.7 RT-PCR Analizi Sonuçları

6.7.1 24 saatlik embriyolar için RT-PCR sonuçları

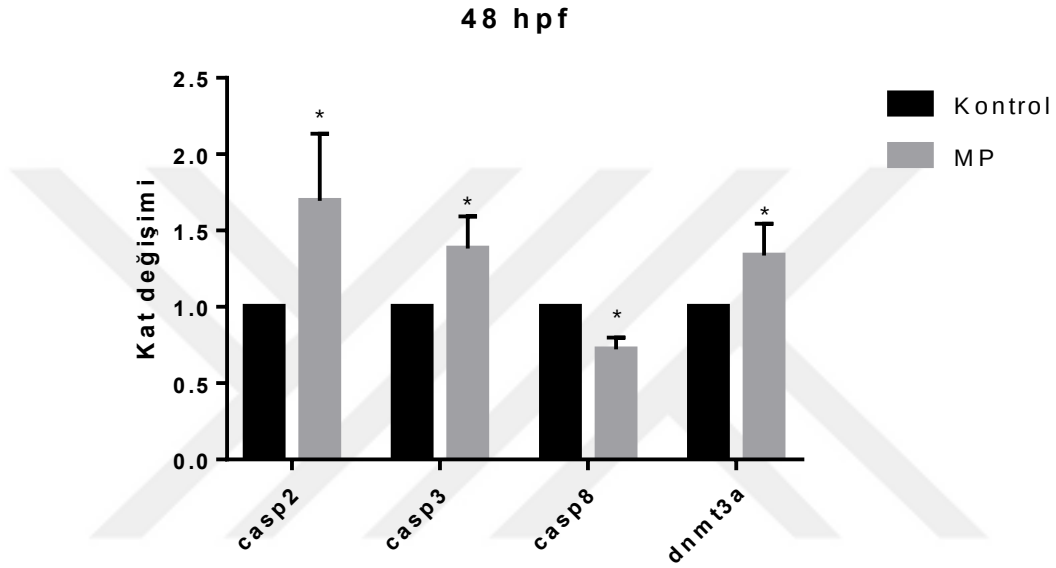
24 saatlik embriyolarda yapılan RT-PCR sonuçları aşağıda gösterilmiştir. Maruziyet grubunda *casp2*, *casp8* anlatım seviyeleri anlamlı derecede azalmış ($p < 0,05$), *casp3* anlamlı derecede artmış ($p < 0,05$), *dnmt3a* anlatım seviyelerinde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir.



Şekil 8: Kontrol ve MP gruplarının 24. saatte mRNA anlatım grafiği. Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler, üç tekrar ve grup başına $n=10$ olacak şekilde çalışılması sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$ kontrol ve maruziyet grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

6.7.2 48 saatlik embriyolar için RT-PCR sonuçları

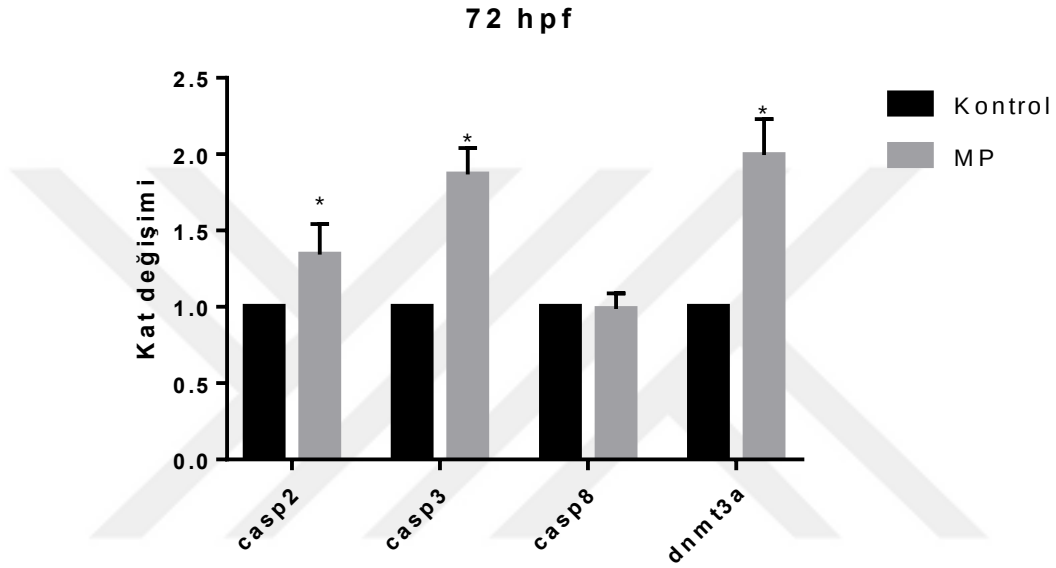
48 saatlik embriyolarda yapılan RT-PCR sonuçları aşağıda gösterilmiştir. Maruziyet grubunda *casp2*, *casp3* ve *dnmt3a* anlatım seviyeleri anlamlı derecede artmış ($p < 0,05$), *casp8* anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$) .



Şekil 9: Kontrol ve MP gruplarının 48. saatte mRNA anlatım grafiği. Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler, üç tekrar ve grup başına $n=10$ olacak şekilde çalışılması sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$ kontrol ve maruziyet grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

6.7.3 72 saatlik embriyolar için RT-PCR sonuçları

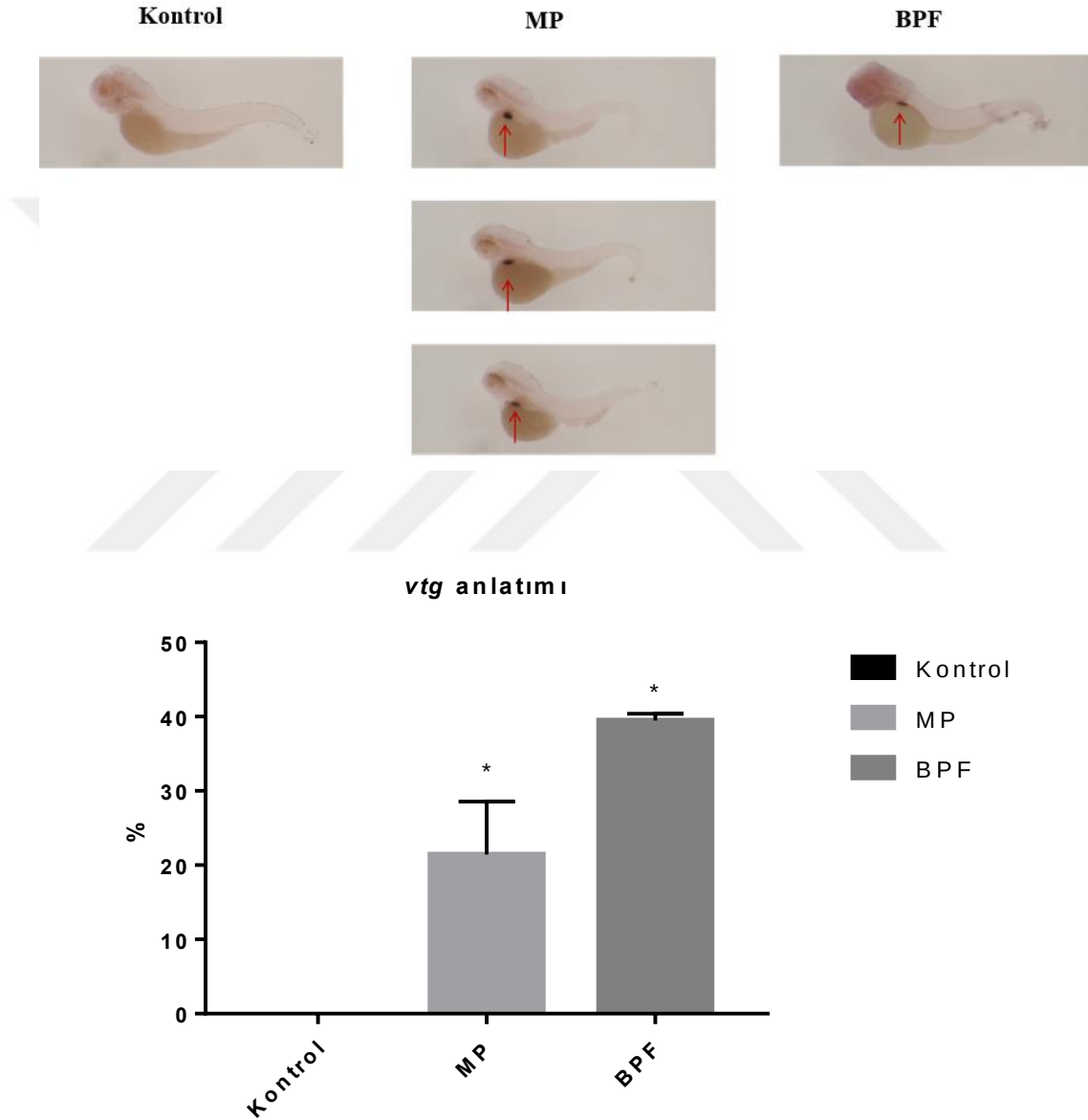
72 saatlik embriyolarda yapılan RT-PCR sonuçları aşağıda gösterilmiştir. Maruziyet grubunda *casp2*, *casp3* ve *dnmt3a* ($p < 0,05$) anlatım seviyeleri anlamlı derecede artmış, *casp8* anlatım seviyesinde anlamlı bir değişim bulunamamıştır.



Şekil 10: Kontrol ve MP gruplarının 72. saatte mRNA anlatım grafiği. Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler, üç tekrar ve grup başına $n=10$ olacak şekilde çalışılması sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$ kontrol ve maruziyet grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

6.8 İn Situ Hibridizasyon Sonuçları

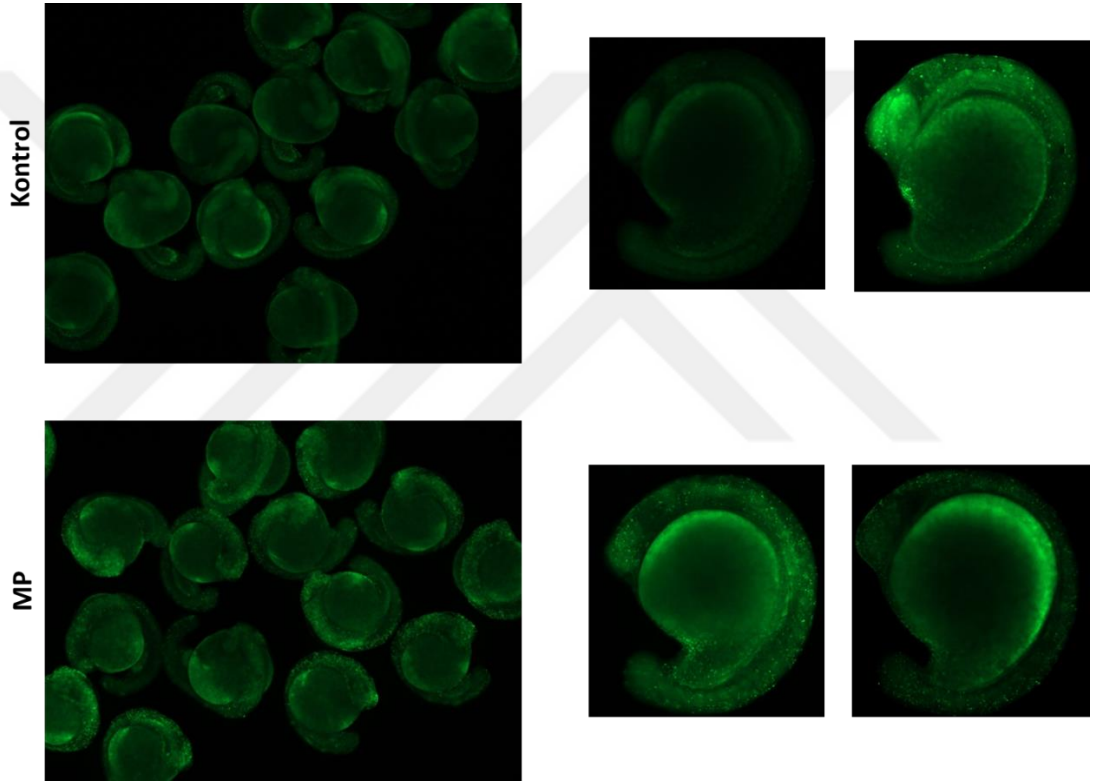
96 saatlik embriyolarda yapılan *vtg* in situ hibridizasyonun sonuçları aşağıdaki gibidir. BPF (Bisfenol F) pozitif kontrol olarak kullanılmış olup oklarla gösterilen bölgeler karaciğerde anlatımı olan *vtg* 'yi göstermektedir. Grafikte ise MP ve BPF gruplarında *vtg* anlatımı gösteren embriyoların yüzdesi verilmiştir.



Şekil 11: Kontrol ve maruziyet gruplarının *vtg* anlatımı açısından karşılaştırılması grafiği ve morfolojileri. Ortalama değerler, üç tekrar ve totalde kontrol (n=33), MP (n=42), BPF (n=28) embriyo içerecek şekilde çalışılmıştır. * $p < 0,05$ kontrol ve maruziyet grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

6.9 Akridin Orange ile Apoptoz Analizi Sonuçları

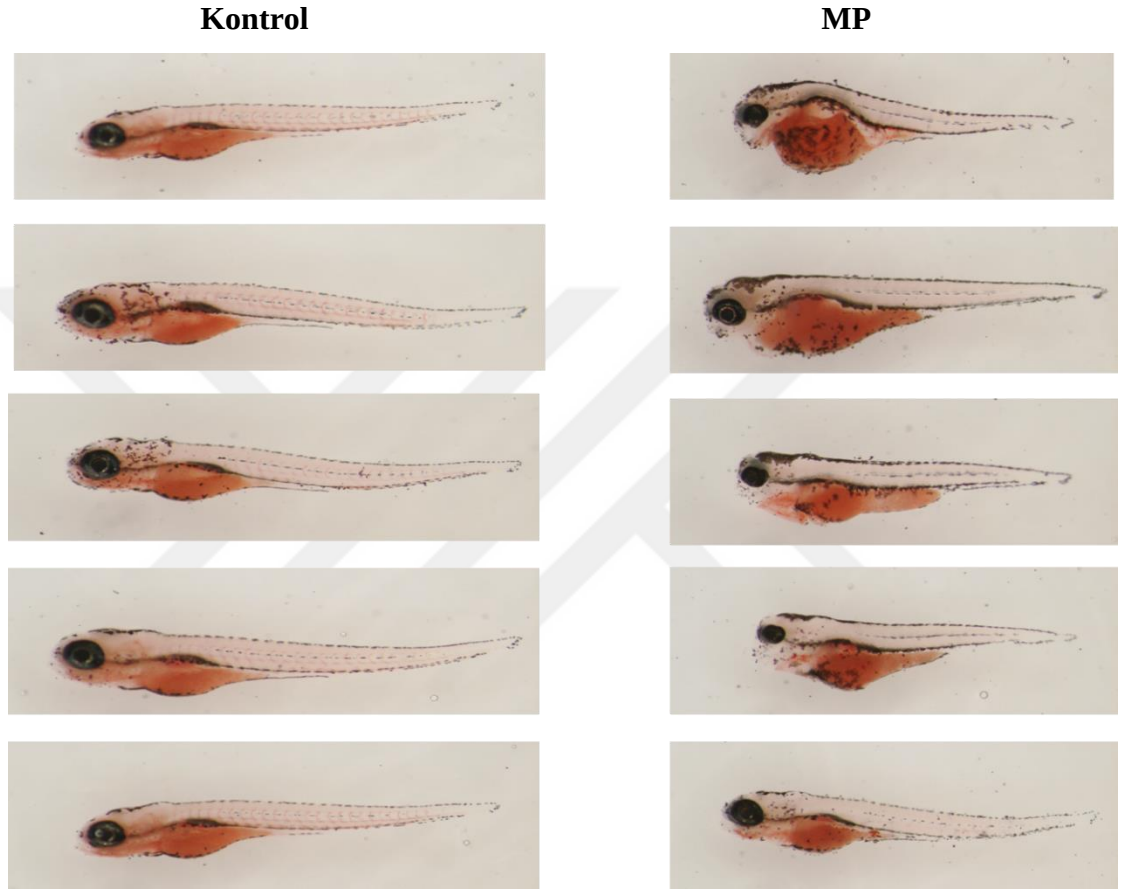
Apoptozun varlığı daha ileri aşamalarda (24 ,48 ve 72 saat) RT-PCR ile tespit edildiği için akridin orange metoduyla apoptozun hangi aşamada başladığı tespit edilmek amacıyla genç embriyolar mikroskop altında görüntülenmiştir. Ve aşağıdaki görsellerde gösterildiği üzere somite evresinde maruziyet grubunda yoğun şekilde apoptotik hücreler gözlemlenmiştir. Üst sıradakiler kontrol alt sıradakiler metilparaben grubunu göstermektedir.



Resim 4: Kontrol ve MP gruplarının somite evresindeki apoptotik hücreleri. Parlak noktalar şeklinde gözüken hücreler apoptoza giden hücreleri göstermektedir.

6.10 Oil Red O metoduyla Lipit Birikimleri Analizi

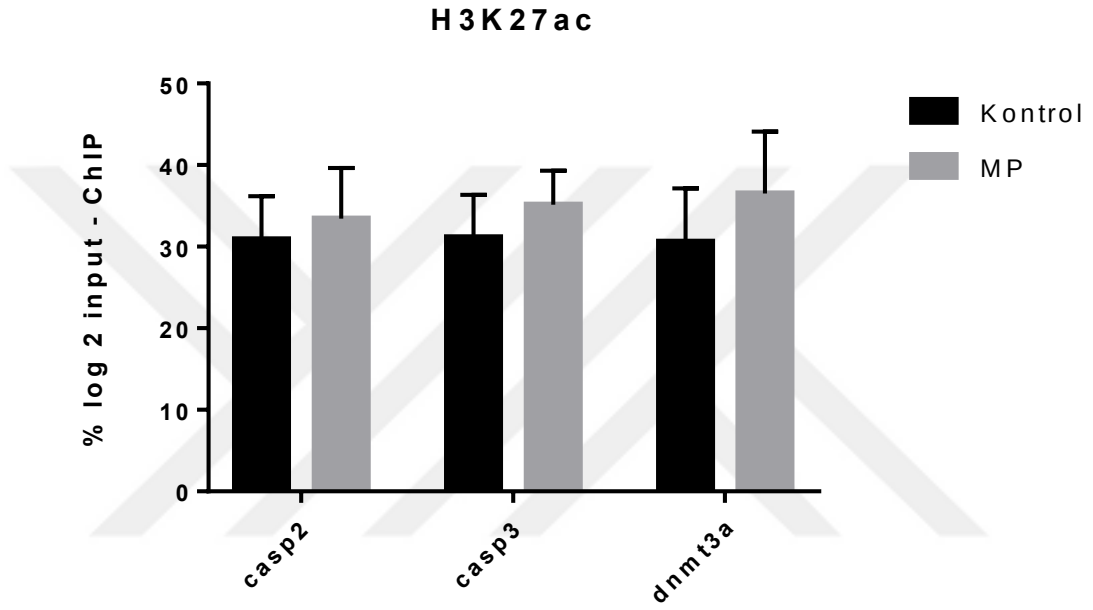
Oil Red O metoduyla lipit birikimleri tespit edilmiştir ve aşağıdaki gibidir. MP grubunda bu birikimler gözle görülür şekilde artmıştır.



Resim 5: Kontrol ve MP gruplarında Oil Red O metoduyla tespit edilen lipit birikimleri.

6.11 H3K27ac Histon Markında Gen Bazlı Değişimlerin Analizi

H3K27ac histon markının 48. saatte gen bazlı değişimleri aşağıdaki gibidir. Maruziyet grubunda *casp2*, *casp3*, *dnmt3a* genleri bazında H3K27ac markı artmış gözükse de değişim anlamlı bulunamamıştır.



Şekil 12: 48 saatlik embriyolarda *casp2*, *casp3* ve *dnmt3a* genleri bazında H3K27ac markının değerlendirilmesi grafiği. Ortalama değerler 6 tekrar ve grup başına n=7 olacak şekilde çalışılması sonucu elde edilmiştir.

6.12 RNA-seq Sonuçları

6.12.1 RNA-seq sonucu anlamlı derecede değişen bütün genlerin listesi

RNA-seq analizleri BlueBee biyoinformatik programında yapılmıştır. Anlatımları anlamlı derecede değişen genlerin tamamı aşağıda yer alan Tablo 20’de verilmiştir, kırmızılar anlatımı azalanları maviler anlatımları artan genleri ifade etmektedir. 172 genin anlatım seviyesinin anlamlı ölçüde değiştiği tespit edilmiştir. 89 genin anlatımı anlamlı derecede artarken 83 tanesinin anlamlı derecede azalmıştır.

Gen adı	log2FoldChange	P değeri
apolipoprotein Ea (<i>apoEa</i>)	-179.915.133.267.219	9,41E-29
selenoprotein P, plazma, 1a (<i>sepp1a</i>)	-120.977.029.730.261	1,81E-08
transferrin-a (<i>tfa</i>)	-126.964.001.339.641	7,38E-07
ATP sentaz 8 (<i>ATP8</i>)	-107.709.609.827.762	3,77E-05
uncharacterized LOC795545 (LOC795545)	131.405.474.616.395	1,31E-03
apolipoprotein Ba (<i>apoba</i>)	-105.911.745.893.386	2,48E-03
NC_002333.17-201	-0.68094093183586	3,68E-01
apolipoprotein Bb, tandem duplicate 1 (<i>apobb.1</i>)	-0.641490986763765	1,38E+01
fruktoz-1,6-bifosfataz 1b (<i>fbp1b</i>)	-15.242.806.139.151	3,34E+01
fibrinojen beta zincir (<i>fgb</i>)	-13.524.052.643.212	9,17E+01
vitronectin b (<i>vtnb</i>)	-139.776.910.627.326	9,77E+01
metallothionein 2 (<i>mt2</i>)	147.158.611.020.699	2,13E+02
antifreeze protein tip IV (<i>afp4</i>)	-0.879215700750646	1,61E+02
kompleman faktör H (<i>cfh</i>)	-157.327.334.348.513	2,12E+03

ribozomal protein L4 (<i>rpl4</i>)	0.572108993314752	2,97E+04
ceruloplasmin (<i>cp</i>)	-118.877.229.110.519	4,04E+04
koagülasyon faktör V (<i>f5</i>)	-151.681.192.004.471	8,02E+04
apolipoprotein M (<i>apom</i>)	-120.042.024.934.709	9,41E+04
lipaz, gastrik (<i>lipf</i>)	-129.138.215.791.142	2,06E+05
NADH dehidrojenaz subunit 5 (<i>ND5</i>)	-0.717787231454652	2,24E+05
katepsin Ba (<i>ctsba</i>)	0.987125246116794	3,13E+05
apolipoprotein C-I like (<i>apoc1l</i>)	-0.557868696102772	9,34E+05
koagülasyon faktör II (thrombin) (<i>f2</i>)	-141.089.026.272.943	1,25E+06
apolipoprotein C-II (<i>apoc2</i>)	-0.753525595501036	3,31E+06
fibrinojen alfa zincir (<i>fga</i>)	-135.389.053.909.872	3,94E+06
fibrinojen gama zincir (<i>fgg</i>)	-125.049.004.306.975	4,48E+06
crystallin, gama M2d16 (<i>crygm2d16</i>)	-0.793366316776478	4,96E+06
lektin, galactosit- bağlanma, soluble, 1 (galektin 1)-like 1 (<i>lgals1l1</i>)	124.704.988.183.664	5,26E+06
fosfogliserat kinaz 1 (<i>pgk1</i>)	123.242.721.927.791	7,19E+06
ribozomal protein S11 (<i>rps11</i>)	0.505476595497244	1,40E+07
ATP sentaz, H ⁺ transporting, mitokondriyal Fo kompleks, subunit d (<i>atp5h</i>)	0.717443728940324	2,61E+07
crystallin, gama M2d12(<i>crygm2d12</i>)	-0.649299663733729	3,39E+07
komplement component c3a, duplicate 1(<i>c3a.1</i>)	-0.664034829153634	4,78E+07

serine (veya sistein) proteinaz inhibitör, clade A (alfa-1 antiproteinaz, antitripsin), member 1, like (<i>serpina1l</i>)	-0.901640263619337	9,96E+06
ribozomal protein L5b (<i>rpl5b</i>)	0.500644392383992	1,37E+08
ribozomal protein L11 (<i>rpl11</i>)	0.44980123738016	1,79E+08
ribozomal protein L9 (<i>rpl9</i>)	0.485483902564769	2,36E+08
solute carrier family 25 (mitokondriyal carrier; adenin nukleotit translocator), member 5 (<i>slc25a5</i>)	0.404374114032715	3,02E+07
fosfolipaz A2, grup XV (<i>pla2g15</i>)	-115.282.163.802.507	3,93E+08
komplement component 5 (<i>c5</i>)	-101.544.574.729.051	4,45E+08
serpin peptidaz inhibitör, clade C (antithrombin), member 1 (<i>serpinc1</i>)	-114.456.412.547.915	6,20E+08
yağ asidi bağlanma proteini 1b, tandem duplicate 1 (<i>fabp1b.1</i>)	-0.485856577416972	7,24E+08
sitokrom c oksidaz subunit I (<i>COX1</i>)	0.395157312952065	7,60E+08
envoplakin a (<i>evpla</i>)	-0.728347448683285	1,14E+09
NME/NM23 nükleozit difosfat kinaz 2b, tandem duplicate 1 (<i>nme2b.1</i>)	0.455723147119473	1,30E+09
solute carrier family 43 (amino asit sistem L transporter), member 2a (<i>slc43a2a</i>)	-0.967837525122156	1,42E+09
apolipoprotein Eb (<i>apoeb</i>)	-0.434316715281484	1,46E+08
ökaryotik translasyon	0.392521906253158	1,54E+09

uzama faktörü 2b (<i>eef2b</i>)		
karbonik anhidraz (<i>cahz</i>)	0.928603900468219	1,76E+09
crystallin, gama M2d7 (<i>crygm2d7</i>)	-0.548226500088653	1,79E+09
zgc:163040 (<i>zgc:163040</i>)	-0.796948209265275	2,16E+09
zgc:153409 (<i>zgc:153409</i>)	-0.693621937119238	2,39E+09
hidroksiasit oksidaz (glikolat oksidaz) 1 (<i>hao1</i>)	-0.975523526766804	3,03E+09
komplement component 9 (<i>c9</i>)	-0.911084718168732	4,47E+09
solute carrier family 43 (amino asit sistem L transporter), member 2b (<i>slc43a2b</i>)	-0.671718152423876	4,57E+09
ribozomal protein S8a (<i>rps8a</i>)	0.44469048999162	4,89E+09
si:dkey-126g1.9 (<i>si:dkey-126g1.9</i>)	-0.925909266982117	5,14E+09
high mobility group box 2b (<i>hmgb2b</i>)	0.522872354207545	6,60E+09
ribozomal protein L12 (<i>rpl12</i>)	0.399172349552233	6,77E+09
Y box bağlanma proteini 1 (<i>ybx1</i>)	0.432078665997797	8,32E+08
poly(A) bağlanma proteini, sitoplazmik 4 (inducible form) (<i>pabpc4</i>)	-0.39709724002384	8,46E+09
miyozin, ağır polipeptit 1.2, iskelet kası, (<i>myhz1.2</i>)	0.409896259177366	8,70E+09
inter-alfa-tripsin inhibitör ağır zincir 2 (<i>itih2</i>)	-0.914375243503719	9,81E+07
ribozomal protein S15 (<i>rps15</i>)	0.357068963710634	0.00010978275286817
solute carrier family 25, member 42	-0.763746053902772	0.00011629869748602 5

(<i>slc25a42</i>)		
ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli) (<i>chac1</i>)	0.671691534562565	0.00011839132374906
ökaryotik translasyon elongasyon faktör 1 alfa 1, like 1 (<i>eef1a1l1</i>)	0.290374955456492	0.00013071561814808 8
NDRG family member 2 (<i>ndrg2</i>)	-0.527684216582676	0.00013977791537140 1
ubikitin protein ligaz E3 component n-recognin 5 (<i>ubr5</i>)	-0.497283375693406	0.00013920337745144 9
apolipoprotein A-Ia (<i>apoa1a</i>)	0.351391669930484	0.00017057980076266 6
ribozomal protein, large P2, like (<i>rplp2l</i>)	0.342148723105061	0.00018126775648278 4
hemoglobin alfa embryonik-3 (<i>hbae3</i>)	-0.290462843507941	0.00019083500211717 4
ribozomal protein SA (<i>rpsa</i>)	0.344656385116782	0.00022915561447245 7
parvalbumin 9 (<i>pvalb9</i>)	-0.64597259866069	0.00023845463895798 7
ribozomal protein L24 (<i>rpl24</i>)	0.344769677567241	0.00025830009351113 9
cugbp, Elav-like family member 2 (<i>celf2</i>)	-0.469732340309319	0.00029852315991912 1
kreatin kinaz, kas a (<i>ckma</i>)	0.319946755285685	0.00033379903914131 3
bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2Ba (<i>baz2ba</i>)	-0.483333257095952	0.00036188296388412 2
si:ch211-39i22.1 (si:ch211-39i22.1)	-0.589011124584922	0.00036987212306609 8
ribozomal protein, large, P0 (<i>rplp0</i>)	0.356477795560139	0.00043068946519327 5
heterojen nuclear ribonükleoprotein L (<i>hnrpl</i>)	-0.517976207068118	0.00045883410936669 9
solute carrier family 27	0.571338974143452	0.00049385709314556

(yağ asidi transporter), member 2a (<i>slc27a2a</i>)		8
ökaryotik translasyon initiation faktör 5A (<i>eif5a</i>)	0.361777956853299	0.0005309916967829
sirkadiyan ilişkili transkripsiyon repressörü (<i>ciarta</i>)	-0.854575117583063	0.00053693284018426 4
protein fosfataz 1, regulatory (inhibitör) subunit 14C (<i>ppp1r14c</i>)	-0.601665232540986	0.00054659942365559 5
gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (<i>gapdh</i>)	0.308695941418032	0.00057756485272927 3
alfa-2-makroglobulin-like (<i>a2ml</i>)	-0.710790519505671	0.00058078818831861
crystallin, gama M2d15 (<i>crygm2d15</i>)	-0.568243804024234	0.00064415871728986 8
ribozomal protein, large P2 (<i>rplp2</i>)	0.376014726184968	0.00065732051387292 2
ribozomal protein L13 (<i>rpl13</i>)	0.347212016642762	0.00067190296208904 6
yağ asidi bağlanma protein 2, intestinal (<i>fabp2</i>)	-0.714003529244708	0.00069952517250036 8
siklin G1 (<i>ccng1</i>)	0.49071893927787	0.00073680070419934 2
serpin peptidaz inhibitör, clade H (heat shock protein 47), member 1b (<i>serpinh1b</i>)	0.528290483194575	0.00078117132138747 8
solute carrier family 3 (amino asit transporter ağır zincir), member 2a (<i>slc3a2a</i>)	-0.692052991049623	0.00077464749760857 7
tümör protein, translasyonel-kontrol 1 (<i>tpt1</i>)	0.306619120563546	0.00076525741087981 8
crystallin, beta B1, like 2 (<i>crybb1l2</i>)	-0.425333428089436	0.00081735833718586 6
ribozomal protein S25 (<i>rps25</i>)	0.356760971685652	0.00088013648902933 7

titin b (<i>ttnb</i>)	0.345406735075974	0.00095073418163121
plac8 onzin related protein 3 (<i>ponzr3</i>)	0.730392901399268	0.00097208314645369
potasyum kanalı tetramerization domain containing 15a (<i>kctd15a</i>)	-0.699944966842122	0.00104861792326058
zRAB1B, member RAS onkogen ailesi a (<i>rab1ba</i>)	0.609308161031262	0.00104460060006647
Trichohyalin (LOC402866)	0.425045509952476	0.00113172312655259
crystallin, gama M2d6 (<i>crygm2d6</i>)	-0.617716894213141	0.00115020936061126
ribozomal protein L34 (<i>rpl34</i>)	0.3275708974831	0.00118270236661774
solute carrier family 1 (glial high affinity glutamat transporter), member 2b (<i>slc1a2b</i>)	-0.505176488798192	0.00120539349040705
fosfoenolpiruvat karboksikinaz 2 (mitokondiyal) (<i>pck2</i>)	-0.802217411535799	0.00122469273768929
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polipeptit 18 (<i>ddx18</i>)	0.658184479551344	0.00123948607759749
troponin C type 1b (slow) (<i>ttnnc1b</i>)	0.403750236049596	0.00124588078707794
enolaz 3, (beta, kas) (<i>eno3</i>)	0.423280801209728	0.00136106863573735
tirozin 3-monooksijenaz/triptofan 5-monooksijenaz aktivasyon protein, theta polipeptit a (<i>ywhaqa</i>)	0.444907460468307	0.00141658821914301
si:dkey-65b12.6	-0.578415193563053	0.00145610869122695
betaine-homosistein metiltransferaz (<i>bhmt</i>)	0.294428879650843	0.00150939087690974
aldolaz C, fruktoz-bifosfat, b (<i>aldocb</i>)	0.554428329715482	0.00151576504594402

miyozin, ağır zincir 9a, kas dışı (<i>myh9a</i>)	-0.382617771895753	0.00154080774410076
hedgehog açilltransferaz-benzeri, a (<i>hhatla</i>)	0.602223905193239	0.00170243170050278
slow miyozin ağır zincir 1 (<i>smyhc1</i>)	0.333586101488019	0.00177578970657826
parvalbumin 2 (<i>pvalb2</i>)	0.253542858399671	0.0018872359388955
si:dkey-183i3.5(si:dkey-183i3.5)	-0.550293686458173	0.00191293002998209
tubulin, alfa 8 like 4 (<i>tuba8l4</i>)	0.325674344238677	0.00199419424637258
ribozomal protein L21 (<i>rpl21</i>)	0.326822380630762	0.00202745502384791
DNA bağlanma inhibitörü 1 (<i>id1</i>)	0.483771562499956	0.00214474828332819
peptidilpropil izomeraz Aa (cyclophilin A) (<i>ppiaa</i>)	0.290111805951231	0.00224051306126194
kreatin kinaz, kas b (<i>ckmb</i>)	0.328290198446176	0.00229807951655463
growth hormon reseptör a (<i>ghra</i>)	-0.741135266474309	0.00229648644393587
NME/NM23 nucleozit difosfat kinaz 2b, tandem duplicate 2 (<i>nme2b.2</i>)	0.35066312906473	0.00231212620012953
miyozin bağlanma proteini Hb (<i>mybphb</i>)	0.490855769215207	0.00234376306761139
troponin T2d, kardiyak (<i>tnnt2d</i>)	0.458416366039653	0.00238406293215533
adenomatosis polyposis coli 2 (<i>apc2</i>)	-0.734710072952095	0.00238751483252174
L-treonin dehidrojenaz (<i>tdh</i>)	0.641685660989768	0.00245604763590964
bromodomain containing 2a (<i>brd2a</i>)	0.507833787583093	0.0024536651193399
glisin amidinotransferaz (L-arjinin:glisin	0.390076419093741	0.002488209066619

amidinotransferaz) (<i>gatz</i>)		
apolipoprotein A-II (<i>apoA2</i>)	-0.286918060395631	0.0025508471045945
serin/ arjinin-rich splicing faktör 1b (<i>srsf1b</i>)	-0.488347985109442	0.00253786180498881
growth arrest-specific 5 (<i>gas5</i>)	-0.811613820615575	0.00255230936238403
ribozomal protein L32 (<i>rpl32</i>)	0.275188081841498	0.00266123193074924
periferal miyelin protein 22b (<i>pmp22b</i>)	0.519347961233713	0.00269727618943308
ribozomal protein L19 (<i>rpl19</i>)	0.292435485599073	0.00278108887866546
si:ch73-21g5.7 (si:ch73-21g5.7)	0.629225936756959	0.00283381782640623
TOX high mobility group box family member 2 (<i>tox2</i>)	-0.543548032153794	0.00287961581707016
ribozomal protein S4, X- linked (<i>rps4x</i>)	0.307035371312198	0.00290875771503472
ubikitin-conjugating enzim E2Ia (<i>ube2ia</i>)	0.634584400028877	0.00309928030656898
fetuin B (<i>fetub</i>)	-0.395850045175561	0.00308926967336216
ribozomal protein, large, P1 (<i>rplp1</i>)	0.239548858193554	0.00316789110524435
aldehit dehidrojenaz 9 family, member A1a, tandem duplicate 1 (<i>aldh9a1a.1</i>)	0.507519096398019	0.00328507481482752
ribozomal protein S9 (<i>rps9</i>)	0.259808571189121	0.00334526239176874
ribozomal protein L22 (<i>rpl22</i>)	0.289794522361073	0.00334717649508119
plexin A3 (<i>plxna3</i>)	-0.703074616127323	0.00339986042540515
zgc:114181 (zgc:114181)	-0.687592107972771	0.00339588874768411
BTB ve CNC homoloji 1,	-0.71673114943441	0.00361608971635696

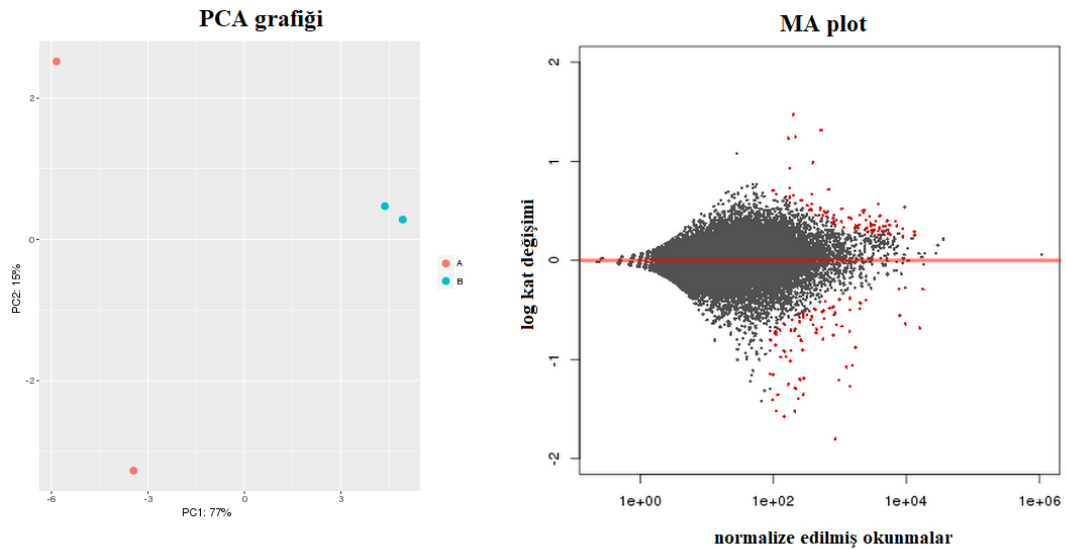
basic leucine zipper transkripsiyon faktör 2b (<i>bach2b</i>)		
ribozomal protein L7a (<i>rpl7a</i>)	0.276582510539444	0.00366211520169193
apolipoprotein A-IV b, tandem duplicate 2 (<i>apoa4b.2</i>)	-0.602524586175989	0.0036475720957609
ryanodine reseptör 3 (<i>ryr3</i>)	0.385603431512705	0.00360043791097246
ATP sentaz, H ⁺ transporting, mitokondriyal F0 kompleks, subunit c3 (subunit 9) b (<i>atp5g3b</i>)	0.297284578736897	0.00381073473474146
DEAD (Asp-Glu-Ala- Asp) box polipeptit 39Ab (<i>ddx39ab</i>)	0.454322892371544	0.00377120839434023
ribozomal protein S27a (<i>rps27a</i>)	0.263108108752405	0.00374425109789347
karboksilesteraz 2 (bağırsak, karaciğer) (<i>ces2</i>)	-0.495822918991808	0.00381370430541728
hemoglobin embriyonik subunit alfa (LOC100334599)	-0.277189752465787	0.00379925196097903
Sitokrom c oksidaz subunit IV izoform 1 (<i>cox4i1</i>)	0.333365856638395	0.00385437161605187
ökaryotik elongasyon faktör 2 kinaz (<i>eef2k</i>)	0.706767770567068	0.00395002832159532
troponin I, iskelet, slow like (<i>tnni1a</i>)	0.458776808158975	0.00395657790410997
kasa özgül beta 1 integrin bağlanma proteini 2 (<i>mibp2</i>)	0.378053882808744	0.00392152340455586
ribozomal protein S3A (<i>rps3a</i>)	0.301711489714863	0.00404370641450348
crystallin, gama M2d10 (<i>crygm2d10</i>)	0.514935207621608	0.00418875653976503
retinol bağlanma protein 1a, cellular (<i>rbp5</i>)	-0.547145241629765	0.0041661622959406

fosfoinositid-3-kinaz, regulatory subunit 2 (beta) (<i>pik3r2</i>)	-0.409467570144693	0.00446387159590758
proteazom subunit alfa 4 (<i>psma4</i>)	0.425939549771753	0.00449676071149728
small nukleer ribonukleoprotein polipeptid G (<i>snrpg</i>)	0.645379034695834	0.00463550144284623
kazein kinaz 1, delta b (<i>csnk1db</i>)	0.672434587731505	0.00473919620628424
spectrin, beta, non- eritrositik 1 (LOC558044)	-0.641163347218615	0.00473357603709018
DR1-ilişkili protein 1 (negatif kofaktör 2 alfa) (<i>drap1</i>)	-0.502186830049452	0.00484392288132795
siklin D1 (<i>ccnd1</i>)	0.36341076996632	0.00484543631149657
histon 1, H4, like (<i>hist1h4l</i>)	-0.533767165263437	0.00488142678862021

Tablo 20: Kontrol ve MP gruplarının 48. saatteki RNA-seq sonuçları. Analiz iki farklı tekrar şeklinde ve örnek başına 4.000.000 okuma olacak şekilde yapılmıştır. Her bir örnek ayrıca 4 parçaya bölünerek okunmuştur. Yalnızca $p < 0,005$ olan genlerin listesi verilmiştir.

6.12.2 RNA-seq sonuçları için PCA ve MA grafiği

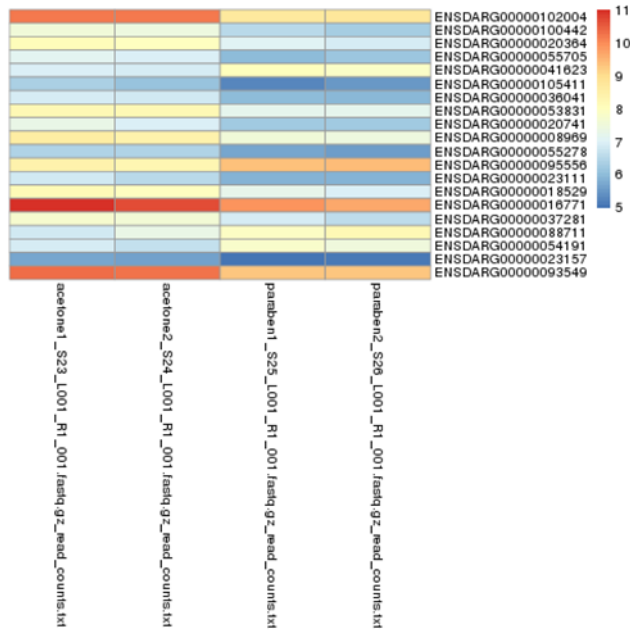
Temel bileşen analizi (PCA), veri analizi için kullanılabilen istatistiksel bir prosedürdür. PCA, temel bileşenler kümesini tanımlamak için orijinal verilerin (örneğin gen ekspresyon değerleri) doğrusal kombinasyonlarını kullanır. Bu yeni değişkenler, gereksiz bilgilerden kaçınarak birbirlerine ortogonaldır. Böylelikle PCA, bir veri setinin boyutlarını azaltmak için kullanılabilir ve veri setlerinin tanımlanmasına ve bunların daha az sayıda değişkenle varyansına izin verir. Veri kümeleri arasındaki benzerlikler, temel bileşenler tarafından tanımlanan alanın projeksiyonundaki mesafelerle ilişkilendirildiğinden, PCA ayrıca ana bileşenlere göre aykırı değerleri tanımlamak için de kullanılabilir. MA grafiği ise; Y eksenindeki log kat değişimi (M) ve X eksenindeki kontrol ve deney grubu örneklerinin (A) normalleştirilmiş ifade sayılarının ortalamasının logaritması açısından gen ekspresyon değişikliklerini görselleştirmek için kullanılmaktadır. Kontrol ve deney grubu numunelerde benzer ifade değerlerine sahip genler, $M = 0$ değeri etrafında kümelenir. $M = 0$ çizgisinden uzak noktalar, anlamlı ekspresyona sahip genleri gösterir. Grafikte yer alan noktalar $M = 0$ çizgisinin üstünde ise upregüle altında ise downregüle olduğu anlaşılır. MA grafiğinde kırmızı ile gösterilen her bir nokta anlatımı anlamlı şekilde değişen genleri ifade etmektedir.



Şekil 13: Kontrol ve MP gruplarının PCA ve MA grafiği. A: Kontrol, B; MP grubunu temsil etmektedir.

6.12.3 RNA-seq sonuçlarında anlatımı en çok değişen 20 genin heatmapi

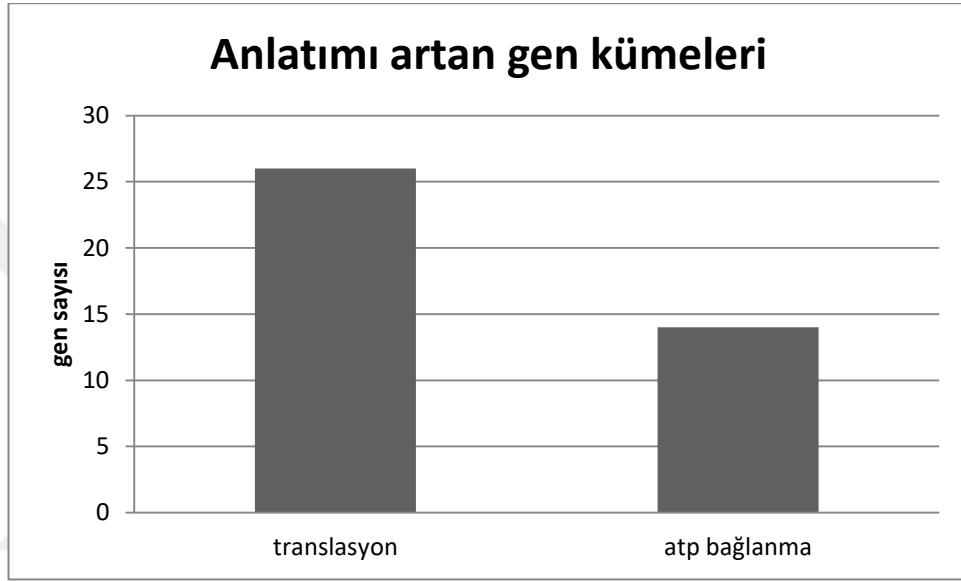
Aşağıda anlatımı en çok değişen 20 genin heatmapi verilmiştir. Genler kod isimleriyle verilmiş olup şu şekildedir; ENSDARG00000102004: apolipoprotein Ea (*apoEa*), ENSDARG00000093549: selenoprotein P plazma, 1a(*sepp1a*), ENSDARG00000016771: transferrin-a (*tfa*), ENSDARG00000063910: ATP sentaz 8 (*ATP8*), ENSDARG00000095556: uncharacterized LOC795545(LOC795545), ENSDARG00000042780: apolipoprotein Ba (*apoba*), ENSDARG00000082753: NC_002333.17-201, ENSDARG00000022767: apolipoprotein Bb, tandem duplicate 1 (*apobb.1*), ENSDARG00000020364: fruktoz-1,6-bifosfataz 1b (*fbp1b*), ENSDARG00000008969: fibrinojen beta zincir (*fjb*), ENSDARG00000053831: vitronektin b (*vtnb*), ENSDARG00000041623: metallothionein 2 (*mt2*), ENSDARG00000095863: antifreeze protein tip IV (*afp4*), ENSDARG00000100442: komplement faktör H (*cfh*), ENSDARG00000041182: ribozomal protein L4 (*rpl4*), ENSDARG00000010312: seruloplazmin(*cp*), ENSDARG00000055705: koagülasyon faktör V (*f5*), ENSDARG00000076838: apolipoprotein M (*apom*), ENSDARG00000018529: lipaz, gastrik (*lipf*), ENSDARG00000063921: NADH dehidrojenaz subunit 5 (*ND5*).



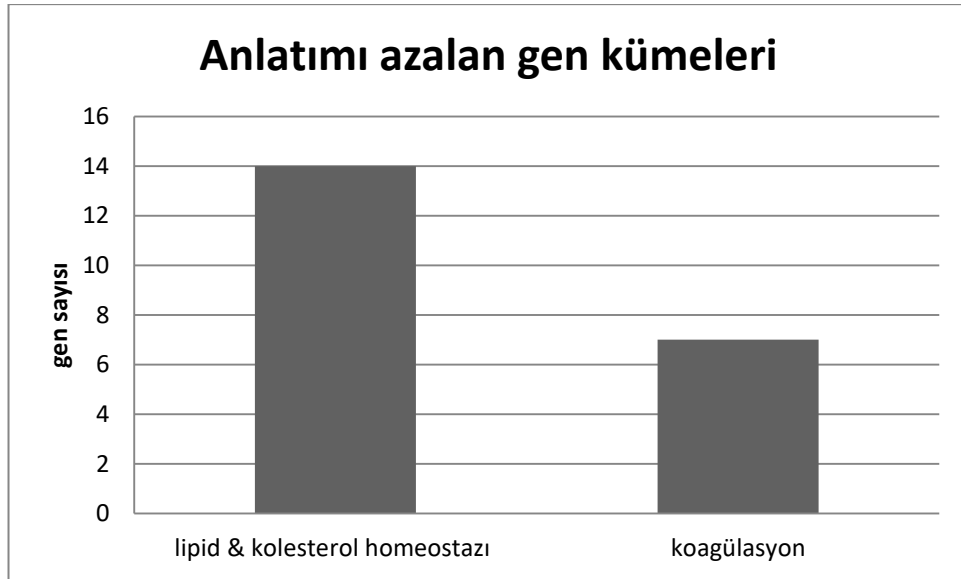
Şekil 14: Kontrol ve MP gruplarında anlatımı en çok değişen 20 genin heatmapi.

6.12.4 Gen ontoloji sonuçlarına göre oluşturulan gen kümeleri (cluster)

Gen ontoloji sonuçlarına göre oluşturulan gen kümeleri (cluster) aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir. Cluster analizleri DAVID biyoinformatik veri bankası (<https://david.ncifcrf.gov/>, Erişim tarihi: 20 Nisan 2020) aracılığı ile yapılmıştır. Upregüle olan 89 gen ve downregüle olan 83 gen ayrı ayrı incelenmiştir. Grafikler kontrol grubuna kıyasla MP grubunu temsil etmektedir.



Şekil 15: Anlatımı artan genlerin cluster grafiği



Şekil 16: Anlatımı azalan genlerin cluster grafiği

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada metilparaben maruziyetinin yaratabileceği olumsuz etkilerin moleküler, biyokimyasal ve epigenetik düzeyde araştırılması hedeflenmiştir ve model organizma olarak zebra balığı embriyoları tercih edilmiştir.

Çalışmamızda LC50 dozunu hesaplama amaçlı zebra balığı embriyoları metilparabenin değişik dozlarına maruz bırakılmış olup, LC50 dozu 24.saat ve 48.saat için 72,23 mg/L, 72.saat için 68 mg/L, 96.ve 120 saat için 66 mg/L olarak hesaplanmıştır. Çalışmanın devamında LC50 dozunun altında olan 50 mg/L (328 µM) tercih edilmiştir.

Çalışmamızda metilparabene maruziyetin; ağırlıklı olarak perikardiyal ödem, kuyruk defekti ve pigmentasyon defektine neden olduğu gözlemlenmiştir. 48.saatte koryondan çıkış yüzdesinin maruziyet grubunda anlamlı seviyede arttığı tespit edilmiştir. Lokomotor aktivite testi sonucuna göre metilparabene maruz bırakılan grubun hareketlerinde azalma saptanmıştır.

RT-PCR sonuçlarına göre maruziyet grubunda 24. saatte *casp2* ve *casp8* anlatımının anlamlı seviyede azaldığı *casp3* anlatımının arttığı, *dnmt3a* anlatımının değişmediği; 48. Saatte *casp2*, *casp3* ve *dnmt3a* anlatımının anlamlı seviyede arttığı *casp8* anlatımının azaldığı; 72. saatte *casp2*, *casp3* ve *dnmt3a* anlatımının anlamlı seviyede arttığı *casp8* anlatımının değişmediği gözlemlenmiştir. RT-PCR sonuçlarını desteklemek amaçlı yaptığımız akridin boyama sonuçlarına göre apoptotik hücrelerin maruziyet grubunda arttığı tespit edilmiştir. Meydana gelen değişimlerin epigenetik temeli olup olmadığını araştırma amaçlı yaptığımız H3K27ac histonuna yönelik ChIP metoduyla; 48. saatte elde ettiğimiz RT-PCR sonuçlarını destekler şekilde *casp2*, *casp3*, *dnmt3a*’ ya yönelik H3K27ac’nin arttığı fakat bu artışın istatistiki olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu sebeple ChIP metodu ardından uygulanan dizileme yöntemi tercih edilmemiş olup yerine tüm transkriptoma yönelik RNA-seq analizi yapılmıştır. RNA-seq sonuçlarına göre 172 genin anlatım seviyesinin anlamlı ölçüde değiştiği tespit edilmiştir. 89 genin anlatımı anlamlı

derecede artarken 83 tanesinin anlamlı derecede azalmıştır. Yaptığımız cluster ve gen ontoloji analizlerine göre en anlatımı en çok etkilenen gen gruplarının translasyon, lipit-kolesterol homeostazı, koagülasyon ve enerji metabolizması ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Oksidan-antioksidan sistemin araştırılması amaçlı LPO, GST ve NO tayini yapılmış ve metilparabenin lipit peroksidasyonunu arttırdığı, nitrik oksid ve glutatyon S-transferaz seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir. Östrojenik bileşiklere maruziyet belirteci olarak kullanılan vitellogenin ekspresyonunun maruziyet grubunda arttığı in situ hibridizasyon yöntemiyle tespit edilmiştir. Oil Red O metoduyla maruziyet grubunda lipit birikmelerinin arttığı tespit edilmiştir.

Endokrin bozucu kimyasallar günümüzde insan sağlığı açısından en popüler konulardan biridir. Bazı araştırmalar bu maddelerin obezite, diyabet, kanser, infertilite ve endometrioze neden olduğunu göstermektedir. Endokrin sistemin bozulması; adet döngüsü, menopoz, andropoz, ergenlik gibi birçok fizyolojik sürecin etkilenmesine neden olabilir. Sonuç olarak da gelişimsel bozukluklara, kansere, immün ve sinir sistem fonksiyon bozukluklarına neden olabilir.

Antifungal ve antibakteriyel ajanlar olarak kullanılan, bir grup para-hidroksibenzoik asit esteri olan parabenler uzun yıllardan beri koruyucu olarak kişisel bakım ürünlerinde, farmasötiklerde ve hazır gıdalarda kullanılmaktadırlar. Parabenlerin östrojenik aktiviteye sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir ancak çok düşük seviyededir. Parabenlerde alifatik zincir uzunluğu arttıkça östrojenik aktivite de artmaktadır. Yapılan çalışmalar estradiolle kıyaslandığında sırasıyla; metil-, etil-, propil-,bütilparaben 2.5×10^6 , 1.5×10^5 , 3×10^4 , 1×10^4 kat daha az ÖR'e bağlanma potansiyeli olduğu gösterilmiştir (Routledge ve ark., 1998; Matwiejczuk ve ark., 2020).

Vitellogenin anlatımı östrojenik bileşenlere maruziyet ile beraber artmaktadır. 17 β -estradiol, nonilfenol ve BPA'ya maruz bırakılan alabalıklarda yapılan bir çalışmada vitellogenin seviyelerinin arttığı ELISA testiyle belirlenmiştir (Hansen ve ark., 1998). Zebra balıklarında yapılan bir çalışmada BPA ve DEHP'ye maruz bırakılan balık embriyolarında vitellogenin seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Üstündağ ve

ark., 2017). Yine zebra balıklarında yapılan bir başka çalışmada metilparabene maruz bırakılan balık embriyolarında *vtg-l*'in mRNA seviyesinin arttığı RT-PCR ile gösterilmiştir (Dambal ve ark., 2017). Östrojenik alkilfenolle içerdiği bilinen, İspanya'da bulunan Anoia nehrinden elde edilen *Cyprinus carpio* (bir sazan balığı türü) türünde yapılan bir çalışmada *vtg* mRNA seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (García-Reyero ve ark., 2004). Biz de çalışmamızda literatürü destekler nitelikte *vtg* anlatımının maruziyet grubunda arttığını in situ hibridizasyon yöntemiyle tespit ederek metilparabenin östrojenik etkisinin olduğunu göstermiş olduk.

Yumurtalıkları alınmış CD1 fareleri ve Wistar sıçanları üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, in vitro olarak bildirilenden daha yüksek paraben östrojenisitesi göstermiştir (Lemini ve ark., 2003). Bir başka çalışmada 3 gün boyunca deri altından verilen ve doz aralığı değişen parabenlerin uterus ağırlığında artışa neden olduğu saptanmıştır. Ve bu çalışmada metilparaben ve etilparaben dozlarının günlük kabul edilebilir doz alımına uygun olduğu rapor edilmiştir (Sun ve ark., 2016).

Östrojen reseptörlerine ek olarak, parabenler androjen reseptörlerinin antagonistleri olarak işlev görebilir. Parabenlerde yapılan çalışmalarda tespit edilen erkek üreme sistemi bozukluklarının sebebi parabenlerin anti-androjenik özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir çünkü androjenler erkek üreme sisteminin gelişiminde ve spermatogenezde önemli rol oynamaktadırlar. Yapılan bir çalışmada 10 µM; -metil, -propil ve bütılparabenin HEK-293 hücrelerinde testosteron kaynaklı transkripsiyonel aktiviteyi sırasıyla %40, % 33 ve % 19 oranında inhibe ettiği belirlendi (Chen ve ark., 2007). AB ve Japonya'da kabul edilebilir günlük paraben alımının üst sınırı (10 mg / kg canlı ağırlık / gün) ile karşılaştırılabilir bir dozda propilparabene maruz kalan sıçanlarda, serum testosteron konsantrasyonu ve günlük sperm üretimi azaldığı gözlemlenmiştir (Oishi, 2002).

Parabenlere dair son yıllarda çokça fikir ortaya atılmakta ve özellikle karsinojen etkilerinin olup olmadığı tartışılmaktadır. Bu düşüncüyü ortaya ilk olarak atan Darbre ve ark. paraben içeren, koltuk altı ve göğüs altında kullanılan krem ve losyonların kadınlarda meme kanseri görülme sıklığını artırabileceği varsayımında bulunmuşlardı (Darbre ve ark., 2004). Göğüs tümör dokusu analizinden sonra, sonuçlar analiz edilen doku örneklerinde (etil-, propil-, butil- ve izobutilparaben

arasında) metilparabenin en yaygın olduğunu ortaya koydu. Koruyucu olarak en yaygın kullanılan paraben çeşidinin MP olduğu göz önüne alındığında, bu hiç de şaşırtıcı değildi, ancak herhangi bir varsayımda bulunmadan önce, geçerli bir sonuç için birkaç gerçek dikkate alınmalıydı. Yapılması gereken şey, parabenlerin vücuda ilk olarak hangi yoldan girdiklerini tespit etmek ve besinler yoluyla da girebilecekleri için meme dokusunda nasıl biriktiklerini bulmaktır. Dahası Darbre ve ark. çalışmasında hastaların tıbbi öyküsü ve meme tümör tipi de bilinmiyordu. Östrojen reseptörü pozitif göğüs kanseri olup olmadıkları bilinmemekteydi. En önemlisi, kontrol dokusu yoktu ve blank olarak kullanılan doku örneklerinde de parabenler tespit edilmişti.

Parabenlerin insan meme kanserinde hücre büyümesini ve çoğalmasını arttırdığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Bir çalışmada paraben maruziyetinin MCF-10A hücre hattında koloni büyüklüğünü arttırdığı tespit edilmiştir (Khanna ve Darbre, 2013). Östrojen bağımlı insan meme kanseri hücre hattında (MCF-7) yapılan bir çalışmada parabenlere maruz kalmanın östrojen tarafından düzenlenen genlerin ekspresyonlarında ve hücre bölünmesinde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Byford ve ark., 2002).

Östrojenin büyümeyi uyardığı ve apoptozu engellediği bilinmektedir. Bununla birlikte, son gelişmeler östrojenin apoptozu; Fas / FasL, mitokondriyal, NF- κ B ve PI3K / Akt yolları aracılığıyla indükleyebildiğini ortaya çıkarmıştır. Fas/FasL ekstrinsik yolda önemli bir rol oynarken, mitokondriyal yolak ise p53, Bax ve diğer pro-apoptotik proteinler aracılığıyla indüklenmektedir (Lewis-Wambi ve Jordan, 2009). Plasenta yerleşimli trofoblastik tümör hattı kökenli JAR hücre hattında yapılan bir çalışmada EBK'lerden olan dioksinin apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2010). PC12 hücre hattında yapılan bir başka çalışmada BPA, nonilfenol ve TBT'nin endoplazmik retikulum stresi yaratacak apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Sasaya ve ark., 2012). Bir böcek öldürücü olan spirotetramat ile yapılan bir çalışmada zebra balıklarının kaspaz seviyelerinin maruziyet grubunda değiştiği gözlemlenmiştir (Zhang ve ark., 2020). Bizim çalışmamız da bu çalışmaları destekler nitelikte olup apoptozun arttığı akrinin boyama ve RT-PCR sonuçlarıyla gösterilmiştir.

Serbest radikaller ve oksidanlar normal hücre metabolizmaları veya dış kaynaklar sebebiyle üretilirler. Vücutta birikmeleri, oksidatif strese yol açar ve kanser, otoimmün bozukluklar ile yaşlanma gibi kronik ve dejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynar. Serbest radikaller enzimatik mekanizmalar yoluyla temizlenerek oksidatif hasarın önlenmesi sağlanır. LPO otokatalitik bir prostestir ve peroksidatif doku hasarına neden olur (Pham-Huy ve ark., 2008). Çalışmamızda MP'ye maruziyetin artmış LPO göstergesi olarak kullanılan artmış MDA seviyesi ve azalmış GST aktivitesi tespit edilmiştir. Sonuçlarımız diğer çalışmaları destekler niteliktedir ve parabenlerin antioksidan kapasiteyi etkilediği kanıtlanmıştır. *Drosophila melanogaster*'de yapılan bir çalışmada metilparabenin makromoleküller üzerindeki oksidatif hasar seviyelerini arttırarak organel fonksiyonlarında bozulmaya sebep olduğu ve sonuç olarak yaşlanmayı tetiklediği gösterilmiştir (Chen ve ark, 2016).

Oksidatif stres, lipoproteinlerin oksidatif modifikasyonu ve hücrel disfonksiyonun indüksiyonu yoluyla aterosklerotik lezyonun başlaması ve ilerlemesinde önemli bir yoldur (Wolin ve ark., 2000). Kontrolsüz diyabette görüldüğü gibi hiperglisemi, muhtemelen oksidatif stresin artması yoluyla endotel disfonksiyonunu indükler (Ceriello, 2002). Bu nedenle, diyabet gelişimini destekleyen EBK'ler, ateroskleroz gelişimine de katkı sağlayabilir. Bir çalışmada üriner DEHP seviyelerinin oksidatif stres belirteci malondialdehit seviyeleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Kim ve ark., 2013), bu da bu mekanizmanın EBK aracılı aterosklerotik hastalıkla ilgili olduğunu düşündürmektedir. Okside LDL'nin endotel hücreleri tarafından alımının arsenik tarafından upregüle edildiği gösterilmiştir (Hossain ve ark., 2013). Sıçanlarda kadmiyum maruziyetinin, endotel hücre oksidatif stresini artırarak vasküler hasarı tetiklediği (Angeli ve ark.,2013), ve PCB'lerin, NF- κ B yoluyla vasküler endotel hücrelerinde oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir (Hennig ve ark., 2002).

Endotel disfonksiyonu, vazodilatörlerin, özellikle NO'nun biyoyararlanımının azalması veya endoteliumdan türetilen kasılma faktörlerinde bir artış ile karakterize edilir (Lerman ve Burnett, 1992). Ortaya çıkan dengesizlik, endotel disfonksiyonunun fonksiyonel özelliği olan endotele bağlı vazodilatasyonun bozulmasına yol açar. Yetersiz NO üretimi, ateroskleroz, yüksek tansiyon ve kalp

hastalığı için diğer risk faktörlerine katkıda bulunabilen endotel disfonksiyonuna neden olabilir (Hadi ve ark., 2005). Ayrıca NO, apoptotik yollarla yaşam ve ölümün hücrel kararlarını etkiler. NO'nun hem proapoptotik hem de antiapoptotik etkileri bildirilmiştir (Brüne, 2003). Çalışmamızda maruziyet grubunda NO'nun azaldığını, apoptozun arttığını tespit ettik. Bu da NO'nın antiapoptotik etkisini destekler niteliktedir. Buna ilave olarak NO seviyesinin azalması endotel hasarının başlamasına da işaret olabilir.

Paraben maruziyetinin lokomotor aktivite üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmalar sınırlıdır. Etilparabene uzun süre maruz kalmanın nematod *Caenorhabditis elegans*'ta hareket kabiliyetini azalttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada hareket kabiliyetindeki kusurların yeni soyda kısmen düzeldiği ve daha yüksek etilparaben konsantrasyonlarının daha büyük kusurlara neden olduğu gösterilmiştir. (Xue ve Yang, 2016). Bizim çalışmamızın sonuçları da bu çalışmayı destekler niteliktedir ve lokomotor aktivite maruziyet grubunda azalmıştır.

Koryondan çıkış süresi biyokimyasal ve davranışsal fenomenlerin kombinasyonu ile ilişkilidir. Kuluçka bezi tarafından sentezlenen enzimler koryonu sindirir ve enzimatik saldırıdan sonra embriyonun hareketleri koryonu ve embriyoyu yırtar (De Gaspar ve ark., 1999). Çalışmamıza paralel olarak çeşitli EBK'lere maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında koryondan çıkış sürelerinin maruziyet grubunda kısaldığı gözlemlenmiştir (Santos ve ark., 2014).

Epigenetik değişiklikler, prenatal ve erken yaştaki çevresel koşullardan kaynaklanabilir ve tüm yaşam süresi boyunca kanserden mental hastalıklara kadar çeşitli hastalıklar geliştirmeye olan duyarlılığı etkileyebilir (Foley ve ark., 2009). Epigenom, genomda bulunan bilgilerle çevresel etkileri harmanlayarak her hücre tipi için transkriptomik profil oluşturur. EBK'leri epigenetik değişiklere neden olduğu bilinmekle beraber altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılmış değildir. Bu, epigenetik mekanizmaların belli DNA bölgelerini nasıl etkilediklerinin hala tam olarak aydınlatılamamasından kaynaklanmaktadır. Çok sayıda çalışma, EBK'lerin epigenetik mekanizma üzerindeki genel etkilerini bildirirken, bölgeye özgü değişiklikler daha az sıklıkla araştırılmıştır.

Hormonların epigenetik markları düzenleyebileceği ve hormonal sinyalizasyonun bozulmasına sebep olacağı uzun bir süredir bilinmektedir. 1984'te araştırmacılar östrojenin tavuk vitellogenin anlatımını arttırdığını ve aynı zamanda vitellogenin genini ER bağlanma bölgesi etrafında demetile ettiğini keşfettiler (Wilks ve ark., 1984). Genistein iyi çalışılmış bir fitoöstrojen olup DNMT'ler üzerinde etkileri olduğu kanıtlanmıştır (Casati ve ark.,2015). Sentetik bir östrojen olan DES ve plastikleştirici olarak kullanılan BPA'nın, DNA metilasyonunu etkiledikleri çeşitli hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (Casati ve ark., 2012). Alev geciktirici olan PBDE DNA metilasyonunu azaltarak hipokampal nöronları etkilemektedirler (Chen ve ark., 2010). Dioksin sınıfından olan 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksinin (TCDD) zebra balıklarında DNA metilasyonunu ve gen spesifik DNA metilasyonunu etkilediği gösterilmiştir (Aluru ve ark., 2015).

Bir sıçan çalışmasında BPA maruziyetinin aksiyeteye sebep olduğu gösterilmiş olup, beynin amigdala kısmı için önemli olan GABAminerjik inhibisyondan sorumlu *Gad67* anlatımını azaldığı ve *dnmt1* anlatımını arttırdığı gösterilmiştir. Ve yine aynı çalışmada DNMT inhibitörü 5-aza-deoksisitidinin doğrudan amigdala içine uygulanmasının *Gad67* mRNA anlatımının ve sıçan davranışlarını normale döndürdüğü keşfedilmiştir (Zhu ve ark., 2018). Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada östrojenik, anti-östrojenik ve anti-androjenik etkileri olduğu bilinen metoksiklorun, *dnmt3b* gen anlatım seviyesini arttırdığı ve overlerde DNA hipermetilasyonuna sebep olduğu tespit edilmiştir (Zama ve Uzun, 2009). İki farklı fare hattında yapılan erkek üreme sistemi çalışmasında bir plastikleştirici olan DEHP'ye maruz bırakılan fare suşlarının spermalarında farklı şekilde DNA metilasyon seviyeleri tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2015). EBK maruziyetinin suşlar arasındaki bu farka neden olması insanlar arasında da bireysel farklar olabileceğinin bir göstergesidir. Biz de bu çalışmalara paralel olarak çalışmamızda *dnmt3a* anlatım seviyesinin 48. ve 72.saatte istatistiki olarak arttığını gösterdik.

EBK maruziyeti ve histon modifikasyonları ilişkisi hakkında yapılan çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Çünkü epigenetik markların analizlerini yapmak DNA metilasyonu ve ncRNA anlatımını tespit etmekten daha zordur. Epigenetik markların çoğu gen anlatımı bağlamında çalışılmış olup zaman içindeki kalıcılıkları hakkında genelde

bilgi vermezler. MCF-7 meme kanseri hücre hattında DES ve BPA ile yapılan bir çalışmada bir histon metiltransferaz olan ve meme kanseri ile tümörigenezin epigenetik düzenlenmesinde rolü olan EZH'nin mRNA ve protein seviyelerinin maruziyet grubunda arttığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak H3 trimetilasyon seviyesinin de arttığı tespit edilmiştir (Doherty ve ark., 2010). TET ve TGD DNA demetilasyon enzimlerindendir. Erişkin farelerde yapılan bir çalışmada DES'nin *tet1* mRNA ve *5hmC* (ikisi de TET üretiminden sorumlu genler) anlatım seviyelerinin fare uterusunda anlamlı şekilde azaldığı keşfedilmiştir (Jefferson ve ark., 2013). Başka bir çalışmada, BPA maruziyetinin TET2 proteininin gonadotropin salgı hormonunda (GnRH) nükleer lokalizasyonunu azalttığı, GnRH promotöründe H3K4 trimetilasyonun azaldığı ve GnRH protein anlatımının arttığı tespit edilmiştir (Kurian ve ark., 2016). Çalışmamızda RT-PCR sonuçlarına göre 48. saatte anlatımı istatistiki olarak artan *casp2*, *casp3* ve *dnmt3a* genleri hedef alınmış ve aktif mark olduğu bilinen H3K27ac bu genlere yönelik olarak incelenmiştir. Üç gen için de H3K27ac markı artmış olsa da bu değişimin istatistiki olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

EBK'ler adipojenезin uygunsuz bir şekilde uyarılmasının yanı sıra lipid metabolizmasını ve enerji dengesini bozarak obezitenin başlamasına önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Sentezlendikten sonra, lipidler enerji kaynağı olarak hepatositler içinde depolanır. Aynı zamanda bu hücrelerde ksenobiyotik detoksifikasyon gerçekleşir. P450 enzimleri bu süreçten sorumlu olan ve AHR, CAR ve PXR gibi ksenobiyotik reseptörleriyle ligand aktive edilen enzimlerdir. Bu ksenobiyotik reseptörlerin tetiklenmesinin hepatik steatosise (aşırı yağ depolanması) neden olduğu bilinmektedir (Wahlang ve ark., 2016). Çoğu türde triaçilgliserol ana diyet bileşenlerindendir ve lipoprotein lipaz ile hidrolize olarak esterlenmemiş yağ asitlerine ve 2-monoaçilgliserole parçalanır. Yağ asitlerinin hücre içine taşınması, lipofilik bileşikler tutan, hepatosit büyümesini düzenleyen ve bunları mitokondriye taşıyan yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABP) tarafından gerçekleştirilir (Olivares-Rubio ve Vega-López, 2016). Mitokondride depolandıktan sonra, lipid metabolizmasının farklı yönlerinde yer alan bir dizi gen aktive olur. Yağ asidi sentaz, lipojenezin ana yolunu katalize ederek uzun doymuş karbon atomları zinciri üretir ve sonunda yağ dokularında depolanır (Tian ve ark., 2015). Bu bağlamda en önemli

şeyin, potansiyel EBK'lerin PPAR kaskadına müdahale etme / aktive etme becerisi olduğu açıktır.

Çalışmamızda anlatımı anlamlı şekilde değişen genlerin cluster analizleri yapıldığında en çok anlatımı değişen gen kümelerinden birinin lipid/ kolesterol homeostazının sağlanmasına yönelik genler olduğu görülmüştür. Anlatımı en çok değişen ilk 25 genin 8 tanesi lipid/kolesterol homeostazının sağlanmasına yönelik genlerdir. Bunların dışında da anlatımı istatistiki olarak değişen 172 genin 14'ü doğrudan lipid/kolesterol homeostazının sağlanmasına yöneliktir. Anlatımı en çok etkilenen genlerin apolipoprotein ilişkili genler olduğu saptanmıştır (*apoea*, *apoba*, *apobb.1*, *apom*, *apoc1l*, *apoc2*, *apoeb*, *apoa2*, *apoa4b.2*). Bunlar dışında FABP ailesinden *fabp1b.1* ve *fabp2* ile gastrik lipaz (*lipf*), antifreeze protein tip IV (*afp4*) anlatım seviyelerinin de anlamlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak Oil Red O metoduyla MP grubunda lipid birikmelerinin arttığı da çalışmamızda gösterilmiştir.

Zebra balıkları ile ilgili yapılan bir çalışmada, yumurtadan çıkmadan 9 aylık olana kadarki süreçte tributiline maruz bırakılan zebra balıklarında; cinsiyet ve doza bağlı bir şekilde değişen vücut ağırlığı, hepatosomatik indeks ve hepatik trigliserit bolluğu gözlemlenmiştir. Erkek balıkların dişi balıklara göre daha duyarlı sonuçlar verdiği görülmüştür. Erkek balıklarda tributilinin, adipogenez ve lipogenezde rol oynayan anahtar faktörlerin ve enzimlerin transkripsiyonunu önemli ölçüde etkilediği gözlemlenmiştir (PPAR γ , SREBP1, FASN, 11 β -HSD2, C / EBP β ve DGAT2). Dişilerde genlerin transkripsiyonunda hafif, anlamlı olmayan adipojenik yanıtla ilişkili hepatomegali gözlenmiştir (Lyssimachou ve ark., 2015). Bir başka zebra balığı çalışmasında bir antimikrobiyal ajan ve EBK olan triklosana maruz kalan balıklarda, β -oksidasyon transkriptlerinin ve *ppara*, *cpt1*, *lpbe*, *cyp4a10* ve *aco* dahil olmak üzere lipid β -oksidasyon genlerinin mRNA anlatım seviyelerini bozulduğu gözlemlenmiştir (Ho ve ark., 2016). Benzer şekilde, yetişkin erkek zebra balıklarında DEHP'ye maruz kalmanın karaciğerdeki metabolik süreçleri bozduğu farklı biyolojik yollar aydınlatılarak tespit edilmiştir ki bunlar; "FOXA2 ve FOXA3 transkripsiyon faktör ağırları", "amino asitlerin ve türevlerinin metabolizması", "lipit ve lipoproteinler metabolizması" ve "yağ asidi, triaçilgliserol ve keton metabolizması" (Huff ve ark.,

2018). Yine zebra balıklarında yapılan bir başka çalışmada dört farklı potansiyel EBK'nin toksik olmayan konsantrasyonları, PPAR sinyalizasyonunu etkileme yetenekleri nedeniyle yetiştirme suyuna eklendi. Test edilen tüm EBK'lerin, safra kesesi ile proksimal bağırsak arasındaki bölgede, floresan lipit boyama ile görselleştirildiği ve ölçüldüğü üzere obeziteyi indüklediği tespit edilmiştir. Buna ek olarak EBK'lere maruz bırakılan larvalar standart diyetle beslenmesine rağmen hiperkalorik diyetle beslenen larvalara göre daha fazla lipit birikimi tespit edilmiştir. Bu da EBK'lere erken maruziyetin balık metabolizmasını ileride etkileyebileceğini göstermektedir (Jarema ve ark., 2015). Farklı bir çalışmada TBT'ye maruz kalmanın sirkadiyen ritmi etkilediği transgenik zebra balığı hattı kullanılarak gösterilmiştir. Araştırmacılar, sirkadiyen ritmin fazla miktardaki yağ asitlerinin PPAR γ sinyalizasyonunu etkilediği ve sirkadiyen ritimden sorumlu Clock/Bmal kompleksi oluşumunu baskıladığıyla ilişkilendirmişlerdir (Kopp ve ark., 2017).

Yolk, sinsityal katman (YSL) olarak adlandırılan, çevresinde hücrel bir sinsityum bulunan lipit ve protein açısından zengin çekirdekten oluşur. YSL'nin embriyonik ve erken larva gelişimi boyunca işlevi, besinlerin yumurta sarısından embriyonik hücrelere taşınmasıdır. YSL ayrıca yumurta sarısının hidrolizi için de gereklidir. Yolk zebra balığı gelişimi boyunca metabolik olarak aktiftir, lipitleri hem parçalayabilir hem de sentezleyebilir. Zebra balığı yumurtalarında, çoğunlukla endojen lipit rezervleri triaçilgliseroller, kolesterol esteri ve fosfolipidler biçimindedir. Oil Red O sonuçlarımıza göre maruziyet grubunda özellikle yolk bölgesinde lipit birikimleri yoğun olarak gözlemlenmektedir. Bu da yolkta diğer hücrelere lipit transportunun bloklandığı anlamına gelebilir. Sonuçlarımızı destekler nitelikte yapılan güncel bir çalışmaya göre propilparabenin zebra balıkları yolk bölgesinde lipit birikimlerini arttırdığı ve fosfolipit metabolizmasında değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Perugini ve ark., 2020). Yine bir başka çalışmada -metil ve propilparabene maruz kalan zebra balığı embriyolarında yağ asidi taşınmasında rol oynayan apolipoprotein genlerinin (*apoab*, *apoeb*, *apoa4*) anlatımının azaldığı ve yağ asidi sentezi (*fasn*) geninin anlatımının arttığı gözlemlenmiştir (Bereketoglu ve Pradhan, 2019).

Apolipoprotein sınıfından olan ApoM'nin HDL metabolizmasında önemli bir düzenleyici faktör olduğu ve aterosklerozun başlaması ve gelişimini etkilediği düşünülmektedir (Wolfrum ve ark., 2005). BPA ve fitalatlar ateroskleroz ile ilişkilendirilen EBK'lerdendir. Ateroskleroz, çok sayıda metabolik ve inflamatuvar düzensizlikten kaynaklanan çok yönlü bir hastalıktır. Aterojenik, apolipoprotein-B içeren lipoproteinler, oksidatif modifikasyona uğrayabilecekleri subendotelyal boşluğa sızar. Okside lipoproteinler, monositlerin subendotelyal boşluğa alınmasına yol açan endotel fonksiyonunda ve protein ekspresyonunda değişikliklere neden olur. Bu sızan monositler aktive olur, lipit biriktirir ve makrofaj "köpük hücrelerine" dönüşür. Bu, düz kas hücreleri dahil olmak üzere diğer hücre tiplerini toplayan bir dizi inflamatuvar yanıtla sonuçlanır. Aterosklerotik plak genişledikçe ve nekrotik hale geldikçe, kopması trombosit yapışmasını teşvik eden ve damar lümeninde akut tıkanma ile sonuçlanan pıhtılaşma kademesini başlatan fibröz bir başlık oluşur. Bu olaylardan herhangi birini modüle eden veya bu süreçlerle ilişkili risk faktörlerini değiştiren EBK'lerin, makrovasküler hastalık gelişimini teşvik ettiği tahmin edilmektedir. ApoM, sfingosin-1-fosfatın bir alıcısı olarak işlev görebilir ve HDL aracılı anti-oksidasyon etkilerini artırabilir (Christoffersen ve ark., 2011). ApoM'nin koroner kalp hastalığı, diyabet ve dislipidemi ile diğer hastalıklarla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Diyabetik hastalarda serum apoM konsantrasyonu önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir (Richter ve ark., 2003). Biz de çalışmamızda *apom* anlatımının anlamlı derecede azaldığını tespit ettik.

Çalışmamızda RNA-seq sonuçlarına göre oluşturulan gen ontoloji ve cluster sonuçlarına göre bir diğer dikkat çeken durum koagülasyonla ve demir bağlama ile ilişkili genlerin (fibrinojen alfa zincir *-fga-*, fibrinojen beta zincir *-fgb-*, fibrinojen gama zincir *-fgg-*, koagülasyon factor II, *-f2-*, koagülasyon faktör V *-f5-*, transferrin a *-tfa-* ceruloplasmin *-cp-*) anlatımında meydana gelen değişikliklerdi. Kan pıhtılaşması ve ateroskleroz arasında yakın ilişki, aterosklerotik lezyonlarda spesifik pıhtılaşma bileşenlerinin varlığıyla ortaya çıkarılmıştır. Faktör XII, faktör XI, faktör IX ve protrombin gibi koagülasyon proteinlerinin çoğu aterosklerotik lezyonların içinde tespit edilmiştir (Esmon, 2005).

Çalışmamız metilparabenle alakalı tüm transkriptom analizinin yaptığı ilk çalışmadır. Çalışmamızda metilparabenin oksidan-antioksidan sisteme, lokomotor aktiviteye, lipid metabolizmasına, koagülasyona, apoptoza ve epigenetik düzenlenmeye olan etkileri aydınlatılmıştır. RNA-seq sonuçlarına göre en çok anlatımı artan gen kümesi translasyon ile ilişkili genlerdir. Transkripsiyon ve translasyonun düzenlenmesi çok çeşitli karmaşık prosesler neticesinde gerçekleşir ve bu olayların düzenlenmesinde birçok faktör rol oynar. Translasyon; RNA bağlayıcı proteinler, miRNA'lar ve post translasyonel modifikasyonlar aracılığıyla düzenlenebilir. RNA-seq sonuçlarında bir genin anlatımının artmış veya azalmış olması mRNA ürünü olan proteinler hakkında kesin bir fikir vermemektedir. RNA-seq sonuçlarına göre de translasyon ile ilişkili genlerin en fazla anlatımı artan gen clusterlarını oluşturması bunun en büyük kanıtıdır. Çalışmamızın en büyük sınırlayıcı faktörü budur. Transkriptom analizlerine destek olacak proteom analizlerinin yapılması büyük önem arz etmektedir.

8. KAYNAKLAR

Alavian-Ghavanini A, Rüegg J. Understanding Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: From Mechanisms to Novel Test Methods. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018;122(1):38-45.

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M. *Essential Cell Biology*. New York: Garland. 1997.

Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*. 2016;17(8):487-500.

Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I, Nadal A. Bisphenol a exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect*. 2010; 118:1243–1250.

Aluru N, Kuo E, Helfrich LW, Karchner SI, Linney EA, Pais JE, Franks DG. Developmental exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters DNA methyltransferase (*dnmt*) expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;284(2):142-151.

Angeli JK, Cruz Pereira CA, de Oliveira Faria T, Stefanon I, Padilha AS, Vassallo DV. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:838-848.

Arcand Hoy, L. D., & Benson, W. H. Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environ Toxicol Chem*. 1998;17, 49– 57.

Baker ME, Hardiman G. Transcriptional analysis of endocrine disruption using zebrafish and massively parallel sequencing. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(3):R241-R256.

Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011;21(3):381-395.

Bereketoglu C, Pradhan A. Comparative transcriptional analysis of methylparaben and propylparaben in zebrafish. *Sci Total Environ.* 2019; 671:129-139.

Bertke SJ, Lehman EJ, Wurzelbacher SJ, Hein MJ. Mortality of lead smelter workers: A follow-up study with exposure assessment. *Am J Ind Med.* 2016;59(11):979-986.

Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell.* 1985;40(1):91-99.

Błędzka D, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Parabens. From environmental studies to human health. *Environ Int.* 2014; 67:27-42.

Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis.* 2015; 6:109–120.

Brand W, Boon PE, Hessel EVS, Meesters JAJ, Weda M, Schuur AG. Exposure to and toxicity of methyl-, ethyl- and propylparaben : A literature review with a focus on endocrine-disrupting properties. RIVM report. 2017-0028.

Brind'Amour J, Liu S, Hudson M, Chen C, Karimi MM, Lorincz MC. An ultra-low-input native ChIP-seq protocol for genome-wide profiling of rare cell populations. *Nat Commun.* 2015; 6:6033.

Brüne B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ.* 2003;10(8):864-869.

Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):753-8.

Byford JR, Shaw LE, Drew MG, Pope GS, Sauer MJ, Darbre PD. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002;80(1):49-60.

Calafat AM, Ye X, Wong LY, Bishop AM, Needham LL. Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005-2006. *Environ Health Perspect*. 2010;118(5):679-685.

Cao J, Yan Q. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Front Oncol*. 2012; 2:26.

Casati L, Sendra R, Colciago A, et al. Polychlorinated biphenyls affect histone modification pattern in early development of rats: a role for androgen receptor-dependent modulation?. *Epigenomics*. 2012;4(1):101-112.

Casati L, Sendra R, Sibilio V, Celotti F. Endocrine disruptors: the new players able to affect the epigenome. *Front Cell Dev Biol*. 2015; 3:37.

Caserta D, Maranghi L, Mantovani A, Marci R, Maranghi F, Moscarini M. Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. *Hum Reprod Update*. 2008;14(1):59-72.

Ceriello A. Evidence for an Independent and Cumulative Effect of Postprandial Hypertriglyceridemia and Hyperglycemia on Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress Generation: Effects of Short- and Long-Term Simvastatin Treatment. *Circulation*. 2002; 106:1211–1218.

Chen H, Hu J, Yang J, et al. Generation of a fluorescent transgenic zebrafish for detection of environmental estrogens. *Aquat Toxicol.* 2010;96(1):53-61.

Chen J, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;221(3):278-284.

Chen J, Liufu C, Sun W, Sun X, Chen D. Assessment of the neurotoxic mechanisms of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in primary cultured neonatal rat hippocampal neurons includes alterations in second messenger signaling and oxidative stress. *Toxicol Lett.* 2010;192(3):431-439.

Chen J, Wu S, Wen S, et al. The Mechanism of Environmental Endocrine Disruptors (DEHP) Induces Epigenetic Transgenerational Inheritance of Cryptorchidism *PLoS One.* 2015;10(6): e0126403.

Chen Q, Pan C, Li Y, Zhang M, Gu W. The Combined Effect of Methyl- and Ethyl-Paraben on Lifespan and Preadult Development Period of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *J Insect Sci.* 2016;16(1):15.

Chen SC, Liao TL, Wei YH, Tzeng CR, Kao SH. Endocrine disruptor, dioxin (TCDD)-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in human trophoblast-like JAR cells. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(5):361-372.

Cheng X. Structural and functional coordination of DNA and histone methylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(8): a018747.

Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, Galvani S, Ahnström J, Sevvana M, Egerer-Sieber C, Muller YA, Hla T, Nielsen LB, Dahlbäck B. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(23):9613-9618.

Cowan-Ellsberry CE, Robison SH. Refining aggregate exposure: example using parabens. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2009;55(3):321-329.

Dai YJ, Jia YF, Chen N, et al. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ Toxicol Chem*. 2014;33(1):11-17.

Dambal VY, Selvan KP, Lite C, Barathi S, Santosh W. Developmental toxicity and induction of vitellogenin in embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to methyl Paraben. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2017; 141:113-118.

Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol*. 2004;24(1):5-13.

Darbre PD. Endocrine Disruptors and Obesity. *Curr Obes Rep*. 2017;6(1):18-27.

De Gaspar I, Blaquez MJ, Fraile B, Paniagua R, Arenas MI. The hatching gland cells of trout embryos: characterisation of N- and O-linked oligosaccharides. *J Anat*. 1999;194 (Pt 1)(Pt 1):109-118.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009;30(4):293-342.

Diniz WJ, Canduri F. Bioinformatics: an overview and its applications. *Genet Mol Res*. 2017;16(1):10.4238/gmr16019645.

Doherty LF, Bromer JG, Zhou Y, Aldad TS, Taylor HS. In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Horm Cancer*. 2010;1(3):146-155.

Dongiovanni P, Valenti L. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2016;65(8):1026-1037.

Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*. 1996; 123:37-46.

DuSell CD, Nelson ER, Wittmann BM, Fretz JA, Kazmin D, Thomas RS, Pike JW, McDonnell DP. Regulation of aryl hydrocarbon receptor function by selective estrogen receptor modulators. *Mol Endocrinol*. 2010;24(1):33-46.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.

Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol*. 2005;131(4):417-430.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983;301(5895):89-92.

Ferguson KK, Cantonwine DE, Rivera-González LO, et al. Urinary phthalate metabolite associations with biomarkers of inflammation and oxidative stress across pregnancy in Puerto Rico. *Environ Sci Technol*. 2014;48(12):7018-7025.

Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. *Int J Toxicol*. 2008;27 Suppl 4:1-82.

Fisher M, MacPherson S, Braun JM, et al. Paraben Concentrations in Maternal Urine and Breast Milk and Its Association with Personal Care Product Use. *Environ Sci Technol*. 2017;51(7):4009-4017.

Fleisch AF, Wright RO, Baccarelli AA. Environmental epigenetics: a role in endocrine disease?. *J Mol Endocrinol*. 2012;49(2): R61-R67.

Foley DL, Craig JM, Morley R, Olsson CA, Dwyer T, Smith K, Saffery R. Prospects for epigenetic epidemiology. *Am J Epidemiol*. 2009;169(4):389-400.

García-Reyero N, Raldúa D, Quirós L, et al. Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. *Anal Bioanal Chem*. 2004;378(3):670-675.

Gard P. *Endocrinology*. London, UK: Taylor and Francis. 1998.

Gruenbaum Y, Cedar H, Razin A. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature*. 1982;295(5850):620-622.

Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997;389(6649):349-352.

Grün F, Blumberg B. Minireview: the case for obesogens. *Mol Endocrinol*. 2009;23(8):1127-1134.

Grün F, Blumberg B. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007;8(2):161-171.

H. Sasaya, K. Yasuzumi, H. Maruoka, A. Fujita, Y. Kato, T. Waki, et al. Apoptosis-inducing activity of endocrine-disrupting chemicals in cultured PC12 cells. *Adv Biol Chem*. 2012; 2:92–105.

Hadi HA, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(3):183-198.

Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. 1996;123:1–36.

Hankinson O. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys*. 2005;433(2):379-86.

Hansen KD, Brenner SE, Dudoit S. Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(12):e131.

Hansen P-D, Dizer H, Hock B, Marx A, Sherry J, McMaster M, Blaise C. Vitellogenin- a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Anal Chem*. 1998;17: 448– 451.

Hardonnière K, Huc L, Sergent O, Holme JA, Lagadic-Gossmann D. Environmental carcinogenesis and pH homeostasis: Not only a matter of dysregulated metabolism. *Semin Cancer Biol*. 2017; 43:49-65.

Hassanzadeh N. “Histopathological evaluation of the Zebrafish (*Danio rerio*) testis following exposure to methyl paraben.” *Int J Aquat Biol*. 2017; 5:71-78.

Heindel JJ, Blumberg B, Cave M, et al. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod Toxicol*. 2017; 68:3-33.

Hennig B, Meerarani P, Slim R, Toborek M, Daugherty A, Silverstone AE, Robertson LW. Proinflammatory properties of coplanar PCBs: in vitro and in vivo evidence. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;181(3):174-183.

Hessel EVS, Boon PE, den Braver-Sewradj SP, Meesters JAJ, Weda M, Brand M. Review on butylparaben: exposure, toxicity and risk assessment – With a focus on endocrine disrupting properties and cumulative risk assessment, The Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (NVWA), National Institute for Public

Health and the Environment, RIVM Report 20180161, Bilthoven (The Netherlands), 2018.

Hiramatsu N, Cheek AO, Sullivan CV, Matsubara T, Hara A. Chapter 16 Vitellogenesis and endocrine disruption. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Volume 6, 2005; 431-471.

Ho JCH, Hsiao CD, Kawakami K, Tse WKF. Triclosan (TCS) exposure impairs lipid metabolism in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol*. 2016; 173:29-35.

Hoberman AM, Schreur DK, Leazer T, et al. Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2008;83(2):123-133.

Hossain E, Ota A, Karnan S, et al. Arsenic augments the uptake of oxidized LDL by upregulating the expression of lectin-like oxidized LDL receptor in mouse aortic endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;273(3):651-658.

Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006; 440:944–948.

Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2014;9;505(7482):248.

Huff M, da Silveira WA, Carnevali O, Renaud L, Hardiman G. Systems Analysis of the Liver Transcriptome in Adult Male Zebrafish Exposed to the Plasticizer (2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP). *Sci Rep*. 2018;8(1):2118.

Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347(6294):645-650.

İzmirli M. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. Van Tıp Dergisi. 2013;20(1):48-51.

Jacobs MN, Marczylo EL, Guerrero-Bosagna C, Ruegg J. Marked for Life : Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals. Annu Rev Environ Resou. 2017; 42:105-160.

Janjua NR, Frederiksen H, Skakkebaek NE, Wulf HC, Andersson AM. Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. Int J Androl. 2008;31(2):118-130.

Jarema KA, Hunter DL, Shaffer RM, Behl M, Padilla S. Acute and developmental behavioral effects of flame retardants and related chemicals in zebrafish. Neurotoxicol Teratol. 2015;52(Pt B):194-209.

Jefferson WN, Chevalier DM, Phelps. Persistently altered epigenetic marks in the mouse uterus after neonatal estrogen exposure. Mol Endocrinol. 2013;27(10):1666-1677.

Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. Environ Toxicol Pharmacol. 2015;40(1):241-58.

Khanna S, Darbre PD. Parabens enable suspension growth of MCF-10A immortalized, non-transformed human breast epithelial cells. J Appl Toxicol. 2013;33(5):378-382.

Kim JH, Park HY, Bae S, Lim YH, Hong YC. Diethylhexyl phthalates is associated with insulin resistance via oxidative stress in the elderly: a panel study. PLoS One. 2013;8(8): e71392.

Kim SH, Wu SY, Baek JI, et al. A post-developmental genetic screen for zebrafish models of inherited liver disease. PLoS One. 2015;10(5): e0125980.

Kopp R, Martínez IO, Legradi J, Legler J. Exposure to endocrine disrupting chemicals perturbs lipid metabolism and circadian rhythms. *J Environ Sci (China)*. 2017; 62:133-137.

Kurauchi K, Nakaguchi Y, Tsutsumi M, et al. In vivo visual reporter system for detection of estrogen-like substances by transgenic medaka. *Environ Sci Technol*. 2005;39(8):2762-2768.

Kurian JR, Louis S, Keen KL, Wolfe A, Terasawa E, Levine JE. The Methylcytosine Dioxygenase Ten-Eleven Translocase-2 (tet2) Enables Elevated GnRH Gene Expression and Maintenance of Male Reproductive Function. *Endocrinology*. 2016;157(9):3588-3603.

Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*. 2008; 300:1303–1310.

Ledwozyw A, Michalak D, Stepień A, Kadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*. 1986;155:275-283.

Lee HR, Hwang KA, Park MA, Yi BR, Jeung EB, Choi KC. Treatment with bisphenol A and methoxychlor results in the growth of human breast cancer cells and alteration of the expression of cell cycle-related genes, cyclin D1 and p21, via an estrogen receptor-dependent signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2012;29(5):883-890.

Lee JH, Lee M, Ahn C, Kang HY, Tran DN, Jeung EB. Parabens Accelerate Ovarian Dysfunction in a 4-Vinylcyclohexene Diepoxide-Induced Ovarian Failure Model. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(2):161.

Lee JT. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science* 2012; 338:1435–9.

Lemini C, Jaimez R, Avila ME, Franco Y, Larrea F, Lemus AE. In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens. *Toxicol Ind Health*. 2003;19(2-6):69-79.

Lerman A, Burnett JC Jr. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*. 1992;86(6 Suppl): III12-III19.

Lewis-Wambi JS, Jordan VC. Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit?. *Breast Cancer Res*. 2009;11(3):206.

Li ZH, Liu XY, Wang N, et al. Effects of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in regulation of growth and apoptosis of breast, ovarian, and cervical cancer cells. *Environ Health Perspect*. 2012;120(4):541-546.

Lillo MA, Nichols C, Perry C, et al. Methylparaben stimulates tumor initiating cells in ER+ breast cancer models. *J Appl Toxicol*. 2017;37(4):417-425.

Liou G.Y., Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*. 2010;44(5):479–496.

Lowry O H, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-275.

Luconi M, Cantini G, Serio M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): Is the genomic activity the only answer?. *Steroids*. 2010;75(8-9):585-594.

Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014; 224:164–175.

Lyssimachou, A, Santos, JG, André, A, Soares, J, Lima, D, Guimarães, L, et al. The Mammalian "Obesogen" Tributyltin Targets Hepatic Triglyceride Accumulation and

the Transcriptional Regulation of Lipid Metabolism in the Liver and Brain of Zebrafish. PLoS One. 2015;10(12): e0143911.

Ma WL, Wang L, Guo Y, et al. Urinary concentrations of parabens in Chinese young adults: implications for human exposure. Arch Environ Contam Toxicol. 2013;65(3):611-618.

Manavathi B, Kumar R. Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: two sides of the coin. J Cell Physiol. 2006;207(3):594-604.

Martini M, Miceli D, Gotti S, et al. Effects of perinatal administration of Bisphenol A on the neuronal nitric oxide synthase expressing system in the hypothalamus and limbic system of CD1 mice. J Neuroendocrinol. 2010;22(9):1004-1012.

Matwiejczuk N, Galicka A, Brzóska MM. Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. J Appl Toxicol. 2020;40(1):176-210.

Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. Cell. 1989;58(3):499-507.

Mínguez-Alarcón L, Messerlian C, Bellavia A, et al. Urinary concentrations of bisphenol A, parabens and phthalate metabolite mixtures in relation to reproductive success among women undergoing in vitro fertilization. Environ Int. 2019; 126:355-362.

Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric oxide. 2001; 5:62-71.

Nguyen LP, Bradfield CA. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. Chem Res Toxicol. 2008;21(1):102-116.

Nielson JR, Rutter JP. Lipid-mediated signals that regulate mitochondrial biology. *J Biol Chem*. 2018;293(20):7517-7521.

Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41:367-401.

Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, et al. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*. 2003 May 29;423(6939):545-50.

Oishi S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicol Ind Health*. 2001;17(1):31-39.

Oishi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(12):1807-1813.

Olivares-Rubio HF, Vega-López A. Fatty acid metabolism in fish species as a biomarker for environmental monitoring. *Environ Pollut*. 2016; 218:297-312.

Patiño, R., Sullivan, CV. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2002;26, 57–70.

Perugini M, Merola C, Amorena M, D'Angelo M, Cimini A, Benedetti E. Sublethal exposure to propylparaben leads to lipid metabolism impairment in zebrafish early-life stages. *J Appl Toxicol*. 2020;40(4):493-503.

Peter Stein T, Scholl TO, Schluter MD, Leskiw MJ, Chen X, Spur BW, Rodriguez A. Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. *Free Radic Res*. 2008 42:841–848.

Petrulis JR, Perdew GH. The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact*. 2002;141(1-2):25-40.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89-96.

Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 1982; 22 517–554.

Richter S, Shih DQ, Pearson ER, Wolfrum C, Fajans SS, Hattersley AT, Stoffel M. Regulation of apolipoprotein M gene expression by MODY3 gene hepatocyte nuclear factor-1alpha: haploinsufficiency is associated with reduced serum apolipoprotein M levels. *Diabetes.* 2003;52(12):2989-2995.

Ritchie MD, Holzinger ER, Li R, Pendergrass SA, Kim D. Methods of integrating data to uncover genotype-phenotype interactions. *Nat Rev Genet.* 2015;16(2):85-97.

Roberts AC, Chornak J, Alzagatiti JB, et al. Rapid habituation of a touch-induced escape response in Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. *PloS One.* 2019;14(4): e0214374.

Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics.* 2012;7(10):1098-1108.

Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;153(1):12-19.

Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology.* 2006;147(8):3681-3691.

Ruder AM, Hein MJ, Hopf NB, Waters MA. Cancer incidence among capacitor manufacturing workers exposed to polychlorinated biphenyls. *Am J Ind Med.* 2017;60(2):198-207.

Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998;391(6662):96-99.

Santos D, Matos M, Coimbra AM. Developmental toxicity of endocrine disruptors in early life stages of zebrafish, a genetic and embryogenesis study. *Neurotoxicol Teratol.* 2014; 46:18-25.

Schwertman P, Bekker-Jensen S, Mailand N. Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016; 17:379–94.

Segner H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2009;149(2):187-195.

Shanle EK, Xu W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol.* 2011;14;24(1):6-19.

Sheskey PJ , Cook WG, Cable CG, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 8th ed., Pharmaceutical Press, London, and American Pharmacists Association, Washington D.C. 2017, pp. 130–133, 379–382, 604–608, 803–806.

Shin MY, Shin C, Choi JW, Lee J, Lee S, Kim S. Pharmacokinetic profile of propyl paraben in humans after oral administration. *Environ Int.* 2019; 130:104917.

Shono T, Taguchi T. Short-time exposure to mono-n-butyl phthalate (MBP)-induced oxidative stress associated with DNA damage and the atrophy of the testis in pubertal rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2014;21(4):3187-3190.

Singh PK, Campbell MJ. The interactions of microRNA and epigenetic modifications in prostate cancer. *Cancers (Basel)*. 2013; 5: 998– 1019.

Smarr MM, Sundaram R, Honda M, Kannan K, Louis GM. Urinary Concentrations of Parabens and Other Antimicrobial Chemicals and Their Association with Couples' Fecundity. *Environ Health Perspect*. 2017;125(4):730-736.

Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*. 1981; 291:293–296.

Sulkowski ZL, Chen T, Midha S, Zavacki AM, Sajdel-Sulkowska EM. Maternal thimerosal exposure results in aberrant cerebellar oxidative stress, thyroid hormone metabolism, and motor behavior in rat pups; sex- and strain-dependent effects. *Cerebellum*. 2012;11(2):575-586.

Sun L, Yu T, Guo J, et al. The estrogenicity of methylparaben and ethylparaben at doses close to the acceptable daily intake in immature Sprague-Dawley rats. *Sci Rep*. 2016; 6:25173.

Swanson HI. DNA binding and protein interactions of the AHR/ARNT heterodimer that facilitate gene activation. *Chem Biol Interact*. 2002;141(1-2):63-76.

Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*. 1979;17(4):771-779.

Thisse C, Thisse B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc*. 2008;3(1):59-69.

Thornton JW. Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(10):5671-5676.

Tian J, Wu F, Yang CG, Jiang M, Liu W, Wen H. Dietary lipid levels impact lipoprotein lipase, hormone-sensitive lipase, and fatty acid synthetase gene expression in three tissues of adult GIFT strain of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem*. 2015;41(1):1-18.

Urriola-Muñoz P, Lagos-Cabré R, Patiño-García D, Reyes JG, Moreno RD. Bisphenol-A and Nonylphenol Induce Apoptosis in Reproductive Tract Cancer Cell Lines by the Activation of ADAM17. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8):2238.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003;189(1-2):41-54.

Üstündağ ÜV, Ünal İ, Ateş PS, Alturfan AA, Yiğitbaşı T, Emekli-Alturfan E. Bisphenol A and di(2-ethylhexyl) phthalate exert divergent effects on apoptosis and the Wnt/ β -catenin pathway in zebrafish embryos: A possible mechanism of endocrine disrupting chemical action. *Toxicol Ind Health*. 2017;33(12):901-910.

Van Ham TJ, Mapes J, Kokel D, Peterson RT. Live imaging of apoptotic cells in zebrafish. *FASEB J*. 2010;24(11):4336-4342.

Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(8):1007-1022.

Verloop J, van Leeuwen FE, Helmerhorst TJM, et al. Risk of cervical intra-epithelial neoplasia and invasive cancer of the cervix in DES daughters. *Gynecol Oncol*. 2017;144(2):305-311.

Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Andò S, Maggiolini M. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced

by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2006 Mar;20(3):631-46.

Vo TT, Jeung EB. An evaluation of estrogenic activity of parabens using uterine calbindin-d9k gene in an immature rat model. *Toxicol Sci*. 2009;112(1):68-77.

Vo TT, Yoo YM, Choi KC, Jeung EB. Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reprod Toxicol*. 2010;29(3):306-316.

Wahlang B, Prough RA, Falkner KC, et al. Polychlorinated Biphenyl-Xenobiotic Nuclear Receptor Interactions Regulate Energy Metabolism, Behavior, and Inflammation in Non-alcoholic-Steatohepatitis. *Toxicol Sci*. 2016;149(2):396-410.

Watkins DJ, Ferguson KK, Anzalota Del Toro LV, Alshawabkeh AN, Cordero JF, Meeker JD. Associations between urinary phenol and paraben concentrations and markers of oxidative stress and inflammation among pregnant women in Puerto Rico. *Int J Hyg Environ Health*. 2015;218(2):212-219.

Watson CS, Bulayeva NN, Wozniak AL, Alyea RA. Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. *Steroids*. 2007;72(2):124-134.

Weigel NL. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J*. 1996;319.

Wilks A, Seldran M, Jost JP. An estrogen-dependent demethylation at the 5' end of the chicken vitellogenin gene is independent of DNA synthesis. *Nucleic Acids Res*. 1984;12(2):1163-1177.

Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. *Nat Med*. 2005;11(4):418-422.

Wolin MS. Interactions of Oxidants With Vascular Signaling Systems. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000; 20:1430–1442.

Xue T, Yang L. The Toxicity Assessment of ethyl p-hydroxybenzoate in Nematode *C. Elegans*. *Int. J. Biol.* 2016;8(3): 38-44.

Yang O, Kim HL, Weon JI, Seo YR. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *J Cancer Prev.* 2015;20(1):12-24.

Ye X, Bishop AM, Reidy JA, Needham LL, Calafat AM. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environ Health Perspect.* 2006;114(12):1843-1846.

Yuan JS, Wang D, Steward CN JR. Statistical methods for efficiency adjusted realtime PCR quantification. *Biotechnol J.* 2008; 3:112-123.

Zama AM, Uzumcu M. Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes. *Endocrinology.* 2009;150(10):4681-4691.

Zeng Z, Shan T, Tong Y, Lam SH, Gong Z. Development of estrogen-responsive transgenic medaka for environmental monitoring of endocrine disrupters. *Environ Sci Technol.* 2005;39(22):9001-9008.

Zhang J, Qian L, Wang C, Teng M, Duan M, Zhou Y, Chen X, Bo R, Wang C, Li X. Dysregulation of endocrine disruption, apoptosis and the transgenerational toxicity induced by spirotetramat. *Chemosphere.* 2020;240:124900.

Zhang S, Qin C, Safe SH. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect.* 2003;111(16):1877-82.

Zhao H, Huo W, Li J, Ma X, Xia W, Pang Z, Xie M, Xu S, Cai Z. Exposure to benzophenones, parabens and triclosan among pregnant women in different trimesters. *Sci Total Environ.* 2017;607-608:578-585.

Zhu C, Liang M, Li Y, Feng X, Hong J, Zhou R. Involvement of Epigenetic Modifications of GABAergic Interneurons in Basolateral Amygdala in Anxiety-like Phenotype of Prenatally Stressed Mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2018;21(6):570-581.

9. EKLER

EK-1 Yayınlanan Makale

➤ J Biochem Mol Toxicol. 2018 Mar;32(3):e22036. doi: 10.1002/jbt.22036. Epub 2018 Jan 23.

Methylparaben induces malformations and alterations on apoptosis, oxidant–antioxidant status, ccnd1 and myca expressions in zebrafish embryos

Perihan Seda Ateş¹, İsmail Ünal¹, Ünsal Veli Üstündağ², Ahmet Ata Alturfan³, Türkan Yiğitbaşı², Ebru Emekli-Alturfan¹

Affiliations + expand

PMID: 29360218 DOI: 10.1002/jbt.22036

Abstract

Methylparabens (MP) are widely used as preservatives in cosmetics, pharmacy, and food industry. Although acute toxicity studies in animals indicated that parabens are not significantly toxic, the effects of chronic exposure under sublethal doses are still unknown and the number of related studies is limited. Our aim was to evaluate the effects of MP on the development of zebrafish embryos focusing on development, locomotor activity, oxidant-antioxidant status, apoptosis, and ccnd1 and myca expressions. The expressions of ccnd1 and myca were determined by RT-PCR. Lipid peroxidation (LPO), nitric oxide (NO), and glutathione-S-transferase (GST) activities were determined spectrophotometrically. Apoptosis was determined using acridine orange staining. Locomotor activity was measured using touch-evoked movement test. MP exposure increased malformations, LPO, apoptosis, ccnd1 and myca expressions, and decreased GST activities and NO levels compared with the control group. Our findings will lead to further understanding of the mechanism of MP toxicity, and merit further research.

Keywords: apoptosis; ccnd1; methylparaben; myca; oxidant-antioxidant status.

© 2018 Wiley Periodicals, Inc.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Perihan Seda	Soyadı	Ateş-Kalkan
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	15.08.1992
Uyruğu	T.C	Tel	05377631112
E-mail	perihansedaates@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Misafir Araştırmacı (Doktora/ Newton Fund ve TÜBİTAK 2214-A bursu ile)	Birmingham Üniversitesi/ Kanser ve Genomik Bilimler Enstitüsü	2018 (7 ay) 2019 (6 ay)
Yüksek Lisans	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi/ Adli Tıp Enstitüsü/ Fen Bilimleri A.B. D	2016
Lisans	İstanbul Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2013

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl- Yıl)
Araştırma Görevlisi	Oxford Üniversitesi/ MRC Weatherall Moleküler Tıp Enstitüsü	2020-...

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	Çok İyi	Çok İyi

Yabancı Dil Sınav Notu							
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	YÖKDİL
							82,5

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	80,190		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.