

## 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol ve 4-*n*-Nonilfenol'e Maruz Bırakılan İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811) (Cyprinidae)'nin Hepatositlerinde Sitokrom P4501A'nın İmmunohistokimyasal Boyanmasındaki Değişimler

Burak Kaptaner<sup>1\*</sup>, Güler Ünal<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 65080 Tuşba, Van, Türkiye

<sup>2</sup> Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Çocuk Gelişimi, Bölümü, Aydın, Türkiye

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

ORCID ID: B.Kaptaner: <https://orcid.org/0000-0003-2366-6756>, G. Unal: <https://orcid.org/0000-0001-5920-6693>

Geliş tarihi/Received: 02/08/2020

Kabul tarihi/Accepted:15/09/2020

### Özet

Bu çalışmada, 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE<sub>2</sub>; 1, 10 ve 100 ng/l) ve 4-*n*-Nonilfenolün (NP; 10, 60 ve 200  $\mu$ g/l) nominal konsantrasyonlarına, semistatik koşullarda kronik olarak (32 gün), maruz bırakılan inci kefalinin hepatositlerinde, sitokrom P4501A (CYP1A) enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonu, incelendi. Deneysel uygulamalar sonrasında, karaciğer kesitleri immunohistokimya yöntemi ile boyandı ve değerlendirildi. CYP1A immunreaktivitesi, kontrol grubuna ait bireylerde hepatositlerin sitoplazmasında, gözlenmedi. NP uygulanan gruplarda, CYP1A'nın immunohistokimyasal boyanmasında kontrol bireylerine kıyasla, bir farklılık belirlenmedi. EE<sub>2</sub> uygulaması sonucunda, hepatositlerin sitoplazmasında nükleus membranından plazma membranına doğru artan ve orta şiddetli olan immunboyanma gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar bu zenoöstrojenlerin, hepatositlerdeki CYP1A immunboyanması üzerine farklı etkiler gösterdiklerini ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Chalcalburnus tarichi*, CYP1A, karaciğer, hepatosit, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, 4-*n*-nonilfenol

### Alterations in the Immunohistochemical Staining of Cytochrome P4501A in the Hepatocytes of *Chalcalburnus tarichi* (Pallas 1811) (Cyprinidae) Exposed to 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and 4-*n*-Nonylphenol

#### Abstract

In the present study, immunohistochemical localization of cytochrome P4501A (CYP1A) in the hepatocytes of *Chalcalburnus tarichi* (Cyprinidae) that were chronically exposed (32 days) to nominal concentrations of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE<sub>2</sub>; 1, 10, and 100 ng/l) and 4-*n*-nonylphenol (NP; 10, 60, and 200  $\mu$ g/l) under semistatic conditions was conducted. After the experimental exposure, the liver sections were stained using immunohistochemistry and then evaluated. No CYP1A immunoreactivity was detected in the cytoplasm of the hepatocytes in the controls. Moreover, no difference in the CYP1A immunohistochemical staining was observed in the NP-treated groups when compared to the controls. The EE<sub>2</sub> treatment resulted in moderate CYP1A immunostaining in the cytoplasm of the hepatocytes, which extended from the nuclear membrane to the plasma membrane. The results showed that those xenoestrogens had different effects on the CYP1A immunostaining in the hepatocytes.

**Key words:** *Chalcalburnus tarichi*, CYP1A, liver, hepatocyte, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, 4-*n*-nonylphenol

## Giriş

Sitokrom P450 bağımlı monooksijenaz enzimleri apısal ve fonksiyonel olarak hem proteinleri ile ilişkili olan bir familyayı kapsar. Sitokrom P450 sisteminin temel fonksiyonu, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH), poliklorlu bifeniller (PCB), dioksinler, halojenli aromatik hidrokarbonlar gibi eksojen kimyasalların yanısıra ilaçlar, steroidler, nörohormonlar, yağ asitleri ve prostaglandinler gibi endojen bileşiklerden oluşan çok geniş bir substrat aralığının oksitatif metabolizasyonudur. Biyotransformasyon basamağının genellikle birincisini oluşturan bu oksitatif süreç, terminolojide “Faz I” metabolizması olarak adlandırılır. Sitokrom P4501A (CYP1A) alt ailesi yukarıda sözü edilen birçok yabancı maddenin biyotransformasyonunda rol oynamasından dolayı daha fazla dikkat çekmektedir. Memeli ve teleost CYP1A formlarının karakteristik özelliği zenobiyotikler tarafından uyarılabilir olmasıdır. Uyarıcıya yanıt, sitosolik ligand aktiviye transkripsiyon faktörü olarak bilinen aril-hidrokarbon reseptör (AHR)’ü aracılığıyla gerçekleştirilir. Ligand olarak zenobiyotiğin reseptöre bağlanması ile ısı şok proteini 90’nın ayrıldığı transformasyon süreci, daha sonra ise AHR-ligand altbirimi ve AHR nüklear translokator proteini arasında heterodimer oluşum süreci meydana gelir. Transkripsiyonel olarak aktif olan heterodimer, DNA üzerinde CYP1A geninin promotör bölgesinin yanındaki spesifik AHR-yanıt elementleri ile etkileşmek üzere nukleusa geçer. Etkileşim, CYP1A gen transkripsiyonu, mRNA sentezi, protein sentezi ve son olarak katalitik aktivitesi ile sonuçlanır (Sarasquete ve Segner 2000).

Zenobiyotiklere maruz kalma sonucunda CYP1A’nın uyarılabilirliği, akuatik çevredeki kirlilik izleme çalışmalarında bir biyomarkır olarak kullanımını ortaya çıkarmıştır (Goksöyr ve Förllin 1992). CYP1A ile yapılan sitotoksikolojik ve ekotoksikolojik çalışmalar, enzimin katalitik aktivitesi [7-etoksiresorufin *O*-deetilaz (EROD), aril hidrokarbon hidroksilaz vb.], gen ve protein ekspresyonu ve dokulardaki immunohistokimyasal lokalizasyonu gibi farklı yöntemlere dayanmaktadır (Sarasquete ve Segner 2000; Fent 2001; Mortensen ve ark. 2006). Balıklarda PAH’lar (örn., benzo[*a*]piren) (Malmström ve ark. 2004) ve PCB’lere (örn., 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD)) (Arellano ve ark. 2001) maruz kalma sonrasında, CYP1A’nın güçlü bir şekilde uyarıldığı, geçmişte yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda, gösterilmiştir.

17 $\alpha$ -Etinilestradiol (EE<sub>2</sub>), kontraseptif ilaçların temel bileşeni olup güçlü bir sentetik östrojendir (Larsson ve ark. 1999). Nonilfenol (NP) ise deterjanların yapımında noniyonik surfaktan olarak kullanılan alkilfenol etoksilatların bir indirgenme ürünüdür ve zayıf östrojenik etkiye sahiptir (Jobling ve Sumpter 1993). Hem EE<sub>2</sub> hem de NP arıtma atık suyunda, sedimentlerde ve akuatik çevrede belirlenmişlerdir (Ahel ve ark. 1994; Ternes ve ark. 1999; Kannan ve ark. 2003). Endokrin sistemi etkileyen bu kimyasalların, balıklarda üreme ve gelişmeyi engelleme (Van Den Belt ve ark. 2002; Weber ve ark. 2003), hormonal bozulma (Labadie ve Budzinski 2006a,b), faz I ve faz II biyotransformasyon enzim seviyelerinde değişim (Vaccaro ve ark. 2005; Kaptaner ve ark. 2009) gibi zararlı etkilere yol açtığı, farklı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir.

İnci kefalı (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811) (Cyprinidae), Van Gölü Havzası’nda yaşayan endemik bir türdür. Anadrom karakterli olan bu balık türü, gölün ekstrem pH seviyelerinde (9.8) yaşayabilme özelliğinden dolayı biyolojik olarak oldukça dikkat çekicidir (Danulat ve Selcuk 1992). Son yıllarda yapılan histolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyedeki çalışmalar, balığın gonadlarının histolojisinde, endokrin ve antioksidan savunma sisteminde değişimlerin meydana geldiğini ve bu

değişimlerin endokrin bozucu çevresel kirleticilerden kaynaklanabileceğini rapor etmişlerdir (Ünal ve ark. 2007; Kaptaner ve ark. 2014; Unal ve ark. 2014; Kaptaner 2015; Kaptaner ve ark. 2016).

EE<sub>2</sub> ve NP'nin, balık dokularında CYP1A enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonu üzerine olan etkileri ile ilgili bilimsel çalışmalar nadirdir. Bu çalışmada, inci kefalinin karaciğerinde, EE<sub>2</sub> ve NP'nin hepatositlerdeki CYP1A immun boyanması üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

## **Materyal ve Yöntem**

### **Balık temini**

Çalışmada kullanılan inci kefalleri Van Gölü'ne dökülen Karasu Çayı'ndan elektroşok ile yakalandıktan sonra 1000 l hacimli ve hava motorları ile havalandırılan fiberglas tanklara aktarıldı. Balıklar daha sonra su sıcaklığının ortalama 16 °C olduğu tanklarda ve doğal fotoperyot altında, bir ay aklimatizasyon sürecine bırakıldı. Bu süreç sırasında balıkların ticari alabalık yemine alıştırılması ve yem almaları sağlandı.

### **Deneysel dizayn ve kimyasal uygulama**

Bir aylık aklimatizasyon periyodundan sonra stok tankında bulunan balıklar, 60 l su hacimli cam akvaryumlara, her akvaryumda 10 balık olacak şekilde dağıtıldı. Görsel stresi önlemek için akvaryumların etrafı kağıtla kapatıldı. Çalışmada 9.72 ± 0.70 cm (Ortalama ± Standart Sapma; Ort. ± S.S.) çatal boylu ve 8.92 ± 2.07 g (Ort. ± S.S.) vücut ağırlıklı balıklar kullanıldı. Akvaryumlara aktarılan balıklara 5 gün sonra kimyasal uygulaması başlatıldı. 17 $\alpha$ -Etinilestradiol (EE<sub>2</sub>, saflık: %98, Sigma, Kat. No: E4876) ve 4-*n*-Nonilfenol (NP, saflık: %99, Riedel-de Häen, Kat. No: 46405)'lün stok solüsyonları aseton solvent (HPLC derece, Sigma) içinde hazırlandıktan sonra EE<sub>2</sub> için 1, 10, 100 ng/l ve NP için 10, 60, 200 µg/l nominal konsantrasyonlarda olacak şekilde akvaryum sularına manuel olarak eklendi. Akvaryum suyundaki aseton konsantrasyonu % 0.001'den düşük olacak şekilde ayarlandı. Balıklar üzerine solventin etkisi hakkında bilgi edinmek için bir kontrol akvaryumuna ek olarak ikinci bir kontrol akvaryumuna, yalnızca aseton solvent, eklendi. Balıklara kimyasal uygulaması semistatik-yenileme sistemi ile 32 gün boyunca, 12:12 fotoperyot altında yapıldı. Uygulanan test kimyasalları, akvaryum suyunun % 80'inin değişimi ile 24 saatte bir yenilendi. Çalışma sekiz grup ile gerçekleştirildi ve her grup için bir tekerrür akvaryumu oluşturuldu. Çalışmada dinlendirilmiş ve kloru uzaklaştırılmış şebeke suyu kullanıldı. Yemleme günde bir kez yapıldı. Yenilmeyen yemler ve balık atıkları her gün sifonlama yapılarak temizlendi. Uygulama süreci boyunca akvaryumlarda su sıcaklığı (Ort.±S.S.: 14.08 ± 0.8 °C), pH (Ort. ± S.S.: 8.78 ± 0.1), çözülmüş oksijen (Ort. ± S.S.: 4.41 ± 0.44 mg/l) ve kondüktivite (Ort. ± S.S.: 638.62 ± 57.8 µMHOS/cm) gibi su kalitesi kriterleri, her gün düzenli olarak ölçüldü. CaCO<sub>3</sub> cinsinden sertlik, dinlendirilmiş stok musluk suyu tankında çalışmanın başında ve sonunda olmak üzere iki kez ölçüldü. Bu değerlerin sırasıyla 198 ve 216 mg/ml olduğu belirlendi.

## **Doku Alınımı ve Histolojik Prosedür**

Kimyasal uygulaması tamamlandıktan sonra balıklar MS-222 (200 mg/l, 3-aminobenzoik asit etil ester, Sigma) ile anestezi edildi. Balıklar daha sonra disekte edilerek karaciğerleri çıkartıldı. Karaciğer dokusu % 10'luk nötral tamponlu formalin fiksatif ile tespit edildi. Tespit edilen dokular, fosfat tuz tamponu (PBS; pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra, dereceli etanol (% 70, % 80, %96 ve absölü) serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve ksilende şeffaflaştırıldıktan sonra parafine gömüldü.

## **CYP1A enziminin immuno-histokimyasal olarak boyanması ve değerlendirilmesi**

Her gruba ait 6 bireyin, parafine gömülmüş karaciğer dokularından 4 µm kalınlığındaki kesitler alınıp polilizin kaplı lamlara aktarıldı. Kesitler, deparafinize ve rehidrate edildikten sonra metanol ile hazırlanan % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edilerek, endojen peroksidaz aktivitesi, inaktif hale getirildi. PBS ile yıkanan kesitler, sitrat tamponu (0.1 M, pH: 6) ile 100 °C'de 15 dk muamele edildi daha sonra PBS ile birkaç kez yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için at serumu ile oda sıcaklığında 20 dk. inkübasyona bırakılan kesitler, PBS ile üç kez beşer dk. yıkandıktan sonra PBS ile 1:100 oranında sulandırılan primer antikor (fare anti balık CYP1A peptid monoklonal antikor, C10-7, Biosense Lab., Norveç) ile 4 °C'de nemli ortamda, bir gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki boyama basamaklarında, biyotinli anti-fare sekonder antikorunu içeren ABC kit (Fare UniTect ABC Kit, Kat. No: XHC01, Calbiochem, Merck, ABD) protokollerine uyuldu. Özet olarak; kesitler PBS ile yıkandıktan sonra biyotinli sekonder antikor ile oda sıcaklığında 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Lamlar PBS ile yıkandıktan sonra avidin-biyotin horradış peroksidaz kompleks karışımı ile 30 dk. inkübe edildi. Daha sonra doku geçirgenliğini artırmak için PBS ile hazırlanan %1'lik Triton X-100 ile 30 saniye yıkandı. Kesitler, DAB (3,3'-diaminobenzidin) ile inkübe edildikten sonra bidistile su ile yıkandı. Zemin boyaması, Mayer'in Hematoksilen boyası ile yapıldı. Lamlar dereceli etanolden (%95, %100) ve ksilenden geçirilerek, entellan ile kapatıldı. Negatif kontrollerde primer antikor yerine PBS kondu. Preparatlar, Nikon Eclipse E600 marka araştırma mikroskobu ile incelendikten sonra görüntüleri alındı.

Kesitlerin değerlendirilmesi ve puanlanması Husøy ve ark. (1996)'ına göre aşağıdaki şekilde yapıldı:

1. Hücrenin sitoplazmik alanında boyanmanın dağılımına göre; sitoplazmik alanda boyanma yok ise, (%0, -); sitoplazmik alanda kısmen boyanma varsa (%50, +), sitoplazmik alanda büyük oranda boyanma varsa (%80-90, ++), sitoplazmik alan tamamen boyanmış ise (%100, +++).

2. Sitoplazmik alandaki boyanmanın yoğunluğuna göre; Negatif, (-); hafif şiddetli (+), orta şiddetli (++) , kuvvetli (+++) ve çok kuvvetli (++++).

3. 1. ve 2. kriterlere göre incelenen hücrelerin kesitteki dağılımına göre; Homojen, (a); heterojen, (b) olmak üzere üç kritere göre yapıldı.

## **Bulgular**

Kontrol gruplarındaki ve NP ile EE<sub>2</sub>'ye maruz bırakılan gruplardaki CYP1A enziminin immunohistokimyasal değerlendirilmesi Tablo 1'de gösterilmiştir. Kontrol gruplarında, CYP1A immunboyanmasının hepatosit nükleus zarının hemen üzerindeki

(perinükleer) alanlarda olduğu gözlemlendi ancak sitoplazmik alanda meydana gelmediği belirlendi bununla birlikte hepatositlerin sinüzoidde bakan plazma membranı altında da boyanmanın olduğu gözlemlendi (Şekil 1a,b).

NP'ye maruz bırakılan gruplarda ise boyanmanın kontrol gruplarına benzer olarak nükleus membranı etrafında ve hepatositlerin sinüzoidde bakan plazma membranı altında olduğu belirlendi (Şekil 2a,b,c). Kontrol gruplarında ve NP'ye maruz bırakılan gruplarda hepatositlerde sitoplazmik alanda boyanma gözlemlenmedi.

EE<sub>2</sub>'nin 1 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan grupta da boyanmanın kontrol grubundakine benzer olduğu bununla birlikte bazı hücrelerde nükleus etrafındaki boyanmanın daha belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 3a). Bu gruba ait bir bireyde kısmen ve granüllü boyanmanın meydana geldiği belirlendi. EE<sub>2</sub>'nin 10 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan grupta genel olarak sitoplazmik alandaki boyanmanın kısmen (+) ve orta şiddetli (++) olduğu, bununla birlikte az sayıdaki hücrede sitoplazmik alanın büyük oranda ve orta şiddetli boyandığı gözlemlendi (Şekil 3b). EE<sub>2</sub>'nin 100 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan grupta sitoplazmik alanın genel olarak, nükleus membranından başlamak üzere, yaygın olarak büyük oranda (++) ve orta şiddetli (++) boyandığı, seyrek de olsa bazı hücrelerin tamamen ve orta şiddetli boyandığı belirlendi. Hücrelerdeki boyanmanın sinüzoidde ve komşu hücelere bakan yan sitoplazmik bölgelerde meydana geldiği ancak sinüzoidin karşı tarafındaki bölgenin boyanmadığı gözlemlendi (Şekil 3c). Bu gruba ait iki bireyde hücrelerde sitoplazmik alanın tamamen ve orta şiddetli boyandığı, seyrek olarak bazı hücrelerde ise boyanmanın kuvvetli olduğu görüldü. EE<sub>2</sub>'ye maruz bırakılan gruplarda sitoplazmik boyanma alanının konsantrasyon artışı ile birlikte arttığı ve orta şiddetli bir boyanma meydana geldiği belirlendi. Hepatositlerde CYP1A enzimi ile boyanan hücrelerin homojen dağılım gösterdiği yani kesit içinde merkezi ven veya büyük damarlar etrafında yoğunlaşmadığı gözlemlendi.

**Tablo 1.** NP ve EE<sub>2</sub>'ye maruz bırakılan inci kefalinde CYP1A enziminin hepatositlerdeki immunohistokimyasal değerlendirilmesi.

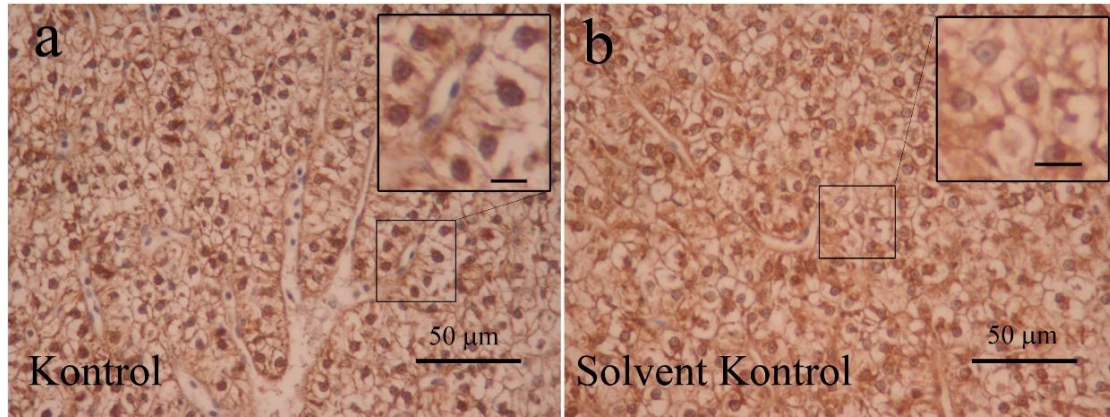
Uygulama Grubu	n	1	2	3
Kontrol	6	–	–	a
Solvent Kontrol	6	–	–	a
NP 10 µg/l	6	–	–	a
NP 60 µg/l	6	–	–	a
NP 200 µg/l	6	–	–	a
EE <sub>2</sub> 1 ng/l	6	–	–	a
EE <sub>2</sub> 10 ng/l	6	+ / ++	++	a
EE <sub>2</sub> 100 ng/l	6	++	++	a

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

## Tartışma ve Sonuç

Kontrol gruplarına ait kesitlerde CYP1A immun-reaktivitesi, sadece nukleus membranına ve plazma membranına bitişik alanda gözlendi bununla birlikte sitoplazmik alanda boyanma görülmedi benzer boyanma, hepatik patolojiye sahip olmayan *Pseudopleuronectes americanus*'ta da gözlenmiştir (Smolovitz ve ark. 1989). Benzer şekilde Lester ve ark. (1993), gökkuşuğu alabalığı hepatositlerinde yaptıkları elektron mikroskop incelemesinde, CYP1A enziminin perinükleolar alanda bulunan granüllü endoplazmik retikulum içerisinde lokalize olduğunu bildirmişlerdir.

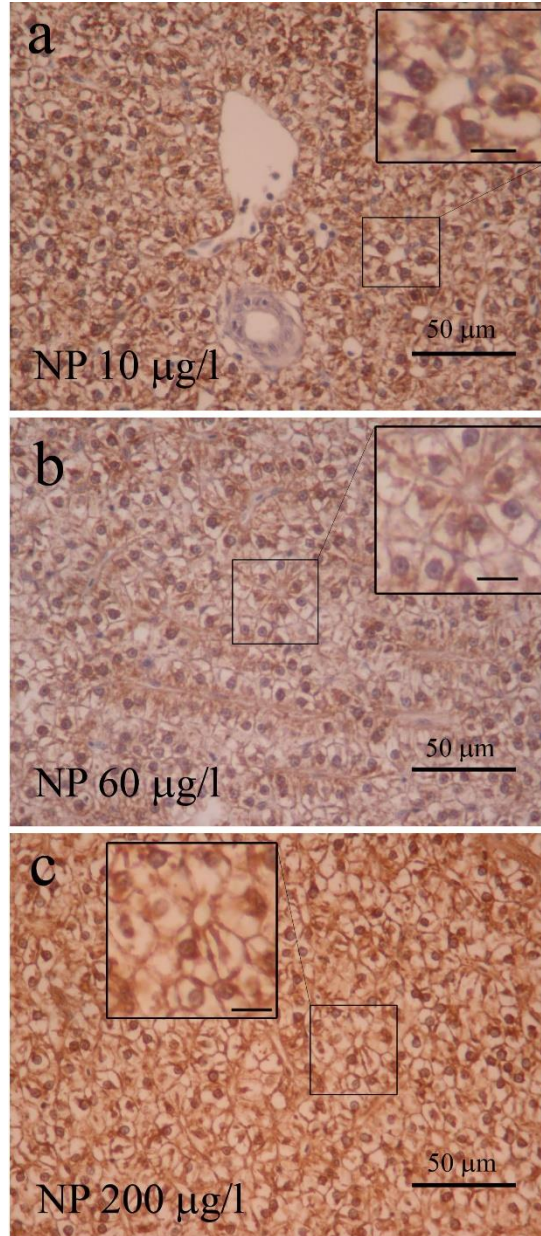
Çalışmamızda NP uygulanan gruplarda, kontrol gruplarında olduğu gibi, hepatosit sitoplazmasında, CYP1A immunreaksiyonu gözlenmedi ve kontrol gruplarına kıyasla belirgin bir fark olmadığı belirlendi. NP'nin sıçanda EROD aktivitesini düşürdüğü ve CYP1A ifadesini azalttığı (Lee ve ark. 1996), *Salmo salar*'da CYP1A ifadesini baskıladığı (Arukwe ve ark. 1997), *Gadus morhua*'da, CYP1A seviyesinde azalmaya ve EROD aktivitesinde düşüşe neden olduğu (Sturwe ve ark. 2006) bildirilmiştir. Bu çalışmada NP'ye maruz bırakılan bireylerde, hepatosit sitoplazmasında CYP1A enzimine ait immunboyanma gözlenmemesi, NP'nin CYP1A'yı uyarmamasından veya CYP1A'yı baskılamasından kaynaklanabilir.



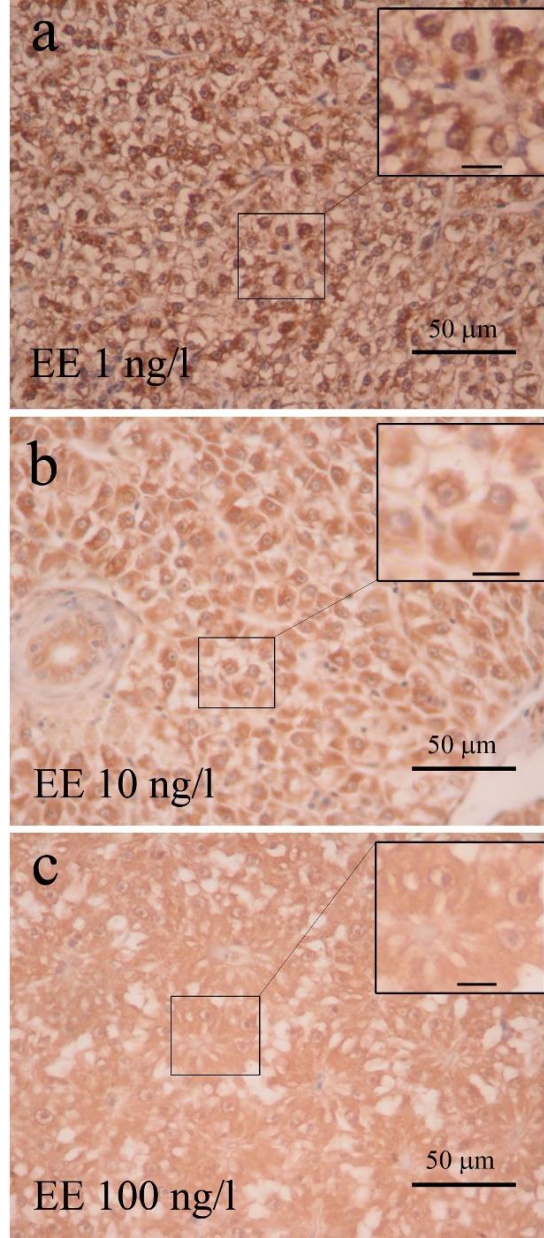
**Şekil 1.** İnci kefalinde kontrol (a) ve solvent kontrol (b) grubu bireylerinin karaciğer dokusundan alınan kesitlerde CYP1A enzimine ait immun boyama. CYP1A immunreaksiyonu hepatositlerin sadece perinükleolar alanlarında gözlenirken, sitoplazmik alanlarında gözlenmemiştir (inset bar: 10 µm).

Doğal östrojen 17 $\beta$ -östradiolün alabalık karaciğer hücre kültüründe bazal EROD aktivitesini inhibe ettiği, (Navas ve Segner 2000), CYP1A mRNA seviyesini düşürdüğü, (Navas ve Segner 2001) ve CYP1A ifadesini baskıladığı (Elskus, 2004) belirlenmiştir. EE<sub>2</sub> enjekte edilen *Cyprinus carpio*'da EROD aktivitesinin ve CYP1A protein ifadesinin belirlenmediği bildirilmiştir (Solé ve ark. 2000). Sentetik östrojen EE<sub>2</sub>'ye 7 gün süre ile maruz bırakılan *Salmo salar*'da ise CYP1A ifadesinin zamana ve doza bağımlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Mortensen ve Arukwe 2007). Bu bulgulardan farklı olarak çalışmamızda EE<sub>2</sub>'ye maruz bırakılan balıklarda hepatositlerin sitoplazmasında CYP1A immunboyanmasının konsantrasyon yükselişi ile birlikte arttığı ancak boyanmanın güçlü olmadığı gözlendi. Benzer olarak, Hasselberg ve ark. (2004), alkilfenol karışımına (C4-C7) ve 17 $\beta$  östradiole maruz bırakılan *Gadus morhua*'nın

erkek bireylerinde, hepatik CYP1A protein ifadesinin doza bağımlı olarak arttığını gözlemlemişlerdir. EE<sub>2</sub>'nin, benzo(a)piren (BaP)'e maruz bırakılan *Clarias gariepinus*'un solungaçlarında EROD aktivitesini, BaP ile antagonistik olarak, inhibe ettiği ve tek başına solungaç EROD aktivitesini iki kat arttırdığı belirlenmiş, bununla birlikte aynı etki karaciğerde gözlenmemiştir (Mdegela ve ark. 2006). Son ve ark. (2002) ise 17β-östradiol'ün fare ovaryum kanser hücre hattında TCDD ile uyarılan CYP1A protein ve mRNA ifadesini arttırdığını bildirmişlerdir. Balıklarda yapılan çalışmalarda, CYP1A enziminin uyarımı-



**Şekil 2.** NP'nin 10 µg/l (a), 60 µg/l (b) ve 200 µg/l (c) konsantrasyonlarına maruz bırakılan inci kefaline ait karaciğer kesitlerinde CYP1A immün boyaması. Kontrollere benzer olarak hepatositlerin sadece perinükleer alanında CYP1A immün reaksiyonu gözlenirken; sitoplazmik alanda gözlenmedi (inset bar: 10 µm).



**Şekil 3.** EE<sub>2</sub>'nin 1 ng/l (a), 10 ng/l (b) ve 100 ng/l (c) konsantrasyonlarına maruz bırakılan inci kefaline ait karaciğer kesitlerinde, hepatosit sitoplazmasında gözlenen CYP1A immun boyanması (inset bar: 10 µm).

nın uyarıcının dozuna, uyarım yoluna, türe, yaşa ve üreme siklusuna (Snowberger ve ark. 1991; Smolowitz ve ark. 1992; Sleiederink ve ark. 1994; Arukwe ve Goksöyr 1997; Van Veld ve ark. 1997; Anulacion ve ark. 1998) bağlı olarak farklılık gösterebildiği bildirilmiştir.

Dolayısıyla diğer türlerde EE<sub>2</sub>'nin CYP1A üzerine olan baskılayıcı etkisine rağmen, inci kefalinin hepatositlerinde CYP1A immunboyanmasının gözlenmesi, deney süresinin uzun olmasından kaynaklanabilir. Bu çalışmaya benzer olarak Madureira ve ark. (2012), farklı farmasötiklerin zebra balığı karaciğerinde CYP1A immunboyanmasını değiştirdiğini veya uyardığını bildirmişlerdir. Öte yandan, P450



izozimlerinin 17β-östradiol (Lee ve ark. 2003) ve EE<sub>2</sub>'nin (Wang ve ark. 2004) oksitativ metabolizasyonunu katalizleyebildikleri de rapor edilmiştir.

Sonuç olarak, EE<sub>2</sub>'ye 32 gün süre ile maruz bırakılan inci kefalinde, CYP1A'nın hepatositlerdeki varlığı immunohistokimyasal olarak belirlenmesine rağmen, NP'ye maruz kalan bireylerde böyle bir etki gözlenmemiştir. Bu bulgular zenoöstrojenlerin, CYP1A uyarımında, farklı etkilere sahip olduğunu göstermektedir. EE<sub>2</sub>'nin CYP1A immun boyanmasını uyarıcı etkisinin altında yatan nedenlerin aydınlatılması için de daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## Teşekkür

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

## Kaynaklar

- Ahel, M., Giger, W., Koch, M., (1994). Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment-I. Occurrence and Transformation in Sewage Treatment. *Water Research*, 28, 1131-1142.
- Anulacion, B.F., Myers M.S., Willis, M.L., Collier, T.K., (1998). Quantitation of CYP1A Expression in Two Flatfish Species Showing Different Prevalences of Contaminant-Induced Hepatic Disease. *Marine Environmental Research*, 46:7-11.
- Arellano, J.M., Ortiz, J.B., Luisa Gonzales de Canales, M., Sarasquete, (2001). Histopathological Alterations and Induction of Cytochrome P-450 1A in the Liver and Gills of the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Exposed to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *The Histochemical Journal*, 33, 663-674.
- Arukwe, A., Förlin, L., Goksöyr, A., (1997). Xenobiotic and Steroid Biotransformation Enzymes in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Liver Treated with an Estrogenic Compound, 4-Nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 2576-2583.
- Arukwe, A., Goksöyr, A., (1997). Changes in Three Hepatic Cytochrome P450 Subfamilies During a Reproductive Cycle in Turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Endocrinology*, 277, 313-325.
- Danulat, E., Selcuk, B. (1992). Life history and Environmental Conditions of the Anadromous *Chalcalburnus tarichi* (Cyprinidae) in the Highly Alkaline Lake Van, Eastern Anatolia, Turkey. *Archiv für Hydrobiologie*, 126,105–125.
- Fent, K., (2001). Fish Cell Lines as Versatile Tools in Ecotoxicology: Assessment of Cytotoxicity, Cytochrome P4501A Induction Potential and Estrogenic Activity of Chemicals and Environmental Samples. *Toxicology in Vitro*, 15, 477-488.
- Goksöyr, A., Förlin, L., (1992). The Cytochrome P-450 System in Fish, Aquatic Toxicology and Environmental Monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22, 287-312.
- Hasselberg, L., Meier, S., Svardal, A., Hegelund, T., Celander, M.C., (2004). Effects of Alkylphenols on CYP1A and CYP3A Expression in First Spawning Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology*, 67, 303-313.
- Husøy, A.-M., Myers, M.S., Goksöyr, A., 1996. Cellular Localization of Cytochrome P450 (CYP1A) Induction and Histology in Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) and

- European Flounder (*Platichthys flesus*) after Environmental Exposure to contaminants by caging in Sør fjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, 36, 53-74.
- Jobling, S., Sumpter, J.P., (1993). Detergent Components in Sewage Effluent are Weakly Oestrogenic to Fish: An in vitro Study Using Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27, 361-372.
- Kannan, K., Keith, T.L., Naylor, C.G., Staples, C.A., Snyder, S.A., Giesy, J.P., (2003). Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates in Fish, Sediment, and Water from the Kalamazoo River, Michigan. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 44:77-82.
- Kaptaner, B., Kankaya, E., Ünal, G., (2009). Effects of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol on Hepatosomatic Index, Plasma Vitellogenin Levels and Liver Glutathione-S-transferase Activity in Lake Van Fish (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811). *Fresenius Environmental Bulletin*, 18, 2366–2372.
- Kaptaner, B., Kankaya, E., Doğan, A., Çelik, İ. (2014). Histopathology and Oxidative Stress in the Liver of *Chalcalburnus tarichi* Living in Lake Van, Turkey. *Life Science Journal*, 11, 66–77.
- Kaptaner, B. (2015). Relation Between Increased oxidative stress and Histological Abnormalities in the Ovaries of *Alburnus tarichi* in Lake Van, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 702.
- Kaptaner B., Kankaya E., Dogan A., Durmuş A., (2016). Alterations of Histology and Antioxidant Defense System in the Testes of the Lake Van Fish (*Alburnus tarichi* GÜldenstädt, 1814). *Environmental Monitoring and Assessment*, 188, 474, 1–15.
- Labadie, P., Budzinski, H., (2006a). Alteration of Steroid Hormone Balance in Juvenile Turbot (*Psetta maxima*) Exposed to Nonylphenol, Bisphenol A, Tetrabromodiphenyl Ether 47, Diallylphthalate, Oil, and Oil Spiked with Alkylphenols. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 552-561.
- Labadie, P., Budzinski, H., (2006b). Alteration of Steroid Hormone Profile in Juvenile Turbot (*Psetta maxima*) as a Consequence of Short-Term Exposure to 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. *Chemosphere*, 64, 1274-1286.
- Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersen, M., Berg, A.H., Olsson, P.-E., Förlin, L., (1999). Ethinylestradiol-an Undesired Fish Contraceptive?. *Aquatic Toxicology*, 45, 91-97.
- Lee, P.C., Patra, S.C., Stelloh, C.T., Lee, W., Struve, M., (1996). Interaction of Nonylphenol and Hepatic CYP1A in Rats. *Biochemical Pharmacology*, 52, 885-889.
- Lester, S.M., Braunbeck, T.A., Teh, S.J., Stegeman, J.J., Miller, M.R., Hinton, D.E., (1993). Hepatic Cellular Distribution of Cytochrome P-450 IA1 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): An Immunohisto- and Cytochemical Study. *Cancer Research*, 53, 3700-3706.
- Malmström, C.M., Koponen, L., Seppa-Lindstrom, P., Bylund, G., (2004). Induction and Localization of Hepatic CYP4501A in Flounder and Rainbow Torut Exposed to Benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58, 365-372.
- Mdegela, R.H., Braathen, M., Correia, D., Mosha, R.D., Skaare, J.U., Sandvik, M., (2006). Influence of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol on CYP1A, GST and Biliary FACs Responses in Male African Shaptooth Catfish (*Clarias gariepinus*) Exposed to Waterborne Benzo[a]Pyrene. *Ecotoxicology*, 15, 629-637.

- Madureira, T. V., Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Rodrigues, I., Monteiro, R. A., Rocha, E., (2012). The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): evaluation of impacts on fish liver, by histopathology, stereology, vitellogenin and CYP1A immunohistochemistry, after subacute exposures of the zebrafish model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(1), 34-45.
- Mortensen, A.S., Arukwe, A., (2007). Effects of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol on Hormonal Responses and Xenobiotic Biotransformation System of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, 85, 113-123.
- Mortensen, A.S., Tølfesen, C.C., Arukwe, A., (2006). Gene Expression Patterns in Estrogen (Nonylphenol) and Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists (PCB-77) Interaction Using Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Primary Hepatocyte Culture. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 69, 1-19.
- Navas, J.M., Segner, H., (2000). Modulation of 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity by Estradiol and Octylphenol. *Marine Environmental Research*, 50, 157-162.
- Navas, J.M., Segner, H., (2001). Estrogen-Mediated Suppression of Cytochrome P4501A (CYP1A) Expression in Rainbow Trout Hepatocytes: Role of Estrogen Receptor. *Chemico-Biological Interactions*, 138, 285-298.
- Sarasquete, C., Segner, H., Cytochrome P4501A (CYP1A) in Teleostean Fishes 2000. A Review of Immunohistochemical Studies. *The Science of the Total Environment*, 247, 313-332.
- Sleiderink, H. M., Oostingh, I., Goksøyr, A., Boon, J. P., (1995). Sensitivity of Cytochrome P450 1A Induction in Dab (*Limanda limanda*) of Different Age and Sex as a Biomarker for Environmental Contaminants in the Southern North Sea. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28, 423-430.
- Smolowitz, R.M., Moore, M.J., Stegeman J.J., (1989). Cellular Distribution of Cytochrome P-450E in Winter Flounder Liver with Degenerative and Neoplastic Disease. *Marine Environmental Research*, 28, 441-446.
- Smolowitz, R.M., Schultz, M.E., Stegeman, J.J., 1992. Cytochrome P4501A Induction in Tissues, Including Olfactory Epithelium, of Topminnows (*Poeciliopsis* spp.) by Waterborne benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*, 13, 2395-2402.
- Snowberger, E.A., Woodin, B.R., Stegeman, J.J. (1991). Sex Differences in Hepatic Monooxygenases in Winter Flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and Scup (*Stenotomus chrysops*) and Regulation of P450 Forms by Estradiol. *Journal of Experimental Zoology*, 259, 330-342.
- Solé, M., Porte, C., Barceló, D., (2000). Vitellogenin Induction and Other Biochemical Responses in Carp, *Cyprinus carpio*, After Experimental Injection with 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38, 494-500.
- Son, D.-S., Roby, K.F., Rozman, K.K., Terranova, P.F., (2002). Estradiol Enhances and Estriol Inhibits the Expression of CYP1A1 Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in a Mouse Ovarian Cancer Cell Line. *Toxicology*, 176, 229-243.
- Sturve, J., Hasselberg, L., Fälth, H., Celander, M., Förlin, L., (2006). Effects of North Sea Oil and Alkylphenols on Biomarker Responses in Juvenile Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology*, 78, 73-78.

- Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., Servos, M., (1999). Behavior and Occurrence of Estrogens in Municipal Sewage Treatment Plants. I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment*, 225, 81-90.
- Ünal, G., Türkoğlu, V., Oğuz, A. R., Kaptaner, B. (2007). Gonadal Histology and Some Biochemical Characteristics of *Chalcalburnus tarichi* (Pallas, 1811) Having Abnormal Gonads. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33, 153–165.
- Unal, G., Marquez, E. C., Feld, M., Stavropoulos, P., Callard, I.P., (2014). Isolation of Estrogen Receptor Subtypes and Vitellogenin Genes: Expression in Female *Chalcalburnus tarichi*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 172–173, 67–73.
- Vaccaro, E., Meucci, V., Intorre, L., Soldani, G., Di Bello, D., Longo, V., Gervasi, P.G., Pretti, C., (2005). Effects of 17 $\beta$ -estradiol, 4-Nonylphenol and PCB 126 on the Estrogenic Activity and Phase 1 and 2 Biotransformation Enzymes in Male Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology*, 75, 293-305.
- Van Den Belt, K., Wester, P.W., Van Der Ven, L.T.M., Verheyen, R., Witters, H., (2002). Effects of Ethinylestradiol on the Reproductive Physiology in Zebrafish (*Danio rerio*): Time Dependency and Reversibility. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 767-775.
- Van Veld, P.A., Vogelbein, W.K., Cochran, M.K., Goksøyr, A., Stegeman, J.J., (1997). Route-Specific Cellular Expression of Cytochrome P4501A (CYP1A) in Fish (*Fundulus heteroclitus*) Following Exposure to Aqueous and Dietary Benzo[a]pyrene. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 142, 348-359.
- Wang, B., Sanchez, R.I., Franklin, R.B., Evans, D.C., Huskey, S.-E.W., (2004). The Involvement of CYP3A4 and CYP2C9 in the Metabolism of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. *Drug Metabolism and Disposition*, 32, 1209-1212.
- Weber, L.P., Kiparissis, Y., Hwang, G.S., Nimi, A.J., Janz., D.M., Metcalfe., C.D., 2002. Increased Cellular Apoptosis after Chronic Aqueous Exposure to Nonylphenol and Quercetin in Adult Medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131, 51-59.