

**NONİLFENOLÜN MALİGNANT MELANOMA
HÜCRESİ G-361 ÜZERİNE ETKİSİ**

Esra BİLİCİ
Doktora Tezi
Danışman: Prof. Dr Cevdet UĞUZ
Tez No: 2022-010
Afyonkarahisar

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MEDİKAL BİYOLOJİSİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**NONİLFENOLÜN MALİGNANT MELANOMA HÜCRESİ G-361
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Hazırlayan
Esra BİLİCİ**

**Danışman
Prof. Dr. Cevdet UĞUZ**

**2. Danışman
Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ**

Tez No: 2022-010

AFYONKARAHİSAR

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: "19.SAĞ.BİL.13"**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veterinerlik Medikal Biyolojisi ve Genetik Anabilim Dalı'nda** Esra BİLİCİ tarafından hazırlanan “Nonilfenolün Malignant Melanoma Hücresi G-361 Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca GG/AA/YYYY tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği / oy çokluğu** ile **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Unvan, Ad, Soyad

İmza

Üye

Unvan, Ad, Soyad

İmza

Üye

Unvan, Ad, Soyad

İmza

Üye

Unvan, Ad, Soyad

İmza

Üye

Unvan, Ad, Soyad

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

..... / / tarih ve

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

...../...../.....

İmza

Esra BİLİCİ

ÖZET

NONİLFENOLÜN MALİGNANT MELANOMA HÜCRESİ G-361 ÜZERİNE ETKİSİ

Nonilfenol en çok kullanılan ve maruz kaldığımız endokrin bozucular arasında yer alır. Endokrin bozucuların kanserojen etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen antikanser etkilerini kapsayan çalışma sayısı azdır. Bu amaçla Nonilfenol'ün sitotoksik ve apoptotik etkileri insan malign melanoma (G-361) hücre hattında araştırılmıştır. Sitotoksitite ölçümü çevresel doz aralığında çalışılmıştır ve 48 saatlik maruziyet süresi değerlendirilmiştir. Sitotoksitenin doza bağımlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Apoptoz, gen düzeyinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) kullanılarak değerlendirilmiştir. 48 saatlik maruziyet sonucunda; apoptotik genler olan P53, Bax ve Kaspaz-3 gen düzeylerinde artma ve P21 ile antiapoptotik gen olan Bcl-2 nin gen düzeylerinde azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak belirlenen dozlarda ve belirlenen maruziyet süresi sonunda Nonilfenolün G-361 hücre hattında apoptotik etki gösterdiği gözlenmiştir. Çalışma sonrası elde edilen bulgular, Nonilfenol'ün hücre içi yolak ile apoptozu indüklediğini ve gen düzeyinde etkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: G-361, Gen Ekspresyonu, Melanoma, MTT, Nonilfenol

SUMMARY

EFFECT OF NONYLPHENOL ON MALIGNANT MELANOMA CELL G-361

Nonylphenol is among the most widely used and exposed endocrine disruptors. Although there are many studies on the carcinogenic effects of endocrine disruptors, there are few studies covering their anticancer effects. For this purpose, the cytotoxic and apoptotic effects of Nonylphenol were investigated in human malignant melanoma (G-361) cell line. Cytotoxicity measurement was studied in the environmental dose range and exposure time of 48 hours was evaluated. It was observed that the cytotoxicity decreased in a dose-dependent manner. Apoptosis was assessed using real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) at the gene level. As a result of 48 hours of exposure; An increase in the levels of the apoptotic genes P53, Bax and Caspase-3, and a decrease in the gene levels of P21 and the antiapoptotic gene BcL-2 were observed. As a result, it was observed that Nonylphenol had an apoptotic effect on the G-361 cell line at the determined doses and at the end of the determined exposure time. Findings obtained after the study show that Nonylphenol induces apoptosis with the intracellular pathway and is effective at the gene level.

Keywords: G-361, Gene Expression, Melanoma, MTT, Nonylphenol

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, akademik yaşamım boyunca örnek alacağım çok değerli danışman hocam *Prof. Dr. Cevdet Uğuz'a* Kendisinden çok şey öğrendiğim kıymetli ikinci danışman hocam *Prof. Dr. Korhan Altunbaş'a* Kıymetli hocalarım *Prof. Dr. Metin Erdoğan* ve *Prof. Dr. Mine Dosay'a*,

Hem eğitim sürecimde hem de tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren *Dr. Öğr. Üyesi Faruk Lenger'e* Beni akademik hayata teşvik eden *Dr. Öğr. Üyesi Özay Güleş'e* Bu süreçte desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen saygı değer *Prof. Dr Sefa Çelik'e*,

Bu çalışmayı '19.SAĞ.BİL.13' proje numarasıyla destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Varlıklarıyla bana her zaman güç veren, her koşulda yanımda olan, başarılarımın en büyük mimarları sevgili *annem, babam ve kardeşlerime* sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Esra BİLİCİ
Afyonkarahisar
2022

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	i
SUMMARY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmada Kullanılan Nonilfenolün Genel Özellikleri.....	1
1.2. Nonilfenol'ün Toksisitesi	2
1.3. Hücre Ölümü (Apoptoz)	5
1.4. NF-Apoptoz İlişkisi	6
1.5. NF'nin Gen Ekspresyon Düzeyi Belirlemede Kullanımı	9
1.5.1. NF'nin Apoptotik Etkisini Belirlemek İçin Çalışılan Genler	10
1.5.1.1. Bcl-2/Bax Geni	10
1.5.1.2. Kaspazlar	12
1.5.1.3. P53 Geni	14
1.5.1.4. P21	16
1.5.1.5. β -aktin.....	18
1.6. NF'nin Gen Ekspresyon Düzeyi Üzerine Etkisinin Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Tekniği Kullanılarak Tespiti.....	18
1.7. Kanser Hücrelerinin İlerlemesinde NF'nin Rolü.....	19
1.8. Melanom	21
1.8.1. Melanomda Östrojen ve Östrojen Reseptörlerinin Rolü	22
1.9. Amaç ve Hedefler	24
2. MATERYAL ve METOT	25
2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller	25
2.1.1. Hücreler.....	25

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Ekipmanlar.....	26
2.1.3. Deney Düzenegi	27
2.1.4. Hücre Kültürü.....	28
2.1.4.1. Hücre Kültür Medyumu.....	28
2.1.4.2. Hücrelerin İnkübe Edilmesi.....	28
2.1.4.3. Hücrelerin Pasajlanması	29
2.1.4.4. Hücre Sayılarının Hesaplanması	31
2.1.5. Deney Gruplarında Kullanılan Kimyasalın Dozları ve Uygulanmaları	32
2.1.6. Sitotoksosite Analizi (MTT Yöntemi)	33
2.1.6.1. MTT Çalışma Solusyonu.....	34
2.1.6.2. MTT Stok Solusyon.....	35
2.1.6.3. Hücre Canlılığının Hesabı	35
2.1.7. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve RT-PCR Analizleri.....	35
2.1.7.1. RNA İzolasyonu	36
2.1.7.2. cDNA Sentezi	37
2.1.7.3. RT-PCR	38
2.1.8. İstatistiksel Analiz.....	40
3. BULGULAR	40
3.1. NF'nin G-361 Hücrelerinde Sitotoksosite Etkisi.....	40
3.2. Farklı Dozlarda Uygulanan Nonilfenolün 48saat Sonrasındaki Hücre Morfolojileri.....	42
3.3. G-361 Hücre Hattına Uygulanan Nonilfenolün Farklı Dozlarının Kaspaz 3 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi.....	44
3.4. G-361 Hücre Hattına Uygulanan Nonilfenolün Farklı Dozlarının P21 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi.....	45
3.5. G-361 Hücre Hattına Uygulanan Nonilfenolün Farklı Dozlarının Bax Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi.....	46
3.6. G-361 Hücre Hattına Uygulanan Nonilfenolün Farklı Dozlarının Bcl-2 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi.....	47
3.6. G-361 Hücre Hattına Uygulanan Nonilfenolün Farklı Dozlarının P53 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi.....	48
4. TARTIŞMA.....	51

5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	57
6. KAYNAKLAR.....	58
7. EKLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
7.1. Etik Onayı.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
8. ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bax:	Bcl-2 İlişkili X Protein
Bcl-2:	B Hücreli Lenfoma-2
cDNA:	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CO₂:	Karbondioksit
CDNKI:	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
CSF:	Koloni Uyarıcı Faktör
DISC:	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimetilsülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
EBK:	Endokrin Bozucu Kimyasal
EED:	Çevresel Endokrin Bozucu
FBS:	Fetal Sığır Serumu
IGF:	İnsülin Benzeri Büyüme
IL-2:	İnterleukin-2
MAPK:	Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinazlar
MM:	Malign Melanom
MTT:	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum bromür
NF:	Nonilfenol
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA:	Ribonükleik Asit
RT-PCR:	Reverse Trankripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TNF:	Tümör Nekroz Faktör
UV:	Ultra Viyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. NF'nin kimyasal yapısı	1
Şekil 1.2. Memelilerin apoptoz yolağı	6

ÇİZELGELER DİZİNİ

	SAYFA
Çizelge 2.1. G-361 Hücre Hattının Özellikleri.....	25
Çizelge 2.2. Çalışmada Kullanılan Cihazların ve Ekipmanların Markalarının Listesi ..	26
Çizelge 2.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	27
Çizelge 2.4. Deney grupları ve deney düzeni.....	28
Çizelge 2.5. Çalışmada Kullanılan Primerler	36
Çizelge 2.6. cDNA Sentezi İçin Kullanılan Kimyasallar	37
Çizelge 2.7. cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları	38
Çizelge 2.8. RT-PCR İçin Kullanılan Mix Bilgileri.....	39
Çizelge 2.9. RT-PCR Sentez Koşulları	39
Çizelge 3.1. MTT Analiz Sonuçları.....	41
Çizelge 3.2. Gen Ekspresyonu Analiz Sonuçları.....	50

RESİMLER DİZİNİ

	SAYFA
Resim 2.1. Sınıf II Biyogüvenlik Kabini.....	29
Resim 2.2. Santrifüj Sonrası Süpernatant ve Hücre Peleti İçeren Falcon.....	30
Resim 2.3. CO ₂ li inkübatör	30
Resim 2.4. G-361 Hücrelerinin Ekildiği Flask.....	31
Resim 2.5. İverted Mikroskop	32
Resim 2.6. Neubauer Lamındaki Hücrelerin İverted Mikroskopta Görünümü. Parlak ve boya almayan hücreler canlı hücreler olarak kabul edildi ve bu hücreler sayıldı.....	32
Resim 2.7. Formazan kristallerinin DMSO ile çözüldükten sonraki görüntüsü.....	34
Resim 2.8. RNA İzolasyonu Aşamasında Ependorftaki Faz Değişimi	37
Resim 3.1. Kontrol Grubu 48 Saat Sonrası Hücre Morfolojileri. Bar: (A) 500 µm, (B) 100 µm, (C) 50 µm.	42
Resim 3.2. Solvent Grubu 48 Saat Sonrası Hücre Morfolojileri. Bar: (A) 500 µm, (B) 100 µm, (C) 50 µm.	42
Resim 3.3. NF 0,1µg/ml grubu 48 Saat Sonrası Hücre Morfolojileri. Bar: (A) 500 µm, (B) 100 µm, (C) 50 µm.	43
Resim 3.4. NF 1µg/ml grubu 48 Saat Sonrası Hücre Morfolojileri. Bar: (A) 500 µm, (B) 100 µm, (C) 50 µm.	43
Resim 3.5. NF 10µg/ml grubu 48 Saat Sonrası Hücre Morfolojileri. Bar: (A) 500 µm, (B) 100 µm, (C) 50 µm.	43
Resim 3.6. NF 100µg/ml grubu 48 Saat Sonrası Hücre Morfolojileri. Bar: (A) 500 µm, (B) 100 µm, (C) 50 µm.	44

GRAFİKLER DİZİNİ

SAYFA

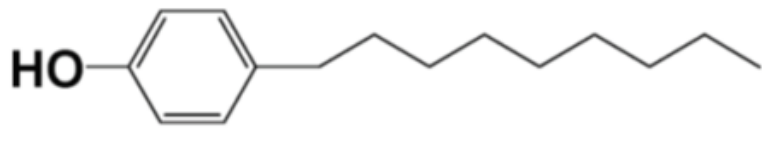
Grafik 3.1. NF'nin çeşitli konsantrasyonlarından elde edilen hücre canlılığı düzeyleri.	40
Grafik 3.2. Nonilfenol % 50 İnhibisyon Dozu (IC50) Belirleme Grafiği	41
Grafik 3.3. G-361 Hücre Hattına Nonilfenolün Çeşitli Konsantrasyon'Uygulamaları Sonrası'48 Saat'Süresince İnkübe'Edilen Hücrelerin'Kaspaz 3 Gen'Ekspresyon Seviyeleri	45
Grafik 3.4. Kaspaz3 Amplikon Eğrisi	45
Grafik 3.5. G-361 Hücre Hattına Nonilfenolün Çeşitli Konsantrasyon Uygulamaları Sonrası 48 Saat Süresince İnkübe Edilen Hücrelerin P21 Gen Ekspresyon Seviyeleri	46
Grafik 3.6. P21 Amplikon Eğrisi	46
Grafik 3.7. G-361 Hücre Hattına Nonilfenolün Çeşitli Konsantrasyon Uygulamaları Sonrası 48 Saat Süresince İnkübe Edilen Hücrelerin Bax Gen Ekspresyon Seviyeleri	47
Grafik 3.8. Bax Amplikon Eğrisi	47
Grafik 3.9. G-361 Hücre Hattına Nonilfenolün Çeşitli Konsantrasyon Uygulamaları Sonrası 48 Saat Süresince İnkübe Edilen Hücrelerin Bcl-2 Gen Ekspresyon Seviyeleri	48
Grafik 3.10. Bcl-2 Amplikon Eğrisi	48
Grafik 3.11. G-361 Hücre Hattına Nonilfenolün Çeşitli Konsantrasyon Uygulamaları Sonrası 48 Saat Süresince İnkübe Edilen Hücrelerin P53 Gen Ekspresyon Seviyeleri	49
Grafik 3.12. P53 Amplikon Eğrisi	49
Grafik 3.13. Actb Amplicon Eğrisi	50

1. GİRİŞ

1.1. Çalışmada Kullanılan Nonilfenolün Genel Özellikleri

Endokrin bozucu kimyasallar (EBK) hayvanlarda ve insanlarda fizyolojinin sürdürülebilmesi için gerekli olan hormonal dengeyi bozmaları nedeniyle sağlık üzerine olumsuz etkilere yol açmaktadırlar (Noorimotlagh vd., 2018).

Alkilfenollerin ve nonilfenol etoksilat bozunmasının son ürünü olan Nonilfenol (NF), bir fenol halkasına bağlı bir nonil grubuna sahip kimyasal bileşiktir (Noorimotlagh vd., 2018). Maddenin özellikleri nonil grubundaki dallanma derecesine göre değişiklik gösterebilmektedir (Buitrón vd., 2015).



Şekil 1.1. NF'nin kimyasal yapısı (Sharma vd., 2009).

NF; su, hava, sediment ve toprakta tespit edilebilir derişimlerde bulunabilen bir kirleticidir ve çevredeki konsantrasyonları ve yarılanma ömrü buldukları ortamlara göre farklılık gösterebilmektedir (Zhang vd., 1997).

Hava, toprak ve insanların günlük olarak tükettiği kimyasallarda bulunmaktadır (Zhang vd., 2015). İyi emülsifikasyon özelliği dolayısıyla günlük üretimde ve yaşamda yaygın olarak kullanılmaktadır (Brunelli, 2018). Yer altı ve içme suyu da dâhil olmak üzere ortamdaki neredeyse tüm su kaynaklarında bulunmaktadır ve insan sağlığına büyük zarar verebilmektedir (Lee vd., 1999; Yang vd., 2020). Ayrıca sebze, süt ve et gibi kontamine gıdalar yoluyla besin zincirine de girdiği belirtilmektedir (Jin vd., 2014).

İnsanlar deri emilimi, yutma veya soluma yoluyla NF'ye maruz kalabilir ve araştırmalar, gıda alımının insanda NF'ye maruz kalmanın birincil yolu haline geldiğini göstermektedir (Careghini vd., 2015; Lee vd., 2015). EBK'lar ABD de çevre koruma ajansı tarafından şu şekilde tanımlanır “vücutta bulunan, üreme ve gelişim sürecinden

sorumlu olan, hormonların sentezine, salgılanmasına, taşınmasına veya ortadan kaldırılmasına müdahale eden dışsal bir ajandır” (Diamanti-Kandarakis vd., 2009).

Çevresel östrojenler su ortamında yaygın olarak bulunmaktadır (Wright ve Volz, 2009). NF'nin lipofilik doğası gereği hayvan dokularında birikebilmektedir (Noorimotlagh vd., 2018). İnsanlar ve suda yaşayan yaban hayatı türleri için büyük tehlike oluşturmaktadır (Tan vd., 2003; Cardinali vd., 2004; Yao vd., 2005; El-Dakdoky ve Helal, 2007; Wang vd., 2015).

NF'ler, biyoakümülyasyon, düşük biyoyararlanım özelliği, kanserojenik, teratojenik ve mutajenik etkilerinden dolayı önem arz eden bileşiklerdir (Krupi vd., 2014) ve insan sağlığı açısından diyabet, obezite, kardiyovasküler bozukluklar ve karaciğer gibi organlarda toksik etkilere neden olabilmektedir (Kazemi vd., 2016). NF, aynı zamanda östrojen eylemlerini taklit ederek östrojen reseptörü ile etkileşime girip cinsel davranış ve üreme sistemini etkileyebilmektedir (Christiansen vd., 1998).

1.2. Nonilfenol'ün Toksisitesi

NF, çeşitli organizmalardaki hormonların normal işleyişine müdahale edebilmektedir (Puy vd., 2014). Bu nedenle NF ile ilgili toksikolojik araştırmalar son yıllarda oldukça artmıştır. Çevre ve insan sağlığı üzerinde belirlenen muhtemel toksik etkilerinden dolayı, NF ve türevlerinin üretimi ve kullanımı birçok ülke tarafından yasaklanmış veya kısıtlanmıştır (USEPA 2005). 2005 yılında USEPA tarafından bildirilen su kalitesi kriterlerine göre, limit NF konsantrasyonu tatlı suda <6,6 µg/L, tuzlu suda <1,7 µg/L olarak verilmektedir (USEPA 2005).

NF'ler canlılarda iskelet sisteminde düşük konsantrasyonlarda hasara yol açmaktadır, yüksek konsantrasyonlarda embriyonun gelişimini baskılayabilmektedir (Jiang vd., 2019). Bitkilerde ise kök, endoplazmik retikulum ve kloroplast yapısını değiştirebilmektedir (Buitrón vd., 2015). Ek olarak, kimyasallara maruz kalmanın sağlık riski değerlendirmeleri, tek tek maddeler üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen verilere dayanmaktadır (Phillips ve Tahaichitr, 2008). Yapılan tüm gözlemler, NF'nin

farklı hücre ile organ türlerine etki etme becerisini, 0.01 mg/gün gibi düşük konsantrasyonlarda çeşitli etki türleri ile gösterdiğini ortaya çıkarmaktadır (Colerangle vd., 1996).

NF'nin insan vücudundaki yarı ömrü kısa olmasına rağmen, konsantrasyon seviyeleri yiyecek alımıyla artmaktadır (Kazemi vd., 2018). Yetişkin Amerikalıların idrar örneklerinde NF konsantrasyonu 0,1 ng / ml iken, Çinli insanların 0,5 µg / kg'den fazla çıkmıştır (Litwa vd., 2016).

17β-Östradiol ve NF kimyasal yapıları açısından çok benzerlik göstermektedir (Lyons vd., 2014). Bu nedenle NF bu dişilik hormonunun bütün fonksiyonlarını taklit etme yeteneğine sahiptir. NF diğer BFA gibi östrojenik kimyasallardan daha güçlü bir östrojenik aktiviteye sahiptir. NF'nin endojen östrojenlere yapısal olarak benzer olması, üreme sisteminin işleyişine müdahale etme potansiyeli vermektedir (Jie vd., 2010). Bilindiği üzere testislerin NF'ye maruz kalması, testis yapısının bozulmasına ve testis boyutunda ve testosteron seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır (Park vd., 2021). Mevcut in vitro ve in vivo çalışmalar NF'nin moleküler yapısının antiandrojenik olduğu, yetişkinlik veya erken çocukluk döneminde bu EBK'ya maruz kalmanın, depresyon ve kaygı benzeri davranışlar ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Lu vd., 2007; Gong vd., 2009; Aly vd., 2012; Jubendradass vd., 2012; Lagos-Cabr  ve Moreno, 2012).

Çevresel östrojeniklere maruz kalmak, erkeklerin dişileştirilmesi, cinsiyet oranlarının değişmesi, doğurganlığın azalması, diğer gonadal ve üreme anomalilerine sebebiyet verebilmektedir (Yang vd., 2020). Bununla birlikte bağışıklık sistemi hastalıkları, kalp rahatsızlıkları veya tümörlerin gelişmesi gibi ciddi sonuçlar doğurabilmektedir (Kavlock vd., 1996; Mills ve Chichester, 2005; Sumpter, 2005).

NF'nin bağışıklık ve sindirim sistemleri üzerindeki olumsuz etkileri araştırılmıştır (Ahmed, 2000; Wada vd., 2007). NF uygulamasının merkezi sinir sistemi fonksiyonu üzerindeki olumsuz etkisi incelenmiştir. Yayınlanan rapora göre NF seviyesinin, beyin gibi yağ bakımından zengin bazı organlarda daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Geens vd., 2012).

Bugüne kadar, balıklar üzerine yapılan toksikolojik araştırmalar, esas olarak üreme üzerindeki etkilerine odaklanmışken, olası immün-endokrin etkileşimlerine çok az ilgi gösterilmiştir (Milla vd., 2011). Balıkların bağışıklık sistemi üzerindeki endojen hormonların etkisi hakkında çok az inceleme yapılmıştır, ancak şimdiye kadar EBK'lar, esas olarak östrojenik, androjenik ve tiroidal aktivitelere sahip bileşikler araştırılmıştır (Rehberger vd., 2017). EBK'lar seçilen endokrin yolların uygunsuz inaktivasyonu veya aktivasyonu nedeniyle normal bağışıklık fonksiyonunu bozabilmektedir ve organizmaların hastalığa duyarlılığını değiştirebilmektedir (Sayed ve İsmail, 2017).

NF maruziyeti anksiyete ile ilgili davranışlarla da ilişkilendirilmiştir (Lee vd., 1999; Dobrzynska, 2014). Bunun için bir model olarak sıçan kullanılmış ve NF çevresel dozlarına (0,001; 0,1; 1, 10 ve 100 µg NF/ml) 30 gün süreyle maruz bırakılmışlardır (Zemheri ve Uğuz, 2018). Sıçanların nörodavranışları çeşitli yöntemlerle araştırılmıştır ve anksiyete ile ilgili davranışlar gözlemlenmiştir (Yang vd., 2020).

Son zamanlarda, NF'ye maruz kalan fetüs ve çocukların merkezi sinir sistemleri üzerindeki etkilerinin korkutucu boyutlara ulaştığı bildirilmektedir (Ferguson vd., 2000). Transplental absorpsiyon nedeniyle veya anne sütü aracılığıyla, NF'e günlük maruz kalan fetüslerin bebeklerin ve çocukların potansiyel olarak risk altında olduğu belirtilmektedir (Siyao vd., 2019).

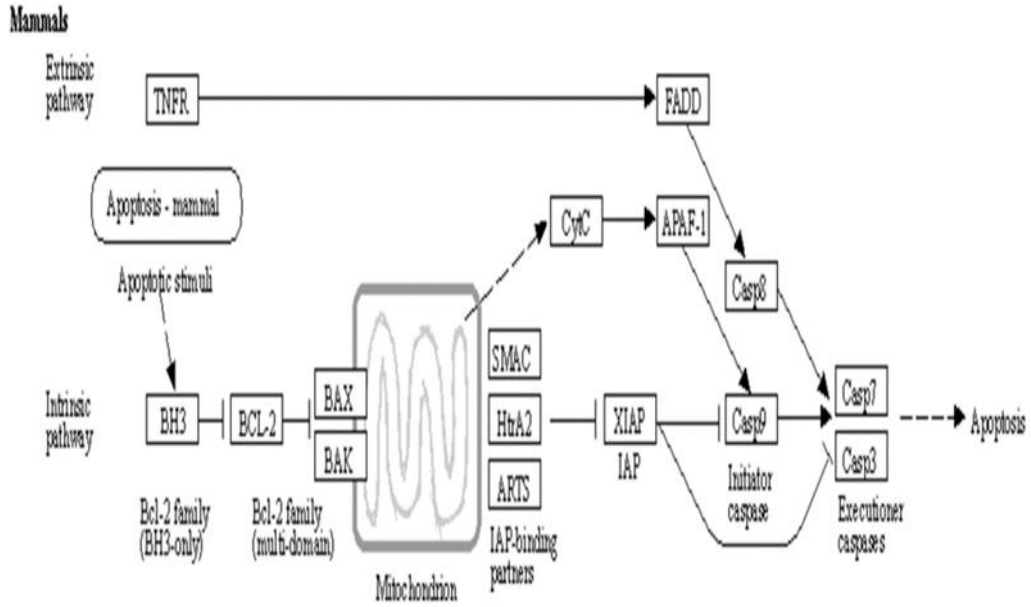
EBK'lar, insan ve vahşi yaşam üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle geniş çapta çalışılmaktadır (Munoz vd., 2018). BPA veya NF'ye maruz kalmanın, hücre ölümü, hormonal düzensizlik ve kanser başlangıcı ile ilgili olduğu önceki yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Hui vd., 2018). NF'nin, prostat ve yumurtalık kanseri hücre dizilerinde apoptozu indükler (Patino vd., 2018). Bu iki organ da hormon duyarlı organdır. Endokrin bozucu bir maddenin bunlar üzerinde etkili olması muhtemeldir. BPA ve NF'nin, biri apoptoz olan farklı hücre tepkilerde birleşebilen farklı hücre içi sinyal yollarını aktive ederek apoptozu indükleyebileceğini göstermektedir (Carmona vd., 2018). Bu sonuçlar, bu bileşiklerin kanser hücre dizilerinde hücre apoptozunu indükleme kapasitesini doğrular nitelikte olduğunu göstermektedir.

1.3. Hücre Ölümü (Apoptoz)

Apoptoz, vücudun dönüştürülmüş ve dolayısıyla potansiyel olarak kanserli hücreleri ortadan kaldırmaya çalıştığı ana hücre ölüm mekanizmasıdır (Guttà vd., 2020). Dışsal veya içsel sinyaller ile tetiklenebilen, fizyolojik ya da programlanmış hücre ölümünün oldukça korunmuş bir şeklidir. Çok hücreli organizmalardaki eski, aşırı veya işlevsiz hücreleri ortadan kaldırarak homeostazın korunmasında temel bir rol oynamaktadır (Kerr vd., 1972). Apoptozun hatalı düzenlenmesi, kanserin ayırt edici özelliklerinden birisidir (Hanahan ve Weinberg, 2011; Favaloro vd., 2012). Kanser hücreleri, apoptozu indüklemesi gereken genomik instabilite veya onkogen aktivasyonu gibi fenotipler sergilemektedir (Letai, 2008).

Apoptozun moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Yao vd., 2020). İntihar programı, hücrelerin genetik olarak belleklerinde vardır, oksidatif stres, patofizyolojik koşullar ve çeşitli sinyallerle aktif hale gelmektedir. (Hampton ve Orrenius, 1998). Apoptozis başlangıcı genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle gerçekleşmektedir (Erdoğan, 2003). Bir uyaran sonucu sekonder olarak gelişebilen apoptozis, önceden hazır olan hücrelerde primer olarak başlatılabilmektedir. Hücre dışı uyaranlar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), nöron büyüme faktörü (NGF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) interleukin 2 gibi maddeler yer almaktadır (Kaminska vd., 2016). Ortamda azalmasında ilaçlar, glukokortikoidler, çeşitli antijenler ile radyasyon önemli rol oynar (Gürbilek vd., 2004), Mevcut kemoterapik ilaçlarının çoğu apoptozu tetikleyerek kanser hücresi ölümüne neden olmaktadır (Öktem, 2001). Kanser iyi bilinen özelliği, pro ve antiapoptotik genlerin düzensizliği yoluyla apoptozdan kaçınmasıdır (Kiraz vd., 2016).

APOPTOSIS - MULTIPLE SPECIES



Şekil 1.2. Memelilerin apoptoz yolağı (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map04215 erişim tarihi: 29.01.2021).

Antiapoptotik ve proapoptotik proteinler arasındaki denge ile apoptoz düzenlenmektedir. Organizmada apoptozu uyaran birden fazla gen bulunmaktadır; Bcl-2, Bax, P53, P21 bunlardan bir kaç tanesidir (Öktem, 2001). Apoptoz, Bcl-2 ailesi üyeleri olarak bilinen apoptozla ilgili proteinler ve kaspaz aktiviteleri ile düzenlenmektedir (Rossen vd., 1998; Delehedde vd., 1999). Bax proteini, Bcl-2 ile yüksek oranda yapısal benzerlik gösterse de, proapoptotik aktivite göstermektedir (Tilli vd., 2002). Tümör hücrelerinde Bax protein seviyesi hücrenin ölmesini ya da yaşamasını belirlemektedir (Tilli vd., 2002). Kanser hücreleri, pro-apoptotik yanıtları ve P53 gibi düzenleyicileri baskılayarak ve Bcl-2 (Giarnieri vd., 2000; Zanotti vd., 2003; Protrka vd., 2010) gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu ve aktivitesini artırarak apoptozdan büyük ölçüde kurtulmaktadır (Jha vd., 2016).

1.4. NF-Apoptoz İlişkisi

NF, genel olarak dışı üreme toksisitesine neden olduğu kabul edilen bir tür çevresel endokrin bozucudur, ancak temel mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Liu vd.,

2020). Yapılan bir in vitro çalışmada granulosa hücreleri (GC) 24 saat boyunca 0-70 µM NF ile muamele edilmiş ve GC lerin hücre canlılığında önemli ölçüde azalma görülmüştür ve hücre apoptozisinde artış olmuştur (Di vd., 2018). Ayrıca NF, otofajiyi ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini önemli ölçüde indüklemiştir. NF'nin G2/M fazında hücre döngüsü durması yoluyla hücre canlılığını azaltarak sitotoksik etkiye neden olabileceğini gösteren raporlar olmasına rağmen, NF'nin GC proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkisinin G2/M faz bloğundan kaynaklanıp kaynaklanmadığı hala belirsizdir (Kudo vd., 2004; Qi vd., 2013).

NF maruziyeti çeşitli hastalıklarla da ilişkilendirilir, bu kimyasalın üreme, bağışıklık, endokrin, merkezi sinir sistemleri (CNS), insanlarda ve hayvanlarda kanser üzerindeki spesifik etkileri geniş çapta ilgi görmektedir (Huang vd., 2019). Düşük dozlarda bile NF, bağırsak bariyerine ve kan beyin bariyerine (KBB) nüfuz eder ve ardından birikir (Rastgar vd., 2019). NF'ye çevresel maruziyet, insan kanserinin gelişmesine katkıda bulunur (Davis vd.,1993; Skakkebaek vd., 1998). Endokrin ile ilgili hastalıkların insidansını artırır, kardiyovasküler ve bağışıklık sistemlerini ve beyin, kemik, böbrek gibi dokuları etkileyebilir, karaciğer ve erkeklerin feminizasyonuna neden olabilir (Colditz, 1993).

Kısırlık gibi üreme sağlığı sorununa neden olan NF, sıçanlarda ciddi testis disfonksiyonuna yol açar ve sertoli hücrelerinde oksidatif stres yoluyla hücre ölümünü indükler (Park vd., 2020). Başka bir çalışmada, yüksek dozlarda NF(60 mg/kg), oksidatif stresle ilişkili p53-Bcl-2/Bax ve Fas/FasL yolaklarını içeren hücre proliferasyonunu azaltarak ve apoptozu indükleyerek testis gelişimini ve fonksiyonunu bozduğu rapor edilmiştir (Duan vd., 2016).

Genel olarak apoptoz sürecinde Kaspaz 3 aktive edildiğinde hücreye sinyal gönderilir ve apoptoz indüklenir. Bu, hücrede kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu içeren morfolojik değişikliklere yol açar (Liu vd., 1997). Kanıtlara göre, NF, sinir hücrelerinin apoptozunu indüklemeye bir rol oynayabilir, böylece NF, hipokampus ve korteks hücrelerinde CAS-3 ekspresyonunu artırır ve bu hücrelerde apoptozu indükler (Lotfi vd., 2021). Ayrıca 5 ve 10 µM'lik konsantrasyonlarda NF, mitokondriyal

membran potansiyelinin kaybına, apoptotik çekirdek parçalanmasına ve nöronal hücre ölümüne neden olur (Che vd., 2020).

Su sistemlerinde yaygın olarak bulunan NF'nin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri vardır (Jie vd., 2013). Yapılan bir *in vitro* çalışmada, B hücre özelliklerine sahip bir insan lenfoblastoid hücre dizisi olan insan Raji hücrelerinin (CCL86) hayatta kalması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve hücre döngüsü dağılımı üzerinde NF'nin etkileri araştırılmıştır. NF'nin doza bağlı bir şekilde ROS'un indüklenmesiyle birlikte hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. En çarpıcı şekilde, NF maruziyeti hücre döngüsü profilini değiştirmiştir ve esas olarak G2/M fazında hücrelerin birikmesine yol açmıştır. NF'nin ROS'a bağlı bir şekilde hücre canlılığını azaltarak ve G2/M hücre döngüsü durmasını indükleyerek Raji hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler sergilediği ortaya konulmuştur (Qi vd., 2013). NF'ye maruz kalmanın hücre proliferasyonu engellediği ve apoptoz, otofaji veya nekroz yoluyla hücre ölümüne yol açabileceği kabul edilmiştir (You vd., 2002; Han vd., 2004; Yao vd., 2006).

Hücre döngüsü durması veya apoptoz gibi hücre tepkileri, hücre tipine ve zarar veren ajana bağlı olduğu rapor edilmiştir (Kudo vd., 2004). Bununla birlikte, bir hücre tipinin neden hücre döngüsü durmasına uğrarken diğer hücre tipinin apoptoz yoluyla öldüğü hala tam olarak anlaşılamamıştır (Tayama vd., 2008).

NF'nin beyin de dahil olmak üzere birçok organa zarar verdiği, nöral kök hücrelerde apoptoz yoluyla güçlü bir sitotoksitite gösterdiği, bunun da merkezi sinir sisteminde nörogenezini etkileyebileceği araştırmalar sonucunda gösterilmiştir (Kudo vd., 2004; Yao ve Hou, 2004; Yao vd., 2006).

Litwa ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada; Fare embriyonik sinir hücreleri üzerinde NF'nin toksik ve apoptotik etkisine yol açan mekanizma araştırılmıştır. 5 ve 10 μ M NF'ye maruz kalan farelerin sinir hücre kültüründe nörotoksik ve apoptotik etkilerin uyarıldığı görülmüştür.

Yücedağ ve arkadaşlarının (2014) yapmış olduğu çalışmada NF'nin sıçanlarda duyma fonksiyonunu da olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Farelerde sinir kök hücrelerinin büyümesini, farklılaşmasını inhibe etmesi ve apoptoza gidebilmesi için etkin olan konsantrasyon 660 mg/L'dir (Soares vd., 2008). Meme bezi hücrelerinde 0,01 mg/gün NF konsantrasyonuna maruz kalma sonucu hücrelerin çoğaldığı gözlenmiştir (Soares vd., 2008).

İnsan T-hücre lösemi kanser hücre hatları NF'nin 0,1; 1 ve 10 µM dozlarına 12 ve 24 saat maruz bırakılmıştır (Yao vd., 2007). Hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile sayılarının doz artışına bağlı arttığı; mitokondriyal membran potansiyelinin ve kaspaz-8 aktivasyonunun azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca kaspaz-8'e bağlı mekanizmalarla kanserli hücrelerde apoptozisin uyarıldığı bildirilmiştir.

1.5. NF'nin Gen Ekspresyon Düzeyi Belirlemede Kullanımı

Dallanmış izomer karışımı NF dünya çapında bir yüzey aktif madde olarak kullanılmaktadır ve organizmaların endokrin sistemlerini bozma potansiyeline sahiptir. İn vivo ve in vitro analizlerden, NF'nin östrojenik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Goksoyr, 2006).

Chen ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada NF ve 17β-östrodiol'un zebrabalıklarında mRNA seviyesine olan etkisi araştırılmıştır. Zebra balıklarında vtg1 geninin mRNA ekspresyonunun doza bağlı artışı görülmüştür.

NF'nin, japon balıklarında gen ekspresyonunda değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir (Ardeshir vd., 2022). Gen ekspresyonunda görülen bu değişiklik de östradiol benzeri bileşiklerin etkisini belirlemek için seçilmiş biyolojik belirteç olduğu yönündedir (Rastgar vd., 2019). Östrojen reseptörü α (ER α) gen ekspresyonu üzerine NF etkisi in vivo olarak gösterilmiştir. Genel olarak, melanomakrofaj merkezlerinin melanin içeriğindeki artış, NF'ye maruz kaldıktan sonra akvaryum balıklarında ERα gen ekspresyonunun artmasına neden olmuştur (Ardeshir vd., 2022).

Kanser gibi kompleks hastalıkların moleküler temelini anlamadaki en önemli yaklaşım bireysel genlerin davranışlarını anlamaktır. Bu nedenle değişimin ekspresyon seviyelerini bağımsız olarak tanımlamak önemlidir. Real-time PCR, mikroarray, northern blots ve/veya in situ hibridizasyon yöntemleri ile değişiklikler belirlenebilmektedir (Pollock, 2002; Hedenfalk vd., 2002; Kuchipudi vd., 2015).

Endokrin yıkıcı kimyasalların canlılar üzerine potansiyel etkilerine ilişkin global bir endişe bulunmaktadır. Endokrin yıkıcı kimyasallar tarafından uyarılan östrojen ilişkili reseptör (ERR) genlerinin sucul çevrede yaşayan sinek türündeki (*Chironomus riparius*) ekspresyonu araştırılmıştır (Park vd., 2010). Farklı yaşama koşullarına bağlı olarak 24 saat NF'ye maruz bırakılan erkek sineklerde ERR mRNA ekspresyonunun önemli derecede arttığı rapor edilmiştir.

Fare dalak makrofaj hücrelerinde SOCS3 ekspresyonu üzerinde NF'nin etkisi araştırılmıştır (Pal vd., 2019). NF ile muamele edilmiş makrofajlarda SOCS3 geninin mRNA düzeyi doza ve süreye bağlı bir şekilde azalmıştır.

1.5.1. NF'nin Apoptotik Etkisini Belirlemek İçin Çalışılan Genler

1.5.1.1. Bcl-2/Bax Geni

Bcl-2, B hücreli lenfoma / lösemi-2'nin kısaltmasıdır. Bcl-2 proteini, apoptozu modüle ettiği bilinen bir grup proteinin kurucu üyesidir. Adından da anlaşılacağı gibi, Bcl-2 eksprese eden gen ilk kez B hücreli malign neoplazilerde bulunmuştur.

Bcl-2, aynı zamanda tüm homolojik proteinler ailesinin tanımlanması için de kullanılmaktadır (Moldoveanu vd., 2014). Bcl-2 gen ailesi proteinleri apoptozun düzenlenmesinde belirleyici bir role sahiptir (Krajewska vd., 2002).

Normalde fetal ve yetişkin dokuda eksprese edilen Bcl-2, hücrenin canlılığını hücre proliferasyonuna sebebiyet vermeden sağlayan apoptoz inhibitörüdür (Ramdial vd.,

2000). Bu ailenin farklı proteinleri Bcl-2 homoloji alanları içermektedir (BH: BH1, BH2, BH3 ve BH4) (Shamas vd., 2013).

Apoptozdaki operasyonel rolleri ve sahip oldukları Bcl-2 homolojisi (BH) alanlarının sayısına bağlı olarak, Bcl-2 ailesi üyeleri üç alt gruba ayrılmaktadır (Chipuk vd., 2010). Bir alt grup, Bax ve Bak gibi ailenin proapoptotik üyelerini içermektedir. Bu proteinler, artmış mitokondriyal dış zar geçirgenliğine aracılık etmektedir. İkinci bir alt grup, apoptoz programının başlatıcıları olan sadece BH3 üyesi Bid, Bim ve PUMA'dır. Üçüncü alt grup, antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini içermektedir (Chipuk vd., 2010).

Apoptoz, hücrenin kaderini belirleyici olarak davranan ve terapötik hedefleri temsil eden Bcl-2 ailesi proteinlerinin kontrolü altındadır (Seiller vd., 2020). Apoptozun regülasyonu, Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır. Bcl-2 ailesi üyeleri, mitokondriyal apoptoz sinyal merkezini düzenlemektedir (Czabotar vd., 2014). Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmaktadır bir kısmı antiapoptotik, diğer bir kısmı ise apoptoz uyarıcı olarak isimlendirilmektedir Bax, BH3, Bik, Bad, Blk, Bid (Nagata, 1997; Shi ve Kehrl, 2019).

Bcl-2 geni bir protoonkogen olarak tanımlanmıştır. İlk olarak insan folliküler lenfomasında, t(14;18) kromozomal translokasyonunda bulunmuştur (Basu ve Haldar, 1998). Sonrasında apoptozisi inhibe edici özelliği ortaya çıkmıştır (Toki vd., 1999).

Birden fazla sayıda üye bulunduran Bcl-2 ilişkili protein ailesi, apoptozu uyarır ve baskılar. Üyeler kendi aralarında homo ve heterodimerler oluşturmaktadırlar. Ailenin proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin rölatif oranı hücrenin yaşayabilirliğini belirlemektedir. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax oranının artışı ya da tersi durumu apoptoz inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Ulukaya, 2001). Bcl-2 yönündeki net artışın, endometriyal glandüler epitel ve lenfoid doku gibi canlılık aktivitesi fazla olan hücrelerde apoptozisi baskılamak aracılığıyla hücre ömrünü uzattığı bilinmektedir (Toki vd., 1999).

Bu gen ailesinin ürünleri endoplazmik retikulum zarının üzerinde konumlandırılır, aynı zamanda mitokondri ile çekirdek zarlarında da bulunurlar ve iyon transportunu

düzenlemektedirler (Ulukaya, 2001). Homodimer ya da heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak çalışmaktadırlar (Hetts, 1998; Israels ve Israels, 1999). Örneğin; Bcl-2 nin Bax ile olan etkileşiminde Bax'ın oransal yüksekliği hücre ölümüne sebep olurken, Bcl-2 nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlamaktadır (Behnia vd., 2000; Zaitoun vd., 2019).

1.5.1.2. Kaspazlar

Apoptotik yolların ana uygulayıcıları, kaspaz ailesinin proteazlarıdır. Bu proteaz ailesi, kaspaz 3 ve 7 gibi yürütücü kaspazlara ve kaspaz 8 ve 9 gibi başlatıcı kaspazlara bölünmüştür. Başlatıcı kaspaz 8'in, ölüm reseptörleri aracılığıyla aktive edildiği bilinirken, kaspaz 9, sitokrom tarafından aktive edilmektedir.

Başlatıcı kaspazlar, hücreyi apoptotik ölüme sürükleyerek kaspaz 3 ve 7'nin aşağı yönde aktivasyonuna yol açmaktadır. (Majno ve Joris, 1995). Kaspaz 3, DNA fragmantasyonu gibi apoptoz ile ilişkili hücresel değişikliklerin ortaya çıkmasında merkezi bir role sahiptir (Kiraz vd., 2016).

Apoptoz sinyalizasyonunun anlaşılmasındaki ilerleme, iki ana başlama yolunun geniş çapta kabul görmesine yol açmaktadır. Bu yollardan ilki olan dışsal yol, hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri aracılığıyla tetiklenmektedir. İçsel yol ise, sitokrom c gibi proapoptotik faktörlerin hücrenin mitokondrilerinden salınmasıyla tetiklenmektedir (Davis vd., 2010).

Kaspazlar tümör baskılama, hücre döngüsü regülasyonu ve DNA onarımı dahil olmak üzere hem apoptotik hem de apoptotik olmayan sinyal yollarında rol oynamaktadır (Vigneswara ve Ahmed, 2020). Apoptotik sinyal yolunun düzensizliği, çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmektedir. Örneğin aşırı apoptoz, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara yol açarken, yetersiz apoptoz kanser ve otoimmün bozukluklarla sonuçlanabilir (Harvey vd., 1997; Fadeel vd., 1999).

Apoptoza iki iyi bilinen klasik sinyal yolu aracılık etmektedir; dışsal yol ve içsel yol. Bu iki yol, fizyolojik veya deneysel olarak indüklenen ölüm uyarılarına yanıt olarak bağımsız olarak veya kombinasyon halinde etkinleştirilebilir. Ekstrinsik apoptotik yol, çeşitli hücre dışı ölüm sinyalleri tarafından tetiklenirken, intrinsik yol, hücre içi hasar, oksidatif stres ve büyüme faktörlerinin yoksunluğu ile aktive edilmektedir (Thornberry ve Lazebnik, 1998; Thornberry, 1998; Zuzarte vd., 2006). Her iki yol kaspaz aktivasyonu ile çalışmaktadır.

Hücreler kaspazlar aracılı yolların rotasını, intrinsek veya ekstrinsek sinyalleri aldıktan sonra izlemektedirler. Ekstrinsek yolda, ölüm reseptörü ve ligandının bağlanması ile Kaspaz 8 oluşumunu sağlamak ve sırasıyla kaspazları (3,6,7) aktif hale getirmektedir. İntrinsek yolda, mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c molekülü salınmakta ve Apaf-1, deoksiadenozin trifosfat ve oligomerize olarak Kaspaz 9' u aktif hale getirmektedir. Bu yolların hasara uğraması kanser dahil birçok hastalığın patogenezinde ciddi rol oynamaktadır.

Hücre canlılığı ile ölümü arasındaki denge kanserde bozulmaktadır buna bağlı olarak apoptozu gerçekleştiren ölüm sinyallerini hücreler alamamaktadırlar. Böylece yolların bir adımında bu durum problem yaratabilmektedir (Bildik ve Bayar, 2018).

Aspartik asitten sonraki peptid bağını kıran kaspazlar, sistein proteazlar olarak tanımlanmaktadır (Wang vd., 2015). Hücrede aktif değildirler, ancak proteolitik olarak aktifleşirler. Apoptoza 100 farklı hedef proteini keserek sebebiyet verirler. 3 tip olarak incelenirler:

- Kaspaz 2,8,9,10 - Başlatıcı
- Kaspaz 3,6,7 - Efektör
- Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14 - İnflamatuar

Çeşitli kanser hücrelerinde programlı hücre ölümü ile kanserin seçici inhibisyonunda rol almaktadır (Elmore, 2007; Nam, 2016). Kaspaz kaskadlarının aktivasyonu, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmantasyonu gibi spesifik morfolojik özelliklere sahiptirler

(Elmore, 2007). Kaspaz kaskadı yolu esas olarak apoptotik hücre ölümüne karışır ve efektör kaspazlar ile başlatıcı kaspazlara bölünmektedirler (Florentin ve Arama, 2012). Başlatıcı ve efektör kaspazların ekspresyonu sırayla meydana gelmektedir ve sonuçta kanser hücrelerinde kaspaza bağlı apoptotik hücre ölümünü indüklemektedir (Daniel vd., 2006; Won ve Seo, 2019).

DNA'nın onarımı ve replikasyonu için gerekli enzimleri kaspazlar inaktive etmektedirler (Adams ve Cory, 2001). Hücre zarının tomurcuklanmasına, hücre iskeleti proteinlerini keserek neden olmaktadır (Adrain ve Martin, 2001; Spierings vd., 2004). Apoptoz aktivasyonunun gerçekleşmesini takiben DNA'nın tek ipliğinde bir çentikle başlayan karakteristik ve dönüşü olmayan bir parçalanma görülmektedir (Coşkun ve Özgür, 2011).

1.5.1.3. P53 Geni

Hücreler hasara uğradıklarında DNA onarımı gerçekleştiren, bu girişimin başarılı olmaması durumunda apoptozu tetikleyen gen grupları tümör baskılayan genler olarak isimlendirilmektedir (Qi vd., 2020).

Hücrelerin bölünüp çoğalmasını desteklerler. Aralarında en çok çalışılan ve bilinen, 393 aminoasitten oluşan P53 genidir (Koçak vd., 2011). On yedinci kromozomun kısa kolu üzerinde onbir ekzondan oluşan bir gen tarafından kodlanmaktadır ve yaklaşık yirmi kilobazlık bir alana yayılmıştır (Varley vd., 1997; Koçak vd., 2011). Genellikle kanserde mutasyona uğrayan P53, tümörün ilerlemesine katkıda bulunan başlıca tümör baskılayıcıdır ve ökaryotlarda genomik bütünlüğü korumaktadır (D'orazi vd., 2020).

P53 proteini birçok hücreyel olayda rol almaktadır (Harris, 1996). Gen ifadesinin düzenlenmesi, apoptoz, DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrol edilmesi, ve genomik kararlılığın sağlanması gibi işlevleri ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek gerçekleştirmektedir (Koçak vd., 2011). Bu protein hücrenin o anki durumuna göre yaşamasında ya da öleceğine karar vermektedir (Velculescu ve El-Deiry, 1996).

P53 hücredeki hasarın büyüklüğüne bağlı olarak kararlı hale gelmektedir ve hücre döngüsünü durdurmaktadır. Hücrede hasarın tamirine olanak sağlamaktadır. Hasar eğer hücrenin tamir etme gücünü aşarsa, hücreyi apoptozise yönlendirmektedir (Koçak vd., 2011).

Hücrenel bir hasar olduğunda P53 DNA'ya transkripsiyon faktörü olarak bağlanmakta ve P21 gen ekspresyon seviyesini uyarmaktadır (Levine, 1989). P21 proteini, hücre döngüsünün G0/G1 evresinde görevli olan siklin bağımlı kinazların işlevini engelleyerek hücre döngüsünü G1 aşamasında durdurmaktadır (Harris 1996). Hasar giderilemez ise, Bcl-2 interacting killer (Bik) proteini P53 tarafından indüklenerek hücreyi ölüme yönlendirmektedir (Mates vd., 2008).

Tümör baskılayıcı protein P53 genellikle "genom koruyucusu" olarak adlandırılmaktadır (Silva vd., 2020). Hücre döngüsünü ve DNA'nın bütünlüğünü ve diğer önemli hücrenel işlevleri kontrol etmektedir. Ana işlevi, tümör hücrelerinde apoptoz sürecini tetiklemektir ve tüm kanserlerin yaklaşık % 50' si TP53 genindeki mutasyonlar yoluyla P53 proteininin inaktivasyonu ile ilgili olduğu bilinmektedir (Zhang vd., 2020).

TP53 geni önemli bir tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır. Tümör baskılayıcı P53, transkripsiyon faktörü olarak karakterize edilen ilklerden biri olmasına rağmen, ana işlevi DNA ile etkileşimi ile güçlendirilmiş olsa da, etki mekanizması hala çözülememektedir (Rangel vd., 2020).

P53, efektör yollarının çokluğunu aktive ederek tümör oluşumunu baskılamaktadır (Ghatak vd., 2021). Bunların çoğu yeni başlayan kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını sınırlamak için öncelikle hücrelerin içinde çalışmasına rağmen, çoğu hücre dışı boşluğa uzanmaktadır (Chen vd., 2020). Özellikle P53, çözünebilir veya eksozomlar gibi hücre dışı veziküller içinde bulunan çok sayıda hücre dışı faktörün ekspresyonunu ve salgılanmasını kontrol etmektedir (Sammons vd., 2020).

Hücresel sekretomun bir parçası olarak, hücre-hücre iletişimde ve hücre dışı matriksin yeniden biçimlenmesinde anahtar rolleri yerine getirmektedir. P53 kodlayan TP53 genindeki mutasyonlar, kanser hücrelerinde en sık görülen genetik değişikliklerdir ve bu nedenle, tümör hücresi sekretomunun bileşimi üzerinde derin bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Pavlakis ve Stiewe, 2020).

Başlangıçta bir onkogen olarak sınıflandırılan tümör baskılayıcı P53, artık insan genomunun en kritik koruyucularından biri ve sinyalleme kaskadlarının multipleks moleküler ağının merkezi bir bileşeni olarak kabul edilmektedir (Lane ve Crafford, 1979; Linzer ve Levine, 1979; Kasthuber ve Luwe, 2017). DNA hasarı, oksidatif stres ve onkojenik sinyal içeren çeşitli hücresel hakaretlerin ardından P53 aktive edilmektedir ve DNA onarımı, hücre döngüsü durması, apoptoz ve yaşlanma için hareket yollarında yer alan sekansa özel bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedir (Levine ve Oren, 2009; Vousden ve Prives, 2009; Bieging vd., 2014).

1.5.1.4. P21

P21 proteini, sikline bağımlı kinaz inhibitörlerinin kurucu üyesidir ve önemli birçok yönlü hücre döngüsü proteinidir (Amirinejad vd., 2020). P21, P53 ve P53'ten bağımsız yollar tarafından transkripsiyonel olarak kontrol edilmektedir. Hücre döngüsü kontrolünün kaybı, tümörjenezin özelliğidir. Hücre döngüsünü durdurmak için çeşitli hücre içi ve hücre dışı uyaranlara yanıt olarak ekspresyonu artmaktadır ve genomik stabilite sağlanmaktadır (Wang vd., 2021). Mitoz dâhil hücre döngüsü düzenlemesindeki rollerinin yanı sıra P21, farklılaşma, hücre göçü, hücre iskeleti dinamikleri, apoptoz, transkripsiyon, DNA onarımı, uyarılmış pluripotent kök hücrelerin yeniden programlanması, otofaji ve yaşlanmanın başlangıcında rol oynamaktadır (Kreis vd., 2019).

Sikline bağımlı kinaz inhibitörü P21 çeşitli uyaranlara cevap olarak hücre döngüsünün durmasını teşvik eden faktörlerden biridir (Zhang vd., 2020). P21'in hücre siklusu ilerlemesi üzerindeki inhibitör etkisi çekirdek lokalizasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. P21 hem P53 bağımlı hem de P53 bağımsız mekanizmaları tarafından

indüklenebilmektedir. P21'e atfedilen diğer bazı önemli fonksiyonlar arasında transkripsiyonel düzenleme ve apoptoz inhibisyonu bulunmaktadır (Chen vd., 2020). Bu işlevler büyük ölçüde doğrudan P21/protein etkileşimlerine ve ayrıca P21 alt hücre lokalizasyonlarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Ek olarak P21 çoğalan hücre çekirdek antijeni (PCNA) ile etkileşime girerek DNA onarımında rol oynayabileceği bildirilmiştir (Ansar vd., 2016).

P21WAF1 / Cip1 molekülü (P21) genellikle ana tümör baskılayıcı P53 ile bağlantılı olarak bulunmaktadır. P53'ün varlığı P53 tümör baskılayıcısının daha az agresif bir tümöre yol açacağını göstermektedir (Liu vd., 2021). Önceki çalışmalar, onkojenik sinyal yollarının P21 ekspresyonunu nasıl etkilediğinin, moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu varsayımı tersine çeviren kanıtlar sunmuştur. Manchester Kanser Araştırma Merkezi'nin bir parçası olan Manchester Üniversitesi'ndeki bilim insanları, P53 molekülünün eksik olduğu tümörlerde, P21'in tümörlerin büyüme ve yayılma yeteneğini vücut boyunca önemli ölçüde arttırdığını göstermişlerdir (Galanos vd., 2016).

Sikline bağlı kinaz inhibitörü P21, P53 tarafından düzenlenen bir hücre döngüsü kontrol noktası efektörü ve yaşlanmanın indükleyicisidir (Galanos vd., 2016). Çeşitli uyarıcılara yanıt olarak esas olarak G1-fazı durdurmaya ve hücrel yaşlanmaya aracılık eden tümör baskılayıcı P53'ün önemli bir downstream efektörüdür (Abbas ve Dutta, 2009).

P53 normal formunda kansere yol açabilecek hücre değişikliklerini önleyen bir tümör baskılayıcıdır (Wu vd., 2021). P53, DNA ya bağlandığında P21 üretmek için başka bir geni uyarmaktadır. Daha sonra P21, hücre bölünmesini uyaran bir protein ile etkileşime girmektedir. P21 bu protein ile kompleks halindeyken, hücre bir sonraki bölünme aşamasından geçememektedir. Genlerdeki mutasyonlar bu koruyucu mekanizmaları önlemektedir (Baylor College Of Medicine, 2004). Hücrel uyarılara yanıt olarak P21 ekspresyonu, RNA stabilizasyonu, fosforilasyon ve ubiquitinasyon içeren mekanizmalar yoluyla transkripsiyonel ve translasyon sonrası seviyelerde sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Sonuç olarak, artan kanıtlar, birkaç önemli tümör baskılayıcı ve onkojenik sinyal yolunun, hücre döngüsü ilerlemesi ve hayatta kalma üzerindeki

etkilerini ortaya çıkarmak için P21 ekspresyonunu değiştirdiğini ortaya koymaktadır. P21 ekspresyonunun, tümörojenik süreçleri hem teşvik edebildiği hem de inhibe edebildiği çalışmalarla gösterilmiştir (Warfel ve El-Deiry, 2013).

1.5.1.5. β -aktin

Hücre iskeleti β -aktin, memeli hücrelerinde oldukça bol bulunan bir proteindir ve mRNA'sı, qRT-PCR tahlillerinde yaygın şekilde referans olarak kullanılır (Selvey vd., 2001).

β -aktin 43-kDa moleküler ağırlığında ve hemen hemen tüm ökaryotik hücrelerde bulunan, yüksek derecede korunmuş bir proteindir. İnsan β -aktin memeli hücre hattında ve transgenik farelerle ilgili genlerin ekspresyonunda geniş bir şekilde kullanılmakta ve β -aktin tüm hücrelerde bolca ifade edildiği bildirilmektedir (Qin ve Gunning, 1997).

1.6. NF'nin Gen Ekspresyon Düzeyi Üzerine Etkisinin Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Tekniği Kullanılarak Tespiti

Gerçek zamanlı izleme ile nicel ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR), az miktarda dokudan mRNA'yı ölçmek için güçlü bir yöntemdir. Gen ekspresyonu analiz yöntemleri çeşitli moleküler araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Korkmaz ve Sidekli, 2020). Gen ekspresyonunun biyolojik çalışmalarında en sık kullanılan yöntemlerden biridir (Bjarnadottir ve Jonsson, 2005). Bu tanı, klinik çalışmalar, patojen belirlemeler, adli, gıda teknolojisi, kanser miktar ölçümü ve fonksiyonel gen bilimi gibi verimli uygulama alanlarında geniş kullanım alanına sahiptir (Yuan ve ark., 2006).

Doku ve organlardaki gen ekspresyonları Northern Blot, İnsitu Hibridizasyon, Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Mikroarray teknolojisi gibi çeşitli analiz yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir (Goldman, 2001; Segundo-Val ve SnazLozano, 2016). Kantitatif gen ekspresyon analizlerinde kullanılan bu analiz yöntemleri arasında bir gene ait hedeflenen mRNA'nın yüksek duyarlılıkta

belirlenebilmesi, hedef bölge çoğaltımı ve kantitatif belirleme aşamasının tek bir cihaz ile yapılabilmesi yönünden en yaygın olarak kullanılan yöntem RT-qPCR'dır ve gen ekspresyon analizlerinde kullanılan doğru, hızlı ve hassas bir tekniktir (Jarczak vd., 2014; Tilli vd., 2016).

Hedef genin göreceli ekspresyon oranı real-time PCR verimliliğine ve kontrole karşı bilinmeyen örneklerin kesişme noktası (Ct) farklarına (Δ) dayalı olarak hesaplanmaktadır (Pfaffl, 2002). Amplifikasyon verimliliğinin hesaplaması real-time PCR analizinde kullanılan önemli bir aşamadır. Bağlı kantasyon ölçümünde bu yöntem örneklerin karşılaştırmalı ifadelene düzeyinin hesaplanmasında kullanılmaktadır. Eğer amplifikasyon verimliliği hem referans gen ve hem hedef gen için 100% olursa, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanıldığı bildirilmektedir (Pfaffl, 2001).

1.7. Kanser Hücrelerinin İlerlemesinde NF'nin Rolü

NF'nin toksik ve kanserojenik bir ajan olması vücudun normal biyolojik fonksiyonlarında olumsuz işleyişe neden olmaktadır. NF'ye maruz kalma, hücre ölümü, hormonal düzensizlik ve kanser başlangıcı ile ilgilidir. Çevrede kalıcı olması ve toksik etkiye sahip olan NF, östrojenik aktivite ve endokrin bozucu özelliklere sahip olmasından dolayı her dönem çalışmak istenilen konu olmuştur (Chang vd., 2012; Liu vd., 2014).

Bozulmuş hormon etkisi, doğurganlığın azalması, kısırlık, polikistik over sendromu, endometriozis, hormona duyarlı kanser, erken veya gecikmiş ergenlik ve olumsuz doğum sonuçları bazı EBK'larla ilişkilendirilmiştir (Yılmaz vd., 2020). NF maruziyeti ile yumurtalık, rahim ve testis gibi reproduktif dokuların kanserleri arasında pozitif ilişkilerin olduğu bildirilmiştir (Garcia vd., 2020). Bazı çalışmalarda çevresel NF maruziyeti ile kanser progresyonu arasındaki olası mekanizmanın, östrojen bağımlı bir sinyal yolu aracılığıyla gerçekleştiği rapor etmiştir (Noorimotlagh vd., 2020).

Son yıllarda meme, yumurtalık ve endometriyal kanser vakalarının arttığı bilinmektedir. EBK'ların ve diğer çevresel faktörlerin kadınlarda malignitelere katkıda bulunduğu ileri

sürülmektedir (Yılmaz vd., 2020). İnsan hücreleriyle yapılan in vivo çalışmalar ve hayvan modelleriyle yapılan in vivo çalışmalar, çevresel EBK dozlarına maruz kalma ile yüksek meme kanseri insidansı arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermiştir (Weber ve Keri, 2011). NF'ye maruz kalmanın meme kanseri oluşumu üzerindeki etkileri de çalışmalarda incelenmiştir. Bulgular, NF maruziyetinin meme kanserinde artışa neden olduğunu göstermiştir (Noorimotlagh vd., 2020). Çeşitli in vitro deneyler, NF gibi çevresel organik bileşiklerin, özellikle meme ve yumurtalık kanserlerinin oluşumuna katkı sağladığını ortaya koymaktadır (Olsen vd., 2005).

Bir başka çalışmada NF'nin doza ve zamana bağlı olarak yumurtalık kanseri hücrelerinde (PEO4) proliferasyonunun azaldığını göstermiştir (Park vd., 2009). Çalışmalar, NF'nin östrojen pozitif yumurtalık kanseri hücrelerinin proliferasyonu ve transkripsiyon düzenlemesi üzerindeki etkilerini incelemiş ve olası mekanizmanın, östrojen bağımlı bir sinyal yolu aracılığıyla gerçekleştiği rapor edilmiştir (Kang vd., 2012 ; Park ve Choi, 2013 ; Kim vd., 2015).

Prostat kanseri (PK), dünyada en sık teşhis edilen malignitelerden biridir ve akciğer kanserinden sonra erkeklerde en sık teşhis edilen ikinci kanser olarak rapor edilmektedir. NF, PK ilerlemesi için değerlendirilen en önemli çevresel ajanlardan biridir. Mevcut durumda, PK'yi inceleyen sadece bir çalışma tanımlanmıştır (Kim vd., 2016). Çalışma sonuçları, NF'nin apoptoz ve metastaz üzerinde etki ederek PK'nin ilerlemesine sebep olabildiğini göstermiştir (Rutkowska and Diamanti-Kandarakis, 2016).

Farklı bir çalışmada düşük bir maruziyet dozunda (10µg/L) NF kullanımının, epidermal hücreleri, sitoplazmanın vakuolasyonunu ve ciddi şekilde deforme olmuş hücre çekirdekleri gibi çeşitli özelliklerini etkilediği gösterilmiştir (Uğuz vd., 2003). 2 haftalık NF'ye maruz kalmanın sonunda hücre sınırları kaybolup, çekirdeklerin büyüdüğü bildirilmiştir. Bu, genellikle NF tarafından indüklenen kanserojen aktiviteye sahip hücrelerde gözlemlenmiştir ve karaciğerde kanserojen gelişme belirtileri olarak yorumlanmıştır.

Kolorektal kanser, en sık teşhis edilen üçüncü kanserdir. Aynı zamanda 2018'de dünya çapında kansere bağlı ölümlerin ikincisi olmuştur (Bray vd., 2018). Son yıllarda çevre kirliliği ve kanserojenler arasındaki ilişki bir endişe kaynağı haline gelmiştir (Wang vd., 2021). Birçok çalışma, EBK'ların kanserlerin oluşumunda ve gelişiminde rol oynadığını göstermiştir (Li vd., 2021).

Diğer bir çalışmada NF'nin hücre döngüsü, apoptoz ve metastaz üzerinde etki ederek prostat hücrelerinin (LNCaP) büyümesine ve prostat kanserinin ilerlemesini artırabileceğini göstermektedir (Kim vd., 2016).

Malign melanom hücrelerinde apoptotik sinyallemedeki kusurların, melanomun kontrolsüz çoğalmasına ve ölümsüzleşmesine önemli katkılardan biri olduğu düşünülmektedir (Zheng vd., 2018).

1.8. Melanom

Melanom nöral yarık kökenli melanositlerden ve melanositlerin farklılaşması sonucu oluştuğu düşünülen nevüs hücrelerinden (ben) kaynaklanan bir neoplazi olarak bilinmektedir (Dzwierzynski, 2013; Parlak vd., 2014). Evrende en sık görülen malignite türü melanom cilt kanseri olarak kategorize edilmektedir ve en önemli yerleşim yeri deridir (Skender-Kalneas vd., 1995; Rigel, 2005; Domingues vd., 2018).

Çeşitli iç ve dış ajanlar melanom cilt kanseri patogenezinde katkıda bulunmaktadır. Bu faktörler epigenetik değişiklikler, X ışınları, genetik, arsenik bileşikleri, UV ışınları ve ek kimyasal ürünler olarak bilinmektedir (Abi vd., 2019). Melanom oldukça kötü huyludur ve şu anda etkili bir tedavisi olmayan hayatı tehdit eden bir hastalıktır (Wang ve Zu, 2020). Deri kanserlerine bağlı ölümlerde ilk sıralarda olduğu rapor edilmiştir (American Cancer Society. Cancer Facts & Figures, 2014).

1.8.1. Melanomda Östrojen ve Östrojen Reseptörlerinin Rolü

Melanom önemli bir mortaliteye sahiptir ve artan insidansı son zamanlarda dikkat çekmektedir. Bu nedenle, melanomun ortaya çıkmasına ve gelişmesine katkıda bulunan karmaşık mekanizmaların araştırılması, hem bilimsel araştırmalarda hem de klinik uygulamalarda ilgi görmektedir. Östrojenler meme kanseri, endometriyal kanser ve yumurtalık kanseri gibi belirli kanser türlerinin ortaya çıkmasında ve gelişmesinde önemli bir rol oynar, ancak melanom gelişimindeki rolleri hala tartışma konusudur.

Östrojenler, östrojen reseptörleri (ER) ve melanom arasındaki bağlantıyı destekleyebilen birkaç hücre içi yol ortaya çıkarılmıştır (Caruntu vd., 2016). ER- β antiproliferatif bir rol oynarken, ER- α hücre büyümesini ve hücre atipiyi destekler (Kesari vd., 2011). Bu nedenle, ciltte ER- β aktivitesinin inhibisyonu, melanom gelişimi ve metastatik hücrelerin yayılması riskini artırabilir. Bununla birlikte, bu alandaki son gelişmelere rağmen, östrojenlerin ve östrojen reseptörlerinin melanomdaki kesin rolü hala tam olarak anlaşılmamıştır.

Meme, yumurtalık, endometriyal, mesane, böbrek, adrenal, prostat, testis, akciğer, kolon gibi belirli tümör türlerinin ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde rol oynadığı kanıtlanan östrojenlere ve östrojen reseptörlerine ilgi artırmıştır (Aitken vd., 2004). Bununla birlikte, östrojenlerin melanom gelişimindeki rolleri hala belirsizliğini korumaktadır (Çenesiz vd., 2011). Melanomda östrojenlerin belirli bir rolü olduğu hipotezi, melanom progresyonundaki cinsiyete bağlı farklılıkların gözlemlerinden ve hamilelik sırasında melanomların evrimi ile ilgili çalışmalardan türetilmiştir (Behari ve Kesari, 2006).

Östrojenler fizyolojik rollerini iki tip reseptör üzerinde etki ederek gösterirler: östrojen reseptörü α (ER- α) ve östrojen reseptörü β (ER- β). ER- α ve ER- β , farklı kromozomlar üzerinde bulunan iki farklı gen tarafından kodlanan proteinlerdir (Ghodbane vd., 2013). ER- β derideki en yaygın östrojen reseptörüdür ve rahim ve meme bezleri gibi iyi bilinen östrojene duyarlı dokuların yanı sıra beyin, kolon ve prostat gibi diğer dokularda da

bulunmuştur (Aitken vd., 2004; Bushra vd., 2011). ER-β'nın aktivasyonu, ER-a'nın zıt etkisi ile dengelenmiş gibi görünen antiproliferatif etkileri indükler. Son çalışmalar, östrojen sinyalinin esas olarak ER-α ve ER-β ekspresyonu arasındaki dengeye bağlı olduğu sonucuna varmıştır (Caruntu vd., 2016).

Östrojenlerin ER'lerle etkileşimi, melanom hücrelerinde değiştirilebilen sinyal faktörlerini içeren genomik ve genomik olmayan yollar aracılığıyla hücre içi etkiler üretir (Ghodbane vd., 2013).

Genomik yol, ER'lerin farklı transkripsiyon koaktivatörleri ile etkileşimini içerir, çeşitli genlerin transkripsiyonunu modüle eder ve tümör hücrelerinin proliferasyonunun değişmesine yol açar (Mark vd., 2013).

Genomik olmayan yol etkileri, ER'lerin, kanserojenezde, hücre proliferasyonunda ve melanomla güçlü bir bağlantıda yer alan bir sinyal sistemi olan MAPK/ERK yolu tarafından kilit bir rol oynadığı birkaç hücre içi yolla etkileşimi tarafından indüklenir (Kumar vd., 2010).

Deneysel çalışmalardaki sonuçlar, tür farklılıkları, çeşitli deneysel tasarımlar, çeşitli hücre dizilerinde östrojen reseptörlerinin farklı ekspresyonu ve ayrıca östrojenlerin dolaylı etkileri ile açıklanabilir.

Meme kanseri gibi bazı kanserlerin östrojene bağımlı olduğu bilinmektedir. Kadınlarda melanom insidans oranları meme kanserine benzer, bu da kadın cinsiyet hormonlarının kadınlarda melanom gelişiminde rol oynayabileceğini düşündürür (Ramadan vd., 2002). Aynı zamanda, başka bir çalışma, daha önce meme kanseri teşhisi konmuş kadınların melanom riskinin daha yüksek olduğunu ve melanomlu hastaların meme kanseri riski altında olduğunu göstermiştir (Hong vd., 2005).

Çeşitli çalışılan melanom hücre hatlarında (BLM, WM115, A375, WM1552) ER-β lerin eksprese edilmesi ER'ler ve melanom arasındaki ilişkiyi doğrular niteliktedir (Hamada vd., 2011).

1.9. Amaç ve Hedefler

Endokrin yıkıcı kimyasalların günlük yaşamdaki kullanımları gittikçe artmaktadır. NF'nin, çeşitli kanser hücrelerinde hücre ölümüne neden olduğu rapor edilmektedir. Endokrin bozucu özelliklere ve östrojenik aktiviteye sahip olan NF, çevrede kalıcı olması ve toksik etkiye sahip olmasından dolayı her zaman önemli bir araştırma konusu olmuştur (Chang vd., 2012; Liu vd., 2014).

NF'nin östrojenik aktivitesi çeşitli organ, doku ve hücrelerde olmak üzere in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. NF'nin östrojen reseptörleri ile etkileşime girdiği rapor edilmiştir (Soto vd., 1991; White vd., 1994; de Weert vd., 2008). Çalışmamızda, şimdiye kadar yapılan çalışmalar incelenmiş olup, östrojenik etkili endokrin bozucuların, melanom üzerindeki etkilerinden, tezde bahsedilmiştir. Hücre sayısı ve gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde NF'nin etkisinin araştırılması kansere sebebiyeti ve gelecek nesilleri olumsuz etkileyebileceği düşüncesi açısından önemlidir.

Literatür araştırmalarında belirtildiği gibi NF'nin karsinojenik, toksikolojik, östrojenik olmak üzere birçok etkisi bulunmaktadır. Bu çalışmada, şimdiye kadar yapılan çalışmalar incelenmiş ve NF'nin çevrede ölçülen ve literatürlerde belirtilen miktarlarının in vitro çalışmayla melanom hücresine verilip, RNA'dan cDNA eldesi ile gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Bu araştırma sonuçları ile NF'nin hücrelere verdiği zarara bağlı olarak NF'nin etkilediği Kaspaz-3, Bcl-2, Bax, P53, P21 ve actin- β genlerinin, hücrelerde bulunan RNA miktarı üzerindeki etki düzeyini belirlemek amaçlanmıştır. Daha sonraki izleyeceğimiz yol in vitro çalışmamızı in vivo deneylerle desteklemek olacaktır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

2.1.1. Hücreler

Çalışmada kullanılan G-361 hücre hattı (ATCC® CRL-1424™) AFSÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalından temin edilerek, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarında 8. pasaja alındıktan sonra -196 C sıvı azot içerisinde muhafaza edilmiştir. Çalışma sırasında hücreler azot içerisinde çıkarılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. G-361 hücre hattının özellikleri Çizelge 2.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. G-361 Hücre Hattının Özellikleri

Kategori	Özellik
Organizma	İnsan
Cinsiyet	Erkek
Yaş	31
Doku	Cilt
Morfoloji	Epitel
Yüzey Tutunum	Yapışan Hücreler
Ürün Formatı	Dondurulmuş
Etnik Köken	Kafkas

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Ekipmanlar

Çizelge 2.2. Çalışmada Kullanılan Cihazların ve Ekipmanların Markalarının Listesi

Araştırma Mikroskobu	Nikon Invert, ECLIPSE TS100
96 kuyu İçeren Plak	Thermo 167008, Danimarka
Biyogüvenlik Kabini	Thermo MSC Advantage, Almanya
Buzdolabı (+4)	Beko, Türkiye
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik, Türkiye
Derin Dondurucu (-80)	Panasonic MDF-U700VX, Japonya
Hücre Kültür Flaskları (25, 75cm ²)	SPL, Almanya
0,2 ml eppendorf	Isolab 123.01.002, Güney Amerika
1,5 ml eppendorf	VWR 20170-038, Çin
Santrifüj tüpü	VWR 10025-698, Kore
İnkübatör	Thermo Heracell 150i, Almanya
Soğutmalı santrifüj	Heal Force, Şangai
Real Time PCR cihazı	Long gene a300, Çin
Sıvı Nitrojen Tank	Worthington, Amerika
Serolojik pipet (5ml, 10ml, 25ml)	SPL, Kore
Otomatik Pipet	Eppendorf, Isolab
Otomatik Pipet uçları	VWR, Çin
Şarjlı Otomatik Pipetleyici	Drummond Scientific
Şırınga filtresi	VWR, Çin
50ml enjektör	Plusmed, SYR050FS
Mini Santrifüj	Biosan
Santrifüj Cihazı	Nüve, Türkiye
Santrifüj cihazı	Thermo, Amerika
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Vorteks	Biosan
Neubauer Lamı	Superior Marienfeld
Lamel	Isolab
Hassas Terazi	Precisa xb 220a, İsviçre
Nanodrop	Thermofisher ND-2000, Amerika
Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan GO

Çizelge 2.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Biofroxx 298-93-1, Almanya
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Panreac Applichem 67-68-5, Almanya
Fötal Sığır Serumumu (FBS)	Gibco Qualified 10500-064, Güney Amerika
Nonilfenol	Sigma Aldrich 29,085-8, Almanya
Proteinaz K	Thermo Scientific, 00522930, Litvanya
Penisilin- Streptomisin karışımı	Gibco 15140-122, UK
Tripsin-EDTA	Capricorn Scientific, Almanya
DMEM HG with L-Glutamine	Capricorn scientific cp19-2782, Güney Amerika
Brightgreen Universal 2x qPCR	Abm 204454, Kanada
cDNA sentez kiti	Thermo Fisher 4368814, Almanya
RNA sentez kiti	Abt 102-01-10, Türkiye
Etanol %92-96	Kimetsan 64-17-5, Türkiye
Sodium Chloride	Merck 7647-14-5, Almanya
di-Sodium hydrogen phosphate dihydrate	Merck K30749780 230, Almanya
Sodium dihydrogen phosphate dihydrate	Merck K91567445 309, Almanya
Distile su	Koçak Farma 6002716, Türkiye
Tripan mavisi 2-Mercaptoethanol	Sigma T8154, Almanya Merc 60-24-2, Amerika

2.1.3. Deney Düzenegi

Deney grupları, uygulama süreleri çizelge 2.4.'deki gibi verilmiştir. Deney süresi boyunca, etanolde (Kimetsan 64-17-5) çözdürülen nonilfenol (Sigma-Aldrich, 290858) her bir gruptaki flasklara pipet yoluyla verildi.

Çizelge 2.4. Deney grupları ve deney düzeni

Deney grupları	Flask sayısı	Deney süresi
Kontrol	5	48 sa
Solvent	5	48 sa
0,1 µg/ml	5	48 sa
1 µg/ml	5	48 sa
10 µg/ml	5	48 sa
100 µg/ml	5	48 sa

2.1.4. Hücre Kültürü

2.1.4.1. Hücre Kültür Medyumu

Steril falkon içerisinde, hücre kültür medyumu;

- 44,5 ml yüksek glikozlu- DMEM (HG-DMEM) kültür medyumu
- 5 ml fötal sığır serumu
- 500 µl Penisilin-Streptomisin

50 ml steril santrifüj tüpü içerisinde hazırlandı.

2.1.4.2. Hücrelerin İnkübe Edilmesi

Sınıf II Biyogüvenlik kabininde (Resim 2.1) hücreler, hücre kültür medyumu içeren 25 cm²'lik steril flasklara son hacim 5 ml olacak şekilde hücreler ekildi. İnkübatörde %5 CO₂ içeren atmosferde hücreler çoğaltıldı (Resim 2.3).



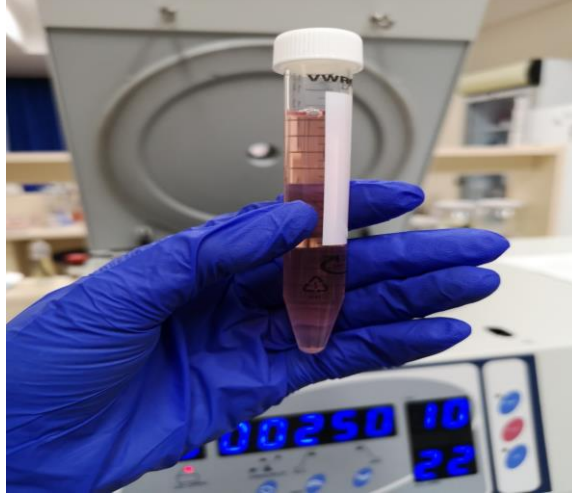
Resim 2.1. Sınıf II Biyogüvenlik Kabini

2.1.4.3. Hücrelerin Pasajlanması

İnkübe edilen hücreler, confluent (%70-80 yayılım) hale geldiklerinde pasajlama işlemi yapıldı. Çalışmada kullanılmak üzere, pasajlamaya yeterli hücre sayısına ulaşıncaya kadar devam edildi. Pasajlamada sırasıyla aşağıda belirtilen işlemler uygulandı;

- Kültür medyumunu 25 cm²'lik flasklardan uzaklaştırıldı ve hücrelerin yıkama işlemi 5 ml PBS ilave edilerek gerçekleştirildi.
- PBS, işlemin ardından ortamdaki hücreleri uzaklaştırıldı.
- Flask tabanında yapışmış durumda olan hücreler, 5 ml tripsin-Edta enzim solüsyonu ile muamele edildi ve inkubatörde 5 dk bekletilerek yüzeyden ayrılmasına izin verildi. Süspansiyon halinde tripsin-Edta solüsyonunda bulunan hücreler, 15 ml hacimde steril falkon tüpüne aktarıldı. Süspansiyonun üzerine enzim aktivitesini inhibe etmek için 5 ml kültür medyumunu ilavesi yapıldı.
- 250 g'de 10 dk santrifüj edildi (Resim 2.2.).
- Santrifüj sonrasında hücre pelletinin üst kısmında yer alan supernatant dökülerek 1,5 ml kültür medyumunu ilave edildi ve pipetasyon yapılarak hücreler tekrar süspansiyon edildi ve 500'er µl olarak bölündü.

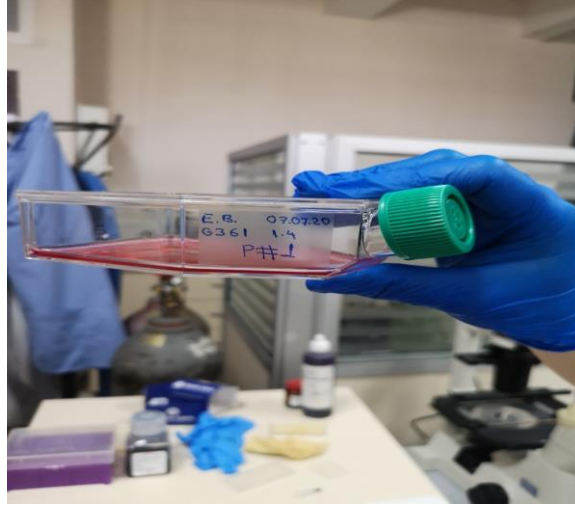
- Hücresleri içeren kültür medyumu eşit hacimde 3 ayrı 25 cm²'lik flaslara bölündü ve %5 CO₂ li içeren inkübatörde 37°C de hücreler inkübe edildi (Resim 2.3). Fazla sayıda hücre elde etmek için ileri pasajlarda 75 cm²'lik flaslara ekildi (Resim 2.4).



Resim 2.2. Santrifüj Sonrası Süpernatant ve Hücre Peleti İçeren Falcon



Resim 2.3. CO₂ li inkübatör



Resim 2.4. G-361 Hücrelerinin Ekildiği Flask

2.1.4.4. Hücre Sayılarının Hesaplanması

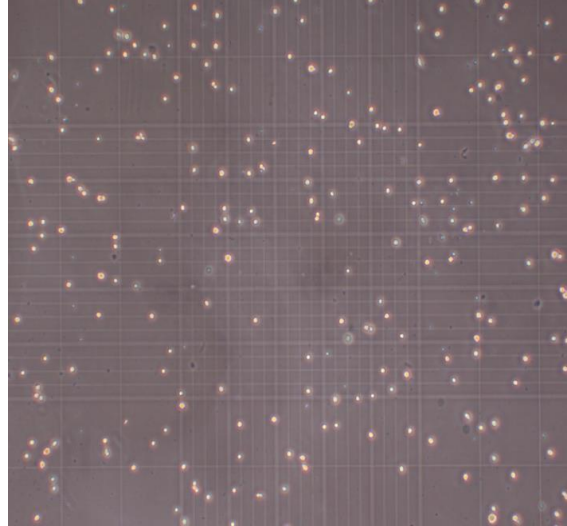
Bir mililitre kültür medyumunu ile sulandırılmış olan hücrelerden, ependorf tüp içerisine pipetle 30 µl alınarak ve 30 µl tripan mavisi ilavesi yapılarak karışım hazırlandı. Karışım Neubauer lamına alınarak lam üzerinde üç farklı alanda hücre sayımı inverted mikroskop altında yapıldı (Resim 2.5). Ortalama hücre sayısı, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

“1ml de hücre sayısı= Sayılan canlı hücre sayısı X sulandırma katsayısı X 10000”

Sitotoksosite analizi için 20 ml kültür medyumunu ile süspansiyon haline getirilen hücrelerden 96 kuyucuklu plakalara cm^2 ye 62500 hücre olacak şekilde hesaplanarak, hücre süspansiyonundan multipipet yardımıyla her bir kuyucuğa 200 µl konuldu ve 500 000 hücre ekimi yapıldı.



Resim 2.5. İverted Mikroskop



Resim 2.6. Neubauer Lamındaki Hücrelerin İverted Mikroskopta Görünümü. Parlak ve boya almayan hücreler canlı hücreler olarak kabul edildi ve bu hücreler sayıldı.

2.1.5. Deney Gruplarında Kullanılan Kimyasalın Dozları ve Uygulanmaları

% 0,1 Alkol Solusyonu

Saf alkol	100 μ l
Hücre Kültür Medyumu	99,9 ml

1 mg/ml Nonilfenol Stok Solusyonu Solvent (20 ml)

Nonilfenol	21,3 μ L
% 0,1 Alkol solüsyonu	20 ml

Bu stok solüsyonu hücre kültür medyumumu ile 1/10 oranında seyreltilerek 96 kuyucuklu plakalara ve flasklara ilave edildi ve sırasıyla 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml Nonilfenol dilüsyonları elde edildi.

Çalışma solüsyonu 1 (100 µg/ml)

Nonilfenol	stok solüsyon içerisinde 1 ml
Medium	9 ml

Çalışma solüsyonu 2 (10 µg/ml)

Nonilfenol	100 µg/ml içerisinde 1 ml
Medium	9 ml

Çalışma solüsyonu 3 (1 µg/ml)

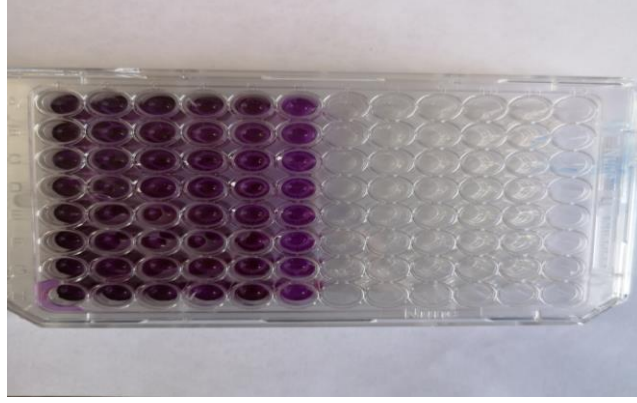
Nonilfenol	10 µg/ml içerisinde 1 ml
Medium	9 ml

Çalışma solüsyonu 4 (0,1 µg/ml)

Nonilfenol	1 µg/ml içerisinde 1 ml
Medium	9 ml

2.1.6. Sitotoksosite Analizi (MTT Yöntemi)

Sitotoksitenin belirlenmesinde, MTT yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, enzimatik aktivite değişimi formazon boyalarının azalmasına bağlı olarak kolorimetrik ölçülmektedir. Çıkan rengin yoğunluğu canlı hücre sayısı ile paralellik göstermektedir. Bu yöntemde, hücreler üzerinde hücrelere uygulanan maddelerin oluşturduğu sitotoksik etkiler belirlenebilmektedir.



Resim 2.7. Formazan kristallerinin DMSO ile çözüldükten sonraki görüntüsü

2.1.6.1. MTT Çalışma Solusyonu

Besi yeri ile 5 mg/ml stok solusyondan 1:10 dilusyon hazırlandı.

Stok solusyon : 5 ml.

Besi yeri : 45 ml

Biyogüvenlik kabin içerisinde, 96 kuyulu tabakalarının her bir kuyucuğuna hücreler ekildi. 24 saat hücre kültür medyumuyla inkübe edilen hücrelerin yüzeye tutunmaları sağlandı. Besiyerleri uzaklaştırıldı. Çalışma gruplarında hücre canlılığının belirlenmesi için NF çözeltileri 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı. Kontrol grubu olarak hücrelere sadece besi yeri uygulandı, solvent kontrolde ise %0,1 alkollü besi yeri kullanıldı. 48 saat inkübasyon süresi sonunda NF bileşiklerine maruz kalan kuyucuklardaki çözeltiler uzaklaştırıldı ve kuyucuklar PBS ile yıkandı.

Her bir kuyucuğa daha önceden hazırlanan 0,5 mg/ml MTT çözeltisinden 200 µl eklendi. 2,5 saat etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırıldı. Hücre içerisinde oluşan formazan kristallerini hücre dışı ortama çıkarılması ve çözülmesi için 200 µl DMSO ilave edildi ve çalkalayıcıda 10 dk çalkalandı. 96'lı plaktaki kuyucukların absorbansları 570 nm'de ölçüldü.

MTT çözeltisi ışığa hassas bir madde olduğundan deney karanlık ortamda çalışıldı. Kontrol grubunun absorbans değerlerinin ortalaması, %100 canlılık olarak kabul edildi.

Bu çalışma farklı günlerde 5 kez tekrarlanarak, elde edilen sonuçların ortalamaları hesaplandı.

2.1.6.2. MTT Stok Solusyon

PBS (7,4) içerisinde 5mg/ml MTT hazırlandı.

MTT (toz) : 60 mg

PBS : 12 ml

Bu solusyon 0,2 mikronluk filtreden geçirilerek -20 °C de saklandı.

2.1.6.3. Hücre Canlılığının Hesabı

Kontrol grubundaki hücrelerin canlılığı % 100 olarak kabul edilmiş, diğer hücre gruplarının canlılığı kontrole kıyasla % canlılık olarak hesaplanmıştır.

% Canlılık = $100 \times (\text{çalışma gruplarının absorbans değeri ortalaması-blank ortalama}) / (\text{kontrol gruplarının absorbans değeri ortalaması-blank ortalama})$.

2.1.7. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve RT-PCR Analizleri

Her bir flaska (T25) %80 konfluense ulaşan hücrelerden 4×10^5 - 5×10^5 hücre ekildi. 24 saat süresin ardından çeşitli NF konsantrasyonları ilave edilip 48 saat inkübasyona bırakıldı. Total RNA, ticari kit (Abt, 102-01-10) kullanılarak izole edildi. RNA izolasyonu sırasında kullanılacak bütün malzemeler uygun çözeltilerle önceden temizlenerek RNAase free bir ortam oluşturuldu. İzole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı nanodrop (Thermofisher, ND-2000) ile ölçüldü. RNA izolasyonu esnasında tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. cDNA, Sybr Green Pcr Master Mix (Abm, 204454) ve primer çifti (oligonükleotid) protokollere uygun olarak eklendi.

Transkripsiyon analizlerinde kullanılacak primerler NCBI dan elde edilen referans diziler kullanılarak primer 3 plus programı kullanılarak yapıldı. Primerler, referans diziler, baz uzunlukları ve Tm dereceleri çizelge 2.4’de verildi.

Çizelge 2.5. Çalışmada Kullanılan Primerler

PRİMERLER	F	R	TM (°C)	Baz Uzunluğu
CDNK1A (NM-000389,5)	CCGTGAGCGATGGAACTT CGC	TGGGAAGGTAGAGCT TGGGCA	60	104 bp
Bax (NM-00129142 8,2)	CGCCTCACTCACCATCTG GAA	CCTCAAGACCACTCT TCCCCA	58	170 bp
Bcl-2 (XM-04743773 3,1)	GAGGGGCTACGAGTGGG ATGC	GGAGGAGAAGATGCC CGGTGC	59	78 bp
Casp3 (XM-04741623 9,1)	GGAAGCGAATCAATGGA CTCTGGA	CCTGAGGTTTGCTGC ATCGAC	58	159 bp
P53 (XM-000546,6)	CTACAGTACTCCCCTGCC CT	ACCATCGCTATCTGA GCAGC	61	250 bp
β-aktin (NM-001101,5)	CACCCCAGCCATGTACGT TGC	CCGGAGTCCATCACG ATGCCA	56	84 bp

2.1.7.1. RNA İzolasyonu

İzole edilen ve -80 °C de saklanan hücreler RNA izolasyonu için oda ısısında çözdürüldü. Ticari kit protokolüne göre hücre içeren her bir mikrosantrifüj tüpüne 200 ml PBS eklendi. Üzerine 500 µl lizis buffer ve betamerkaptoetanol ilave edildi ve vortexlendi. Vortexlenen mikrosantrifüj tüpüne 10 µl proteinaz K eklendi ve 3 dk oda ısısında inkübe edildi. Ardından üzerine 500 µl Buffer P eklenip vortexlendi, oda ısısında 3 dk daha inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine 200 µl kloroform/izoamilalkol eklendi. Süre sonunda karışım 4 °C de 12000 g’de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda ependorfta 3 faz görüldü en üstte biriken sıvı (şeffaf

kısım) farklı bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Süpernatant hacminin 1,25 katı etanol (% 96) eklendi, pipetlenerek karıştırıldı. Daha sonra 700 µl lizat kolon tüplerine döküldü ve oda ısısında 12000 g'de 20 sn santrifüj edildi. Tüpün içeriği döküldü ve kolon tüpü tekrar mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Bu işlem tüm lizatlar kolona aktarılanaya kadar tekrarlandı. Kolona 700 µl yıkama solüsyonu eklendi oda sıcaklığında 20 sn süresince 12000 g'de santrifüj edildi tüp içeriği döküldü ve sütun tekrar mikrosantrifüj tüpünün üzerine yerleştirildi. Yukarıda belirtilen adımlara benzer olarak 600 µl yıkama solüsyonu eklendi ve iki defa tekrarlandı. Kolon tekrar 1 dakika en yüksek hızda santrifüjlendi ve 1,5 ml ependorf tüpün üzerine yerleştirildi. Kolonun merkezine 50-100 µl, nükleaz içermeyen 65-70 °C'de bekletilmiş ultra saf su eklendi, oda ısısında 1 dakika boyunca 12000 g' de santrifüj edildi. İzole edilen total RNA'lar nanodrop cihazı ile kalite miktar açısından değerlendirilmek üzere ölçüldü. Yapılan ölçümler sonrasında 260/280 oranı 2,0 ve üzeri olanlar çalışmada kullanıldı.



Resim 2.8. RNA İzolasyonu Aşamasında Ependorftaki Faz Değişimi

2.1.7.2. cDNA Sentezi

RNA izolasyonu sonrasında cDNA aşamasına geçildi. cDNA sentezinde ticari kit (Applied Biosystems By Thermo Fisher Scientific, 4368814) kullanıldı. cDNA sentezi için kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 2.6. da verilmiştir.

Çizelge 2.6. cDNA Sentezi İçin Kullanılan Kimyasallar

Bileşen	Hacim
---------	-------

5X RT Buffer	4 µl
Random Primers	1 µl
dNTP	1 µl
OneScript Plus RTase	1 µl
RNA	500 ng

cDNA karışımı hazırlandıktan sonra nanodropla ölçülen her bir RNA örneğinden 500 ng ve hacim 20 µl olacak şekilde nükleaz free H₂O eklendi. cDNA sentezi için karışım PCR cihazına konuldu ve çizelge 2.7. de verilen koşullar uygulandı.

Çizelge 2.7. cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları

	Adım1	Adım2
Sıcaklık(C)	55	85
Süre(dk)	15	5

Elde edilen cDNA lar Real Time PCR aşamasına kadar -80C° de muhafaza edildi.

2.1.7.3. RT-PCR

Real time PCR analizi için kullanılan kimyasallar ve miktarları çizelge 2.8. de verilmiştir. Hazırlanan PCR karışımları cihaza yüklenmiş ve uygulanan PCR koşulları çizelge 2.9. da verilmiştir. Her gen için uygulanan yapışma sıcaklıkları çizelge 2.5. te verildiği şekilde uygulandı. Analizler her bir örnek için 3 kez tekrarlandı. Real time PCR analizlerinde her gen ve her örnek için melting curve analizi yapıldı. Örneklerde DNA kontaminasyonu ile primer dimerleşmelerinin olmadığı görüldü.

Üç basamaktan oluşan (denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma) amplifikasyon işleminin ardından, elde edilen eğrilere ait döngü eşiği (Ct) değerleri belirlendi. mRNA ekspresyon düzeyi belirlendi. Referans geni olarak beta aktin kullanıldı. Her bir numuneye ait beta aktin gen düzeyine bakılarak, G-361 melanoma

hücrelerinde Kaspaz-3, Bcl-2, Bax, P21, P53 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri belirlendi.

Elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ifade düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplandı (Plaff, 2001). Bu hesaplama;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{actin } \beta})_{\text{deney grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{actin } \beta})_{\text{kontrol grubu}}$$

formülü uygulandıktan sonra hesaplanan değer her bir gen için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde yerine konularak mRNA ifade düzeyi misli olarak azalış ya da artış şeklinde belirlendi. Housekeeping gen olarak Actin- β kullanıldı ve her bir örneğe ait Actin- β gen düzeyine göre diğer genlerin ifade düzeylerinde normalizasyon uygulandı (Kumoğlu vd., 2019).

Çizelge 2.8. RT-PCR İçin Kullanılan Mix Bilgileri

Bileşen	Hacim
BrightGreen 2X qPCR MasterMix (Abm, 204454)	10 μ l
Forward Primer (10 μ M)	0,6 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	0,6 μ l
cDNA	1 μ l
Nuclease-free H2O	7,8 μ l

Çizelge 2.9. RT-PCR Sentez Koşulları

Adım	Sıcaklık	Standart süre	Döngü
Enzim aktivasyonu	95 °C	10 dk	1
denaturasyon	95 °C	15 sn	
Annealing/extension	56-61 °C	60 sn	40

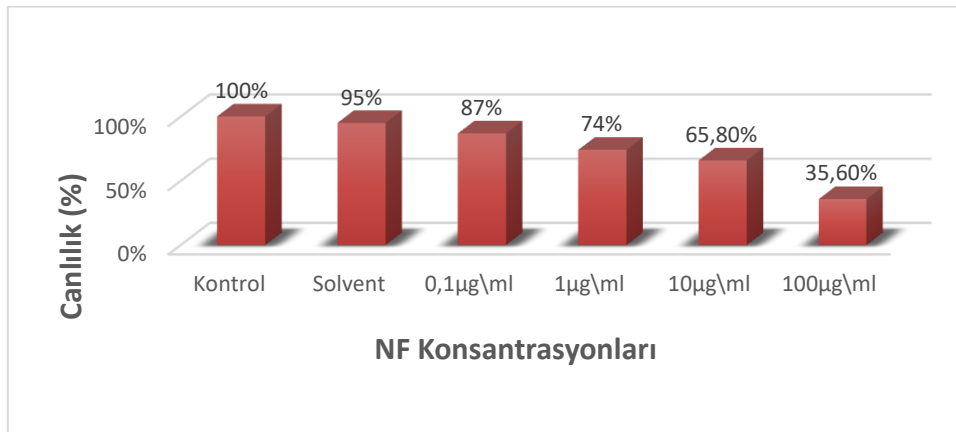
2.1.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmalardan elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 22.00 paket programı kullanılarak yapıldı. Normal dağılım gösterenler Shapiro-Wilk testi kullanılarak, normal dağılımında olmayan gruplar arasında farklılık Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi ve Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi uygulandı (Conover, 1980). Yapılan istatistiksel analizlerde tüm veriler ortalama ve \pm standart hata olarak verildi.

3. BULGULAR

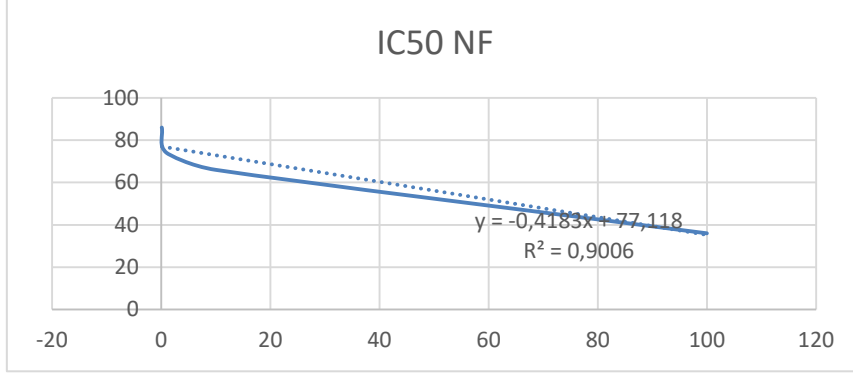
3.1. NF'nin G-361 Hücrelerinde Sitotoksikite Etkisi

NF'nin melanom kanseri (G-361) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi MTT analizi ile belirlenmiştir. 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda NF ile muamele edilen G-361 hücrelerinde belirlenen hücre canlılığı yüzdelerinden hareketle IC₅₀ değeri hesaplandı. Hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonun 64,82 $\mu\text{g/ml}$ olduğu hesaplandı (Grafik 3.2.). Hücre canlılığı sonuçları Grafik 3.1.'de verilmiştir.



Grafik 3.1. NF'nin çeşitli konsantrasyonlarından elde edilen hücre canlılığı düzeyleri.

MTT sonucunda en güçlü sitotoksik aktivite, en yüksek NF konsantrasyonu olan 100 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi.



Grafik 3.2. Nonilfenol % 50 İnhibisyon Dozu (IC50) Belirleme Grafiği

Çizelge 3.1. MTT Analiz Sonuçları

Grup	n	% Canlılık ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)	P
Kontrol	5	100,00 \pm 0,00 ^a	
Solvent	5	95,20 \pm 0,25 ^{ac}	
NF 0,1	5	86,90 \pm 0,33 ^{ad}	***
NF 1	5	74,10 \pm 0,10 ^{ad}	
NF 10	5	65,80 \pm 0,12 ^{bcd}	
NF 100	5	35,30 \pm 0,37 ^{bd}	

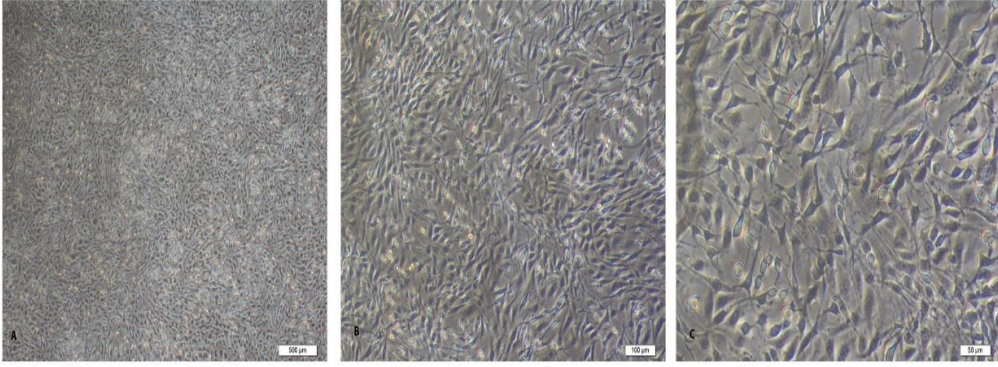
^{a, b, c, d, e, f}Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen grup ortalamaları arasındaki fark önemlidir.

***: p < 0.001, NF: nonilfenol, n: tekrar sayısı, \bar{x} : ortalama, $S\bar{x}$: standart hata

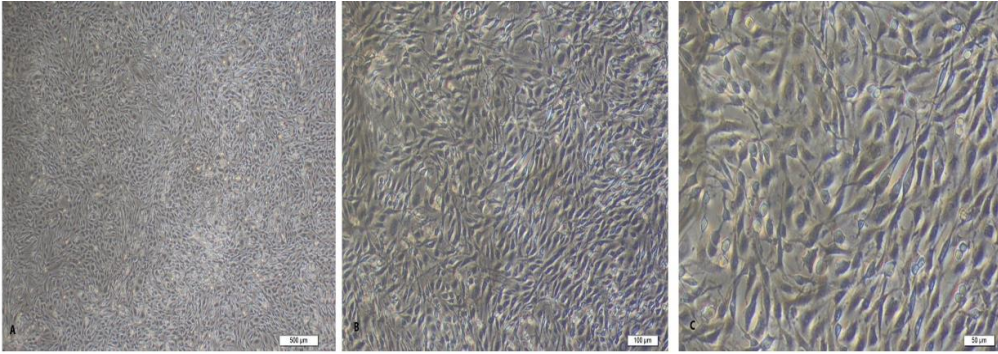
Verilerin normal dağılımına bakıldı ve shapiro-wilk significant değerine göre verilerin normal dağılmadığı görüldü (p<0,05), buna göre gruplar arasında Kruskal-wallis testi kullanıldı. Test sonucunda grupların arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi (p<0,001). Gruplar arasındaki farklılığı belirlemek için Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi uygulandı. Tüm gruplarda yapılan MTT analiz sonuçları çizelge 3.1. de gösterildi. Yapılan istatistiksel incelemede 48 saat inkübasyon süresi sonunda kontrol, solvent, NF 0.1 ve 1 µg/ml grupları arasındaki farklılığın önemli olmadığı görüldü (p>0,05). NF'nin 10 ve 100 µg/ml konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (p<0.001) gösterdi.

3.2. Farklı Dozlarda Uygulanan Nonilfenolün 48saat Sonrasındaki Hücre Morfolojileri

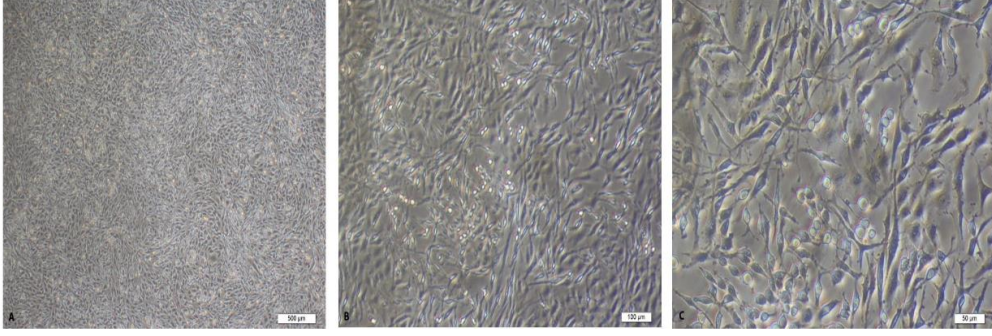
Farklı dozlarda Nonilfenol uygulanan G-361 melanoma hücrelerinin morfolojik görünüşleri Resim 3.1-3.6'da gösterildi. Hücrelerin tek tabaka olarak yüzeye tutundukları gözlemlendi. Düşük konsantrasyonlarda hücre yüzeyini kaplayan hücrelerin çoğalmasında az düzeyde önemsiz bir inhibisyon görülürken Resim 3.1-5, yüksek NF konsantrasyonunun hücrelerde sitotoksik etkiye neden olduğu ve hücre sayısının önemli derecede azaldığı saptandı (Resim 3.7)



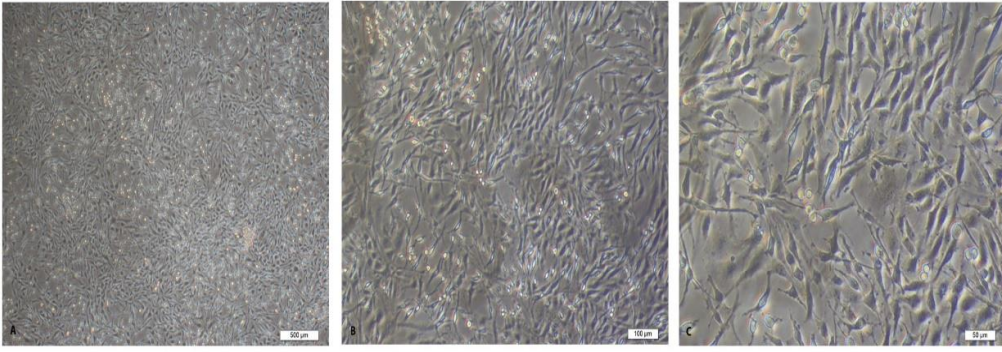
Resim 3.1. Kontrol Grubu 48 saat sonrası hücre morfolojileri. Bar: (A) 500 µm, (B) 100 µm, (C) 50 µm.



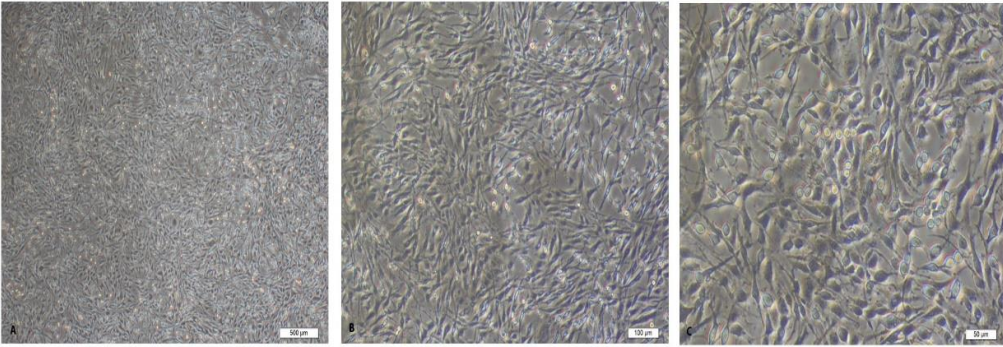
Resim 3.2. Solvent Grubu 48 saat sonrası hücre morfolojileri. Bar: (A) 500 µm, (B) 100 µm, (C) 50 µm.



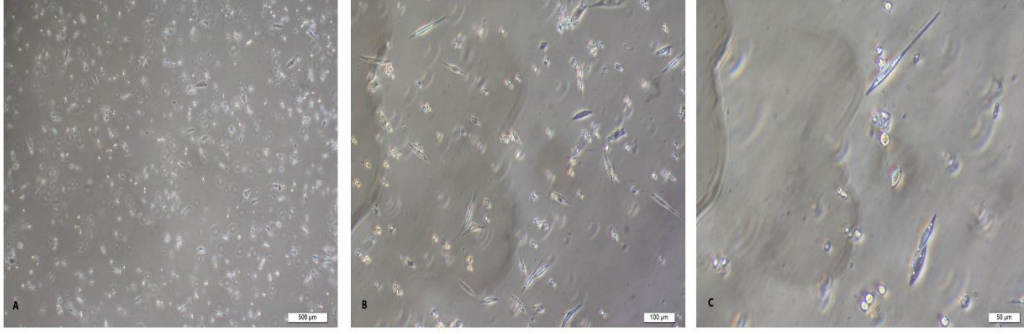
Resim 3.3. NF 0,1µg/ml grubu 48 saat sonrası hücre morfolojileri. Bar: (A) 500 µm, (B) 100 µm, (C) 50 µm.



Resim 3.4. NF 1µg/ml grubu 48 saat sonrası hücre morfolojileri. Bar: (A) 500 µm, (B) 100 µm, (C) 50 µm.



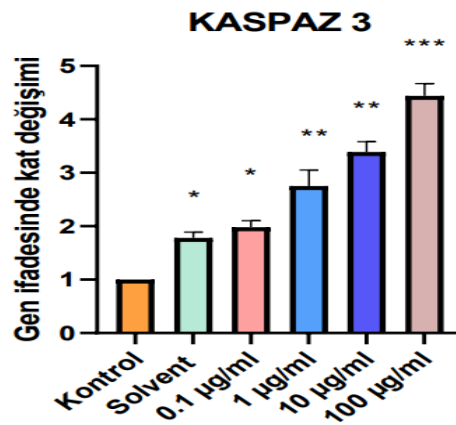
Resim 3.5. NF 10µg/ml grubu 48 saat sonrası hücre morfolojileri. Bar: (A) 500 µm, (B) 100 µm, (C) 50 µm.



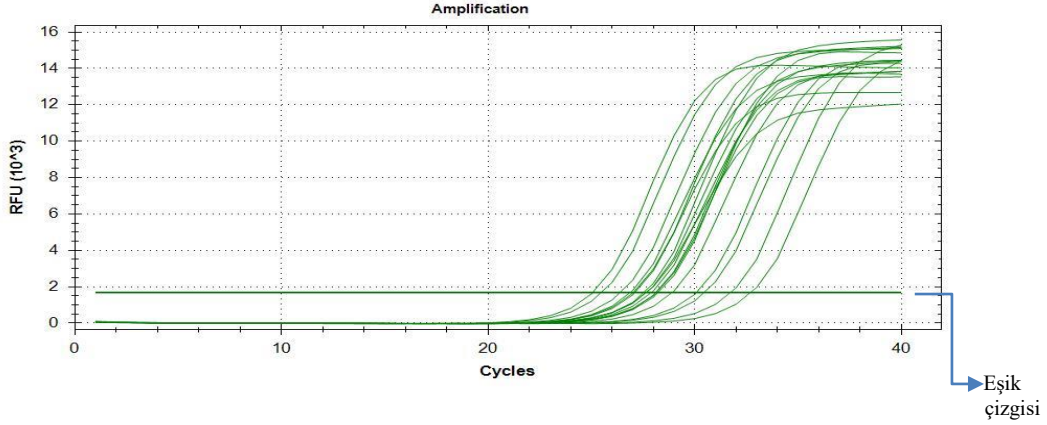
Resim 3.6. NF 100µg/ml grubu 48 saat sonrası hücre morfolojileri. Bar: (A) 500 µm, (B) 100 µm, (C) 50 µm.

3.3. G-361 Hücre Hattına Uygulanan Nonilfenolün Farklı Dozlarının Kaspaz 3 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi

G-361 hücre hattına NF'nin farklı konsantrasyon uygulamaları sonrası 48 saat süresince inkübe edilen hücrelerin Kaspaz 3 gen ekspresyon seviyeleri, RT-PZR yöntemi ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Solvent ($p<0,05$), 0,1 µg/ml ($p<0,05$), 1 µg/ml ($p<0,01$), 10 µg/ml ($p<0,01$) ve 100 µg/ml ($p<0,001$) NF uygulanan gruplarda ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi. Tüm gruplara ait 48 saat süreli inkübasyon sonunda elde edilen Kaspaz 3 gen ekspresyon seviyeleri Grafik 3.3.' te ve amplifikasyon eğrisi Grafik 3.4'te sunulmuştur.



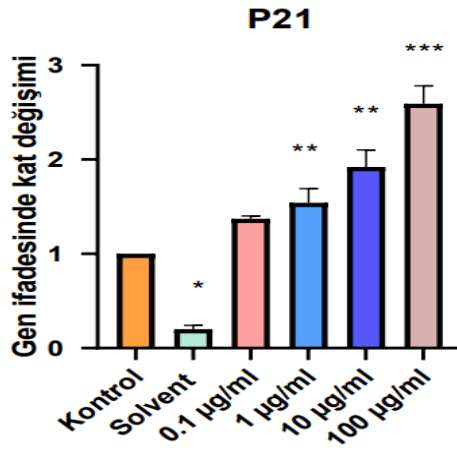
Grafik 3.3. G-361 Hücre Hattına Nonilfenolün farklı konsantrasyon uygulamaları sonrası 48 saat süresince inkübe edilen hücrelerin Kaspaz 3 gen ekspresyon seviyeleri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)



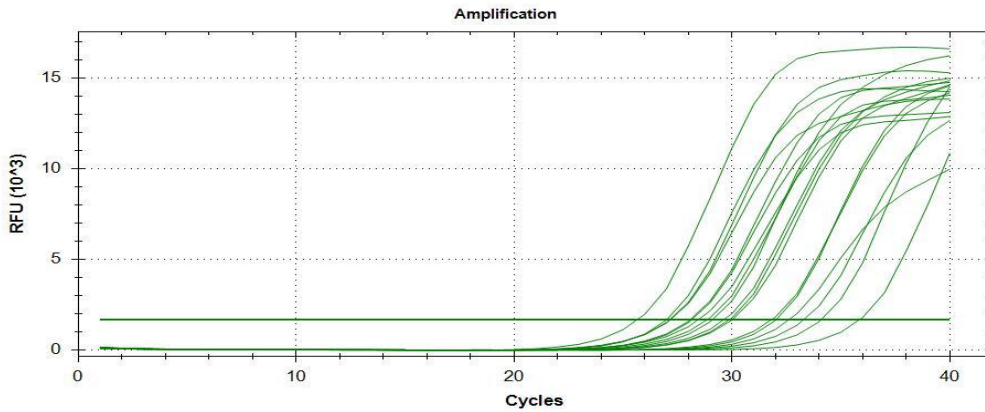
Grafik 3.4. Kaspaz3 Amplikon Eğrisi

3.4. G-361 Hücre Hattına Uygulanan Nonilfenolün Farklı Dozlarının P21 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi

G-361 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda NF uygulamaları sonrası 48 saatlik inkübasyonda hücrelerin P21 gen ekspresyon seviyelerine göre 1 $\mu\text{g/ml}$ ($p<0,01$), 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p<0,01$) ve 100 $\mu\text{g/ml}$ ($p<0,001$) NF uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi. Solvent grubu ($p<0,05$) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiki olarak anlamlı bir azalış gözlemlendi. Tüm gruplara ait 48 saatlik inkübasyonda P21 gen ekspresyon seviyelerinin verileri Grafik 3.5 ve amplifikasyon eğrisi Grafik 3.6'da sunulmuştur.



Grafik 3.5. G-361 Hücre hattına nonilfenolün çeşitli konsantrasyon uygulamaları sonrası 48 saat süresince inkübe edilen hücrelerin P21 gen ekspresyon seviyeleri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

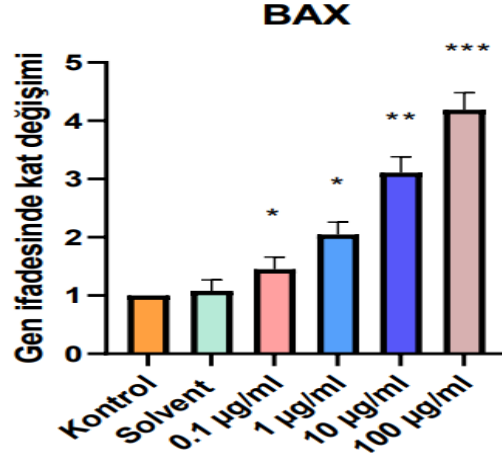


Grafik 3.6. P21 Amplikon Eğrisi

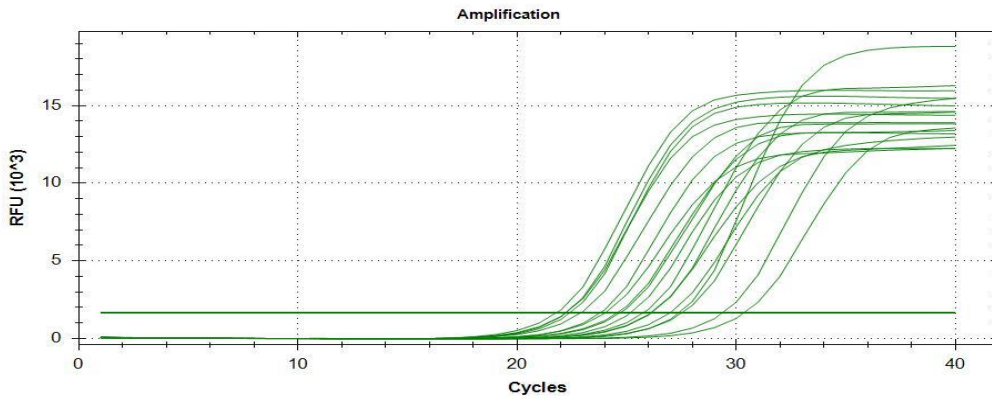
3.5. G-361 Hücre Hattına Uygulanan Nonylphenoln Farklı Dozlarının Bax Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi

G-361 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda NF uygulamaları sonrası 48 saatlik inkübasyonda hücrelerin Bax gen ekspresyon seviyelerine 0,1 µg/ml ($p<0,005$), 1 µg/ml ($p<0,05$), 10 µg/ml ($p<0,01$) ve 100 µg/ml ($p<0,001$) NF uygulanan gruplarda Bax ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında solvent grupta ise artış

olmasına rağmen istatistiki olarak önem görülmedi. Tüm gruplara ait 48 saatlik inkübasyonda Bax gen ekspresyon seviyelerinin verileri Grafik 3.7. ve amplifikasyon eğrisi Grafik 3.8.'de sunulmuştur.



Grafik 3.7. G-361 Hücre hattına nonilfenolün çeşitli konsantrasyon uygulamaları sonrası 48 saat süresince inkübe edilen hücrelerin Bax gen ekspresyon seviyeleri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

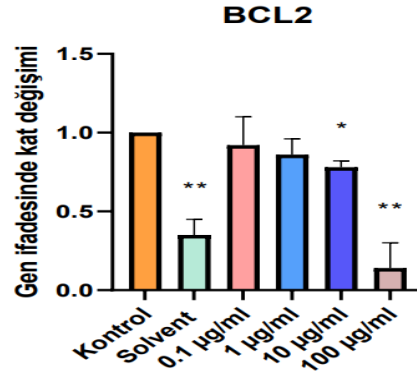


Grafik 3.8. Bax Amplikon Eğrisi

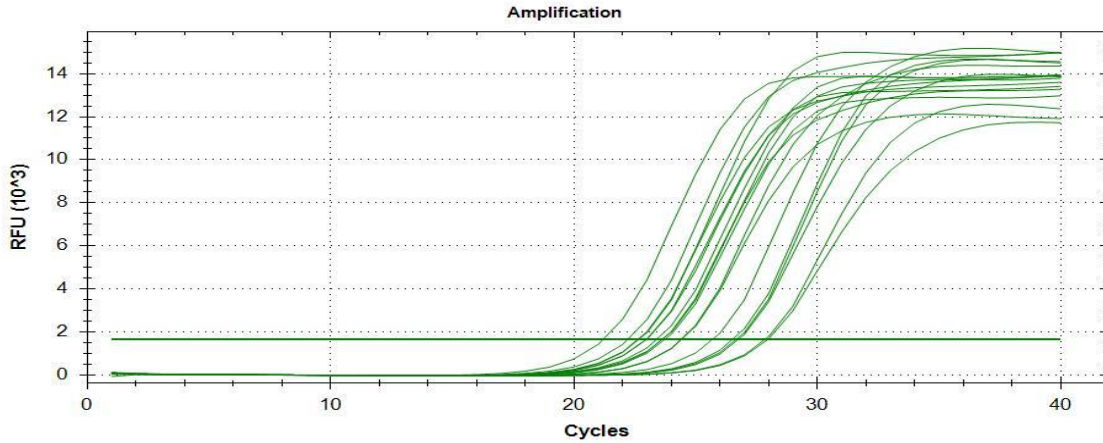
3.6. G-361 Hücre Hattına Uygulanan Nonilfenolün Farklı Dozlarının Bcl-2 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi

G-361 hücre hattına NF'nin farklı konsantrasyon uygulamaları sonrası 48 saat süresince inkübe edilen hücrelerin Bcl-2 gen ekspresyon seviyeleri, RT-PZR yöntemi ile analiz edildi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi sonucuna göre kontrol grubuna kıyasla

solvent grubu ($p<0,01$), 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p<0,05$) ve 100 $\mu\text{g/ml}$ NF uygulanan grupta istatistiki olarak azalma gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırılan 0,1 ve 1 $\mu\text{g/ml}$ NF uygulanan gruplarda ise azalma gözlenmesine rağmen istatistiki olarak önemli değildir. Tüm gruplara ait 48 saatlik inkübasyonda Bcl-2 gen ekspresyon seviyelerinin verileri Grafik 3.9. ve amplifikasyon eğrisi Grafik 3.10'da sunulmuştur.



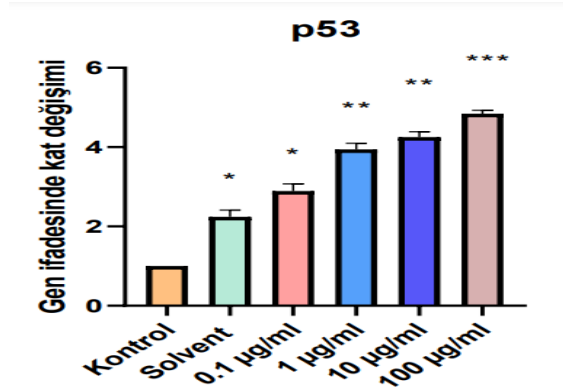
Grafik 3.9. G-361 Hücre hattına nonilfenolün çeşitli konsantrasyon uygulamaları sonrası 48 saat süresince inkübe edilen hücrelerin Bcl-2 gen ekspresyon seviyeleri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)



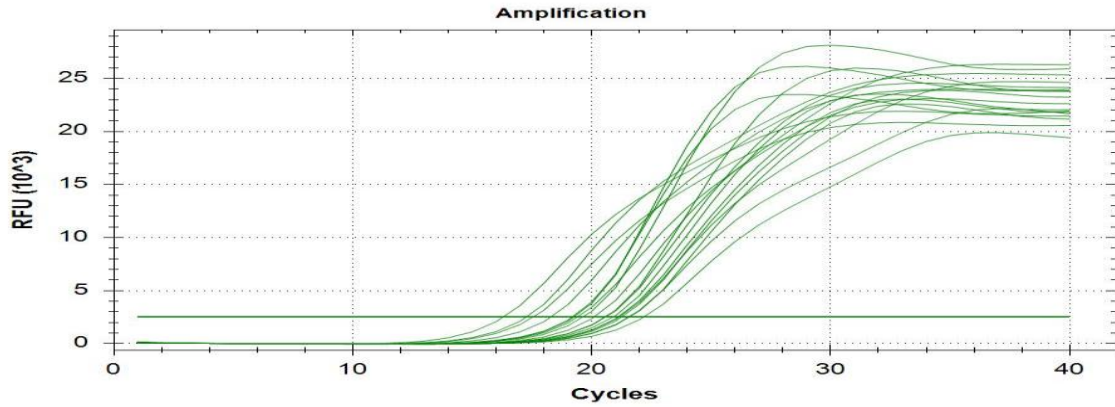
Grafik 3.10. Bcl-2 Amplikon Eğrisi

3.6. G-361 Hücre Hattına Uygulanan Nonilfenolün Farklı Dozlarının P53 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında solvent ($p<0,05$), 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ($p<0,05$), 1 $\mu\text{g/ml}$ ($p<0,01$), 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p<0,01$) ve 100 $\mu\text{g/ml}$ (0,001) NF uygulanan gruplarda istatistiki olarak önemli artış tespit edildi. Tüm gruplara ait 48 saatlik inkübasyonda P53 gen ekspresyon seviyelerinin verileri Grafik 3.11’de ve amplifikasyon eğrisi Grafik 3.12’de sunulmuştur.

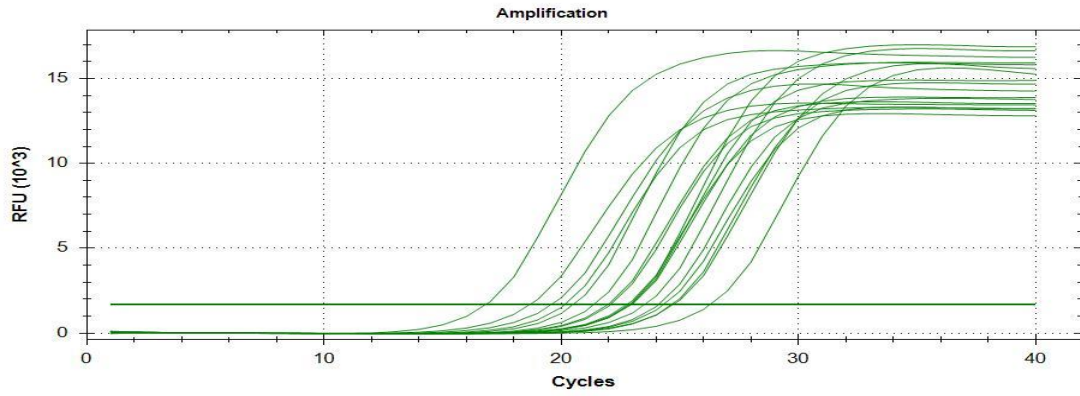


Grafik 3.11. G-361 Hücye hattına nonilfenolün çeşitli konsantrasyon uygulamaları sonrası 48 saat süresince inkübe edilen hücrelerin P53 gen ekspresyon seviyeleri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)



Grafik 3.12. P53 Amplikon Eğrisi

Ayrıca çalışmada kullanılan referans genin amplikon eğrisi de Grafik 3.13’de verilmiştir.



Grafik 3.13. Actb Amplicon Eğrisi

Çizelge 3.2. Gen Ekspresyonu Analiz Sonuçları

Grup	Kaspaz3 ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)	P21 ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)	Bax ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)	Bcl2 ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)	P53 ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)
Kontrol	1,00±0,00 ^d	1,00±0,00 ^d	1,00±0,00 ^d	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^d
Solvent	1,78±0,11 ^c	0,20±0,04 ^e	1,08±0,19 ^d	0,35±0,10 ^c	2,24±0,17 ^c
0,1 µg/ml	1,98±0,12 ^c	1,37±0,03 ^{cd}	1,45±0,21 ^c	0,92±0,18 ^a	2,89±0,18 ^c
1 µg/ml	2,75±0,30 ^b	1,54±0,15 ^c	2,05±0,21 ^{bc}	0,86±0,10 ^{ab}	3,94±0,16 ^b
10 µg/ml	3,39±0,19 ^b	1,92±0,18 ^{cb}	3,11±0,27 ^b	0,78±0,04 ^b	4,25±0,14 ^{ab}
100 µg/ml	4,44±0,23 ^a	2,59±0,19 ^a	4,19±0,29 ^a	0,14±0,16 ^c	4,84±0,09 ^a
P	***	**	**	*	**

*p<0,05 ** p<0,01 ***p<0,001

^{a, b, c, d, e, f}Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen grup ortalamaları arasındaki fark önemlidir. \bar{x} : ortalama, $S\bar{x}$: standart hata

Gen ekspresyonu analizinde Kaspaz 3, P21, Bax, Bcl-2, P53 genleri için dağılım normal olmayıp Kruskal-Wallis testi kullanıldı (çizelge 3.2.).

4. TARTIŞMA

EBK'ler hormon sistemlerine müdahale edebilir ve memelilerde olumsuz gelişimsel, üreme, nörolojik ve immünolojik etkiler yaratabilmektedir (Yang vd., 2015). Yapılan çalışmalarda, bu maddelerin insan sağlığını olumsuz etkilediği, doğurganlığın azalmasına, obezite, diyabet, endometriozis ve bazı kanser türleri dâhil olmak üzere belirli hastalıkların ilerlemesine neden olduğu gösterilmiştir (Lee vd., 2012; Kim vd., 2016; Ariemma vd., 2016; Jambor vd., 2016).

EBK'ler, hormon reseptörlerine anormal bir şekilde bağlanarak meme, yumurtalık ve prostat kanseri dâhil olmak üzere hormona duyarlı kanser başlangıcını ve ilerlemesini tetikleyerek üreme organlarının normal işlevlerini kesintiye uğratabilmektedirler (Park ve Choi, 2014; In vd., 2015). EBK'lar çevresel kirleticiler ve ticari ürünler, endojen hormonların işlevlerini taklit etmektedirler. Bu durum hormon işlevini değiştirebilmekte veya engelleyebilmektedir (Kim vd., 2016).

Aktif hormon maruziyeti hayatımızda yaygındır. Örneğin, sigara, otomobil egzozu ve kozmetik ürünlerdir ve bu bileşiklerin çoğu NF, zearalenon ve BPA gibi ksenoöstrojenlerdir. Ksenoöstrojenler, östrojen reseptörlerine rekabetçi bir şekilde bağlanarak vücutta östrojenik etkinlik göstermektedir (Liu vd., 2002). NF nin çeşitli kanserleri etkilediği rapor edilmiştir (Xie vd., 2019).

Biyokimyasal analizler, malign melanomda östrojen bağlayıcı proteinlerin bulunduğunu gösterse de, hassas ve daha spesifik bir immünohistokimyasal teknik kullanılarak yapılan çalışmada (Toma vd., 1999) melanomda östrojen reseptörleri bulunamamıştır.

Kolon kanserindeki etkileri araştırılmak için yapılan bir çalışmada (Qui vd., 2002) kolon kanser hücre hatları COLO205 ve SW480 kullanılmıştır. MTT ve flow sitometri deneyleri yapılarak NF nin apoptoz ve proliferasyon üzerine etkileri gözlemlenmiştir. NF'nin, COLO205 ve SW480 hücrelerinin proliferasyonunu doza bağlı olarak azalttığı bildirilmiştir (Qui vd., 2002). NF nin hücre döngüsü, apoptoz ve metastazı düzenleyen

siklin D1, siklin E, p21, Bax ve katepsin D gibi proteinleri modüle ederek prostat kanserinin ilerlemesini baskıladığı bildirilmiştir (Kim vd., 2016).

Bir çalışmada (Shirdel vd., 2020) 1, 10 ve 100 µg/l NF'nin farklı konsantrasyonlarının üreme hormonları ve karaciğer enzim seviyeleri üzerindeki etkilerini incelenmiştir. Sonuçlar, çevresel olarak ilişkili NF konsantrasyonlarının, seks steroidlerinin seviyelerini etkilediğini göstermiştir, östradiol/testosteron oranı artmıştır ve karaciğer, böbrek, testis dokularında histopatolojik lezyonlara neden olmuştur. NF, estradiol seviyelerini de önemli ölçüde arttırmıştır (Shirdel vd., 2020).

NF'nin insanlarda östrojenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Yang vd., 2015). NF'nin meme, yumurtalık ve prostat kanserinde hücre döngüsü, apoptoz ve metastaza etki ederek kanserin ilerlemesini artırabileceğini ortaya konmuştur (Kim vd., 2015).

Duan vd. (2016) yaptıkları hücre kültürü çalışmasında NF stok çözeltisi DMSO içerisinde çözdürmüşler ve % 0,1 (v/v) DMSO konsantrasyonunun sitotoksik etkiye neden olmadığını bildirmişler. Bizim de çalışmamızda hem DMSO hem etanol çözücü olarak kullanılmış ve iki çözücüde de % 0,1 oranında kullanım aynı canlılık oranları elde edilmiştir.

Kim vd (2016) yaptığı çalışmada NF'nin prostat kanseri hücrelerindeki proliferasyon etkisine bakılmıştır ve konsantrasyon arttıkça hücre canlılığında düşüş görülmüştür.

Yaptığımız çalışmada NF'nin sitotoksik etkiye etkisini saptamak üzere MTT testi kullanıldı. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre melanom hücrelerine 100 µg/ml NF uygulamasının kontrol grubuna göre hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı, NF'nin konsantrasyonu arttıkça kanser hücre canlılığının kontrol grubuna göre düştüğü görüldü (p<0,05).

Farklı kanser hücre hatları üzerinde NF'nin etkilerinin incelendiği bir çalışmada (Yang vd., 2018) Kolon kanser hücrelerinde (Colo205) NF'nin 10⁻⁶ mol/L konsantrasyonunun hücre canlılığı ve çoğalmasının daha olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir.

Forte vd. (2016) insan prostat tümörjenik olmayan hücre hatlarında yaptıkları bir çalışmada NF nin 10^{-6} mol/L uygulanan grubun 10^{-12} mol/L NF uygulanan gruba göre hücre canlılığını etkilediğini bildirmişlerdir.

Başka bir çalışmada (Bistakowa vd., 2016) NF'nin, H295R insan adrenokarsinom hücre hattına uygulanan 0,04, 0,2, 1, 2,5 ve 5 µg/ml konsantrasyonlarında çeşitli etkileri ortaya konulmuştur. Canlılığın % 100' ünü temsil eden kontrol grubuyla karşılaştırma gözlemlenmiş olup hücrelerin canlılığı 5 µg/ml NF konsantrasyonunda kontrol grubuna göre hafifçe azalmıştır (Bistakowa vd., 2016).

Jambor vd. (2017) leyding hücrelerine 0,04, 0,2, 1, 2,5 ve 5 µg/mL konsantrasyonlarda NF uyguladıkları çalışmada tüm grupların canlılığa etki ettiği rapor edilmiştir.

NF ve türevleri ile farklı hücre hatlarında yapılan sitotoksisite çalışmalarındaki sonuçlar ile bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların benzer olduğu görülmüştür. Dozun konsantrasyonu arttıkça, canlılığı etkilediği ve azalttığı belirlenmiştir.

Apoptozis veya programlı hücre ölümü, efektör bir yolağın ortak akışında birleşmiş intrinsik ve ekstrinsik sinyallerin birbirleriyle etkileşiminden kaynaklanan bir süreç olarak bilinmektedir (FGE vd., 2001). Birçok hücre tipinde ve değişik dokularda görülen apoptozis, hücre ölümü ile sonuçlanan belirli morfolojik değişiklikler ile ortaya çıkmaktadır. Apoptozis yollarındaki değişikliklerin tümör gelişimi ve progresyonuna katkıda bulunduğu, kanser hücrelerinin daha uzun süre hayatta kalmasına izin verildiği bildirilmiştir (Reed, 1999). Melanoma kanserlerinin hem proapoptotik hem de antiapoptotik proteinlerin farklı miktarlarda üretimiyle birlikte programlı hücre ölümüne dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Shariat vd., 2003; Shariat vd., 2004).

Apoptotik mekanizmalar içinde yer alan ve bir apoptozis inhibitörü olan Bcl-2, melanoma karsinomunun prognozunu belirlemek için birçok çalışmada kullanılan bir faktör olarak bilinmektedir (Nakupoulou vd., 1998). Bcl-2'nin lenfoma, lösemi, nöroblastom ve prostat karsinomlarında yüksek bulunması kötü prognozun göstergesi

olarak bildirilmiştir (Kong vd., 1998). Çalışmamızda apoptozu engelleyen anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2 gen ekspresyon düzeyinde incelendiğinde, NF'nin tüm gruplarda görülen ekspresyon düzeyini azaltması hücrelerin fonksiyonlarını yitirdiğini ve apoptozisin başladığı göstermektedir.

Bax ve Bcl-2 genleri ile şu ana kadar yapılan birçok çalışmada farklı maddelerin kanser hücrelerinde etkisi incelenirken bu genlerin apoptoz üzerindeki rolleri araştırılmıştır (Zeestraten vd., 2013; Zhu vd., 2013). Yapılan çalışmalar Bcl-2 ve Bax genlerinin hücre proliferasyonu ve apoptozda kilit rol oynadıklarını göstermektedir (Thomas vd., 2013). NF hücrelerde apoptoz yollarında etkili olan Bcl-2 ailesinin ekspresyonunu etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada (Low vd., 2011) NF'nin, proapoptotik gen olan Bax'ın ekspresyonunu artırıcı ve antiapoptotik gen olan Bcl-2'nin ekspresyonunu baskılayıcı etkisi saptanmıştır.

Bu çalışmada NF'nin doza bağlı olarak G-361 hücreleri üzerindeki apoptotik aktivasyonun araştırılması için apoptozda görev alan genlerin (P53, Bax, Bcl-2, Kaspaz 3, P21) RT-PCR metodu ile gerçek zamanlı olarak gen ekspresyonlarındaki değişimleri mRNA seviyesinde saptanmıştır.

Kanser hücrelerinde apoptozun uyarılması ve apoptotik moleküler yolağının aydınlatılması çok önemlidir. Bu konuda birçok in vivo çalışmalar bulunmaktadır (Ogur, 2014).

Son yıllarda bir tümör baskılayıcı gen olan P53 ve apoptozisi kontrol eden Bcl-2 geninin, birçok tümörün gelişiminde ve seyrinde rol oynadığı rapor edilmektedir (Süllü ve ark., 2006). Bu nedenle çalışmamızda hem P53 geni hem de Bcl-2 geni ile çalışma yapılmıştır.

Hücre döngüsünün G1/S fazında tutulması P53'ün kanserdeki başlıca rolüdür (Geske vd., 2000). Çalışmamızda, G-361 hücrelerinde mitokondriyal yolun uyarılıp uyarılmadığının anlaşılabilmesine adına, farklı konsantrasyonlarda NF hücrelere uygulandıktan 48 saat sonra, melanom hücresinde apoptozda intrinsik yolun en önemli düzenleyicisi olarak bilinen P53, Bax ve Bcl-2 genlerinin mRNA seviyesindeki

ekspresyon sonuçları (Çizelge 3.2.) gösterilmiştir. Bu çalışmada, NF'nin 10 µg/m ve 100 µg/ml konsantrasyonu, kontrol grubuna göre P53 ekspresyonunu yaklaşık 4kat aktive ettiği, bu etkinliğin solvent, 1 µg/ml ve 0,1 µg/ml NF uygulanan gruba göre önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0,001). Bu artışın NF'nin kanserli hücre DNA'sında oluşturduğu hasar sonucunda indüklendiğini düşündürmektedir. P53 genindeki artışa bağlı olarak Bcl-2/Bax oranında da apoptoz lehine anlamlı değişme olduğu görülmektedir. Sonuçlar (Fridman ve Lowe, 2003) bize NF'nin, P53 aracılı yollar üzerinden G-361 hücrelerinde apoptoza sebep olduğunu göstermektedir.

Hücresel sistemde apoptozisin düzenlenmesinde ve apoptotik değişikliklere karşı koruyucu olan Bcl-2 aile üyelerinden biri olan Bax tümör gelişimi ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda genel gruplar arasındaki farklılıklar incelendiğinde NF konsantrasyonunun artması Bax gen ekspresyonunun arttığını göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, apoptozisin ana yürütücüsü olan kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri nisbi değişime göre incelendiğinde 100 µg/ml NF uygulanan grupta daha fazla hasar oluşturduğu bulunmuştur. Ayrıca tüm veriler dikkate alındığında artan NF konsantrasyonuna bağlı olarak kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyinin uyarıldığı ve kaspaz-3'ün daha fazla eksprese olduğu görülmektedir. Sonuçlar, Kaspaz 3'ün ekspresyon seviyesini artırması yoluyla apoptoza gittiğini düşündürmektedir. Ayrıca yapılan farklı çalışmalarda genel olarak, tümör hücrelerinin dışsal yola olan duyarlılığının içsel yola göre daha fazla olduğu belirtilmektedir (Lopez ve Tait, 2015).

P21 geni, hücre döngüsü inhibitörüdür. P53'e bağlı veya bağlı olmayan yollarla kontrol edilebilmektedir. Normal ve kanser hücrelerindeki işlevi hakkında ortaya çıkan güncel bilgiler, P21 geninin birçok araştırma alanına yeni kapılar açmıştır (El-Deiry, 2016). Hücrelerin 48 saatlik inkübasyonundan elde edilen P21 ekspresyon analizi verilerine göre, 0,1, 1, 10 ve 100 µg/ml konsantrasyonda NF uygulamasının P21 ekspresyon seviyesini kontrol grubuna göre kıyaslandığında artırdığı saptanmıştır.

Sunulan bu çalışmada cilt kanseri hucelerinde NF'nin etkileri in-vitro bir modelle tespit edilmeye çalışılmıştır. İncelenen apoptotik mekanizmalar, NF etkisine bağlı olarak malign melanomun gen duzeyinde araştırılmasına yardımcı olacaktır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kimyasallar günlük hayatımızın önemli bir bileşenidir. Ancak endokrin bozucular olarak bilinen bazı kimyasalların vücudun endokrin sistemi üzerinde zararlı etkileri kaçınılmazdır (Monneret, 2017). EBK'lar, insanlarda ve vahşi hayvanlarda iç hormonal dengeyi bozan olumsuz etkilere yol açan çok çeşitli bileşiklerin adıdır (Lagos-Cabre ve Moreno, 2012; Prins vd., 2014; Gore vd., 2015; Bunay vd., 2017). BPA ve NF insan biyolojik örneklerinde serum, anne sütü, idrar, fetal kan, ve göbek kordon kanında tespit edilen, plastik ve deterjan endüstrisinde kullanılan en bilinen EBK'lerden ikisidir (Gore vd., 2015).

Çalışmamızda kullanılan apoptotik ve anti-apoptotik genlerle (Kaspaz-3, Bcl-2, Bax, P53 ve P21) yapılan araştırmalarla, çalışmamızın sonuçları paralellik göstermektedir. Yapılan çalışmaların hemen hemen hepsinde NF canlılara farklı yollarla verilirken, bu çalışmada kanserli hücre hattına uygulanmıştır. Gen ekspresyon düzeylerinden elde edilen bulguların diğer çalışmalarla paralellik gösterdiği görülmüş ve NF'nin melanom hücrelerinde hasar oluşturduğu belirlenmiştir.

Bu araştırmada, Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, NF'nin doz artışına paralel olarak Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyinin arttığı belirlenmiştir.

Anti-apoptotik Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, NF'nin ekspresyon düzeylerini azalttığı, doz konsantrasyonunun artması ekspresyon seviyesinde daha fazla azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir.

Hücrede düzenleyici rol oynayabilen p53 geninin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, NF'nin tüm gruplarda gen ekspresyon seviyesini artırdığı bulunmuştur.

Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda bu tez çalışmasında kullanılan NF maddesinin moleküler mekanizmasını daha iyi anlaşılabilmesi için farklı yollar üzerindeki etkilerin de araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abbas, A., Najmeh, F., Ghader, M., Seyed, M., Gheibi, H. (2019). Circular rnas: epigenetic regulators in cancerous and noncancerous skin diseases, *Cancer Gene Therapy*, DOI.org/10.1038/s41417-019-0130-x.
- Abbas, T., Dutta, A. (2009). P21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer*, 9:400–414.
- Abildgaard, C., Guldberg, P. (2015). Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. *Trends Mol Med*, 21:164-71.
- Adams, J.M., Cory, S. (2001). Life or death decions by the bcl-2 family. *Trends. Biochem Sci*, 26: 61-6.
- Adrain, C., Martin, S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, 26: 390-7.
- Aguissa-Touré, A.H., Li, G., (2012). Genetic alterations of pten in human melanoma. *Cell Mol Life Sci*, 69:1475-91.
- Ahmed, S.A. (2000). The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology*, 150: 191–206.
- Aitken, R.J., Roopman, P., Lewis, S.E.M., (2004). Seeds of concern. *Nature*. 432(7013):48–52.
- Aly, H.A.A., Domènec, O., Banjar, Z.M. (2012). Effect of nonylphenol on male reproduction: analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261; 134-141.
- American Cancer Society. (2014). Cancer Facts& Figures [Http://Www.Cancer.Org/Acs/Groups/Content/@Research/Documents/Webcontent/Acs-pc-042151.Pdf. Accessed June 2.]
- American Cancer Society. Cancer facts and figures. (2008). American Cancer Society; Atlanta. 1-70. Available from: <http://www.cancer.org>.
- Amirinejad, R., Rezaei, M., Shirvani, Z.F. (2020). An update on long intergenic noncoding RNA P21: a regulatory molecule with various significant functions in cancer, *Cell Biosci*, 10: 82.
- Andersen, L.B., Fountain, J.W., Gutmann, D.H., et al, (1993). Mutations in the neurofibromatosis 1 gene in sporadic malignant melanoma cell lines. *Nat Genet*, 3:118-21.
- Ardeshir, R.A., Rastgar, S., Salati, P.A., Zabihi, E., Movahedinia, A., Feizi, F. (2022). The effect of nonylphenol exposure on the stimulation of melanomacrophage centers, estrogen and testosterone level, and ER α gene expression in goldfish, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 254: 109270.
- Ariemma, F., D'Esposito, V., Liguoro, D., Oriente, F., Cabaro, S., Liotti, A., Cimmino, I., Longo, M., Beguinot, F., Formisano, P., Valentino, R. (2016). Low-dose bisphenol-a impairs adipogenesis and generates dysfunctional 3t3-l1 adipocytes, DOI.org/10.1371/journal.pone.0150762.
- Basu, A., Haldar, S. (1998). The relationship between bcl-2, bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod*, 4: 1099-1109.

- Behari, J., Kesari, K.K., (2006). Effects of microwave radiations on reproductive system of male rats. *Embryo Talk*. 1(1):81–85.
- Behnia, M., Robertson, K.A., Martin, W.J. (2000). Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Official Publication Of The American College Of Chest Physicians(Chest)*, 117: 1771-7.
- Bender, L.M., Morgan, M.J., Thomas, L.R., Liu, Z.G., Thorburn, A. (2005). The adaptor protein tradd activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death and Differentiation*, 12: 473–481.
- Biegging, K.T., Mello. S.S., Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer*, 14, 359–370.
- Bildik, A., Bayar, İ. (2018). Kanserde apoptotik yolakların inhibisyonu turkiye klinikleri. *J Vet Sci*. 9(2):42-51. DOI: 10.5336/vetsci. 2018-62141.
- Bjarnadottir, H., Jonsson, J.J. (2005). A rapid real-time qRT-PCR assay for ovine β -actin mRNA, *Journal of Biotechnology*. 117, 2:173-182.
- Bonefeld-Jørgensen, E.C., Long, M., Hofmeister, M.V., Vinggaard, A.M. (2007). Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: New data and a brief review. *Environ Health Perspect*, 115 Suppl 1:S69–S76.
- Brandão, F.V., Pereira, A.F., Gontijo, B. (2013). Epidemiological aspects of melanoma at a university hospital dermatology center over a period of 20 years. *An Bras Dermatol*, 88(3):344-53.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 68 394–424.
- Brenner, M., Hearing, V.J. (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*, 84: 539-549.
- Brunelli, E. (2018). Histological and ultrastructural alterations of the Italian newt (*Lissotriton italicus*) skin after exposure to ecologically relevant concentrations of nonylphenol ethoxylates. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 60, 17e27. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.04.007>.
- Buitron, G., Angeles, X., Torres, B., Glenda, C.B. (2015). Removal of p-nonylphenol isomers using nitrifying sludge in a membrane sequencing batch reactor.
- Bunay, J., Larriba, E., Moreno, R.D., Del, Mazo J. (2017). Chronic low-dose exposure to a mixture of environmental endocrine disruptors induces microRNAs/isomiRs deregulation in mouse concomitant with intratesticular estradiol reduction. *Sci. Rep.* 7:3373.
- Bunay, J., Larriba, E., Patino-Garcia, D., Cruz-Fernandes, L., Castaneda-Zegarra, S., Rodriguez-Fernandez, M., Del Mazo, J., Moreno, R.D. (2017). differential effects of exposure to single versus a mixture of endocrine-disrupting chemicals on steroidogenesis pathway in mouse testes. *Toxicol. Sci.* doi: 10.1093/toxsci/kfx200.
- Bushra, A.H., Leila, R., Amir, A.A., Jafar, S.R. (2011). Histological Study of Testes and Sperm Parameters in Adult Mice Exposed to 50 Hz Electromagnetic Field during Developmental Period. *Annals of Biological Research*, 2(5):455–462.

- Cardinali, M., Maradonna, F., Olivotto, I., Bortoluzzi, G., Mosconi, G., Polzonetti-Magni, A.M., Carnevali, O. (2004). Temporary impairment of reproduction in freshwater teleost exposed to nonylphenol. *Reproductive Toxicology*, 18; 597-604.
- Careghini, A., Mastorgio, A.F., Saponaro, S., Sezenna, E. (2015). Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 5711e5741. DOI.org/10.1007/s11356-014-3974-5.
- Carmona-Gutierrez, D., Bauer, M.A., Zimmermann, A., Aguilera, A., Austriaco, N., Ayscough, K., Balzan, R., Bar-Nun, S., Barrientos, A., Belenky, P., et al. (2018). Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature. *Microb. Cell.* 5:4–31.
- Chao, D.T., Korsmeyer, S.J. (1998). Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annual Review Of Immunology*, 16: 395- 419.
- Che, X., Fang, Y., You, M., Xu, Y., Wang, Y. (2020). Exposure to nonylphenol in early life increases pro-inflammatory cytokines in the prefrontal cortex: Involvement of gut-brain communication. *Chem. Biol. Interact*, 323:109076.
- Chen, H., Zhao, L., Jimmy, Q. (2019). Determination and reduced life expectancy model and molecular docking analyses of estrogenic potentials of 17 β -estradiol, bisphenol A and nonylphenol on expression of vitellogenin gene (vtg1) in zebrafish. *Chemosphere*. 221:727-734
- Chen, L., Liu, S., Tao, Y. (2020). Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications, *Signal Transduct Target Ther.*5: 90.
- Chen, Q., Sun, X., Luo, X., Wang, J., Hu, J., Feng, Y. (2020). PIK3R3 inhibits cell senescence through p53/p21 signaling. *Cell Death Dis.* 11(9): 798.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green, D.R. (2010). The bcl-2 family reunion. *Mol. Cell*, 37: 299–310.
- Colditz, G.A. (1993). Epidemiology of breast cancer. findings from the nurses healthstudy. *Cancer*, 71: 1480–1489.
- Colerangle, J.B., Roy, D. (1996). Exposure of environmental estrogenic compound nonylphenol to 20 noble rats alters cell-cycle kinetics in the mammary gland. *Endocrine*, 4: 115-22.
- Conover, W.J. (1980). Practical nonparametric statistics. 2nd ed. New yorg: john wiley&sons, 229-239.
- Coşkun, G., Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv*, 20: 145.
- Cristiano, G., Arman, R., Claudia, A., Peter, D., Emilie, C., Elodie, M.H., Jesuchristopher, J., Jasper, W., Ciaran, C., Mairin, R., Madhuri, W., Joost, V.O., William, M.G., Markus, R. (2020). Low expression of pro-apoptotic proteins bax, bak and smac indicates prolonged progression-free survival in chemotherapy-treated metastatic melanoma. *Cell Death & Disease*, 11: 124.
- Çenesiz, M., Atakisi, O., Akar, A., Onbilgin, G., Ormanci, N., (2011). Effects of 900 and 1800MHz Electromagnetic Field Application on Electrocardiogram, Nitric Oxide, Total Antioxidant Capacity, Total Oxidant Capacity, Total Protein, Albumin and Globulin Levels in Guinea Pigs. *Kafkass Univ Vet Fak Derg.* 17(3):357–362.
- D’Orazi, G., Cordani, M., Cirone, M. (2020). Oncogenic pathways activated by pro-inflammatory cytokines promote mutant p53 stability: clue for novel anticancer therapies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, DOI: 10.1007/s00018-020-03677-7.

- Daniel, P.T., Koert, U., Schuppan, J. (2006). Apoptolidin: induction of apoptosis by a natural product. *Angew Chem. Int. Ed. Engl*, 45, 872-893.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., et al, (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417:949-54.
- Davis, C.D., Emenaker, N.J., Milner, J.A. (2010). Cellular proliferation, apoptosis and angiogenesis: Molecular targets for nutritional preemption of cancer. *Seminar in Oncology*, 37(3): 243–257.
- Davis, D.L., Bradlow, H.L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D.G., Anton-Culver, H. (1993). Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer, *Environ. Health Perspect*, 101: 372–377.
- Delehedde, M., Cho, S.H., Sarkiss, M., Brisbay, S., Davies, M., El-Naggar, A.K., McDonnell, T.J. (1999). Altered expression of bcl-2 family member proteins in nonmelanoma skin cancer. *Cancer*, 85: 1514-22.
- Deng, W., Gopal, Y.N., Scott, A., et al, (2012). Role and therapeutic potential of PI3KmTOR signaling in de novo resistance to BRAF inhibition. *Pigment Cell Melanoma Res*, 25:248-58.
- Di, Q.N., Cao, W.X., Xu, R., Lu, L., Xu, Q., Wang, X.B. (2018). Chronic low-dose exposure of nonylphenol alters energy homeostasis in the reproductive system of female rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 348; 67-75.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* DOI.org/10.1210/er.2009-0002.
- Diel, P. (2002). Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms, *Toxicol. Lett*, 127:217–224.
- Dobrzynska, M.M. (2014). DNA damage in organs of female and male mice exposed to nonylphenol, as a single agent or in combination with ionizing irradiation: a comet assay study. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 772:14–19.
- Domingues, B., Lopes, J., Soares, P., Populo, H. (2018). Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther*, 7: 35–49.
- Duan, P., Hu, C., Butler, H.J., Quan, C., Chen, W., Huang, W., Tang, S., Zhou, W., Yuan, M., Shi, Y., et al. (2016). Effects of 4-nonylphenol on spermatogenesis and induction of testicular apoptosis through oxidative stress-related pathways. *Reprod. Toxicol*, 62:27–38.
- Duan, P., Hu, C., Quan, C., Yu, T., Zhou, T., Yuan, M., Shic, Y., Yang, K. (2016). 4-Nonylphenol induces apoptosis, autophagy and necrosis in Sertoli cells: Involvement of ROS-mediated AMPK/AKT-mTOR and JNK pathways. *Toxicology*, 341–343, 28–40.
- Durna, Z. (2013). İç Hastalıkları Hemşireliği, *Akademi Kitapevi*, İstanbul.
- Dzwierzynski, W.W. (2013). Managing malignant melanoma. *Plastic Reconstr. Surg.* 132:446e–460e.
- El-Dakdoky, M.H., Helal, M.A.M. (2007). Reproductive Toxicity of Male Mice after Exposure to Nonylphenol. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79; 188–191.
- El-Deiry, W.S. (2016). p21(WAF1) mediates cell-cycle inhibition, relevant to cancer
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35: 495–516.

- Erdoğan, B.B. (2003). Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, 4: 165-174.
- Fadeel, B., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (1999). Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun*, 266(3):699-717.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di, Ilio., C, De., Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging*, 4:330–349.
- Ferguson, S.A., Flynn, K.M., Delclos, K.B., Newbold, R.R. (2000). Maternal and offspring toxicity but few sexually dimorphic behavioral alterations result from nonylphenol exposure. *Neurotoxicol. Teratol*, 22: 583–591.
- Fisher, R.I., Neifeld, J.P., Lippman, M.E. (1976). Estrogen receptors in human malignant melanoma. *Lancet*, 2:337–338.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi, L.M., MacIntyre, M.F., Allen, C. (2015). The global burden of cancer 2013. *JAMA Oncol*. 1(4):505-27.
- Florentin, A., Arama, E. (2012). Caspase levels and execution efficiencies determine the apoptotic potential of the cell, *J. Cell Biol*, 196, 513-527.
- Flowers, J.L., Seigler, H.F., McCarty, K.S., Konrath, J. (1987). Absence of estrogen receptor in human melanoma as evaluated by a monoclonal antiestrogen receptor antibody. *Arch Dermatol*, 123:764 –765.
- Fortea, M., Lorenzo, M.D., Carrizoc, A., Valiantea, S., Vecchione, C., Laforgia, V., Falcoa, M.D. (2016). Nonylphenol effects on human prostate non tumorigenic cells. *Toxicology*, 357–358, 21–32.
- Fridman, H., Jordan, S., Scott, W., Lowe, H. (2003). “Control of apoptosis by p53”. *Oncogene*, 22(56 REV. ISS. 8): 9030–40.
- Galanos, P., Vougas, K., Walter, D., Polyzos, A., Maya, M.A., Haagensen, E.J., Kokkalis, A., Roumelioti, F.M., Gagos, S., Tzetis, M., Canovas, B., Igea, A., Ahuja, A.K., Zellweger, R., Havaki, S., Kanavakis, E., Kletsas, D., Roninson, I.B., Garbis, S.D., Lopes, M., Nebreda, A., Thanos, D., Blow, J.J., Townsend, P., Sørensen, C.S., Bartek, J., Gorgoulis, V.G. (2016). Chronic P53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. *Nature Cell Biology*, 18: 777-789.
- Garcia-Perez, J., Fernandez de Larrea-Baz, N., Lope, V., Molina, A.J., O’Callaghan-Gordo, C., Alonso, M.H., et al. (2020). Residential proximity to industrial pollution sources and colorectal cancer risk: a multicase-control study (MCC-Spain). *Environ. Intern.* 144:106055. 10.1016/j.envint.2020.106055
- Geens, T., Neels, H., Covaci, A. (2012). Distribution of bisphenol-a triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. *Chemosphere*, 87: 796–802.
- Geske, F.J., Nelson, A.C., Lieberman, R., Strange, R., Sun, T., Gerschenson, L.E. (2000). DNA repair is activated in early stages of p53-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 7: 393-401.
- Ghatak, D., Ghosh, D.D., Roychoudhury, S. (2021). Cancer stemness: p53 at the wheel, *Front. Oncol*, DOI.org/10.3389/fonc.2020.604124.
- Ghobrial, I.M, Witzig, T.E., Adjei, A.A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55 (3), 178– 194.
- Ghodbane, S., Lahbib, A., Sakly, M., Abdelmelek, H. (2013). Review article: Bioeffects of Static Magnetic Fields: Oxidative Stress, Genotoxic Effects, and Cancer Studies. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*. 2013(2):1–12.

- Giarnieri, E., Mancini, R., Pisani, T., Alderisio, M. (2000). Msh2, Mlh1, Fhit, p53, Bcl-2, and Bax expression in invasive and in situ squamous cell carcinoma of the uterine cervix, *Clin. Cancer Res*, 6:3600-3606.
- Giulivo, M., Alda, M.L. de, et al, (2016). Human exposure to endocrine disrupting compounds: their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. *A Review Environ. Res*, 151:251-264.
- Goel, V.K., Lazar, A.J., Warneke, C.L., et al, (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*, 126:154-60.
- Gokce, O., Dogan, G., Turacli, I., Ilke, G., Onen, H. et al, (2016). Flavopiridol induces apoptosis via mitochondrial pathway in b16f10 murine melanoma cells and a subcutaneous melanoma tumor model. *Acta Dermatovenerol Croat*, 24:2-12.
- Goksøyr, A. (2006). Endocrine disruptors in the marine environment: Mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 69, 175–184.
- Goldstein, A.M. (2004). Familial melanoma, pancreatic cancer and germline CDKN2A mutations. *Hum Mutat*, 23:630.
- Gong, Y., Han, X.D. (2006). Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular sertoli cells, *Reprod. Toxicol*, 22: 623–630.
- Gong, Y., Wu, J., Huang, Y., Shen, S., Han, X. (2009). Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicology Letters*, 186; 84-95.
- Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., Toppari, J., Zoeller, R.T. (2015). EDC-2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr. Rev.* 36:E1–E150.
- Gürbilek, M., Dağlar, C., Aköz, M., Topçu, C. (2004). Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı na⁺/k⁺-atpaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve dhea(s), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Turkish Journal Of Biochemistry*, 29 (3): 237-242.
- Haluska, F.G., Tsao, H., Wu, H. et al, (2006). Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. *Clin Cancer Res*, 12:2301-7.
- Hamada, A.J., Singh, A., Agarwal, A. (2011). Cell Phones and their Impact on Male Fertility: Fact or Fiction. *The Open Reproductive Science Journal*. 5(4):125–137.
- Hampton, M.B., Orrenius, S. (1998). Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors*, 8: 1-5.
- Han, X.D., Tu, Z.G., Gong, Y., Shen, S.N., Wang, X.Y., Kang, L.N., Hou, Y.Y., Chen, J.X. (2004). The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats, *reprod. Toxicol*, 19: 215–221.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144:646–674.
- Harris, C.C. (1996). Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst*, 88(20): 1442-1455.
- Harvey, N.L., Butt, A.J., Kumar, S. (1997), Functional activation of Nedd2/ICH-1 (caspase-2) is an early process in apoptosis, *J Biol Chem*. 272(20):13134-9.
- Hazafa, A., Rehman, K.U., Jahan, N., Jabeen, Z. (2020). The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells, *Nutr Cancer*, 72(3):386-397.

- Hetts, S.W. (1998). To die or not to die, *The Journal Of The American Medical Association (Jama)*, 279: 300-7.
- Hocker, T., Tsao, H. (2007). Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat*, 28:578-88.
- Hollander, M.C., Blumenthal, G.M., Dennis, P.A. (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer*, 11:289-301.
- Hong, R., Zhang, V., Liu, Y., Weng, E.Q. (2005). Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on DNA of testicular cells and sperm chromatin structure in mice. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing ZaZhi*. 23(6):414–417.
- Houben, R., Hesbacher, S., Schmid, C.P., et al, (2011). High-level expression of wild type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. *PLoS One*, 6:e22096.
- Huang, Q., Bu, L., Yang, T., Yang, Y., Huang, S., Yang, J., Guo, Y., Liu, C. (2019). Effects of nonylphenol administration on serum, liver and testis estrogen metabolism. *Chemosphere*, 235, 543e549. DOI.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.173.
- Hui, L., Li H., Lu, G., Chen, Z., Sun, W., Shi, Y., Fu, Z., Huang, B., Zhu, X., Lu, W., et al. (2018). Low dose of bisphenol a modulates ovarian cancer gene expression profile and promotes epithelial to mesenchymal transition via canonical wnt pathway. *Toxicol. Sci*. DOI: 10.1093/toxsci/kfy107.
- In, S.J., Kim, S.H., Go, R.E., Hwang, K.A., Choi, K.C. (2015). Benzophenone-1 and nonylphenol stimulated MCF-7 breast cancer growth by regulating cell cycle and metastasis-related genes via an estrogen receptor α -dependent pathway. *J Toxicol Environ Health A*, 78:492–505.
- Jambor, T., Lukáčová, J., Tvrda, E., Knážícká, Z., Forgács, Z. Lukáč, N. (2016). The impact of 4-nonylphenol on the viability and hormone production of mouse leydig cells. *Folia Biol (Praha)*. 62:34–39.
- Jambor, T., Tvrda, E., Tusimova, E., Kovacik, A., Bistakova, J., Forgacs, Z., Lukac, N. (2017). In vitro effect of 4-nonylphenol on human chorionic gonadotropin (hCG) stimulated hormone secretion, cell viability and reactive oxygen species generation in mice Leydig cells. *Environmental Pollution*, 222:219e225.
- Jha, A.K., Sharma, V., Nikbakht, M., Jain, V., Sehgal, A., Capalash, N., Kaur, J. (2016). A comparative analysis of methylation status of tumor suppressor genes in paired biopsy and serum samples from cervical cancer patients among north indian population. *Russ. J. Genet*, 52:226-230.
- Jie, X., JianMei, L., Zheng, F., Lei, G., Biao, Z., Jie, Y. (2013). Neurotoxic effects of nonylphenol: a review. *Wien. Klin. Wochenschr*, 125.
- Jie, X., Yang, W., Jie, Y., Hashim, J.H., Liu, X.Y., Fan, Q.Y., Yan, L. (2010). Toxic effect of gestational exposure to nonylphenol on f1 male rats. birth defects res. part b: dev. reprod. *Toxicol*, 89: 418–428.
- Jin, X., Wang, Y., Jin, W., Rao, K., Giesy, J.P., Hollert, H., Richardson, K.L., Wang, Z. (2014). Ecological risk of nonylphenol in China surface waters based on reproductive fitness. *Environ Sci Technol*, 48(2):1256-62.
- Joosse, A., Collette, S., Suci, S., Nijsten, T., Patel, P.M., Keilholz, U., Eggermont, A.M., Coebergh, J.W., de Vries E. (2013). Sex is an independent prognostic indicator for survival and relapse/progression-free survival in metastasized stage III to IV melanoma:

- a pooled analysis of five European organisation for research and treatment of cancer randomized controlled trials. *J. Clin. Oncol.* 31, 2337–2346.
- Jubendradass, R., D’Cruz, S.C., Rani, S.J.A., Mathur, P.P. (2012). Nonylphenol induces apoptosis via mitochondria- and Fas-l-mediated pathways in the liver of adult male rat. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 62; 405-411.
- Junk, G.A., Svec, H.J., Vick, R.D., Avery, M.J. (1974). Contamination of water by syntheticpolymer tubes. *Environ. Sci. Technol*, 8: 1100–1106.
- Kaandarakis, E.D., Bourguigon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, L., Prins, G.S.A.M. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific State-Ment. *Endocr. Rev*, 30: 293–342.
- Kaminska, W.G., Wydmanski, J., Gajda, M. (2016). Melanoma awareness and prevalence of dermoscopic examination among internet users: a cross-sectional survey. *Tukiendorf A Postepy Dermatol Alergol*, (6):421-428.
- Kang, N.H., Hwang, K.A., et al. (2012). Induced growth of BG-1 ovarian cancer cells by 17 β -estradiol or various endocrine disrupting chemicals was reversed by resveratrol via downregulation of cell cycle progression. *Mol. Med. Rep*, 6 (1):151-156.
- Karimian, A., Ahmadi, Y., Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after dna damage. *DNA Repair (Amst)*, 42:63-71. DOI: 10.1016/J.Dnarep 04.008. Epub 2016 Apr 22.
- Kastenhuber, E.R., Lowe, S.W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, 170, 1062–1078.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner, C.P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the us. epasponsored workshop. *Environ. Health Perspect*, 104: 715–740.
- Kawaguchi, S., Kuwahara, R., Kohara, Y., Uchida, Y., Oku, Y., Yamashita, K. (2015). Exposure to low-dose of nonylphenol impairs memory performance in sprague-dawley rats. *J. Toxicol. Sci*, 40: 43–53.
- Kazemi, S., Fomeshi, M.K., Akbari, A., Kani, S.N.M., Ahmadian, S.R., Kasman, M.G. (2018). The correlation between nonylphenol concentration in brain regions and resulting behavioral impairments. *Brain Research Bulletin*, 139: 190–196.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26:239–257.
- Kesari, K.K., Kumar, S., Behari, J., (2011). Effects of Radiofrequency Electromagnetic Wave Exposure from Cellular Phones on the Reproductive Pattern in Male Wistar Rats. *Apply Biochemistry Biotechnology*. 164(4):546–559.
- Kim, S.H., Nam, K.H., Hwang, K.A., Choi, K.C. (2016). Influence of hexabromocyclododecane and 4-nonylphenol on the regulation of cell growth, apoptosis and migration in prostatic cancer cells. *Toxicol In Vitro*, 32:240–247.
- Kim, S.H., Nam, K.H., Hwang, K.A., Choi, K.C. (2016). Influence of hexaboromocyclododecane and 4-nonylphenol on the regulation of cell growth, apoptosis and migration in prostatic cancer cells. *Toxicology in vitro*, 32, 240-247.
- Kim, Y.S., Choi K.C., Hwang, K.A., et al. (2015). Genistein suppressed epithelial–mesenchymal transition and migration efficacies of BG-1 ovarian cancer cells activated

- by estrogenic chemicals via estrogen receptor pathway and downregulation of TGF- β signaling pathway. *Phytomedicine*, 22 (11): 993-999.
- Kim, Y.S., Hwang, K.A., Hyun, S.H., Nam, K.H., Lee, C.K., Choi, K.C. (2015). Bisphenol A and nonylphenol have the potential to stimulate the migration of ovarian cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition via an estrogen receptor dependent pathway. *Chem Res Toxicol*, 28:662–671.
- Kiraz, Y., Adan, A., Yandim, A.K., Baran, Y. (2016), Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis, *Tumor Biol*, 37:8471-8486.
- Koçak, N., Yıldırım, İ.H., Yıldırım, S. (2011). P53 Ve P53 gen ailesi üyeleri olan p63 ve p73'ün hücrel işlevleri. *Tıp Dergisi Dicle*, 38(4): 530-535.
- Kong, G., Shin, K.Y., Lee, J.J. (1998). Bcl-2 and p53 expressions in invasive bladder cancers. *Acta Oncol*, 37:715-20.
- Korkmaz, A.Ö., Sidekli, Ö. (2020). Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) çalışmalarında uygun housekeeping genlerin (HKGs) seçimi ve validasyonu. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 17(1): 76-83.
- Krajewska, M., Zapata, J.M., Meinhold-Heerlein, I., Hedayat, H., Monks, A., Bettendorf, H., Shabaik, A., Bubendorf, L., Kallioniemi, O.P., Kim, H., Reifenberger, G., Reed, J.C., Krajewski, S. (2002). Expression of bcl-2 family member bid in normal and malignant tissues, *Neoplasia*, 129-140.
- Kreis, N.N., Louwen, F., Yuan, J. (2019). The multifaceted p21 (*cip1/waf1/cdkn1a*) in cell differentiation. *Migration And Cancer Therapy Cancer*, 11(9): 1220.
- Kudo, C., Wada, K., Masuda, T., Yonemura, T., Shibuya, A., Fujimoto, Y., Nakajima, A., Niwa, H., Kamisaki, Y. (2004). Nonylphenol induces the death of neural stem cell due to activation of the caspase cascade and regulation of the cell cycle, *J. Neurochem*, 88: 1416–1423.
- Kudo, C., Wada, K., Masuda, T., Yonemura, T., Shibuya, A., Fujimoto, Y., Nakajima, A., Niwa, H., Kamisaki, Y. (2004). Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of the caspase cascade and regulation of the cell cycle. *Journal of biochemistry*, DOI.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02270.x
- Kumar, R., Angelini, S., Snellman, E. et al, (2004). BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol*, 122:342-8.
- Kumar, S., Kesari, K.K., Behari, J. (2010). Influence of microwave exposure on fertility of male rats. *Fertile Sterile*. 95(4):1500–1502.
- Kumoğlu, G., Döşkaya, M., İz, S.G. (2019). The biomarker features of mir-145-3p determined via meta-analysis validated by qrt-pcr in metastatic cancer cell lines, *Gene*, 710: 341-353.
- Kwon, S.J., Lee, J.H., Moon, K.D., Jeong, I.Y., Ahn, D.U., Lee, M.K., Seo, K.I. (2014). Induction of apoptosis by isoogonaketone from *perilla frutescens* L. in b16 melanoma cells is mediated through ros generation and mitochondrial-dependent, -independent pathway. *Food Chem. Toxicol*, 65,97-104.
- Lagos-Cabré, R., Moreno, R.D. (2012). Contribution of environmental pollutants to male infertility: A working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers, *Biological Research*, DOI.org/10.4067/S0716-97602012000100001.
- Lane, D.P., Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278, 261–263.

- Lee, C.C., Jiang, L.Y., Kuo, Y.L., Chen, C.Y., Hsieh, C.Y., Hung, C.F., Tien, C.J. (2015). Characteristics of nonylphenol and bisphenol A accumulation by fish and implications for ecological and human health. *Sci. Total Environ*, 502, 417e425. DOI.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.042.
- Lee, H.B. (1999). Review of analytical methods for the determination of nonylphenol and related compounds in environmental samples. *Water Qual. Res. J. Can*, 34:3–35.
- Lee, J.H., Won, Y.S., Park, K.H., Lee, M.K., Tachibana, H., Yamada, K., Seo, K.I. (2012). Celestrol inhibits growth and induces apoptotic cell death in melanoma cells via the activation of ROS-dependent mitochondrial pathway and the suppression of p13k/akt signaling. *Apoptosis*, 17: 1275-1286.
- Lee, J.W., Han, H.K., Park, S., Moon, E.Y. (2017). Nonylphenol increases tumor formation and growth by suppressing gender-independent lymphocyte proliferation and macrophage activation. *Environ Toxicol*, 32:1679-87.
- Lee, P.C., Arndt, P., Nickels, K.C. (1999). Testicular abnormalities in male rats after lactational exposure to nonylphenols. *Endocrine*, 11:61–68.
- Lei, J., Yi, Y., Yong, Z., Ying, L., Bo, P., Bingjie, W., Yong, L. (2019). Accumulation and toxicological effects of nonylphenol in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Scientific Reports*, 9:7022.
- Leo, L., Bodemeyer, V., Bosisio, F.M., Claps, G., Carretta, M., Rizza, S., Faienza, F., Frias, A., Khan, S., Bordi, M., Pacheco, M.P., Martino, J., Bravo-Cordero, J., Daniel, C.J., Sears, R.C., Donia, M., Madsen, D.H., Guldborg, P., Filomeni, G., Sauter, T., Robert, C., Zio, D.D., Cecconi, F.F. (2021). Loss of Ambra1 promotes melanoma growth and invasion. *Nat Commun*. 12: 2550.
- Letai, A.G. (2008). Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 8: 121–132.
- Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 57: 1083–1093.
- Levine, A.J., Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer*, 9, 749–758.
- Li, S., Jiang, Z., Chai, W., Xu, Y., Wang, Y. (2019). Autophagy activation alleviates nonylphenol-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *Neurochemistry International*, 122: 73–84.
- Li, S., Jianga, Z., Chai, W., Xu, Y., Wang, Y. (2019). Autophagy activation alleviates nonylphenol-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *Neurochemistry International*, 122:73–84.
- Li, X., Zhou, L., Ni, Y., Wang, A., Hu, M., Lin, Y., Hong, C., Wan, J., Chen, B., Fang, L., Tong, J., Tong, X., Tao, S., Tian, H. (2017). Nonylphenol induces pancreatic damage in rats through mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Toxicol. Res*, 6: 353-360.
- Li, Z., Yin, H., Shen, Y., Ren, M., Xu, X. (2021). The influence of phenolic environmental estrogen on the transcriptome of uterine leiomyoma cells: a whole transcriptome profiling-based analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 211:111945.
- Lin, W.M., Baker, A.C., Beroukhi, R., et al, (2008). Modeling genomic diversity and tumor dependency in malignant melanoma. *Cancer Res*, 68:664-73.

- Linzer, D.I., Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17, 43–52.
- Litwa, E., Rzemieniec, J., Wnuk, A., Lason, W., Krzeptowski, W., Kajta, M. (2016). R.X.R, P.X.R and car xenobiotic receptors mediate the apoptotic and neurotoxic actions of nonylphenol in mouse hippocampal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 156: 43–52.
- Liu, H., Liu, K., Dong, Z. (2021). The Role of p21-activated kinases in cancer and beyond: where are we heading? *Front Cell Dev Biol*, 9: 641381.
- Liu, M.M., Albanese, C., Anderson, C.M., Hilty, K., Webb, P., Uht, R.M., et al., (2002). Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem*, 277: 24353-60.
- Liu, T., Di, Q.N., Sun, J.H., Zhao, M., Xu, Q., Shen, Y. (2020). Effects of nonylphenol induced oxidative stress on apoptosis and autophagy in rat ovarian granulosa cells, *Chemosphere* 261; 127693.
- Lopez, J., Tait, S.W.G. (2015). Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *British Journal of Cancer*, 112(6): 957–62.
- Lotfi, M., Hasanpour, A.H., Moghadamnia, A.A., Kazemi, S. (2021). The Investigation into Neurotoxicity Mechanisms of Nonylphenol: A Narrative Review. *Curr Neuroparmacol*, 11; 19(8): 1345–1353.
- Low, I.C., Kang, J., Pervaiz, S. (2011). Bcl-2: A prime regulator of mitochondrial redox metabolism in cancer cells. *Antioxid Redox Signal*, 15: 2975-2987.
- Lu, D., Yu, L., Li, M., Zhai, Q., Tian, F., Chen, W. (2021). Behavioral disorders caused by nonylphenol and strategies for protection. *Chemosphere*, 275; 129973.
- Lu, Y.Y., Chen, M.L., Sung, F.C., Wang, P.S.G., Mao, I.F. (2007). Daily intake of 4-nonylphenol in Taiwanese. *Environ. Int.* 33, 903e910. DOI.org/10.1016/j.envint.2007.04.008.
- Lyons, R., Van de Bittner, K., Morgan-Jones, S. (2014). Deposition patterns and transport mechanisms for the endocrine disruptor 4-nonylphenol across the Sierra Nevada Mountains, California. *Environmental Pollution*, 195, 123-132.
- Maio, M. (2012). Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. *Ann Oncol*, 23(Suppl 8):10-4.
- Majno, G., Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology*, 146(1): 3–15.
- Mark, W., Cunningham, J.R., Jennifer, M.S., Crystal, A.W., Chris, B. (2013). Renal Redox Response to Normal Pregnancy in the Rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 304(6):443–449.
- Mates, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., Marquez, J. (2008). Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch Toxicol*, 82(5): 273- 299.
- Milla, S., Depiereux, S., Kestemont, P. (2011). The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review. *Ecotoxicology*, 20:305–319.
- Mills, L.J., Chichester, C. (2005). Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci. Total Environ.* 343 (1–3): 1–34.

- Moldoveanu, T., Follis, A.V., Kriwacki, R.W., Green, D.R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem Sci.* 102-110.
- Monneret, C., (2017). What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies.* 403-405.
- Morgan, D.M. (1998). Tetrazolium (MTT) Assay For Cellular Viability And Activity. *Methods Mol Biol*, 79: 179-83.
- Muñoz, P.U., Cabré, R.L., García, D.P., Reyes, J.G., Moreno R.D. (2018). Bisphenol-A and nonylphenol induce apoptosis in reproductive tract cancer cell lines by the activation of adam17, *Int J Mol Sci*, 19(8): 2238.
- Nakopoulou, L., Vourlakou, C., Zervas, A. (1998). The prevalence of bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder, carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol*, 29:146-54.
- Nam, M.S., Jung, D.B., Seo, K.H., Kim, B.I., Kim, J.H., Kim, B., Baek, N.I., Kim, S.H. (2016). Apoptotic effect of sanggenol I via caspase activation and inhibition of nf-kb signaling in ovarian cancer cells. *Phytother Res*, 30: 90-96.
- Nesbit, R.A., Woods, R.L., Tattersall, M.H., et al, (1979). Tamoxifen in malignant melanoma. *N Engl J Med*, 301:1241–1242.
- Nissan, M.H., Pratilas, C.A., Jones, A.M., et al, (2014). Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res*, 74:2340-50.
- Noorimotlagh, Z., Haghighi, N.J., Ahmadi Moghadam, M., Rahim, F. (2017). An updated systematic review on the possible effect of nonylphenol on male fertility. *Environ Sci Pollut Res Int.* (4):3298-3314.
- Noorimotlagh, Z., Kazeminezhad, I., Jaafarzadeh, N., Ahmadi, M., Ramezanid, Z., Martinez, S.S. (2018). The visible-light photodegradation of nonylphenol in the presence of carbon-doped TiO₂ with rutile/anatase ratio coated on GAC: Effect of parameters and degradation mechanisms, *Journal of Hazardous Materials*, 350; 108-120.
- Noorimotlagh, Z., Mirzaee, S.A., Martinez, S.S., Rachoń, D., Hoseinzadeh M., Jaafarzadeh, N. (2020). Environmental exposure to nonylphenol and cancer progression Risk–A systematic Review. *Environmental Research*, 184:109263.
- Noorimotlagh, Z., Mirzaee, S.A., Ahmadi, M., Jaafarzadeh, N., Rahim, F. (2018), The possible DNA damage induced by environmental organic compounds: The case of Nonylphenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158; 171–181.
- Ogur, R. (2014) 'Studies with *Myrtus communis* L.: anticancer properties'. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 3(4): 135.
- Olsen, CM, Meussen-Elholm, E.T, et al. (2005). Estrogenic effects of environmental chemicals: an interspecies comparison, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*, 141 (3): 267-274.
- Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D. (2001). Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2 (1): 91-95.
- Park, H.J., Lee, R., Yoo, H., Hong, K., Song, H. (2021). Nonylphenol induces apoptosis through ros/jnk signaling in a spermatogonia cell line. *Int. J. Mol. Sci*, 22, 307.
- Park, H.J., Zhang, M., Lee, W.Y., Hong, K.H., Do, J.T., Park, C., Song, H. (2020). Toxic effects of nonylphenol on neonatal testicular development in mouse organ culture. *Int J Mol Sci*, 21(10): 3491.
- Park, K., Kwak, I.S. (2010). Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere*. 79:934-941.

- Park, M.A., Choi, K.C. (2013). Effects of 4-nonylphenol and bisphenol A on stimulation of cell growth via disruption of the transforming growth factor- β signaling pathway in ovarian cancer models. *Chem. Res. Toxicol*, 27 (1):119-128.
- Park, M.A., Choi, K.C. (2014). Effects of 4-nonylphenol and bisphenol A on stimulation of cell growth via disruption of the transforming growth factor- β signaling pathway in ovarian cancer models. *Chem Res Toxicol*, 27:119–128.
- Park, S.H., Kim, K.Y. et al, (2009). Cell growth of ovarian cancer cells is stimulated by xenoestrogens through an estrogen-dependent pathway, but their stimulation of cell growth appears not to be involved in the activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and p38. *J. Reprod. Dev*, 55 (1):23-29.
- Parlak, A. (2014). Melanoma genel bakış. *Konuralp Tıp Dergisi*, 6(1):22-27.
- Patino-Garcia, D., Cruz-Fernandes, L., Bunay, J., Palomino, J., Moreno, R.D. (2018). Reproductive alterations in chronically exposed female mice to environmentally relevant doses of a mixture of phthalates and alkylphenols. *Endocrinology*, 159:1050–1061.
- Pavlakakis, E., Stiewe, T. (2020). p53's extended reach: the mutant p53 secretome. *Biomolecules*, 15;10(2).
- Pavlopoulou, A., Spandidos, D.A., Michalopoulos, I. (2015). Human cancer databases (review). *Oncol Rep*, 33(1):3-18.
- Perabo, F.G.E., Kamp, S., Schmid, D. (2001). Bladder cancer cells acquire competent mechanism to escape Fas-mediated. Apoptosis and immune surveillance in the course of malignant transformation. *Br J Cancer*, 84:1330-38.
- Phillips, K.P., Tanphaichitr, N. (2008). Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 11(3-4):188-220.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29:9.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30:9.
- Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., et al, (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*, 33:19-20.
- Prins, G.S., Hu, W.Y., Shi, G.B., Hu, D.P., Majumdar, S., Li, G., Huang, K., Nelles, J.L., Ho, S.M., Walker, C.L., et al. (2014). Bisphenol A promotes human prostate stem-progenitor cell self-renewal and increases in vivo carcinogenesis in human prostate epithelium. *Endocrinology*.155:805–817.
- Protrka, Z., Djurić, J., Protrka, O., Arsenijević, S. (2010). The possible role of Bcl-2 expression of tumors of the uterine cervix, *J. B.U.ON*, 15: 323-329.
- Puy-Azurmendi, E., Olivares, A., Vallejo, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Piña, B., Zuloaga, O., Cajaraville, M.P. (2014). Estrogenic effects of nonylphenol and octylphenol isomers in vitro by recombinant yeast assay (RYA) and in vivo with early life stages of zebrafish. *Sci Total Environ*, 466-467:1-10.
- Qi, W., Li, J., Pei, X., Ke, Y., Bu, Q., Ni, X. (2020). B-Actin facilitates etoposide-induced p53 nuclear import. *J Biosci*. 45. pii: 34.
- Qi, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, W. (2013). Nonylphenol decreases viability and arrests cell cycle via reactive oxygen species in Raji cells. *Experimental and Toxicologic*,

- Qiu, Y., Waters, C.E., Lewis, A.E., Langman, M.J., Eggo, M.C. (2002). Oestrogen-induced apoptosis in colonocytes expressing oestrogen receptor beta. *J Endocrinol*, 174:369-77.
- Qin, H., Gunninga, P. (1997). The 39-end of the human b-actin gene Enhances activity of the b-actin expression vector system: construction of improved vectors. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 36: 63-72.
- Ramadan, L.A., Abd-Allah, A.D., Hamdy, A.A., Saad-El-Din, A.A. (2002). Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme Q 10 and L-carnitine in mice. *Pharmacological Research*. 46(4):363–370.
- Ramdial, P.K., Madaree, A., Reddy, R., Chetty, R. (2000). Bcl-2 protein expression in aggressive and non-aggressive basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol*, 27: 283-291.
- Rangel-Pozzo, A., Booth, S., Yu, P.L.I., Singh, M., Selivanova, G., Mai, S. (2020). p53 CRISPR deletion affects dna structure and nuclear architecture. *J Clin Med*. 22;9(2). pii: E598. DOI: 10.3390/jcm9020598.
- Rastgar, S., Movahedinia, A., Salamat, N., Salati, A.P., Zabihi, E. (2019). Interruption of immune responses in primary macrophages exposed to nonylphenol provides insights into the role of ER and NF-KB in immunotoxicity of Persian sturgeon. *Fish Shellfish Immunol*, 86, 125e134. DOI.org/10.1016/j.fsi.2018.11.038.
- Rastgar, S., Ardeshtir, R.A., Zabihi, E., Movahedinia, A., Salati, A.P. (2019). Immunotoxicity of estrogen and nonylphenol on apoptosis and expression of ERs in goldfish macrophage: opening new avenue for discovering the role of experimental model systems and sexes *Aquat. Toxicol*. 209:159-167
- Reed, J.C. (2003). Apoptosis-targeted therapies of cancer. *Cancer Cell*, 3: 17–22.
- Rehberger, K., Werner, I., Hitzfeld, B., Segner, H., Baumann, L. (2017). 20 years of fish immunotoxicology - what we know and where we are. *Crit Rev Toxicol*, 47:509–535.
- Renehan, A.G., Booth, C., Potten, C.S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal/(Clinical Research Ed.)*, 322: 1536-8.
- Rossen, K., Karabulut, T.A., Hou-Jensen, K., Krag, Jacobsen, G. (1998). Bax protein is not expressed by basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*, 139: 472-474.
- Rutkowska, A.Z., Diamanti-Kandarakis, E. (2016). Polycystic ovary syndrome and environmental toxins. *Fertil. Steril*, 106 (4):948-958.
- Sammons, M.A., Nguyen, T.T., McDade, S.S., Fischer, M. (2020). Tumor suppressor p53: from engaging DNA to target gene regulation, *Nucleic Acids Res*, 48(16): 8848–8869.
- Sayed, A.E.H., Ismail, R.F.K. (2017). Endocrine disruption, oxidative stress, and testicular damage induced by 4-nonylphenol in *Clarias gariepinus*: the protective role of *Cydonia oblonga*. *Fish Physiol Biochem*, 43:1095–1104.
- Saylor, P.J., Keating, N.L., Smith, M.R. (2009), Prostate cancer survivorship: prevention and treatment of the adverse effects of androgen deprivation therapy. *J Gen Intern Med*. 24(2): 389-394.
- Seiller, C., Maiga, S., Touzeau, C., Bellanger, C., Kervoelen, C., Descamps, G., Maillet, L., Moreau, P., Deceunynck, C.P., Bougie, P.G., Amiot, M. (2020). Dual targeting of BCL-2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL-2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes. *Cell Death Disease*, 5:316.
- Selvey, S., Thompson, E.W., Matthaei, K., Lea, R.A., Irving, M.G., Griffiths, L.R. (2001). β -Actin—an unsuitable internal control for RT-PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 15,5:307-311

- Shamas, D.A., Kale, J., Leber, B., Andrews, D.W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5.
- Shariat, S.F., Kim, J., Raptidis, G. (2003). Association of p53 and p21 expression with clinical outcome in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder. *Urology*, 61:1140-45.
- Shariat, S.F., Tokunaga, H., Zhou, J. (2004). p53, p21, pRB and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *Clin Oncol*, 22:1014-24.
- Sharma, V.K., Anquandah, G.A.K., Yngard, R.A., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., Ray, A.K., Golovko, D. (2009). Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-a in the aquatic environment: a review on occurrence, fate, and treatment. *Journal Of Environmental Science And Health Part A*, 44: 423–442.
- Shi, C.S., Kehrl, J.H. (2019). Bcl-2 Regulates Pyroptosis And Necroptosis By Targeting BH3-Like Domains In GSDMD And MLKL. *Cell Death Discovery*, 5, 151.
- Shirdel, I., Kalbassi, M.R., Esmaeilbeigi, M., Tinoush, B. (2020). Disruptive effects of nonylphenol on reproductive hormones, antioxidant enzymes, and histology of liver, kidney and gonads in Caspian trout smolts. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 232, 108756.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 69(1):7-34.
- Silva, J.L., Lima, C.G.S., Rangel, L.P., Ferretti, G.D.S., Pauli, F.P., Ribeiro, R.C.B., Silva, T.B., Silva, F.C., Ferreira, V.F. (2020). Recent synthetic approaches towards small molecule reactivators of p53. *Biomolecules*, 10(4): 635.
- Skakkebaek, N.E., Meyts, E.R., Jorgensen, N., Carlson, E., Petersen, P.M., Giwerc-man, A., Andersen, A.G., Jensen, T.K., Andersson, A.K., Muller, J. (1998). Germ cells cancerdisorders of spermatogenesis: an environmental connection acta path. micro. *Immunol. Scand*. 106: 3–11.
- Skender, T.M., English, D.R., Heenan, P.J. (1995). Benign melanocytic lesions: risk marker or precursors of cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 33: 1000-7.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N. (2008). nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34: 1033-1049.
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C. (1991). p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from modified” polystyrene. *Environ. Health Perspect*. 92:167-173.
- Spierings, D.C., Eg, D.V., Vellenga, E. (2004). Tissue distribution of the death ligand trail and its receptors. *J Histochem Cytochem* 52(6): 821-831.
- Stahl, T., Loquai, C. (2015). Treatment side effects and follow-up of malignant melanoma, *Radiologe*, 55, Pp. 136-143.
- Sumpter, J.P. (2005). Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. acta hydrochim. *Hydrobiol*, 33 (1): 9–16.
- suppression and therapy. *Cancer Res*, 76: 5189-5191.
- Sushil, K. (2014). Endocrine Disruptors in the Environment. Jon Wiley & Sons; Hoboke, NJ, USA: Environmental chemicals targeting estrogen signaling pathways. doi.org/10.1351/pac200375050631
- Tan, B.L., Kassim, N.M., Mohd, M.A. (2003). Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenolaand nonylphenol, *Toxicol. Lett*. 143: 261–270.

- Tan, B.L.L., Kassim, N.M., Mohd, M.A. (2003), Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenol A and nonylphenol, *Toxicology Letters*, 143; 261-270.
- Tayama, S., Nakagawa, Y., Tayama, K. (2008), Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. *Mutat Res*, 649:114–25.
- Thomas, S., Quinn, B.A., Das, S.K. (2013). Targeting the bcl-2 family for cancer therapy, *Expert Opin Ther Targets*, 17: 61-75.
- Thornberry, N.A. (1998). Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol*, 5(5):R97-103.
- Tilli, C.M.L.J., Stavast, A.J.W., Ramaekers, F.C.S., Neumann, H.A.M. (2002). Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol*, 29: 79-87.
- Toki, T., Horiuchi, A., Ichikawa, N., Mori, A., Nikaido, T., Fujii, S. (1999). Inverse relationship between apoptosis and bcl-2 expression in syncytiotrophoblast and fibrin-type fibrinoid in early gestation. *Mol Hum Reprod*, 5(3): 246-251.
- Toma, S., Ugolini, D., Palumbo, R. (1999). Tamoxifen in the treatment of metastatic malignant melanoma: still a controversy? *Int J Oncol*, 15:321–337.
- Tsao, H., Chin, L., Garraway, L.A., et al, (2012). Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev*, 26:1131-55.
- Turaçlı, I.D. (2017). Molecular mechanisms in formation and progression of malignant melanoma. *Turk J Dermatol*, 11:184-8.
- Uguz, C., Iscan, M., Ergüven, A., Isgor B., Togan, I. (2003). The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Environmental Research*, 92, 262-270.
- Uğuz, C., Varışlı, O., Agca, C., Agca, Y. (2009). Effects of nonylphenol on motility and subcellular elements of epididymal rat sperm. *Reproduct. Toxicol*, 28(4): 542-549.
- Ulukaya, E. (2001). Hücre siklusu ve apoptozis. akciğer kanserleri: tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar. Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti, İstanbul, Türkiye; 26-38.
- Varley, J.M., Evans, D.G., Birch, J.M. (1997). Li-Fraumeni syndrome-a molecular and clinical review. *Br J Cancer*, 76(1): 1-14.
- Velculescu, V.E., El-Deiry, W.S. (1996). Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem*, 42(6): 858-868.
- Vigneswara, V., Ahmed, Z. (2020). The role of caspase-2 in regulating cell fate, *Cells*, 9(5): 1259.
- Vousden, K.H., Prives, C. (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*, 137, 413–431.
- Wada, K., Sakamoto, H., Nishikawa, K., Sakuma, S., Nakajima, A., Fujimoto, Y., Kamisaki, Y. (2007). Life style related diseases of the digestive system: endocrine disruptors stimulate lipid accumulation in target cells related to metabolic syndrome. *J. Pharmacol. Sci*, 105: 133–137.
- Walker, M.J., Beattie, C.W., Patel, M.K., Ronan, S.M., Gupta, T.K. (1987), Estrogen receptor in malignant melanoma. *J Clin Oncol*, 5:1256 –1261.
- Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., et al, (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116:855-67.

- Wan, X., Zhu, Y., Zhang, L., Hou, W. (2018). Gefitinib inhibits malignant melanoma cells through the VEGF/AKT signaling pathway, *Molecular Medicine Reports*, 17:7351-7355.
- Wang, J., Xie, Y., Feng, Y., Zhang, L., Huang, X., Shen, X., Luo, X. (2015). Epigallocatechingallate induces apoptosis in b lymphoma cells via caspase- dependent pathway and bcl-2 family protein modulation. *Int. J. Oncol*, 46: 1507-1515.
- Wang, J., Zhang, Y., Zhang, N., Yin, S., Ruan, D., He, N., Chen, X., Yang, X. (2021). Coiled-Coil domain containing 80 suppresses nonylphenol-induced colorectal cancer cell proliferation by inhibiting the activation of ERK1/2. *Front Cell Dev Biol*. 10.3389/fcell.2021.759820.
- Wang, L., Han, H., Dong, L., Wang, Z., Qin, Y. (2021). Function of P21 and its therapeutic effects in esophageal cancer, *Oncol Lett.* 21(2): 136.
- Wang, P.W., Chen, M.L., Huang, L.W., Yang, W., Wu, K.Y., Huang, Y.F. (2015). Prenatal nonylphenol exposure, oxidative and nitrate stress, and birth outcomes: A cohort study in Taiwan. *Environmental Pollution*, 207; 145-151.
- Wang, S., Zhu, W. (2020). Tumour suppressor candidate 3 inhibits biological function and increases endoplasmic reticulum stress of melanoma cells wm451 by regulating akt/gsk3- β / β -catenin pathway. *Cell Biochem Funct*. DOI: 10.1002/cbf.3515.
- Warfel, N.A., El-Deiry, W.S. (2013). P21waf1 and tumorigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol*. 25(1):52-8. DOI: 10.1097/CCO.0b013e32835b639e.
- Watts, C.G., Dieng, M., Morton, R.I. (2015). Clinical practice guidelines for identification, screening and follow up of individuals at high risk of primary cutaneous melanoma: a systematic review. *Br J Dermatol*, 172: 33 47.
- Weber Lozada, K., Keri, R.A. (2011). Bisphenol A increases mammary cancer risk in two distinct mouse models of breast cancer. *Biol Reprod*. 85:490–497
- Weert, J.de., Cal, A.de.la.H., Berg, van.den.A., Murk, A., Langenhoff, H., Rijnaarts, T., Grotenhuis. (2008). Bioavailability and biodegradation of nonylphenol in sediment determined with chemical and bioanalysis. *Environ. Toxicol. Chem*. 27:778-785.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., Parker, M.G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 135:175-182.
- Wiebke, P., Julie, R., James, W., Martin, M.C., Attrill, G.H., Dyring, A.B., Fields, P., Zhan, Q., Colebatch, A.J., Ferguson, P.M., Thompson, J.F., Kallenbach, K., Yusko, E., Clark, R.A., Robins, H., Scolyer, R.A., Kupper, T.S. (2020). Molecular analysis of primary melanoma t cells identifies patients at risk for metastatic recurrence. *Nature Cancer*. DOI: 10.1038/s43018-019-0019-5.
- Wozniak, A.L., Bulayeva, N.N., Watson, C.S. (2005). Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor- α -mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells *Environ. Health Perspect*, 113:431-439.
- Wright, W., Volz, M.C. (2009). Municipal wastewater concentrations of pharmaceutical and xeno-estrogens: wildlife and human health implications. *Proceedings of the 2007 National Conference on Environmental Science and Technology*, 103–113.
- Wu, C., Guo, E., Ming, J., Sun, W., Nie, X., Sun, L., Peng, S., Luo, M., Liu, D., Zhang, L., Mei, Q., Long, G., Hu, G., Hu, G. (2020). Radiation-Induced DNMT3B Promotes Radioresistance in Nasopharyngeal Carcinoma through Methylation of p53 and p21. *Mol Ther Oncolytics*, 17: 306–319.

- Xie, M., Liang, J.L., Huang, H.D., Wang, M.J., Zhang, T., Yang, X.F. (2019). Low doses of nonylphenol promote growth of colon cancer cells through activation of erk1/2 via g protein-coupled receptor 30, *Cancer Res Treat.* 51(4):1620-1631.
- Yaman, B., Akalin, T., Kandiloğlu, G. (2015). Clinicopathological characteristics and mutation profiling in primary cutaneous melanoma. *Am J Dermatopathol*, 37:389-97.
- Yang, J., Huang, Q., Liu, H., Zhou, X., Huang, Z., Peng, Q., Liu, C. (2020). 4-Nonylphenol and 4-tert-octylphenol induce anxiety-related behaviors through alternation of 5-HT receptors and transporters in the prefrontal cortex. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 230:108701.
- Yang, L., Lin, L., Wenga, S., Feng, Z., Luan, T. (2016). Sexually disrupting effects of nonylphenol and diethylstilbestrol on male silver carp (*Carassius auratus*) in aquatic microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71:400-411.
- Yao, G., Hou, Y. (2004). Nonylphenol induces thymocyte apoptosis through fas/fasL pathway by mimicking estrogen in vivo. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 17: 19–27.
- Yao, G., Hu, Y., Liang, J., Hou, Y. (2005). Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis is related to Fas/FasL pathway. *Life Sciences*, 77; 3306-3320.
- Yao, G., Yang, L., Hu, Y., Liang, J., Hou, J. (2006). Nonylphenol-Induced thymocyte apoptosis involved caspase-3 activation and mitochondrial depolarization. *Mol. Immunol.* 43: 915–926.
- Yao, G., Yang, L., Hu, Y., Liang, J., Hou, Y. (2006). Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis involved caspase-3 activation and mitochondrial depolarization. *Mol Immunol*, 43:915–26.
- Yao, T., Weng, X., Yao, Y., Huang, C., Li, j., Peng, Y., Lin, R., Lin, Z. (2020). ALDH-1 positive cells exhibited a radioresistant phenotype that was enhanced with hypoxia in cervical cancer. *BMC Cancer*, 20; 891.
- Yılmaz, B., Terekeci, H., Sandal, S., Keleştimur, F., (2020). Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders.* 21:127–147.
- You, H.J., Choi, C.Y., Jeon, Y.J., Chung, Y.C., Kang, S.K., Hahm, K.S. (2002). Suppression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-[alpha] expression by 4-nonylphenol in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 294:753–9.
- Yu, J., Yang, X., Yang, X., Yang, M., Wang, P., Yang, Y., Yang, J., Li, W., Xu, J. (2018). Nonylphenol aggravates non-alcoholic fatty liver disease in high sucrose-high fat diet-treated rats. *Scientific Reports*, 8;3232.
- Yun, W.J., Kim, E.Y., Park, J.E., Jo, S.Y., Bang, S.H., Chang, E.J., Chang, S.E. (2016). Microtubule-associated protein light chain 3 is involved in melanogenesis via regulation of MITF expression in melanocytes. *Sci Rep*, 6: 19914.
- Yücedağ, F., Okur, E., Uğuz, C., Zemheri, F., Kuzu, S., Ayçiçek, A., Kahveci, O.K. (2014). The 875 Effects of nonylphenol on hearing in rats. *Int. Adv. Otol.* 10(1):76-9.
- Zaitoun, I.S., Wintheiser, C.M., Jamali, N., Wang, S., Suscha, A., Darjatmoko, S.R., Schleck, K., Hanna, B.A., Lindner, V., Sheibani, N., Sorenson, C.M. (2019). Bcl-2 expression in pericytes and astrocytes impacts vascular development and homeostasis. *Scientific Reports*, 9: 9700.

- Zanotti, S., Eckhoff, A.F., Mannherz, H.G. (2003). Changes in the topological expression of markers of differentiation and apoptosis in defined stages of human cervical dysplasia and carcinoma. *Gynecol. Oncol*, 89: 376-384.
- Zeestraten, E.C., Benard, A., Reimers, M.S., Schouten, P.C., Liefers, G.J., Van De Velde, C.J., Kuppen, P.J. (2013). The prognostic value of the apoptosis pathway in colorectal cancer: a review of the literature on biomarkers identified by immunohistochemistry. *Biomark Cancer*, 4;5:13-29.
- Zemheri, F., Uğuz, C., (2018). Endokrin Bozucu Kimyasallar: Nonilfenol ve Bisfenol A Endocrine. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 1 71-76.
- Zha, J., Wang, Z., Wang, N.C. (2007). Ingersoll, histological alternation and vitellogenin induction in adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol. *Chemosphere*, 66: 488–495.
- Zhang, C., Liu, j., Xu, D., Zhang, T., Hu, W., Feng, Z. (2020). Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy. *J Mol Cell Biol*, 12(9): 674–687.
- Zhang, L., Cao, Y., Hao, X., Zhang, Y., Liu, J. (2015). Application of the GREAT-ER model for environmental risk assessment of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in China. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 18531e18540. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5352-3>
- Zhang, Q., Yang, X., Luo, L., Ma, X., Jiao, W., Li, B., Zhang, M., Zhao, K., Niu, H. (2020). Targeted p21 activation by a new double stranded RNA suppresses human prostate cancer cells growth and metastasis. *Am J Transl Res.* 12(8): 4175–4188.
- Zhu, M., Hong, D., Bao, Y., Wang, C., Pan, W. (2013). Oridonin induces the apoptosis of metastatic hepatocellular carcinoma cells via a mitochondrial pathway. *Oncology Letters*, 6(5):1502-1506.
- Zuzarte-Luis, V., Berciano, M.T., Lafarga, M., Hurlé, J.M. (2006). Caspase redundancy and release of mitochondrial apoptotic factors characterize interdigital apoptosis. *Apoptosis*, 11(5):701-15.