

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**NONYLPHENOL'ÜN KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNE TOKSİK
ETKİSİNE KARŞI CURCUMİN'İN KORUYUCU ROLÜ**

Hazırlayan

Pınar SUNA

Danışmanlar

- 1. Doç. Dr. Arzu YAY**
- 2. Doç. Dr. Tolga ERTEKİN**

Yüksek Lisans Tezi

Mart 2018

KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NONYLPHENOL'ÜN KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNE
TOKSİK ETKİSİNE KARŞI CURCUMİN'İN KORUYUCU
ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan

Pınar SUNA

Danışmanlar

- 1. Doç. Dr. Arzu YAY**
- 2. Doç. Dr. Tolga ERTEKİN**

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2017-7098 nolu proje ile desteklenmiştir.

Mart 2018

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı *Pınar SUNA*

İmza: 

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Nonylphenol’ün Kemik Gelişimi Üzerine Toksik Etkisene Karşı Curcumin’in Koruyucu Rolü” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

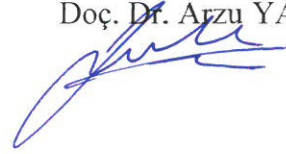
Tezi Hazırlayan

Pınar SUNA



Danışman

Doç. Dr. Arzu YAY



Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Birkan YAKAN



Doç. Dr. Arzu YAY danışmanlığında **Pınar SUNA** tarafından hazırlanan **“Nonylphenol’ün Kemik Gelişimi Üzerine Toksik Etkisine Karşı Curcumin’in Koruyucu Rolü”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

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

JÜRİ:

İMZA

Danışman : Doç. Dr. Arzu YAY

(Erciyes Üniv. Histoloji- Embriyoloji ABD)

Üye : Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

(Erciyes Üniv. Histoloji- Embriyoloji ABD)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ

(Eskişehir Osmangazi Üniv. Histoloji- Embriyoloji ABD)

.....
.....
.....

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim süresince engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez çalışmam boyunca titiz çalışmasıyla bilgi ve desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan Sayın Hocam Doç. Dr. Arzu YAY'a, bölüm hocalarımız Prof. Dr. Birkan YAKAN, Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR ve Uz. Dr. Esra BALCIOĞLU'na,

Anatomi Anabilim Dalında geçirdiğim deney süresi boyunca benden güler yüz ve anlayışlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Erdoğan UNUR'a, ikinci danışmanım Doç. Dr. Tolga ERTEKİN'e ve Anatomi Anabilim Dalı değerli hocalarına,

Eğitimim boyunca ve bu çalışmayı yaparken benden emeğini esirgemeyen Öğ. Gör. Emre ATAY, Arş. Gör. Hatice SUSAR ve ailesine ve kıymetli dostlarım Emine MERAL, Arş.Gör. Sümeyye UÇAR'a,

Yüksek Lisans öğrenimim süresince sıcak bir ortamda birlikte çalıştığımız Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans ve doktora öğrenimini yapan ve yapmış olan tüm kıymetli arkadaşlarıma,

Tezin yapılmasında katkıları olan DEKAM yöneticileri ile çalışanlarına ve özellikle Dr. Zeynep SOYER SARICA hocama, tez çalışmasına maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Bugünlere gelmem için fedakârlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen ve üzerimde büyük emekleri olan, beni yetiştiren sevgili annem Elife ALIŞAN'a, abim Harun ALIŞAN ve canım ablam Emine COŞKUN'a,

Hayatımızın her anında birlikte olmaya söz verdiğimiz, her zaman yanımda olan desteği ve motivasyonu beni güdüleyen değerli ve canım eşim Ahmet SUNA'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

NONYLPHENOL'ÜN KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNE TOKSİK ETKİSİNE KARŞI CURCUMİN'İN KORUYUCU ROLÜ

Pınar SUNA

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji- Embriyoloji Anabilim
Dalı Yüksek Lisans Tezi Mart 2018**

Danışmanlar: Doç. Dr. Arzu YAY ve Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

ÖZET

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, doğal yaşamdaki canlıların ve insanların endokrin sistemi üzerinde tahrip edici etkisi bulunan 'endokrin bozucu' kimyasalların tehlikeli boyutlarda yayılım gösterdiği belirlenmiştir. Endokrin bozucu kimyasallardan en önemlilerinden olan nonylphenolün kemik gelişimi üzerine toksik etkileri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Toksik faktörlere karşı curcumin'in koruyucu rolünün anlaşılması ile birlikte çalışmamızda, güçlü bir antioksidan olan curcuminin, nonylphenol'ün kemik gelişimi üzerine toksik etkisine karşı olası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen, 3-4 aylık Wistar albino cinsi 30 adet gebe dişi sıçan kullanıldı. Deney grupları her birinde 6 gebe sıçan olacak şekilde, kontrol grubu, curcumin grubu (100 mg/kg/gün), mısır yağı grubu (150 µl/kg/gün), curcumin+nonylphenol grubu (100 mg/kg/gün+50 µl/kg/gün) ve nonylphenol grubu (50 µl/kg/gün) olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Belirtilen dozlar sıçanlara gebeliklerinin 5. gününden 20. gününe kadar gavaj yoluyla verildi. Deney sonunda, fetuslar anne ratların gebeliklerinin 20. gününde sezeryan ile alındı. Kemik gelişimini belirlemek amacıyla, her gruba ait fetüslerin yarısı ikili iskelet boyama metodu için kullanılırken, diğerleri morfolojik ve immünohistokimyasal (tartara dirençli asit fosfataz (TRAP) ve alkalın fosfataz (AP) ekspresyon düzeyleri) analizler için kullanıldı. Ön ekstremit (clavicula, scapula, humerus, radius, ulna) ve arka ekstremit kemiklerinde (femur, tibia, fibula) kemik-kıkırdak oranı ImageJ programı ile belirlendi ve veriler SPSS istatistiksel yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

Çalışmada, deney gruplarına ait fetüslerin ağırlıkları ve plasenta ağırlıkları, baş-kıç, biparietal uzunluk ve occipito-frontal uzunlukları gruplar arasında karşılaştırıldığında, Nonylphenol grubu diğer gruplarla kıyasla azaldığı, Curcumin+Nonylphenol grubunda ise hemen hemen kontrol grubuna yakın olduğu gözlemlendi. Ön ekstremit kemiklerinden clavicula, scapula, humerus, radius ve ulna kemiklerinde yapılan tüm ölçüm sonuçlarında en düşük kemik uzunluğu yüzdesi ve kemikleşme alanının yüzdesi değerleri Nonylphenol grubuna aitti. Curcumin+Nonylphenol grubunda ön ekstremit kemiklerindeki değerler neredeyse kontrol grubuna yakındı. Benzer sonuçlar, ikili iskelet boyama metodu uyguladığımız arka ekstremit kemikleri olan femur, tibia ve fibula kemiklerinde de gözlemlendi. Bununla birlikte immünohistokimyasal boyama sonuçlarımızda, femurlara ait TRAP ve AP ekspresyon değerleri bakımından Nonylphenol grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu tespit edildi.

Bu çalışmada, Nonylphenol'ün kemik metabolizmasını olumsuz yönde etkilediği ve kemik yapımı-yıkım aşamalarını geciktirdiği, Curcumin'in ise bu toksik etkiyi düzelttiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Nonylphenol, Curcumin, ikili boyama, AP, TRAP, kemik gelişimi

THE PROTECTIVE ROLE OF CURCUMIN AGAINST TOXIC EFFECT OF NONYLPHENOL ON BONE DEVELOPMENT

Pınar SUNA

**Erciyes University, Institute Of Medical Sciences Department Of Histology-
Embriyology MSc Thesis**

March 2018

Supervisor: Doç. Dr. Arzu YAY and Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

ABSTRACT

Recent studies have shown that chemicals called ‘endocrine disrupters’ which have disruptive effects on the endocrine systems of organisms and people living in nature are spreading in dangerous dimensions. There are not enough studies related to the toxic effects of nonylphenol (NF), one of the most important endocrine disrupting chemicals, on bone development. When we understanding of the protective role of curcumin against toxic factors, in our study it was aimed to investigate possible protective effects of curcumin, a potent antioxidant, against the toxic effect of nonylphenol on bone development.

In the study, 30 pregnant female rats weighing between 250-300 g, 3-4 months old Wistar albino were used. Experimental rats were equally distributed amongst five groups provided that each has 6 of them; the control group, curcumin group (100 mg/kg/day), corn oil group (150 µl/kg/day), curcumin+nonylphenol group (100 mg/kg/day+ 50 µl/kg/day) and nonylphenol group (50 µl/kg/day). The doses given were given by gavage from the 5th day to the 20th day of the gestation. The fetus was removed out on the 20th day of pregnancy by cesarean at the end of study. Half of the fetuses belonging to each group were used for the double skeletal staining method, while others were used for morphologic and immunohistochemical staining (tartaric acid phosphatase (TRAP) and alkaline phosphatase (AP) expression levels) analyses in order to determine bone development. The rate of bone-cartilage in forelimb (clavicula, scapula, humerus, ulna, radius) and hindlimb bones (femur, tibia, fibula) were determined with ImageJ program and data was analyzed using SPSS statistical software.

In the study, when weights of fetuses and placenta weights, head-ass, biparietal length and occipito-frontal length of the experimental groups compared between the groups, the decrease in nonylphenol group compared to the other groups, curcumin + nonylphenol group was almost observed to be close to the control group. The nonylphenol group has the lowest bone length percentage and percentage of the ossification area in all measurements of clavicula, scapula, humerus, radius and ulna, anterior limb bones. The values in the anterior limb bones were almost close to the control group in the curcumin+nonylphenol group. Similar results were observed in the bones of the femur, tibia, and fibula from posterior limbs bones which we applied the double skeletal staining method. Moreover, it was detected that TRAP and AP expressions of femur were determined statistically significant differences between the control and nonylphenol groups by using immunohistochemical staining.

In this study is result while the effect of nonylphenol on bone metabolism in the negative direction and delayed the bone-destruction stages, curcumin corrects this toxic effect is achieved.

Keywords: Nonylphenol, Curcumin, double staining, AP, TRAP, bone development

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
RESİMLER LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. KEMİK DOKUSU VE HİSTOLOJİSİ.....	4
2.1.1. Kemik Dokusu ve Hücreleri	4
2.1.1.1. Osteoprogenitör Hücreler	5
2.1.1.2. Osteoblastlar	5
2.1.1.3. Osteositler	6
2.1.1.4. Osteoklastlar	7
2.1.2. Kemik Matriksi.....	8
2.1.3. Kemik Saran Yapılar	9
2.1.3.1. Periosteum	9
2.1.3.2. Endosteum	9
2.1.4. Kemik Tipleri	10

2.1.4.1. Süngerimsi Kemik.....	11
2.1.4.2. Kompakt Kemik.....	11
2.2. İSKELET SİSTEMİNİN GELİŞİMİ.....	12
2.2.1. Endokondral Kemikleşme.....	12
2.2.2. İntramembranöz Kemikleşme	14
2.3. SKELETON APPENDICULARE (APPENDİKÜLER İSKELET).....	15
2.3.1. Ön Ekstremitte Kemikleri	16
2.3.2. Arka Ekstremitte Kemikleri	18
2.4. KIKIRDAK DOKUSUNUN HİSTOLOJİSİ.....	20
2.4.1. Kıkırdak Tipleri.....	20
2.4.1.1. Hyalin Kıkırdak.....	21
2.4.1.2. Elastik Kıkırdak	23
2.4.1.3. Fibröz Kıkırdak	23
2.5. ALKİL FENOL ETOKSİLATLAR (AFE).....	24
2.5.1. Nonylphenol'ün Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	25
2.5.2. Nonylphenol'ün Etkileri	27
2.5.2.1. Nonylphenol'ün Karsinojenik Etkisi.....	27
2.5.2.2. Nonylphenol'ün Embriyonik Etkisi	28
2.5.2.3. Nonylphenol'ün Mutajenik Etkisi.....	29
2.5.2.4. Nonylphenol'ün Toksik Etkileri	30
2.5.2.5. Nonylphenol'ün Östrojenik Etkileri.....	31
2.6. CURCUMİN	32
2.6.1. Curcumin'in Metabolizması	34
2.6.2. Curcumin'in Biyolojik Etkileri	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. DENEY HAYVANLARININ ÇİFTLEŞTİRİLMESİ.....	36

3.2. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	37
3.3. DENEKLERİN ELDE EDİLMESİ	40
3.4. İKİLİ İSKELET BOYAMADA KULLANILAN KİMYASALLAR	41
3.5. İKİLİ İSKELET BOYAMA YÖNTEMİ.....	42
3.6. İKİLİ İSKELET BOYAMAYA AİT MORFOLOJİK ÖLÇÜMLER	45
3.7. HİSTOLOJİK DOKU TAKİP YÖNTEMİ	46
3.8. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR	49
3.9. İMMÜNOHİSTOKİMYA BOYAMA YÖNTEMİ.....	50
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	51
4. BULGULAR	52
4.1. KİLİNİK BULGULAR.....	52
4.2. İKİLİ İSKELET BOYAMA YÖNTEMİNE AİT BULGULAR.....	56
4.3. HİSTOLOJİK BULGULAR	80
4.3.1. H&E ve MT İle Boyanmış Gruplara Ait Histolojik Bulgular.....	80
4.3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	86
4.3.2.1. Alkalın fosfataz (AP) İmmunoreaktivite Yoğunluklarına Ait Bulgular	86
4.3.2.2. Anti-Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) İmmunoreaktivite Yoğunluklarına Ait Bulgular	88
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	91
6. KAYNAKLAR	98
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

AF	: Alkilfenol
BFA	: Bisfenol A
OP	: Oktilfenol
AFE	: Alkilfenoletoksilat
NFE	: Nonylphenol polietoksilat
DMSO	: Dimetilsülfoksid
DDT	: Diklordifeniltrikloreten
PCB	: Poliklorbifenil
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
OPG	: Osteoprotegerin
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7
MUC1	: Mucin gen 1
Sg/plak	: Salmonella gallinarum/plak
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
in vivo	: Canlı ortamda
in vitro	: Laboratuvar ortamında
CAT D	: Cathepsin D aktivitesi
RT- PCR	: Reverse transkriptaz PCR
mRNA	: Mesajcı RNA
TRAP	: Tartara Dirençli Asit Fosfataz
DEKAM	: Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi
MT	: Masson trichrom
KOH	: Potasyum Hidroksit
H&E	: Hemotoksilen-Eosin
AP	: Alkalın Fosfataz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
PBS	: Phosphate Buffered Saline
DAB	: Diaminobenzidin
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
dH₂O	: distile su

μm	: mikrometre
mm	: milimetre
g	: Gram
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
μg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
μ	: Mikro
ml	: mililitre
m^3	: Metreküp
l	: Litre
kPa	: Kilopascal
Pa	: Henry sabiti
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	: Hidroksiapatit
PO_4^{-3}	: Fosfat
Ca^{+2}	: Kalsiyum
OH	: Hidroksil grubu
dk	: Dakika
mmHg	: Milimetre Civa
μM	: Mikromolar
ALP	: Alkalen fosfataz

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1.	Nonylphenol fizikokimyasal özellikleri .	27
Tablo 3-1.	İkili iskelet sistemi boyama protokolü	43
Tablo 3-2:	Doku hazırlama metodu.....	47
Tablo 3-3:	Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi	48
Tablo 3-4:	Masson trichrom boyama yöntemi.....	49
Tablo 4-1.	Anne ağırlığı verileri	53
Tablo 4-2.	Fetus ve plasenta ağırlık verileri	55
Tablo 4-3.	Baş- Kıç, Biparietal ve Frontal – Occipital uzunluk verileri	56
Tablo 4-4.	Clavicula'ya ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması	60
Tablo 4-5.	Scapula'ya ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması	63
Tablo 4-6.	Humerus'a ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması	66
Tablo 4-7.	Ulna'ya ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması	68
Tablo 4- 8.	Radius'a ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması	71
Tablo 4-9.	Femur'a ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması	74
Tablo 4-10.	Tibia'ya ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması	76
Tablo 4-11.	Fibula'ya ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması	79
Tablo 4-12.	Tüm gruplara ait AP ekspresyon yoğunluğu	88
Tablo 4-13.	Tüm gruplara ait TRAP ekspresyon yoğunluğu	90

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1.	Kemiğin yapısındaki hücreler	5
Şekil 2-2.	Kemik dokusu osteoklast hücresi	8
Şekil 2-3.	Kemik yapı	10
Şekil 2-4.	Havers sistemine ait şematik çizim	12
Şekil 2-5.	Endokondral kemikleşme	14
Şekil 2-6.	İntramembranöz kemikleşmenin başlaması ile ilgili şematik çizim	15
Şekil 2-7.	Sol scapula'nın lateral görünümü	16
Şekil 2-8.	Matriksin boyanma özelliklerini temel alan üç farklı alan	22
Şekil 2-9.	AFB'nin indirgenerek oluşturduğu bileşiklerin şematik olarak gösterilmesi	25
Şekil 2-10.	NFE'nin su ortamındaki bozunma şeması	25
Şekil 2-11.	Doğrusal konumdaki 4-Nonylphenol'ün kimyasal yapısı	26
Şekil 2-12.	Nonylphenol'ün kimyasal yapısı	26
Şekil 2-13.	Curcumin'in kimyasal yapısı	33
Şekil 2-14.	Curcuminoidlerin kimyasal yapısı	33
Şekil 2-15.	Curcumin'in biyolojik etkileri	35
Şekil 4-1.	Tüm fetus görüntüsü.....	57
Şekil 4-2.	İkili iskelet boyama metodu uygulanan ön ekstremitte görüntüsü.....	57
Şekil 4-3.	Clavicula'ya ait görüntüler	59
Şekil 4-5.	Humerus'a ait görüntüler	65
Şekil 4-6.	Radius / Ulna'ya ait görüntüler	70
Şekil 4-7.	İkili iskelet boyama metodu uygulanan arka ekstremitte görüntüsü.....	72
Şekil 4-8.	Femur'a ait görüntüler.....	73
Şekil 4-9.	Tibia / Fibula'ya ait görüntüler	78
Şekil 4-10.	Kontrol grubuna ait femur kesitinin ışık mikroskopik görünüm (H&E ve MT).....	81

Şekil 4-11. Mısır yağı grubuna ait femur kesitinin ışık mikroskopik görünüm (H&E ve MT).....	82
Şekil 4-12. Curcumin grubuna ait femur kesitinin ışık mikroskopik görünüm (H&E ve MT).....	83
Şekil 4-13. Nonylphenol grubuna ait femur kesitinin ışık mikroskopik görünüm (H&E ve MT).....	84
Şekil 4-14. Curcumin + Nonylphenol grubuna ait femur kesitinin ışık mikroskopik görünüm (H&E ve MT).....	85
Şekil 4-15. Kontrol (A: X20, B: X40), Mısır yağı (C: X20, D: X40), Nonylphenol (E: X20, F: X40), Curcumin (G:X20, H:X40) ve Curcumin + Nonylphenol gruplarına (I: X20, J: X40) ait immünohistokimyasal boyama uygulanmış preparatlarda kemikleşme görülen bölgedeki AP ekspresyonu	87
Şekil 4-16. Kontrol (A: X20, B: X40), Mısır yağı (C: X20, D: X40), Nonylphenol (E: X20, F: X40), Curcumin (G: X20, H: X40) ve Curcumin + Nonylphenol (I: X20, J: X40) gruplarına ait immünohistokimyasal boyama uygulanmış preparatlarda kemikleşme görülen bölgedeki TRAP ekspresyonu.....	89

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1.	Sol ön ekstremitte kemikleri	18
Resim 2.2.	Sol arka ekstremitte kemikleri	19
Resim 2.3.	Hyalin kıkırdığın mikroskop fotoğrafı	21
Resim 2.4.	Elastik kıkırdak fotoğrafı	23
Resim 2.5.	Fibröz kıkırdak fotoğrafı	24
Resim 2.6.	Curcuma longa bitkisi	32
Resim 3.1.	Sıçanların çiftleşme sonucu vaginada çiftleşme plağı tespit edilmesi fotoğrafı	37
Resim 3.2.	Sıçanlara yapılan gavaj uygulaması	38
Resim 3.3.	A. Gebe dediğimiz sıçandan fetus yerine plasenta çıkan	39
	B. Yavru sayısı az çıkan sıçan görünümü.....	39
Resim 3.4.	Gebe ratlara sezeryan uygulanması sonrası uterusun ve fetusların çıkartılması.....	40
Resim 3.5.	A. Fetusun uterustan plasenta ile ayrılması	40
	B. Uterustan tam diseke olmuş fetus ve plasenta.....	40
Resim 3.6.	A. Fetusların baş-kıç uzunluğu ölçümü	41
	B. Fetusların occipito-frontal uzunluk ölçümü	41
	C. Fetüslerin bipariatel uzunluk ölçümü	41
Resim 3.7.	Derileri soyulup gözleri ve iç organları çıkarılan fetuslar	42
Resim 3.8.	ImageJ programının kalibrasyon ayarı	45
Resim 3.9.	ImageJ programında yapılan kemik ölçümleri.....	46

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Giderek artan nüfusla birlikte gelişen teknoloji ve hızlı sanayileşme çevre kirliliğini de beraberinde getirmektedir. Çeşitli kaynaklardan çıkan radyoaktif, katı, sıvı ve gaz halindeki kirlletici maddelerin hava, su ve toprakta yüksek oranda birikmesi çevre kirliliğinin oluşmasına neden olmaktadır. Böylece, ekolojik dengenin yanı sıra bitki, hayvan ve insan sağlığı için risk oluşturan zararlı ürünler her geçen gün yaşamımızı etkilemektedir. Çevreye insanlar tarafından bırakılan pek çok kimyasalın insan sağlığı ve canlı türleri üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu konusunda bilimsel bulgular giderek artmaktadır (1). Hormon gibi etki yapan ve endokrin maddeler olarak tanımlanan kimyasallar, canlılarda kalıtsal bazı değişikliklere, hücresel hasara neden olmaktadır (2). Çevresel endokrin maddelerin çoğunluğunu dietilstilbestrol, diklordifeniltriokloreten (DDT), poliklorbifeniller (PCB) ve alkilfenoletoksilatlar (AFE) oluşturmaktadır. Alkilfenol etoksilat bileşikleri (AFB); deterjanlarda, ot ve böcek ilaçlarında, boyalarda, kozmetik ve plastik eşyalarda yüzey aktif maddeleri ve gaz yağı ile uçak benzininde yaygın bir şekilde kullanılan ve endokrin sistemi bozucu etkiye sahip olan maddelerdir (3). Endokrin bozucu maddeler; hormonların üretim, salınım, bağlanma, taşınma, aktivite, yıkım ve vücuttan atılımları üzerine etki etmektedirler (4). Bu kimyasallar, vücutta hormon sistemini taklit ederek vücut gelişimini ve hücre metabolizmasını bozmaktadır (5). Ayrıca, bu kimyasalların çoğu yağ dokusunda birikirler ve vücutta uzun süre kalarak zararlı etkilerde bulunabilirler (6).

Endüstrideki kullanımı nedeniyle AFB'lerin dünyadaki yıllık üretimi 500.000 tonun üzerinde olup, bu miktarın %60'dan fazlasının dere, nehir, göl ve deniz gibi su kütlelerinde biriktiği ortaya konmuştur.

Sularda biriken, AFB bileşikleri, biyolojik bozunuma uğrayarak, Nonylphenol (NF), Oktifenol ve Bütilfenol gibi östrojenik özelliği daha fazla ve biyolojik bozunuma daha

dayanıklı olan alkil fenol denilen bileşikler haline dönüşmektedirler (3, 7, 8).

Doğada bulunan AFB bileşiklerinin %82'sini Nonylphenol oluşturmaktadır. Bir ksenoöstrojen olan Nonylphenol; östrojenik, karsinojenik ve toksik etkiye sahip bir kimyasal maddedir (3, 9, 10). Çevredeki kirliliğe bağlı olarak, bu maddelere maruz kalan canlılarda, sağlık sorunları ile birlikte üreme sorunları da meydana gelmektedir (10). Nonylphenol diğer toksik maddeler gibi bir oksidatif stres kaynağı olarak kabul edilen bir maddedir. Nonylphenol gerçekte *in vitro* bir antioksidan olmasına rağmen, alınan doz miktarı ve vücutta birikme kabiliyeti onu prooksidan haline getirebilir. Prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasıyla oksidatif stres ortaya çıkar. Bu durum vücutta lipidler, proteinler ve DNA yapısının hasar görmesi, hücresel reaksiyonlar ve oluşumların bozulmasına neden olur (11).

Sanayide geniş bir kullanım alanı olmasından dolayı, insanların sürekli maruz kaldığı Nonylphenol idrar, kan ve dokularda tespit edilmiştir (12). Nonylphenol; östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojen gibi davranan bir madde olmasına rağmen kalsiyum üzerine etkileri östrojenden farklıdır. Çünkü östrojen hem plazma kalsiyum seviyesinin hem de kalsitonin seviyesinin artması yönünde etki gösterirken (13), Nonylphenol hem plazma kalsiyum seviyesinin ve hem de kalsitonin seviyesinin düşmesine yol açmaktadır (13). Buna ek olarak, östrojenin kemik metabolizmasını ve osteblastik farklılaşmayı etkilediği belirtilmiştir (14, 15). Nonylphenol yapısal olarak östradiol (17 β -östradiol) hormonu ile benzerlik göstermektedir. Bu sayede Nonylphenol, östrojen hormonunu taklit edebilmektedir. Bilindiği üzere, östradiol (E2 veya 17 β -östradiol) kadınlık özelliğini sağlayan ana hormon olan östrojen türevidir. Dişi cinsel organlarının gelişimini ve cinsel olgunluğa erişimi sağlar. Progesteron hormonuyla birlikte ovulasyon ve menstrual siklusun düzenlenmesini sağlar (16, 17).

Curcumin, zingiberaceae ailesine ait, sarı çiçekli *Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından elde edilen bir antioksidandır. Curcumin köri baharatına sarı rengini veren aktif bileşenidir. Bu bitkinin kökleri kurutularak Asya tıbbında binlerce yıldır kullanılmaktadır (18). Beta konumunda bağlanmış iki keton grubu içermesi, antioksidan özellik taşımasında rol oynar. Bağırsaklardan emilerek, kana ve böylece dokulara dağılır ve safra ile atılır. Curcumin diyetle kolaylıkla alınabilen, kullanımı güvenli olan ve özellikle kanser gelişimini önlemede etkili olduğu bildirilmiş bir antioksidandır. Curcumin, kuvvetli hidroksil radikal temizleyicisi olduğu gibi, süperoksit radikallerini

de yakalar. Serbest radikalleri tutma özelliği nedeniyle DNA'yı oksidatif hasarlardan korur (19, 20). Son yıllarda yapılan çalışmalarda curcuminin antioksidan özelliğinin yanı sıra antiinflamatuvar, immunomodulatuvar, antitümoral ve antipsöriyatik etkinliği olduğu bildirilmiştir (21, 22). Ayrıca curcumin'in anoreksia, öksürük, diabetes, karaciğer rahatsızlıkları, romatizma, Alzheimer, safra ile ilgili rahatsızlıklar, sinüzit gibi hastalıklara karşı güçlü bir ajan olduğuna inanılmaktadır (23). Curcumin'in yüksek dozlarda alındığında bile toksik etkisinin olmadığı görülmüştür (24).

Bu çalışmada, kemik gelişimi üzerine Nonylphenol'ün neden olduğu olumsuz yapısal değişimlerin belirlenmesi ve bu değişimlere karşı antioksidan özelliğe sahip olduğu bilinen Curcumin'in olası koruyucu etkilerinin ikili boyama ve immünohistokimyasal metodlar kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

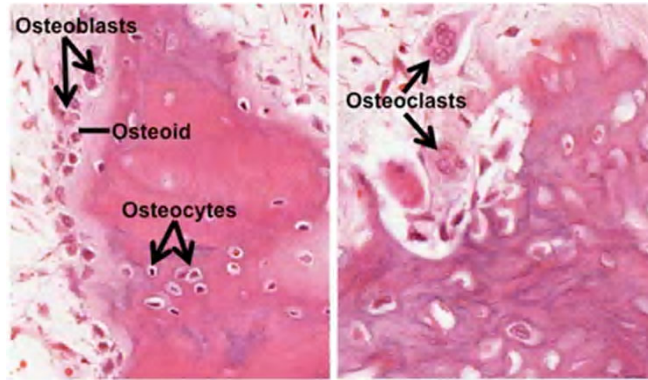
2.1. KEMİK DOKUSU VE HİSTOLOJİSİ

Kemik dokusu özelleşmiş bir bağ dokusu olup iskelet sisteminin en önemli yapı taşını oluşturmaktadır. Yapısında bulundurduğu farklı hücrelerin ve ara maddenin üzerine organik ve inorganik tuzların çökmesi ile sağlamlık ve esneklik gibi fiziksel özellikler kazanır. Kemik kollajen bir yapı içinde yer alan mikroskobik Ca^{+2} ve PO_4^{-3} tuzlarından, özellikle genel formülü $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ olan hidroksiapatitten yapılmış özel bir bağ dokusu şeklindedir. Böylece, Ca^{+2} ve PO_4^{-3} homeostazında da rol oynar (25).

Kemik, vücudun iskelet yapısını oluşturarak dokulara destek olan, yüzeyine tutunan kaslarla birlikte vücudun hareketliliğini sağlayan, beyin, omurilik ve iç organları koruyan, vücuttaki başlıca kan yapıcı doku olan kemik iliğini barındıran ve vücuttaki birçok süreç için gerekli olan kalsiyum, fosfor, sodyum, magnezyumu depolayan sert bir dokudur (26). Ayrıca yapısında kalsiyum, fosfat ve diğer iyonları da bulundurmaktadır. Vücut iç dengesinin ayarlanmasında bu iyonların kontrollü olarak dolaşıma salıverilmesinde ya da dengede tutulmasında kemik doku önemli bir rol oynar (27). Bunlara ek olarak kemikler, iskelet kası kasılmaları ile oluşan kuvvetleri çoğaltarak, bunları vücut hareketlerine dönüştüren bir kaldıraç sistemi oluştururlar. Tüm bu süreçlerle birlikte kemiklerde bir yaşlanma meydana gelir ve sürekli rezorbe olarak yeni kemikler üretirler (25, 27).

2.1.1. Kemik Dokusu ve Hücreleri

Kemik, hücreler arası kireçlenmiş materyal olan kemik matriksi ve 3 tür hücreden meydana gelmiştir (Şekil 2-1). Kemik hücreleri matriks içinde laküna adı verilen boşluklarda bulunan osteositler, matriksin organik kısımlarının sentezini yapan osteoblastlar ve kemiğin yeniden modellenmesi ile ilgili olarak çok çekirdekli dev hücreler olan osteoklastlardan oluşmaktadır (27).



Şekil 2-1. Kemiğin yapısındaki hücreler (28).

2.1.1.1. Osteoprogenitör Hücreler

Mezenşimal kökenli hücreler olup kemiğin ana hücreleridir. Asidofilik sitoplazma ve soluk boyanan çekirdeğe sahiptirler. Endosteumda, periosteumun iç tabakasında, Havers ve Volkmann kanallarının yüzeylerinde ve gelişmekte olan uzun kemiklerin metafizindeki büyüme plağının kıkırdak matriksinde bulunurlar (29). Osteoprogenitör hücreler iğ şeklinde ve oval çekirdekli dirler. Sitoplazmaları açık pembe boyanır. Endoplazmik retikulumları gelişmiştir. Golgi kompleksi az gelişmiştir. Buna karşın çok sayıda serbest ribozoma sahiptirler. Bu hücreler kemik büyümesi sırasında son derece aktif olurlar (30).

2.1.1.2. Osteoblastlar

Olgun, metabolik olarak aktif, kemik oluşturan hücrelerdir. Osteoblastlar kemik matriksinin organik kısımlarının üretilmesinden (Tip I kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinler) sorumlu hücrelerdir (27). Kemiğe güç ve dayanıklılığını kazandıran “osteoid” adlı organik matriksi salgılarlar (Şekil 2-1).

Osteoblastlar özellikle kemik yüzeylerinde, yan yana, tek katlı epiteli andıracak şekilde bulunurlar (Şekil 2-1). Aktif olarak matriks sentezi ile uğraşırken osteoblastlar kübik şekilden prizmatığe kadar değişen şekle ve bazofilik sitoplazmaya sahiptirler. Üretim işlevleri azalmaya başladığında, yassılaşırlar ve sitoplazmalarındaki bazofilik özellik azalmaya başlar (27). Kemikleşme bölgelerinde ve gelişmekte olan kemiklerin periostunun kemiğe temas eden derin bölgelerinde bulunurlar. Yüksek seviyede alkale fosfataz aktivitesi göstermeleri nedeniyle kemik matriksinde kalsiyum depolanmasını osteoblastların düzenlediği düşünülmektedir (31).

Osteoblastlar kemik yapımı esnasında iki önemli fonksiyona sahiptirler. Bunlar yeni kemik oluşumunu başlatan maddeler salgılamak ve osteoklastların farklılaşmasını ve aktivitesini etkileyen paratiroid hormonu, D vitamini ve diğer faktörlere cevap vermektir (32). Osteoblastlar bu fonksiyonlarını gerçekleştirirken matriks ile kuşatılırlar ve osteosit haline gelirler. Bu işlem sırasında laküna adı verilen boşluklar oluşur. Lakünaların içinde osteosit ve uzantıları ile bunlarla birlikte az miktar kireçlenmemiş matriks vardır (27).

Osteosit oluşumundan birkaç gün sonra osteoblastlardan kaynaklanan alkalen fosfataz varlığında kollajen liflerinin yüzeyine kalsiyum tuzları çökmeye başlar. Bu çökelmeler kollajen lifleri üzerinde düzenli bir şekilde gerçekleşir ve haftalar sonunda son şekli olan hidroksiapatit ortaya çıkar. Tüm bunların sonuna osteoblastlar osteositlere farklılaşırlar (32).

2.1.1.3. Osteositler

Osteositler, osteoblast hücrelerinin olgunlaşmasıyla oluşmaktadır. Kemik matriks içerisinde laküna olarak adlandırılan küçük boşluklarda yerleşmişlerdir. Her laküna içerisinde bir osteosit bulunur (Şekil 2-1). Şekil olarak içinde bulundukları laküna adı verilen boşluklara uyan osteositler sitoplazmik uzantılara sahiptirler ve kanalikuli adı verilen küçük kanalcıklar sayesinde diğer osteositlerle ve kan damarlarıyla ilişkidirler. Bu bağlantılar komşu hücreler arasında iyonların akışını sağlar. Bu değişim yaklaşık 15 hücre zincirini besler (27, 32). Bununla birlikte, osteositler ile kan damarları arasındaki bazı moleküler değişim, osteositler ile kemik matriksi arasında az miktardaki hücreler arası madde aracılığı ile de yapılır (27).

Osteoblastlar ile karşılaştırıldığında osteositler, yassı ve badem şeklinde bir görünüme sahiptirler. Bununla birlikte granüllü endoplazma retikulumu epeyce azalmış ve Golgi kompleksi ile birlikte daha koyu kromatin sergilerler. Osteositler, morfolojik özellikleri ve çevredeki kemik matriksi eritmek üzere paratiroid hormonu tarafından uyarılmaları nedeniyle kemikten kana kalsiyum geçişinde rol oynadıkları düşünülmektedir. Ayrıca, osteositler ekstrasellüler kalsiyum ve fosfor konsantrasyonunun düzenlenmesinde de önemli rol alırlar (27, 32).

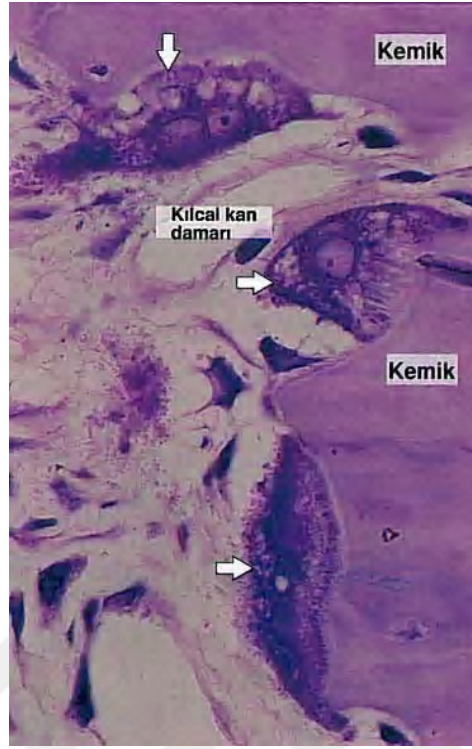
2.1.1.4. Osteoklastlar

Osteoklastlar monositlerden oluşan makrofajlardır. Çok büyük, dallanmış, hareket edebilen ve kemik rezorbsiyonundan sorumlu hücrelerdir (Şekil 2-2). Genişlemiş hücre gövdesinde 5-50 arasında nükleus içeren, tartara dirençli asit fosfatazdan (TRAP) zengin mononükleer fagositoz sisteme dahil hücrelerdir (27, 32).

Osteoklastlar, integrinler aracılığı ile sıkı bir şekilde kemiğe tutunarak rezorpsiyon çukurları oluştururlar. Bu hücreler kemik rezorbsiyonun başladığı bölgelerde, enzimatik olarak açılmış ve Howship lakunası adı verilen çukurcularda bulunurlar. Hücrenin çukurlara bakan kenarı düzensizce katlanıp fırçamsı bir kenar oluşturur (Şekil 2-2). Bu kenarın etrafında organel içermeyen sitoplazmik bir bölge oluşur. Bu bölge aktin flamanlarından zengindir. Burası osteoklastın kemik matriksine tutunduğu alandır ve rezorbsiyon için mikroçevre oluşturur (26).

Osteoklastların işlevi sitokinler ve hormonlar tarafından kontrol edilmektedir. Osteoklastların tiroidten salgılanan bir hormon olan kalsitonin için reseptörleri vardır. Ancak paratiroid hormonu reseptörlerine sahip değildirler. Bununla birlikte osteoblastlarda paratiroid hormonu reseptörleri mevcuttur ve bu hormon ile uyarıldıklarında osteoklastları uyarıcı faktör denilen sitokini üretirler (27). Osteoblast ve osteoklastların beraber fonksiyon görmesi kemik yapım-yıkım döngüsünü etkileyen önemli faktörlerden biridir (33, 34). Kemik rezorpsiyonunu stimüle edici faktörlerin (hormonlar, sitokinler gibi) osteoblastlar üzerine etkisiyle beraber osteoblastların hücre membranında RANKL sentezlenir.

Osteoblastik hücreler ayrıca M-CSF'nin sentezini gerçekleştirir. RANKL ve M-CSF varlığında osteoklast öncül hücreleri membranlarında RANK ve c-Fms ifade ederler. Bu reseptörlerin etkileşimi ile (RANK/RANKL ve M-CSF/c-Fms) preosteoklastlar matür osteoklastlara diferensiyasyon olurlar ve kemik rezorpsiyonunu gerçekleştirirler (35). Öte yandan yine osteoblastlar tarafından sentezlenen osteoprotegerin (OPG), RANKL için yalancı reseptör görevi görerek RANK/RANKL bağlanmasını engeller ve böylece osteoklastik aktiviteyi inhibe etmiş olur. Yapılan çalışmalar sonucunda OPG/RANKL oranının kemik kütlesini belirleyen esas faktör olduğu görülmüştür (36).



Şekil 2-2. Kemik dokusu osteoklast hücreleri (→) (37).

2.1.2. Kemik Matriksi

Kemik matriksinin kuru ağırlığının %50-60'lık kısmı inorganik maddelerden oluşur. Özellikle kalsiyum ve fosfor boldur. Özellikle Ca^{+2} ve PO_4 başta olmak üzere bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum inorganik maddeler arasında bulunur (27).

Organik madde Tip 1 kollajenden ve proteinler ile ilgili glikozaminoglikanları içeren amorf temel maddeden oluşur. Kemik matriksindeki proteinin %90'dan fazlası Tip I kollajenden meydana gelmektedir. Bu protein aynı zamanda tendon ve deride de yer alan temel yapısal proteindir. Tip I kollajen birbirine sıkıca bağlanan üç polipeptidin üçlü sarmalından yapılmıştır. Bu özelliği ile Tip I kollajen aynı miktardaki çelik kadar sağlamdır. Kemik glikoproteinleri ise matriks kalsifikasyonunun başlatılmasından sorumlu olarak görev almaktadırlar (25, 27). Matriksin yapısındaki inorganik ve organik maddeler esasen kemiğin yapısının ve şeklinin korunmasında görev almaktadırlar. Hidroksiapatit ile kollajen lifler arasındaki bağlar, kemiğin karakteristik sertliğinden ve dayanıklılığından sorumludur. Kemik dekalsifiye edildikten sonra da şeklini korur, fakat bir tendon kadar esnek hale gelir. Büyük bir kısmı Tip I kollajenden oluşan organik

madde çıkarıldığında ise kemik yapı yine orijinal şeklini korur ancak kırılğan hale gelir ve dokunulduğunda ufalanarak kırılır (27).

2.1.3. Kemiği Saran Yapılar

2.1.3.1. Periosteum

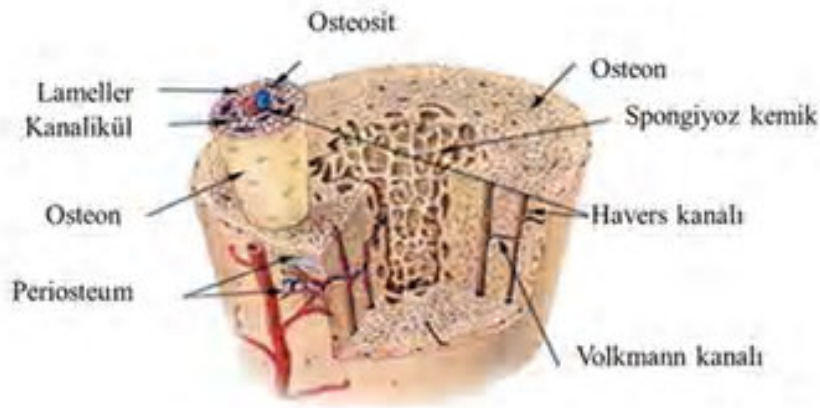
Eklem yüzeyleri hariç bütün kemikleri dıştan çevreleyen bağ dokusudur (Şekil 2-3). Yapısında bol miktarda fibroblast, kan ve lenf damarları, duyu sinirleri, elastik ve kollajen lifler bulunmaktadır. Sharpey lifleri ile dış esas lameller ve ara lamellere kadar dikey ve yatay şekilde uzanarak kemiğe bağlanırlar (25, 27). Kollajen lif ve fibroblastlardan oluşan bir dış tabakadan ve kemik büyümesine potansiyel destek sağlayan hücreleri içeren ince elastik iç katmandan oluşur. Dış tabaka daha çok bağ dokusu yapısındadır. İçerdiği kan ve lenf damarları ile kemiğin beslenmesini ve gelişimini sağlamaktadır. Kan damarları kemik kanallarında devam ederek kemik dokusunun tüm alanlarına ulaşır. Duyu sinirleri de kan damarları ile beraber seyreder ve endosteum, kemik iliği boşluğu ve epifiz bölgelerinde sonlanır. İç tabaka ise hücre bakımından zengindir. Yapısında bulunan hücreler kemik tamiri gibi durumlarda osteoblastlara dönüşerek fonksiyon görürler; ancak bunun dışında aktif değildirler (29).

Periosteum kıkırdak ile kaplı bölgeler hariç kemiğin bütün yüzeylerini kaplar ve ligament ve tendonlar için bağlanma yeri olarak görev yapar. Yaşlandıkça periosteum inceler ve damarlarının bir kısmını kaybeder. Bu olay kemiği yaralanma ve hastalıklara karşı daha duyarlı hale getirir (25). Periosteum damar ve sinir yönünden oldukça zengindir. Ağrı duyusunu ileten lifler periosteumda dağınıktır. Bu yüzden darbelere, yırtılmalara ve gerilmeye karşı oldukça hassastır. Periosteum dışında kalan kemik dokusu ağrıya karşı duyarsızdır (38).

2.1.3.2. Endosteum

Endosteum, kemik içindeki bütün boşlukları sarar ve tek tabaka halinde yassılaştırmış osteoprogenitor hücreler ile çok az miktardaki bağ dokusundan oluşur (25).

Periosteum ve endosteumun görevi; kemik dokusunun beslenmesini, büyümesini ve harap olan kısımlarının onarımını gerçekleştirmektir. Devamlı olarak yeni osteoblastların üretimini sağlamaktadırlar (27, 38).



Şekil 2-3. Kemik yapısı (39).

2.1.4. Kemik Tipleri

Kemik dokusu olgunlaşmamış (primer veya lamelsiz) ve olgunlaşmış (sekonder veya lamelli kemik dokusu) kemik olarak ikiye ayrılır.

Primer kemik dokusu, embriyonik gelişim evresinde ve kırıkların onarımı olaylarında ilk ortaya çıkan kemik türüdür. Primer kemik dokusu genellikle geçicidir ve yetişkinlerde kafatası kemikleri arasındaki eklemlerin etrafında, tendonların kemiğe yapıştığı yerde ve diş alveollarında görülür. Primer kemik dokusu daha az minarel içeriğe sahiptir ve sekonder kemiğe göre daha fazla osteosit içermektedir. Ayrıca kollajen lifleri düzensiz sıralanır (27, 38).

Sekonder kemik dokusu; çocuklarda ve yetişkinlerde görülen kemik dokusu olup iki tiptir. Bunlar; vücuttaki kemiklerin %80'ini oluşturan ve birçok kemiğin dış tabakasını yapan kompakt veya kortikal kemik ve kalan %20'yi oluşturan kortikal kemiğin içindeki süngerimsi (spongiöz) veya trabeküler kemiktir (25). Tipik olarak sekonder kemik dokusu, kollajen liflerin birbirine paralel veya bir damar kanalı etrafında dairesel olarak düzenlendiklerini gösterir (25, 27, 38).

Kan damarlarını, sinirleri ve gevşek bağ dokusunu içeren bir kanal etrafını saran, dairesel lamellere "Havers Sistemi" ya da "Osteon" denir. Kemik yüzeyine dik olarak konumlanan diğer bir kanal sistemine ise "Volkmann Kanalları" denir. Volkmann kanalları içindeki damarlar Havers kanallarının içindekilerle bağlantılıdır. Böylece kemiğin iç ve dış yüzeyleri arasında bağlantı sağlanmış olur (26).

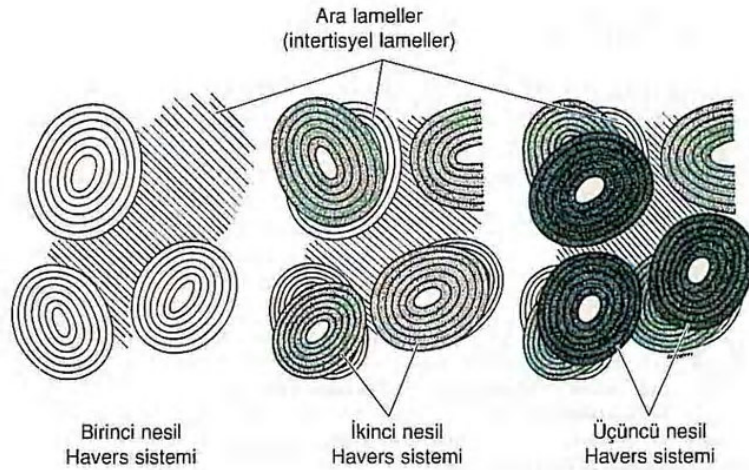
2.1.4.1. Süngerimsi Kemik

Süngerimsi kemik iskelet sisteminin %20'sini oluşturur. Genellikle kemiklerin iç kısımlarında bulunur. Yapısında iğnemsî çıkıntılar veya plakalar yer almaktadır. Bu kemiklerde kemik yüzeyin kemiğin tüm hacmine oranı yüksektir ve plakaların yüzeyinde birçok hücre yer almaktadır. Yapısında çok sayıda kemik trabekülü ve bunlar arasındaki boşlukları ihtiva eder. Bu boşluklar canlıda kırmızı kemik iliği tarafından doldurulmuştur. Süngerimsi kemiklerin yapısında Havers kanalları bulunmaz. Bundan dolayı besin maddeleri trabekülaya difüzyon ile geçmektedir (25, 38).

2.1.4.2. Kompakt Kemik

Kompakt kemik kanallar ve lamellerden oluşmuş homojen bir yapıya sahiptir. Kompakt kemikteki lameller; Havers lamelleri, dış dairesel lameller, iç dairesel lameller ve ara lamellerden meydana gelmektedir (38).

İç dairesel lameller kemik iliği boşluğunun etrafında, dış dairesel lameller ise hemen periosteumun altında yer alır. Dış lamellerin sayısı iç lamellerden daha fazladır. Ara lameller ise Havers sistemleri arasında yer alan birbirine paralel uzanan lamellerdir (27). Havers sistemi; diyafizin uzun eksenine paralel uzanan, uzun ve sık dallanma gösteren kanallardır (Şekil 2-4). Etrafı 4-20 lamelcik ile sarılı merkezi kanaldan meydana gelir. Endosteum ile örtülü her kanalda kan damarları, sinirler ve gevşek bağ dokusu vardır. Havers kanalları, kemik iliği boşluğu, periosteum ve enine veya çapraz uzanan Volkmann kanalları ile ilişkilidir. Volkmann kanalları dairesel lamel içermez, bunun yerine lamelleri delerek uzanırlar. Kemik dokusu sürekli yeniden modellendiği için Havers kanallarının çapları büyük değişiklik gösterir. Her sistem ardı ardına dıştan içeriye doğru lamellerin tortulanması ile meydana gelir (Şekil 2-4). Bu yüzden yeni oluşmaya başlamış sistemlerin kanalları daha büyüktür. Yetişkin Havers sisteminde merkezdeki kanala en yakın lamel en yeni oluşmuş olandır (27).



Şekil 2-4. Havers Sistemine ait şematik çizim (37).

2.2. İSKELET SİSTEMİNİN GELİŞİMİ

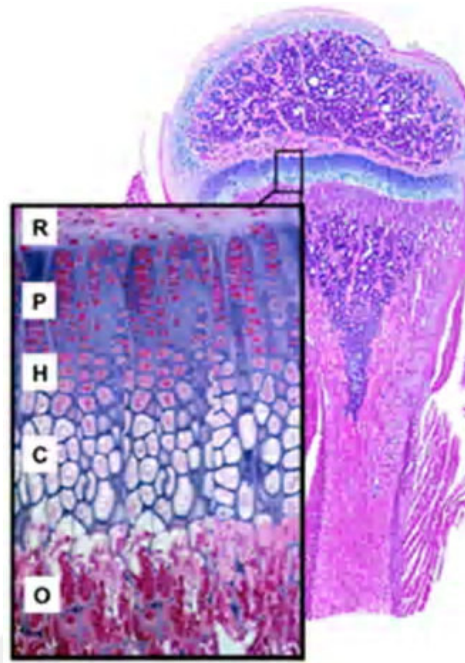
Fetal gelişim döneminde kemiklerin çoğu önce kıkırdak olarak şekillenir, daha sonra gövdede başlayan ossifikasyonla normal kemik haline dönüşür. Mezenşimal hücrelerin doğrudan kemik oluşturduğu clavícula, mandibula ve kafatasındaki bazı kemikler bunun dışındadır. Vertebralılarda iskelet sistemi mezoderm ve crista neuralis hücrelerinden orijin alır (40). Primitif kemik yapıların oluşumunda ilk aşama mezenkim hücrelerinin yoğunlaşması ile ortaya çıkan model yapılarıdır (40, 41, 42). Bu aşamadan itibaren kafatası kemiklerinde olduğu gibi bazı kemikler bu mezenkim doku içerisinde intramembranoz yolla, diğerleri ise ekstremitelerin uzun kemiklerinde olduğu gibi endokondral yolla gelişimlerini tamamlarlar (40). Kemikleşme hangi türde olursa olsun, ilk oluşan kemik dokusu birincil kemik olarak adlandırılan olgunlaşmamış kemiktir. Oluşan bu birincil kemik kalıcı olmayıp yerini olgun lamelli kemik dokuya bırakmaktadır (43).

2.2.1. Endokondral Kemikleşme

Klavikula dışında kalan uzun kemiklerin, kalça kemiklerinin, omurganın ve kafa tabanının kemikleşmesi bu yolla gerçekleşir. Bu tip kemik gelişimi modelinde, kemiklerin oluşacağı yerlerde kemiğin şeklini andıran mezenkim doku kaynaklı hyalin kıkırdak yapıda küçük bir taslağı meydana gelmektedir (Şekil 2-5). Dolayısı ile kondrogenez bu mekanizmanın önemli bir morfojenetik parçasıdır. Bu tür kemikleşme ekstremiteler kemikleri, omurga kemikleri, pelvis kemikleri gibi kısa ve uzun kemiklerde görülmektedir. Bu kemikleşme modelinde, fetal kemik gelişim döneminde kemiklerin

çoğu önce kıkırdak olarak şekillenir (25, 27, 38). Daha sonra bu kıkırdak taslak apozisyonel büyüme yoluyla daha uzun bir şekil alır. Perikondriumla sarılı olan diyafiz ve epifizler oluşur. Kıkırdak modelin ortasında yer alan kondrositler büyüyerek onları çevreleyen kıkırdağı rezorbe ederler ve geride trabeküllü bir kıkırdak matriks kalır. Daha sonra bu kıkırdak matriks kalsifiye olur. Kondrosit hücreleri dejenere olduktan sonra geniş boşluklar meydana gelir. Periost kıkırdak taslağın üzerinde ince bir tabaka olup yeni kemik dokusu oluşturur. Aynı anda ilkel mezenkim dokusu ve kan damarları kıkırdak taslağın içindeki boşlukları istila ederler. Bu mezenkim dokusu daha sonra osteoblastlara ve kemik iliği hücrelerine farklılaşır. Osteoblastlar kıkırdak matriksin kalıntılarının yüzeyinde bir hücre tabakası meydana getirerek ağsı kemiği oluşturmaya başlarlar (31).

Bu olaylar sonucunda ilk kıkırdak taslağının uç kısımları orta kısımdan primer kemikleşme merkezi adı verilen geniş bir alanla ayrılır. Buna karşılık kıkırdağın her iki ucunun çapı büyümeye devam eder. Bu sırada orta kısmın uç bölümlerinde bulunan kıkırdak değişime uğramaya ve kemikleşmeye başlar. Bu aşamada gelişmekte olan kemik uzun bir diyafiz ve bunun her iki ucunda yarım ay biçiminde halen kıkırdak dokudan meydana gelen epifizlerden oluşur. Diyafiz ile her iki epifiz arasında yer alan bölgelere büyüme plağı ya da epifiz plağı adı verilir (Şekil 2-5). Bunların içinde kıkırdak doku çoğalmaya devam ederek kemiğin boyunun uzamasını sağlar. Benzer şekilde, plakların diyafiz tarafında kondrositler olgunlaşır ve kaybolur, dejenere olan kısımlara ise yeni kemik dokusu yerleşir. Bu sayede diyafiz kısmı da uzar ve büyüme plakları daha uzağa itilir. Genel iskelet sisteminin olgunlaşmasıyla beraber hormonal etkenler daha fazla kıkırdak oluşumunu engelleyerek büyüme plaklarının kemikleşmesini ve diyafiz ile epifizlerin birleşmesini sağlar (44). Bu sırada gelişmekte olan epifizlerin içindeki kıkırdak dokusunun merkezinde diyafize benzer şekilde yeni kemik oluşumu meydana gelir. Bunun gerçekleştiği bölgeye sekonder kemikleşme merkezi adı verilir. Sonradan eklem kıkırdağına dönüşecek olan ince bir hyalin kıkırdak doku epifizlerinin yüzeyini örtmeye devam eder. Fonksiyonel streslerin etkisiyle, kalsifiye kıkırdak dokusu ve bunu çevreleyen düzensiz ağsı kemik yeniden şekillenerek kemiğin kompakt yapıda bir dış tabaka ve ortasında boşluk bulunan kansellöz yapıda bir iç tabakanın oluşmasını sağlarlar. Yaşlanma ile birlikte orta kısım rezorbe olarak kemik iliği ile dolu geniş bir boşluk haline gelir (31, 44).



Şekil 2-5. Endokondral kemikleşme (28).

R: Rezerv kıkırdak zone

P: Proliferasyon zone

H: Hipertrofi zone

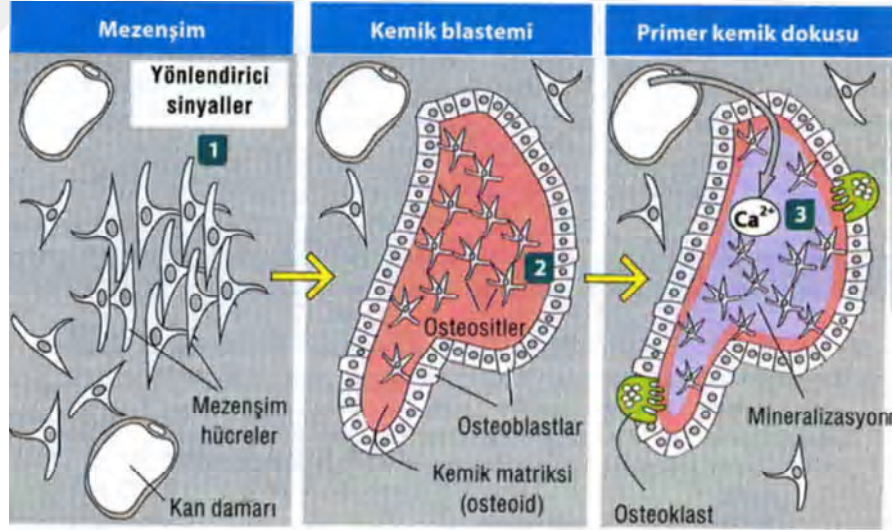
C: Kalsifiye kıkırdak zone

O: Kemikleşme zone (Rezorbsiyon zone)

2.2.2. İntramembranöz Kemikleşme

İntramembranöz kemik oluşumunda mezenkim kökenli yoğun bağ dokusu yeni kemik oluşumuna yardımcı olmaktadır. İntramembranöz kemikleşme, çoğu yassı kemiğin kaynağıdır. Bu yöntemin, kısa kemiklerin büyümesine ve kalınlaşmasında katkısı vardır. Bu kemikleşmede mezenkim dokusu yoğunlaşması içinde kemikleşme gelişir. Bağ dokusu kıkırdak dokuya dönüşmeden direkt olarak kemik dokusunu oluşturur (Şekil 2-6). Kafatasının frontal ve parietal kemikler ile occipital, temporal, mandibula ve maxilla kemiklerinin bazı kısımları intramembranöz kemikleşme ile oluşur. Ayrıca bu kemikleşmenin kısa kemiklerin büyümesinde ve kalınlaşmasında da katkısı vardır (27, 38). Mezenkim hücreleri önce hızlı bölünme gösterir ve osteoprogenitör hücreye farklılaşırlar, daha sonra da osteoblastlara dönüşerek kemik matriksini şekillendirirler. Bu dokuda çok sayıda kılcal damar gözlenir. Bu damarlar osteoid dokuya kalsiyum ve fosfor iyonlarını taşır.

İyonlar, osteoblastların salgıladığı alkalen fosfataz aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşerek kalsifikasyonu sağlarlar. Oluşan dokuya kemik trabekülleri denir. Trabeküller içinde kalan osteoblastlar aktivitesi azalmış osteositlere dönüşür. Şekillenen trabeküllerin yüzeyine osteoprogenitör hücrelerden farklılaşan osteoblastlar tek sıra halinde dizilirler ve kemik lamellerini oluştururlar. Bu olayın ardı ardına tekrarlanması sonucu birincil kemik trabeküllerinin yüzeylerinde ve kenarlarında lamelli ikincil kemik yapısında katmanlar meydana gelir ve trabeküller kalınlaşıp uzarlar. Bu sırada osteoklastlar kemikleri iç yüzeylerinden rezorbe ederken, osteoblastlar da bir taraftan yeni kemik lamelleri eklerler. Böylece birincil kemik dokusu içeren trabeküller tamamen ortadan kalkar, geriye sadece ikincil kemik yapısındaki trabeküller kalır. Komşu trabeküller birbirleriyle kaynaşarak spongiyöz kemiği şekillendirirler. Bu kemiklerin iç ve dış yüzeylerinde yine intramembranöz yolla bir miktar kompakt kemik eklenir ve kemikleşme sona erer. Trabeküllerin aralarında kalan mezenkim dokusundan da kemik iliği şekillenir (45, 46, 47).



Şekil 2-6. İntramembranöz kemikleşmenin başlaması ile ilgili şematik çizim (48).

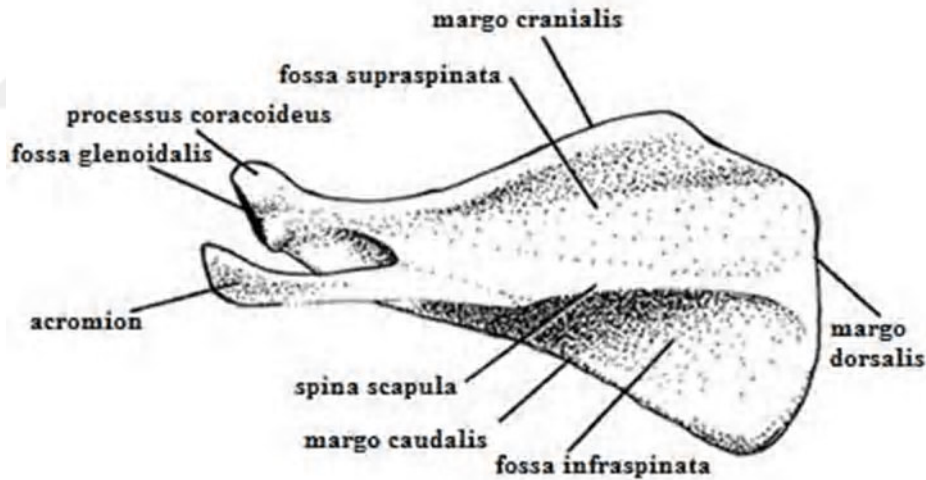
2.3. SKELETON APPENDICULAR (APPENDİKÜLER İSKELET)

Ratlarda appendiküler iskelet; ön ve arka ekstremite kemiklerinden meydana gelmektedir.

2.3.1. Ön Ekstremitte Kemikleri

Ön ekstremitte clavícula, scapula, humerus, radius, ulna ve ön ayak kemikleri tarafından sağda ve solda toplamda 64 kemikten meydana gelmektedir (Resim 2.1).

Clavicula, iskelet sistemi gelişiminde ossifikasyonu ilk başlayan kemiktir. Ayrıca omuz kavşağını aksiyal iskelete bağlamaktadır. Proksimal ucu sternum ile distal ucu scapula eklem yapmaktadır (49, 50). Üçgen şeklinde yassı bir kemik olan scapula'nın; üç kenarı, üç köşesi ve iki yüzü bulunmaktadır (Şekil 2-7). Scapula'nın dış yüzünde spina scapula olarak adlandırılan belirgin bir çıkıntı vardır. Bu yapı laterale doğru acromion isimli çıkıntı ile devam eder. Üst kenarında ise kanca şeklinde görünümü olan processus coracoideus isimli çıkıntı bulunmaktadır. Ayrıca scapula'nın lateral kenarında humerus ile eklem yaptığı fossa glenoidale adı verilen çukur bulunmaktadır. Böylece ön ekstremitte ile omuz kavşağı arasında bağlantı kurulmaktadır (50).



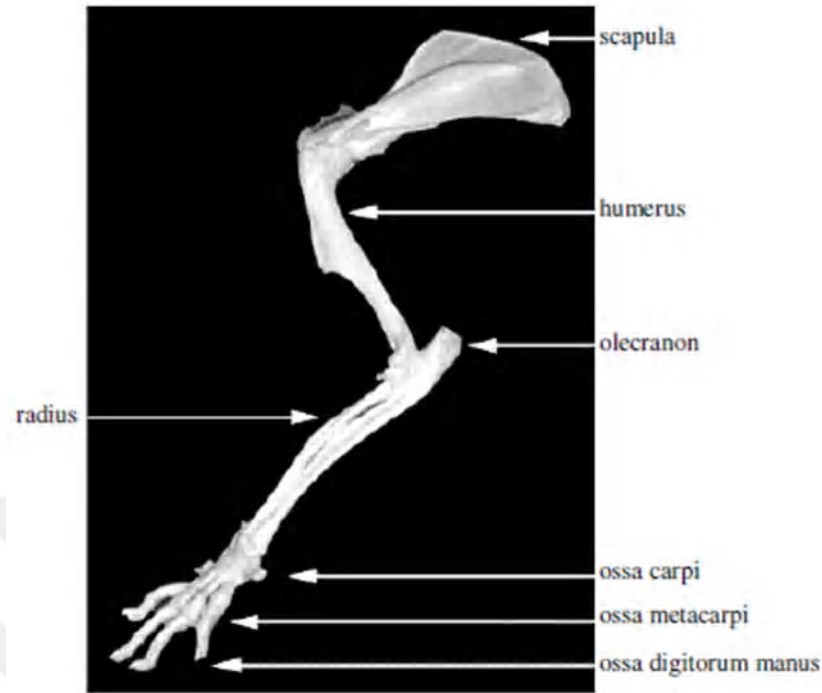
Şekil 2-7. Sol scapula'nın lateral görünümü (50).

Humerus, ön ekstremitenin uzun kemiklerinden biridir. İki ucu ve bir gövdesi bulunan humerus, proksimalde scapula ile distalde radius ve ulna ile eklem yapar. Art. humeri, humerus'un caput humeri'si ile scapula'nın fossa glenoidale'si arasındadır. Humerus'un proksimal ucunda tuberculum majus, tuberculum minus ve m. deltoideus kasının tendonlarının tutunduğu tuberositas deltoidea bulunmaktadır. Ayrıca yaşlı ratlarda tuberositas teres adında bir kabarıklık daha mevcuttur. Humerus'un distal ucunda ise

epicondylus medialis ve lateralis olarak adlandırılan iki ayrı epikondil bulunmaktadır (51, 52, 53).

Ön ekstremitede humerus ile carpal kemikler arasında radius ve ulna kemikleri bulunmaktadır (Resim 2.1). Ulna ve radius temelde benzer çaplarda kemiklerdir. Fakat ulna proksimal ucundaki olecranon çıkıntısından dolayı radius'tan 1/6 oranında daha uzundur. Ulna ve radius arasında dar bir aralık bulunmaktadır ve burası membran ile kapatılmıştır (51, 52, 53). Ön ekstremitede el bileği ve el iskeleti toplam 27 adet kemikten oluşmaktadır. Bu kemikler; ossa carpi (8 adet), ossa metacarpi (5 adet) ve ossa digitorum manus (14 adet)'dur.

Ossa carpi kemikleri proksimal ve distal iki sıra halinde dizilmiştir. Proksimal sırada 2 adet kemik bulunur. Medialde os carpi intermedioradiale (os carpi radiale ve os carpi intermedium'un birleşmesinden oluşur), lateralde ise os carpi ulnare bulunur. Distal sırada ise 6 adet kemik bulunur. Bunlar, os carpale I, os carpale II, os carpale III, os carpale IV, os carpale V ve os carpi centrale olarak adlandırılırlar. Ayrıca el iskeletinde bunların dışında iki adet sesamoid kemik bulunmaktadır. Bu kemiklerden medialde bulunana os falciforme veya os marginale, lateralde bulunana ise phalanx postminimi adı verilmektedir. Ossa metacarpale toplamda 5 adet kemikten meydana gelmektedir. Bu kemiklerin en kısası I. metacarpal kemik en uzununu ise III. metacarpal kemiktir. Ossa digitorum manus ise başparmak 2, diğer parmaklar ise 3'er tane falanks olmak üzere toplam 14 adet kemikten oluşur (51, 52, 53).



Resim 2.1. Sol ön ekstremité kemikleri (50).

2.3.2. Arka Ekstremité Kemikleri

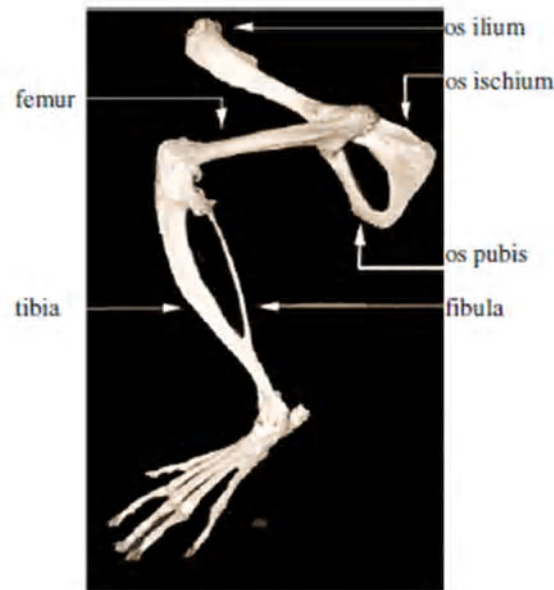
Arka ekstremité os coxae, femur, tibia, fibula, patella ve arka ayak kemikleri tarafından sağda ve solda toplamda 64 kemikten meydana gelmektedir. Buna ek olarak 2 adet patella'da bulunmaktadır.

Os coxae, sacrum kemiğinin sağ ve sol tarafında bulunan bir çift kemik olup pelvis iskeletini oluşumuna katılmaktadır. Os coxae kemikleşmesini tamamlamadan önce üç parçadan meydana gelmektedir. Bunlar os ilium, os ischium ve os pubis'tir. Fossa acetabuli ile femur'un caput femoris'i arasında oluşan art. coxae arka ekstremité ve pelvis kavşağı arasında bağlantıyı kurmaktadır (51, 54).

Arka ekstremitenin en uzun kemiği olan femur'un proksimal ve distal olmak üzere iki ucu ve bunlar arasında yer alan bir gövdesi bulunmaktadır. Proximal uçta caput femoris ve collum femoris vardır. Yine proksimal uçta; trochanter major, trochanter minor ve trochanter tertius olmak üzere üç adet çıkıntı bulunmaktadır. Distal uçta ise condylus medialis ve condylus lateralis olmak üzere iki kondil mevcuttur (51, 54, 55). Ratlarda tibia ve fibula kemiklerinin anatomik yapısı insaninkinden biraz farklıdır. Şöyle ki tibia ve fibula ratlarda tek bir kemik olarak incelenmektedir. Çünkü tibia ve fibula, proksimal

ve distal uçta birleşmektedirler. Bundan dolayı os tibiofibulare olarak isimlendirilmektedir. Yeni doğanlarda bile kısmi bir kemikleşme ile birleşen bu kemikler, yaş ilerledikçe daha iyi kaynaşırlar. Tibia ile fibula arasındaki kaynaşmaya rağmen iki kemik arasında geniş bir aralık bulunmaktadır ve burası membran ile kapatılmıştır (51, 54, 55). Arka ekstremitede ayak bileği ve ayak iskeleti toplam 27 adet kemikten oluşmaktadır (Resim 2.2). Bu kemikler; ossa tarsi (8 adet), ossa metatarsi (5 adet) ve ossa digitorum pedis (14 adet)'dir.

Ayak bileğine ait kemikler proksimal ve distal iki sıra halinde dizilmiştir. Proksimal sırada dört adet kemik bulunmaktadır. Bu kemikler; talus, calcaneus, os tibiale mediale tarsi ve talus ile distal sıra arasında yer alan os naviculare (os tarsi centrale) kemikleridir. Distal sırada da dört adet kemik bulunmaktadır. Bu kemikler medialden laterale doğru os cuneiforme mediale, intermedium, laterale ve cuboideum (os tarsale I, os tarsale II, os tarsale III, os tarsale IV) kemikleridir (23, 26, 27). Ossa metatarsale toplamda 5 adet kemikten meydana gelmektedir. Bu kemiklerin en kısısı I. metatarsal kemik en uzununu ise III. metatarsal kemiktir. Ossa digitorum pedis 14 kemikten meydana gelmektedir. Birinci parmakta iki falankstan, diğer parmaklar ise uç falankstan oluşur (51).



Resim 2.2. Sol arka ekstremit kemikleri (49).

2.4. KIKIRDAK DOKUSUNUN HİSTOLOJİSİ

Kıkırdak, kondrosit adı verilen hücreler ve yüksek düzeyde özelleşmiş ekstraselüler matriksten oluşan bir bağ dokusu şeklidir. Kıkırdak, kondrositlerden ve bol miktarda ekstraselüler matriksten oluşan avasküler bir dokudur. Kıkırdak hacminin %95'den çoğu, bu dokunun işlevsel bir elemanı olan ekstraselüler matriksten oluşmaktadır. Kondrositler, matriksin üretimi ve devamlılığı için gerekli öğelerdir (56).

Kıkırdak dokusu, kollajen matriksinde yer alan glikozaminoglikan kümeleri ile karakterize yarı sert bir bağ dokusudur. Yapısında sıvı içeriğinin fazla olmasından kaynaklı esnek bir destek sağlamak üzere görev yapar. Kıkırdak dokusu, kan damarı içermediği için besin maddelerinin ve metabolik ürünlerin geçişi difüzyon ile gerçekleşmektedir. Aynı zamanda kıkırdak dokusunda lenfatik damarlar ve sinirlerde bulunmamaktadır (27, 32).

Kıkırdak matriksinde glikozaminoglikanların tip II kollajen liflerine oranının yüksek olması, çevreleyen bağ dokusundaki kan damarları ile matrikste dağılmış olan kondrositler arasında maddelerin difüzyonuna izin vermekte ve böylece doku canlılığının devamlılığı sağlanmaktadır. Zıt biyofiziksel özelliklere sahip iki yapısal molekül sınıfı arasında yakın ilişki görülmektedir. Bu moleküller, gerilime direnç gösteren kollajen lif ağı ve yüksek miktarlardaki yoğun bir şekilde hidrate proteoglikan kümeleridir. Proteoglikan kümeleri kopma konusunda çok zayıf olmakla birlikte, kıkırdağı özellikle sinoviyal eklemler gibi hareket noktalarında ağırlık taşımaya uygun hale getirmektedirler. Büyüme sırasında bile bu özelliği koruduğu için; kıkırdak, fetal iskeletin ve büyümekte olan çoğu kemiğin gelişiminde anahtar dokudur (56). Perikondrium, kıkırdağın büyük bir kısmını saran, kıkırdak ile kıkırdağın desteklediği doku arasında ara yüz meydana getiren yoğun bağ dokusu tabakasıdır. Bu tabaka kıkırdak dokusu için damar desteği sağlar ve ayrıca lenfatik damarlar ve sinirleri de barındırır (27).

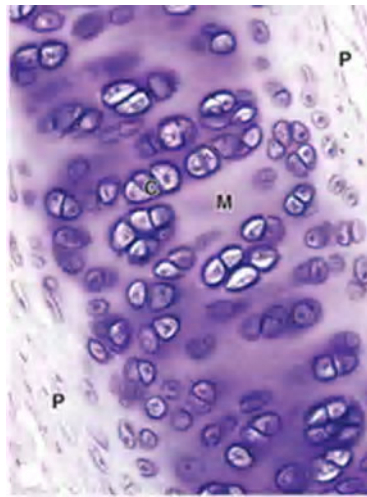
2.4.1. Kıkırdak Tipleri

Vücut yapısına uygun bir şekilde, bölgesel biyomekanik gereksinimler doğrultusunda oluşan farklı matriks elemanları üç çeşit kıkırdağın ortaya çıkmasına sebep olur. Üç tip kıkırdak görünüm olarak farklıdır ve mekanik özellikleri matrikslerinin karakteristiklerine göre farklılıklar göstermektedir.

1. Hyalin kıkırdak; tip II kollajen lifleri, glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve çoklu yapışkan glikoproteinler içeren matriks ile karakterizedir.
2. Elastik kıkırdak; hyalin kıkırdağın matriks materyallerine ek olarak elastik lifler ve elastik lamellerle karakterizedir.
3. Fibröz kıkırdak; hyalin kıkırdağın matriks materyalinin yanında bol miktarda tip I kollajen lifleri ile karakterizedir.

2.4.1.1. Hyalin Kıkırdak

Hyalin kıkırdak, kıkırdak türleri içerisinde en yaygın olanıdır. Hyalin kıkırdak, homojen ve amorf matriks ile ayırt edilmektedir. Hyalin kıkırdağın matriksi canlı durumda camsı görünmektedir ve bu nedenle hyalin olarak isimlendirilmiştir (*Gr. hyalos, camsı*). Kıkırdak matriksi içinde laküna adı verilen boşluklar bulunmaktadır. Bu lakünalarda kondrositler yerleşmiştir (56). Taze hyalin kıkırdak yarı saydam mavimsi beyaz renktedir (Resim 2.3). Embriyolojik dönemde zamanla yerini kemik dokusu alıncaya kadar geçici iskelet doku olarak görev yapar. Yetişkinlerde hyalin kıkırdak, hareketli eklemlerin eklem yüzeylerinde, solunum yollarının duvarlarında, kaburgaların sternum eklem yaptıkları ön uçlarında ve epifiz plaklarında yer alır (55).



Resim 2.3. Hyalin kıkırdağın mikroskop fotoğrafı (57).

P: Perikondriyum

M: Matriks

C: Kondrosit

Hyalin kıkırdak matriksinin makromolekülleri, kollajen (baskın olarak tip II lifler ve

kıkırdığa özgün diğer kollajen molekülleri), glikozaminoglikanları içeren proteoglikan kümeleri ve çoklu yapışkan glikoproteinlerdir (non-kollajen proteinler) (56).

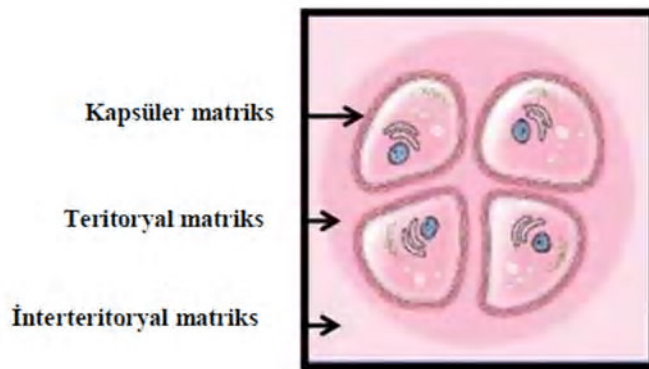
Hyalin kıkırdak matriksinin bileşenleri eşit şekilde dağılmamıştır. Hyalin kıkırdığın proteoglikanları yüksek yoğunlukta bağlı sülfat grupları içerdikleri için ara madde bazik boyalarla ve hematoksilinle boyanmaktadır. Böylece boyanmış kıkırdak kesitlerinde görülen bazofili ve metakromazi sülfatlı proteoglikanların dağılımları ve nispi yoğunluklarına ilişkin bilgi sağlar. Bununla birlikte matriks homojen bir biçimde boyanmaz (Şekil 2-8).

Matriksin boyanma özelliklerini temel alan üç farklı alan tanımlanmıştır:

1. Kapsüler (periselüler) matriks, kondrositin hemen çevresinde yer alan, daha yoğun boyanan matriks halkasıdır. Proteoglikanları, hiyaluronanı, biglikanları ve bazı çoklu yapışkan glikoproteinleri (örnek; fibronektin, dekorin ve laminin) en yüksek yoğunlukta içermektedir. Kapsüler matriks neredeyse yalnızca tip VI kollajen liflerini içermektedir ve bu lifler her bir kondrositin çevresinde sıkıca örülmüş bir çift oluştururlar. Tip VI kollajen, hücre yüzeyindeki integrin reseptörlerine bağlanır ve kondrositleri matrikse sabitler. Kapsüler matrikste yüksek yoğunlukta tip IX kollajen de bulunmaktadır.

2. Teritoryal matriks, kondrositlerin yakın çevresinden uzakta kalan alandır. İzogen grupları çevreler ve rastgele düzenlenmiş tip II kollajen lifleri ile az miktarda tip IX kollajen içermektedir. Daha düşük yoğunlukta sülfatlı proteoglikanları içermektedir ve kapsüler matrikse göre daha az yoğun boyanır.

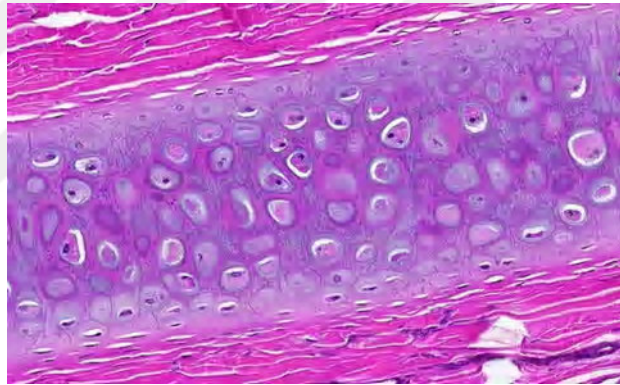
3. İnterteritoryal matriks, teritoryal matriksi çevreleyen bölgedir ve kondrosit grupları arasındaki alanı kaplar (56).



Şekil 2-8. Matriksin boyanma özelliklerini temel alan üç farklı alan (48).

2.4.1.2. Elastik Kıkırdak

Elastik kıkırdak matriksi, hyalin kıkırdak matriksinin normal bileşenlerini içermesine ek olarak, dallanan ve anastomozlaşan yoğun elastik lif ağı ve birbiri ile birleşen elastik materyal yaprakları da içermektedir. Elastik kıkırdak, kulak kepçesinde, dış kulak kanalı duvarında, östaki borusunda, epiglotta ve gırtlığın küneiform kıkırdağında bulunur. Matriks yapısı; tip II kollajen liflere ilave olarak, balık ağı gibi ince çok sayıda elastik lifçik bulundurması dışında hyalin kıkırdak matriksine birebir benzemektedir. Taze elastik kıkırdak sarımtırak renktedir (Resim 2.4). Elastik kıkırdak çoğu zaman hyalin kıkırdağa dönüşür. Hyalin kıkırdakta olduğu gibi elastik kıkırdağın yapısında perikondrium vardır (27). Yaşlanma ile kalsifiye olan hyalin kıkırdağın aksine elastik kıkırdağın matriksi yaşlanma sürecinde kalsifiye olmamaktadır.



Resim 2.4. Elastik kıkırdak fotoğrafı (58).

2.4.1.3. Fibröz Kıkırdak

Fibröz kıkırdak kondrositlerden ve bunların sıkı bağ dokusu ile karışmış matriks materyalinden oluşmaktadır. Fibröz kıkırdak, sıkı bağ dokusu ve hyalin kıkırdağın bir birleşimidir. Kondrositler, kollajen liflerinin arasında tek tek, dizi ve izogen gruplar halinde dağılmışlardır. Bu kondrositler hyalin kıkırdağın kondrositlerine benzer görünürler, ancak daha az kıkırdak matriks materyaline sahiptirler. Omurlar arası disklerde, belirli bağların kıkırdağımsı kemik yüzeylerine bağlandıkları yerlerde ve symphysis pubica'da bulunur. Fibröz kıkırdak ya tek başına ya da izogen gruplar halinde yer alan kıkırdak hücrelerini içerir (Resim 2.5). Matriksi tip I kollajenden zengin olduğu için asidofildir. Bunun yanı sıra yapısında tanımlanabilecek herhangi bir perikondrium yoktur (27).

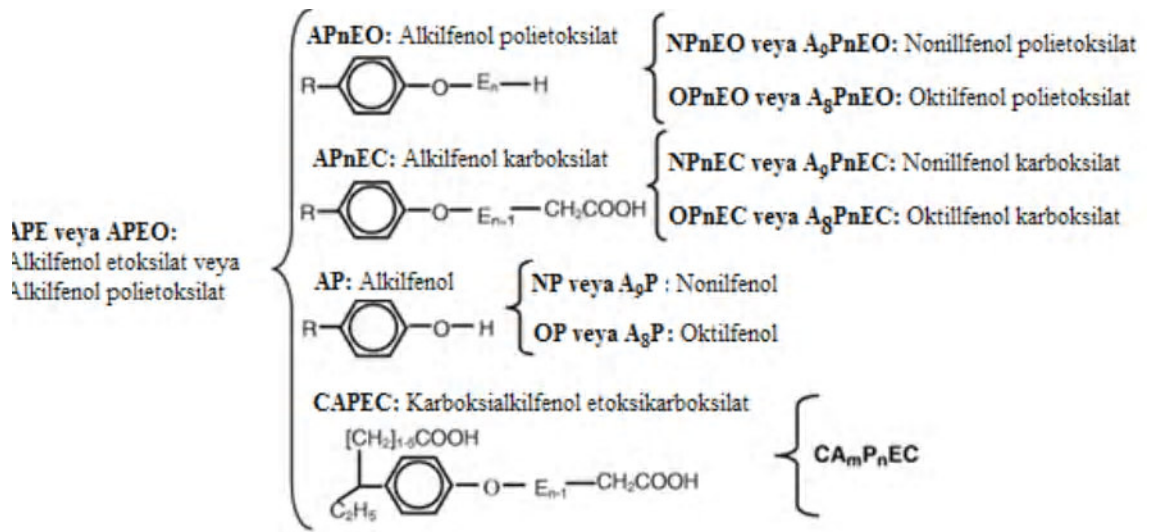


Resim 2.5. Fibröz kıkırdak fotoğrafı (56).

2.5. ALKİLFENOL ETOKSİLATLAR (AFE)

Çevremizde bulunan endokrin bozucular ya da hormon benzeri etki eden kimyasallar endojen hormonların etkilerini baskılayarak metabolizmayı bozmaktadırlar. Güncel çalışmalara göre, çevremizdeki bu kimyasallara maruz kalma, insan ve hayvanlarda fertilite ve gonadların gelişimini etkilemektedir.

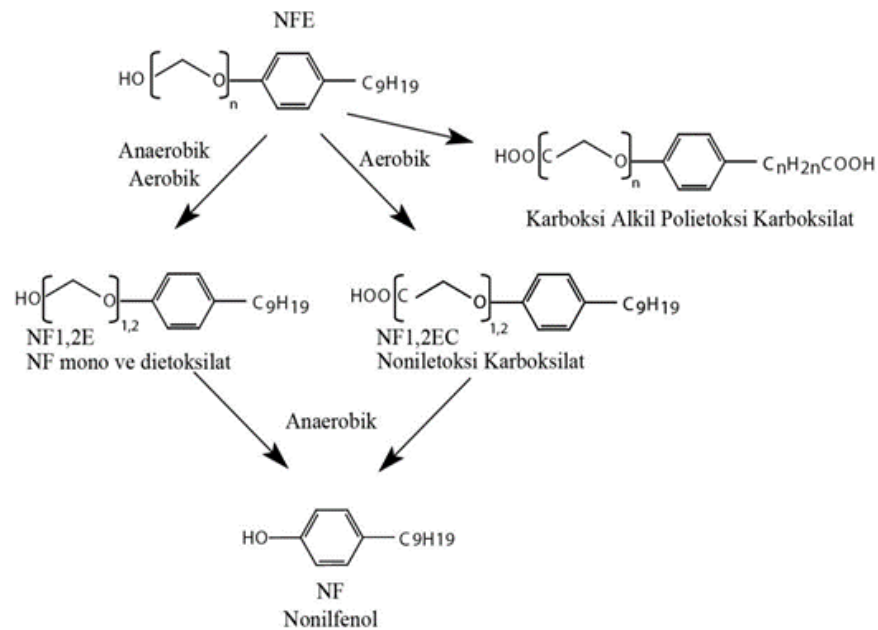
Endüstriyel, ticari ve evsel ortamlarda yaygın olarak kullanıldıklarından çevreye atık sular yoluyla yayılan AFE'ler, sulu solüsyonlarda kullanıldıklarında suyu kirleten maddeler olarak adlandırılırlar (59). AFE'ler temizlik ürünleri, boya, herbisit, pestisit gibi maddelerin yapımında kullanılan yüzey aktif bileşiklerdir. Bu bileşiklerin biyolojik olarak kolay parçalanma özelliği vardır. AFE'lerin parçalanma ürünleri toksik ve biyodegradasyona karşı dirençli yapılardır (60). Hem literatür hem de laboratuvar çalışmaları göstermektedir ki, AFE'ler ve özellikle Nonylphenol'ün canlı dokularda biyolojik birikime neden olmaktadır (61). Alkilfenolik bileşikler su ortamlarında, birkaç etoksilat grubu içeren alkilfenol etoksilatlar, alkilfenoksi karboksilik asit ve alkilfenoller olarak üç ana grup şeklinde bulunurlar. Şekil 2-9'da AFB'nin indirgenerek oluşturduğu bileşikler şematik olarak gösterilmektedir (62).



Şekil 2-9. AFB'nin indirgenerek oluşturduğu bileşiklerin şematik olarak gösterilmesi (62). R: dallanmış nonil grup (C₉H₁₉) veya oktil grup (C₈H₁₇); m: Alkil grup sayısı (m=9 nonil grup, m=8 oktil grup) E= [CH₂-CH₂-O] etoksilat grup; n: etoksilat grup sayısı (1-20)

2.5.1. Nonylphenol'ün Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

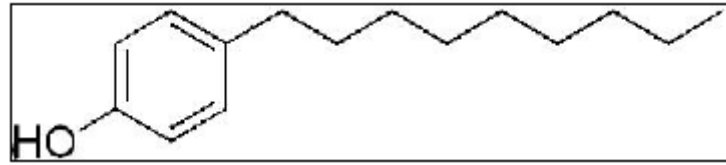
Nonylphenol (NF)'ler, alkil fenollerin geniş bir grubunu oluşturan organik bileşiklerdir. Nonylphenol, nonylphenol polietoksilatların (NFE) parçalanmasıyla oluşmaktadır (60). Nonylphenol merkezinde aromatik (veya benzen) halka, halkaya bağlı dokuz karbonlu (C) yan zincir ve bu zincirin karşısında hidroksil grubu (OH) bulunduran bileşiklerden en iyi bilinenidir (Şekil 2-10) (63).



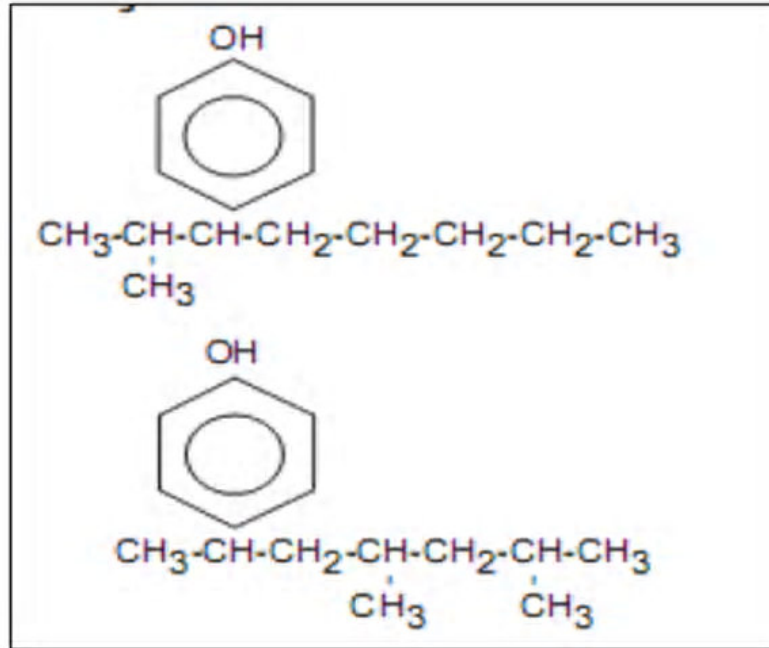
Şekil 2-10. NFE'nin su ortamındaki bozunma şeması (63).

Nonylphenol çevrede sık rastlanan bir kirleticidir. Yapılan araştırmalarda Nonylphenol'e tüm dünya çapında suda, çökeltelerde havada ve toprakta rastlanmıştır. Doğal çevrelerde ve su arıtma tesislerinde aerobik ve anerobik ortamlarda mikroorganizmalar sayesinde biyodegradasyonla azaltılabilir (64).

Nonylphenol yapısal olarak doğrusal ve dallı olmak üzere iki farklı şekilde bulunmaktadır. Şekil 2-11 ve 2-12'de doğrusal konumdaki 4-Nonylphenol'ün kimyasal yapısı gösterilmektedir (65).



Şekil 2-11. Doğrusal konumdaki 4-Nonylphenol'ün kimyasal yapısı (65).



Şekil 2-12. Nonylphenol'ün kimyasal yapısı (63).

Doğrusal Nonylphenol (4-NF) beyaz kristal yapıdayken dallı Nonylphenol oda sıcaklığında sıvıdır ve rengi sarıya kaymaktadır. Nonylphenol'ün, 25 °C'deki yoğunluğu 0.952 g/ml'dir. Sudaki 11 çözünürlüğü 4,9 mg/L'dir. Çoğu organik çözücüde çözünebilmektedirler (66). Nonylphenol, mat sarı visküz zayıf fenolik kokulu bir sıvıdır. Bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri ise aşağıdaki tablodaki gibidir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1. Nonylphenol fizikokimyasal özellikleri (67, 68, 69).

Parametre	Değer
Normal Sıcaklık ve Basıncıta Fiziksel Hali	Zayıf Fenolik Kokulu, mat sarı Renkli
Saflık yüzdesi	% 90 w/w
Erime Noktası	Alkil zinciri yapısındaki farklılıklardan dolayı -10°C, -8°C, 10°C ve <20°C gibi çeşitli değerler rapor edilmiştir.
Kaynama Noktası	Atmosfer basıncında ayrışma ile 290-310°C
Bağıl Yoğunluk	20°C'de 0,95 g/ml
Buhar Basıncı	20°C'de 0.0023 mmHg (0.3 Pa)
Sudaki Çözünürlük	Suda gerçekte çözünmez ancak 20°C'de 6mg/100 ml'de çözünür.
Kendi Kendini Yıkımlama Isısı	370°C
Henry Sabiti	1.02 Pa m ³ /mol
pKa değeri	Tahmini değer 10.25

2.5.2. Nonylphenol'ün Etkileri

Alkilfenolün en dirençli metaboliti olan Nonylphenol, yüksek lipofilik yapısı nedeniyle akümülyasyon eğilimindedir (70). Alkilfenol bileşiklerinin organizmalarda östrojenik (71), kanserojenik (72), toksik (73) ve oksidatif stres oluşturunca (74) etkilerinin olduğu gösterilmiştir. 17 β östradiol hücre ölümüne engel olmazken, alkilfenollerin hücre ölümü üzerine etkileri, östrojenik etkilerinden bağımsızdır (72). Nonylphenol'ün etoksi üniteleri, hücre duvarında eritici aktiviteye sahiptir ve mitokondriyel oksidatif fosforilasyonu inhibe eder (75). Alkilfenol'ler, sıçan primer germinatif hücreler ve sertoli hücre kültürlerinde apoptosise neden olmaktadır (76). Brogadin ve ark.'da (75), Nonylphenol'ün ATP sentezini azalttığını, önlediğini ve mitokondrial membranın potasyum geçirgenliğini arttırdığını rapor etmişlerdir.

2.5.2.1. Nonylphenol'ün Karsinojenik Etkisi

AFE'lerin, hayvansal organizmalar üzerine çeşitli kanser türlerini başlatıcı etkisi vardır. Nonylphenol'ün meme (77), testis ve ovaryum kanserine (78) neden olduğu gösterilmiştir. Artmış hücresel proliferasyon ve hücre siklus değişimleri, genetik bozunumların fark edilmesinde önemli faktörler olarak kabul edilmektedir. Örneğin, hücre proliferasyonu, mitozla bağılı rekombinasyon oluşumuna ve daha ağır

mutasyonlara yol açabilmektedir. DNA sentezi sırasında, uygun olmayan nükleotit birleşimleri, DNA hasarına yol açmaktadır. Bu hasar, hücre siklusunun G1 fazında tamir edilmektedir. Bu fazların değişmesi, DNA hasarının kalıcı olmasına yol açabilmektedir (79). Çoğu kanser hücreleri, telomerik birleşmeleri sergilemektedir. Telomerik birleşimler, genomdaki değişime katıldığını göstermektedir. Telomer, kromozomlardaki dengeyi sağlar ve kurallara aykırı rekombinasyondan korur. Bulgular, Nonylphenol'e maruz kalan hücrelerin, potansiyel olarak genom değişmelerine, telomer kısalmasına ve telomerik birleşme vasıtasıyla da yıkımlandıklarını göstermektedir (80).

İnsan meme yağı dokusunda ve sütünde, bazı östrojeni taklit eden özellikler gösteren bu maddeler ölçülmüştür (81). Bu maddeler, meme dokusuna çeşitli çevresel kirlenmelere bağlı olarak yiyecek, su ve hava aracılığıyla girmekte ve lipofilik özelliklerinden dolayı meme yağında birirmektedir. Aynı zamanda meme, koltukaltı ve meme çevresinde kozmetik amaçlı kullanılan birçok östrojenik kimyasala da maruz kalmaktadır. Bu bölgelerdeki deri üzerinde kalan bu kozmetikler, deri üzerinden emilim yoluyla meme bölgesinin direkt olarak östrojenik kimyasallara maruz kalmasına ve bu kimyasalların sistemik metabolizmadan kaçmasına sebep olmaktadır (81).

Bir çalışmada östrojene duyarlı pS2, ER ve MUC1 genlerinin ekspresyonu kullanılarak östradiol ve Nonylphenol'ün meme kanseri hücresi MCF-7 üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Çalışma boyunca 10 µM Nonylphenol ve 0,1 µM östradiol uygulanarak RT-PCR tekniği ile mRNA ekspresyonları tespit edilmiştir. Araştırma sonunda Nonylphenol'ün östradiole göre pS2, MUC1 ve ER ekspresyonunu değişik şekillerde uyarabildiği görülmüştür (82). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda, ratlara yirmi sekiz hafta boyunca diyet içerisinde 250 ve 25 ppm Nonylphenol verilmiştir. Çalışma sonunda, akciğerlerde kanser hücrelerinin oluşma sıklığının kontrol gruplarına göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (83). Jubendradass ve ark. (84), ratlarda yaptıkları çalışmada Nonylphenol'ün hem mitokondriye bağlı olarak hem de Fas ve Fas-l yoluyla karaciğere zarar vererek apoptoza neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, endokrin yıkıcı maddelerin, hormon etkisinde değişikliğe sebep olarak prostat kanserinin oluşmasında ve gelişmesinde önemli biyolojik etkiye sahip olduğu da belirtilmiştir (85).

2.5.2.2. Nonylphenol'ün Embriyonik Etkisi

Çakal ve Parlak (86), denizkestanesi embriyolarında Nonylphenol miktarını ölçmüşlerdir. Sonuçlar düşük miktarlardaki Nonylphenol konsantrasyonlarının iskelet

sisteminde bozukluklara yol açtığını göstermiştir. Yüksek konsantrasyonların ise mitozu engelleyerek erken yaşam dönemlerinde embriyo gelişimini engellediği görülmüştür.

Yapılan bir başka çalışmada deniz kestanesi türü olan *Paracentrotus lividus* gametlerinde ve embriyolarında, Arslan ve ark. (87), denizkestanesi sperm ve yumurtalarını Nonylphenol (0,937- 18,74 µg/L)'e maruz bırakmışlardır. Bunun sonucunda sperm fertilizasyon başarısı, kalitesi ve mitotik aktivitedeki morfolojik değişim, şekil bozuklukları, gelişim geriliği, embriyonik ve larval ölüm oranları incelenmiştir. Fertilizasyon başarısında %20'ye yakın bir azalma meydana gelmiş ve kontamine spermlerin oluşturduğu larvaların iskelet yapısındaki şekil bozukluklarında artış görülmüştür. Bu türde Nonylphenol'ün embriyotoksik ve genotoksik konsantrasyonları 0,937 µg/L olarak tespit edilmiştir.

Zebrabalıklarının üreme sistemleri üzerinde yapılan çalışmada ise, üreme öncesi Nonylphenol'e maruz bırakılmanın etkisi incelenmiş, üç hafta boyunca 50 µg/L Nonylphenol'e maruz bırakılan dişi ve erkek zebrabalıkları, kontrol grubundaki dişi ve erkek zebrabalıklarıyla dört grup olacak şekilde çiftleştirilmiştir. Dört grup için embriyonik cathepsin D aktivitesi (CAT D), yumurta kabuğu kalınlığı, fekundite, kuluçkadan çıkma oranı ve yavrulardaki şekil bozukluğu değerleri ölçülmüştür. 50 µg/L Nonylphenol'e maruz bırakılan erkek balıklara ait gruplardaki değerler farklılık göstermemesine rağmen, dişi balıklara ait gruplarda üremede zayıflamalara ve CAT D aktivitesinin yavaşlamasına ($p<0.05$), yumurta kabuğu kalınlığının azalmasına (% 23.6) ve şekil bozukluğu oranının yükselmesine ($p<0.001$) neden olmuştur (88).

Nonylphenol'ün, yavaş bir hızda da olsa insan plasentasına geçtiği tespit edilmiştir. Nonylphenol'ün, plasentayı geçerek, amniyon sıvısına da ulaştığı belirlenmiştir (89). Yapılan bir araştırmada doğum öncesinde Nonylphenol miktarını ölçmek ve anne-cenin arasındaki Nonylphenol geçişi olup olmadığını belirlemek için 174 anneden ve göbek kordonundan alınan kan örnekleri analiz edilmiş, analiz sonucunda özellikle şehir-büyükşehir bölgelerinde 211 ng/plazma'ya çıkacak oranlarda Nonylphenol oranı tespit edilmiştir. Anne-bebek çiftlerin % 63.6'sında göbek kordonu toplardamarında, göbek kordonu atardamarına göre daha yüksek Nonylphenol oranına rastlanmıştır (90).

2.5.2.3. Nonylphenol'ün Mutajenik Etkisi

Nonylphenol'ün mutajenik etkisinin belirlenmesi amacı ile *Salmonella thyphimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde (metabolik aktivasyonsuz), Nonylphenol 0,937-4,685

$\mu\text{g/L}$ aralıklarında altı farklı konsantrasyonda, Oktilfenol (OP) ise 10-160 $\mu\text{g/L}$ aralıklarında 5 farklı konsantrasyonda test edilmiştir. Sonuçlar revertant koloni sayılarına göre değerlendirildiğinde, tüm Nonylphenol konsantrasyonlarının toksik olduğu ama mutajenik etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Buna ek olarak OP'ün *Salmonella thyphimurium* TA98 suşu ile yapılan testlerde 40 $\mu\text{g/L}$ ve *Salmonella thyphimurium* TA100 suşu ile yapılan testlerde ise 20 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonları mutajenik bulunmuştur (91).

Başka bir çalışmada Zemheri (92), Bisfenol-A (BFA) ve Nonylphenol'ün mutajenik etkisini Ames /*Salmonella*/Mikrozom test yöntemi ile araştırmıştır. Çeşitli dozlarda kullanılan test maddelerinin mutajenik etkisi S9'suz (metabolik aktivasyonsuz) ve S9'lu (metabolik aktivasyonlu) olarak, *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarında araştırmıştır. Bunun sonucunda, her iki madde içinde toksik olmayan 100 Sg/plak; 10 Sg/plak; 1 Sg/plak; 0.1 Sg/plak dozları S9'lu ve S9'suz deneylerde kullanmış ve her iki suş içinde yapılan deneylerde mutajenik etkiye rastlanmamıştır. Bir çalışmada, *Chlorella vulgaris* ve *Selenastrum capricornutum* mikroalglerinin büyüme, fotosentez ve andioksidan işlemleri üzerine Nonylphenol'ün etkisi incelemiş, Nonylphenol uygulandığında iki mikroalgin de fotosentez faaliyetleri, anten uzunlukları, maksimum fotokimya ve absorbe edilen ışık değerlerinde azalma saptanmıştır (93).

2.5.2.4. Nonylphenol'ün Toksik Etkileri

Argese ve ark. (94), alkilfenollerin hidrofobik alkil bakiyelerinden dolayı hayvan, bitki ve mikroorganizmaların hücre membranlarında toksik etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Alkilfenollerin, mitokondrial membranlarda enerji üretimini sabote ettiği bilinmektedir.

Yapılan bir çalışmada, büyük hidrofobik bir molekül olmasından dolayı Nonylphenol'ün, membran geçirgenliğini arttırdığı ve hücrel iyonların kaybına neden olduğu görülmüştür. Gökkuşaklı alabalığı için Nonylphenol-10 etoksilattan dolayı solungaç epitel hücrelerinden sodyumun akması ve artmış iyon geçirgenliği rapor edilmiştir (95). Kalsiyum, Nonylphenol'ü etkilemede önemli rol oynar. Nonylphenol, ratların sarkoplazmik retikulumunda, CaMgATP-az enzim affinitesinin düşmesini önlemektedir. Hughes ve arkadaşları (96), alkilfenollerin, testis endoplazmik retikulum Ca^{+2} pompalarını engelleyerek hücre ölümüne sebep olduğunu kanıtladılar. Benzer mekanizmalar ile Nonylphenol içeren çeşitli alkilfenollerin, sarkoplazmik retikulum

Ca^{+2} pompalarını engelleyerek, iskelet kasında da hücre ölümüne neden oldukları gösterilmiştir (95).

Nonylphenol, ratların vasküler düz kas hücrelerinde, L tipi Ca geçitinin işlemlerini önlemektedir. Brogadin ve ark.'da (95, 97) , Nonylphenol'ün, ATP sentezini azalttığını, önlediğini ve mitokondrial membranın potasyum geçirgenliğini arttırdığını rapor etmişlerdir. Schwaiger ve ark. (98) yaptıkları bir çalışmada, Nonylphenol'e maruz bırakılmış sazan balığında, hematolojik parametrelerin etkilendiğini, Nonylphenol'ün eritrosit membran tahribatına ve anemiye neden olduğunu bildirmişlerdir. Alkilfenoller, sıçan primer germinatif hücreler ve sertoli hücre kültürlerinde apoptosise neden olduğu gösterilmiştir (76, 80, 96, 99).

17 β östradiol hücre ölümüne engel teşkil etmezken, alkilfenollerin hücre ölümü üzerine etkileri, östrojenik etkilerinden bağımsızdır (88). Nonylphenol'ün etoksi üniteleri, hücre duvarında eritici aktiviteye sahiptir ve mitokondriyel oksidatif fosforilasyonu inhibe eder (75). Aslında, AFE'nin akut toksisitesi, memelilerde çok düşüktür. Örnek olarak fareler ve sıçanlar için oral LD50 dozu 2 ile 4 g/kg arasındadır. Ancak dermal iritasyon düşük dozlarda (500mg/kg) ve şiddetli göz iritasyonu ise 5 mg/kg dozda gözlenmiştir (59). 9 etilen oksit ünitesi içeren nonoksinolün, sıçanlarda vajina içine verilmesinden sonra hızla emilmesi nedeniyle yüzey aktif madde olan nonoksinol-9, vajina içinde spermatosit olarak kullanılmaktadır (80, 100). Alkilfenolün en dirençli metaboliti olan Nonylphenol, yüksek lipofilik yapısı nedeniyle akümülyasyon eğilimindedir (70).

2.5.2.5. Nonylphenol'ün Östrojenik Etkileri

Çevresel östrojene maruz kalma akuatik çevrede çift cinsiyetli balıklarda, erkek ve kadında meme kanserlerine yol açmaktadır (101, 102). Ekzojen östrojen bileşikleriyle östradiolün yapısının benzerliklerinden dolayı ekzojen östrojen bileşikleriyle, organizmalarda kadın spesifik hormonu olan 17 β östradiolün endojen etkisini taklit ederler (60). İşleyişin moleküler temeli, bu kimyasalların veya metabolitlerinin östrojen reseptörleriyle temas kurmaları ve kompleks oluşturmalarına dayanır (103). Nonylphenol'ün östrojenik etkisinin, bir pestisit olan DDT'den 3 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (71). Nonylphenol, östrojenik etkisi ile organizmada morfolojik değişimlere de sebep olmaktadır. Yapılan bir çalışmada örneğin, yetişkin erkek gökkuşağı alabalığındaki spermatogenezin inhibisyonu (71), germdaki ve erkek yılanbalığındaki sertoli hücrelerindeki sitolojik değişimler (104) ve genç gökkuşağı

alabalığında ovosomatik indekste artış gözlenmiştir (105). Genellikle balıkta östrojen hormonu dişileşmeye, androjen hormonu da erkekleşmeye sebep olmaktadır (106,107). Ekzojen hormon uygulanması, balıkta, cinsiyetin tersine çevrilmesine neden olabilir. Çevresel endokrin bozucularına maruz kalma, cinsiyetin tersine çevrilmesinde önemli olasılıktır.

2.6. CURCUMİN

Curcumin, baharat ya da bitkisel ilaç olarak kullanılan zerdeçal bitkisinin (*curcuma longa*, zerdeçöp, safran kökü) kökünden türetilen bir polifenoldür (108). Curcumin; Çin ve Hindistan'da yaygın olarak yetiştirilen, Zingiberaceae (Zencefilgiller) familyasına ait, sarı çiçekli ve büyük yapraklı çok yıllık otsu bir bitki olan *Curcuma longa* (Turmerik, Zerdeçal, Zerdeçöp)'nın rizomlarında bulunur (Resim 2.6) (109, 110). Gıda ve kozmetikte renk verici olarak kullanıldığı gibi, halk arasında yaygın olarak tedavi edici amaçlarla da kullanılır (111).

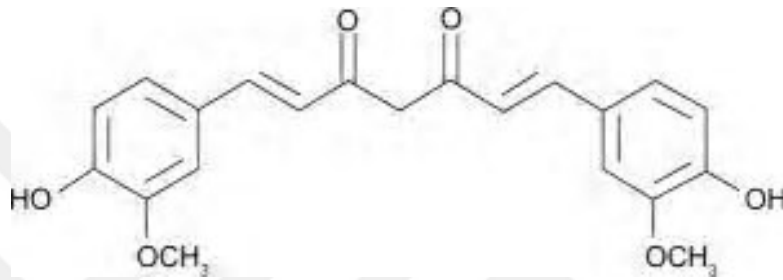


Resim 2.6. *Curcuma longa* bitkisi (110).

Curcumin'in, kimyasal özellikleri ilk kez 1910 yılında tanımlanmış düşük molekül ağırlıklı polifenol bileşiğidir (112). β konumunda bağlanmış 2 keton grubu içerir. Bu yapı özelliği antioksidan olmasında rol oynar. Ağız yoluyla alındığında, bağırsaklarda

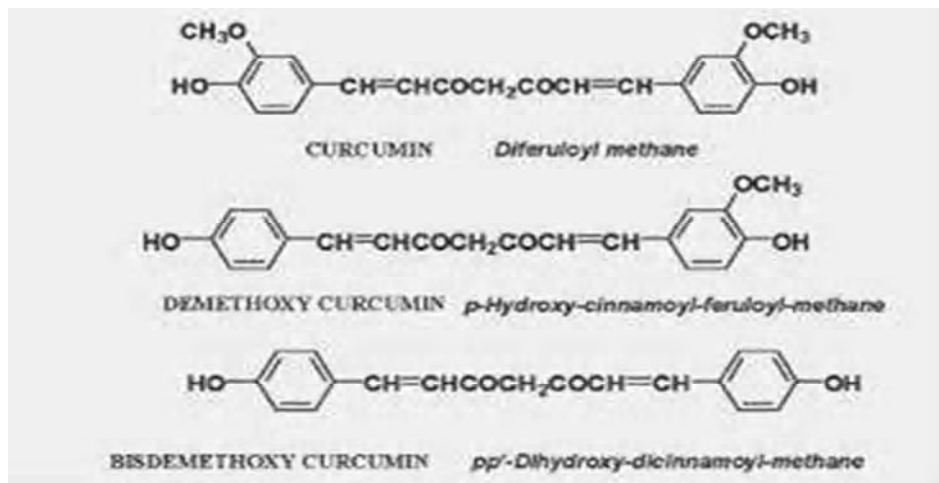
hidrojenasyon ile Tetrahidrocurcumin'e dönüşür. Curcumin, bağırsaklardan emilerek, kana ve böylece dokulara dağılır ve safra ile atılır (113).

Curcumin 183 °C'de erir, moleküler formülü $C_{21}(H_2O)_6$ ve moleküler ağırlığı 368.37 g/mol'dür (112, 114). Curcumin, suda çözünmezken, etanol, metanol, DMSO, alkali, kloroform veya asetik asit gibi organik çözücülerde iyi çözünür (112, 115). Curcumin'in kimyasal yapısı (Şekil 2-13)'de gösterilmiştir.



Şekil 2-13. Curcumin'in kimyasal yapısı (116).

Curcumin'in özünde, Curcumin (diferuloilmetan), demethoxycurcumin (p-hidroksi-kinnamoil-feruloil-metan) ve bis-demethoxycurcumin (pp'-dihidroksi-dikinnamoil-metan) olmak üzere 3 farklı curcuminoid vardır (Şekil 2-14) (115).



Şekil 2-14. Curcuminoidlerin kimyasal yapısı (115).

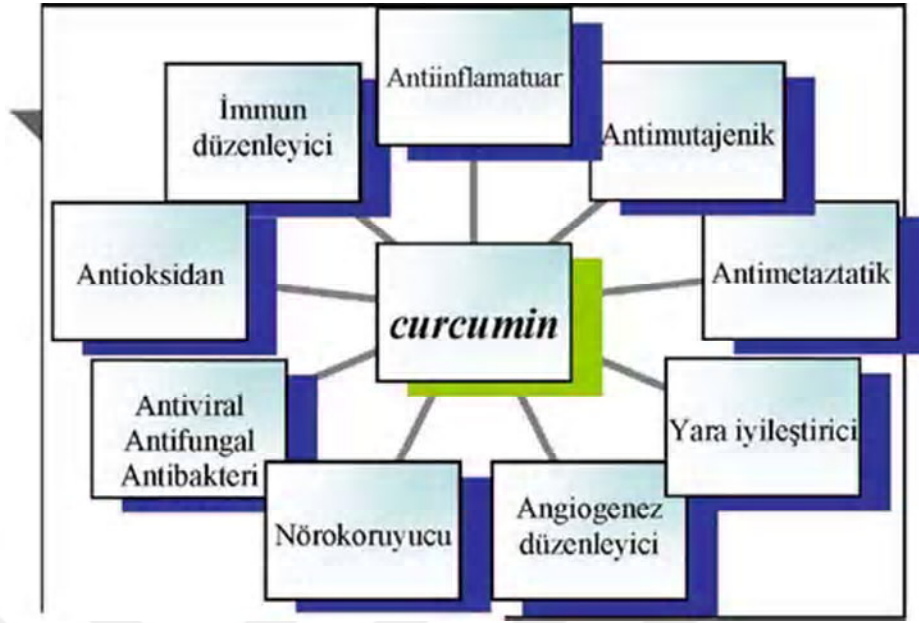
2.6.1. Curcumin'in Metabolizması

Curcumin suda çözünmediği için hücre membranının hidrofobik ceplerinde lokalize olmaktadır. Moleküler yapısından dolayı, hücreye hızlıca penetre olur ve plazma membranından kolayca geçerek sitozole ulaşır. Sitoplazmada birikmiş olan curcumin çekirdeğe giremez. Plazma membranı, endoplazmik retikulum ve çekirdek kılıfı gibi yapıların lipofilik özellikte olmasından dolayı, curcumin bu membranöz yapıların içinde daha yoğun bir şekilde bulunur. Curcumin, dolaşımında çok düşük seviyede bulunmakta ya da hiç bulunmamaktadır (117).

Curcumin bağırsaklarda, renksiz ve daha az polar olan tetrahidrocurcumin adlı metabolitine dönüşerek emilir ve buradan tüm dokulara dağılır. Daha sonra karaciğerde glukoronlanarak safra yolu ile atılır. Oral yolla alınan curcumin'in, yaklaşık % 75'i feçesle, geri kalan kısmı ise idrarla atılır. İntraperitoneal uygulamalarda da vücuttan atılması benzer şekilde olmaktadır, ancak % 11'inin de safrada depolandığı belirtilmiştir (118).

2.6.2. Curcumin'in Biyolojik Etkileri

Curcumin diyetlerde baharat, gıda maddesi ve tekstilde de renk veren bitkisel ajan olarak kullanılmasının yanı sıra birçok hastalıkta da tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır (108). Son yıllarda yapılan çalışmalarda Curcumin'in birçok farklı farmakolojik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (119). Curcumin'in anti-inflamatuar, antioksidan, yara iyileştirici, antikanser, antimikrobiyal, anti-tumor, anti-karsinogenik, anti- bakteriyel, anti-alerjik, anti-demans gibi geniş bir farmakolojik yetiye sahip olduğu bilinmektedir (120, 121, 122). Yapılan çalışmalarda Curcumin'in Kaspaz -3 aktivasyonu ile apoptozisi harekete geçirerek anti-tümöral özellik gösterdiği de bildirilmektedir (123) (Şekil 2-15). Curcumin'in diğer belirgin bir özelliği ise Asya ülkelerinde yüzyıllardır kullanılmasına karşın insan ve hayvanlarda in vivo çalışmalarda güvenli ve yüksek dozlarda herhangi bir zararlı etkisinin saptanmamasıdır (124, 125). Curcumin farmokolojik olarak yüksek güvenli ve olumlu etkiler gösterdiğinden çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel bir ajan olarak düşünülebilir.



Şekil 2-15. Curcumin'in biyolojik etkileri (119).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na başvuruldu ve 16.11.2016 tarihli 16/137 karar nolu Etik Kurul onayı alındı. Çalışmanın her aşamasında yapılan tüm işlemler etik kurul yönergesinde belirtilen kurallara uygun olarak gerçekleştirildi. Mevcut çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2017-7098 nolu tez projesi ile desteklenmiştir.

3.1. DENEY HAYVANLARININ ÇİFTLEŞTİRİLMESİ

Çalışma kapsamında Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'den temin edilen ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen, daha önce herhangi bir çalışmada kullanılmamış, 3-4 aylık Wistar Albino cinsi 30 adet erişkin dişi sıçan kullanıldı.

Çalışmada kullanılan dişi sıçanlar erkek sıçanlardan ayrı olarak 20 gün süreyle bekletildiler. Bu sürenin sonunda çalışmada, kesin olarak gebe olmadıkları belirlenen dişi sıçanlar çiftleşme için kullanıldı. Çiftleşme için iki dişi sıçana bir erkek sıçan olacak şekilde sıçanlar bir gece süreyle özel kafeslere alındı. Ertesi sabah dişi sıçanlardan vaginal smear örnekleri alındı ve ışık mikroskobu altında incelendi (Resim 3.1). Smear örneklerinde spermium görülen ya da vajinada plak gözlenen dişiler 0.5 günlük gebe olarak kabul edildi. Gebe sıçanlar 21 ± 3 °C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında, özel hazırlanmış otomatik olarak klimatize edilen odalarda tutulmuştur. Deney hayvanları her biri ayrı kafeslerde olmak üzere, standart sıçan yemi (ad-libitum %21 ham protein içeren granüle pelip) ile beslenmişler ve musluk suyu içmişlerdir.



Resim 3.1. Sıçanların çiftleşme sonucu vaginada çiftleşme plağı tespit edilmesi fotoğrafı

3.2. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Çalışmada, 0.5 günlük gebe olarak kabul edilen sıçanlar her grupta 6 gebe sıçan olacak şekilde rastgele 5 gruba ayrıldı.

Kontrol Grubu: Bu gruptaki sıçanlara gebeliklerinin 20. gününe kadar standart yem ve suları verildi. Gebe sıçanlar gebeliklerinin 20. gününde dekapite edildi ve yavruları sezeryan ile alındı. Dekapitasyon sonrası herbir anneden elde edilen fetusların yarısı ikili iskelet boyama için kullanıldı. Geriye kalan yavru fetuslara ait femur dokuları ise histopatolojik incelemeler için kullanılacak olan hemotoksilen-eozin ve Masson trichrom boyama metodları ve osteoblast-osteoklast aktivitelerini belirlemek üzere immünohistokimyasal boyama metodu için ayrıldı.

Mısır yağı verilen grup (sham):

Bu gruptaki sıçanlara gebeliklerinin 5. gününden 20. gününe kadar 150 μ L dozda mısır yağı gavaj yoluyla verildi. Gebe sıçanlar gebeliklerinin 20. gününde dekapite edildi ve yavruları sezeryan ile alındı. Bu gruptaki her bir gebe sıçana ait fetusların yarısı ikili iskelet boyama için kullanılırken ve diğer yarısı hemotoksilen-eozin, Masson trichrom ve immünohistokimyasal boyama metodları için ayrıldı.

Curcumin verilen grup:

Bu gruptaki sıçanlara gebeliklerinin 5. gününden 20. gününe kadar her gün taze olarak

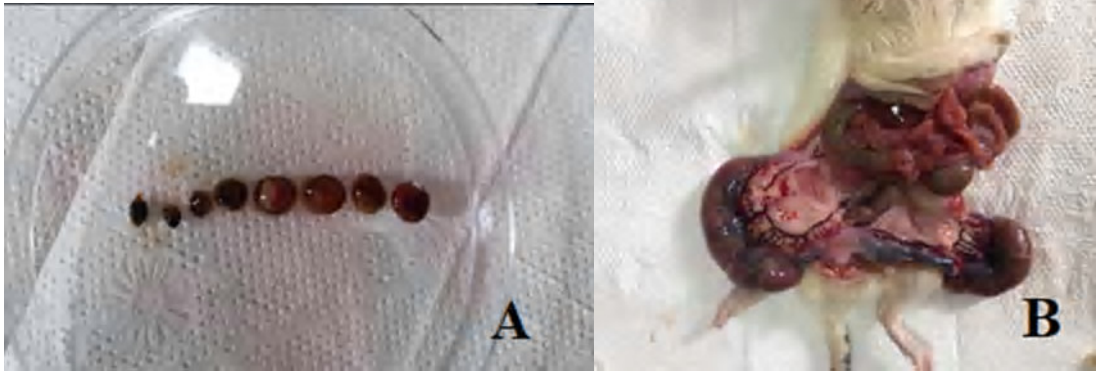
hazırlanan ve 150 µl mısır yağında çözdürülen 100 mg/kg/gün dozda curcumin gavaj yoluyla verildi (toplam 150 ml) (Resim 3.2). Gebe sıçanlar gebeliklerinin 20. gününde dekapite edildi ve yavruları sezeryan ile alındı. Her bir gebe sıçana ait fetusların yarısı ikili iskelet boyama için kullanılırken ve diğer yarısı hemotoksilen-eozin, Masson trichrom ve immünohistokimyasal boyama metodları için ayrıldı.



Resim 3.2. Sıçanlara yapılan gavaj uygulaması

Nonylphenol verilen grup:

Bu gruptaki sıçanlara gebeliklerinin 5. gününden 20. gününe kadar 100 µl mısır yağında çözdürülerek her gün taze olarak hazırlanan 50 µl dozda Nonylphenol gavaj yoluyla verildi (toplam 150 ml) (Resim 3.2). Bu gruba ait gebe sıçanlar gebeliklerinin 20. gününde dekapite edildi ve yavruları sezeryan ile alındı. Bu gruptaki her bir gebe sıçana ait fetusların yarısı ikili iskelet boyama için kullanılırken ve diğer yarısı hemotoksilen-eozin, Masson trichrom ve immünohistokimyasal boyama metodları için ayrıldı (Resim 3.3).



Resim 3.3. A. Gebe dediğimiz sıçandan fetus yerine plasenta çıkan

B. Yavru sayısı az çıkan sıçan görünümü

Curcumin+ Nonylphenol verilen grup:

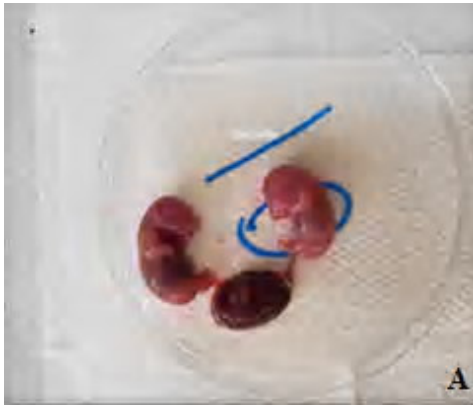
Bu gruptaki sıçanlara gebeliklerinin 5. gününden 20. gününe kadar her gün taze olarak hazırlanan ve 150 μ l mısır yağında çözdürülen 100 mg/kg/gün dozda Curcumin'in gavaj yoluyla uygulanmasından yarım saat sonra, 100 μ l mısır yağında çözdürülerek yine taze olarak hazırlanan 50 μ l dozda Nonylphenol gavaj yoluyla verildi (toplam 150 ml) (Resim 3.2). Bu gruba ait gebe sıçanlar gebeliklerinin 20. gününde dekapite edildi ve yavruları sezeryan ile alındı. Bu gruptaki her bir gebe sıçana ait fetusların yarısı ikili iskelet boyama için kullanılırken ve diğer yarısı hemotoksilen-eozin, Masson trichrom ve immünohistokimyasal boyama metodları için ayrıldı.

3.3. DENEKLERİN ELDE EDİLMESİ

Tüm deney gruplarına ait gebe sıçanlar, gebeliklerinin 20. gününde ketamin (75 mg/kg) + ksilazin (10 mg/kg) anestezisi altında sezeryana alındı. Bunun için anestezisi altındaki sıçanların abdominal bölümü %70'lik alkol ile temizlendikten sonra transvers bir kesi ile karın ön duvarları açıldı (Resim 3.4) ve uterus, içerisindeki fetuslar ile birlikte diseke edildi (Resim 3.5).



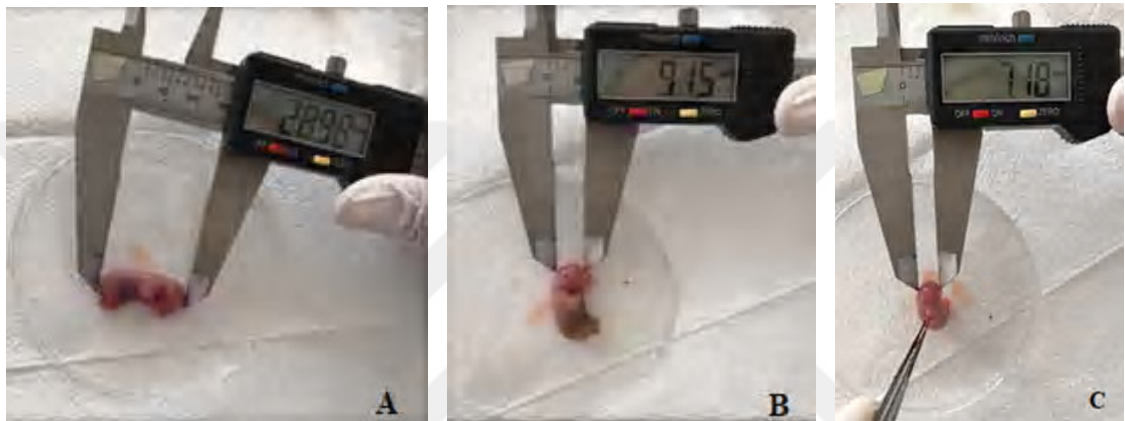
Resim 3.4. Gebe sıçanlara sezeryan uygulanması sonrası uterusun ve fetusların çıkartılması



Resim 3.5. A. Fetusun uterustan plasenta ile ayrılması

B. Uterustan tam diseke olmuş fetus ve plasenta

Uterustan çıkarılıp plasentalarından ayrılan fetusların herbirinin ağırlıkları tartılarak, dijital kumpas ile baş-kıç, occipito-frontal ve biparietal uzunlukları ölçülerek kayıt edildi (Resim 3.6). Daha sonra, fetuslar yüksek doz eter inhalasyonu ile dekapite edildi. Tüm deney gruplarından elde edilen fetusların yarısı ikili iskelet boyama analizleri için hazırlanırken diğer yarısı ise hemotoksilen-eozin, Masson trichrom ve immünohistokimyasal boyama metodları için ayrıldı.



Resim 3.6. A. Fetusların baş-kıç uzunluğu ölçümü

B. Fetusların occipito-frontal uzunluk ölçümü

C. Fetusların biparietal uzunluk ölçümü

3.4. İKİLİ İSKELET BOYAMADA KULLANILAN KİMYASALLAR

- Alcian Blue 8 Gx Merck (Almanya)
- Alizarin Red S Sigma-Aldrich (Almanya)
- Acetic Acid (Glacial) %99 Merck (Almanya)
- Etil Alkol %99.5 Merck (Almanya)
- Etil Alkol %96 NECM (Türkiye)
- Xylene For Analysis Emsure Sigma-Aldrich (Almanya)
- Gliserin %99.5 Merck (Almanya)
- Potassium Hydroxide Gr For Analysis Merck (Almanya)
- Diethylether For Analysis Emsure Merck (Almanya)

- Sigma 290858-1L Nonylphenol 1 L
- Sigma C1386-10G Curcumin 10 g

3.5. İKİLİ İSKELET BOYAMA YÖNTEMİ

Tüm deneysel prosedürler sonrasında elde edilen fetusların iskelet sistemi, ikili iskelet boyama yöntemiyle boyandı. Bunun için tüm fetuslar önce %70'lik etil alkol içinde 4-7 gün kadar bekletilerek dokularındaki sıvının çekilmesi sağlandı. Bu işlemi takiben fetuslar saf aseton içinde 1-3 gün süreyle bekletilerek yağlarından arındırıldı. Daha sonra, ince uçlu forceps yardımıyla tüm fetusların derileri soyuldu, iç organları ve gözleri çıkarıldı (Resim 3.7). Bütün bu işlemler sırasında zarar gören ya da parçalanan fetuslar çalışmaya dahil edilmedi. Fetusların iskelet sistemi, Tablo 3-1'de gösterilen ikili iskelet boyama prosedürüne uygun olarak yapıldı ve boyandı.



Resim 3.7. Derileri soyulup gözleri ve iç organları çıkarılan fetuslar

Tablo 3-1. İkili iskelet sistemi boyama protokolü

Teknik Aşamalar	Solüsyonlar	Süre
Tespit	%70'lik etil alkol	4-7 gün
Yağdan Arındırma	Saf aseton	1-3 gün
<u>Boyanın hazırlanışı</u>		
Boyama	1.solüsyon: 300 mg Alcian Blue + 100 ml %70'lik etil alkol	7gün süreyle 38- 40 °C'de etüvde bekletildi
	2.solüsyon: 100 mg Alizarin Red S + 100 ml %95'lik etil alkol	
	3.solüsyon: 1. Solüsyon + 2. Solüsyon + 100 ml glacial asetik asit	
	4.solüsyon: Hazırlanan ilk üç solüsyonun içerisine 1700 ml %70'lik etil alkol ilave edilerek hazırlanır.	
Şeffaflaştırma	1. %1'lik Potasyum Hidroksit (KOH)	1-3 gün
	2. %1'lik KOH (80 ml)+%20'lik gliserin (20 ml)	5-7 gün
	3. %1'lik KOH (50 ml)+%50'lik gliserin (50 ml)	5-7 gün
	4.%1'lik KOH (20 ml)+%80'lik gliserin (80 ml)	5-7 gün
Saklama	%100'lük gliserin	

Boya Solüsyonunun Hazırlanması:

İkili iskelet boyama için gerekli olan boya solüsyonu ayrı ayrı hazırlanan solüsyonların belirli yöntemlerle birleştirilmesi ile elde edildi. Bunun için dört farklı solüsyon hazırlandı.

Bu solüsyonların hazırlanması:

1. solüsyon: 300 mg Alcian Blue'nun, 100 ml %70'lik etil alkol içerisinde eritilmesi ile elde edildi.

2. solüsyon: 100 mg Alizarin Red-S'in 100 ml %95'lik etil alkol içerisinde eritilmesi ile elde edildi.

3. solüsyon: Daha önce hazırlanmış olan birinci solüsyonun içine ikinci solüsyon azar azar eklenerek elde edildi ve bu iki solüsyonun tamamen karışması sağlandı. Karışma işlemi tamamlandıktan sonra ortaya çıkan solüsyona 100 ml Glacial Asetik Asit eklendi.

4. solüsyon: Elde edilen 3. solüsyonun üzerine 1700 ml %70'lik etil alkol ilave edilerek hazırlandı.

Boyama Aşaması: Deney gruplarına ait fetusların derileri soyulup, iç organları ve gözleri çıkarıldıktan sonra kapaklı cam kaplar içerisindeki boya solüsyonuna alındı. Fetusların herbiri ayrı cam kaplara konukduktan sonra kapların hava ile temasını önlemek için streç film ile sarıldı. İçerisinde farklı deney gruplarına ait fetusların bulunduğu cam kaplar boyanma süreci için sıcaklığı 38-40°C'ye ayarlanmış etüve konuldu. Etüvde 7 gün süreyle bekletilerek fetusların iskelet yapılarının boyanması sağlandı. 7. günün sonunda fetuslar, akan musluk suyu altında 2 saat süre ile yıkandı ve şeffaflaştırma aşamasına geçildi.

Şeffaflaştırma Aşaması: Bu basamak toplam 4 aşamadan oluşmaktadır.

1.aşama: Boyanmış olan fetuslar 1 gün %1'lik KOH içerisinde bekletildi.

2.aşama: 5 gün 80 ml %1'lik KOH ve 20 ml %20'lik gliserinden oluşan karışım içinde bekletildi.

3.aşama: 5 gün 50 ml %1'lik KOH ve 50 ml %50'lik gliserinden oluşan karışımda bekletildi.

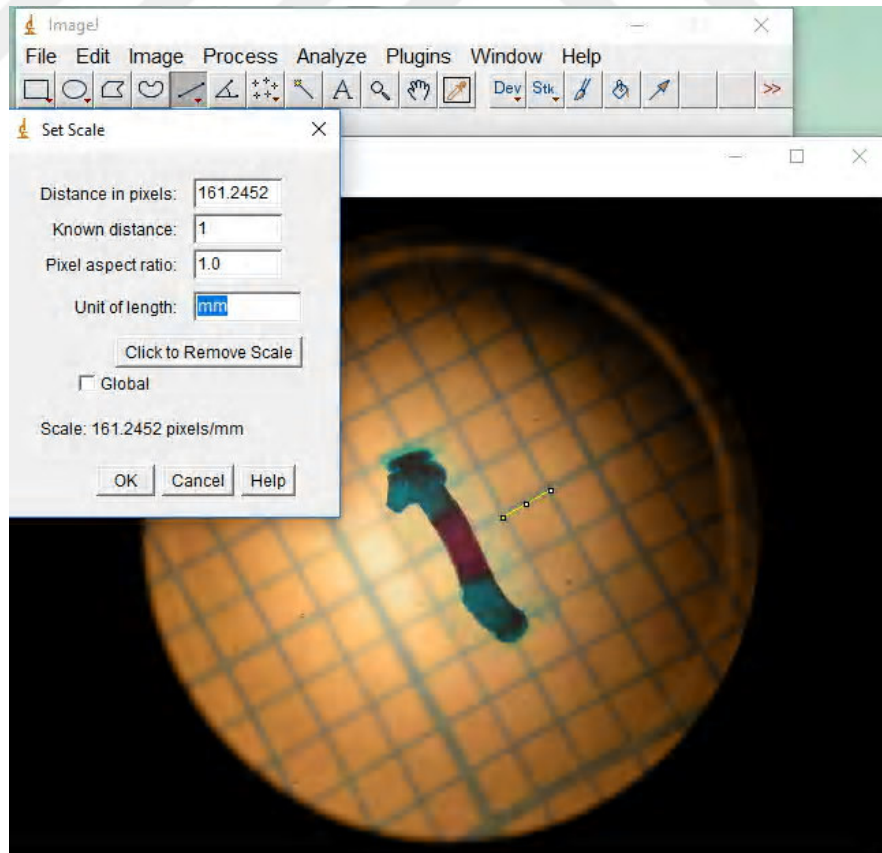
4.aşama: 5-7 gün 20cc %1'lik KOH ve 80 ml %80'lik gliserinden oluşan solüsyon içinde bekletildi.

Şeffaflandırma işleminin tamamlanmasından sonra fetuslar %100 gliserin içerisine alınarak gerekli ölçümler yapılmaya kadar muhafaza edildi.

3.6. İKİLİ İSKELET BOYAMAYA AİT MORFOLOJİK ÖLÇÜMLER

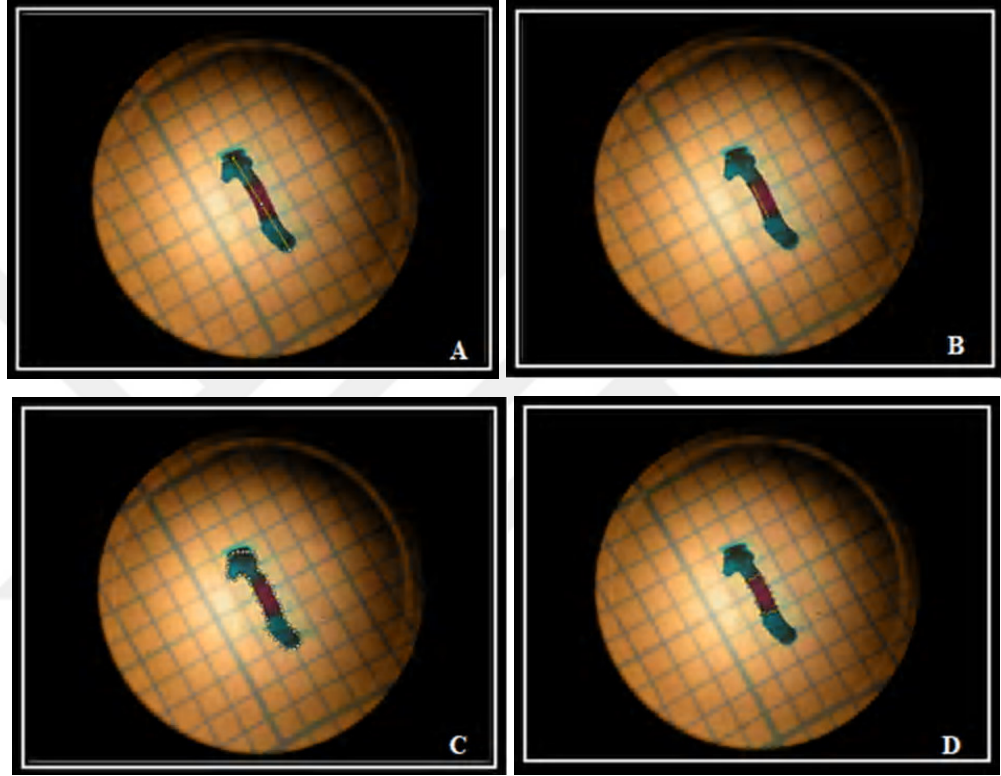
İkili iskelet boyama yöntemi ile kemik ve kıkırdak yapıları belirlenen fetusların morfometrik ölçümleri için Nikon E5700 marka fotoğraf makinasının monte edildiği stereomikroskop aracılığıyla milimetrik kâğıt üzerine yerleştirilen ön ve arka ekstremite kemiklerinin fotoğrafları çekildi. Elde edilen fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarılarak ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) yazılım programı aracılığıyla kemik ve kıkırdak alanlar üzerinde ölçümler yapıldı.

Ölçüm işleminin doğru sonuç vermesi amacıyla orijinal görüntü ile fotoğraf görüntüsü arasında kalibrasyon ayarı yapıldı. Bu kalibrasyon ayarının yapılması için sırasıyla şu yol izlendi. Öncelikle ölçüm yapılacak fotoğraf ImageJ programı ile açıldı. Fotoğraf üzerinde milimetrik kâğıtta orijinali 1 mm olan mesafe Straight Line aracılığıyla ölçüldü. Daha sonra ImageJ programının Analyze - Set Scale - Known distance menüsü kullanılarak uygun kalibrasyon yapıldı (Resim 3.8).



Resim 3.8. ImageJ programının kalibrasyon ayarı

Yapılan kalibrasyon sonucu ImageJ programının Wand Tool özelliği ile ölçüm yapılacak alan ve mesafe manuel olarak belirlendi ve sonuçlar mm olarak kaydedildi. Kemikleşme yüzey alanının tüm kemik yüzey alanına oranını hesaplamak için; $(\text{Kemikleşme Alanı} / \text{Tüm Kemik Alanı}) \times 100$ formülü kullanıldı (Resim 3.9).



Resim 3.9. ImageJ programında yapılan kemik ölçümleri

A. Kemik Total Boy Uzunluğu Ölçümü **B.** Kemikleşme Sergileyen Bölgenin Ölçümü
C. Total Yüzey Alanı Ölçümü **D.** Kemikleşme Gösteren Bölgenin Yüzey Alan Ölçümü

3.7. HİSTOLOJİK DOKU TAKİP YÖNTEMİ

Hemotoksilen-eozin, Masson trichrom ve immünohistokimyasal boyama metodları için ayrılan fetusların arka ekstremitelerinden çıkarılan femur dokuları tespit işlemi için %10'luk formaldehit içine alındı. Tespit solüsyonunda 72 saat bekleyen dokular akan musluk suyunda yıkandıktan sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirildi ve daha sonra ksilol ile şeffaflandırılarak parafine gömüldü ve parafin bloklar elde edildi. Rutin histolojik doku takibi metodu Tablo 3-2'de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: Doku hazırlama metodu

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	%10 Formaldehid	72 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
2	Musluk suyu	1 gece	9	Absolü Alkol	1 saat
3	%50 Alkol	1 saat	10	Ksilen	20 dakika
4	%70 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dakika
5	%80 Alkol	1 saat	12	Ksilen	20 dakika
6	%96 Alkol	1 saat	13	Eriyik parafin (60°C)	1 gece
7	Absolü Alkol	1 saat	14	Bloklama	

Çalışmada kullanılan kemik dokularında Işık mikroskopik incelemeler için bir mikrotom (Leica RM 2155) yardımıyla 5µ' luk kesitler polilizin kaplı lamlara alınarak 37°C su banyosunda kesitlerin açılması sağlandı. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5µm kalınlığındaki kesitlerde rutin histolojik incelemeler için hematoksilen-eozin (H&E) ve Masson trichrom boyama metodları uygulandı.

Hematoksilen-Eosin (H&E) Boyama: Herbir deneğe ait femur dokusundan alınana 5 µm'lik kesitler 1 gece boyunca 60⁰C'lik etüvde bekletildi ve ertesi gün H&E boyama yöntemi uygulandı (Tablo 3- 3).

Tablo 3-3: Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Ksilen-I	15 dk	12	Akarsu	10 dk
2	Ksilen-II	15 dk	13	%50 Alkol	10 dk
3	Absolü Alkol	10 dk	14	%70 Alkol	10 dk
4	%96 Alkol	10 dk	15	%80 Alkol	10 dk
5	%80 Alkol	10 dk	16	%96 Alkol	10 dk
6	%70 Alkol	10 dk	17	Absolü Alkol	10 dk
7	%50 Alkol	10 dk	18	Absolü Alkol	10 dk
8	Akarsu	10 dk	19	Ksilen-I	15 dk
9	Hematoksilen	7 dk	20	Ksilen-II	15 dk
10	Akarsu	5 dk	21	Kapatma	
11	Eozin	5 dk			

Masson Trichrom (MT) Boyama Yöntemi: Parafin bloklardan elde edilen kesitler 1 gece boyunca 60°C'lik etüvde bekletildikten sonra kesitlere Masson trikrom boyama yöntemi uygulandı (Tablo 3-4). H&E ve MT ile boyanan kesitlerin histolojik değerlendirmesi için DP 70 dijital kamera ile donatılmış Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) kullanıldı. Tüm preparatlar bu mikroskopta incelenerek grupları temsil eden görüntüler elde edildi.

Tablo 3-4: Masson trichrom boyama yöntemi

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etiv (60 °C)	1 gece	16	Distile Su	5 dakika
2	Ksilen I	10 dakika	17	Fosfomolibdik asit	5 dakika
3	Ksilen II	10 dakika	18	Anilin blue solüsyonu	2-5 dakika
4	Ksilen III	10 dakika	19	Distile Su	5 dakika
5	Absolu Alkol I	5 dakika	20	%1'lik asetik asit	2 dakika
6	Absolu Alkol II	5 dakika	21	Distile Su	5 dakika
7	%96 Alkol	5 dakika	22	%50 Alkol	2 dakika
8	%70 Alkol	5 dakika	23	%70 Alkol	2 dakika
9	%50 Alkol	5 dakika	24	%96 Alkol	2 dakika
10	Akarsu	2 dakika	25	Absolu Alkol I	10 dakika
11	Hematoksilen	5-8 dakika	26	Absolu Alkol II	10 dakika
12	Akarsu	5 dakika	27	Ksilen I	20 dakika
13	Asit alkol	30 saniye	28	Ksilen II	20 dakika
14	Akarsu	5 dakika	29	Ksilen III	20 dakika
15	Asit fuksin	1-2 dakika	30	Kapatma	

3.8. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR

- Phosphate Buffer Saline (PBS) Sigma-Aldrich (Almanya)
- EDTA Buffer, pH 8, 125 ml Thermo Fisher Scientific (Amerika)
- Citrat Buffer, pH 6, 125 ml Thermo Fisher Scientific (Amerika)
- Ultravision Polyvalent (Rabbit-Mouse) HRP Kit, 125 ml Thermo Fisher Scientific (Amerika)
- DAB Chromogen and Substrate System, 125 ml Thermo Fisher Scientific

(Amerika)

- ImmunoCruz™ Rabbit ABC Staining System Santa Cruz Biotechnology (Amerika)
- Rabbit Anti-TRAP/Tartrate Resistant Acid Phosphatase Polyclonal Antibody Abcam (Amerika)
- Anti-Alkaline Phosphatase Antibody 100µl Abcam (Amerika)

3.9. İMMÜNOHİSTOKİMYA BOYAMA YÖNTEMİ

Çalışmada, yeni doğan kemik dokusunda TRAP ve Alkaline Fosfataz (AP)'ın ekspresyonu İmmünohistokimya boyama yöntemi kullanılarak gösterildi. Farklı deney gruplarına ait femur kesitlerinde, osteblast aktivitesini göstermek için AP (Anti-Alkaline Phosphatase Antibody 100µl 1 Abcam cat no:ab95462) ve osteoklast aktivitesini belirlemek üzere TRAP (Rabbit Anti-TRAP/Tartrate Resistant Acid Phosphatase Polyclonal Antibody Abcam cat no: bs-6434R) primer antikorları kullanıldı. Avidin-biotin peroksidaz yöntemi için streptavidin-biotin kiti (thermo ultravision detection system, TP-125-HL) kullanıldı.

Parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler poli-lizinli lamlara alındıktan sonra 2 saat boyunca 60°C'lik etüvde bekletildi. Kesitler önce 3 kez 5'er dakika olmak üzere ksilende bırakıldı, sonra sırasıyla %100'lük, %96'lık, %80'lik ve %70'lik alkol serilerinden 3'er dakika geçirildi. Sonraki basamakta, kesitler 2 kez 2'şer dakika distile su (dH₂O)'dan geçirilerek alkolden kurtarıldı. Kesitlere 12 dakika süreyle %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulandı ve endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Lamlar 2 kez 5'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH: 7.4) ile yıkandı. Kesitler doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla %5'lik sitrat tamponu ile mikrodalga fırında 600W'de 5 dakika kaynatılan kesitler Phosphate Buffered Saline (PBS) ile tekrar yıkandı ve oda ısısında soğumaya bırakıldı. Daha sonraki aşamalarda thermo ultravision detection system (TP-125-HL) boyama kiti kullanılarak sırasıyla boyama prosedürü takip edildi. Lamlar 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla 5 dakika Ultra V Block uygulandı. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan AP yada TRAP primer antikoru ile inkübe edildi. Negatif kontrol için, primer antikor yerine PBS kullanıldı. Üzerine primer antikor damlatılan kesitler 1 gece +4°C'de bekletildi. Ertesi sabah lamlar oda ısısında bekletilerek 2 kez 5'er dakika PBS

ile yıkandı ve daha sonra 20 dakika biyotinli sekonder antikor uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. Bu basamağın ardından streptavidin peroksidaz ile 15 dakika muamele edilen kesitler yıkanarak immunreaktiviteyi görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB) (Thermo Scientific) özelliği gösteren substrat ile 5 dakika muamele edildikten sonra 5 dakika deiyonize H₂O ile yıkandı. Gill hematoksislen ile zıt boyanan kesitler distile su ile yıkandı ve lamalar entellan ile kapatıldı. Kesitler ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) incelendi.

Tüm deney gruplarına ait deneklerden alınan tüm femur kesitlerinde AP ve TRAP primer antikorları kullanılarak yapılan immun boyama metodunu uyguladığımız kesitler immunoreaktivite yoğunluklarının hesaplanması için kullanıldı. Femur kesitlerindeki AP ve TRAP immunoreaktivite yoğunlukları X40'da Image J software programı kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar kaydedildi.

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Varyans homojenliği Levene testi ile test edildi. İki denekten fazla gruplar arası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için Dunn-Bonferroni testi uygulandı. Veriler R 3.2.2 (www.r-project.org) yazılımı ile değerlendirildi. Verilerin anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. KILİNİK BULGULAR

Deneyisel çalışma süresince Nonylphenol grubu dışındaki tüm gruplarda bulunan ratların uygulanan gavaj işlemlerini iyi tolere ettiği, beslenmeleri açısından herhangi bir olumsuzluk gelişmediği, deney süresine bağlı olarak herhangi bir enfeksiyon oluşmadığı ve deneklerin genel sağlık durumlarının iyi olduğu gözlemlenirken, Nonylphenol grubuna ait anne ratlarda uygulamanın ilk dozundan itibaren zayıf ve halsiz oldukları izlendi.

Gebe Ratlara Ait Ağırlık Bulgular

Çalışmada, tüm deney gruplarına ait anne ratların gebelikleri süresince 0.5, 4., 8., 12., 16. ve 20. günlerde ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir ve elde edilen veriler gebelik günlerine göre tüm gruplar arasında karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analiz sonuçları tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Tablo 4-1. Anne ağırlığı verileri

Değişken	Grup					<i>p</i>
	Kontrol (<i>n</i> =6)	Mısır yağı (<i>n</i> =6)	Nonylphenol (<i>n</i> =6)	Curcumin (<i>n</i> =6)	Curcumin+Nonylphenol (<i>n</i> =6)	
0.5.Gün(gr)	175.10±15.30 ^a	198.40±14.21 ^a	170.98±36.70 ^a	196.72±14.23 ^a	179.95±20.53 ^a	0.129
4.Gün (gr)	184.51±15.12 ^b	206.20±14.10 ^b	181.90±33.50 ^b	203.60±12.50 ^b	190.60±21.63 ^a	0.186
8.Gün (gr)	193.60±17.22 ^c	214.70±13.80 ^c	187.70±34.30 ^b	211.51±12.80 ^b	197.43±22.60 ^b	0.173
12.Gün (gr)	204.60±14.50 ^d	223.15±13.20 ^d	196.30±32.95 ^c	222.11±11.90 ^c	206.40±23.60 ^c	0.141
16.Gün (gr)	226.20±20.73 ^e	240.91±15.51 ^e	206.61±31.70 ^d	241.10±14.90 ^d	219.90±22.23 ^d	0.054
20.Gün (gr)	248.80±19.90 ^e	266.60±24.10 ^f	228.21±29.60 ^e	263.60±17.10 ^e	236.50±18.40 ^e	0.025
<i>p</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütunda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

Deney Gruplarına Ait Fetus ve Plasentalarının Ağırlıkları

Çalışmada, tüm deney gruplarına ait anne ratlardan gebeliklerinin 20. gününde sezeryan ile alınan yavrularının tek tek ağırlıkları tartılarak hesaplanmış ve kaydedilmiştir. Buna göre en düşük fetus ağırlığı ortalaması Nonyphenol grubuna aitti ve Curcumin+ Nonylphenol grubu dahil tüm diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş vardı ($p<0.001$). Fetüslara ait plasentalarının ağırlıkları karşılaştırıldığında, en düşük plasenta ağırlığı yine Nonylphenol grubunda gözlendi. Nonylphenol uygulanan gruba ait fetüslerin plasenta ağırlıkları Kontrol, Curcumin ve Curcumin+ Nonylphenol gruplarına göre anlamlı derece düşük ($p<0.001$) iken Mısır yağı grubu ile anlamlılık göstermedi ($p>0.05$). İstatistiksel analiz sonuçları tablo 4- 2’de gösterilmiştir.

Tablo 4-2. Fetus ve plasenta ağırlık verileri

Değişken	Grup					<i>p</i>
	Kontrol (<i>n</i> =70)	Mısır yağ (<i>n</i> =65)	Nonylphenol (<i>n</i> =55)	Curcumin (<i>n</i> =67)	Curcumin+Nonylphenol (<i>n</i> =59)	
Fetus Ağırlığı (gr)	2.2(2.0-2.4) ^a	2.2(2.1-2.4) ^a	1.9(1.6-2.0) ^b	2.3(2.1-2.4) ^a	2.3(2.1-2.4) ^a	<0.001
Plasenta Ağırlığı (gr)	0.5(0.5-0.6) ^a	0.5(0.4-0.6) ^{ab}	0.5(0.4-0.5) ^b	0.5(0.5-0.6) ^a	0.5(0.5-0.6) ^a	<0.001

Veriler ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

Deney Grupları Fetuslarına Ait Uzunluk Bulguları

Deney gruplarına ait anne ratlarda sezeryan ile elde edilen fetusların baş-kıç, biparietal ve occipito-frontal uzunlukları dijital kumpas ile ölçülerek kaydedildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, anlamlı derecede en düşük boy ve frontal-occipital uzunluk değerlerine sahip olan fetuslar Nonylphenol grubuna ait anne ratlardan elde edilen fetuslardı ($p<0.001$). Biparietal uzunluk ölçüm sonuçlarına bakıldığında, Nonylphenol grubuna ait fetuslarda Kontrol, Mısır yağı ve Curcumin gruplarına göre anlamlı bir düşüş varken ($p<0.001$). Curcumin + Nonylphenol grubunda biparietal uzunluk sonuçları Nonylphenol grubuna göre yüksekti ancak veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı değildi ($p>0.05$). İstatistiksel analiz sonuçları tablo 4- 3’de gösterilmiştir.

Tablo 4-3. Baş- Kıç, Biparietal ve Frontal – Occipital uzunluk verileri

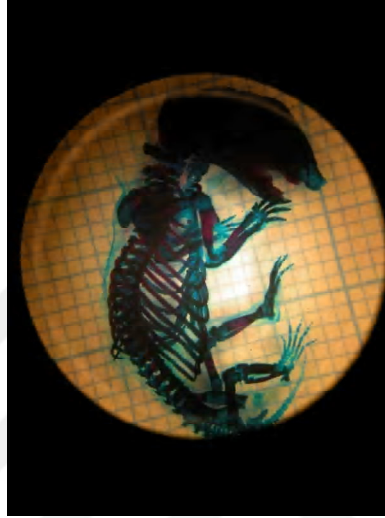
Değişken	Grup					p
	Kontrol (n=70)	Mısır yağı (n=65)	Nonylphenol (n=55)	Curcumin (n=67)	Curcumin+Nonylphenol (n=59)	
Baş-Kıç Uzunluğu (mm)	28.25±1.61 ^a	28.40±1.40 ^{ac}	26.40±2.41 ^b	29.00±1.50 ^c	28.11±1.95 ^a	<0.001
Biparietal Uzunluk (mm)	6.98±0.58 ^a	6.92±0.88 ^{ac}	6.36±0.84 ^b	6.89±0.83 ^{ac}	6.51±0.70 ^{bc}	<0.001
Frontal-Occipital Uzunluk (mm)	8.10±1.01 ^a	8.50±1.04 ^a	7.40±1.10 ^b	8.40±0.90 ^a	7.60±0.90 ^b	<0.001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

4.2. İKİLİ İSKELET BOYAMA YÖNTEMİNE AİT BULGULAR

Çalışmada tüm deney gruplarına ait fetusların ön ve arka ekstremitte kemikleri tek tek incelendi. İkili boyama metodu uygulandıktan sonra, fetusların stereomikroskop altında fotoğrafları çekildi. İncelenen kemiklerin morfometrik ölçümleri için fotoğraf çekimi esnasında milimetrik kâğıt kılavuz olarak kullanıldı (Şekil 4-1). Tüm ölçümler, ön ekstremitte kemikleri için clavicula, scapula, humerus, radius ve ulna kemikleri değerlendirilirken, arka ekstremitte kemikleri için femur, tibia ve fibula üzerinden yapıldı ve elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Tüm kemikler üzerinde yapılan ölçümler; kemiğin toplam uzunluğu, kemikleşme gösteren bölgenin uzunluk yüzdesi, kemik toplam alanı ve kemikleşme gösteren bölgenin alan yüzdesi şeklinde

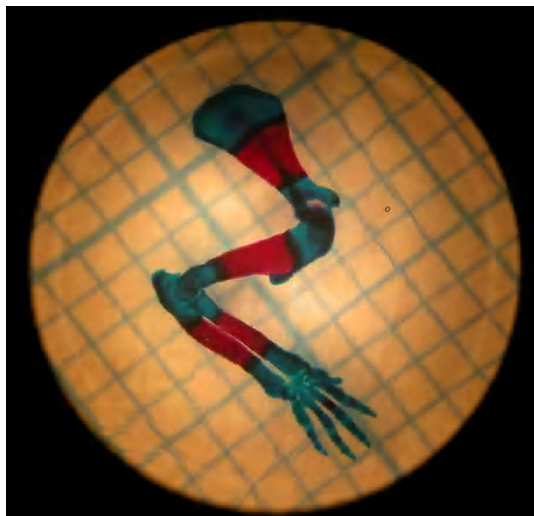
hesaplamalar yapıldı. Alan ölçümlerinde veriler kullanılarak kemiklerin toplam kemikleşme yüzdesi hesaplandı. Her kemik için toplam 18 fetusa ait sağ ve sol iki taraflı inceleme yapıldı ve böylece toplamda her gruptan 36 adet kemik incelemeye dâhil edildi.



Şekil 4-1. Tüm fetus görüntüsü

Ön Ekstremité Kemiklerine Ait Bulgular

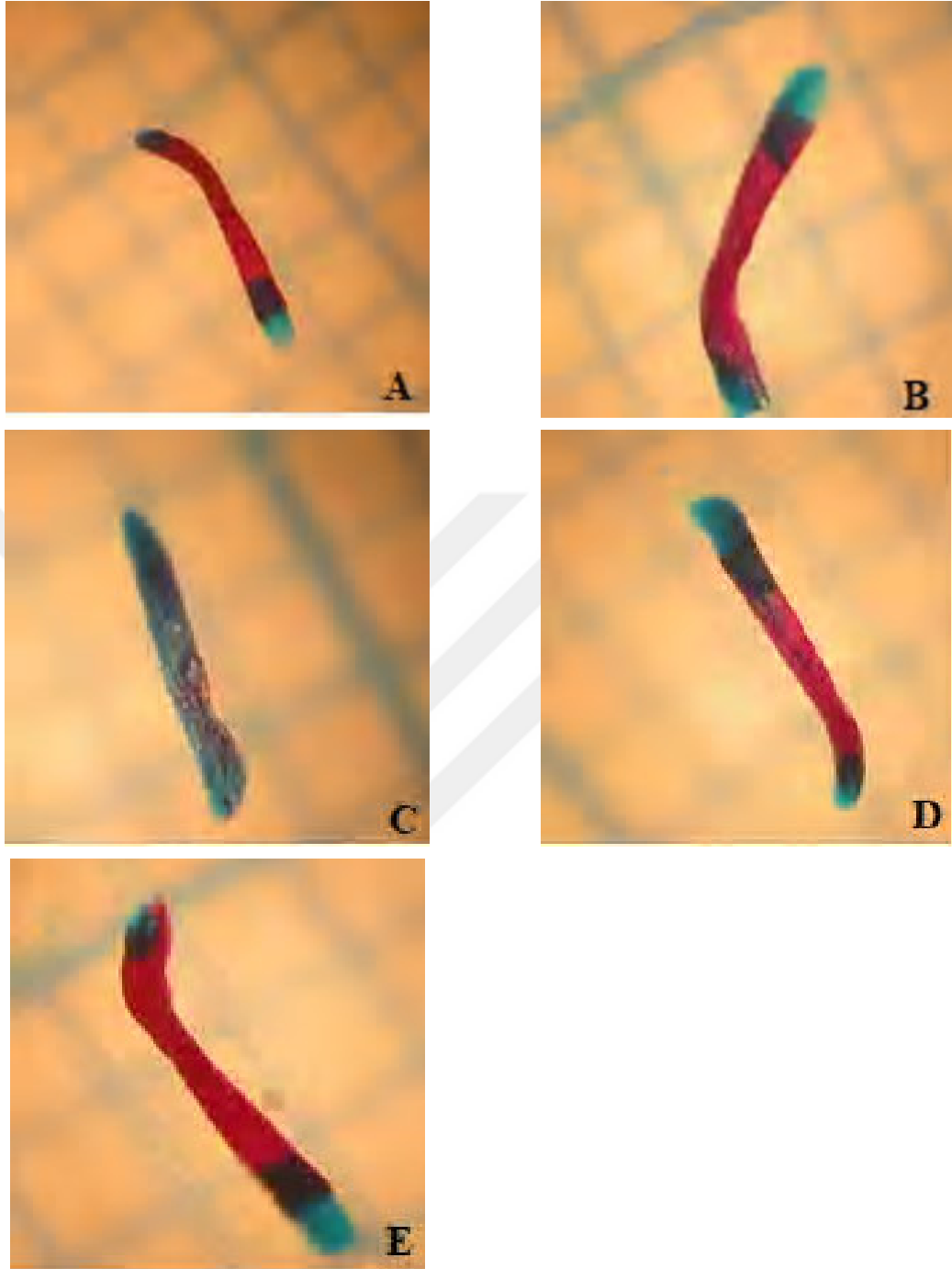
Tüm deney gruplarına ait fetuslardan alınan ön ekstremité kemiklerine ikili iskelet boyama metodu uygulandı (Şekil 4-2).



Şekil 4-2. İkili iskelet boyama metodu uygulanan ön ekstremité görüntüsü.

1. Clavicula'ya Ait Morfolojik Bulgular

Clavicula'ya ait morfolojik bulguların gruplar arasında karşılaştırma yapılması, her fetusa ait sağ ve sol claviculaları üzerinden olup her grupta toplam 18 fetustan 36 adet clavicula incelenmiştir. Clavicula incelemesinde kemikleşme bölgeleri kırmızı renkte izlenirken, kemikleşmenin görülmediği kıkırdak bölümleri ise mavi renkte gözlendi. Buna göre tüm deney gruplarına ait sağ ve sol claviculaların kemikleşme bölgelerinin uzunluk ve alan yüzdelerinin en düşük olduğu grup Nonylphenol grubuna ait fetuslarda gözlendi. Nonylphenol grubuna ait fetusların sağ ve sol claviculalarında gözlenen azalmış kemik uzunluğu ve alanı yüzdesi değerlerindeki bu azalma tüm diğer deney grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$) (Şekil 4-3). Clavicula ölçümlerine ait istatistiksel analiz sonuçları tablo 4-4'de gösterilmiştir. Clavicula kemik toplam boyu, kemikleşme gösteren bölgenin uzunluğu ve kemikleşme oranının yüzdesi uygulanan Nonylphenol'e bağlı olarak kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0.001$). Vücuttaki ilk kemikleşmeye başlayan kemik olarak bilinen claviculada, kıkırdak yıkımının geç meydana gelmesi Nonylphenol'ün fetus iskelet sisteminde oluşturduğu hasarı göstermiştir. Buna rağmen, Curcumin + Nonylphenol grubunda sadece Nonylphenol uygulanan gruba göre artmış kemik toplam boyu ve kemikleşme gösteren bölgenin uzunluğu gözlenmiştir. Bu durum, Curcumin'in Nonylphenol'ün neden olduğu kemikleşme hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olabileceğini göstermiştir.



Şekil 4-3. Clavicularia'ya ait görüntüler

A. Kontrol grubu **B.** Mısır yağı grubu **C.** Nonylphenol grubu **D.** Curcumin grubu
E. Curcumin+ Nonylphenol grubu

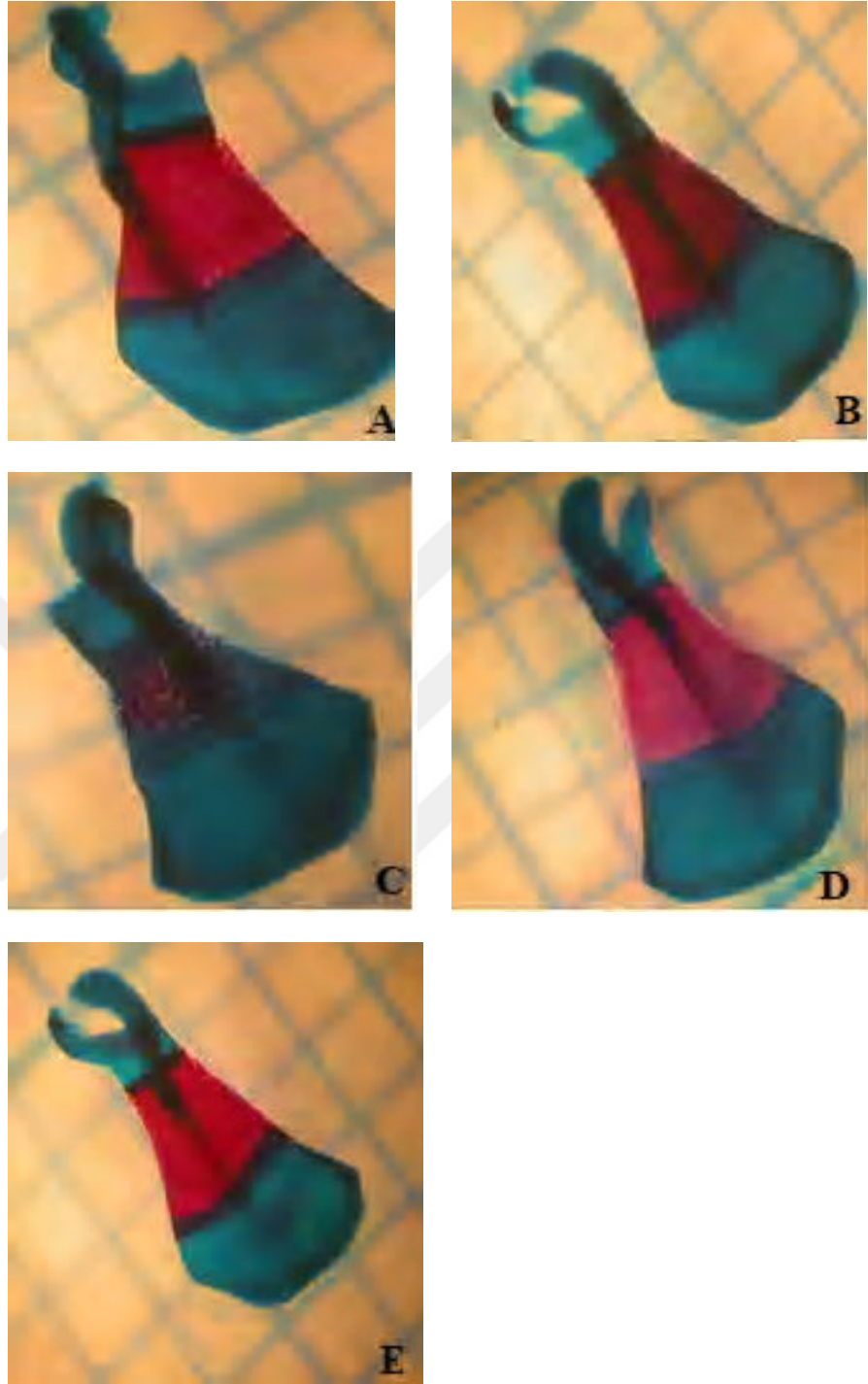
Tablo 4-4. Clavicula'ya ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması

Değişken	Grup					<i>p</i>
	Kontrol (<i>n</i> =18)	Mısır yağ (<i>n</i> =18)	Nonylphenol (<i>n</i> =18)	Curcumin (<i>n</i> =18)	Curcumin+Nonylphenol (<i>n</i> =18)	
Sağ clavicula alan (%)	84.0 (80.9-90.1) ^a	81.4 (79.4-84.8) ^a	13.3(4.7-26.0) ^b	85.1(80.0-87.8) ^a	79.5(74.0-83.1) ^a	< 0.001
Sağ clavicula uzunluk (mm)	83.4(81.7-88.0) ^a	83.9(82.3-85.3) ^a	27.3(14.2-34.3) ^b	85.6(80.3-87.6) ^a	83.9(76.7-87.1) ^a	< 0.001
Sol clavicula alan (%)	85.2(80.1-89.4) ^a	82.8(77.1-85.3) ^a	13.6(7.7-24.8) ^b	80.8(73.9-86.6) ^a	81.3(75.6-84.7) ^a	< 0.001
Sol clavicula uzunluk (mm)	84.4(79.8-86.1) ^a	82.9(76.8-85.2) ^a	24.5(15.0-32.8) ^b	80.5(76.7-86.2) ^a	83.4(79.8-85.8) ^a	< 0.001

Veriler ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

2. Scapula'ya Ait Morfolojik Bulgular

Scapula'ya ait morfolojik bulguların gruplar arasında karşılaştırması için, her grup için toplam 36 adet scapula incelenmiştir. İkili boyama metodu uygulanan scapula incelemesinde kemikleşme bölgeleri kırmızı renkte izlenirken, kemikleşmenin görülmediği kıkırdak bölümleri ise mavi renkte gözlemlendi. Sağ ve sol scapulalarda gözlenen uzunluk ölçümleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, tüm diğer deney gruplarına göre en düşük kemikleşme uzunluğu yüzdesi Nonylphenol grubunda anlamlı derecede düşüktü ($p<0.001$). Nonylphenol grubuna ait sağ scapula'daki yüzde kemikleşme alanı kontrol ve tüm diğer deney gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü ($p<0.001$). Curcumin + Nonylphenol grubunda sağ scapula'daki yüzde kemikleşme alanı kontrol ve mısır yağı gruplarına göre anlamlı derecede düşük olmasına rağmen ($p<0.001$) kemikleşme alanı yüzdesi Nonylphenol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ($p<0.001$). Curcumin + Nonylphenol grubundaki yüzde kemikleşme alanı ile Curcumin grubundaki yüzde kemikleşme alanı arasında anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$). Curcumin + Nonylphenol grubunda sağ scapula'daki yüzde kemikleşme alanı Kontrol ve tüm diğer deney gruplarına göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0.001$). Curcumin + Nonylphenol grubunda sol scapula'daki yüzde kemikleşme alanı sadece Nonylphenol uygulanan grupta anlamlı derecede artmıştı ($p<0.001$) (Şekil 4-4). İstatistiksel analiz sonuçları tablo 4-5'de gösterilmiştir.



Şekil 4-4. Scapula'ya ait görüntüler

A. Kontrol grubu **B.** Mısır yağı grubu **C.** Nonylphenol grubu **D.** Curcumin grubu
E. Curcumin+ Nonylphenol grubu

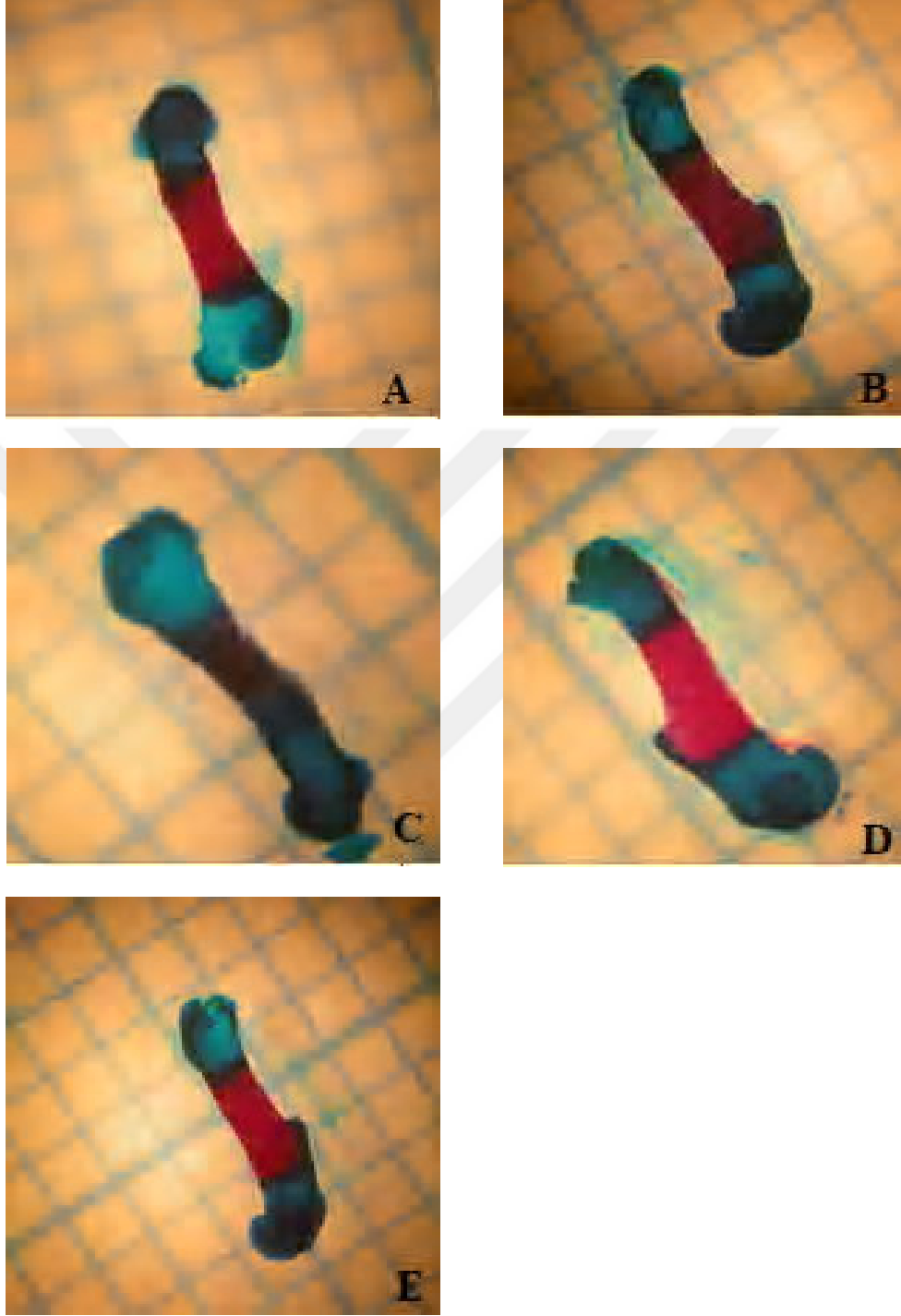
Tablo 4-5. Scapula'ya ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması

Değişken	Grup					<i>p</i>
	Kontrol (<i>n</i> =18)	Mısır yağ (<i>n</i> =18)	Nonylphenol (<i>n</i> =18)	Curcumin (<i>n</i> =18)	Curcumin+Nonylphenol (<i>n</i> =18)	
Sağ scapula alan (%)	41.4(39.8-43.4) ^a	40.4(37.9-42.9) ^a	12.3(6.2-15.1) ^b	39.1(96.3-42.6) ^{ac}	35.1(33.7-39.2) ^c	< 0.001
Sağ scapula uzunluk (mm)	41.4(38.3-42.3) ^a	41.4(39.6-42.4) ^a	19.5(16.2-21.0) ^b	41.9(39.5-43.6) ^a	37.8(35.2-43.4) ^a	< 0.001
Sol scapula alan (%)	35.0(34.3-38.6) ^a	38.6(35.2-40.7) ^{ac}	8.9(3.5-14.0) ^b	44.3(41.7-46.2) ^c	40.5(38.5-43.4) ^c	< 0.001
Sol scapula uzunluk (mm)	38.7(36.4-41.2) ^a	39.8(37.9-41.5) ^a	18.2(11.6-19.9) ^b	38.1(34.3-41.9) ^a	34.8(33.7-40.7) ^a	< 0.001

Veriler ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

3. Humerus'a Ait Morfolojik Bulgular

Tüm gruplara ait fetusların humeruslarına ait morfolojik bulguların karşılaştırması için yine her gruptan 18 fetusa ait sağ ve sol olmak üzere toplam 36 adet humerus incelenmiştir. İkili boyama metodu uygulanan humerus kemiklerinde kemikleşme bölgeleri kırmızı renkte izlenirken, kemikleşmenin görülmediği kıkırdak bölümleri ise mavi renkte gözlendi. Tüm ölçümler bu renklendirmelere göre yapıldı. Çalışmamızda, en düşük kemikleşmenin olduğu grup Nonylphenol uygulanan anne ratlara ait fetuslarda görüldü. Sadece Nonylphenol uygulanan grubun fetuslarına ait sağ ve sol humerusun kemik toplam boyu ve kemikleşme gösteren bölgenin alan yüzdesi tüm diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derece düşüş gösterirken ($p<0.001$), Curcumin + Nonylphenol grubunda sadece Nonylphenol uygulanan gruba göre anlamlı derecede artış ($p<0.001$) gözlendi. Curcumin + Nonylphenol grubunda gözlenen sağ ve sol humerusun kemik toplam boyu ve kemikleşme gösteren bölgenin alan yüzdesindeki kemikleşme ile Kontrol, Mısır yağı ve sadece Curcumin uygulanan gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$). Bu sonuçlara dayanarak çalışmamızda, humerus kemikleşmesi üzerine Nonylphenol'ün neden olduğu hasar üzerine Curcumin'in koruyucu etkiye sahip olduğu söylenebilir (Şekil 4-5). İstatistiksel analiz sonuçları tablo 4-6'da gösterilmiştir.



Şekil 4-5. Humerus'a ait görüntüler

A. Kontrol grubu **B.** Mısır yağı grubu **C.** Nonylphenol grubu **D.** Curcumin grubu
E. Curcumin+ Nonylphenol grubu

Tablo 4-6. Humerus'a ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması

Değişken	Grup					<i>p</i>
	Kontrol (<i>n</i> =18)	Mısır yağı (<i>n</i> =18)	Nonylphenol (<i>n</i> =18)	Curcumin (<i>n</i> =18)	Curcumin+Nonylphenol (<i>n</i> =18)	
Sağ humerus alan (%)	40.2 (38.8-42.7) ^a	37.8(31.-42.8) ^a	12.2(10.4-15.1) ^b	39.8(37.2-44.5) ^a	34.4(33.6-41.8) ^a	< 0.001
Sağ humerus uzunluk (mm)	46.2(43.7-48.2) ^a	47.3(45.7-48.4) ^a	17.5(14.1-21.9) ^b	43.5(41.8-46.8) ^a	42.9(38.3-48.2) ^a	< 0.001
Sol humerus alan (%)	41.6(36.8-45.9) ^a	40.9(36.4-41.9) ^{ac}	13.5(10.4-15.5) ^b	39.2(37.9-40.7) ^{ac}	34.9(31.6-38.9) ^c	< 0.001
Sol humerus uzunluk (mm)	46.0(45.1-49.1) ^a	45.2(41.9-47.4) ^{ac}	17.0(13.8-22.2) ^b	45.3(43.1-47.9) ^{ac}	39.7(37.2-42.6) ^c	< 0.001

Veriler ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

4. Ulna'ya Ait Morfolojik Bulgular

Tüm gruplara ait fetusların ulnasına ait morfolojik bulguların karşılaştırması için yine her gruptan 18 fetusta ve sağ ve sol olmak üzere toplam 36 adet ulna incelenmiştir. İkili boyama metodu uygulanan ulna kemiklerinde kemikleşme bölgeleri kırmızı renkte izlenirken, kemikleşmenin görülmediği kıkırdak bölümleri ise mavi renkte gözlendi. Çalışmada, Nonylphenol uygulanan deney grubunda, sağ ve sol ulna'da kemik toplam boyu ve kemikleşme gösteren bölgenin alan yüzdesi tüm diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derece düşüş gösterdi ($p<0.001$). Curcumin + Nonylphenol uygulanan grupta ise, sadece Nonylphenol uygulanan gruba göre hem sağ hem de sol ulna da, kemik toplam boyu ve kemikleşme gösteren bölgenin alan yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı derece bir artış gözlendi ($p<0.001$). Sol ulna'da kemik uzunluğuna bakıldığında, Curcumin + Nonylphenol grubunda kontrol ve mısır yağı uygulanan gruplar arasında anlamlı bir farklılık yokken ($p>0.05$), sadece Curcumin uygulanan grup ile anlamlı bir farklılık gösterdi ($p<0.001$). Bu sonuçlara göre, Curcumin'in Nonylphenol'ün neden olduğu kemikleşme üzerine ulnada da koruyucu bir etkiye sahip olabileceği söylenebilir (Şekil 4-6). İstatistiksel analiz sonuçları tablo 4-7'de gösterilmiştir.

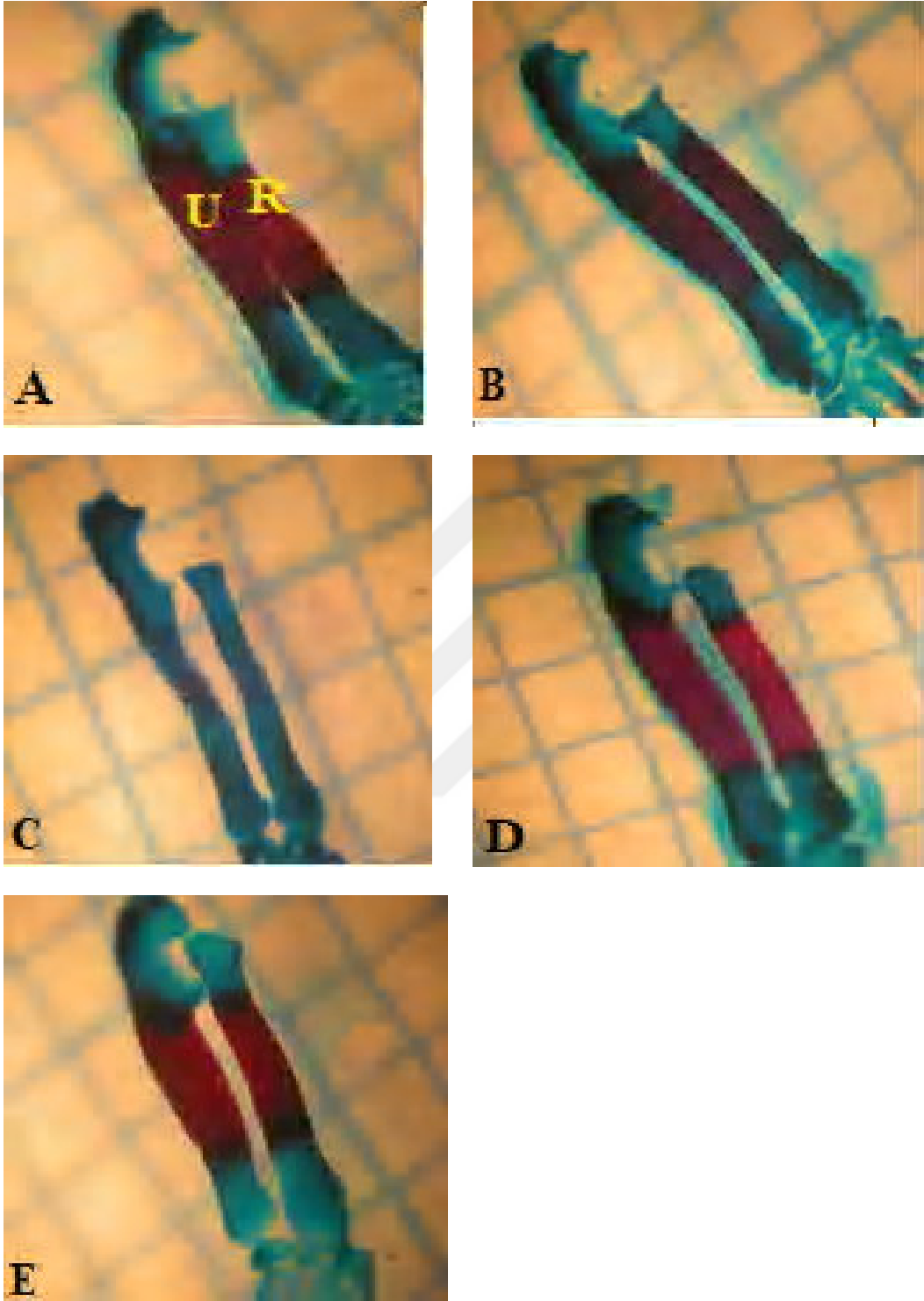
Tablo 4-7. Ulna'ya ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması

Değişken	Grup					<i>p</i>
	Kontrol (<i>n</i> =18)	Mısır yağı (<i>n</i> =18)	Nonylphenol (<i>n</i> =18)	Curcumin (<i>n</i> =18)	Curcumin+Nonylphenol (<i>n</i> =18)	
Sağ ulna alan (%)	44.1(40.1-46.9) ^a	43.1(40.2-48.8) ^a	12.9(7.6-17.6) ^b	43.5(40.6-46.9) ^a	42.3(36.2-45.1) ^a	< 0.001
Sağ ulna uzunluk (mm)	44.9(43.2-47.4) ^a	44.5(42.0-46.3) ^a	16.8(11.8-18.9) ^b	45.3(41.5-47.9) ^a	41.7(40.1-43.5) ^a	< 0.001
Sol ulna alan (%)	45.5(41.2-47.6) ^a	42.6(36.7-46.6) ^a	12.6(10.0-16.6) ^b	44.6(41.9-45.5) ^a	40.2(38.9-42.2) ^a	< 0.001
Sol ulna uzunluk (mm)	44.6(42.9-46.9) ^{ac}	43.5(41.6-45.2) ^{ac}	16.8(11.2-19.4) ^b	46.4(43.9-47.4) ^c	41.6(39.0-43.6) ^a	< 0.001

Veriler ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

5. Radius'a Ait Morfolojik Bulgular

Tüm gruplara ait fetusların radiusundaki morfolojik bulguların karşılaştırması 18 fetusa ait sağ ve sol olmak üzere toplam 36 adet radius üzerinde yapılmıştır. İkili boyama metodu uygulanan radius kemiklerinde kemikleşme bölgeleri kırmızı renkte izlenirken, kemikleşmenin görülmediği kıkırdak bölümleri ise mavi renkte gözlenmiş olup tüm ölçümler yine bu renklemeler üzerinden yapılmıştır. Çalışmamızda, Nonylphenol uygulanan deney grubunda, sağ ve sol radius'da kemikleşme gösteren bölgenin alan yüzdesi tüm diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derece düşüş gösterdi ($p<0.001$). Curcumin + Nonylphenol uygulanan grupta ise, sadece Nonylphenol uygulanan gruba göre anlamlı bir artış vardı ($p<0.001$). Curcumin + Nonylphenol grubunda, sağ ve sol radius'da kemikleşme gösteren bölgenin alan yüzdesi bakımından Kontrol, Mısır yağı ve sadece Curcumin uygulanan gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$). Sağ radius'da kemik uzunluğunun en düşük olduğu grup Nonylphenol grubu idi. Curcumin + Nonylphenol uygulanan grupta sağ radius kemik uzunluğu Kontrol ve Mısır yağı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece düşük ($p<0.001$) olmasına rağmen sadece Nonylphenol uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derece yüksekti ($p<0.001$) ve sadece Curcumin grubu ile anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$). Sol radius kemik uzunluğunun diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük olan grup Nonylphenol grubu idi. Curcumin + Nonylphenol uygulanan grupta sol radius kemik uzunluğu sadece Nonylphenol uygulanan gruba göre anlamlı bir artış gösterdi ($p<0.001$). Curcumin + Nonylphenol uygulanan grupta sol radius kemik uzunluğu bakımından Mısır yağı ve Curcumin gruplarına göre anlamlı bir artış göstermezken ($p>0.05$), Kontrol gruna göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0.001$). Ancak Kontrol grubu ile Mısır yağı ve Curcumin grupları arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$). Bu sonuçlara göre, Curcumin'in Nonylphenol'ün neden olduğu kemikleşme üzerine radiusda koruyucu bir etkiye sahip olduğu söylenebilir (Şekil 4-6). İstatistiksel analiz sonuçları tablo 4- 8'de gösterilmiştir.



Şekil 4-6. Radius / Ulna'ya ait görüntüler

A. Kontrol grubu **B.** Mısır yağı grubu **C.** Nonylphenol grubu **D.** Curcumin grubu
E. Curcumin+ Nonylphenol grubu

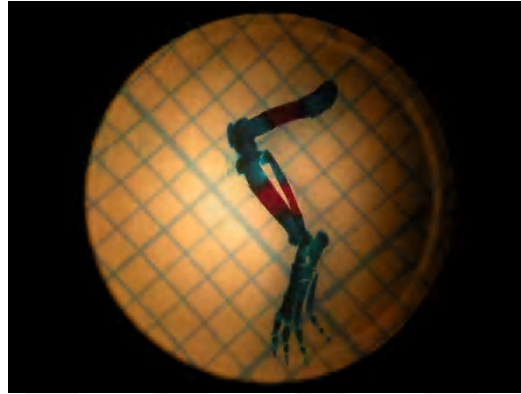
Tablo 4- 8. Radius'a ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması

Değişken	Grup					<i>p</i>
	Kontrol (n=18)	Mısır yağı (n=18)	Nonylphenol (n=18)	Curcumin (n=18)	Curcumin+Nonylphenol (n=18)	
Sağ radius alan (%)	45.4(40.5-46.9) ^a	44.4(38.4-48.2) ^a	13.4(7.4-18.4) ^b	45.6(37.4-49.5) ^a	41.8(37.6-46.3) ^a	< 0.001
Sağ radius uzunluk (mm)	51.5(47.4-53.7) ^a	50.8(49.2-52.4) ^a	17.9(12.1-22.9) ^b	47.2(46.1-51.2) ^{ac}	41.4(37.9-46.0) ^c	< 0.001
Sol radius alan (%)	48.2(44.1-51.2) ^a	49.1(45.2-51.3) ^a	13.8(7.3-15.1) ^b	48.3(46.6-49.9) ^a	39.2(37.1-42.3) ^b	< 0.001
Sol radius uzunluk (mm)	52.1(46.4-53.9) ^a	49.5(45.9-51.6) ^{ac}	16.1(12.1-20.3) ^b	47.0(45.3-52.3) ^{ac}	39.8(35.7-48.3) ^c	< 0.001

Veriler ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

Arka Ekstremité Kemiklerine Ait Bulgular

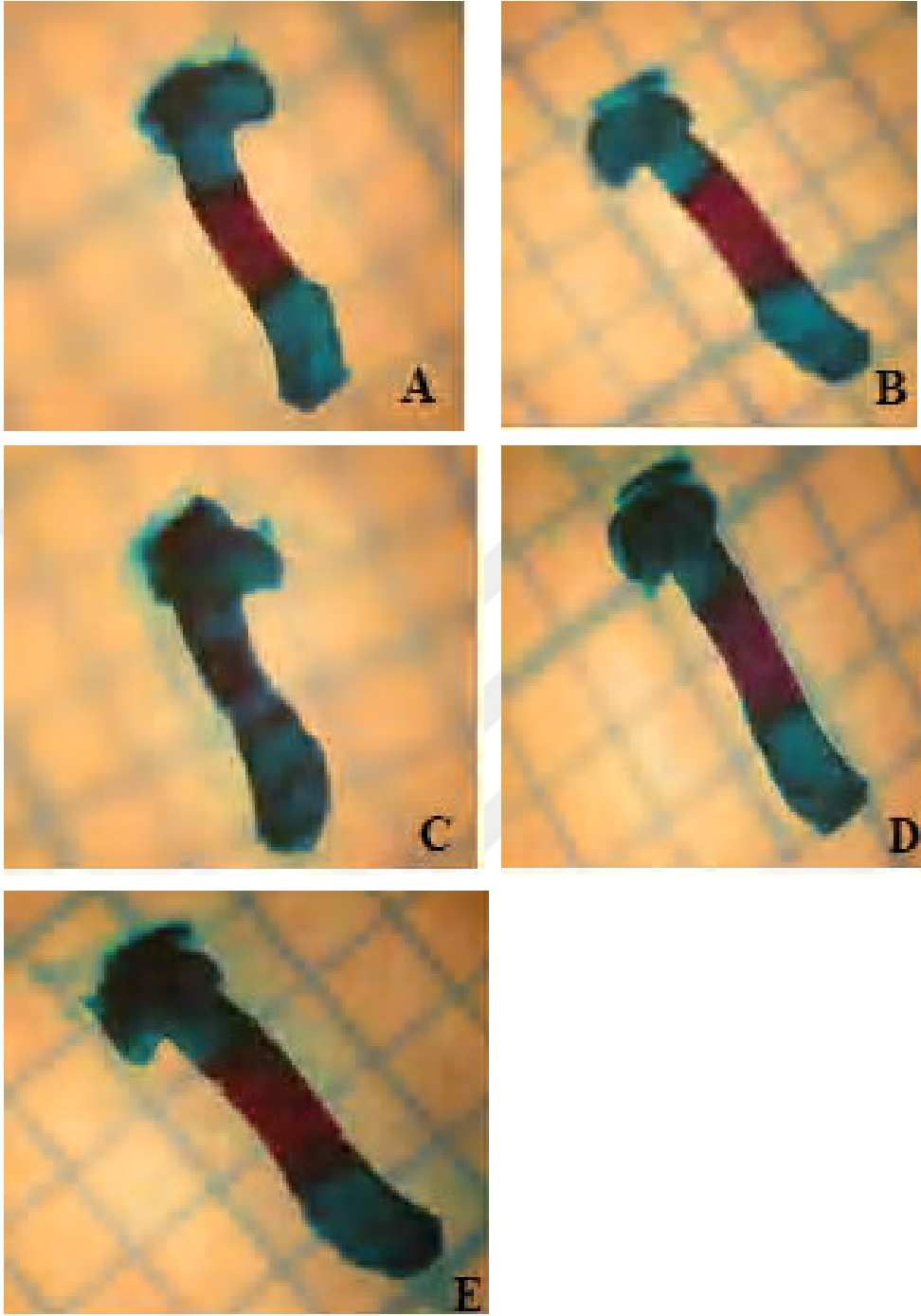
Tüm deney gruplarına ait fetuslardan alınan arka ekstremité kemiklerine ikili iskelet boyama metodu uygulandı (Şekil 4-7).



Şekil 4-7. İkili iskelet boyama metodu uygulanan arka ekstremité görüntüsü

1. Femur'a Ait Morfolojik Bulgular

Tüm gruplara ait fetusların femuruna ait morfolojik bulguların karşılaştırması için her gruptan 18 fetus için sağ ve sol olmak üzere toplam 36 adet femur incelenmiştir. İkili boyama metodu uygulanan femur kemiklerinde kemikleşme bölgeleri kırmızı renkte izlenirken, kemikleşmenin görülmediği kıkırdak bölümleri ise mavi renkte gözlendi. Çalışmada, Nonylphenol uygulanan deney grubunda, sağ ve sol femurda kemik toplam boyu ve kemikleşme gösteren bölgenin alan yüzdesi tüm diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derece düşüş gösterdi ($p<0.001$). Curcumin + Nonylphenol uygulanan grupta ise, sadece Nonylphenol uygulanan gruba göre kemikleşmede anlamlı bir artış vardı ($p<0.001$). Curcumin + Nonylphenol uygulanan grupta sol femura ait kemikleşme alanı sadece Nonylphenol uygulanan femura göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p<0.001$) olmasına rağmen, sadece Curcumin uygulanan gruptan anlamlı derecede düşüktü ($p<0.001$). Kontrol grubunda sol femura ait kemikleşme alanı yüzdesi bakımından Mısır yağı ve sadece Curcumin uygulanan gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$). Çalışmamızın sonuçları, Curcumin'in Nonylphenol'ün neden olduğu kemikleşme üzerine femurda koruyucu bir etkiye sahiptir (Şekil 4-8). Femura ait tüm istatistiksel analiz sonuçları tablo 4-9'de gösterilmiştir.



Şekil 4-8. Femur'a ait görüntüler

A. Kontrol grubu **B.** Mısır yağı grubu **C.** Nonylphenol grubu **D.** Curcumin grubu
E. Curcumin+ Nonylphenol grubu

Tablo 4-9. Femur'a ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması

Değişken	Grup					<i>p</i>
	Kontrol (<i>n</i> =18)	Mısır yağı (<i>n</i> =18)	Nonylphenol (<i>n</i> =18)	Curcumin (<i>n</i> =18)	Curcumin+Nonylphenol (<i>n</i> =18)	
Sağ femur alan (%)	37.5(33.1-41.4) ^a	36.7(32.9-44.5) ^a	7.4(5.3-9.5) ^b	39.7(36.3-43.2) ^a	33.6(28.6-35.4) ^a	< 0.001
Sağ femur uzunluk (mm)	40.3(36.2-45.1) ^a	38.9(36.9-42.5) ^a	12.1(7.9-15.6) ^b	41.0(37.2-43.6) ^a	37.9(34.3-41.2) ^a	< 0.001
Sol femur alan (%)	33.0(29.9-35.3) ^{ac}	32.4(28.7-35.7) ^{ac}	6.2(3.8-10.2) ^b	33.7(32.8-37.6) ^c	26.9(24.0-30.8) ^a	< 0.001
Sol femur uzunluk (mm)	38.7(37.1-42.5) ^a	36.2(33.4-39.5) ^a	12.4(7.5-16.6) ^b	37.6(35.2-41.3) ^a	35.4(33.2-39.2) ^a	< 0.001

Veriler ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

2. Tibia'ya Ait Morfolojik Bulgular

Tüm gruplara ait fetusların tibialarına ait morfolojik bulguların karşılaştırması için her gruptan 18 fetus için sağ ve sol olmak üzere toplam 36 adet tibia incelenmiştir. İkili boyama metodu uygulanan tibia kemiklerinde kemikleşme bölgeleri kırmızı, kemikleşmenin görülmediği kıkırdak bölümleri ise mavi renkte gözlendi. Çalışmada, tüm deney gruplarına ait sağ ve sol tibiaların kemikleşme bölgelerinin uzunluk ve alan yüzdelерinin en düşük olduğu grup Nonylphenol grubuna ait fetuslarda gözlendi. Nonylphenol grubuna ait fetusların sağ ve sol tibialarında gözlenen azalmış kemik uzunluğu ve kemikleşme alanı yüzdesi değerlerindeki bu azalma tüm diğer deney grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$). Tibiada kıkırdak yıkımının geç meydana gelmesi Nonylphenol'ün fetus iskelet sisteminde oluşturduğu hasarı göstermiştir. Çalışmada, tibia kemik toplam boyu, kemikleşme gösteren bölgenin uzunluğu ve kemikleşme yüzde oranının uygulanan Nonylphenol'e bağlı olarak kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0.001$). Buna rağmen, Curcumin + Nonylphenol grubunda sadece Nonylphenol uygulanan gruba göre artmış kemik toplam boyu ve kemikleşme gösteren alanın yüzdesi gözlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4-9). İstatistiksel analiz sonuçları tablo 4-10'da gösterilmiştir.

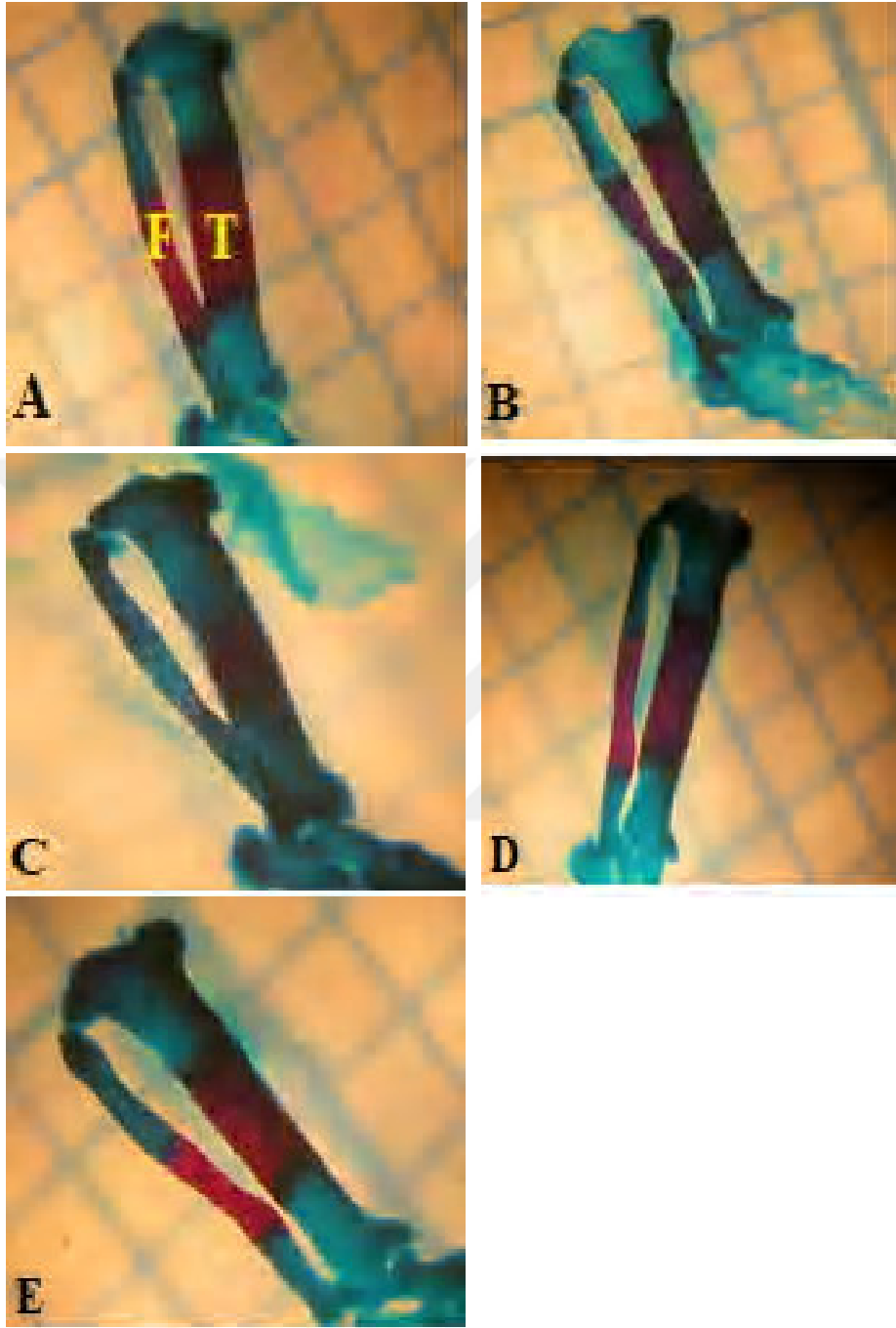
Tablo 4-10. Tibia'ya ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması

Değişken	Grup					<i>p</i>
	Kontrol (<i>n</i> =18)	Mısır yağı (<i>n</i> =18)	Nonylphenol (<i>n</i> =18)	Curcumin (<i>n</i> =18)	Curcumin+Nonylphenol (<i>n</i> =18)	
Sağ tibia alan (%)	40.8(36.4-44.3) ^a	38.7(37.3-42.4) ^a	9.2(3.9-11.5) ^b	40.9(37.7-43.4) ^a	39.9(34.8-43.7) ^a	< 0.001
Sağ tibia uzunluk (mm)	42.4(40.9-45.5) ^a	42.4(40.8-43.6) ^a	14.2(10.5-17.2) ^b	42.1(39.1-44.7) ^a	42.3(36.6-45.4) ^a	< 0.001
Sol tibia alan (%)	40.5(38.7-45.4) ^a	41.8(37.5-43.4) ^a	9.9(6.0-13.1) ^b	45.0(38.7-46.6) ^a	37.7(35.5-42.2) ^a	< 0.001
Sol tibia uzunluk (mm)	43.2(40.9-47.4) ^a	41.3(40.3-42.6) ^a	15.3(9.3-18.5) ^b	44.3(40.6-45.6) ^a	41.9(36.9-44.8) ^a	< 0.001

Veriler ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

3. Fibula'ya Ait Morfolojik Bulgular

Tüm gruplara ait fetusların fibulalarına ait morfolojik bulguların karşılaştırması için her gruptan 18 fetus için sağ ve sol olmak üzere toplam 36 adet fibula incelenmiştir. İkili boyama metodu uygulanan fibula kemiklerinde kemikleşme bölgeleri kırmızı, kemikleşmenin görülmediği kıkırdak bölümleri ise mavi renkte gözlendi. Çalışmada, tüm deney gruplarına ait sağ ve sol fibulaların kemikleşme bölgelerinin uzunluk ve alan yüzdelерinin en düşük olduğu grup Nonylphenol grubuna ait fetuslarda gözlendi ve veriler tüm diğer deney grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$). Çalışmada, fibulada kemikleşme gösteren bölgenin uzunluğu ve kemikleşme yüzde oranının uygulanan Nonylphenol'e bağlı olarak kontrol ve tüm diğer deney gruplarına göre anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0.001$). Buna rağmen, Curcumin+ Nonylphenol grubunda sadece Nonylphenol uygulanan gruba göre artmış kemik toplam boyu ve kemikleşme gösteren alanın yüzdesi gözlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4-9). İstatistiksel analiz sonuçları tablo 4-11'de gösterilmiştir.



Şekil 4-9. Tibia / Fibula'ya ait görüntüler

A. Kontrol grubu **B.** Mısır yağı grubu **C.** Nonylphenol grubu **D.** Curcumin grubu
E. Curcumin+ Nonylphenol grubu

Tablo 4-11. Fibula'ya ait kemikleşme alanı ve kemik uzunluğu yüzde oranı karşılaştırılması

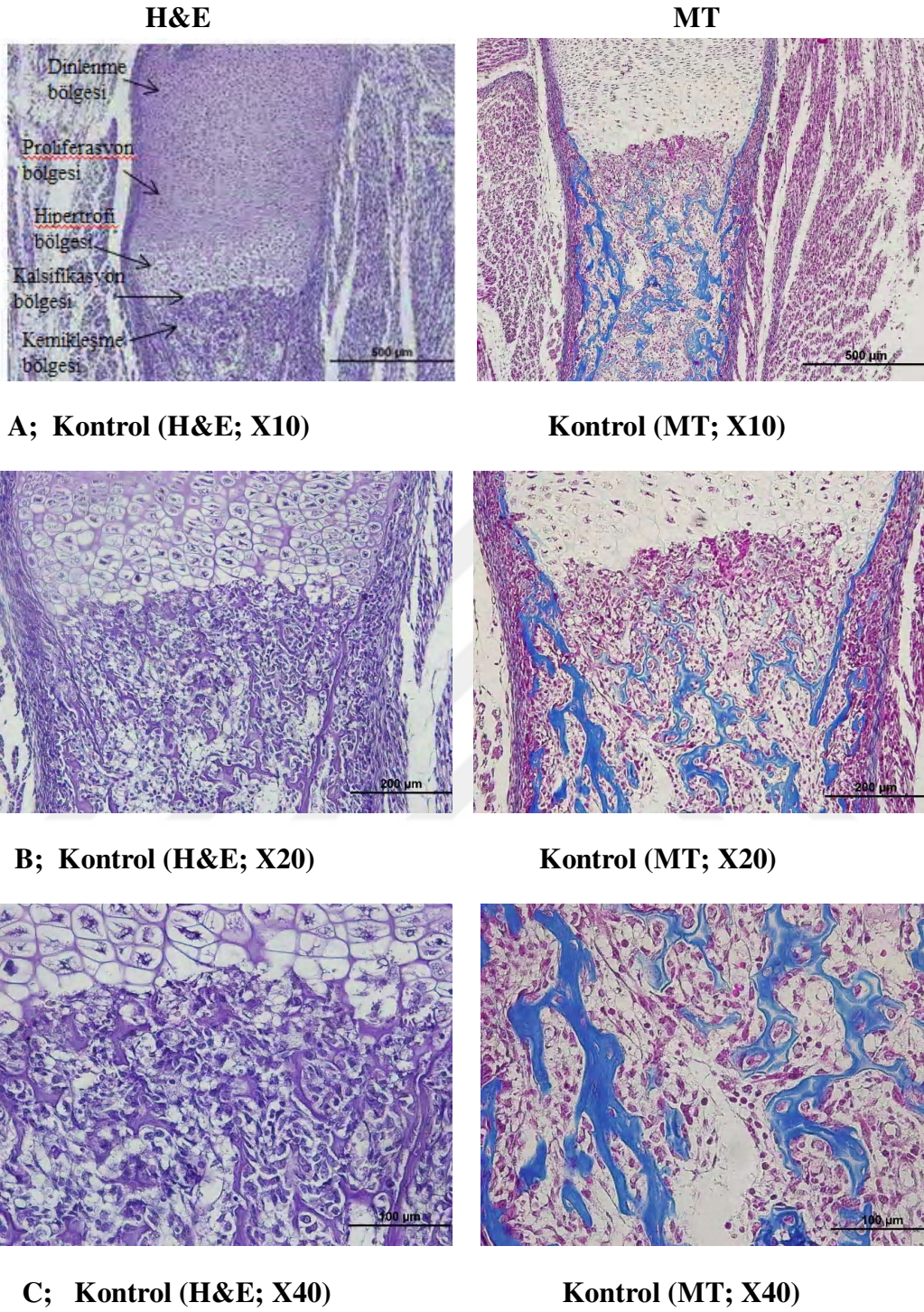
Değişken	Grup					<i>p</i>
	Kontrol (<i>n</i> =18)	Mısır yağı (<i>n</i> =18)	Nonylphenol (<i>n</i> =18)	Curcumin (<i>n</i> =18)	Curcumin+Nonylphenol (<i>n</i> =18)	
Sağ fibula alan (%)	39.5(37.0-41.6) ^a	37.7(34.4-39.6) ^a	0(0-8.3) ^b	38.9(35.1-42.3) ^a	36.9(30.6-43.5) ^a	< 0.001
Sağ fibula uzunluk (mm)	40.8(39.7-44.6) ^a	41.9(40.4-44.2) ^a	0(0-10.4) ^b	40.7(39.1-43.1) ^a	39.2(29.7-43.3) ^a	< 0.001
Sol fibula alan (%)	41.7(36.2-43.7) ^a	42.2(38.5-44.9) ^a	1.6(0-6.4) ^b	41.8(35.8-45.7) ^a	38.8(32.2-41.9) ^a	< 0.001
Sol fibula uzunluk (mm)	40.6(38.7-42.6) ^a	41.4(37.7-43.1) ^a	5.3(0-12.5) ^b	38.9(36.9-40.4) ^a	37.7(31.1-39.4) ^a	< 0.001

Veriler ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

4.3. HİSTOLOJİK BULGULAR

4.3.1. H&E ve MT İle Boyanmış Gruplara Ait Histolojik Bulgular

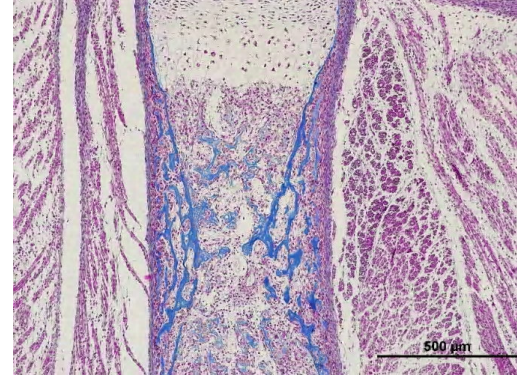
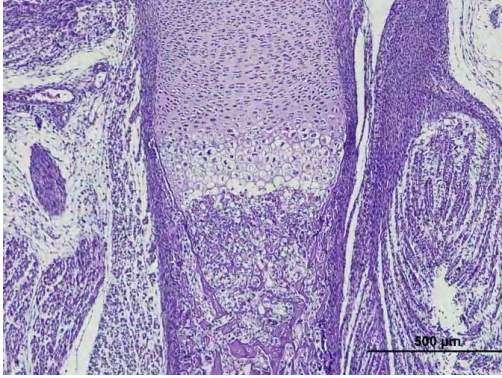
Tüm deney gruplarına ait fetuslardan alınan femurlara ait kesitler H&E ve MT ile boyanarak kemikleşme bölgeleri ışık mikroskobu altında incelendi ve değerlendirildi. Tüm uzun kemiklerde olduğu gibi femurda da kemikleşme endokondral kemikleşme olarak adlandırılan bir hyalin kıkırdak model üzerinden gerçekleşmektedir. Kontrol grubuna ait femur kesitinin ışık mikroskobik incelemesinde, femur'un epifiz bölgesinde dinlenme bölgesinde hyalin kıkırdağa ait kondrositler laküna içinde tek tek ya da izogen gruplar şeklinde yerleşim göstermekteydi. Dinlenme bölgesinin altında yer alan proliferasyon bölgesinde, kondrositlerin hızla bölündüğü ve çoğaldığı görüldü. Kemikleşmenin 3. bölgesi olan hipertrofi bölgesinde hipertrofiye olmuş büyük kondrositlerle ayırt edildi. Kalsifikasyon bölgesi endokondral kemikleşmenin 4. bölgesi olarak bilinir ve bu bölgede kalsifiye olmuş kıkırdak matriksi belirgin olarak gözlenmektedir. Endokondral kemikleşmenin son bölgesi olan kemikleşme bölgesi yeni oluşan kemik spikülleri ile tüm kontrol grubu femur kesitlerinde belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 4-10). Mısır yağı ve sadece curcumin uygulanan gruplara ait femur kesitlerinin ışık mikroskobik incelemesinde, endokondral kemikleşme bölgelerinin aynı morfolojik özelliklere sahip olduğu ve kemikleşmenin 5 bölgesinin de net bir şekilde ayırt edildiği görüldü (Şekil 4-11/12). Sadece Nonylphenol uygulanan gruba ait femur kesitleri ışık mikroskobik olarak incelendiğinde, kemikleşme bölgelerindeki hücre yoğunluklarında kontrol grubuna göre daha az olduğu dikkati çekti. Özellikle de hipertrofi bölgesindeki kondrositlerin sayısı belirgin şekilde azalmıştı (Şekil 4-13). Mikroskobik bulgulara göre, Nonylphenol'ün kemikleşmeyi geciktirdiği açıktı. Curcumin + Nonylphenol uygulanan gruba ait femur kesitlerinde Nonylphenol grubuna göre kemikleşme bölgelerinde hemen hemen kontrol grubuna yakın özelliklere sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4-14).



Şekil 4-10. Kontrol grubuna ait femur kesitinin ışık mikroskopik görünüm (H&E ve MT)

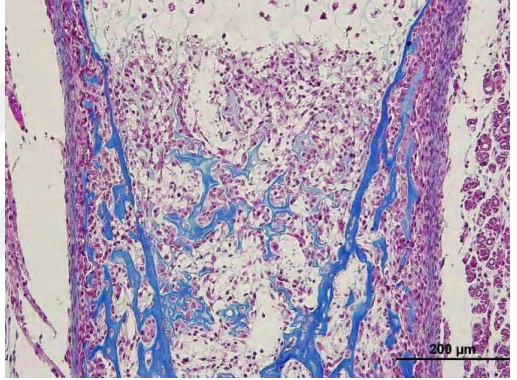
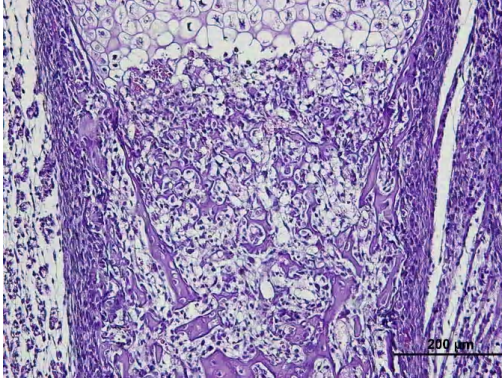
H&E

MT



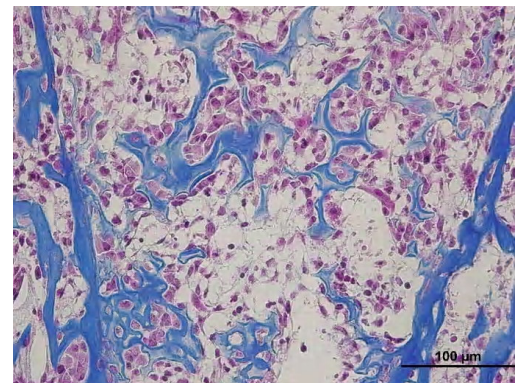
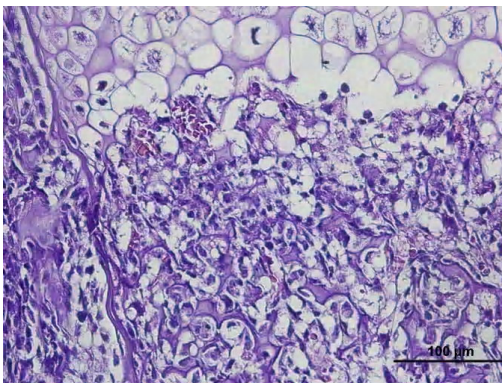
A; Mısır yağı (H&E; X10)

Mısır yağı (MT; X10)



B; Mısır yağı (H&E; X20)

Mısır yağı (MT; X20)



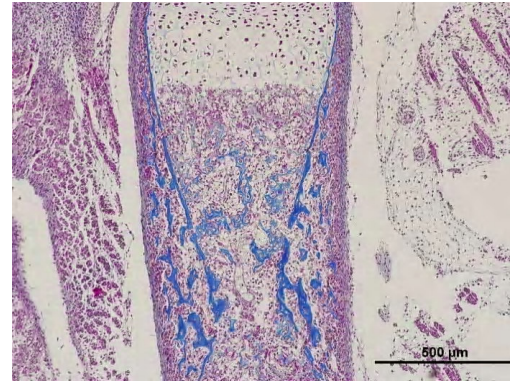
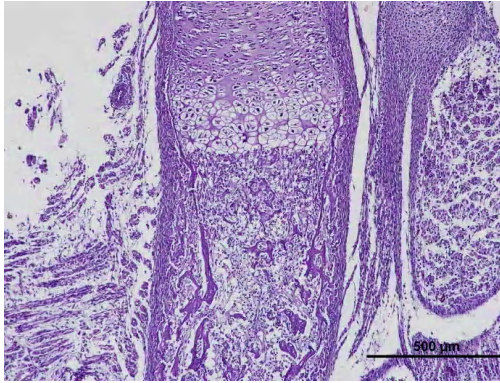
C; Mısır yağı (H&E; X40)

Mısır yağı (MT; X40)

Şekil 4-11. Mısır yağı grubuna ait femur kesitinin ışık mikroskopik görünüm (H&E ve MT)

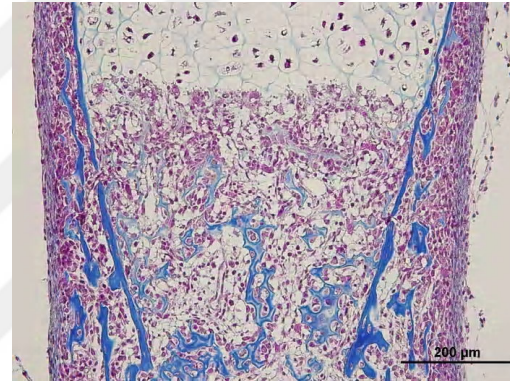
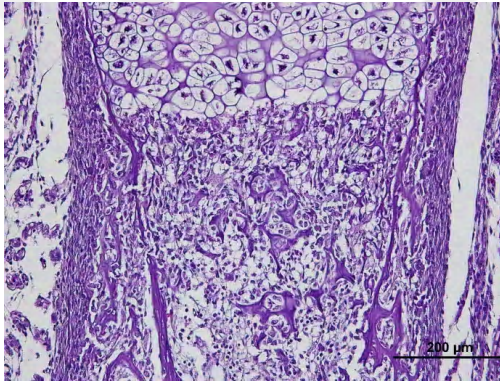
H&E

MT



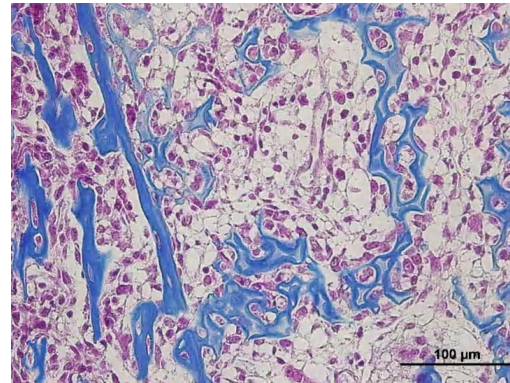
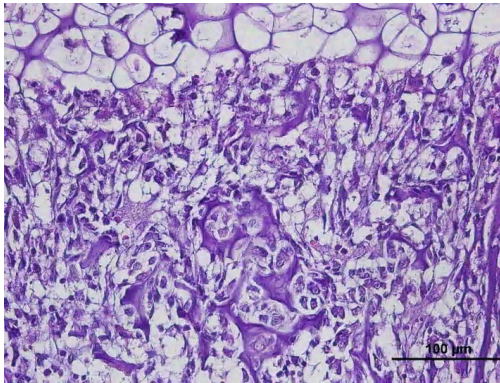
A; Curcumin (H&E; X10)

Curcumin (MT; X10)



B; Curcumin (H&E; X20)

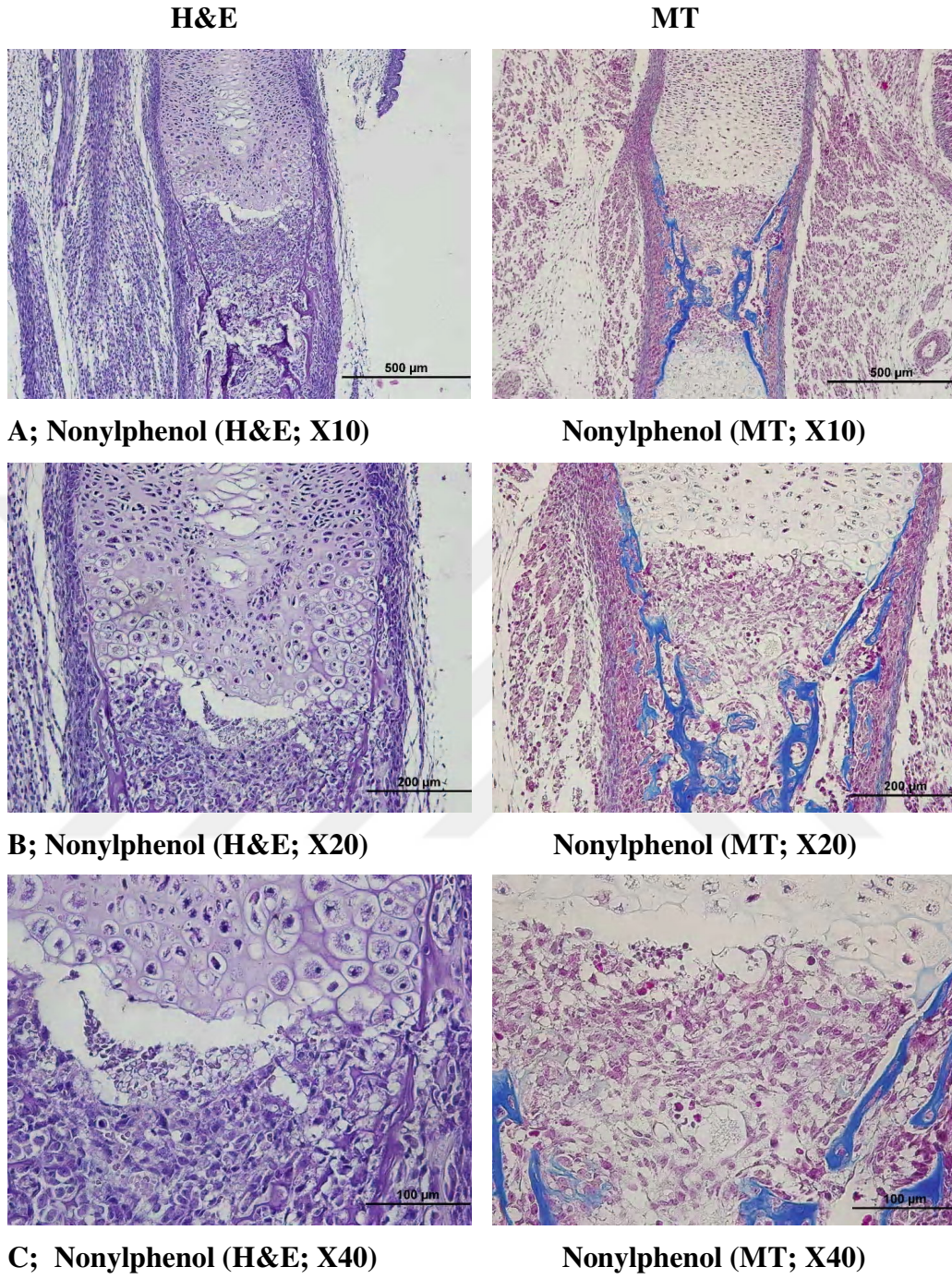
Curcumin (MT; X20)



C; Curcumin (H&E; X40)

Curcumin (MT; X40)

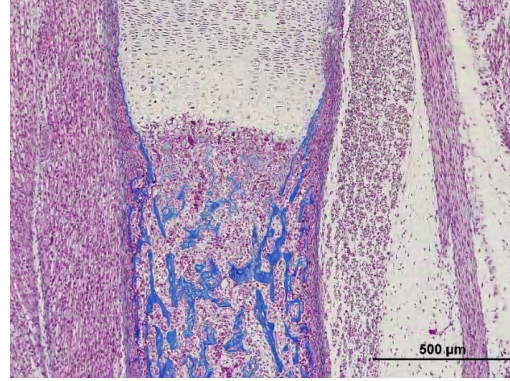
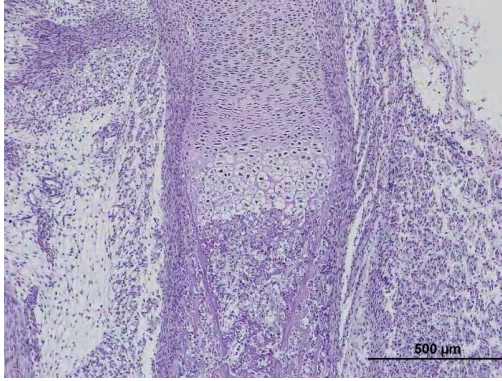
Şekil 4-12. Curcumin grubuna ait femur kesitinin ışık mikroskopik görünüm (H&E ve MT)



Şekil 4-13. Nonylphenol grubuna ait femur kesitinin ışık mikroskopik görünüm (H&E ve MT)

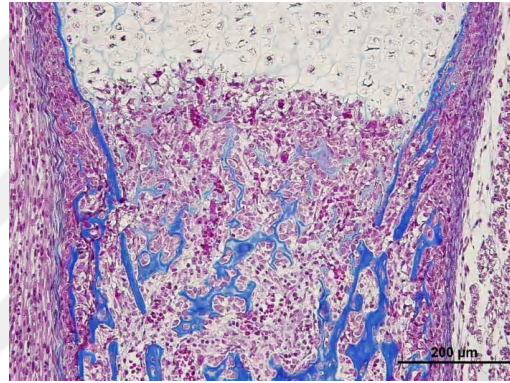
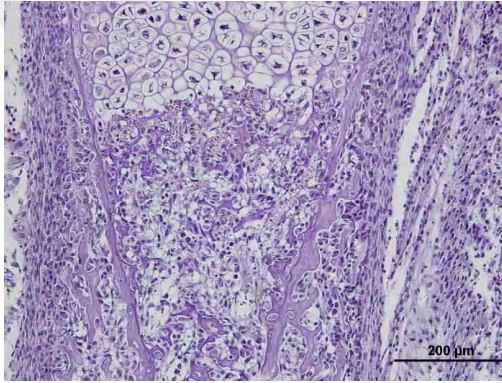
H&E

MT



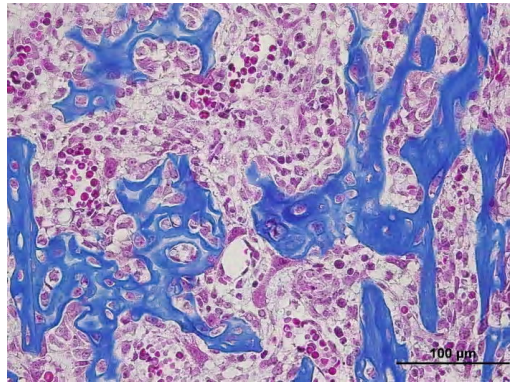
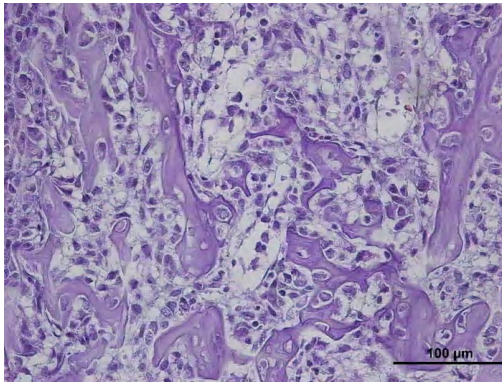
A; Curcumin+Nonylphenol (H&E; X10)

Curcumin+Nonylphenol (MT; X10)



B; Curcumin+Nonylphenol (H&E; X20)

Curcumin+Nonylphenol (MT; X20)



C; Curcumin+Nonylphenol (H&E; X40)

Curcumin+Nonylphenol (MT; X40)

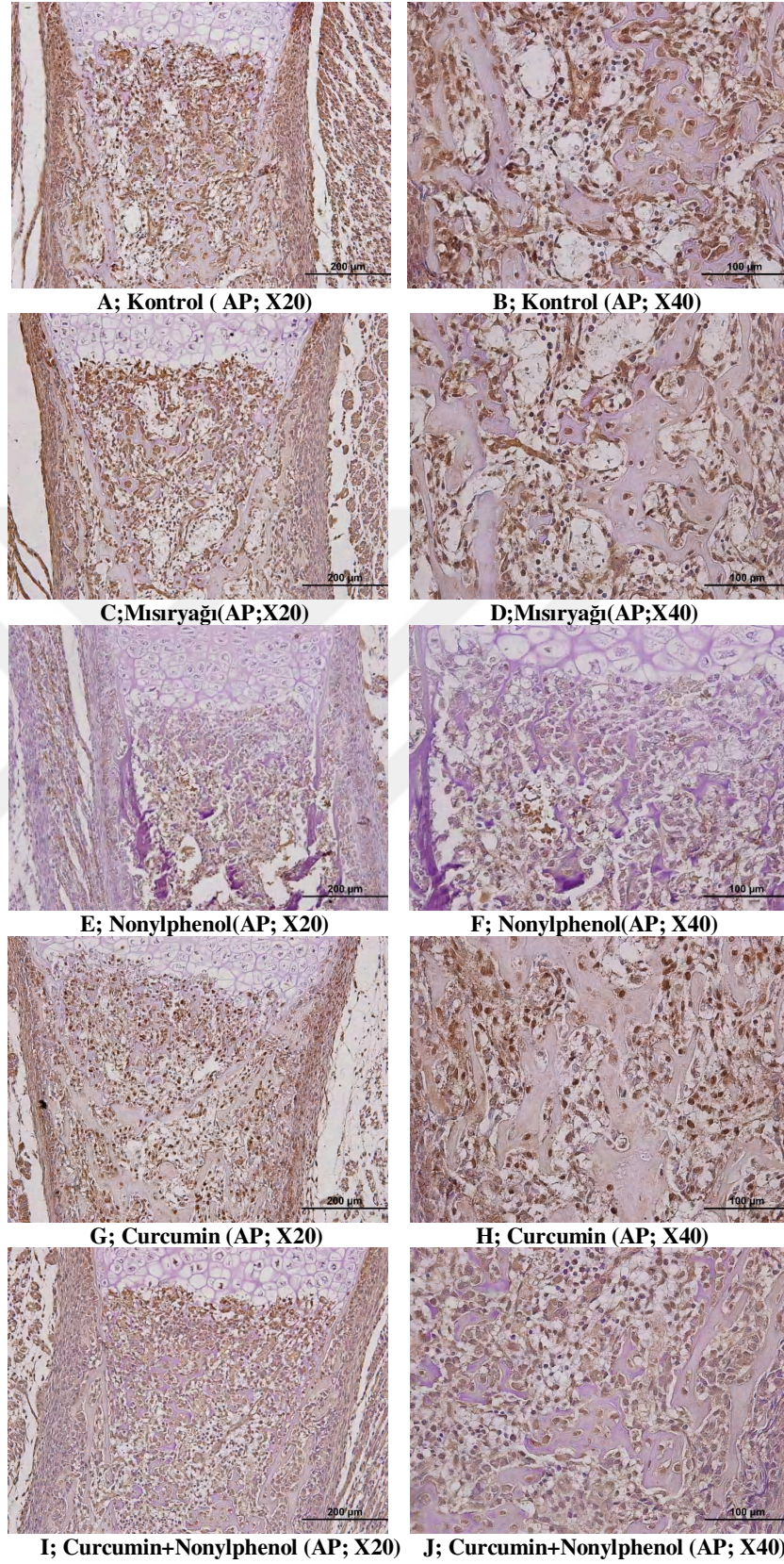
Şekil 4-14. Curcumin + Nonylphenol grubuna ait femur kesitinin ışık mikroskopik görünüm (H&E ve MT)

4.3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.3.2.1. Alkalın fosfataz (AP) İmmunoreaktivite Yoğunluklarına Ait Bulgular

Tüm deney gruplarına ait femur kesitlerinde kemikleşme bölgesindeki osteoblast aktivitesini değerlendirmek için AP immonureaktivite yoğunlukları belirlendi. Tüm gruplara ait kesitlerden alınan veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Kontrol grubuna ait İmmunohistokimya boyama metodunun uygulandığı femur kesitlerinde kemikleşme bölgesinde yoğun AP ekspresyonu mevcuttu. Kontrol grubundaki AP immonureaktivite yoğunluğu ile Mısır yağı ve sadece Curcumin uygulanan gruplarındaki AP immonureaktivite yoğunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$). Kontrol grubu ile sadece Nonylphenol uygulanan grup karşılaştırıldığında, kontrol grubunda Nonylphenol uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardı ($p<0.001$). Sadece Nonylphenol uygulanan gruba ait femur kesitlerinde AP immonureaktivite yoğunluğu tüm diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştı ($p<0.001$). Buna rağmen Curcumin + Nonylphenol uygulanan gruba ait femur kesitlerinde AP immonureaktivite yoğunluğu Nonylphenol uygulanan gruba göre anlamlı derecede artmıştı ($p<0.001$).

Curcumin + Nonylphenol uygulanan grupta AP immonureaktivite yoğunluğu hemen hemen aynı düzeyde olup Kontrol, Mısır yağı ve Curcumin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$) (Şekil 4-15) (Tablo 4-12). Çalışmanın sonuçları gebelik döneminde maruz kalınan Nonylphenol'ün kemik yapımından sorumlu osteoblastlar üzerinde yıkıcı etkiye sahip olarak kemikleşmeyi olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir.



Şekil 4-15. Kontrol (A: X20, B: X40), Mısır yağı (C: X20, D: X40), Nonylphenol (E: X20, F: X40), Curcumin (G:X20, H:X40) ve Curcumin + Nonylphenol gruplarına (I: X20, J: X40) ait immünohistokimyasal boyama uygulanmış preparatlarda kemikleşme görülen bölgedeki AP ekspresyonu

Tablo 4-12. Tüm gruplara ait AP ekspresyon yoğunluğu

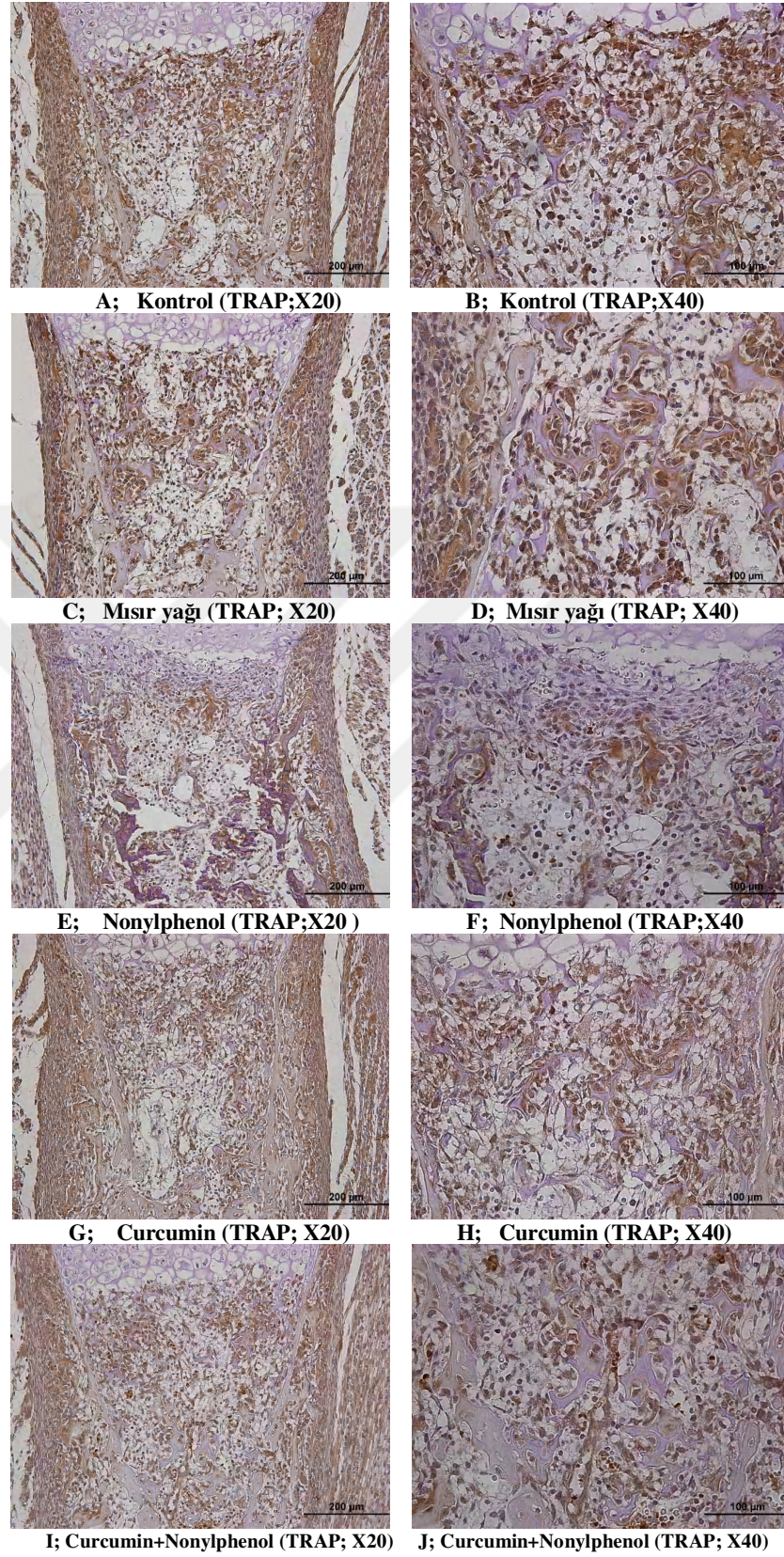
Değişken	Grup					p
	Kontrol (n=54)	Mısır yağı (n=54)	Nonylphenol (n=54)	Curcumin (n=54)	Curcumin+Nonylphenol (n=54)	
AP(Alkalinfosfataz)	81.31±3.70 ^a	80.11±6.30 ^a	75.50±7.20 ^b	83.02±5.96 ^a	81.62±6.30 ^a	<0.001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

4.3.2.2. Anti-Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) İmmunoreaktivite Yoğunluklarına Ait Bulgular

Çalışmanın bu bölümünde, tüm deney gruplarına ait femur kesitlerinde osteoklast aktivitesini belirlemek için kemikleşme bölgesinde Anti-Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) immunoreaktivite yoğunlukları hesaplandı ve elde edilen veriler ile gruplar arasında karşılaştırma yapıldı. Kontrol grubuna ait femur kesitlerinde TRAP immunohistokimya boyama metodu uygulanmış femur kesitlerinin immunoreaktivite sonuçlarına bakıldığında, sadece Nonylphenol grubuna göre anlamlı derecede yüksek immunorektivite yoğunluğu gösterdi ($p<0.001$). Kontrol grubu femur kesitlerinde TRAP immunoreaktivite yoğunluğu sadece Curcumin ve Curcumin + Nonylphenol uygulanan gruplara göre de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştı ($p<0.001$). Kontrol grubunda artmış TRAP ekspresyonu kemikleşme bölgesindeki osteoblast/osteoklast hücre dengesinin bir sonucu olarak düşünülmektedir. Tüm deney grupları içinde en düşük TRAP immunoreaktivite yoğunluğu sadece Nonylphenol uygulanan grupta gözlemlendi ve bu düşüş Kontrol, Mısır yağı, Curcumin gruplarındaki ekspresyon yoğunluklarına göre istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$). Curcumin + Nonylphenol uygulanan gruba ait femur kesitlerinde kemikleşme bölgesindeki TRAP immunoreaktivite yoğunluğu kontrol ve mısır yağı gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük iken ($p<0.001$), Nonylphenol uygulanan gruba göre yüksekti ancak veriler istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Curcumin + Nonylphenol uygulanan grup ile sadece Curcumin verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$) (Şekil 4-16) (Tablo 4-13).

Çalışmadan elde edilen bu verilere dayanarak, Nonylphenol'ün osteoklast aktivitesini de bozarak kemikleşme için gerekli olan hücresel dengeyi bozduğu ve kemikleşmeyi olumsuz yönde etkilediği, ayrıca Curcumin'in Nonylphenol'ün neden olduğu bu hasar üzerinde hücresel dengeyi düzelterek koruduğu söylenebilir.



Şekil 4-16. Kontrol (A: X20, B: X40), Mısır yağı (C: X20, D: X40), Nonylphenol (E: X20, F: X40), Curcumin (G: X20, H: X40) ve Curcumin + Nonylphenol (I: X20, J: X40) gruplarına ait immünohistokimyasal boyama uygulanmış preparatlarda kemikleşme görülen bölgedeki TRAP ekspresyonu

Tablo 4-13. Tüm gruplara ait TRAP ekspresyon yoğunluğu

Değişken	Grup					<i>p</i>
	Kontrol (<i>n</i> =54)	Mısır yağı (<i>n</i> =54)	Nonylphenol (<i>n</i> =54)	Curcumin (<i>n</i> =54)	Curcumin+Nonylphenol (<i>n</i> =54)	
TRAP	112.53±4.90 ^a	110.60±4.80 ^{ab}	106.04±4.70 ^c	109.50±5.32 ^b	109.10±7.04 ^{bc}	<0.001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde çevreye zarar veren kimyasalların üretimi ve kullanımı oldukça artmıştır. Bu kimyasallardan bazıları endokrin sisteme zarar vermektedir. Endokrin bozucu kimyasallardan en önemlilerinden olan alkilfenol etoksilat bileşikler (AFB); endüstride kullanılan iyonik olmayan yüzey aktif maddelerinin en yaygın ikinci grubu olarak bilinmektedir (126). AFB bunların parçalanma ürünü olan Nonylphenol (NF) ve oktilfenol (OP) ile endüstriyel alanda özellikle plastik malzemelerin üretiminde yaygın olarak kullanılan Bisfenol-A (BPA)'dır. Endokrin tahrip edici kimyasalların atıklarla ortama bırakılması çevresel kontaminasyonun en büyük nedenlerinden biridir. Arıtıma tabi tutulan atık sularda bu üç kimyasalın tamamen yok edilmesi söz konusu olmamaktadır (127). Alkilfenol bileşiklerinin organizmalarda östrojenik (71), kanserojenik (72), toksik (73) ve oksidatif stres oluşturunca (74) etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

Çevresel endokrin sistem bozucuları olarak da adlandırılan bu kimyasalların üreme sisteminde de olumsuz etkileri görülmektedir. Fetüs üzerinde doğrudan toksik etkilerinin yanında, hipotalamus, hipofiz veya gonadlar üzerinde birçok mekanizmalarla erkekte ve dişide üremeyi etkileyebilmektedir (128). Biz de çalışmamızda Nonylphenol'ün kemik gelişimi üzerine neden olduğu olumsuz etkileri ve bu değişimlere karşı bir antioksidan olduğu bilinen Curcumin'in olası koruyucu etkilerinin ikili boyama metodu kullanılarak belirlenmesi ve ışık mikroskopik bulgularla da desteklenmesini amaçladık.

Alkilfenolik bileşikler lipofilik özelliklerinden dolayı, balık gibi suda yaşayan canlılarda birikerek besin zinciri yoluyla biyolojik birikime uğramaktadır (129, 130, 131, 132). Doğada canlılarda ve insanlarda endokrin sistemi üzerinde tahrip edici etkisi birçok toksikolojik çalışma ile belirlenen bu kimyasalların ekosistemin sürekliliği için bir

tehlike oluşturduğu kesinlik kazanmıştır. Nonylphenol, Oktifenol ve Bisfenol A'nın sucul organizmalardaki biyolojik birikim miktarları ve toksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmıştır (133). İtalya'da yapılan bir çalışmada, haftada en az iki kez balık yediğini belirten kadınlardan alınan süt örneklerinde Nonylphenol, haftada bir kez balık yiyen kadınlara göre yüksek çıkmıştır. Deniz ürünleri tüketimi ile vücuda Nonylphenol alımı arasında önemli bir ilişki olduğu bu çalışmayla gösterilmiştir (134). Çakal ve Parlak (86) yaptıkları çalışmalarında, denizkestanesi embriyolarında Nonylphenol miktarını ölçmüşlerdir. Çalışmadan elde ettikleri sonuçlara göre, düşük miktarlardaki Nonylphenol konsantrasyonlarının iskelet sisteminde bozukluklara yol açtığını, yüksek konsantrasyonların ise mitozu engelleyerek erken yaşam dönemlerinde embriyo gelişimini engellediği gösterilmiştir. Nonylphenol'ün, yavaşta olsa insan plasentasına geçtiği tespit edilmiştir. Nonylphenol'ün, plasentayı geçerek, amniyon sıvısında ulaştığı belirlenmiştir (135). Gebelik döneminde Nonylphenol uygulanan ratlardan elde edilen fetuslar ile yapılan bir çalışmada Nonylphenol'ün yavru ratların davranışsal ve sinirsel gelişim bozukluklarına neden olduğu görülmüştür (136).

Nonylphenol'ün kemik metabolizması üzerine etkisini değerlendiren in vivo ve in vitro yapılan bir çalışmada, in vivo ortamda Nonylphenol'e maruz bırakılan gebe farelerin fetusları kontrol grubu ile kıyaslandığında göğüs kemiğinde kemikleşmesinin hızlandığı, aynı zamanda in vitro deneylerde osteoklast oluşumunu engellediği sonucuna varılmıştır (137). Nonylphenol'ün karaciğer toksitesine ve oksidatif strese sebep olduğunu gösteren başka bir çalışmada, Nonylphenol 5, 25 ve 125µg/kg verilmiş, serum alkalın fosfatazı arttırmış, karaciğer hasarına sebep olmuş ve HO1 ve Gadd45b gen ekspresyonunu arttırabildiği ve oksidatif stres aracılığı ile karaciğer üzerine toksik etkileri değiştirebildiği belirlenmiştir (138). Nonylphenol ile yapılan başka bir çalışmada, gebeliğin 14. gününden 19. gününe kadar oral yolla yer fıstığı yağında çözdürülmüş 20, 40, 80 ve 200 mg/kg dozlarda Nonylphenol verilmiş. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 80 ve 200 mg/kg Nonylphenol dozunda dalak ve timüs ağırlığının azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca 200 mg/kg Nonylphenol verilen grupta; Nonylphenol, murin dalak lenfosit kültürünün proliferatif cevabını baskıladığı ve Nonylphenol'ün immün organ ağırlığını azalttığı gözlemlenmiştir. Çalışmada, Nonylphenol plasenta bariyerini geçtiği, 200mg/kg dozda Nonylphenol'ün immün organların normal gelişimini ve F₁ yavruların immün hücre fonksiyonunu engellediği belirtilmiştir (139). Nonylphenol, erkek ratlarda spermatogeneze zarar verirken, epididimal sperm üzerinde de toksik etki göstermektedir

(140). Yapılan bir çalışmada gebeliğin 9. gününden 15. gününe kadar gavaj ile 50, 100 ve 200 mg/kg nonylphenol verilen 1. grup ve gebeliğin 14. gününden 19. gününe kadar 20, 40, 80 ve 200 mg/kg Nonylphenol verilen 2. grup oluşturulmuştur. Çalışmada, 200 mg/kg Nonylphenol dozda öğrenme ve hafıza fonksiyonları azaldığı, 80 ve 200 mg/kg Nonylphenol'ün ise uterustaki canlı yavrusunu azaltmasının yanı sıra testis ve prostat ağırlığını, ALP aktivitesini, plasma testosteron konsantrasyonunu, epididimisteki sperm kuyruk sayısını ve günlük sperm üretimini azalttığı gösterilmiştir. Histopatolojik incelemelerde ise yüksek doz Nonylphenol de seminifer tübüllerin lümeninde anormal spermetazoa görülmüştür (141). Nonylphenol uygulanan bir başka çalışmada ratlarda ovaryum ağırlığının, ovaryum ve korteks hacminin, antral ve graff follikül sayılarının azaldığı; atretik follikül sayısının ise arttığı belirlenmiştir (142). Tüm çalışmalar Nonylphenol'ün birçok sistem üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğunu göstermektedir. İkili iskelet boyama, embriyonik ve postnatal dönemde teratojenik araştırmaların çoğunda kullanılan önemli bir metottur (143). Bu boyama tekniği ile fetusların iskelet sisteminin gelişim düzeyleri belirlenebilmektedir (144, 145). Hill ve ark. (146) ikili iskelet boyama tekniğini ilk kullanan araştırmacıyı Belchier (1735–1736) olarak ifade etmişlerdir. Belchier, halk arasında *Madder plant* ismiyle bilinen bitkinin köklerini toz haline getirip hayvanların yemlerine karıştırarak kemiklerin kırmızıya boyandığını saptamıştır. Ancak, deney hayvanlarına ait fetusların embriyolojik dönemde iskeletlerinin büyük bir bölümü kıkırdaktan meydana gelmektedir. Bu nedenle kemiğin tek başına boyanması ile elde edilecek sonuçların güvenilir olmayacağı anlaşılmıştır. Bunun üzerine iskeletin hem kıkırdak hem de kemik bölümlerinin boyanmasını sağlayacak yeni teknikler geliştirilmiştir (147,148). Bu bağlamda çalışmamızda da kullandığımız, iskeletin kemik kısımlarının Alizarin red S, kıkırdak kısımlarının ise Alcian blue ile boyandığı Inouye'un metodu ortaya çıkmıştır (149). Literatürde bu metot kullanılarak teratojenik maddenin iskelet sistemi üzerinde oluşturduğu hasarların tespit edildiği ve kemik kıkırdak oranlarının ölçülerek değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur (143, 150, 151, 152). Biz çalışmamızda, 50 µl dozda Nonylphenol'ü mısır yağında çözerek gebe ratlara gavaj yoluyla gebeliklerinin 20. gününe kadar uyguladık ve iskelet sistemi gelişimi üzerine etkilerini ikili boyama ve immunohistokimya boyama metodu ile gösterdik. Çalışmada, Nonylphenol grubuna ait fetuslardan alınan ön ekstremit (clavicula, scapula, humerus, radius ve ulna kemikleri) ve arka ekstremit (femur, tibia ve fibula) kemiklerinde kemikleşmenin kontrol gruplarına göre anlamlı

düzeyde azaldığı sonucuna vardık. İmmunohistokimyasal bulgularımız ikili boyama sonuçlarını destekler şekildeydi ve tüm deney gruplarına göre en az AP ve TRAP ekspresyonu nonylphenol grubunda görüldü. Bu sonuçlar nonylphenol'ün birçok sistem üzerinde olumsuz etkiye sahip olmasının yanı sıra, gebelik döneminde maruz kalınması durumunda iskelet sisteminin gelişimini de olumsuz yönde etkilediği ve kemikleşmeyi geciktirdiğini göstermektedir.

Curcumin'in çeşitli hastalıklar için tedavi edici bir ajan olarak etkili olduğu bulunduğundan bu zamana kadar, oldukça popüler bir hale gelmiştir (153, 154). Anti-oksidan, anti-kanserojen, anti-inflamatuar, anti-alerjik, anti-demans etkileri ve serbest radikal toplayıcısı olduğu yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir (120,121,122,155). Ayrıca, Curcumin'in yüksek dozlarda alındığında bile toksik etkisi olmadığı bildirilmiştir (156). Curcumin'in rat ovaryumunda meydana gelen iskemi reperfüzyon yaralanmaları üzerinde önemli koruyucu etkisi gözlenmemiştir (157).

Tüm bu bilgiler, Nonylphenol'ün fetal gelişim sürecinde kemik gelişimi üzerine oluşturduğu toksik etkileri üzerine Curcuminin koruyucu etkiler üstlenebileceğini düşündürdü. Literatürdeki Nonylphenol ve Curcumin ile ilgili yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak deney gruplarına uygulanacak dozlar ayarlandı ve buna göre çalışmamızda 100 mg/kg Curcumin, 50 µl NF, 100 mg/kg Curcumin + 50 µl NF, 150 µl mısır yağı verilen gruplar ve kontrol grubu oluşturuldu. Belirtilen Nonylphenol, Curcumin ve Mısır yağının uygun dozlarda uygulanması için gavaj yöntemini uygun gördük. Sıçanların embriyonik gelişimi ile ilgili olarak literatüre bakıldığında, gebeliğin yaklaşık 9. veya 10. günlerinde organların; 10.5 günlük bir rat embriyosunda ise kas-iskelet sistemi gelişiminin başladığı bildirilmektedir (158, 159).

Literatürde incelemelerimize dayanarak Nonylphenol ve Curcumin'in kemik gelişimi üzerine etkilerini inceleyen ikili iskelet boyama yöntemi ile yapılmış yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bundan dolayı biz çalışmamızda, Nonylphenol'ün kemik gelişimi üzerine etkilerini ve Curcumin'in koruyucu etkisini ikili iskelet ve immünohistokimyasal boyama yöntemleri ile inceledik. Çalışmada ilk olarak, tüm deney gruplarına ait fetusların ağırlıkları ve plasenta ağırlıkları tartılarak hesaplandı. Buna göre en düşük ağırlıklara sahip olan grup, Nonylphenol grubu olup bu düşüş kontrol ve diğer gruplarla kıyasladığımızda anlamlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca fetusların baş-kıç, biparietal uzunluk ve occipito-frontal uzunlukları gruplar arasında

karşılaştırıldığında, Nonylphenol grubunda diğer gruplara kıyasla azaldığı, Curcumin + Nonylphenol grubunda ise hemen hemen kontrol grubuna yakın olduğu görülmüştür. Elde ettiğimiz bu veriler ışığında, uygulanan Nonylphenol dozunun fetuslar üzerine toksik etki oluşturduğu kanısındayız.

Çalışmamızda, fetuslara ait ön ve arka ekstremitelerdeki kemiklerinin ikili iskelet boyama tekniği ile kemik uzunluğu yüzdesi ve kemikleşme alanının yüzdesi hesaplanmıştır. Ön ekstremitelerdeki kemikler olan clavicula, scapula, humerus, radius ve ulna kemiklerinde yapılan tüm ölçüm sonuçlarında en düşük kemik uzunluğu yüzdesi ve kemikleşme alanının yüzdesi değerleri Nonylphenol grubuna aitti. Curcumin + Nonylphenol grubunda ise ön ekstremitelerdeki kemiklerindeki kemik uzunluğu yüzdesi ve kemikleşme alanının yüzdesi değerleri neredeyse kontrol grubuna yakındı. Curcumin + Nonylphenol grubu ön ekstremitelerdeki kemiklerinde görülen kemikleşme değerlerindeki bu artış, Nonylphenol'ün neden olduğu toksik etkiye karşı Curcumin'in koruyucu rolünü göstermektedir.

Çalışmada benzer sonuçlar, ikili iskelet boyama metodu uyguladığımız arka ekstremitelerdeki kemikler olan femur, tibia ve fibula kemiklerinde de gözlemlendi. Nonylphenol uygulanan gruba ait arka ekstremitelerdeki kemiklerindeki kemik uzunluğu yüzdesi ve kemikleşme alanının yüzdesi değerleri tüm diğer gruplar ile kıyaslandığında anlamlı derecede düşüktü. Curcumin + Nonylphenol grubunda ise Nonylphenol grubuna göre arka ekstremitelerdeki kemiklerindeki kemik uzunluğu yüzdesi ve kemikleşme alanının yüzdesi değerleri artmıştı ve neredeyse kontrol grubuna yakındı. Mısır yağı ve sadece Curcumin uygulanan gruplardan elde edilen veriler kontrol grubuna benzerdi. İkili boyama metodu uygulayarak elde ettiğimiz arka ekstremitelerdeki kemiklerine ait kemik uzunluğu yüzdesi ve kemikleşme alanının yüzdesi değerleri, Nonylphenol'ün neden olduğu toksik ve azalan kemikleşme etkilerine karşı Curcumin'in koruyucu rolünü göstermektedir.

Nonylphenol yapay bir östrojen olmasına rağmen tipik olarak östrojen gibi davrandığı gözlemlenmiştir (160). Çoğu çalışma, östrojenin osteoklastogenezisi önlediğini ayrıca osteoblastların farklılaşmasını başlattığını göstermiştir (161, 162). Buna ek olarak endokrin bozucu kimyasalların deney hayvanları ve insanlarda üreme, sinir, bağışıklık ve iskelet sistemleri üzerine direkt etki gösterdikleri bildirilmiştir (163, 164). Bu nedenle çalışmamızda, endokrin bozucu kimyasallardan olan Nonylphenol'ün fetal kemikleşme üzerindeki doğrudan etkisini AP ve TRAP ekspresyon yoğunluğu açısından

değerlendirmek için fetüslara ait femur kesitlerinde immünohistokimya boyama yöntemi kullanıldı.

Kemik yapımının metabolik belirleyicilerinden AP, kemik döngüsünün yapım aşamasında osteoblastlar tarafından çok yüksek konsantrasyonlarda üretilmektedir. AP, genel kemik yapımı hakkında iyi bir fikir vermektedir (165, 166). Kemik yıkımının metabolik belirleyicilerinden olan TRAP ise, aktif kemik yıkımı esnasında osteoklastlardan salgılanmaktadır. TRAP osteoklastlarda büyük miktarlarda bulunmaktadır ve kemik rezorpsiyonunda ortaya çıkmaktadır (167, 168). Normal kemik döngüsünde osteoblastlar ve osteoklastlar arasında denge söz konusudur (169).

Kontrol grubuna ait femur kesitinin ışık mikroskopik incelemesinde, femur'un epifiz bölgesinde endokondral kemikleşmenin gösterdiği 5 farklı bölge net olarak ayırt edilebilmekteydi. Mısır yağı ve sadece Curcumin uygulanan gruplara ait femur kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, endokondral kemikleşme bölgelerinin kontrol grubu ile aynı morfolojik özelliklere sahip olduğu ve kemikleşmenin 5 bölgesinin de ayırt edildiği görüldü. Nonylphenol uygulanan gruba ait femur kesitlerinde ise, kemikleşme bölgelerindeki hücre yoğunluklarında kontrol grubuna göre daha az olduğu ve özellikle hipertrofi bölgesindeki kondrositlerin sayısının azaldığı dikkati çekti. Çalışmadan elde edilen histolojik bulgulara göre, Nonylphenol'ün toksik etkiye sahip olduğu ve kemikleşmeyi geciktirdiği açıktı. Curcumin + Nonylphenol uygulanan gruba ait femur kesitlerinin kemikleşme bölgelerinde Nonylphenol grubuna göre belirgin bir düzelmenin olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızda immünohistokimyasal boyama metodu uygulanan deney gruplarına ait femur kesitlerinde AP ekspresyonunun en düşük olduğu grup Nonylphenol grubuydu. Nonylphenol uygulanan gruba ait femur kesitlerinde kemikleşme bölgesinde kontrol grubu ve diğer gruplar ile kıyaslandığında anlamlı bir azalmanın olduğu belirlendi. Bu durum Nonylphenol'ün osteoblast aktivitesini azaltarak kemikleşmeyi olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Curcumin + Nonylphenol grubunda ise AP ekspresyonu Nonylphenol uygulanan gruba göre anlamlı derecede artmıştı.

TRAP uygulanan preparatlarda ise TRAP immunoreaktivite yoğunluğunun Nonylphenol grubunda kontrol ve diğer deney gruplarına göre azaldığı gözlemlendi. Nonylphenol grubuna ait TRAP ekspresyon yoğunluğu ortalaması 106.04 ± 4.70 iken kontrol grubunda 112.53 ± 4.90 ve Curcumin grubu ortalaması 109.50 ± 5.32 olarak

hesaplandı. Bu sonuçlara dayanarak Nonylphenol tarafından kemik yapım ve yıkımının etkilendiği görüldü. Normal bir kemik yapısında osteoblast ve osteoklastların aktiviteleri denge halinde olmasına rağmen Nonylphenol grubunda bu dengenin bozulduğu, kemik gelişiminin olumsuz etkilendiği ve nonylphenol'e maruz kalan fetusların osteoklast ve osteoblast aktivitesini azalttığı ve neticede iskelet sistemi gelişiminin olumsuz etkilendiği söylenebilir. Çalışmanın immunohistokimyasal bulgularına göre, Nonylphenol'ün neden olduğu tüm bu toksik etkilere karşı Curcumin'in koruyucu bir rol üstlendiği de söylenebilir.

Endokrin tahrip edici kimyasallar; hem doğal yaşam için hem de insan sağlığı için tehdit oluşturan, alkilfenolik bileşikler ve bunların parçalanma ürünleri olan Nonylphenol, Oktifenol ve Bisfenol-A'nın ülkemizde geniş alanlarda kullanımı söz konusudur. Toksik etkisi düşünüldüğünde alkilfenolik bileşiklerin yakın sürede kullanımlarının sınırlandırılması gerekmektedir. Bu tedbirlerin alınabilmesi için daha önceden yapılmış literatürler doğrultusunda yeni prosedürler geliştirilmelidir. Ayrıca, içme sularında ve gıdalarda bulunan bu bileşiklerin seviyeleri tespit edilmeli ve sınırları belirlenmelidir. Sonuç olarak çalışmamızda, Nonylphenol'e maruz kalan gebe ratlara ait fetusların ön ve arka ekstremitelerde kemikleşme uzunluğu yüzdesi ve kemikleşme sergileyen bölge alanı yüzdesi oranının azalması, baş-kıç, biparietal ve frontal occipital uzunluktaki kısalmalar, fetüs ve plasenta ağırlığında azalmalar, gebe rat ağırlığının her grubun kendi içindeki ve grupların 20. gündeki tartım anlamlılığı ve Curcumin'in iyileştirici etkisi hem ikili iskelet boyama tekniği hem de immunohistokimya yöntemiyle ayrı ayrı ortaya konuldu. Yapmış olduğumuz çalışmada Nonylphenol grubuna ait tüm fetuslarda Curcumin + Nonylphenol ve tüm diğer gruplara göre kemikleşmeyi anlamlı düzeyde azalttığı ve Nonylphenol'ün bu toksik etkisine karşı Curcumin'in koruyucu role sahip olabildiği gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan ikili iskelet boyama ve immunohistokimya boyama metodlarından elde edilen sonuçlar birbirini desteklemekteydi. Buna göre çalışmada Nonylphenol'ün kemik metabolizmasını olumsuz yönde etkilediği, kemik yapım-yıkım aşamalarını geciktirdiği Curcumin'in ise bu toksik etkiyi düzelttiği sonucuna varıldı.

6. KAYNAKLAR

1. İkizoğlu E, Haskök S. Tehlikeli Kimyasalların Çevresel Etkileri İçin Risk Değerlendirme Örneği: Endokrin Sistemi Bozan Kimyasallar <http://www.cevremuhendisleri.com/articles.asp> (Erişim tarihi 11.11.2017)
2. Erdin E, Alten A, Hegemann W, Emiralioglu A. Endokrin Madeler Ve Çevresel Etkileri.I Ulusal Çevre Kongresi, 13-15 Ekim 2004.Sivas.
3. Nimrod A.C, and Benson W.H. Environmental estrogenic effects of alkylphenol etoxylates.Crit.Rev.Toxicol, 1996;26:335-364
4. Yeşilkaya E. Endokrin Bozucular. Güncel Pediatri Dergisi 2008; 6: 76-82.
5. Jacobsen P.R, Christiansen S, Boberg J, Nellemann C, Hass U. Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats. International Journal of Andrology 2010; 33: 434-442.
6. Lee M.M. Endocrine Disrupters. A Current Review of Pediatric Endocrinology 2007; 109-18
7. Ahel M, Giger W, and Koch M, Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment.1. Occurence and transformation in sewage treatment. Water Res 2006;28:1131 -1142
8. Hawerlak M, Bennet E. and Metcalfe C. The environmental fate of the primary degradation products of alkylphenol ethoxylate surfactants in recycled paper Sludge.Chemosphere 1999;39:745 -752
9. Tapiero H. and Tew K.D. Estrogens and evironmental estrogens. Biomed Pharmacother 2002;56:36 -44

10. Hughes P.J, Mcellan H, Lowes D.A, Khan S.Z, Bilmem J.G, Tovey S.C, Godfrey R.E, Michell R.H, Kirk C.J, Michelangeli F. Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic retikulum Ca pumps. *Biochem.Biophy.Res.Commun* 2000;277:568-574
11. Jobling S, Sheahan D, Osborne J.A, Matthissen P. and Sumpter J.P. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Onchornychus mykiss*) exposed to estrogenic alkyphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem* 1996;152:194-202
12. Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, et al. Urinary concentrations of Bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 2005; 113:391-395
13. Björnsson BT, Haux C, Bern HA, et al. 17 β -Estradiol increases plasma calcitonin levels in salmonid fish. *Endocrinology* 1989; 125:1754-1759.
14. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; 241:84-86
15. Okazaki R, Inoue D, Shibata M, et al. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology* 2002; 143:2349-2356
16. Toppari J, LArsen J, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette JR L, Jegou B, Jensen T, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan Z, Meyer O, Muller J, Rajpert-De-Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek N. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspec* 1996;104: 741-803.
17. Bigsby R, Chapin R.E, Daston G.P. Evaluating the effectsof endocrine disruptors on endocrine function duringdevelopment. *Environmental Health Perspect*, 1999; 107: 613-618.
18. Akpolat M, Topçu T. Y, Kanter M. Protective Effects of Curcumin and Vitamin C on Ionizing Radiation-Induced Morphological Destruction of Intestinal Mucosa in Rats. *TAD* 2008; 6:77 -85.

19. Aggarwal B, Bhatt ID, Ichikawa H, Ahn KS, Sethi G, Sandur SK et al. Curcumin Biological and Medicinal Properties. 7034_bookfm 2006; 297-367.
20. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer 2005; 41: 1955-1968.
21. Miquel J, Bernd A, Sempere JM, Diaz-Alperi J, Ramirez A: The Curcuma Antioxidants: Pharmacological Effects and Prospects for Future Clinical Use. Arch Gerontol Geriatr 2002; 34:37-46
22. Thiagarajan M, Sharma SS: Neuroprotective Effect of Curcumin in Middle Cerebral Artery Occlusion Induced Focal Cerebral Ischemia in Rats. Life Sci. 2004; 74:969-85
23. Thakam A, Seawan N. Antioxidant activities of curcumin-metal complex. Thai Journal of Agricultural Science 2011; 44:188-193.
24. Azuine MA, Bhide SV. Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. Nutrition and Cancer 1992; 17:77-83.
25. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, et al. Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi. Gökbel H. (Edt), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2015: ss 385-388.
26. Junqueira, L.C. and Carneiro, J. Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitabevleri (Çeviri: Aytekin, Y, Solakoğlu, S.), İstanbul, 2006;141–154.
27. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S. (Edt), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006: ss 142-156.
28. Human structure virtual histology, web.sitesi
https://vmicro.iusm.iu.edu/hs_vm/docs/lab2_8.htm (27/02/2018)
29. Gökçimen A. Kemik Dokusu. İçinde: Genel Tıbbi Histoloji. 60, Isparta: S.D.Ü. Basımevi, 2006; ss 89-101.
30. Erdoğan D, Hatipoğlu M, Görgün M. ve Ilgaz C. Genel Histoloji, Hatipoğlu Yayın Evi, Ankara,1999; 107–117s.
31. Sikavitsas V.I, Temenoff J.S. and Mikos A.G. Biomaterials and bone mechanotransduction. Biomaterials 2001; 22: 2581–2593.

32. Ackermann U. Pretty Darned Quick Fizyoloji. Alican İ. (Edt), İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2006: ss 498-505.
33. Desai B, Rogers ML, Chellaiah MA. Mechanisms of osteopontin and CD44 as metastatic principles in prostate cancer cells. *Molecular Cancer* 2007; 6: 1-16.
34. Gordjestani M, Dermaut L, De Ridder L, Thierens H, De Waele P, De Willy W, Bosman F. Osteopontin and bone metabolism: a histology and scintigraphy study in rats. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 2005; 34: 794-799.
35. Kurban S, Mehmetoğlu İ. Osteoprotegerin, rank ve rankl ligandı. *Türk Biyokimya Dergisi* 2007; 32: 178-184.
36. Babür C, Özcan G. Opg/rank/rankl'ın periodontolojideki yeri. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2010; 27: 137-144.
37. Ansiklopedik Tıbbi Doküman: Kemik Doku web.sitesi
<http://tipwiki.blogspot.com.tr/2012/12/kemik-doku.html> (27/01/2018)
38. Unur E, Ülger H, Ekinci N. *Anatomi. Kivılcım Kitapevi, Kayseri*, 2014: ss 7-11.
39. Ultrastructure of bone web sitesi <http://teachmeanatomy.info/the-basics/ultrastructure/bone/> (27/02/2018)
40. Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human. Clinically Oriented Embryology* 1993; 5th ed. Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company.
41. Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 2000; 22:138-47.
42. Hickok NJ, Haas AR, Tuan RS. Regulation of chondrocyte differentiation and maturation. *Microsc Res Tech* 1998; 43:174-90.
43. Webb J.C.J. and Tricker J. A Review of Fracture Healing, *Current Orthopaedics*, 2000;14: 457–463.
44. Young B. and Heath J.W. *Wheather's Functional Histology* 4th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 2000;142-151.
45. Bancroft J.D, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th ed. Churchill Livingstone, Newyork, Chapter 1996;15: 309-339.

46. Cotran R.S, Kumar V, Robbins S.L. Robbin's pathologic basis of disease.1999; 6th ed. WB Saunders Co, London.
47. Gartner L.P, James LH. Color Atlas of Histology, 2000;3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Chapter 4, 73.
48. Kierszenbaum AL. Histology and cell biology (Histoloji ve hücre biyolojisi). Çevirmen: Demir R. Palme Yayıncılık, Ankara, 2006; 113–117
49. WEB_9. (2016). Kenyon College web sitesi <http://biology.kenyon.edu/courses/biol10/110pdfs/8skeleton.pdf> (25/11/2016).
50. Wingerd DB. Rat Dissection Manual. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1988: pp 5-10.
51. Hebel R, Stromberg MW. Anatomy and embryology of the laboratory rat. BioMed Verlag. Worthsee 1986; 9-21:231-251.
52. Olude MA, Olopade JO, Akinloye AK, et al. Macro-anatomical investigations of the skeletons of the African giant rat (*Cricetomys gambianus* Waterhouse 1840) II: Fore limb. Eur J Anat 2010; 14:19-23
53. Özkan ZE. Macro-Anatomical Investigations on the Forelimb Skeleton of Mole-Rat (*Spalax leucodon* Nordmann). Veterinarski Arhiv 2002; 72:91-99
54. Olude MA, Olopade JO, Mustapha OA. Macro-anatomical investigations of the skeletons of the African giant rat (*Cricetomys gambianus* Waterhouse): Pelvic limb. Eur J Anat 2009; 13:127-131
55. Salami SO, Onwuama KT, Byanet O, et al. Morphological studies of the appendicular skeleton of the African giant pouched rat (*Cricetomys gambianus*) part (ii) pelvic limb. et al. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health 2011; 3:88-93
56. Ross MH, Pawlina W. Histology: A text and atlas 6/E (Histoloji konu anlatımı ve atlas). Çevirmen: BAYKAL B, 6. baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 2013; 198–208
57. Junqueira's Anthony L. Mescher, Temel Histoloji. Solakoğlu S. (Edt), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2015: ss 133.

58. Washington State University VPh 308 – Histology, web sitesi <http://undergraduate.vetmed.wsu.edu/courses/vph-308/histology/lab-3-histology-cartilage/cartilage-elastic-cartilage> (Erişim tarihi 11.12.2017)
59. Nimrod A.C, Benson W. H. Environmental estrogenic effects of alkylphenol etoxylates. *Crit Rev Toxicol* 1996; 26:335-364.
60. Warhurst A.M. “An Environmental Assessment of Alkylphenol Ethoxylates and Alkylphenols.” 1995
61. Uğuz C, Iscan M, Erguven A. and Togan I. The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effects on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Environmental Research* 2003; 92:262- 270.
62. Tubau I, Vázquez-Suñé E, Carrera J, González S, Petrovic M, López De Alda M. J, Barceló D. Occurrence and fate of alkylphenol polyethoxylate degradation products and linear alkylbenzene sulfonate surfactants in urban ground water: Barcelona case study. *Journal of Hydrology* 2010; 383: 102–110.
63. Cox C. Nonylphenol and related chemicals. *Journal Of Pesticide Reform* 2003;16:4
64. Mao Z, Zheng X. F, Zhang Y. Q, Tao X. X, Li Y, Wang W. Occurrence and biodegradation of nonylphenol in the environment. *Int. J. Mol. Sci* 2012; 13: 491-505.
65. Mehtonen J, Munne P. Measures for emission reduction of nonylphenol (NP) and nonylphenol ethoxylates (NPE) in the Baltic sea area. *Cohiba Guidance Document* 2011; 6: 5-7.
66. Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester J.N. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 2008; 34: 1033–1049.
67. Talmage S.S. Environmental and human safety of major surfactants: alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates. The Soap and Detergent Association. Lewis Publishers Boca Raton Ann Arbor London, Tokyo 1994.
68. Groves M.J, Mustafa R.M, Carless J.E. Some properties of a water soluble phosphated nonylphenol ethoxylate. *J Pharm Pharmacol* 1972; 24,104-110.

69. Miyamoto J, Klein W. Natural and anthropogenic environmental estrogens: The scientific basis for risk assesment. *Pure & Appl Chem* 1998; 70:1829-1845
70. Arukwe A, Thibaut I, Celius, Goksoyr A, Cravedi J.P. In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicol* 1999; 49:289-304.
71. Jobling S, Sheahan D, Osborne J.A, Matthissen P, Sumpter J.P. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 1996;152:194–202.
72. Legler J. Development of a stably transfected estrogen receptor mediated luciferase reporter gene assaying the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol Sci* 1999; 48: 55-56.
73. Hughes P.J, Mclellan H, Lowes D.A, et al. Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps. *Biochem Biophy Res Commun* 2000;277:568-574.
74. Okai Y, Sato E. F, Higashi-Okai K, Inoue M. Enhancing effect of the endocrine disruptor para-nonylphenol on the generation of reactive oxygen species in human blood neutrophils. *Environmental Health Perspectives* 2004;112:553-556.
75. Bragadin M, Perin G, Iero A, Manente S, Rizzoli V, Scutari G. An in vitro study on the toxic effects of nonylphenols in mitochondria. *Chemosphere* 1999; 38:1997-2001.
76. Christensen L.J, Korsgaard B, Bjerregaard P. The effect of p-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. *Aquatic Toxicology* 1999;46:211-219.
77. Bloom A, Ekman E, Johannisson A, Norrgren L, Pesonen M. Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line. *Arch Environ Contam Toxicol* 1998; 34:306-310
78. Skakkebaek N.E, Meyts E.R.D, Jorgensen N, et al. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica (APMIS)* 1998; 106:3–11.

79. Malins D.C, Gunselman S.J. Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Gas Chromatography-mass spectrometry reveal a remarkable degree of structural damage in the DNA of wild fish exposed to toxic chemicals. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:13038-41.
80. Roy D, Palangat M, Chen C, et al. Biochemical and molecular changes at the cellular level in response to exposure to environmental estrogen-like chemicals. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1997; 50: 1-29.
81. Darbre P.D. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Oncology* 2006; 20; 121–143.
82. Ren L, Melissa A.M, Lech J.J. Estrogenic effects of nonylphenol on pS2, ER and MUC1 gene expression in human breast cancer cells-MCF-7. *Chemico-Biological Interactions* 1997; 104: 55-64.
83. Seike N, Wanibuchi H, Morimura K, Wei M, Nishikawa T, Hirata K, Yoshikawa J, Fukushima S. Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model. *Cancer Letters*, 2003; 192: 25–36.
84. Jubendradass R, D’cruz S. C, Ran, S. J. A, Mathur P. P. Nonylphenol induces apoptosis via mitochondria- and Fas-L-mediated pathways in the liver of adult male rat. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2012; 62: 405–411.
85. Hess-Wilson J.K, Knudsen K.E. Endocrine disrupting compounds and prostate cancer. *Cancer Letters* 2006; 241: 1–12.
86. Çakal Arslan Ö, Parlak H. Embryotoxic effects of nonylphenol and octylphenol in sea urchin *Arbacia lixula*. *Ecotoxicology* 2007; 16: 439-444.
87. Arslan O.C, Parlak H, Oral R., Katalay S. The effects of nonylphenol and octylphenol on embryonic development of Sea Urchin (*Paracentrotus lividus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2007; 53: 214–219.
88. Yang F, Xu Y, Hui Y. Reproductive effects of prenatal exposure to nonylphenol on zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 2006; 142: 77–84.

89. Balakrishnan B, Thorstensen E, Ponnampalam A, Mitchell M.D. Passage of 4-nonylphenol across the human placenta. *Placenta* 2011; 32: 788-792.
90. Chen M, Chan, C.C, Shen Y.J, Hung J.H, Guo B, Chuang H.Y, Mao I.F. Quantification of prenatal exposure and maternal-fetal transfer of nonylphenol. *Chemosphere* 2008; 73: 239–245.
91. Boyacıoğlu M, Çakal Arslan Ö, Parlak H, Karaaslan M.A. Mutagenicity of nonylphenol and octylphenol using salmonella mutation assay. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* 2007;24:299-302.
92. Zemheri F. Nonilfenol ve bisfenol A'nın ames/salmonella/mikrozom test yöntemi kullanılarak mutajenik etkisinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2011.
93. Gao Q.T, Tam N.F.Y. Growth, photosynthesis and antioxidant responses of two microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*, to nonylphenol stress. *Chemosphere* 2011;82:346–354.
94. Argese E, Marcomini A, Miana P, Bettiol C, Perin G. Submitochondrial particle response to linear alkylbenzen sulfonates, nonylphenol polyethoxylates and their biodegradation derivatives. *Environ Toxicol Chem* 1994;13:737-742.
95. Michelangeli F, Orłowski S, Champeil P, East J. M, Lee A. G. Mechanism of inhibition of the $(Ca^{+2}-Mg^{+2})$ -ATPase by nonylphenol. *Biochemistry* 1990;29:3091–3101.
96. Hughes P.J, McLellan H, Lowes D.A, et al. Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:568-574.
97. Burkhardt-Holm P, Wahli T, Meier W. Nonylphenol affects the granulation pattern of epidermal mucous cells in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol Environ* 2000;46:34-40.
98. Schwaiger J, Spieser OH, Bauer C, et al. Chronic toxicity on nonylphenol and ethinylestradiol: Haematological and histopathological effects in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology* 2000;51:69-78.

99. Raychhouldhury S.S, Blake C.A, Milette C.F. Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and sertoli cells. *Toxic App Pharmac* 1999; 157:192-202.
100. Buttar H.S, Swierenga S.H.H, Matula T.L. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the spermicides nonoxynol-9 and octoxynol-9. *Toxicol Lett* 1986; 31:65-73.
101. Sheahan D, Harries J. Effects of trace organic in fish a joint study between the directorate of fisheries research of the ministry of agriculture, fisheries and food. Brunel University and the Water Reassert Center 1992.
102. Wolf M.S, Toniolo P, Lee E.W, Rivera M, Dubin N. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Ntl Cancer Inst* 1993; 85:648-52.
103. White R, Jobling S, Hoare S. A, Sumpter J. P. Parker M.G. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 1994; 135:175-182.
104. Christiansen T, Korsgaard B, Jerpersen A. Effects of nonylphenol and 17 β -estradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eel pot *Zoarces viviparus*. *J Exp Biol* 1998;201:179-182.
105. Ashfield L.A., Pottinger T.G., Sumpter J.P. Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovosomatic index *Environ Toxicol Chem* 1998; 17:679-686.
106. Shreck C.B. Hormonal treatment and sex manipulation in fishes; Control of sex in fishes. Virginia Polytechnic Institute and State University Sea Grant Extension Division, Blacksburg, Virginia 1974; 84-106.
107. Hunter G.A, Donaldson E.M. Hormonal sex control and its application to fish culture. In *Fish Physiology Academic pres New York*. 9B,1983; 223-303
108. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The Story so Far. *Eur J Cancer* 2005; 41:1955-1968.

109. Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong O, Apisariyakul A, Dunn F.W. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Letters*, 1997;116: 197-213.
110. Scartezzini P. and Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2000;71: 23-43.
111. Matsumi N. Et al. Novel Bio-Based Polyesters Derived from Curcumin as an Inherent Natural Diol Monomer, *Polymer Journal* 2008; 40: 400–401.
112. Menon V.P. and Sudheer A.R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2007; 595: 103-125.
113. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos* 1999; 27: 486-94.
114. Goel A, Ajaikumar B.K. and Aggarwal B.B. Curcumin as “Curecumin” :From kitchen to clinic, *Biochemical Pharmacology* 2008;75: 787-809
115. Maheshwari R.K, Singh A.K, Gaddipati J. and Srimal R.C. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences* 2006;78:2081-2087.
116. Sreejayan N and Rao M.N. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung* 1996; 46: 169-171.
117. Jaruga E, Salvioli S, Dobrucki J, Chrul S, Bandorowicz-Pikula J, Sikora E, Franceschi C, Cossarizza A. and Bartosz G. Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rats thymocytes. *FEBS Letters* 1998; 433: 283-297.
118. Gautam S.C, Xu Y.X, Pindolia K.R, Janakiraman N. and Chapman R.A. Nonselective inhibition of proliferation of transformed and nontransformed cells by the anticancer agent curcumin (diferuloylmethane). *Biochemical Pharmacology* 1998;55:1333-1337.
119. Aggarwal B.B, Sethi G, Ahn K.S, Sandur S.K, Pandey M.K, Kunnumakkara, A.B. Sung, B. and Ichikawa, H. Targeting signal-transducer- and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient

- solution. *Annals of the New York Academy of the Sciences* 2006; 1091: 151-169.
120. Pal A and Pal AK. Studies on the genotoxicity of turmeric extracts in bacterial system, *Int J Antimicrob Agents* 2000;16:415- 7.
 121. Lee SL, Huang WJ, Lin WW, Lee SS, Chen CH. Preparation and anti-inflammatory activities of diarylheptanoid and diarylheptylamine analogs. *Bioorg Med Chem* 2005;13:6175-81.
 122. Chuang SE, Kuo ML, Hsu CH, Chen CR, Lin JK, Lai GM, Hsieh CY, Cheng AL. Curcumin containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 331-5.
 123. Chan WH, Wu HY, Chang WH. Dosage effects of curcumin on cell death types in a human osteoblast cell line. *Food Chem. Toxicol.* 2006; 44:1362-1371.
 124. Lao CD, Demierre MF, Sondak VK. Targeting events in melanoma carcinogenesis for the prevention of melanoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2006;6:1559-1568.
 125. Lao CD, Ruffin MT 4th, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, Boggs ME, Crowell J, Rock CL, Brenner DE. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med* 2006;17:6-10.
 126. Renner R. European bans on surfactants trigger Transatlantic debate. *Environmental Science and Technology*, 1997;31:316-320.
 127. Ahel M, Molnar E, Ibric S, Giger W. Estrogenic metabolites of Alkylphenol poly ethoxylates in secondary sewage effluents and rivers. *Water Science and Technology* 2000;42:15-22.
 128. Petro E.M.L, Leroy J.L.M.R, Van Cruchten S.J.M, Jorssen E.P.A, Bols P.E.J. Endocrine disruptors and female fertility: Focus on ovarian follicular physiology. *Reproductive Toxicology* 2011;32:150–153
 129. Maruyama K, Yuan M, Otsuki A. Seasonal Changes in Ethylen Oxide Chain Length of Poly(oxyethylene)alkylphenol Ether Nonionic Surfactants in Three Main Rivers in Tokyo. *Environ. Sci. Technol* 2000;34:343-348.

130. Ahel M, Giger W, Koch M. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment I: Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res* 1994;28:1131–1142.
131. Ahel M, Giger W, Schaffner C. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Res* 1994b;28:1143-1152.
132. Ahel M, Schaffner C, Giger W. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment 3. occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Res* 1996;30:37-46.
133. Staples C.A, Weeks J, Hall J, Naylor C. Evaluation of aquatic toxicity and bioaccumulation of C8- and C9- Alkylphenol ethoxsilates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1998;17:2470-2480.
134. Ademollo N, Ferrara F, Delise M, Fabietti F, Funari E. Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environment International* 2008; 34: 984-987.
135. Balakrishnan B, Thorstensen E, Ponnampalam A, Mitchell M.D. Passage of 4-nonylphenol across the human placenta. *Placenta*, 2011;32:788-792.
136. Couderc M, Gandar A, Kamari A, Allain Y, Zalouk-Vergnoux A, Herrenknecht C, Bizec B.L, Mouneyrac C, Poirier L. Neurodevelopmental and behavioral effects of nonylphenol exposure during gestational and breastfeeding period on F1 rats *Neurotoxicology* 2014;44:237-49
137. Hagiwara H, Sugizaki T, Tsukamoto Yu, Senoh E, Goto T, Ishihara Y. Effects of alkylphenol on bone metabolism in vivo and in vitro 2008;181:13-18
138. Kazemi S, Kani S.N.M, Kasman M.G, Aghapour F, Khorasani H, Akbar Moghadamnia A. Nonylphenol induces liver toxicity and oxidative stress in rat *Biochem Biophys Res Commun* 2016;479;17-21
139. Xu Jie , Wang Yang , Yu Jie , Qi-Yuan Fan , Xiao-Yun Liu , Li Yan & Hou-Jin Huang Immune Effects of Nonylphenol on Offspring of Rats Exposed During Pregnancy, *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 2010;16:444-452

140. Aly H. A. A, Domènech Ò, Banjar Z. M. Effect of nonylphenol on male reproduction: Analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2012;261:134–141.
141. Xu Jie, Wang Yang, Yu Jie, Jamal Hisham Hashim, Xiao-Yun Liu, Qi-Yuan Fan, and Li Yan. Toxic Effect of Gestational Exposure to Nonylphenol on F1 Male Rats 2010; 89:418–428
142. Mehranjani M.S, Noorafshan A, Hamta A, Momeni H.R, Abnosi M.H, Mahmoodi M, Anvari M, Hazaveh M. Effects of vitamin E on ovarian tissue of rats following treatment with p-nonylphenol: A stereological study. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2010;8:1-9.
143. Sadeghi F. Two separated protocols with the most important comments for skeletal staining in embryonic and adulthood period in laboratory animals. *Anatomical Sciences* 2014; 11:87-92.
144. Danielson M, Kihlström I. Calcification of the rabbit fetal skeleton. *Growth* 1986; 50:378-384
145. Menegola E, Broccia ML, Giavini E. Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. *Teratology* 2001; 64:125–133
146. Hill MF, Zdan R. Staining of developing skeleton with murexide. *Acta Anatomica* 1973;84:509–515
147. Kimmel CA, Laborde JB, Trammell CT. Evaluation of cartilage and bone formation in fetal skeletons following prenatal insult reveals abnormalities not apparent in Alizarin stained specimens. *Teratology* 1982; 25:54A–55A
148. Salaramoli J, Sadeghi F, Gilanpour H, et al. Modified double skeletal staining protocols with Alizarinred and Alcian blue in laboratory animals. *AMHSR* 2015; 13:76-81
149. Inouye M. Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by Alcian blue and Alizarin red S. *Cong Anom* 1976; 16:171–173
150. Williams TW. Alizarin red S and toluidine blue for differentiating adult or embryonic bone and cartilage. *Stain Technol* 1941; 16:23–25

151. Soysal H, Unur E, Düzler A, et al. Effects of intraperitoneal administration of the phenytoin on the skeletal system of rat fetus. *Seizure* 2011;20:187-193
152. Kimmel CA, Trammel C. A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. *Stain Technol* 1981; 56:271–273
153. Thakam A, Saewen N. Antioxidant activities of curcumin–metal complex. *Thai Journal of Agricultural Science* 2011;44:188-193.
154. Rashid K, Sil PC. Curcumin enhances recovery of pancreatic islets from cellular stress induced inflammation and apoptosis in diabetic rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2015;287:297-310.
155. Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong O, Apisariyakul A, Dunn FW. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett* 1997;116:197-203.
156. Azuine MA, Bhide SV. Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. *Nutrition and Cancer* 1992;17:77-83.
157. Eser A, Hızlı D, Haltas H, Namuslu M, Kosus A, Kosus E, Kafalı H. Effects of curcumin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Biomed Rep* 2015;3:807-813
158. Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy and embryology of the laboratory rat*. BioMed Verlag Worthsee 1986; 9-21:231-251.
159. Moore KL. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* (4th Edition). W.B. Saunders Co, London, 1988: pp 20-30.
160. Wang J, Shim W. J, Yim U. H, Kannan N, Li D. Nonylphenol in bivalves and sediments in the northeast coast of China. *Journal of Environmental Sciences* 2010;22:1735–1740.
161. Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, et al. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem* 2001;276:8836–8840

162. Kousteni S, Almeida M, Han L, et al. Induction of osteoblast differentiation by selective activation of kinase-mediated actions of the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 2007; 27:1516–1530
163. Sonne C, Dietz R, Born EW, et al. Is bone mineral composition disrupted by organochlorines in east Greenland polar bears (*Ursus maritimus*). *Environ Health Perspect* 2004;112:1711-1716
164. Tsukamoto Y, Ishihara Y, Miyagawa-Tomita S, et al. Inhibition of ossification in vivo and differentiation of osteoblasts in vitro by tributyltin. *Biochemical Pharmacology* 2004;68:739–746
165. Marshall WJ. *Illustrated Textbook of Clinical Chemistry* (1 st edition). Gower Medical Publishing, London, 1988: pp 65.
166. Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clinic Chemistry* 1982;28:2007-2016
167. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 1997;30:573-593
168. Price CP, Kirwan A, Vader C. Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone resorption. *Clin Chem* 1995;41:641-643
169. Kosteva J, Langer C. The changing landscape of the medical management of skeletal metastases in nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 2008;20:155-161

EKLER



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 16.11.2016

Toplantı Sayısı: 10

Karar No:16/137

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 16.11.2016 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	KATILMADI
Serpil SARIOZKAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Nükhet KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Hamiyet ÜNAL	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	KATILMADI
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	KATILMADI
Asiye GÖKBELEN	Yardımcı Öğretim Üyesi	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji A.D.'dan Doç. Dr. Arzu YAY tarafından sunulan "Nonylphenol'ün Kemik Gelişimi Üzerine Toksik Etkisine Karşı Curcumin'in Koruyucu Rolü." başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 16.11.2016

Etik kurul Başkan Vekili : Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA

İmza :

NONYLPHENOL'ÜN KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNE TOKSİK ETKİSİNE KARŞI CURCUMİN'İN KORUYUCU ROLÜ

ORJİNALLİK RAPORU

% **16**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **15**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **3**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikerisim.aku.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

% **12**

2

acikerisim.deu.edu.tr

İnternet Kaynağı

% **1**

3

www.turkailehekderg.org

İnternet Kaynağı

% **1**

4

Karafakioğlu, Yasemin Sunucu.
"NONİLFENOL'ÜN RAT BÖBREK VE TESTİS
DOKUSUNDA İNDÜKLEDĞİ OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE TAURİNİN KORUYUCU
ETKİSİ", Afyon Kocatepe University Journal of
Science/13023187, 20071001

Yayın

% **1**

5

tipwiki.blogspot.com.tr

İnternet Kaynağı

% **1**

6

acikerisim.pau.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

% **1**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Pınar SUNA
Doğum Yeri ve Tarihi : Osmaniye /Kadirli- 04.08.1985
Telefon : 0535 912 00 03
Mail : pinar.alisan.0138@gmail.com
Adres : Yeni Doğan Mah. Bilge Kaan Cad. Birkent Sit. B
blok Kat:5 No:13 TALAS/KAYSERİ

EĞİTİM BİLGİLERİ

- **ÜNİVERSİTE (YÜKSEK LİSANS)**
Erciyes Üniversitesi - Tıp Fakültesi, Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalı
Bitiş Tarihi : 2018
- **ÜNİVERSİTE (LİSANS)**
Erciyes Üniversitesi - Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Bitiş Tarihi : 2014
- **Lise**
Gülten- Ali Zıyan Anadolu Lisesi
Bitiş Tarihi : 2004

İŞ TECRÜBESİ

Erciyes Üniversitesi - Tıp Fakültesi Hastaneleri
Tıbbi genetik Ana Bilim Dalı Gönüllü Stajyer (2010-2014)

YABANCI DİL

- İngilizce

SERTİFİKALAR VE BELGELER

- DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI – 2015/2016
- 2. HEMATOGENETİK SEMPOZYUMU – KASIM 2015
- 2. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRESİ – NİSAN 2015
- EUROBIOTECH 2012 AGRICULTURE SYMPOSIUM – NİSAN 2012 – KAYSERİ / TURKEY
- 1st INTERNATIONAL CONFERENCE on STEM CELL RESEARCH and APPLICATIONS – EKİM 2011
- ERCİYES UNIVERSITY BIOTECHNOLOGY AND RESEARCH CENTER CERTIFICATION – ARALIK 2010