

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CİNSİYETE DAYALI FARKLILIKLAR AÇISINDAN METİL
CIVA VE TİYOMERSALİN TOKSİSİTELERİNİN İNSAN
NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE KARŞILAŞTIRMALI
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Kim. Selinay Başak ERDEMLİ KÖSE

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2022**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CİNSİYETE DAYALI FARKLILIKLAR AÇISINDAN METİL
CIVA VE TİYOMERSALİN TOKSİSİTELERİNİN İNSAN
NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE KARŞILAŞTIRMALI
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Kim. Selinay Başak ERDEMLİ KÖSE

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU**

ANKARA

2022

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CİNSİYETE DAYALI FARKLILIKLAR AÇISINDAN METİL CIVA VE
TİYOMERSALİN TOKSİSİTELERİNİN İNSAN NÖROBLASTOMA
HÜCRELERİNDE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Uzm. Kim. Selinay Başak ERDEMLİ KÖSE
Danışman: Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU**

Bu tez çalışması 05/12/2022 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji
Doktora Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ayşe Nurşen BAŞARAN
(Başkent Üniversitesi)
Üye: Prof. Dr. Terken BAYDAR
(Hacettepe Üniversitesi)
Üye: Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT
(Hacettepe Üniversitesi)
Üye: Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ
(Ankara Üniversitesi)
Üye: Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU
(Hacettepe Üniversitesi)

ONAY

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

08 Aralık 2022

**Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü**

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

O Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)

O Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .. ay ertelenmiştir. (2)

O Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

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

Selinay Başak ERDEMLİ KÖSE

¹“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

(1) *Madde 6. 1. Lisansüstü tezele ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*

(2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*

(3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

*Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Kim. Selinay Başak ERDEMLİ KÖSE

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca çok kıymetli bilgi ve tecrübelerini sabırla aktaran, desteğini hiç esirgemeyen ve her zaman yol gösteren, öğrencisi olmaktan büyük bir onur ve mutluluk duyduğum çok değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU'na,

Eğitimime katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Deneyletim sırasında bilimsel birikimleri ve emekleri ile yanımda olan, her zaman desteklerini ve sevgilerini hissettiğim, varlıkları hayatımı güzelleştiren, çok kıymetli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Aylin BALCI ÖZYURT, Uzm. Ecz. Anıl YİRÜN ve Bio. Deniz Arca ÇAKIR'a,

Hayatımın her aşamasında sınırsız sevgisiyle yanımda olan sevgili arkadaşlarım Uzm. Dr. Başak ÇAKIR GÜNEY, Dr. Emre ÖZMEN ve Dr. Neslihan KADIKÖYLÜ'ye,

Başta Şenay ERDEMLİ ve Reyhan ERDEMLİ olmak üzere; bana her zaman güvenen, inanan ve destek olan, beni koşulsuz sevgi ve fedakarlıkla yetiştiren aileme,

Doktoramı kendisine ithaf ettiğim, hayattaki en büyük şansım canım babam Gürhan ERDEMLİ'ye ve bizi birbirimize emanet eden canımız rahmetli babaannem Pakize ERDEMLİ'ye,

Bana her zaman güç veren ve destek olan, koşulsuz sabrını ve sevgisini her zaman hissettiğim yol arkadaşım Faruk KÖSE'ye ve hayatımın en güzel rengi patili oğlum Toti'ye

Çok teşekkür ederim.

ÖZET

Erdemli Köse, S.B., Cinsiyete Dayalı Farklılıklar Açısından Metil Cıva ve Tiyomersalin Toksiklerinin İnsan Nöroblastoma Hücrelerinde Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2022. Organik cıva bileşikleri, maruz kalma süresi ve konsantrasyona bağlı olarak motor gelişim ve bilişsel aktivitelerdeki bozulmalardan ciddi nöromotor değişikliklere önemli nörotoksik etkilere neden olmaktadır. Cinsiyet farklılığının birçok nörodejeneratif bozukluğun fizyopatolojisinde önemli değişikliklere yol açabileceği bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, metil cıva ve etil cıvaya metabolize olduğu bilinen tiyomersalin nörotoksik etkilerinin insan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y) üzerinde incelenmesi amaçlanmış ve farklı konsantrasyonlarda testosteron ve estradiolün organik cıva bileşikleri varlığında olası nörotoksikite üzerindeki etkilerinin, oksidatif stres parametreleri, nöroendokrin sistemdeki değişiklikler, oksidatif DNA ve RNA hasarının, hücre ölüm mekanizmalarının ve epigenetik değişikliklerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Sitotoksikite deneylerinden elde edilen sonuçlara göre tiyomersal ve metil cıva için inhibitör konsantrasyon 20 (IC_{20}) dozları sırasıyla $1,15$ ve $2,93$ μM olarak belirlenmiştir. 17β -estradiol ve testosteron için yüksek ve düşük konsantrasyonlar olarak sırasıyla $7,5-0,75$ μM ile $1-0,1$ μM kullanılmıştır. Gruplar; kontrol, metil cıva, tiyomersal, yüksek testosteron/düşük estradiol+tiyomersal, yüksek estradiol/düşük testosteron+tiyomersal, yüksek testosteron/düşük estradiol+metil cıva, yüksek estradiol/düşük testosteron+metil cıva olarak tasarlanmıştır. Nöroblastoma hücrelerinde hem tiyomersal hem de metil cıvanın toksik etkilerinin olduğu; tiyomersalin yüksek testosteron ortamında toksik etkilerinin arttığı; estradiol ve testosteronun tiyomersal ve metil cıva kaynaklı toksik etkiler üzerinde meydana getirdiği değişikliklerin birbirinden farklı olduğu ve genel olarak estradiolün toksisiteyi azaltıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuçlar organik cıva bileşiklerine karşı erkek ve dişilerde farklı nöronal yanıtlar oluşabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: estradiol, metil cıva, nörotoksikite, testosteron, tiyomersal

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: TDK-2020-18502.

ABSTRACT

Erdemli Köse, S.B., Comparative Evaluation of the Toxicities of Methyl Mercury and Thiomersal Regards to Gender-Based Differences in Human Neuroblastoma Cells, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Pharmaceutical Toxicology Program, PhD Thesis, Ankara, 2022.

Depending on exposure time and concentration, organic mercury compounds cause significant neurotoxic effects, ranging from deterioration in motor development and cognitive activities to severe neuromotor alterations. It is known that gender differences can lead to significant changes in the pathophysiology of many neurodegenerative disorders. In this thesis, it was aimed to investigate the neurotoxic effects of methyl mercury and thiomersal, a compound known to be metabolized to ethyl mercury, in human neuroblastoma cells. In addition, in the presence of organic mercury compounds, we aimed to determine the effects of testosterone and estradiol at different concentrations on possible neurotoxicity oxidative stress parameters, changes in the neuroendocrine system, oxidative DNA and RNA damage, cell death mechanisms and epigenetic changes. According to the results obtained from cytotoxicity experiments, the inhibitory concentration 20 (IC₂₀) doses for thiomersal and methyl mercury were 1.15 and 2.93 μ M, respectively. For 17 β -estradiol, high and low doses were 7.5 and 0.75 μ M whereas for testosterone 1 and 0.1 μ M were used as high and low doses. Groups were designed as control, methyl mercury, thiomersal, high testosterone/low estradiol+thiomersal, high estradiol/low testosterone+thiomersal, high testosterone/low estradiol+methyl mercury, high estradiol/low testosterone+methyl mercury. It has been determined that both thiomersal and methyl mercury had toxic effects on neuroblastoma cells; the toxic effects of thiomersal specifically increased in high testosterone environment, the changes caused by estradiol and testosterone on thiomersal, and methyl mercury-induced toxic effects were different from each other, and that estradiol has a toxicity reducing effect generally. The results suggest that different neuronal responses may occur in males and females against organic mercury compounds.

Key words: estradiol, methyl mercury, neurotoxicity, testosterone, thiomersal

This thesis is supported by Hacettepe University Scientific Projects Coordination Unit Fund. Project no: TDK-2020-18502.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Cıva	4
2.2. Organik Cıva Bileşikleri	6
2.2.1. Metil Cıva	8
2.2.2. Tiyomersal	9
2.3. Erkek ve Kadın Beyninde Cinsiyet Farklılıkları	11
2.3.1. Estradiol	13
2.3.2. Testosteron	14
2.4. Nörolojik Bozukluklarda Cinsiyet Farklılıkları	14
2.5. Metil Cıva ve Tiyomersal ile İlgili Çalışmalar	16
2.6. Metil Cıva ve Tiyomersal Toksisitelerinde Cinsiyet Farklılıkları ile İlgili Çalışmalar	20
2.7. Oksidatif Stres	23
2.8. Apoptoz	25
2.9. Nörotransmitter Sistemler	25
2.9.1. Serotonin	27
2.9.2. Serotonin Taşıyıcı Protein	29
2.9.3. Dopamin	29
2.9.4. Dopamin Taşıyıcı Protein	31
2.10. Epigenetik Değişiklikler	32

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	35
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	36
3.3. Kullanılan Hücre Hattı	37
3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	37
3.4.1. Metil Cıva, Tiyomersal, Testosteron ve Estradiol Çözeltilerinin Hazırlanması	37
3.4.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	37
3.4.3. Sitotoksisite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	38
3.4.4. Hücre İçi ROS Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	38
3.4.5. CAT Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	39
3.4.6. SOD Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	40
3.4.7. Glutasyon Peroksidaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	41
3.4.8. Glutasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	42
3.4.9. Lipit Peroksidasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	44
3.4.10. Protein Karbonil Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	45
3.4.11. Total Protein Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	46
3.4.12. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	46
3.4.13. RNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	47
3.4.14. DNA ve RNA Hasarının Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	47
3.4.15. Kaspaz 3, 8, 9 Aktivitelerinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	48
3.4.16. Dopamin Düzeylerinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	49
3.4.17. DAT Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	49
3.4.18. Serotonin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	50
3.4.19. SERT Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	51
3.4.20. Global Metilasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	52
3.4.21. Histon Asetilasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	52
3.5. Deneysel İşlemler ve Yöntemler	52
3.5.1. Hücre Kültürü	52
3.5.2. Hücre Dondurma, Çözme ve Pasaj İşlemleri	53
3.5.3. Uygun Hücre Sayılarının Belirlenmesi	54

3.5.4.	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi	55
3.5.5.	Çalışma Gruplarının Oluşturulması	56
3.5.6.	Hücre İçi ROS Miktarının Belirlenmesi	57
3.5.7.	Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	58
3.5.8.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü	59
3.5.9.	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü	61
3.5.10.	Glutasyon Miktarının Ölçümü	62
3.5.11.	Lipit Peroksidasyon Miktarının Ölçümü	64
3.5.12.	Protein Karbonil Miktarlarının Belirlenmesi	65
3.5.13.	Total Protein Miktarlarının Belirlenmesi	66
3.5.14.	DNA İzolasyonu	67
3.5.15.	RNA İzolasyonu	68
3.5.16.	Hücre Örneklerinde DNA/RNA Miktarlarının Belirlenmesi	69
3.5.17.	DNA/RNA Hasarının Belirlenmesi	69
3.5.18.	Kaspaz 3, 8, 9 Aktivitelerinin Belirlenmesi	71
3.5.19.	Dopamin Miktarının Belirlenmesi	72
3.5.20.	DAT Miktarının Belirlenmesi	73
3.5.21.	Serotonin Miktarının Belirlenmesi	74
3.5.22.	SERT Miktarının Belirlenmesi	75
3.5.23.	Global Metilasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	77
3.5.24.	Histon Asetilasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	78
3.6.	Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi	80
4.	BULGULAR	81
4.1.	Hücre Canlılığı ve Hücre Proliferasyonu	81
4.2.	Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri	88
4.3.	Antioksidan Enzim Aktiviteleri	89
4.4.	Oksidatif Stres Parametreleri	93
4.5.	Oksidatif DNA Hasarı	96
4.6.	Apoptoz-Kaspaz 3, 8 ve 9 aktiviteleri	98
4.7.	Oksidatif RNA Hasarı	101
4.8.	Serotonin ve Serotonin Taşıyıcı Protein Düzeyleri	103

4.9. Dopamin ve Dopamin Taşıyıcı Protein Düzeyleri	105
4.10. Global Metilasyon	107
4.11. Histon Asetilasyonu	108
5. TARTIŞMA	110
5.1. Hücre Canlılığı	112
5.2. Oksidatif Stres Parametreleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri	114
5.3. Hücre içi ROS Düzeyleri	116
5.4. Oksidatif DNA ve RNA Hasarı	116
5.5. Apoptoz (Kaspaz 3, 8 ve 9 Aktiviteleri)	117
5.6. Nöroendokrin Parametreler	120
5.6.1. Dopamin ve Dopamin Taşıyıcı Protein	120
5.6.2. Serotonin ve Serotonin Taşıyıcı Protein	123
5.7. Epigenetik Değişiklikler	124
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	127
7. KAYNAKLAR	129
8. EKLER	
EK-1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu Ekran Görüntüsü	
EK-2. Turnitin Dijital Makbuz	
EK-3. Tez Çalışması ile İlgili Yayın ve Bildiriler	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

5-HT	Serotonin
8-OHdG	8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin
8-OHG	8-Hidroksi Guanozin
AH	Alzheimer Hastalığı
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
APOE	Apolipoprotein E
ATCC	American Type Cell Collection
BDNF	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
CAT	Katalaz
DA	Dopamin
DAT	Dopamin Taşıyıcı Protein
DEHB	Dikkat Eksikliği-Hiperaktivite Bozukluğu
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT	DNA Metiltransferaz
DOPAC	3,4-dihidroksifenilasetik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTNB	5,5'- Ditiyo- Bis-(2- Nitrobenzoik asit)
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmüno sorbent Testi
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FoxP4	Forkhead kutu proteini P4
FTD	Frontotemporal Demans
GABA	γ -aminobütirik asit
GACVC	Aşı Güvenliliği Küresel Danışma Komitesi
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HDAC4	Histon Deasetilaz 4
IC₂₀	İnhibitör Konsantrasyon 20
IC₅₀	İnhibitör Konsantrasyon 50
LDH	Laktat Dehidrogenaz

MDA	Malondialdehit
MS	Multiple Skleroz
MTT	3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum Bromür
NSC	Nöral Kök Hücre
O₂⁻	Süperoksit Anyonu
OH	Hidroksil Radikali
OSB	Otizm Spektrum Bozuklukları
PARK1, 4, 8	Parkinson Hastalığı ile İlişkili Genler
PARP	Poli (ADP-riboz) Polimeraz
PC	Protein Karbonil
Pcp2	Purkinje hücre proteini 2
PH	Parkinson Hastalığı
PS1	Presenilin-1
PS2	Presenilin-2
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SERT	Serotonin Taşıyıcı Protein
SHBG	Seks Hormon Bağlayıcı Globülin
SH-SY5Y	İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı
SOD	Süperoksit Dismutaz
SWAP-1	SWIM-Tip 1 Çinko parmak 7 ilişkili protein (SWIM-Type Zinc Finger 7 Associated Protein 1)
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri
UPR	Katlanmamış Protein Yanıtı

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa	
2.1.	Metil cıva ve etil cıva bileşiklerinin kimyasal yapısı.	7
2.2.	Tiyomersal bileşiğinin kimyasal yapısı.	9
3.1.	Katalaz standart eğrisi.	59
3.2.	Süperoksit dismutaz standart eğrisi.	61
3.3.	Glutatyon standart eğrisi.	64
3.4.	8-OHdG ve 8-OHG için standart eğri.	70
4.1.	SH-SY5Y hücre hattında tiyomersalin (0-4 µM) canlılık üzerindeki etkisi.	81
4.2.	SH-SY5Y hücre hattında tiyomersalin (0-4 µM) canlılık üzerindeki etkisi.	82
4.3.	SH-SY5Y hücre hattında metil cıvanın (0-15 µM) canlılık üzerindeki etkisi.	83
4.4.	SH-SY5Y hücre hattında metil cıvanın (0-15 µM) canlılık üzerindeki etkisi.	83
4.5.	SH-SY5Y hücre hattında testosteronun (0-100 µM) canlılık üzerindeki etkisi.	85
4.6.	SH-SY5Y hücre hattında testosteronun (0-100 µM) canlılık üzerindeki etkisi.	85
4.7.	SH-SY5Y hücre hattında estradiolün (0-30 µM) canlılık üzerindeki etkisi.	86
4.8.	SH-SY5Y hücre hattında estradiolün (0-30 µM) canlılık üzerindeki etkisi.	87
4.9.	Çalışma gruplarında hücre içi ROS düzeyleri.	88
4.10.	Çalışma gruplarında CAT aktiviteleri.	89
4.11.	Çalışma gruplarında SOD aktiviteleri.	91
4.12.	Çalışma gruplarında GPx aktiviteleri.	92
4.13.	Çalışma gruplarında total GSH düzeyleri.	93
4.14.	Çalışma gruplarında MDA düzeyleri.	94
4.15.	Çalışma gruplarında protein karbonil düzeyleri.	96
4.16.	Çalışma gruplarında 8-OHdG düzeyleri.	97
4.17.	Çalışma gruplarında kaspaz 3 aktiviteleri.	98
4.18.	Çalışma gruplarında kaspaz 8 aktiviteleri.	100
4.19.	Çalışma gruplarında kaspaz 9 aktiviteleri.	101
4.20.	Çalışma gruplarında 8-OHG düzeyleri.	102
4.21.	Çalışma gruplarında serotonin düzeyleri.	103
4.22.	Çalışma gruplarında SERT düzeyleri.	104

4.23.	Çalışma gruplarında dopamin düzeyleri.	105
4.24.	Çalışma gruplarında DAT düzeyleri.	106
4.25.	Çalışma gruplarında 5-mC % düzeyleri.	107
4.26.	Çalışma gruplarında asetillenmiş histon H3 düzeyleri.	108

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. Çalışma Grupları	57
4.1. Tiyomersal için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları.	82
4.2. Metil cıva için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları.	84
4.3. Testosteron için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları.	86
4.4. Estradiol için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları.	87
4.5. Çalışma gruplarında hücre içi ROS düzeyleri.	88
4.6. Çalışma gruplarında CAT aktiviteleri.	90
4.7. Çalışma gruplarında SOD aktiviteleri.	91
4.8. Çalışma gruplarında GPx aktiviteleri.	92
4.9. Çalışma gruplarında total GSH düzeyleri.	94
4.10. Çalışma gruplarında MDA düzeyleri.	95
4.11. Çalışma gruplarında protein karbonil düzeyleri.	96
4.12. Çalışma gruplarında 8-OHdG düzeyleri.	97
4.13. Çalışma gruplarında kaspaz 3 aktiviteleri.	99
4.14. Çalışma gruplarında kaspaz 8 aktiviteleri.	100
4.15. Çalışma gruplarında kaspaz 9 aktiviteleri.	101
4.16. Çalışma gruplarında 8-OHG düzeyleri.	102
4.17. Çalışma gruplarında serotonin düzeyleri.	103
4.18. Çalışma gruplarında SERT düzeyleri.	104
4.19. Çalışma gruplarında dopamin düzeyleri.	106
4.20. Çalışma gruplarında DAT düzeyleri.	107
4.21. Çalışma gruplarında 5-mC % düzeyleri.	108
4.22. Çalışma gruplarında asetillenmiş histon H3 düzeyleri.	109

1. GİRİŞ

Cıva simgesi Hg, atom ağırlığı 200,5 g/mol, atom numarası 80 ve yoğunluğu 13,59 g/cm³ olan, donma noktasının -38,8°C olması nedeniyle oda sıcaklığında sıvı olarak bulunan gümüş renginde bir metaldir. Elementler içinde en tehlikeli toksik etkilere sahip olanlardan biridir ve organik cıva formlarına maruziyet çok yaygındır. Metil cıva ve etil cıva en sık maruz kalınan organik cıva türleridir (1). Cıva bileşikleri, başta merkezi sinir sistemi olmak üzere, beyin, böbrekler, kardiyovasküler sistem ve bağışıklık sistemine zarar veren çok çeşitli toksikolojik etkiler göstermektedir (2, 3).

Cıva nörotoksitesinin altında yatan hücrel mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (4, 5). Metil cıva ve etil cıvanın (tiyomersalin metabolizma ürünü) *in vitro* olarak metiyonin sentaz enzimini inhibe ettiği bildirilmiştir (6). Bu enzim glutatyon sentezi için gereklidir ve cıvanın detoksifikasyonu birincil olarak glutatyon ile gerçekleşir. Detoksifikasyonu geciktiğinde serbest cıvanın DNA, RNA ve histonların metilasyonunu engellediği, metilkobalamin, fosfatidilkolin ve nörotransmitterlerin sentezini önlediği görülmüştür. Bu etkiler sonucu sağlıklı beyin gelişim süreci sekteye uğrar ve çok sayıda nörolojik bozukluk ortaya çıkabilir (7).

Toksik metallerin sağlık üzerindeki etkilerinin, toksikokinetikleri, etki biçimleri ve duyarlılıkları nedeniyle erkeklerde ve kadınlarda farklı şekilde ortaya çıkabileceğine dair kanıtlar vardır. Genellikle deneysel toksikolojik araştırmalar için sadece erkek hayvanlar kullanılır. Bu nedenle birçok çalışmada cinsiyete özgü farklılıkların etkileri (belirli hormon etkileşimleri, iki farklı cinsiyetteki etki mekanizması gibi) genellikle ihmal edilmektedir (8, 9). Cıva gibi metallerin metabolizmasında ve toksisitesinde cinsiyet farklılıkları olabileceğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (10-12). Bu farklılıkların maruziyet dozu ve süresi ile de ilişkili olduğu düşünülmektedir (9).

Çalışmalar, östrojen ve testosteronun baskın olmasının beyin için hem avantaj hem de dezavantajlara sahip olduğunu göstermektedir. Östrojenlerin antioksidan etkileri nedeniyle kadın beyinde koruyucu rol oynadığı vurgulanmaktadır. Erkek beyinde yüksek düzeyde testosteron bulunması, oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasını arttırabilecek etkenlerden biri olabilir. Bu nedenle, erkeklerin metallerin neden olduğu nörotoksositeye daha duyarlı olabileceği ileri sürülmektedir. Çeşitli

epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan çalışmaları bu öneriyi desteklemektedir (8, 9, 13, 14).

Bu tez çalışmasında, sıklıkla maruz kalınan çevresel kirleticilerden biri olarak tanımlanan çevresel yolla, gıdalardan ve aşılar başta olmak üzere çeşitli farmasötik preparatlar aracılığıyla maruz kalınan cıvanın organik türleri olan metil cıva ve etil cıvaya metabolize olduğu bilinen tiyomersalin (sodyum etil cıva tiyosalisilat) nörotoksik etkilerinin SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerinde incelenmesi ve farklı konsantrasyonlarda testosteron ve estradiol uygulamasının bu bileşiklerin oluşturabileceği nörotoksisite üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Olası nörotoksisite, oksidatif stres parametreleri ve serotonin, dopamin, serotonin taşıyıcı protein (SERT) ve dopamin taşıyıcı protein (DAT) düzeylerinin ölçülmesi, oksidatif DNA ve RNA hasarının, hücre ölüm mekanizmalarının ve epigenetik değişikliklerin belirlenmesi ile değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasından elde edilen verilerin karşılaştırmalı değerlendirilmesi ile:

- Metil cıva ve tiyomersalin çalışılan hücre hattı üzerinde toksik etkileri olduğu, metil cıva uygulanan hücrelerde bu toksik etkilerin genellikle daha şiddetli görüldüğü; ancak tiyomersal maruziyetinin meydana getirdiği toksik etkilerin ihmal edilemeyecek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla tiyomersal toksisitesinin değerlendirilmesinde, metil cıvanın referans olarak gösterilmesinin tam olarak uygun olmayacağı ancak tiyomersal kaynaklı cıva maruziyetinin de son derece önemli toksik etkilere neden olduğu belirlenmiştir.
- Farklı konsantrasyonlarda seks steroid hormonları uygulaması ile taklit edilmeye çalışılan kadın ve erkek beyin modellerinde, oluşturulan yüksek estradiol/düşük testosteron ve yüksek testosteron/düşük estradiol ortamlarında metil cıva ve tiyomersal kaynaklı toksik etkilerde değişiklikler olduğu tespit edilmiştir. Modellemenin ilgili maddeler için kullanılan hücre hattında ve değerlendirilen parametreler üzerinde cinsiyet farkının etkisini incelemek adına başarılı olduğu görülmüştür.

- Tiyomersalin özellikle bazı parametrelerde yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında toksik etkilerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu durum testosteronun tiyomersal kaynaklı toksik etkileri daha da güçlendirebileceğini göstermektedir.
- Estradiol ve testosteronun tiyomersal ve metil cıva kaynaklı toksik etkiler üzerinde meydana getirdiği değişikliklerin birbirinden farklı olduğu, bazı parametreler üzerinde estradiolün düzeltici etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum farklı kimyasal maddelere karşı erkek ve dişi organizmalarda farklı toksikokinetik süreçler işleyebileceğini de düşündürmektedir. Deneysel çalışmalar planlanırken, toksik maddelerle ilgili maruziyet düzenlemeleri yapılırken, tedavi süreçlerinde doz ve yan etki planlamaları yapılırken bu farklılıkların göz önünde bulundurulması önem taşıyabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Cıva

Cıva en yaygın kullanılan metallere biridir ve hem çevreye hem de insan sağlığına risk oluşturan küresel bir kirleticidir (15). Endüstriyel faaliyetler, altın madenciliği, tıbbi ve kozmetik kullanımlar ve fosil yakıtların kullanımı nedeniyle cıva maruziyeti dünya çapında sürekli artış göstermektedir. Cıva fosil yakıtların, endüstri ve tarımda kullanılan bileşiklerin ve atıkların işlenmesi nedeniyle çevreye girer. Biyosfere salınan cıva binlerce yıl boyunca katlanarak birikir. 2000'li yıllarda biyosferdeki cıva içeriğinin endüstri öncesi dönemin 2 ila 5 katı olduğu düşünülmektedir (16, 17). Cıva üç farklı değerlik (Hg^0 , Hg^{1+} , Hg^{2+}) alabilir ve doğada metalik form ile inorganik ve organik kompleksleri halinde bulunur. Cıvanın doğal küresel biyojeokimyasal döngüsü, elementin topraktan ve yüzey sularından gaz halinde salınımı, atmosferik taşınımı, toprağa ve yüzey sularına yeniden birikmesi, bileşiğin toprak veya tortu parçacıkları tarafından emilmesi ve kara ve yüzey sularından yeniden buharlaşması şeklinde özetlenebilir (18). Çevreye girdikten sonra, farklı cıva formları arasında karşılıklı dönüşüm meydana gelebilir. Partiküle bağlı cıva atmosferik partikül madde üzerinde adsorbe edilmiş hem kararlı yoğunlaştırılmış hem de gaz halindeki formlar dahil olmak üzere, havadaki Hg içeren tüm parçacıklardan oluşur. Partiküle bağlı cıva çözünmeyen cıva sülfüre dönüşebilir ve çökebilir veya atmosfere yeniden giren veya su ve karasal gıda zincirlerinde biyolojik olarak biriken daha uçucu veya çözünür formlara biyolojik olarak dönüşebilir (16).

Cevherlerde bulunan form olan cıva sülfür, cıvanın doğal şeklidir. Cevheri içeren kayaların aşınması veya temel olarak fosil yakıtların yakılması gibi insan faaliyetleri yoluyla havaya salınabilir. Cıva bir kez havaya salındığında uzun mesafeler kat edebilen ve uzak bölgeleri etkileyebilen küresel bir kirleticidir. Su kontaminasyonu, doğal veya antropojenik kaynaklarla kontamine olmuş akan suda veya hava birikiminden meydana gelebilir. Genel popülasyonun cıvaya maruz kalmasının potansiyel kaynakları, ortam havasındaki cıva buharlarının solunması, içme suyunun ve cıva ile kontamine gıda maddelerinin tüketilmesi ve diş amalgamları ve cıvalı bileşikler içeren tıbbi preparatlardır. Cıva doğal ve antropojenik kaynaklardan çıkıp okyanus, deniz, göl ve nehirlerle girerek, sucul mikrobiyota

aracılığıyla metil cıvaya dönüştürülür. Metil cıva balık ve kabuklu deniz ürünleri de dahil olmak üzere sucul besin ağlarında biyolojik olarak birikir. İnsanlar ve yaban hayatı metil cıvaya öncelikle kontamine balıkların, ton balığı, kılıç balığı, köpekbalığı ve balina gibi özellikle büyük yırtıcı balık türlerinin tüketimi yoluyla maruz kalmaktadır (19). Ton balığındaki cıva içeriğinin yılda %4 artış gösterdiği ve geçtiğimiz 1000 yılda 1000 kattan fazla arttığı bildirilmektedir (20). Balık tüketiminin yanı sıra, önemli bir antropojenik cıva kaynağı da yaklaşık %50'si cıvadan oluşan dental amalgamlardır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1991 yılında genel popülasyonda günlük ortalama en yüksek cıva alımının dental amalgamlardan kaynaklandığını belirtmiştir (21). Diğer önemli maruziyet kaynakları da başta aşılardan olmak üzere çeşitli tıbbi ilaç ve kozmetik ürünlerde kullanılan cıva içeren koruyuculardır (22).

Çeşitli cıva formlarının insan popülasyonları üzerinde farklı toksik etkilere sahip olabileceği bildirilmiştir (15). Cıva doğrudan kan beyin engelini geçebilir ve özellikle görsel korteks, serebellum ve omurilikte yüksek miktarlarda birikir. Cıva ayrıca endoplazmik retikulum (ER), mitokondri ve golgi cisimciği gibi membranöz organellere bağlanır ve işlevlerini bozar (23). Cıva bileşikleri, başta merkezi sinir sistemi olmak üzere, beyin, böbrekler, kardiyovasküler sistem ve bağışıklık sistemine zarar veren çok çeşitli toksik etkiler göstermektedir (2, 3). Metil cıva ve inorganik cıva bileşiklerine toksisite eşiğinin üzerindeki düzeylerde maruz kalma, düzenli balık tüketimi veya mesleki temas yoluyla meydana gelir ve uzun yıllardır toksikolojik olarak büyük bir endişe uyandırmaktadır (2, 24, 25). Diş hekimliği uygulamalarında cıva buharı salan dental amalgam dolguların kullanımı nedeniyle hem diş hekimleri hem de hastalar için cıva maruziyeti de yine önem arz etmektedir (2). Tiyomersal gibi cıva bileşiklerinin ilaçlarda ve antiseptiklerde kullanımı azalmakla birlikte bazı aşılarda, kozmetik ve tıbbi ürünlerde koruyucu olarak halen kullanılmaktadır (26).

Cıva bileşikleri yeni toksik maddeler olmamasına rağmen, moleküler toksisite mekanizmaları hakkında, özellikle tiyomersal ve onun parçalanma ürünü etil cıva hakkında önemli bir bilgi eksikliği vardır. Etil cıva ve tiyosalisilik asitten oluşan bir cıva türevi olan tiyomersal, aşılarda, dermatolojik ve oküler preparatlarda koruyucu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır. Klinik cıva maruziyetinin ana yolu tiyomersal içeren aşılardır (27) ve gelişmiş ülkelerin çoğunda çocuklara normal olarak tiyomersal içermeyen aşılardan yapılırken, gelişmekte olan ülkelere farklı dozlarda tiyomersal

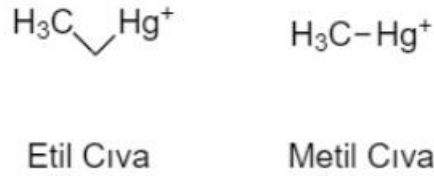
içeren aşular bulunmaktadır (26, 28). Tiyomersal içeren aşulara erken yaşta maruziyeti ele alan deneysel çalışmalar, maruz kalan fetuslarda, yenidoğanlarda ve bebeklerde, cıvanın kanda toksik etki gösterecek yeterli konsantrasyonda tespit edildiğini ve beyne ulaştığını; nörolojik bir etki oluşturacak ve nörogelişimi etkileyecek sürede organizmada kaldığını göstermektedir (3, 28). Epidemiyolojik çalışmalarla farklı dozlarda cıva bileşiklerine maruz kalma değerlendirilmiş ve düşük cıva düzeylerinin bile beyin fonksiyonları üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu, çocuklarda nörodavranışsal gelişime müdahale edebileceği ve ayrıca bağışıklık sistemini de etkileyebileceği; yetişkinlerde ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların ilerlemesine neden olabileceği bildirilmiştir (29-34).

Farklı çalışmalarda, cıva maruziyeti nörogelişimsel hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca gelişimsel dönemde cıvaya maruz kalmanın otizmde olduğu gibi öğrenme bozukluklarına ve davranışsal anormalliklere neden olabileceği öne sürülmüştür. Bazı araştırmacılar, erken yaşta tiyomersal maruziyetinin “Otizm Spektrum Bozuklukları (OSB)” gelişimi için önemli bir faktör olabileceğini belirtmektedir (35, 36). Toksik metallerin sağlık üzerindeki etkilerinin, toksikokinetikleri, etki biçimleri ve duyarlılıkları nedeniyle erkeklerde ve kadınlarda farklı şekilde ortaya çıkabileceğine dair kanıtlar vardır. Genellikle deneysel toksikolojik araştırmalar için sadece erkek hayvanlar kullanılır. Bu nedenle, birçok çalışmada cinsiyete özgü farklılıkların etkileri (belirli hormon etkileşimleri, iki farklı cinsiyetteki etki mekanizması gibi) genellikle ihmal edilmektedir. Ayrıca, son yıllara kadar çevresel sağlık risk değerlendirmesi ve toksisite çalışmalarının çoğunda cinsiyet farklılıkları gerektiği kadar dikkate alınmamıştır (8, 9).

2.2. Organik Cıva Bileşikleri

Organik cıva formları, elementel cıva karbon ile temas ettiğinde oluşur. Metil cıva ve etil cıva en sık rastlanan organik cıva türleridir (şekil 2.1.) (1). Genellikle “kısa zincirli cıva molekülleri” olarak adlandırılırlar. Her iki bileşik için de primatlarda ana hedef merkezi sinir sistemidir. Etil cıva bileşikleri, metil cıva formlarına göre vücutta inorganik cıvaya daha hızlı dönüştürüldükleri ve böbrek hasarı meydana getirebildikleri için toksisiteleri farklılık gösterir (37). Metabolitleri olan organomerküriyal katyonun, merkezi sinir sisteminde ve böbrekte toksisite

oluşturmaktan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Metil cıvanın vücuttaki yüksek mobilitesi, aminoasit sistein ile bir kompleks oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Bu kompleksin yapısı, büyük ve nötral bir aminoasit olan metiyonine benzer ve bu benzerlik sayesinde ilgili taşıyıcı üzerinden hücrelere giriş kabiliyeti kazanır. Metil cıva indirgenmiş glutatyon (GSH) ile bir kompleks oluşturarak hücrelerden çıkar. Metil cıva hakkında etil cıvadan çok daha fazla toksikolojik bilgi mevcuttur (37).



Şekil 2.1. Metil Cıva ve Etil Cıva Bileşiklerinin Kimyasal Yapısı

Çevre ve besinlerde kirletici olarak en çok bulunan organik cıva türü olan metil cıva, sucul ortamlarda inorganik cıvanın mikroorganizma aracılıklı bakteriyel metilasyonu ile oluşan güçlü bir nörotoksik ajandır (15). Yapısal özelliklerinden dolayı, metil cıva, insanlar tarafından besin olarak tüketilen sucul canlılar da dahil olmak üzere birçok organizmanın yağ dokusunda birikir. İnsanlar metil cıvaya özellikle gıdalar (balık, deniz ürünleri, balık tüketen hayvanlar) aracılığıyla maruz kalır (38). Tüm cıva formları toksik olmasına rağmen, metil cıva küçük bir molekül olduğu için kan beyin bariyerini daha hızlı ve yüksek miktarlarda aşarak nörotoksositeye neden olabilir (39). Kalkarin korteks tutulumuna bağlı olarak görme alanı daralması, somatosensör korteks tutulumuna bağlı duyu bozukluk ve serebellumun granül hücreli nöronlarının tutulumuna bağlı serebellar ataksi metil cıva zehirlenmesine bağlı olarak gelişen yaygın ve karakteristik patolojik durumlardır. Maruziyet sonucu meydana gelen diğer nörolojik bozukluklar dizatri, postural ve aksiyon halinde titremeler, bilişsel bozukluk, işitme kaybı ve denge bozukluklarıdır (40). Ana hedefin serebellum olduğu bilinmekle birlikte, metil cıvanın spesifik hücre tipleri üzerindeki toksik etkileri belirsizliğini korumaktadır (39). Etil cıvanın toksisite profilinin metil cıvadan farklı olduğu düşünülmektedir. *In utero* etil cıva ve metil cıvaya birlikte maruz kalmanın, maddelere ayrı ayrı maruz kalmaktan çok daha fazla nörotoksik etki yaratabildiği bildirilmiştir (41).

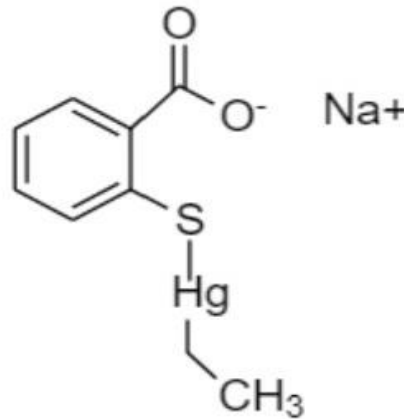
2.2.1. Metil Cıva

Metil cıva insanlarda, özellikle beyinleri henüz gelişme aşamasında olan ve bu nedenle ekzojen toksik maddelere karşı daha hassas olan çocuklarda ciddi sağlık riskleri oluşturan çevresel bir toksik bileşiktir (42-44). Metil cıvaya kontamine gıdalar yoluyla maruz kalındığında diyetten kan dolaşımına kolayca emilir ve beyin dahil tüm dokulara dağılır. Sistein gibi küçük moleküller ile tiyol kompleksleri oluşturma yeteneğinden dolayı vücutta yüksek hareketlilik sergiler (45). Beyindeki metil cıva birikiminin kinetiği, karaciğer veya böbrek gibi periferik organlarınkinden farklıdır (46). Canlılarda metil cıvaya maruziyet sonrası şiddeti büyük ölçüde dozun büyüklüğüne bağlı olan, bir dizi olumsuz sağlık etkisi gözlemlendiği bilinmektedir. Minamata Körfezi ve Irak'taki zehirlenme olayları sırasında aşırı yüksek dozda maruziyetlere bağlı olarak ölümler ve yıkıcı nörolojik hasarlar gözlemlenmiştir. Fetusun metil cıva maruziyetine karşı yetişkinlerden çok daha hassas olduğu bildirilmiştir. *In utero* maruziyetin gelişen merkezi sinir sisteminde geri dönüşü olmayan hasara neden olma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir (19). Minamata Körfezi ve Irak olayları sırasında metil cıvaya *in utero* maruz kalan bebeklerin, zekâ geriliği, nöbetler, serebral palsy, körlük ve sağırılık gibi ciddi engellerle doğdukları bildirilmiştir. Annenin kronik balık tüketiminden kaynaklanan çok daha düşük dozlarda maruziyet sonucu ise, bebeklerin yaşamın ilk birkaç ayında normal görünebildiği; ancak daha sonra belirli nörolojik noktalarda eksiklikler (IQ eksiklikleri, anormal kas tonusu, motor işlevde azalma, dikkat ve görsel-uzaysal algılama ve yeteneklerde bozulma) gösterebildiği tespit edilmiştir. Japonya, Irak ve ABD'deki insan zehirlenmesi vakaları, çocukluk ve yetişkinlik döneminde gerçekleşen maruziyetlerin, merkezi sinir sistemine zarar verebildiğini ve ilk toksisite belirtilerinin genellikle maruziyet sona erdikten birkaç ay sonra ortaya çıktığını göstermiştir (19, 47). Merkezi sinir sisteminde metil cıvanın hem insanlarda hem de hayvan modellerinde nörojenez ve hücre sağ kalımı gibi gelişimsel süreçlere müdahale ettiği bildirilmiştir (4, 48-51). İnsanlarda, özellikle fetusta ve çocuklarda maruziyet düzeyini tahmin etmek zordur ve nörotoksisite için etkili tedaviler henüz tanımlanmamıştır. Cıva nörotoksisitesinin altında yatan hücresel mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamakla birlikte oksidatif stresin merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (4, 5). Metil cıvaya gelişimsel olarak maruz kalmanın olumsuz

etkileri arasında psikomotor gelişimde gecikme, anormal refleksler ve sensorimotor ve bilişsel işlev bozukluğu yer alır (52-56). Kemirgenlerde de gebelik ve/veya doğum sonrası erken gelişim sırasında metil cıvaya erken maruziyetin ardından eksiklikler gözlenmiştir. Bu eksiklikler, labirent öğrenme ve akılda tutmada bozulmalar, spontan motor aktivitede değişiklikler ve normal refleksif davranışların gelişiminde gecikmeler olarak kendini göstermiştir (57-65).

2.2.2. Tiyomersal

Tiyomersal (etil(2-merkaptobenzoato-(2-)-O,S) merkürat (1-) sodyum) aşılar da yer alan ve toksik etkileri olduğu bilinen, “timerosal” olarak da adlandırılan bir bileşiktir. Bu bileşik esas olarak “sodyum etil cıva tiyosalisilat”dır ve ağırlıkça %49,8 cıva içerir.



Şekil 2.2. Tiyomersal Bileşiğinin Kimyasal Yapısı

1930’ların başlarında, “thimerosal” ve “merthiolate” ticari isimleri altında etil cıva tiyosalisilatın, birçok tıbbi preparat ve aşıda koruyucu olarak kullanılmaya başlanmasıyla, insanların bu maddeye farmasötik ürünler aracılığıyla da maruziyeti ortaya çıkmıştır. Aşı içeren çok kullanımlı şişeler, enjektör iğnesi aşı sıvısı ile birçok kez temas ettiğinden, ürün içeriğinde koruyucu bulunması gerekmektedir (66). Tiyomersal, başlıca prezervatif (antibakteriyel ve antifungal) olarak aşıların raf ömrünü arttırmakta kullanılır; ayrıca immüno globulin preparatları, cilt testi antijenleri, antivenomlar, oftalmik ve nazal ürünler ve dövme mürekkepleri gibi ürünlerde de koruyucu olarak yer alır. Oftalmik solüsyonlar, lens temizleme solüsyonları, göz

makyajı ürünleri ve göz makyajı temizlemekte kullanılan solüsyonlarda sıklıkla kullanılan tiyomersalin, alerji ve iritasyon gelişmesine neden olduğu; dermatit ve konjonktivit gibi durumlara neden olabileceği bildirilmiştir (66, 67). Tiyomersalin kullanımının olası toksik etkileri 2001 yılına kadar dikkat çekmemişken, günümüzde ABD’deki çocukluk çağı aşılarının çoğu tiyomersal içermemektedir ancak erişkinlerde kullanılan tetanoz, tetanoz-difteri, tetanoz-difteri-boğmaca, influenza ve meningokokkal polisakkarit aşılarında tiyomersal halen koruyucu olarak kullanılmaktadır. İnfluenza aşısı için tiyomersal dozu azaltılmış ya da tiyomersal içermeyen alternatifler de bulunmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde çocukluk çağında tiyomersal içeren aşıların kullanımı halen devam etmektedir. Türkiye’de bu aşılar ek olarak karma aşılar, kuduz, hepatit B ve tetanoz-difteri aşılarında da tiyomersal bulunmaktadır (37, 68). Son yıllarda hepatit B ve influenza aşıları gibi rutin bağışıklamada önerilen bazı aşılarla tiyomersal bulunması bazı sağlık sorunlarını gündeme getirmiştir. Bebeklik döneminde tiyomersal maruziyetin OSB, “Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (ADHD, DEHB)” ve tik bozuklukları gibi nörogelişimsel bozuklukların riskini artırdığını öne süren çalışmalar vardır (69).

DSÖ’ye bağlı Aşı Güvenliliği Küresel Danışma Komitesi (GACVS) tiyomersalin olası toksisitesini Ağustos 2000’deki bir toplantıda değerlendirmiştir. Tiyomersal, çocuklarda otizmle ilişkilendirildikten sonra alınan önlemler sonucu, günümüzde çocuklara uygulanan aşıların birçoğunda kullanılmamaktadır. Ancak, yetişkinler için influenza, tetanoz, hepatit, pnömokok ve keneler nedeniyle oluşabilecek meningo-ensefalit aşıları halen tiyomersal içermektedir. Büyük Britanya, Kuzey İrlanda ve Danimarka’da, koruyucu olarak tiyomersal içeren aşılarla aşılama ve nöro-davranışsal bozuklukların sıklığı arasındaki ilişkiyi araştıran dört farklı epidemiyolojik çalışmadan elde edilen bulgular, bebeklerde mevcut tiyomersal içeren aşıların güvenliğinde sorun olmadığını bildirmiştir (70-73). Ulusal aşılama programında tiyomersal içeren aşıların kesilmesinin ardından ABD’de nörogelişimsel bozuklukların görülme sıklığında azalma olduğunu iddia eden çalışmalar yayınlanmıştır (74, 75). Ancak, GACVS çalışmaların tasarlanma şeklini ve veri kaynaklarını uygun bulmadığından ilgili çalışmaların sonuçlarının ikna edici olmadığını bildirmiştir. GACVS en son karar olarak farmakokinetik ve gelişimsel çalışmaların aşılarla tiyomersal güvenliği konusundaki endişeleri desteklemediği

sonucuna varmıştır. Yine de devam etmekte olan çalışmalardan doğabilecek tüm epidemiyolojik veriler de dahil olmak üzere kanıtları incelemeye devam edeceğini belirtmiştir. Bu nedenle, halen tiyomersalin aşılar için güvenlik konusu olup olmadığı tartışmalıdır (76).

2.3. Erkek ve Kadın Beyninde Cinsiyet Farklılıkları

Erkek ve kadın beyinlerinin morfolojisi ve işlevleri üzerine yapılan araştırmalar, bazı beyin yapılarının cinsel olarak dimorfik olduğunu göstermektedir. Beyin ve ilgili bölgeler cinsiyetler arasında biyokimyasal, fonksiyonel ve anatomik farklılıklar göstermektedir (77). Anatomik farklılıklar, boyut ve ağırlıktaki değişiklikleri, gri cevher beyaz cevher oranını, beynin çeşitli bölgelerindeki yapısal farklılıkları içerir. Örneğin, erkek beyni kadın beyninden daha ağırdır ve erkeklerin baş çevresi kadınlardan daha büyüktür. Ancak, bu farkın vücut ağırlığı ile karşılaştırıldığında nispi bir fark olmadığı görülmektedir (78). Gri ve beyaz cevher oranları incelendiğinde, erkek beyninde gri cevher, kadın beyninde ise beyaz cevherin daha fazla olduğu bildirilmiştir (79). Ek olarak, birçok nörokimyasal cinsel dimorfizm, nörotransmitter sistemleri ve anatomik farklılıkları içerir. Tüm bu değişiklikler beynin nörolojik hastalıklara farklı tepkiler vermesine neden olur. Ayrıca, bazı nörolojik ve fizyolojik hastalıkların tedavisi iki cinsiyette farklılık gösterebilmektedir (80). Cinsiyet hormonlarının epigenetik etkilerinden dolayı farklı cinsiyetlerde beyin fonksiyonlarında farklılıklar meydana gelebilir. Son yıllarda insan ve hayvan çalışmaları, nörotoksistelerde cinsiyet farklılıklarının beklenenden daha yaygın olduğunu ortaya koymuştur. Cinsiyete özgü semptomların tanınması, risk faktörlerinin gözlenmesi ve cinsiyetin kişiyi belirli metallerin ve kimyasalların toksisitesine karşı daha savunmasız hale getirebileceğini bilmek, etkili önleme ve tedavi stratejileri için son derece önemlidir (81).

İnsanlarda ana seks hormonları olarak görev yapan östrojen ve testosteron, hücrenin çekirdek, sitozol ve hücre zarı gibi farklı bölümlerindeki spesifik steroid hormon reseptörlerine bağlanarak işlevlerini yerine getirir. Östrojen ve testosteron kadın ve erkek vücudundaki farklılıkları belirleyerek, farklı cinsiyet özelliklerine yol açar. Seks hormonlarının uzun veya kısa vadeli etkileri, bağlandıkları yere ve aşağı gen aktivasyonuna göre belirlenir (82-84). Cinsiyet hormonu reseptörleri farklı hücre

tiplerinde bulunur. Ancak bu reseptörler, tüm doğum öncesi, doğum sonrası ve yetişkin beyinlerinde farklı ekspresyonlar gösterir. Bu nedenle, cinsiyet hormonlarının düzeyleri ve etkileşimleri yaşamın belirli dönemlerinde farklılık gösterebilir ve etkileri kesinlikle iki cinsiyet arasında farklılık gösterebilir (85-87).

Östrojenlerin vazoprotektif ve nöroprotektif etkileri vardır (88). Çeşitli *in vitro* çalışmalarda, estradiolün farmakolojik ve fizyolojik konsantrasyonlarda nöronları oksidatif strese karşı koruduğu gösterilmiştir (89-91). Ancak, erkek beynindeki yüksek testosteron düzeyleri, oksidatif strese neden olabilir. Testosteron beyindeki ve nöronlardaki antioksidan düzeylerini azaltabilir ve bu etki nörodejenerasyona yol açabilir (92-94). Öte yandan, düşük testosteron düzeyleri, erken yaşlanma, diyabet, obezite, cinsel işlev bozukluğu ve inme gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (95).

Cıva gibi metallerin metabolizmasında ve toksisitesinde cinsiyet farklılıkları olabileceğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (10-12). Bu farklılıkların maruziyet dozu ve süresi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kadın ve erkek bedenlerinde bu özel metallerin atılımı ve birikimi açıkça farklıdır. Bu olay, farklı cinsiyetlerde ksenobiyotik metabolize edici enzimlerin aktivite ve miktarlarındaki farklılıkla ilgilidir (9). Çalışmalar, östrojen ve testosteronun baskın olmasının beyin için hem avantaj hem de dezavantajlara sahip olduğunu göstermektedir. Östrojenlerin antioksidan etkileri nedeniyle kadın beyinde koruyucu rol oynadığı vurgulanmaktadır. Metaller merkezi sinir sisteminde oksidatif strese neden olabilir. Erkek beyinde yüksek düzeyde testosteron bulunması, oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasını şiddetlendirebilir. Bu nedenle erkeklerin bazı ağır metallerin neden olduğu nörotoksositeye daha duyarlı olabileceği ileri sürülmektedir. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan çalışmaları bu öneriyi desteklemektedir (8, 9, 13, 14).

Cinsiyet ve bağışıklık tepkileri arasındaki ilişki incelendiğinde, bazı bulaşıcı hastalıkların prevalansı ve iki cinsiyetteki direnç farkı ortaya konmuştur. Dişiler, erkeklerden daha güçlü bağışıklık tepkileri sergileyebilir. Erkeklerin çok çeşitli hastalıklara ve enfeksiyonlara karşı daha duyarlı oldukları ileri sürülmektedir. Bu periferik immün yanıtta farklılıklar, otoimmün hastalıkların gelişiminde de rol oynayabilir (96, 97). Proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi gibi olayların çeşitli

nörolojik hastalıkların ve nörodejeneratif bozuklukların başlamasında ve ilerlemesinde rol oynadığı bilinmektedir. İnme (98, 99), multipl skleroz (MS) (100), amiotrofik lateral skleroz (ALS) (101), Alzheimer Hastalığı (AH) (102, 103) ve Parkinson Hastalığı (PH)'nda (104) nörodejenerasyon bölgelerinde inflamatuvar mediyatörler sentezlenir. Nöroenflamasyonun steroidler veya steroid olmayan ilaçlar tarafından inhibisyonu, nörodejenerasyonun azalmasına neden olur (105, 106). Beyindeki bağışıklık fonksiyonu ve inflamatuvar süreçler, seks steroidlerinden, özellikle estradiolden etkilenebilir (107, 108). Östrojenler hücrese düzeyde nöroinflamatuvar kaskadın aktivasyonunu azaltarak ve moleküler faktörlerin salınımını inhibe ederek inflamatuvar yanıtın ilerlemesini engellerler (109, 110). Östrojenlerin nöroprotektif etkileri, immünomodülatör etkileri ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, farklı biyolojik ve kimyasal ajanlara karşı bağışıklık tepkilerinde cinsiyet farklılığı, araştırılması gereken çok önemli bir konu olarak öne çıkmaktadır (111-114).

2.3.1. Estradiol

Kadınlarda östrojenler öncelikle yumurtalıklar ve gebelik sırasında plasenta tarafından üretilirken, testosteron adrenal bezlerden ve erkeklerde testisler tarafından salgılanır. Östrojenler vazoprotektif etkileri ile bilinirler. Farmakolojik ve fizyolojik konsantrasyonlarda farklı etki mekanizmaları sergilerler (88). Çeşitli çalışmalarda estradiolün lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği, nöronları *in vitro* oksidatif strese karşı koruduğu ve farmakolojik konsantrasyonlarda glutamat kaynaklı eksitotoksositeye karşı koruduğu bildirilmiştir (89-91). Fizyolojik konsantrasyonlarda östrojenler, gen ekspresyonunu uyararak veya baskılayarak östrojen reseptörleri üzerinde etkilerini gösterirler (88).

Östrojenlerin nöroprotektif etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Epidemiyolojik çalışmalarda kadınlarda nörodejeneratif bozuklukların görülme sıklığının genellikle erkeklere göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ancak bu etkilerin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (88). Östrojenler ayrıca nöroprotektif ajanlar olarak işlev görerek β -amiloid birikimini modüle edebilir (94).

2.3.2. Testosteron

Üreme işlevlerini yerine getirmekle sorumlu ana erkek cinsiyet hormonu olan testosteron 1930'larda keşfedilmiştir (95). Testosteron, erkeklerde testisler (Leydig hücreleri tarafından), kadınlarda yumurtalıklar (yumurtalık foliküler hücreleri tarafından) ve adrenal bezler tarafından üretilir. Bu androjen, seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) ve albümine bağlı olarak taşınır. SHBG düzeyleri erkeklerde yaşla birlikte artar. Bu nedenle erkeklerde serbest testosteron düzeyleri 60 yaşa kadar azalmakta ve en düşük düzeylere ulaşmaktadır (115). Testosteronun farklı doku, organ ve sistemler üzerinde çeşitli etkileri vardır. Testosteron kas ve kemik kütlesi, libido, yağ dağılımı, cinsel işlev, kırmızı kan hücresi üretimi ve saç uzamasından sorumludur ve üreme işlevlerine ek olarak merkezi sinir sisteminin gelişimini etkiler. Serbest testosteron kan-beyin bariyerini geçebilir ve böylece nöronları etkileyebilir (116).

Düşük testosteron düzeyleri, erken yaşlanma, obezite, cinsel işlev bozukluğu, diyabet ve inme gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (95). Yüksek testosteron düzeyleri kardiyovasküler sisteme zararlı olabilir (117). Testosteron, antioksidan düzeylerini azaltabilir ve bu nedenle beyindeki oksidatif stresi artırabilir. Ancak oksidasyonun türü beyindeki koşullara göre değişebilmektedir (94). Ayrıca, testosteronun sıçanlarda oksidatif stresin neden olduğu nörotoksisiteyi arttırdığı ve nörodejenerasyona yol açtığı bildirilmiştir (93). Orşiektomi beyindeki oksidatif stresi artırabilir. Erkek farelerde kastrasyonun *striatum* ve *substantia nigra* dopaminerjik nöronların kaybına ve ardından PH ile ilişkili patogenezin uyarılmasına neden olabileceği tespit edilmiştir (118). Ek olarak, yüksek testosteron düzeylerinin, erkek hastalarda muhtemelen yüksek oksidatif stres nedeniyle bilişsel gerileme ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (93). Tüm bu veriler, testosteron ve nörodejeneratif hastalıklar arasındaki etkileşim için bir açıklama olabilir.

2.4. Nörolojik Bozukluklarda Cinsiyet Farklılıkları

Nöronlarda meydana gelen yapısal değişiklikler veya nöronların geri dönüşümsüz kaybı sonucu hareket, motivasyon ve hafıza gibi fonksiyonlarda ilerleyici ve kademeli olarak bozulmalar nörodejenerasyon olarak tanımlanmaktadır (119). Nörodejenerasyonun gelişiminde oksidatif stres, mitokondriyal bozukluklar, ER stresi, nöroinflamasyon, yanlış katlanmış proteinlerin üretimi ve birikimi ve eksitotoksisite

gibi biyolojik süreçler gözlenir. Nöronların rejenerasyon kapasitesi oldukça düşük olduğu için beyin pek çok etkiye karşı hassastır. Ayrıca, beyin lipid açısından zengin bir organ olarak yüksek oranda peroksidize edilebilir yağ asitleri içerdiğinden ve sınırlı antioksidan enzim aktivitesine sahip olduğundan oksidatif stres gibi yıkıcı süreçlere diğer doku ve organlardan daha savunmasızdır (94, 121). Ayrıca kodlamayan RNA'lar, genetik mutasyonlar [PH ile ilişkili genlerde (PARK1, PARK4, PARK8), Presenilin-1 (PS1), Presenilin-2 (PS2), Apolipoprotein E (APOE); Frontotemporal demans (FTD) ile ilgili genlerde] ve çevresel faktörler (pestisitler, fungusitler, bağımlılık yapan ilaçlar, potansiyel toksik elementler, virüsler gibi) nörodejenerasyonun gelişiminde rol oynayabilir (121).

Nörolojik ve nörodegeneratif hastalıklara sadece beyinde meydana gelen fizyolojik bozukluklar değil, hastaların genel sağlığını etkileyen çeşitli durumlar da neden olabilir. Bu bozukluklar, nöronlarda kritik bilişsel ve motor fonksiyonların hızlı ve geri dönüşü olmayan kaybının neden olduğu kademeli hasar nedeniyle oluşur. DSÖ'nün son raporları, nörolojik bozuklukların dünya genelinde 1 milyardan fazla insanı etkilediğini vurgulamaktadır. Bu yüksek insidans, cinsiyetin bu hastalıkların ilerlemesi üzerindeki etkilerine odaklanmak için araştırmacıların ilgisini çekmektedir (122).

Yetişkin beyninin gelişimi, yapısı, işlevi ve biyokimyası, cinsiyeti belirleyen genler ve fetal hormonal programlamadaki farklılıklar nedeniyle cinsiyete göre büyük farklılıklar gösterir. Sağlıklı bir insan beyninin anatomik yapısındaki cinsiyete özgü farklılıkların, iki farklı cinsiyette çeşitli hastalıkların patolojisinde, ilerlemesinde ve şiddetinde değişikliklere yol açması kuvvetle muhtemeldir. Ayrıca bu farklılıklar, farklı cinsiyetlerin belirli nörolojik durumlara duyarlılığını da değiştirebilir (80, 123-125). Beyindeki cinsel dimorfizmlerin keşfi, nörolojik hastalıkların ve bozuklukların farklı evrelerinde cinsiyetin önemini anlamak için çok önemlidir (122).

Bazı nörolojik bozuklukların insidans, prevalans ve ilerleme açısından çarpıcı bir cinsiyet yanlılığı vardır (126). AH, özellikle 65 yaş üstü kadınlarda daha yüksek bir prevalansa (1,6-3: 1) sahiptir. AH ayrıca kadınlarda daha fazla ve daha hızlı bilişsel bozulmaya neden olur (127-129). Kadınlarda yaşla artan AH insidansının altında yatan spesifik patojenik mekanizma, genç yaşta mitokondrinin östrojene bağlı amiloid β toksisitesine karşı korunmasıdır. Böylece mitokondri daha az reaktif oksijen türleri

(ROS) üretir ve apoptotik sinyaller kadınlarda erkeklere göre daha azdır. Ancak, ileri yaşlarda östrojen düzeyleri azaldıkça tüm bu avantaj kaybolur. Öte yandan, erkeklerde PH görülme sıklığı (2-3.5: 1) kadınlara göre daha yüksektir (130). Bununla birlikte, erkekler ve kadınlar arasında PH semptomlarındaki ve bilişsel etkilerindeki farklılıklar kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır (131). PH'nin kadınlarda erkeklere göre daha yavaş ilerlediği öne sürülmektedir (132, 133). Otoimmün hastalıklar incelendiğinde, kadınlar erkeklerden daha fazla MS'e yakalanmaktadır (2-3: 1), ancak erkeklerde hastalık daha yavaş ilerlemektedir (134, 135). ALS gibi motor nöron hastalıklarının erkeklerde görülme sıklığı daha fazladır (1.6: 1). Erkeklerde hastalık daha erken başlasa da ALS kadınlarda erkeklere göre daha ölümcüldür (136, 137). Duygudurumla ilgili bozukluklar (depresyon veya anksiyete bozuklukları gibi) kadınlarda daha sık görülür (2:1). Ek olarak, semptomlar daha şiddetlidir ve kadınlar daha yüksek subklinik depresyon insidansı gösterirler (138, 139). Öte yandan, DEHB'de erkekler daha yüksek prevalans göstermektedir (3:1). Ayrıca, erkekler kadınlara göre motor becerilerde daha ciddi eksiklik ve dikkat dağınıklığı yaşarlar (140-143). Şizofreni de erkeklerde kadınlara göre daha yüksek bir insidans (1.4: 1) vardır ve hastalığın başlangıcı erkeklerde kadınlara göre daha erkendir. Erkekler ayrıca şiddetli semptomlarla birlikte zayıf bir prognoza sahiptir ve antipsikotiklere kadınlardan daha olumsuz yanıt verir (144, 145). OSB, disleksi, DEHB ve erken başlangıçlı kalıcı antisosyal davranış gibi birçok nörogelişimsel bozukluk, erkek bireylerde kadınlara göre daha sık görülmektedir (146).

2.5. Metil Cıva ve Tiyomersal ile İlgili Çalışmalar

Metil cıva ve tiyomersalin farklı hücre tipleri üzerinde toksik etkilerini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Morken ve ark. (147) yaptıkları çalışmada, serebellar granül nöronlar ve astrositleri ayrı ayrı ve birlikte metil cıva (5, 10, 25, 50 μ M dozlarında) varlığında çoğaltmışlardır. Takiben sitotoksitenin belirlenmesi için 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve laktat dehidrojenazda (LDH) testleri yapılmıştır. Kortikal astrositlerdeki mitokondrinin, serebellar astrositlerdekilere göre metil cıvanın toksik etkilerine daha duyarlı olduğunu ve hücresel bütünlüğün serebellar astrositlerde daha iyi korunduğunu bildirmişlerdir. Tamm ve ark. (148) yaptıkları çalışmada, metil cıva maruziyetinin

nöral kök hücre (NSC)'lerin canlılığının korunması ve farklılaşması üzerindeki etkilerini araştırmak için NSC C17.2 hücre hattını ve primer embriyonik kortikal NSC'leri (cNSC) kullanmışlardır. Farklılaşmayı incelemek için 2,5 ve 5 nM, apoptozu değerlendirmek için ise 0,05 ve 0,5 μ M dozlarda metil cıva uygulaması yapılmıştır. Araştırmacılar NSC'lerin, özellikle cNSC'lerin metil cıvaya oldukça duyarlı olduğunu göstermişler ve metil cıvanın her iki hücre modelinde de Bax aktivasyonu, sitokrom c translokasyonu, kaspaz ve kalpain aktivasyonu yoluyla apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada metil cıvanın indüklediği apoptoza yol açan hücre içi yolak belirlenmiş ve NSC'lerin metil cıvanın indüklediği sitotoksositeye karşı farklılaştırılmış nöronlardan veya *glia* hücrelerinden daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Engin ve ark. (149) insan dopaminerjik nöronları üzerinde metil cıva ve cıva (II) klorür ile oluşan sitotoksitenin belirlenmesi ve oluşacak sitotoksitenin şiddeti üzerinde kafein ve interferon- γ (IFN- γ)'nın etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, farklı dozlarda (1, 2 ve 5 μ M) metil cıva ve (1, 2 ve 5 μ M) cıva (II) klorürü SH-SY5Y hücre hattına uygulamışlardır. Cıva maruziyetini takiben, oksidatif stresin şiddetinde artış, mitokondriyel metabolik aktivitede ise düşüş görüldüğü belirtilmiştir. Metil cıvanın inorganik cıvaya göre daha toksik olduğu bildirilmiştir. Cıva ile indüklenen nöronal ölümün, glutamat-aracılıklı eksitotoksositeye bağlı olduğu belirtilmiştir. Shao ve ark. (39) yaptıkları çalışmada, birincil serebellar granül nöronları (CGN'ler) ve serebellar astrositleri izole ederek, metil cıva (0, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 μ M dozlarda) uygulamışlar, maruziyet sonrası toplam cıva birikimi, hücre içi ROS üretimi ve tam hücre proteom ekspresyonu açısından analiz etmişlerdir. Hücre içi cıva konsantrasyonuna bağlı olarak ROS düzeylerinde artış görülmüş ve cıva birikiminin CGN'lerde astrositlerden daha fazla olduğu bildirilmiştir. Proteomik analizde, CGN'ler ve astrositlerde sırasıyla toplam 1966 ve 3214 proteini tanımlanmış, bunların sırasıyla 183 ve 262'sinin cıva maruziyetinden sonra farklı şekilde eksprese edildiği belirtilmiştir. Enrichment (Zenginleştirme) analizinde, her iki hücre tipinde de metil cıvanın ana hedeflerinin mitokondriye bağlı organeller olduğu bildirilmiştir. CGN'lerde nörotrofin sinyal yolağı, hücre iskeleti, siklik AMP (cAMP) sinyal yolağı ve tiroit hormonu sinyal yolağı etkilenirken, astrositlerde en belirgin şekilde oksidasyon-redüksiyon yolağının değiştiği gözlenmiştir. CGN'ler metil cıva aracılıklı nörotoksositeye astrositlerden daha duyarlı olarak bulunmuştur. Sudo ve ark. (15)

yaptıkları çalışmada, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde metil cıvanın nörotoksik etkilerini incelemeyi ve etki mekanizmalarını karakterize etmeyi amaçlamışlardır. Metil cıvanın (0,3, 1, 3, 10, 30 μM) doz bağımlı olarak LDH salınımına, kaspaz aktivasyonuna, hücre döngüsünde değişikliklere, hücre canlılığının azalması ve buna bağlı hücre içi ROS oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. Chung ve ark. (150) yaptıkları çalışmada metil cıvaya (1-5 μM) maruz bırakılan Neuro-2a hücrelerinin apoptoza girdiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda, Neuro-2a hücrelerinin metil cıvaya maruz bırakılması sonucu, ER stresinin tetiklendiği ve ER stresinin göstergesi olan birçok proteinin [glikoz düzenlenmiş protein 78 (GRP78), glikoz regüle protein 94 (GRP94), C/EBP homolog protein (CHOP), X-box bağlayıcı protein 1 (XBP-1), protein kinaz R-benzeri ER kinaz (PERK), ökaryotik başlangıç faktörü 2 α (eIF2 α , aktivasyon transkripsiyon faktörü 4 (ATF4) ve aktivasyon transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)] ekspresyonunun değiştiği belirtilmiştir. GRP78, GRP94, CHOP ve XBP-1'e özgü siRNA ile transfeksiyonun, bu proteinlerin ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı, metil cıvaya maruz kalan hücrelerde sitotoksisite ve kaspaz-12, -7 ve -3 aktivasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, metil cıvanın Akt fosforilasyonunu önemli ölçüde azalttığı ve Akt1 (myr-Akt1) aktivasyonunun aşırı ekspresyonunun, apoptotik ve ER stresine ilgili sinyalleri de önemli ölçüde önleyebildiği gösterilmiştir. Çalışmanın sonucunda, metil cıvanın sitotoksik etkisini, ROS aracılı Akt inaktivasyonu ve ER stresini indükleyerek ve bunların sonucunda da apoptozu tetikleyip, nöronlarda hücre ölümüne yol açarak gösterdiği ortaya konmuştur. Metil cıvanın indüklediği oksidatif stresin apoptoz üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, oksidatif stresin ER ve mitokondri işlevi üzerindeki etkileri araştırılmış ve özellikle primer kortikal nöron hücre kültürlerinde mitokondriyal apoptoz yollarının aktivasyonu, katlanmamış protein yanıtı (UPR) ve ER stresine odaklanılmıştır. Hücreler 1-6 saat boyunca 0; 0,25; 0,5 veya 1 μM dozlarda metil cıvaya maruz bırakılmış, ardından hücre canlılığı ölçülmüştür. Çalışmanın sonucunda, metil cıvanın nöronal oksidatif stres ve apoptozu indüklediği; GRP78, GRP94, spliced XBP1 ve ATF4 mRNA'larının ekspresyonlarını arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, metil cıvanın kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonunu etkilediği ve sitokrom c artışı ile mitokondriyal işlevi bozduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, metil cıvanın ER ve mitokondri üzerinden nöronal apoptozu indüklediği ve oksidatif stres ile apoptoz

aktivasyonuna aracılık etmede önemli rol oynadığı sonucuna varmışlardır (151). Ayrıca *in vitro* çalışmalarda metil cıva maruziyetinin; hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmantasyonu, mitokondriyal işlev bozukluğu, kaspaz bağımlı yolak aktivasyonu, otofaji, hücre içi Ca^{+2} düzeyleri ve kalpain aktivasyonundaki artış gibi apoptotik olaylar ile gözlenen nöronal hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (152, 153).

Sıçan ve fareler üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, metil cıvanın tekrarlayan dozlarına maruziyet sonucu, merkezi sinir sistemi ve özel duyuşal sistemde anormal tepkiler ve işlev bozuklukları ortaya çıktığı, nöronal hücrelerde hücre sayısının dramatik bir şekilde azaldığı ve hücre ölümünün/apoptozun indüklendiği bildirilmiştir (64, 154, 155). Desaulniers ve ark. (156) yaptıkları çalışmada metil cıvaya (0,02 ya da 2 mg/kg/gün) *in utero* ve postnatal maruziyet sonucu DNA metilasyonundaki değişiklikleri incelemişlerdir. Gebe sıçanlara gestasyonun 1. gününden postnatal 21. güne kadar 2 farklı dozda metil cıva uygulanmıştır. Gelişim döneminde cıvaya maruz kalan sıçanlarda, belirli genlerin promotör bölgelerinde ve DNA metilasyon yolundan sorumlu olan önemli enzimlerin ekspresyon düzeylerinde azalmış bir metilasyon kalıbı gözlenmiştir. Carvan ve ark. (157) yaptıkları çalışmada, metil cıvanın, zebra balıklarında sperm epimutasyonları ve nöro-davranışlar üzerine doğrudan maruz kalma ve jenerasyonlar arası etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. F0 jenerasyon embriyoları, 24 saat *ex vivo* olarak metil cıvaya (0, 1, 3, 10, 30 ve 100 nM) maruz bırakılmışlar; takiben F1 ve F2 jenerasyonları yetiştirilmiştir. Doğrudan maruz kalma (F0 kuşağı) ve jenerasyonlar arası geçişle maruziyet (F2 kuşağı) değerlendirilmiş ve F2 jenerasyonunda kontrole oranla hiperaktivite ve görsel işitsel aktivitelerde bozukluk gözlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, F0 jenerasyonuna göre F2 jenerasyon sperm epimutasyonlarında artış gözlenmiştir. Metil cıvanın neden olduğu anormal davranış kalıpları ve sperm epimutasyonlarının özellikle F2 jenerasyon yetişkin zebra balıklarında daha belirgin olarak ortaya çıktığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, cıvanın zebra balıklarında epigenetik değişikliklerin jenerasyonlar arası aktarılabilirdiği belirlenmiş ve bu durumun başta insanlar olmak üzere tüm organizmalarda önemli epigenetik değişikliklere yol açabileceği ön görülmüştür. Cıvanın hayvan modellerinde epigenom üzerindeki etkilerine dair mevcut veriler olmasına rağmen, insan epigenomu üzerindeki olası etkisi hakkında veriler sınırlıdır (158).

2.6. Metil Cıva ve Tiyomersal Toksisitelerinde Cinsiyet Farklılıkları ile İlgili Çalışmalar

Toksik metallerin sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinin, toksikokinetik, etki şekli ve duyarlılık farklılıkları nedeniyle erkeklerde ve kadınlarda farklı şekilde ortaya çıktığına dair veriler sınırlıdır. Birçok epidemiyolojik çalışmanın sonunda elde edilen veriler erkekler ve kadınlar için ayrı ayrı rapor edilse de de cinsiyet farklılıkları nadiren değerlendirilir. Ayrıca, deneysel toksikolojik çalışmalarda çoğunlukla sadece erkek hayvanlar kullanılmış ve bu nedenle belirli hormonların olası etkileri konusunda olası mekanizmalar belirlenmemiştir (9).

Hem insanlarda hem de deney hayvanlarında farklı cinsiyetlerde metil cıva metabolizmasının farklılıklarını gösteren çalışmalar mevcuttur. Ancak, sonuçlar çelişkilidir. Araştırmacılar 56 günlük erkek (n=4) ve dişi (n=4) Long-Evans sıçanlara kg başına 1 µmol deri altı işaretli metil cıva (²⁰³Hg) klorür uygulamışlar ve dokulardaki toplam cıva ve organik ve inorganik cıva konsantrasyonlarını ölçmüşlerdir. Dişilerde toplam vücut cıva klerensinin erkeklerden daha hızlı olduğu ve böbrek ve beyindeki metil cıva dozunun erkeklere göre daha yüksek pik yüzdelerine ulaştığı bildirilmiştir. Aynı hayvanlarda dozlamadan sonra 98 gün boyunca idrar ve feçes ile cıvanın atılım kinetiği takip edilmiş; cıvanın ana atılım yolunun feçes olduğu ve dozlamadan 98 gün sonra feçeste kümülatif cıva atılımının erkeklerde dozun yaklaşık %51'ini ve dişilerde dozun %54'ünü oluşturduğu belirtilmiştir. İdrarla atılım cıva klerensi için daha küçük bir yol olarak belirtilmiş olsa da bu eliminasyon yolu için de cinsiyet farklılıkları bildirilmiş, organik cıvanın idrarla kümülatif atılımının erkeklerde dozun %1,8'ini ve dişilerde dozun %5,3'ünü oluşturduğu belirtilmiştir (159, 160). Araştırmacılar, dişi (n=40) ve erkek (n=40) farelere gastrik tüp ile kg başına 1 µmol ²⁰³Hg işaretli metil cıva klorür uygulamışlar ve toplam karaciğer, böbrek, beyin, kan, yağ, kas, kemik, deri ve saçta metil cıva birikiminin tespiti için 3., 10., 20. ve 30. günlerde örnek almışlardır. Tüm vücut eliminasyonu başlangıçta birinci derece kinetiği izlemiş, erkekler ve dişiler için yaklaşık yarı ömürler sırasıyla 7 ve 12 gün olarak tespit edilmiştir. Deney süresince, erkek farelerde kan, beyin ve kaslardaki cıva düzeylerinin dişi farelere göre daha düşük olduğu, ancak cıvanın böbrekte birikiminin önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir. 30. günde, dişilerin karaciğer, beyin ve saçlarında erkek sıçanlara göre yaklaşık 2 kat fazla cıva bulunduğu

tespit edilmiştir. Araştırmacılar, yarı ömürlerdeki farklılıklar ve iki cinsiyetin dozlamadan sonraki farklı günlerde farklı organlarda farklı cıva düzeylerine sahip olmasını, erkek ve dişi farelerde metil cıvanın toksikokinetiğinde büyük farklılıklar olmasına bağlamışlardır (161).

In vitro ve *in vivo* çalışmalar, sülfidril grupları ile etkileşimlerin, mikrotübül destabilizasyonunun, hücre içi kalsiyum düzeylerindeki değişikliklerin ve ROS oluşumunun, metil cıva nörotoksitesinin başlangıcında kritik mekanizmalar olduğunu göstermiştir (162-166). Sıçan beyinde antioksidan savunma sistemlerinin aktivitesinde cinsiyete bağlı farklılıklar olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin katalaz (CAT) aktivitesi dişilerde, nitrit/nitrat üretimi erkeklerde daha yüksektir (167). Dişi sıçanlarda mitokondrinin, erkeklere kıyasla daha fazla antioksidan enzim ekspresyonu ve daha düşük ROS üretimi sergilediği bulunmuştur (168).

Yapılan bir çalışmada, araştırmacılar genç erişkin Wistar sıçanlara farklı dozlarda (12, 240, 1440, 3000 µg Hg/kg) postnatal enjeksiyonlarla tiyomersal uygulamışlardır. Doğum sonrası erken yaşam boyunca tiyomersal dozlarının tamamına maruz bırakılan yetişkin erkek ve dişi sıçanlarda açık alan testinde lokomotor aktivitede bozulmalar ve artan kaygı/neofobi görüldüğü bildirilmiştir. Tiyomersal verilen erkek sıçanlarda tüm dozlarda genel lokomotor aktivitede önemli bir azalmanın gözleendiği, benzer bir etkinin dişi sıçanlarda sadece en yüksek dozda kaydedildiği belirtilmiştir. En yüksek dozu alan her iki cinsiyetten hayvanlarda da prososyal etkileşimlerin sıklığının azaldığı; erkeklerde asosyal/antisosyal etkileşimlerin sıklığı artarken, dişilerde azaldığı gözlenmiştir. Tiyomersale maruz kalan sıçanlarda ayrıca, beyin dopaminerjik sisteminde değişiklikler olduğunu düşündüren, immünohistokimyasal boyama ile ölçülen *striatal* D2 reseptörlerinin yoğunluğunda belirgin bir düşüşün eşlik ettiği, haloperidol kaynaklı katalapseide azalma görüldüğü bildirilmiştir. Bulgular doğum sonrası erken dönem tiyomersal maruziyetinin, doz ve cinsiyete bağlı olarak beyinde kalıcı nörodavranışsal bozukluklara ve nörokimyasal değişikliklere neden olduğunu ve erkek sıçanların dişilere göre nörotoksik etkilere daha duyarlı olduğunu göstermiştir (169). Başka bir çalışmada, araştırmacılar perinatal dönemde tiyomersal maruziyetinin oksidatif stres nedeniyle merkezi sinir sistemi ve özellikle beyincik gelişimini bozduğu varsayımını

test etmek için yaptıkları çalışmada, spontan hipertansif (SHR) ve Sprague-Dawley (SD) dişi sıçanlara gebelik (gebelik günleri G10-G15 arasında) ve emzirme (P5-P10) döneminde tiyomersal (200 µg/kg) uygulamışlardır. Tiyomersale maruz bırakılan SD yenidoğanlarda gecikmiş bir irkilme tepkisi gözleendiği ve SHR erkek (%22,6), SD erkek (%29,8) ve SD dişi (%55,0) yenidoğanlarda motor öğrenmenin azaldığı bildirilmiştir. Tiyomersale maruz bırakılan SH sıçan yavrularında, P4'te rollover süresinin erkek yavrularda %59, dişilerde ise sadece %13 azaldığı bulunmuştur. Tiyomersale maruz bırakılan SHR sıçan yavrularında, P14'te ölçülen irkilme tepkisi, dişilerde aynı kalırken, erkeklerde %12,2 oranında azalmıştır. SD sıçanlarda, irkilme tepkisi gösteren erkek yavruların oranı %27,8 ve dişi yavruların oranı %19,2 azalmıştır. Tiyomersale maruz bırakılan erkek yenidoğan SD sıçanlarında 3-nitrotirozinin (3-NT, protein tirozin oksidasyonunun gösteren bir oksidatif stres belirteci) serebellar düzeylerinin %14 arttığı, dişi yenidoğanlarda önemli bir değişiklik gözlenmediği tespit edilmiştir. Tiyomersale perinatal maruziyetin erkek SHR sıçanlarında serebellar tip-2 iyodotironin deiyodinaz (DIO2) aktivitesinde %60,9 oranında önemli bir azalmaya neden olduğu, bu durumun dişilerde gözlenmediği bildirilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler, perinatal tiyomersal maruziyetinin cinsiyete ve suşa bağlı değişen olumsuz nörogelişimsel etkileri olduğunu göstermiştir (170). Araştırmacılar gebelik (G10-G15) ve doğum sonrası günlerde (P5-P10) SHR sıçanlara tiyomersal (200 µg/kg) uygulamışlardır. Triiyodotironin (T3) tarafından negatif olarak düzenlenen bir gen olan SWIM-Tip 1 Çinko parmak 7 ilişkili protein (SWIM-Type Zinc Finger 7 Associated Protein 1, SWAP-1) ekspresyonunun tiyomersal uygulanan erkeklerde %61 arttığını, dişilerde ise herhangi bir artış olmadığını bildirmişlerdir. Ek olarak, tiyomersal maruz kalan erkeklerde Purkinje hücre proteini 2 (Pcp2) ve Forkhead kutu proteini P4 (FoxP4) ekspresyonlarında azalma tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu sonuçlara göre tiyomersalin toksik etkilerinin cinsiyete göre farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir (171).

Estradiolün, östrojen reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla koruyucu moleküllerin sentezini indükleyerek de oksidatif strese karşı koruma sağlayabildiği bildirilmiştir (89, 172, 173). Cinsiyet farklılıklarının kronik metil cıva toksisitesindeki rolü bu mekanizmalarla da açıklanabilir. Araştırmacılar, Çin'in Zhejiang Eyaleti, Zhoushan şehrinde yenidoğanlarda ve annelerde cıva düzeylerini ve *in utero* cıvaya

maruz kalma ile yenidoğanların nörodavranışsal gelişimi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. 408 anket yapılmış, annelerden 405 saç örneği ve yenidoğanlardan 406 kordon örneği toplanmış; 384 yenidoğan üzerinde davranışsal nörolojik değerlendirmeler yapılmıştır. Kordon kanı örneklerinde ve anne saç örneklerinde cıva düzeyleri sırasıyla 5,58 µg/L (aralık: 3,96-7,82 µg/L) ve 1246,56 µg/kg (aralık: 927,34-1684,67 µg/kg) olarak belirlenmiştir. Yenidoğanların %70'inde cıva düzeylerinin, Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından bildirilen referans dozu (RfD = 5,8 µg/L) aştığı tespit edilmiştir. Prenatal cıva maruziyetindeki artış, erkeklerde davranışsal yeteneklerde azalma ile ilişkilendirilirken, kadınlarda bu ilişki gözlenmemiştir (174). 1950'lerde Japonya'nın Minamata şehrinde şiddetli ve yaygın metil cıva kirliliğinin etkisini, doğumdaki yavruların cinsiyet oranını ve ölü doğumdaki fetusları incelemek için retrospektif bir çalışma yapılmıştır. 1955-1959 yılları arasında, kirliliğin en şiddetli olduğu dönemde daha az erkek çocuk doğduğu gözlemlenmiştir. Bu 5 yıllık süre boyunca, Minamata şehri genel popülasyonu, en çok maruz kalan meslek grubu olan balıkçılar ve Minamata hastalığı olan hastalar arasındaki doğum sertifikalarından elde edilen veriler kullanılarak yavruların cinsiyet dağılımı hesaplanmıştır. Benzer şekilde Kumamoto şehir nüfusundaki ölü doğan fetusların cinsiyet oranı da ilgili istatistikler kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm şehir nüfusunda ayrıca hem balıkçılar hem de anne Minamata hastalarından doğan bebeklerde erkek doğumlarında azalma gözlenmiştir. Bu durumlar erkek fetusların cıva kontaminasyonuna kadınlardan daha duyarlı olabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, doğumda erkek/kadın oranının düşük olmasının genellikle annelerin metil cıvaya maruz kalmasından kaynaklandığı bulunmuştur. Minamata hastalığı olan annelerde erkek çocuk oranı artarken, anneler sağlıklı ve babalar hasta olduğunda erkek olma olasılığının önemli ölçüde değişmediği de gösterilmiştir (12).

2.7. Oksidatif Stres

Oksidatif stres artrit, kanser, otoimmün hastalıklar, yaşlanma, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynar. Yaş, genetik ve çevresel risk faktörleri nedeniyle oksidatif-antioksidatif denge bozulur ve ROS ve reaktif azot türleri (RNS)'nin düzeyleri artar. Dolayısıyla, enerji üretimi için oksijeni kullanan mitokondrinin, oksidatif stresin ana kaynaklarından biri olduğu

düşünülmektedir. Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat [NAD(P)H] ve aşırı stimülasyondan sonra elektron taşıma zinciri, çok miktarda ROS üretimine neden olur. Her ne kadar daha düşük konsantrasyonlarda ROS/RNS fizyolojik süreçlerde önemli rol oynasa da (örneğin, sinyal yolları, mitojenik yanıtın indüklenmesi, bulaşıcı patojenlere karşı savunma), endojen antioksidan savunma sisteminin aşırı ROS üretimini dengelemede zorlanması sonucu oksidatif stres meydana gelir ve bu ROS posttranslasyonel modifikasyonlara, proteinlerin, lipitlerin, DNA ve RNA'nın oksidasyonuna neden olur (175).

Beyin birçok nörodejeneratif hastalığın temelinde yatan mekanizma olan oksidatif strese karşı en hassas organlardandır. Genel olarak, beyin, hücresel rejenerasyon için diğer organlara kıyasla daha az kapasiteye sahip, metabolik olarak hiperaktif bir organdır. Bu nedenle de reaktif türlerin bu sistem üzerindeki etkileri ciddi toksik yanıtlar yaratır (175). Memeli beyni nispeten yüksek oranda oksijen tükettiğinden, nöronların oksijenli solunum sonunda meydana gelen ROS yan ürünlerine yüksek oranda maruz kalmasına yol açar; beyinde antioksidanlar tükenirse, nöronlar ROS kaynaklı DNA hasarına duyarlı hale gelirler (176). Mitokondriyal DNA hasarı, mitokondriyal disfonksiyon ve baz eksizyon onarımındaki defektlerin nöronal işlevleri olumsuz etkileyebildiği ve böylece nörodejeneratif hastalık riskini artırabildiği bilinmektedir. DNA onarım genlerinde mutasyonlar olan bireylerde ve ayrıca DNA onarımı açısından belirli genlerinde mutasyon oluşturulan fare modellerinde nörolojik işlev bozukluğu görüldüğü belirlenmiştir. Diğer taraftan, DNA onarım yollarının ve DNA hasarına karşı gelişen koruyucu mekanizmaların nöropatolojinin önlenmesinde rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (176).

“Nörodejeneratif hastalıklar” terimi, insan beyni veya omurilikte nöronların dejenerasyonundan kaynaklanan progresif sinir sistemi disfonksiyonu ile karakterize edilen çeşitli kalıtsal ve sporadik koşulları tanımlar. Nöronlar hasar aldıkça, bireylerde ilk önce koordinasyon problemleri veya isimleri hatırlama gibi nispeten hafif semptomlar yaşanırken, ölen nöronların sayısındaki artışla birlikte, semptomlar giderek kötüleşir ve bu hastalıkların çoğu ölümcüldür. Oksidatif hasar ve sitogenetik hasar şeklindeki DNA hasarı, büyük ölçüde Alzheimer hastalarının beyinlerinde ve periferik dokularında klinik ve prelinik evrelerde tespit edilmiştir ve nörodejeneratif sürece katkıda buldukları düşünülmektedir. Mitokondriyal işlev bozukluğu ve

mitokondriyal DNA (mtDNA) hasarı da PH'de tespit edilen hasarlardır. Hastalığın ailesel formlarına neden olan genlerin bazılarının, mitokondriyal proteinleri veya mitokondri ile ilişkili proteinleri kodladığı ve bu proteinlerin oksidatif strese neden olan ve serbest radikal hasarını ortaya çıkaran yollarda bulunmaktadır. Oksidatif DNA hasarının ALS'de motor-nöron dejenerasyonuna da katkıda bulunduğu düşünülmektedir (177). RNA düzenlenmesi ve RNA hasarının son yıllarda birçok nörodejeneratif hastalıkla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. RNA düzenlenmesi ile DNA'da yazılı olmayan yeni protein sekanslarının üretilmesi mümkün olmaktadır. Araştırmacılar, RNA düzenlenmesinin şizofreni, bipolar bozukluk ve majör depresyonda da bozulabildiğini, diğer nörogelişimsel bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıklarda da incelenmesi gerektiğini bildirmişlerdir (178).

2.8. Apoptoz

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü tiplerinden biridir. Özellikle sinir sisteminde normal gelişimin önemli bir parçasıdır. Programlanmış hücre ölümünü başlatan uyarıcılardaki zamansal veya niceliksel hatalar veya programlanmış hücre ölümü yolları içindeki hatalar anormal sayıda nöron üretimi ve patolojik nöronal gelişim ile sonuçlanabilir. Merkezi sinir sistemindeki apoptoz mekanizmasının, mitokondriyal, ölüm reseptörü ve enflamatuvar yollar olarak bilinen üç sinyal yolu içerdiği öne sürülmüştür (179). Nöron sayılarındaki artış ve düşüşler sadece AH, PH, MS, ALS ve Huntington hastalıkları gibi tipik nörodejeneratif hastalıklarda değil, aynı zamanda ADHD, depresyon, şizofreni ve otizm de dahil olmak üzere çeşitli nörogelişimsel bozukluklarda da gözlenmiştir (180).

2.9. Nörotransmitter Sistemler

Sinir sistemi, duyuusal bilgileri işler ve çok sayıda hesaplama yaparak davranışı kontrol eder. Bu hesaplamalar hem hücreler içinde hem de hücreler arasında gerçekleşir. Ancak, sinir sistemine olağanüstü işlevsel kapasitesini sağlayan karmaşık sinir ağlarını içeren hücreler arası bilgi işlemedir. Bilgi işlemede yer alan başlıca hücreler, morfoloji, konum, bağlantı ve kimyası değişen yüzlerce, hatta binlerce bireysel hücre tipi bulunan nöronlardır. Nöronlara ek olarak, sinir sistemindeki diğer

ana hücre türü, kritik destek rolleri oynayan, ancak bilgi işlemenin bazı yönlerinde giderek daha fazla işlev gördüğü tespit edilen *gliadır* (181).

Nöronlar arasındaki bilgi aktarımı kimyasal maddeler, yani nörotransmitterler aracılığıyla gerçekleşir. İletim ayrıca nöronlar ve glial hücreler arasında da meydana gelir. Bu üçlü sinaps olarak adlandırılır (182). Otto Loewi, 1926'da asetilkolinin *vagus* sinirinden kalbe, kalp ritmini yavaşlatan kimyasal bir sinyal taşıdığını göstererek ilk nörotransmitteri keşfetmiştir. O zamandan beri, yüzden fazla madde ve çok daha fazla sayıda reseptörün sinaptik iletimde rol oynadığı gösterilmiştir (181).

Bir kimyasal maddenin nörotransmitter olarak tanımlanabilmesi için gerekli olan özellikleri şunlardır (182);

- Sinir terminallerinde bulunması
- Elektriksel olarak uyarılan nöronlardan salınması
- Salınan maddenin etkisini sona erdirmek için bir mekanizmanın bulunması
- Spesifik reseptörlerin varlığı

Nöronlar bilgiyi almak, işlemek ve iletmek için özelleşmiştir. Bilgi nöronlar arasında elektriksel olarak ve kimyasal olarak (nörotransmitterler tarafından) iletilir. Nörotransmitterler salındıktan sonra, sinaps boyunca yayılarak postsinaptik reseptörlere bağlanırlar. Büyük çoğunluğu temsil eden kimyasal sinapslara ek olarak, boşluk bağlantılarından hücreler arasında iyon akışına izin veren elektriksel sinapslar da vardır. Elektriksel sinapslar, nöronlar arasında basit elektrik sinyallerinin geçmesine izin verirken, kimyasal sinapslar hücreler arasında uyarıcı, engelleyici ve karmaşık biyokimyasal bilgilerin geçmesine izin verir (181).

Birçok nöronda birden fazla nörotransmitter vardır. Nörotransmitterler uyarıcı ya da engelleyici etki gösterebilirler ve etkileri tepki verdikleri reseptöre bağlı olarak değişebilir. Ayrıca aynı nörotransmittere karşı uyarıcı ya da engelleyici etki meydana getirebilecek reseptörler mevcut olabilir. Sinaptik iletim maksimum 30 ms'lik bir hızla gerçekleşir, başlangıcı ve sonlandırılması son derece hızlı olarak gerçekleşir. Postsinaptik reseptörlere bağlanma, iyonik kanalların açılmasına ve daha uzun süreli intranöronal süreçlerin (cAMP, sinyal iletimi gibi ikincil haberciler) aktivasyonuna yol açar (182).

Kimyasal bir sinapsın ana yapısal elemanları, presinaptik bir sinir terminali, nörotransmitter reseptörleri ve uygun bir hücre içi sinyal aparatını içeren postsinaptik bir yapı ve aradaki sinaptik boşluktur. Çoğu kimyasal sinapsta, nörotransmitter vezikül başına birkaç bin molekül olan sinaptik veziküllerde depolanır. NO ve CO gibi gaz halindeki nörotransmitterler depolanamaz. Sinaptik veziküller, aktif bölgeler olarak adlandırılan ve ayrıca yüksek yoğunlukta voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları içeren, presinaptik terminal içinde zarın özel bölgelerinde kümelenir. Klasik bir kimyasal iletim durumunda, bir nörotransmitter presinaptik bir nöron tarafından salınır ve postsinaptik nörondaki reseptörlere bağlanır; tipik olarak bu reseptörler, hücrenin birincil alıcı yapıları olan nöronun hücre gövdesinden gelen filamentli uzantılar olan dendritler üzerinde lokalizedir. Kimyasal bilgi, reseptörler ve ilişkili proteinler tarafından, iyon kanallarının aktivasyonu ile elektriksel bilgiye dönüştürülür. En basit durumda kanal, nikotik asetilkolin reseptörleri veya γ -aminobütirik asit (GABA) reseptörleri gibi, nörotransmitter reseptörünün kendisinin içsel bir bileşenidir. Dinlenme durumunda nöronal membran polarize olur ve negatif bir yük taşır. İyon kanallarını düzenleyerek, nörotransmitter bağlanması, zar boyunca iyon akışlarını aktive edebilir. Hangi kanal türlerinin etkinleştirildiğine bağlı olarak, hücreye 'hiperpolarize edici negatif yükler' veya 'depolarize edici pozitif yükler' girebilir. Negatif ve pozitif yük dengesi, nöronun dendritleri ve hücre gövdesi içinde bütünleşir ve eğer bir depolarizasyon eşiğine ulaşırsa, özel voltaj kapılı Na^{+} kanalları art arda açılır ve akson boyunca bir depolarizasyon dalgası oluşturur. Bu aksiyon potansiyeli olarak tanımlanır. Aksonun distal ucuna (presinaptik terminaller) bir aksiyon potansiyeli ulaştığında, pozitif yük akımı voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarını aktive eder. Ca^{+2} girişi daha sonra veziküllerin presinaptik hücre zarı ile kaynaşarak nörotransmitterleri sinaptik boşluğa saldırdığı süreçleri başlatır (181, 183, 184).

2.9.1. Serotonin

Serotonin (5-HT) indolamin yapılı bir nörotransmitterdir. İndol çekirdeğinin 5 konumundaki hidroksil grubu ile fizyolojik pH'ta proton alıcısı olarak görev yapan bir birincil amin azotunun kombinasyonu serotoninini hidrofilik bir madde yapar. Bu nedenle lipofilik kan-beyin bariyerini kolayca geçmez (185). Hayvanların gastrointestinal sisteminde, trombositlerinde ve merkezi sinir sisteminde ve tüm

bilateral hayvanlarda bulunur. Serotonin beyin sapının medyan rafesinden kaynaklanan ve birçok beyin ve omurilik bölgesine, özellikle omuriliğin dorsal boynuzlarına ve hipotalamusa uzanan çekirdekler tarafından salgılanır. Enterokromaffin hücrelerinden salgılanan serotonin daha sonra dokulardan kana geçer. Onu depolayan kan trombositleri tarafından aktif olarak alınır. Trombositler bir pıhtıya bağlandığında, serotonin bir vazokonstriktör görevi gördüğü ve hemostaz ve kan pıhtılaşmasını düzenlemeye yardımcı olduğu yerden dışarı atılır (186, 187). Hipotalamus, ön hipofiz bezinden hormonların salgılanmasını kontrol etmek için birkaç serbest bırakma faktörü salgılar ve inhibe edici faktörleri serbest bırakır. Serotonin hipofiz salgısının hipotalamik kontrolünde, özellikle adrenokortikotropin, prolaktin ve büyüme hormonunun salgılanmasının düzenlenmesinde yer alan birçok nörotransmitter arasındadır. Hipotalamusun paraventriküler çekirdeğindeki serotonerjik terminaller ile kortikotropin salgılatıcı hormon içeren nöronlar arasında doğrudan bir sinaptik bağlantı olduğu bilinmektedir (185).

Serotonin, neredeyse tüm insan davranışsal süreçlerini modüle eder. Buna rağmen merkezi sinir sistemi nöronlarının milyonda birinden daha azı serotonin üretir. Ayrıca toplam vücut serotonininin büyük çoğunluğu merkezi sinir sistemi dışında bulunur (188). Bununla birlikte, beyin sapındaki serotonin nöronları, kortikal, limbik, orta beyin ve arka beyin bölgelerinde sonlanan iyi düzenlenmiş ve organize projeksiyonlar iletir. Tüm beyin bölgeleri, reseptör alt tipine özgü çoklu serotonin reseptörlerini eksprese eder (189). Ayrıca bireysel nöronlar birden fazla serotonin reseptörü ifade edebilir. Serotonin tarafından düzenlenen başlıca davranışsal ve nöropsikolojik süreçler arasında ruh hali, algı, ödül, öfke, saldırganlık, iştah, hafıza, cinsellik ve dikkat bulunur. Serotoninin, düzenlenmesine dahil olmadığı bir insan davranışı hemen hemen yoktur (190).

Serotonin, nörotransmitter olarak işlevinde, depresyon, otizm ve diğer nöropsikiyatrik bozukluklardaki rolü ile iyi bilinmektedir. Serotonerjik sistem, embriyogenez sırasında en erken gelişen sistemlerden biridir ve serotonin düzeylerindeki erken değişiklikler, belirli beyin bölgelerinin gelişiminde büyük değişiklikler meydana getirebilir. Serotoninin düzenlenmesi ve işleyişi, insanlarda serotonin taşıyıcı polimorfizmi gibi genetik risk faktörlerinden etkilenir. Bu polimorfizm, otizm spektrum bozukluklarından muzdarip hastalarda da görülen

anksiyete ile ilişkili semptomlar, sosyal davranıştaki değişiklikler ve kortikal gri ve beyaz cevher değişiklikleri ile ilişkilidir (191).

2.9.2. Serotonin Taşıyıcı Protein

Serotonin taşıyıcı protein, nörotransmitter sodyum simporter ailesinin bir üyesidir. Beyindeki ve birçok periferik dokudaki SERT, serotoninin nöronlara, enterokromaffin hücrelerine, trombositlere ve diğer hücelere aktif taşınmasından sorumludur. Merkezi sinir sisteminde hem sinir terminallerinin perisinaptik zarlarında hem de dendritik çardaklarda, orta beyindeki ve beyin sapı rafe çekirdeklerindeki serotonin içeren hücre gövdelerinin yakınında yer alır (192). Periferde, SERT ayrıca enterik sinir sistemindeki hücrelerde ve kan trombositlerinde, mast hücrelerinde ve plasentanın sinsityotrofoblast hücrelerinde bulunur. Fluoksetin gibi antidepresanların ve kokain gibi suistimal edilen ilaçların SERT'i inhibe ettiği bilinmektedir (193).

SERT, nöronal stimülasyonun ardından salınan serotoninin hızlı bir şekilde çıkarılmasına ve geri dönüştürülmesine aracılık eder. Bu nedenle serotonin reseptörlerine ulaşan sinyallerin büyüklüğü, süresi ve dağılımının homeostatik düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir. SERT, dopamin gibi diğer endojen aminleri de taşıma kabiliyetine sahiptir. Ayrıca fenfluramin, nonfenfluramin, süstitüe amfetaminler (MDMA ve p-kloroamfetamin), metkatinon ve 1-metil4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) gibi ajanlar için de bir ilaç taşıyıcıdır. SERT yoluyla nöronlara giren ajanların nörodejeneratif değişikliklerin eşlik ettiği kalıcı (aylarca süren) serotonin düşüşlerini indüklediği bildirilmiştir (194-197).

2.9.3. Dopamin

Katekolaminler bir çekirdek katekol grubu, yani iki bitişik hidroksil grubuna sahip bir benzen grubu ve ek süstitüelere sahip olabilen tek bir amin grubuna sahip bir etilamin yan zinciri içerir. Beyindeki baskın katekolaminler dopamin, norepinefrin ve epinefrindir. Katekolamin nörotransmitterleri ilk olarak otonom sinir sisteminde bulunmuştur. Tirozin hidroksilaz, substratları tirozin ve moleküler oksijenin 3,4-dihidroksi-1-fenilalanine dönüşümünü katalize eder. Dopamin sentezinde başlangıç ve hız sınırlayıcı basamak olan katekolamin sentezindeki en önemli enzimdir. Merkezi sinir sisteminde ve kromaffin granüllerinde uyararla indüklenen katekolamin salınımı

ekzositoz ile gerçekleşir. Voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları yoluyla hücreye Ca^{+2} girişini takiben, sinaptik vezikül membrana kaynaşır ve içeriğindeki katekolaminleri boşaltır. Veziküller, aktif bölge adı verilen sinapsla örtüşen sinir terminalindeki özel bir bölgeye hedeflenir ve burada zara kenetlenir ve kaynaşır. Veziküler içeriğin ekzositozundan sonra, kesecik endositoza ve geri dönüşüme uğrar (198). Sentezlenen ve salınan dopaminin miktarı, sinapstaki dopaminerjik reseptör (DR) sayısı ve dopaminin sinaptik boşlukta geçirdiği süre gibi çeşitli faktörler dopaminerjik sinir iletimini etkiler. Salınan dopamin postsinaptik hücrede bir yanıt uyandırmak için DR'lere bağlanır. Dopamin daha sonra sinapstan öncelikle dopamin taşıyıcı protein (DAT) tarafından temizlenir; burada geri dönüştürülmek ve veziküller halinde yeniden paketlenmek üzere presinaptik nörona döner (199).

Mezolimbik, mezokortikal, nigrostriatal ve tuberoinfundibular olmak üzere dört ana dopaminerjik yol vardır. Mezolimbik yol ventral tegmental alandan (VTA) kaynaklanır ve çekirdek akumbens olarak da bilinen ventral striatumu innerve eder. Bu yol, ödül ve zevkle ilgilidir. Mezokortikal yol da yine VTA'dan kaynaklanır ve serebrumun ön loblarına, özellikle prefrontal kortekse yansır ve bilişsel durum ve duygu ile ilgilidir. Hem mezolimbik hem de mezokortikal yol bağımlılık, depresyon ve şizofreni ile ilişkilendirilmiştir. Nigrostriatal yol, hücre gövdeleri *substantia nigra*da başlayan ve dorsal *striatum*da sonlanan nöronlardan oluşur. Bu alan hareketle ilgilidir ve bu projeksiyonların dejenerasyonunun, titreme, kas sertliği ve genel olarak uygunsuz hareket ile karakterize edilen PH'ye neden olduğu gösterilmiştir (200). Ayrıca bu bölgenin beslenme davranışında da önemli olduğu gösterilmiştir (201). Son olarak, hipotalamusun arkuat çekirdeğinde *median eminense* yansıyan bir grup dopaminerjik nörona atıfta bulunan tuberoinfundibular yolun nöronları, ön hipofiz bezinden prolaktin salgılanmasını kontrol eder (202).

Katekolamin sistemleri, beyin sapının ve hipotalamusun sınırlı bölgelerinde hücre gövdelerine ve beyin boyunca yaygın olarak çıkıntı yapan nöronlara sahiptir. Dopaminerjik çekirdekler esas olarak orta beyinde (A8 ila A10 grupları) veya diensefalon, olfaktör bulbus ve retinada (A11 ila A17 grupları) bulunur. A8 ila A10 grupları, *substantia nigra* (A9) ve ventral tegmental alanı (A8, A10), *neostriatum* (kaudat putamen), limbik korteks (medial prefrontal, cingulate ve entorhinal alanlar) ve diğer limbik yapılarla bağlayan uzun projeksiyon sistemlerinden oluşur. Rostral

yerleşimli A9 çekirdeği, esas olarak dorsal kaudat putamenlere yansır ve nigrostriatal yolu içerir. Bu yol, *globus pallidus* ve subtalamik çekirdeği içeren bazal gangliyonların bir parçasıdır. A8 ve A10 çekirdeklerinin limbik ve frontal kortikal alanlara projeksiyonları sırasıyla mezolimbik ve mezokortikal yolları içerir (183, 198). Dopamin, endokrin düzenleme (hipotalamik nöronlar), hareket (nigrostriatal nöronlar), motivasyonel süreçler, öğrenme, ödül, duygusal davranış, ruh hali ve biliş (nigrostriatal, mezolimbik ve mezokortikal nöronlar) gibi bir dizi fizyolojik ve davranışsal süreçte rol oynar. Dopaminerjik sistem, antipsikotik ilaçlar, anti-Parkinson ilaçları, uyarıcılar ve suistimal edilen ilaçlar tarafından hedeflenmektedir. Merkezi dopaminerjik sistemlerdeki anormallikler birçok merkezi sinir sistemi hastalığına katkıda bulunur (198, 203, 204).

2.9.4. Dopamin Taşıyıcı Protein

Dopamin taşıyıcı protein, iyon-bağlı ikincil taşıyıcılar süper ailesine ait olan nörotransmitter sodyum simporterleri ailesinin bir üyesidir. Bu aile bugüne kadar tanımlanmış 1000'den fazla üyesi olan taşıyıcıların membran proteinlerinin en büyük ailesi olarak bilinir (205). Bu proteinler, iyonları, ilaçları, nörotransmitterleri ve diğer hidrofilik çözünen maddeleri taşır (206). Dopaminerjik nörotransmisyonun sonlandırılması, ya monoamin oksidazın aracılık ettiği enzimatik bozunma ya da DAT yoluyla plazma zarı boyunca dopamin translokasyonu yoluyla gerçekleşir. Veziküllerin presinaptik membran ile kalsiyum aracılı füzyonunun bir sonucu olarak sinaptik boşluğa dopamin salınımı üzerine DAT, dopamin taşınmasını sağlamak için sinaptik boşluk ve presinaptik nöron arasındaki iyonik gradyanları kullanır. Geri alındıktan sonra dopamin daha sonra VMAT2 tarafından veziküllere işlenir. Dopaminin sinir terminalinde alımı ve ardından lokalizasyonu, nörotransmisyonu sona erdirir ve sonraki salınım için nörotransmitterin geri dönüşümüne izin verir (207, 208). Dopamin taşıyıcı protein (DAT), dopamin homeostazında kritik bir role sahiptir. İşlev kaybı ve taşıyıcının düzenlenmesinin dopamine bağlı hastalıklarda rol oynadığı bilinmektedir. Örneğin, klinik depresyonda (209) ve şizofreni hastalarında (210) striatal DAT bağlanması azalma görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca dopamin taşıyıcı genindeki (DAT1) genetik farklılıklar, çeşitli nöropsikiyatrik bozukluklar için risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. DAT'ın ayrıca alkolizm (211) ve amfetamin gibi

psikostimülanların suistimal edilmesi (212) dahil olmak üzere bağımlılıktaki rolü de iyi bilinmektedir.

2.10. Epigenetik Değişiklikler

Epigenetik terimi, DNA dizisinde kodlanmayan genlerin ekspresyonundaki tüm mayotik ve mitotik kalıtsal değişiklikleri tanımlamaktadır. Altta yatan DNA dizisinin kendisinde değişiklik olmadan, gen ekspresyonunda fenotipik değişiklikler meydana gelmektedir (213). Gen susturmayı başlatmak ve sürdürmekten sorumlu başlıca üç sistem, DNA metilasyonu, RNA ile ilişkili gen susturma ve histon modifikasyonudur. Bu sistemler arasındaki ilişkilerin çözülmesi nasıl etkileştiklerini ve birbirlerini nasıl dengelediklerini göstermektedir. Bu etkileşimli sistemlerden birinin veya diğerinin bozulması, genlerin uygunsuz ifadesine veya susturulmasına yol açarak epigenetik bozukluklar ile sonuçlanabilmektedir (214, 215). Nörodejeneratif bozuklukların klinik özellikleri ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bu hastalıkların etiyolojisinde epigenetik değişikliklerin önemli bir katkısı olduğunu düşündürmektedir. Epigenetik modülasyonların beynin gelişiminde, nöroplastik değişikliklerde ve sinir sisteminin çeşitli hastalıklarındaki rolleri bilinmektedir (215). Çok hücreli organizmalar, kalıtsal gen susturma kalıplarına olanak sağlayan güçlendirici mekanizmalara ihtiyaç duyarlar. Global epigenetik profilleri etkileyen genlerdeki mutasyonların, kalıtsal veya somatik olarak gelişebilen insan hastalıklarına yol açabildiği bilinmektedir. Bu epigenetik anormalliklerin çoğu, kromozomal değişikliklere ve öğrenme gücüne neden olur (214). DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunun nörodejeneratif hastalıkların önemli bir göstergesi olan depresyonda da rol oynadığı tespit edilmiştir (216, 217). Epigenetik mekanizmaların öğrenme ve hafıza oluşumu sürecine katkıda bulunduğu da çalışmalarla gösterilmiştir (218, 219).

DNA metilasyonu, guaninlerden (CpG dinükleotitleri olarak adlandırılan) önce gelen bir sitozin nükleotidine bir metil grubu eklendiğinde (DNA'daki sitozin kalıntılarının C5 pozisyonunun metilasyonu) meydana gelir. Global metilasyon, toplam sitozin yüzdesi olarak ifade edilen genomdaki genel metilsitozin düzeyini ifade eder (215). Bir genin transkripsiyonel aktivitesini aktive ederek veya baskılayarak DNA'nın fonksiyonunu etkiler (220). İnsan genomu içindeki CpG bölgelerinin metilasyonu, bir dizi DNA metiltransferaz enzimi tarafından sürdürülür ve transpoze

edilebilir elementlerin susturulması, viral dizilere karşı savunma ve belirli genlerin transkripsiyonel baskılanması için çok yönlü rollere sahiptir. 5-Metilsitozin oldukça mutajeniktir, C:G'den T:A'ya geçişlere neden olur ve insan DNA'sındaki CpG metil alıcı bölgesinin güçlü bir şekilde baskılanmasıyla sonuçlanır (214). DNA metilasyonu, çeşitli organizmaların genomunda bulunan çok önemli bir epigenetik modifikasyondur. Gelişim, farklılaşma, dokuya özgü gen ekspresyonu ve hücrel işlevde yer alır. Ayrıca, epigenetik yeniden programlama, X-kromozomu inaktivasyonu ve genomik damgalamada da temel bir rol oynar (221). Metallerin oluşturduğu karsinojenik etkinin altında DNA metilasyon kalıplarındaki bozulmaların olduğuna dair kanıtlar vardır. Hipermetilasyon, tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerinin transkripsiyonunu engeller, bu da spesifik genlerin sessizliğine yol açarken, global hipometilasyon da onkogenin ana nedeni olarak kabul edilmektedir (222).

Beyin gelişimi sırasında DNA metilasyonunun, nöral kök hücrelerin proliferasyonunu ve bunların nöronlara ve glial hücrelere farklılaşmasını düzenlemede önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Nöronların farklılaşması, büyüme konisi davranışlarını düzenleyen aktin filamentlerini ve aksonların ve dendritlerin uzamasını ve stabilizasyonunu düzenleyen mikrotübülleri içeren hücre iskeletinin belirgin bir şekilde yeniden düzenlenmesini içerir (223). Farklılaşan nöronlar, nörotransmitterler, sitokinler ve nöropeptitler için iyon kanallarını, nörotransmitterleri ve reseptörleri (downstream sinyal proteinlerini) kodlayan genleri upregüle eder. Nöronal farklılaşma ilerledikçe genel DNA metilasyon düzeyleri azalır (224).

Histon proteinlerinin modifikasyonları, kromatin yapısı ile ilişkilidir ve transkripsiyonun epigenetik düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Spesifik olarak asetilasyon, histon kuyruklarının pozitif yükünü nötralize eder ve DNA'ya olan afinitesini azaltır. Bu, histon proteinlerinin yapılandırılmış düzenini bozarak ve kromatin yapısını gevşeterek gerçekleştirilir ve böylece transkripsiyon bağlanmasına daha erişilebilir hale gelir (225). Histon kuyruklarındaki lizin kalıntılarının metilasyonu ve asetilasyonu gibi translasyon sonrası histon modifikasyonları ise esas olarak kromatin yapısını değiştirerek gen ekspresyonunu etkiler (220, 226). Genel olarak, histonların asetilasyonu, aktif, transkripsiyonel olarak yetkin bölgeleri işaretlerken, hipoasetillenmiş histonlar, transkripsiyonel olarak aktif olmayan

ökromatik veya heterokromatik bölgelerde bulunur (214). Histon asetiltransferazlar gen ekspresyonunda görev alırken ve histon deasetilazlar gen ekspresyonunu susturmada işlev görürler. Bu enzimlerin düzenlenmesi, bir bireyin yaşamı boyunca bütünlüklerini sürdürmeleri gerektiğinden, özellikle nöronal hücrelerde hücre kimlik ve homeostaz için çok önemlidir. Nöronal hücrelerde anormal bir epigenetik düzenleme, nörodejenerasyon gibi patolojik sonuçlara yol açar (227, 228).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür	Sigma-Aldrich
Dimetil Sülfoksit	Duchefa Biochemical
DNA İzolasyon Kiti (Quick-DNA™ Miniprep Kit)	Zymo Research
DNA/RNA Oksidatif Hasar Kiti	Cayman Chemical
Dulbecco's Modified Eagle's Besiyeri (DMEM)-Ham's F12 w/L-Glutamin w/15 mM HEPES	Biowest
Dulbecco Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (DPBS)	Biowest
Etanol	JT Baker
Florometrik Hücre İçi ROS Kiti	Sigma-Aldrich
Fetal Sığır Serumu (FBS)	Biowest
Glutasyon Kiti	Cayman Chemical
Glutasyon Peroksidaz Kiti	Cayman Chemical
Hücre Liziz Reaktifi (Cell Lytic MT)	Sigma-Aldrich
Kaspaz 3, 8, 9 Deney Kiti	Abcam
Katalaz Kiti	Cayman Chemical
Penisilin-Streptomisin	Biological Industries
Proteaz İnhibitör Kokteyli	Sigma – Aldrich
Protein Karbonil Kiti	Cayman Chemical
Protein Miktar Tayini Kiti	Cayman Chemical
Süperoksit Dismutaz Kiti	Cayman Chemical
TBARS Deney Kiti	Cayman Chemical
Tripsin-EDTA	Sigma – Aldrich
Metil Cıva	Sigma – Aldrich
Tiyomersal	Sigma – Aldrich
Testosteron	Sigma – Aldrich
Estradiol	Sigma – Aldrich
SH-SY5Y Hücre Hattı	ATCC
SERT Kiti	Elabscience
Serotonin Kiti	Elabscience
Dopamin Kiti	Cusabio
DAT Kiti	Elabscience
Global Metilasyon Kiti	Abcam
Histon Asetilasyon Kiti	Epigentek

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

96 Kuyucuklu Plak	Greiner Bio-One
Biyogüvenlik Kabini	Holten, LaminAir Model
Buz Makinası	Scotsman AF100
Buzdolabı	Arçelik, 2 kapılı
Derin Dondurucu (-20°C)	Arçelik, Tek kapılı
Derin Dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Distile Su Cihazı	MES mp Minipure, mes08/Thermo Scientific
Hassas Terazı	Mettler Toledo, XS105
Hücre Kültürü Uyumlu Flask (25, 75, 175 cm ²)	Corning, Isolab
Işık Mikroskobu	Leica
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments Funtion Line
Kriyo Tüp	Greiner Bio-One
Lamel	Isolab
Mikro Santrifüj	Heraeus, Hettich, Mikro22
Nanodrop	Maestrogen Spectrophotometer
Neubauer Lamı (Hücre sayım lamı)	Marienfeld
Otoklav	Nüve NC40M
Otomatik Pipetler	Eppendorf
Otomatik Pipet Uçları	Eppendorf, Top-Line
pH Metre	Isolab
Steril Serolojik Pipetler (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One
Steril Santrifüj Tüpleri	Greiner Bio-One
Santrifüj	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
Spektrofotometre / Spektroflorometre	Molecular Devices, SpektraMax M2
Su Banyosu	Memmert, Edelstaht Rostfrei
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX- 3000L

3.3. Kullanılan Hücre Hattı

SH-SY5Y hücre hattı, 4 yaşındaki bir kız çocuktan alınan, kemik iliği dokusundan elde edilmiş epitelyal morfolojide nöroblastoma hücreleridir. Hem adherent hem de süspande hücreleri içerir. Orijinal olarak bir metastatik kemik tümörü biyopsisinden türetilmiş, SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) hücreleri, ana SK-N-SH (ATCC® HTB-11™) soyunun üçüncü alt klonudur (SK-N-SH>SH-SY>SH-SY5>SH-SY5Y).

3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Metil Cıva, Tiyomersal, Testosteron ve Estradiol Çözeltilerinin Hazırlanması

Metil cıva: 251,08 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. 6,277 mg tartılarak 10 ml besiyerinde çözülür ve 2500 µM ana stok çözeltisi hazırlanır.

Tiyomersal: 404,81 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. 4 mg tartılarak 5 ml besiyerinde çözülür ve 2000 µM ana stok çözeltisi hazırlanır.

Testosteron: 288,42 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. 0,173 mg tartılarak 6 ml besiyerinde çözülür ve 100 µM ana stok çözeltisi hazırlanır.

Estradiol: 272,38 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. 6,8095 mg tartılarak 10 ml besiyerinde çözülür ve 2500 µM ana stok çözeltisi hazırlanır.

Çalışma gruplarının dozlanması için gereken diğer konsantrasyonlar besiyeri ile seyreltilerek bu ana stok çözeltilerden hazırlanır.

3.4.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Hücreler %15 (h/h) FBS ve %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş DMEM-Ham's F12 w/L-glutamin w/15 mM HEPES içeren kültür ortamında inkübatörde (37°C ve %5 CO₂) büyütülmüştür. Besiyeri 500 ml'lik DMEM-Ham's F12 w/L-Glutamin w/15 mM HEPES içeren şişe içerisine %15 (h/h) olacak şekilde 88 ml FBS ve %1 olacak şekilde 5,9 ml penisilin/streptomisin eklenerek hazırlanmıştır.

3.4.3. Sitotoksisite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Dimetil Sülfoksit:

Oda sıcaklığında sıvı halde bulunan 1,1 g/ml yoğunluğa sahip uçucu bir bileşiktir. Kullanıma hazır şekildedir.

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür (MTT) Çözeltisi:

15 mg 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür tartılarak, 3 ml Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS) içerisinde çözünür ve 27 ml besiyeri ile 30 ml'ye tamamlanır. Bu şekilde 0,5 mg/ml konsantrasyonda MTT çözeltisi hazırlanmış olur. Hazırlanan çözelti karanlıkta saklanmalıdır ve 24 saat boyunca dayanıklıdır.

3.4.4. Hücre İçi ROS Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

ROS Tayin Reaktifi:

Reaktifi oluşturmak için vial içerisine 40 µl DMSO eklenir. Pipetlenerek iyice karıştırılır. Çözelti -20°C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

Dimetil Sülfoksit:

Kit 0,2 ml DMSO içermektedir. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır.

Deney Tamponu:

Kit 20 ml deney tamponu içermektedir. -20°C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

Master Reaksiyon Karışımı:

Hazırlanan ROS tayin reaktifinden 20 µl alınır ve üzerine 10 ml deney tamponu eklenir. Oda sıcaklığında 2 saat içinde kullanılmalıdır. -20°C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

3.4.5. CAT Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu (10X):

Her vialde 5 ml deney tamponu bulunmaktadır. 2 ml deney tamponu 18 ml distile su ile 20 ml'ye tamamlanarak seyreltilir ve 1X konsantrasyona ulaşılır. Hazırlanan çözelti 100 mM potasyum fosfat (pH 7,0) içermektedir. 4°C'de saklandığında 2 ay boyunca dayanıklıdır.

Örnek Tamponu (10X):

Her vialde 10 ml örnek tamponu bulunmaktadır. 5 ml örnek tamponu 45 ml distile su ile 50 ml'ye tamamlanarak seyreltilir ve 1X konsantrasyona ulaşılır. Hazırlanan çözelti (pH 7,5) 25 mM potasyum fosfat, 1 mM EDTA ve %0,1 BSA içermektedir. Örnek tamponu, formaldehit standartlarını, katalaz kontrolü ve örnekleri seyreltmek için kullanılır. 4°C'de saklandığında 2 ay boyunca dayanıklıdır.

Katalaz Formaldehit Standardı:

Vial 4,25 M formaldehit içerir. Stok standart çözeltisini hazırlamak için vial içerisinden 10 µl katalaz formaldehit standartı alınır ve 9,99 ml 1X örnek tamponu ile seyreltilir. Hazırlanan formaldehit ara stok çözeltisinin konsantrasyonu 4,25 mM olur. Daha sonra final konsantrasyonları 0; 5; 15; 30; 45; 60 ve 75 µM formaldehit içerecek şekilde bir seri standart çözelti hazırlanır. Bunun için stok standart çözeltisinden 0 µl, 10 µl, 30 µl, 60 µl, 90 µl, 120 µl ve 150 µl alınarak, sırasıyla 1000 µl, 990 µl, 970 µl, 940 µl, 910 µl, 880 µl ve 850 µl örnek tamponu ile seyreltilir.

Katalaz (Kontrol):

Her vial liyofilize halde sığır karaciğeri CAT enzimi tozu içermektedir ve pozitif kontrol olarak kullanılır. Vial içerisine 2 ml örnek tamponu eklenerek sulandırılır. Elde edilen çözeltiden 100 µl alınır ve 1,9 ml örnek tamponu ile seyreltilir. Bu seyreltilmiş enzimin kuyucuk başına 20 µl'lik miktarı, arka plan absorbansının çıkarılmasından sonra yaklaşık 0,29'luk bir absorbansa neden olmaktadır. Seyreltilmiş enzim çözeltisi 30 dakika (dak); sulandırılmış Katalaz (Kontrol) ise -20°C'de bir ay dayanıklıdır.

Potasyum Hidroksit Çözeltisi:

Her vial 4 ml 10 M potasyum hidroksit (KOH) içerir. Reaktif, tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. 4°C’de 3 ay dayanıklıdır.

Hidrojen Peroksit Çözeltisi:

Vial 8,82 M H₂O₂ çözeltisi içerir. 40 µl çözelti 9,96 ml distile su ile seyreltilir. 35,28 mM konsantrasyona sahip çözelti elde edilir. Seyreltilmiş çözelti 2 saat dayanıklıdır.

Purpald (Kromojen):

Her vial 0,5 M hidroklorik asit içinde 4 ml 4-amino-3-hidrazino-5-merkaptotriazol (purpald) içermektedir. Reaktif, tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır.

Potasyum Periyodat:

Her vial 0,5 M potasyum hidroksit içinde 1,5 ml potasyum periyodat içermektedir. Reaktif, tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır.

3.4.6. SOD Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**Deney Tamponu (10X):**

3 ml deney tamponu 27 ml distile su eklenerek 30 ml’ye tamamlanır ve bu şekilde konsantrasyon 1X olacak şekilde seyreltilir. Hazırlanan 1X deney tamponu 0,1 mM dietilentriamin pentaasetik asit (DTPA) ve 0,1 mM hipoksantin içeren, pH’ı 8,0 olan 50 mM Tris-HCl tamponudur ve radikal dedektörü seyreltmek için kullanılır. 4°C’de saklandığında 2 ay boyunca dayanıklıdır.

Örnek Tamponu (10X):

2 ml örnek tamponu 18 ml distile su eklenerek 20 ml’ye tamamlanır ve bu şekilde konsantrasyon 1X olacak şekilde seyreltilir. Örnek tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 8,0) SOD standartlarını hazırlamak ve ölçüm yapılacak örnekler ile ksantin oksidazı seyreltmek için kullanılır. 4°C’de saklandığında 6 ay boyunca dayanıklıdır.

Radikal Dedektör:

Radikal dedektörü vial içerisinde 250 µl tetrazolyum (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum) tuzu çözeltisi içermektedir. Bu çözülden 50 µl alınır ve 19,95 ml deney tamponu (1X) eklenerek seyreltilir. Folyo ile sarılarak ışıktan korunması sağlanır. Hazırlanan çözelti 2 saat boyunca dayanıklıdır. Hazır hale getirilmeyen çözelti -20°C’de saklanmalıdır.

SOD Standart Çözeltileri:

Vial içerisinde 100 µl sıgır eritrosit SOD (Cu/Zn) çözeltisi bulunmaktadır. Çözülen enzim buz üzerinde bekletilmelidir. Öncelikle SOD stok çözeltisini hazırlamak için vial içerisinden 20 µl SOD çözeltisi alınır ve 1,98 ml 1X örnek tamponu ile seyreltilir. Daha sonra final konsantrasyonları 0; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03, 0,04 ve 0,05 U/ml SOD aktivitesine sahip olacak şekilde bir seri standart çözelti hazırlanır. Bunun için seyreltilmiş SOD stok çözeltisinden sırasıyla 0 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 120 µl, 160 µl ve 200 µl alınarak, 1000 µl, 980 µl, 960 µl, 920 µl, 880 µl, 840 µl ve 800 µl örnek tamponu ile seyreltilir. Kullanılmayan enzim -20°C’de saklanmalıdır. Enzim iki donma/çözülme döngüsüne dayanıklıdır.

Ksantin Oksidaz:

Kit içerisindeki vialler 150 µl ksantin oksidaz içermektedir. Kullanım öncesi bir vial çözdürülür ve 50 µl enzim alınarak 1,95 ml örnek tamponu (1X) ile seyreltilir. Buz üzerinde bekletilir. Hazırlanmış enzim 1 saat dayanıklıdır ve yeniden dondurulmamalıdır.

3.4.7. Glutatyon Peroksidaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu (10X):

Vial içinde 5 ml 10X deney tamponu bulunmaktadır. 5 ml deney tamponu (10X) 45 ml distile su ile 50 ml’ye tamamlanır ve 1X çözelti elde edilir. Hazırlanan çözelti 5 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) tamponudur. 4°C’de saklandığında hazırlanan deney tamponu 6 ay boyunca dayanıklıdır.

Örnek Tamponu (10X):

Vial içinde 3 ml 10X örnek tamponu bulunmaktadır. 2 ml örnek tamponu (10X) 18 ml distile su ile 20 ml'ye tamamlanır ve 1X tampon elde edilir. Hazırlanan çözelti 5 mM EDTA ve 1 mg/ml BSA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) tamponudur. GPx kontrolünü ve örnekleri seyreltmek için kullanılır. 4°C'de saklandığında hazırlanan deney tamponu 1 ay boyunca dayanıklıdır.

Glutasyon Peroksidaz (Kontrol):

Vial 50 µl sığır eritrosit GPx içermektedir. Tekrarlanan donma/çözülme önlemek için GPx birkaç küçük şişeye bölünerek -20°C'de saklanmalıdır. 10 µl enzim buz üzerinde başka bir viala aktarılır ve 490 µl örnek tamponu ile 500 µl'ye tamamlanır. Seyreltilmiş enzim buz üzerinde 4 saat dayanıklıdır.

Kosubstrat Karışımı:

Vial liyofilize halde glutasyon ve glutasyon redüktaz içermektedir. İçerik 6 ml deney tamponu ile sulandırılarak hazır hale getirilir. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 2 saat, 4°C'de ise 2 gün dayanıklıdır. Hazır hale getirilmiş reaktif dondurulmamalıdır.

NADPH:

Vial liyofilize NADPH içermektedir. İçerik 6 ml deney tamponu ile sulandırılarak hazır hale getirilir. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 2 saat, 4°C'de ise 2 gün dayanıklıdır.

Kümen Hidroperoksit:

Kit 2,5 ml kümen hidroperoksit içermektedir. Reaktif, tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır.

3.4.8. Glutasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**2-(N-morfolin) Etansülfonik Asit (MES) Tamponu (2X):**

Tampon pH 6,0 olacak şekilde 0,4 M MES, 0,1 M fosfat ve 2 mM EDTA içermektedir. 60 ml tampon 60 ml distile su ile 120 ml'ye tamamlanır ve 1X tampon elde edilir.

Okside Glutasyon (GSSG) Standartı:

Her vial MES tamponu içerisinde 2 ml 25 µM GSSG içermektedir. Standart tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. GSSG, GSH yerine standart olarak kullanılır. Deney koşulları altında, GSSG hızlı bir şekilde GSH'ye indirgenir ve böylece gerekli standardı sağlar. 0-4°C'de tedarik edildiği şekilde saklandığında 1 yıl dayanıklıdır. GSSG standartlarını 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 µM konsantrasyonlarında hazırlamak için sırasıyla 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 µl stok çözeltisinden alınır ve üzerlerine sırasıyla 500, 495, 490, 480, 460, 420, 380, 340 µl 1X MES tamponu eklenir.

Kofaktör Karışımı:

Kit liyofilize halde NADP⁺ ve glukoz-6 fosfat tozu içermektedir. Vial içeriği kullanılmadan önce 0,5 ml distile suda çözülerek hazırlanır. Sulandırılmış reaktif, 0-4°C'de saklandığında 2 hafta dayanıklıdır.

Enzim Karışımı:

Vial içerisinde 0.2 ml tampon içinde glutasyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz içermektedir. Dikkatlice açılan şişeye 2 ml 1X MES Tamponu eklenir ve iyice karıştırılır. Hazırlanan karışım 0-4°C'de saklandığında 2 hafta dayanıklıdır.

5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik) Asit (DTNB):

Vial liyofilize DTNB tozu (Ellman reaktifi) içermektedir. Vial içeriği 0,5 ml distile su ile sulandırılır ve iyice karıştırılır. Hazırlanan reaktif 10 dak içinde kullanılmalıdır.

Deney Kokteyli:

11,25 ml MES tamponu, 0,45 ml ko-faktör karışımı, 2,1 ml enzim karışımı, 0,45 ml DTNB ve 2,3 ml distile suyun 20 ml'lik şişede karıştırılmasıyla elde edilir. Deney kokteyli hazırlandıktan sonra 10 dak içinde kullanılmalıdır.

3.4.9. Lipit Peroksidasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Tiyobarbitürik Asit (TBA):

Vial 2 g tiyobarbitürik asit (TBA) içermektedir. Renk reaktifini hazırlamak için kullanılır.

Asetik Asit:

Her vial 20 ml konsantre asetik asit içermektedir. 2 vial (40 ml) asetik asit 160 ml distile su 200 ml'ye tamamlanarak seyreltilir. Bu seyreltilmiş asetik asit çözeltisi, renk reaktifinin hazırlanmasında kullanılır. Çözelti oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi (10X):

Vial NaOH çözeltisi içerir. 20 ml NaOH 180 ml distile su ile 200 ml'ye tamamlanarak 1X'e seyreltilir. Bu seyreltilmiş NaOH çözeltisi renk reaktifinin hazırlanmasında kullanılır. Çözelti oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır, ancak aşınmaya karşı uygun bir plastik kaptaki saklanmalıdır.

Malondialdehit Standardı:

Vial 500 µM malondialdehit (MDA) çözeltisi içermektedir. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Standart eğrinin oluşturulmasında kullanılır. Bu çözeltiden 250 µl alınır ve 750 µl distile su ile 1 ml'ye tamamlanarak seyreltilir. 125 µM'lık ara stok çözeltisi bu şekilde elde edilir. MDA final konsantrasyonları 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 25 ve 50 µM olacak şekilde bir seri standart çözelti hazırlanır. Bunun için seyreltilmiş MDA stok çözeltisinden sırasıyla 0 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 200 µl ve 400 µl alınarak, 1000 µl, 995 µl, 990 µl, 980 µl, 960 µl, 920 µl, 800 µl ve 600 µl distile su ile seyreltilir.

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi:

Vial sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi içermektedir. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır.

Renk Reaktifi:

50 ml seyreltilmiş asetik asit çözeltisi ve 50 ml 1X NaOH çözeltisi içerisine 530 mg TBA'nın eklenmesi ve tamamen çözülene kadar karıştırılmasıyla hazırlanır. Hazırlanan çözelti 24 saat boyunca dayanıklıdır.

3.4.10. . Protein Karbonil Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**Hidroklorik Asit Çözeltisi:**

Vial 12 M hidroklorik asit (HCl) içermektedir. 2,5 M HCl çözeltisi elde etmek için vial içeriği 40 ml distile su içerisine dikkatlice eklenir. 2,5 M HCl çözeltisi 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH)'yi hazırlamak için kullanılır. Seyreltilmiş HCl oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH):

Vial DNPH içermektedir. İçerik 10 ml 2,5 M HCl ile çözülerek hazır hale getirilir. Hazırlanmış DNPH çözeltisi 4°C'de 1 hafta dayanıklıdır ve karanlıkta saklanmalıdır. Çözelti dondurulmamalıdır.

Trikloroasetik asit (TCA) Çözeltisi:

Vial 1 g/ml TCA çözeltisi içerir. 12 ml TCA çözeltisine 48 ml distile su yavaşça eklenir. Bu seyreltme ile %20'lik TCA Çözeltisi hazırlanmış olur. 20 ml %20'lik TCA Çözeltisi başka bir kaba aktarılır ve 20 ml distile su eklenir. Bu şekilde %10'luk TCA çözeltisi elde edilmiş olur. Her iki çözelti de oda sıcaklığında 1 ay dayanıklıdır.

Guanidin Hidroklorür:

Vial guanidin hidroklorür çözeltisi içerir. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır.

Etanol:

Vial 30 ml etanol içerir. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır.

Etil asetat:

Vial 30 ml etil asetat içerir. 1:1 Etanol: Etil Asetat (1:1) karışımı için bir vial (30 ml) içeriği, 30 ml etanol ile karıştırılır.

3.4.11. Total Protein Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**Protein Tayin Deney Reaktifi:**

7,5 ml deney reaktifi distile su ile seyreltilerek 50 ml'ye tamamlanır. Seyreltilmiş reaktif, koyu renkli şişede 4°C'de uygun şekilde saklanırsa 1 yıl boyunca dayanıklıdır.

Protein Tayini BSA Standartı:

Vial %0,05 sodyum azid ile %0,9 salin solüsyonunda 10 mg/ml BSA stok standart içermektedir. 4 µl stok standart 996 µl distile su ile seyreltilerek 1 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltinin konsantrasyonu 40 µg/ml olacaktır. Seri standartların hazırlanması için 1'den 8'e kadar numaralandırılan 8 vialden ilk 7'sine (A-G) 250 µl, sonuncuya (H) ise 200 µl distile su eklenir. 800 µl stok standart (40 µg/ml) H tüpüne aktarılır ve iyice karıştırılır. H tüpünden G tüpüne 750 µl aktarılarak iyice karıştırılır. Bu şekilde B tüpüne kadar aynı işlem yapılarak bir seri standart hazırlanır. A tüpü ise kör olarak kullanılır. Bu seyreltilmiş standartlar 24 saatten fazla kullanılmamalıdır.

3.4.12. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler**Genomik Liziz Tamponu:**

Kit içerisinde 50 ml çözelti bulunmaktadır. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Oda sıcaklığında saklanabilir.

DNA Ön Yıkama Tamponu:

Kit içerisinde 15 ml çözelti bulunmaktadır. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Oda sıcaklığında saklanabilir.

g-DNA Yıkama Tamponu:

Kit içerisinde 50 ml çözelti bulunmaktadır. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Oda sıcaklığında saklanabilir.

DNA Elüsyon Tamponu:

Kit içerisinde 10 ml çözelti bulunmaktadır. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Oda sıcaklığında saklanabilir.

3.4.13. RNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler**RNA Yıkama Tamponu:**

24 ml konsantre RNA yıkama tamponuna 96 ml %100 etanol çözeltisi eklenerek hazırlanır.

DNaz I çözeltisi:

Liyofilize halde tedarik edilen DNaz I, kit ile sağlanan DNaz/RNaz içermeyen su ile karıştırılarak hazır hale getirilir.

3.4.14. DNA ve RNA Hasarının Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**ELISA Tamponu (10X):**

Vial içeriği (10 ml konsantre ELISA tamponu) 90 ml distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 1X'e seyreltilir.

Yıkama Tamponu (400X):

Vial içeriğine (5 ml konsantre yıkama tamponu) 1 ml polisorbat 20 eklenir ve toplam hacim distile su ile 2 L'ye tamamlanır.

ELISA Standartları:

100 µl ana standart vial alınır ve 900 µl distile su ile seyreltilerek konsantrasyonu 30 ng/ml olan standart çözelti elde edilir. Bu çözelti 4°C'de saklandığında 6 hafta boyunca dayanıklıdır. Seri standartların hazırlanması için 1'den 8'e kadar numaralandırılan 8 vialden 1 numaralıya 900 µl, diğer 7 tanesine ise 500 µl ELISA Tamponu eklenir. 30 ng/ml'lik çözeltilerden 100 µl alınarak, 1. vial aktarılır ve

iyice karıştırılır. Daha sonra vial 1'den 2.'ye 400 µl çözelti aktarılır ve karıştırılır. Bu şekilde bir öncekinden 400 µl alınıp, sonraki vialle aktarılarak bir seri standart çözelti elde edilir. Seyreltilmiş standartlar 4°C'de 24 saatten fazla saklanmamalıdır.

AkE Tracer Çözeltisi:

Viale 6 ml ELISA tampon çözeltisi eklenerek hazır hale getirilir.

ELISA Monoklonal Antikor Çözeltisi:

Viale 6 ml ELISA tampon çözeltisi eklenerek hazır hale getirilir.

Ellman Reaktifi:

Viale 20 ml distile su eklenerek hazır hale getirilir. Kullanılmadan hemen önce hazırlanmalıdır.

3.4.15. Kaspaz 3, 8, 9 Aktivitelerinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu:

Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. -20°C'de saklanmalı, deney öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir.

Kaspaz 3 Substratı:

Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Kullanılmadan önce oda sıcaklığında çözülmelidir. -20°C'de saklanmalıdır. Yeniden donma/çözülme döngülerinden kaçınılmalıdır.

Kaspaz 8 Substratı:

Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Kullanılmadan önce oda sıcaklığında çözülmelidir. -20°C'de saklanmalıdır. Yeniden donma/çözülme döngülerinden kaçınılmalıdır.

Kaspaz 9 Substratı:

Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Kullanılmadan önce oda sıcaklığında çözülmelidir. -20°C'de saklanmalıdır. Yeniden donma/çözülme döngülerinden kaçınılmalıdır.

Kaspaz Deney Çözeltisi:

10 ml deney tamponu içerisine kaspaz 3, 8 ve 9 substratlarının her birinden 50 µl eklenerek, pipetleme ile karıştırılarak hazırlanır.

3.4.16. Dopamin Düzeylerinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Tamponu (20X):

Konsantre içerik oda sıcaklığına getirilir. Kristaller oluşmuşsa hafifçe karıştırılır. Bu konsantre içerikten (20X) 15 ml alınarak distile su ile 300 ml'ye tamamlanır ve 1X yıkama tamponu elde edilir.

Standartlar, horse radish peroxidase (HRP)-konjugat, Substrat A ve B ile durdurma çözeltileri kit ile tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır.

3.4.17. DAT Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Tamponu:

Vial içeriğindeki 30 ml konsantre çözelti distile su ile 750 ml'ye tamamlanarak seyreltilir.

Standart Çözeltiler:

Ana standart 10.000×g'de 1 dak santrifüjlenir. Vial içerisine 1 ml standart/örnek seyreltici çözeltiden eklenir, 10 dak beklenir ve dikkatlice karıştırılır. Bu çözelti 10 ng/ml konsantrasyona sahip olur. Daha sonra 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,32; 0,16 ve 0 ng/mL standartları hazırlamak için 7 tüpün her birine 500 µL standart/örnek seyreltici çözeltiden eklenir. İlk tüpe 10 ng/ml'lik çözeltiden 500 µL eklenir ve pipetlenir. Daha sonra bu çözeltiden 500 µL alınarak bir sonraki tüpe eklenir ve bu şekilde bir seri standart çözelti hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi:

Kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde deney için gereken miktar hesaplanır ve kayıplara karşı önlem olarak bu hesaplanan miktardan biraz daha fazlası olacak şekilde hazırlanır. Kullanmadan önce çözelti santrifüjlenir. 100X konsantre

biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi, biyotinlenmiş deteksiyon çözeltisi seyreltici ile 1X'e seyreltilir.

HRP Konjugat Çözeltisi:

Kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde deney için gereken miktar hesaplanır ve kayıplara karşı önlem olarak bu hesaplanan miktardan biraz daha fazlası olacak şekilde hazırlanır. 100X konsantre HRP konjugat çözeltisi, HRP konjugat seyreltici ile 1X'e seyreltilir.

3.4.18. Serotonin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Tamponu:

30 ml konsantre yıkama tamponu distile su ile 750 ml'ye seyreltilir. Konsantre çözelti içinde kristaller oluşmuşsa 40°C'lik su banyosunda ısıtılır ve hafifçe karıştırılır.

Standart Çözeltiler:

Ana standart 10,000×g'de 1 dak santrifüjlenir. Vial içerisine 1 ml standart/örnek seyreltici çözeltilerden eklenir, 10 dak beklenir ve dikkatlice karıştırılır. Bu çözelti 1000 ng/ml konsantrasyona sahip olur. Daha sonra 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 ve 0 ng/ml standartları hazırlamak için 7 tüpün her birine 500 µL standart/örnek seyreltici çözeltilerden eklenir. İlk tüpe 1000 ng/ml'lik çözeltilerden 500 µL eklenir ve pipetlenir. Daha sonra bu çözeltilerden 500 µL alınarak bir sonraki tüpe eklenir ve bu şekilde bir seri standart çözelti hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi:

Kuyucuk başına 50 µL olacak şekilde deney için gereken miktar hesaplanır ve kayıplara karşı önlem olarak bu hesaplanan miktardan biraz daha fazlası olacak şekilde hazırlanır. Kullanmadan önce çözelti santrifüjlenir. 100X konsantre biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi, biyotinlenmiş deteksiyon çözeltisi seyreltici ile 1X'e seyreltilir.

HRP Konjugat çözeltisi:

Kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde deney için gereken miktar hesaplanır ve kayıplara karşı önlem olarak bu hesaplanan miktardan biraz daha fazlası olacak şekilde hazırlanır. 100X konsantre HRP Konjugat çözeltisi, HRP Konjugat Seyreltici ile 1X'e seyreltilir.

3.4.19. SERT Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**Yıkama Tamponu:**

30 ml konsantre yıkama tamponu distile su ile 750 ml'ye seyreltilir. Konsantre çözelti içinde kristaller oluşmuşsa 40°C'lik su banyosunda ısıtılır ve hafifçe karıştırılır.

Standart Çözeltiler:

Ana standart 10,000×g'de 1 dak santrifüjlenir. Vial içerisine 1 ml standart/örnek seyreltici çözeltiden eklenir, 10 dak beklenir ve dikkatlice karıştırılır. Bu çözelti 1000 pg/ml konsantrasyona sahip olacaktır. Daha sonra 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 ve 0 pg/ml standartları hazırlamak için 7 tüpün her birine 500 µL standart/örnek seyreltici çözeltiden eklenir. İlk tüpe 1000 pg/ml'lik çözeltiden 500 µL eklenir ve pipetlenir. Daha sonra bu çözeltiden 500 µL alınarak bir sonraki tüpe eklenir ve bu şekilde bir seri standart çözelti hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi:

Kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde deney için gereken miktar hesaplanır ve kayıplara karşı önlem olarak bu hesaplanan miktardan biraz daha fazlası olacak şekilde hazırlanır. Kullanmadan önce çözelti santrifüjlenir. 100X konsantre biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi, biyotinlenmiş deteksiyon çözeltisi seyreltici ile 1X'e seyreltilir.

HRP Konjugat çözeltisi:

Kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde deney için gereken miktar hesaplanır ve kayıplara karşı önlem olarak bu hesaplanan miktardan biraz daha fazlası olacak şekilde hazırlanır. 100X konsantre HRP Konjugat çözeltisi, HRP Konjugat Seyreltici ile 1X'e seyreltilir.

3.4.20. Global Metilasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Tamponu (10X):

26 ml 10X yıkama tamponuna 234 ml distile su eklenerek 260 ml'ye tamamlanır ve 1X'e seyreltilir. Çözeltinin pH'ı 7,2-7,5 arasında olmalıdır. 1X çözelti 4°C'de 6 ay boyunca dayanıklıdır.

Bağlanma çözeltisi, negatif kontrol, pozitif kontrol, 5-mC antikoru, sinyal indikatörü, enhancer çözeltisi, developer çözeltisi ve durdurma çözeltisi kit ile kullanıma hazır olarak tedarik edilmektedir.

3.4.21. Histon Asetilasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi:

GF3'ün distile su (pH 7.2-7.5) ile 1:10 oranında seyreltilmesiyle hazırlanır.

GF2/Gliserol çözeltisi:

GF2'ye 1:10 oranında gliserol eklenerek hazırlanır.

GF7 Çözeltisi:

Stok GF7, GF6 ile (1:100 oranında) seyreltilerek 1 µg/ml GF7 çözeltisi hazırlanır.

GF8 Çözeltisi:

Stok GF8, GF6 ile (1:1000 oranında) seyreltilerek hazırlanır.

3.5. Deneysel İşlemler ve Yöntemler

3.5.1. Hücre Kültürü

Çalışmada insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y kullanılmıştır. Hücreler %15 (h/h) FBS ve %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş DMEM-Ham's F12 w/L-glutamin w/15 mM HEPES içeren kültür ortamında inkübatörde (37°C ve %5 CO₂) büyütülmüştür. Hücrelerin besiyeri uygun aralıklarla değiştirilmiş ve hücreler istenen doluluğa (%80) ulaştıklarında pasajlanarak çoğaltılmıştır.

3.5.2. Hücre Dondurma, Çözme ve Pasaj İşlemleri

Hücrelerin Çözülmesi

- Hücrelerin içerisinde olduğu vial su banyosunda hafifçe yüzdürülerek 37°C'ye getirilir.
- Steril falkon tüpe yaklaşık 10 ml besiyeri eklenir.
- Vial içine az miktarda besiyeri eklenerek pipetaj işlemi ile hücreler alınır ve falkon tüpe aktarılır.
- 1200 devir/dak hızda 5 dak süreyle santrifüj edilir.
- Flaska 5-6 ml besiyeri konur.
- Santifüj sonrası elde edilen hücre pelleti 1 ml besiyerinde çözülür ve flaska aktarılır.
- İnkübatörde (37°C, %5 CO₂) çoğalmaya bırakılır.

Hücrelerin Pasajlanması

- Uygun büyüklükteki flasklar içinde tutunmuş SH-SY5Y hücrelerinin çoğaltıldığı besiyeri çekilerek, ölü hücreler ve atıklar uzaklaştırılır.
- Daha sonra flasklara 3 ml tripsin-EDTA çözeltisi eklenir ve flasklar inkübatörde yaklaşık 5 dak süreyle bekletilir.
- Hücrelerin tutundukları flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları ışık mikroskobu altında kontrol edilir.
- Hücre kaldırma işlemi gerçekleştikten sonra flasklara eklenen tripsin-EDTA çözeltisinin yaklaşık 2 katı kadar besiyeri eklenerek etkisi sonlandırılır.
- Bu karışım steril falkon tüplere alınarak 1200 devir/dak hızda 5 dak süreyle santrifüj edilir.
- Hücrenin pasajlanacağı yeni flasklara taze besiyeri eklenir.
- Süpernatant uzaklaştırılarak falkon tüp içerisinde kalan hücre pelleti bir miktar besiyeri ile süspansiyon edilir ve yeni flasklara paylaşılır.
- Yaklaşık %80-90 doluluğa ulaşıncaya hücreler yeniden pasajlanır.

Hücrelerin Dondurulması

- Hücre pelleti elde edilinceye kadar pasajlama işlemindeki basamaklar tekrarlanır.
- Pellet dondurma vasatı (besiyeri içerisine %10 DMSO eklenerek hazırlanır) ile çözümlenerek vial içerisine aktarılır.
- -80°C’de saklanır.

3.5.3. Uygun Hücre Sayılarının Belirlenmesi

- Uygun büyüklükteki flasklar içinde tutunmuş SH-SY5Y hücrelerinin çoğaltıldığı besiyeri çekilerek, ölü hücreler ve atıklar uzaklaştırılır.
- Daha sonra flasklara 3 ml tripsin-EDTA çözeltisi eklenir ve flasklar inkübatörde yaklaşık 5 dak süreyle bekletilir.
- Hücrelerin tutundukları flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları ışık mikroskobu altında kontrol edilir.
- Hücre kaldırma işlemi gerçekleştirildikten sonra flasklara eklenen tripsin-EDTA çözeltisinin yaklaşık 2 katı kadar besiyeri eklenerek etkisi sonlandırılır.
- Bu karışım steril falkon tüplere alınarak 1200 devir/dak hızda 5 dak süreyle santrifüj edilir.
- Süpernatant uzaklaştırılarak falkon tüp içerisinde kalan hücre pelleti, hücre yoğunluğuna göre belirlenen miktarda (5-10 ml) besiyeri ile süspansiyon edilir.
- Bu hücre süspansiyonu homojen hale getirildikten sonra içerisinden 50 µl alınarak bir endorf tüpe aktarılır ve üzerine 50 µl %0,4’lük tripan mavisi çözeltisi eklenerek hücre ve boya karışımı süspansiyon edilir.
- Neubauer lamı üzerindeki çukur kısmın oluşturduğu iki bölme üzerine lamel yerleştirildikten sonra hücre süspansiyonu dikkatli bir şekilde lam üzerine tatbik edilir ve ışık mikroskobu altında incelenerek hücreler sayılır.
- Neubauer lamı üzerindeki sekiz ayrı karedeki hücre sayısı belirlenir ve ortalaması alınır.
- Bu sayı dilüsyon faktörüyle ve ardından 10000 ile çarpılarak ml’deki canlı hücre sayısı hesaplanır.

- Canlı hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra analizler için kaç μl 'de ne kadar hücre isteniyorsa hesaplanır ve 96 kuyucuklu plaklara ya da flasklara hücre ekimi yapılır.

3.5.4. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

MTT analizi, hücre canlılığı, hücre çoğalması ve sitotoksisitenin değerlendirilmesi, hücre aktivasyonunun ve büyüme faktörleri, sitokinler ve besinlere yanıt olarak hücre proliferasyonunun incelenmesi için hücresel metabolik aktiviteyi ölçen bir yöntemdir. Bu kolorimetrik analiz esas olarak metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür'ün mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi prensibine dayanır. Canlı hücreler, MTT'yi formazana indirgeyen NADPH'ye bağlı oksidoredüktaz enzimleri içerirler (229). Oluşan mor renkli kristaller DMSO içerisinde çözülür. Çözelti ne kadar koyu renkliyse, canlı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı o kadar fazladır. Renkli çözeltilerin absorbansı 570 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

- Hücre ekimi 96 kuyucuklu plağa 100 μl 'de 10000 hücre olacak şekilde yapılır.
- Hücreler plağa tutunmaları ve çoğalmaları için 24 saat inkübasyona bırakılır.
- Hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri steril şekilde uzaklaştırıldıktan sonra, uygulama maddelerinin çeşitli konsantrasyonlarını içeren ve kontrol olarak hiçbir madde içermeyen yeni besiyerleri eklenerek 24 saat boyunca inkübatörde (37°C, %5 CO₂) bekletilir.
- İnkübasyon sonunda uygulama çözeltileri steril şekilde uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 μl MTT çözeltisi eklenir.
- MTT çözeltisi ışık ile bozunabileceği için deneyler karanlık ortamda gerçekleştirilir.
- MTT çözeltisi eklenen plaklar 3 saat inkübe edilir ve sürenin sonunda MTT çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılır.

- Her bir kuyucuğa reaksiyon sonucu oluşan mor renkli formazan kristallerini çözmek amacıyla 150 µl DMSO eklenir ve plak çalkalayıcı üzerinde 5-10 dak karıştırılır.
- Kuyucukların absorbans değerleri 570 nm’de ölçülür.

Hücre Canlılığının Hesaplanması:

Her bir madde için anlamlı bir sonuç dizisi elde edene kadar çeşitli doz aralıklarında MTT analizi yapılır ve belirlenen doz aralıklarında üç tekrar yapılarak ortalama absorbans değerleri belirlenir.

Kontrol olarak kullanılan hücelere ait absorbans değerleri %100 olarak kabul edilerek bu hücrelerin %100 canlı olduğu varsayılır ve diğer hücrelerin canlılığı kontrole oranlanarak inhibitör konsantrasyon 50 (IC50) ve inhibitör konsantrasyon 20 (IC20) değerleri hesaplanır.

3.5.5. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışma kapsamında SH-SY5Y hücre hattında aşağıdaki çalışma grupları oluşturulmuştur (Tablo 3.1.). İnkübasyon süresi tüm gruplarda tüm analizler için 24 saat olarak uygulanmıştır. MTT deneylerinden elde edilen sonuçlara göre tiyomersal ve metil cıva için IC20 dozları, testosteron ve estradiol için ise hücre canlılığını değiştirmeyen ve proliferasyona neden olmayan dozlar seçilerek kullanılmıştır. IC20, hücre canlılığında %20 inhibisyona neden olan konsantrasyonu ifade etmektedir.

Tablo 3.1. Çalışma Grupları

Deney Grupları	Uygulanan Maddeler
Kontrol (K)	Besiyeri
Tiyomersal (T)	1,15 μ M tiyomersal
Metil cıva (M)	2,93 μ M metil cıva
Testosteron baskın/estradiol düşük tiyomersal (TT)	1 μ M testosteron + 0,75 μ M estradiol + 1,15 μ M tiyomersal
Testosteron baskın/estradiol düşük metil cıva (TM)	1 μ M testosteron + 0,75 μ M estradiol + 2,93 μ M metil cıva
Estradiol baskın/testosteron düşük tiyomersal (ET)	0,1 μ M testosteron + 7,5 μ M estradiol + 1,15 μ M tiyomersal
Estradiol baskın/testosteron düşük metil cıva (EM)	0,1 μ M testosteron + 7,5 μ M estradiol + 2,93 μ M metil cıva

3.5.6. Hücre İçi ROS Miktarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Florometrik hücre içi ROS test kiti, canlı hücrelerde 1 saatlik inkübasyonu takiben oluşan hücre içi ROS'u tespit etmek için hassas, tek adımlı bir florometrik ölçüm sağlamaktadır. ROS, hücre geçirgen bir sensör ile reaksiyona girerek, mevcut ROS miktarıyla orantılı bir florometrik ürün meydana getirir. Oluşan ürünün floresans şiddetinin ölçülmesiyle ROS miktarı tespit edilir.

Yöntemin Uygulanışı:

- Hücreler kuyucuk başına 90 μ l'de 10.000-40.000 hücre olacak şekilde hücre plağına ekilir ve üzerine 10 μ l dozlanan maddeleri içeren besiyeri eklenir.
- Hücre kültür plağı gece boyunca inkübatörde (37°C, %5 CO₂) bekletilir.
- Hücreler üzerine kuyucuk başına 100 μ l Master Reaksiyon Karışımı eklenir.
- Hücreler inkübatörde (37°C, %5 CO₂) 1 saat bekletilir.
- Kuyucukların floresansı ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 640/675$ nm) ölçülür.

ROS Düzeylerinin Hesaplanması:

Kontrol kuyucukları için hesaplanan ROS miktarı %100 kabul edilir ve diğer kuyucuklara ait ROS miktarları kontrole oranlanarak bağıl olarak hesaplanır.

3.5.7. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Yöntemin Esası:

Katalaz, çoğu aerobik organizmada hemen hemen her doku ve hücrede bulunan bir antioksidan enzimdir. Hem normal aerobik metabolizma hem de hücrelerdeki patojenik değişiklikler sonucu üretilen ROS'un ana toksik ürünlerinden biri olan H₂O₂'nin detoksifikasyonunda önemli rol oynar (230).

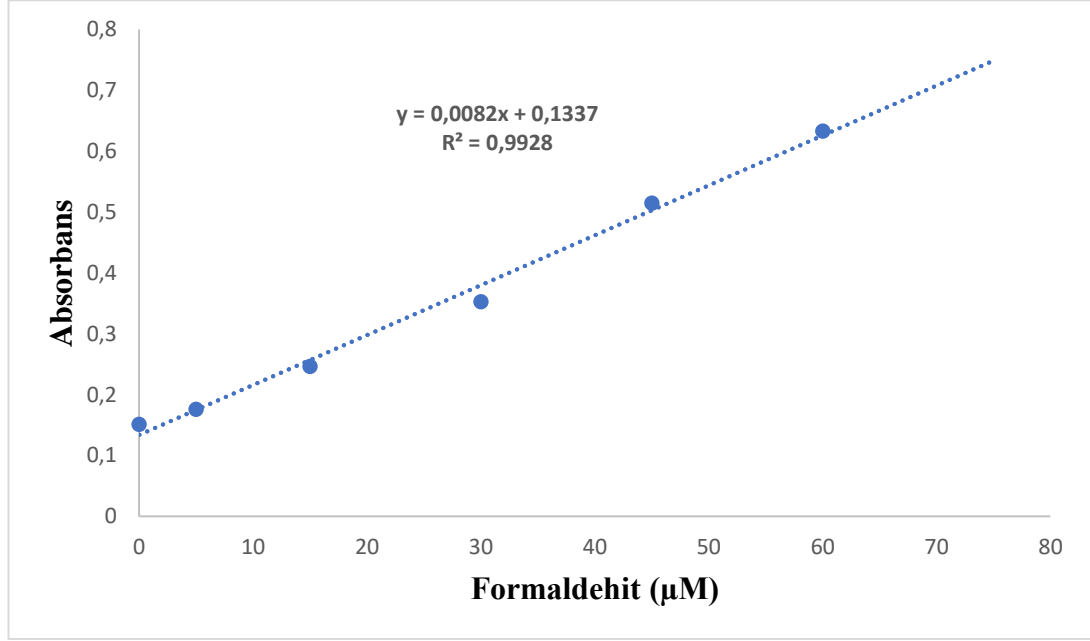
Test kiti, optimal konsantrasyonda H₂O₂ içeren ortamda katalaz enzimi aracılığıyla metanolden formaldehit oluşumuna dayanmaktadır. Oluşan formaldehit, kromojen olarak kullanılan purpald (4-amino-3-hidrazino-5-merkaptotriazol) ile reaksiyona girerek mor bir renk oluşturur. Bu renkli çözeltinin absorbansının 540 nm'de ölçülmesi ile CAT enzim miktarı tayin edilmektedir.

Yöntemin Uygulanışı:

- Tüm kuyucuklara 100 µl deney tamponu ve 30 µl metanol eklenir.
- Ardından standart kuyucuklarına 20 µl formaldehit standart çözeltisi, kontrol kuyucuklarına 20 µl katalaz kontrol ve örnek kuyucuklarına da 20 µl hücre lizatı eklenir.
- Tüm kuyucuklara 20 µl hidrojen peroksit çözeltisi hızlı bir şekilde eklenerek reaksiyon başlatılır ve plak oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 20 dak inkübasyona bırakılır.
- Reaksiyonun tamamlanması için tüm kuyucuklara önce 30 µl potasyum hidroksit, ardından 30 µl purpald çözeltileri eklenir.
- Plak oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 10 dak inkübasyona bırakılır.
- 10 µl potasyum periyodat tüm kuyucuklara eklenir ve plak oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 5 dak inkübasyona bırakılır.
- Absorbans değerleri 540 nm'de ölçülür.

Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması:

Her standart ve örnek için ortalama absorbans hesaplanır. Standart A'nın ortalama absorbansı kendisinden ve diğer tüm standartlardan ve örneklerden çıkarılır. Formaldehit standartlarına ait konsantrasyonlar ve karşılık gelen absorbans değerleri ile standart eğri elde edilir.



Şekil 3.1. Katalaz standart eğrisi

Elde edilen denklem kullanılarak örneklerdeki formaldehit konsantrasyonu ve CAT aktivitesi hesaplanır. Sonuçlar total protein değerine de bölünerek, 25°C'de dakikada 1 nmol formaldehit oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak nmol/dak/mg protein olarak ifade edilir.

CAT Aktivitesi (nmol/dak/ml) = Formaldehit (µM)/ 20 dak x Dilüsyon faktörü (5)

Spesifik Aktivite (nmol/dak/mg protein) = CAT aktivitesi (nmol/dak/ml) / total protein (mg/ml)

3.5.8. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü

Yöntemin Esası:

Süperoksit dismutazlar (SOD'lar), canlı organizmalar için son derece tehlikeli olan reaktif bir oksijen bileşiği olan süperoksit anyonunun moleküler oksijene ve

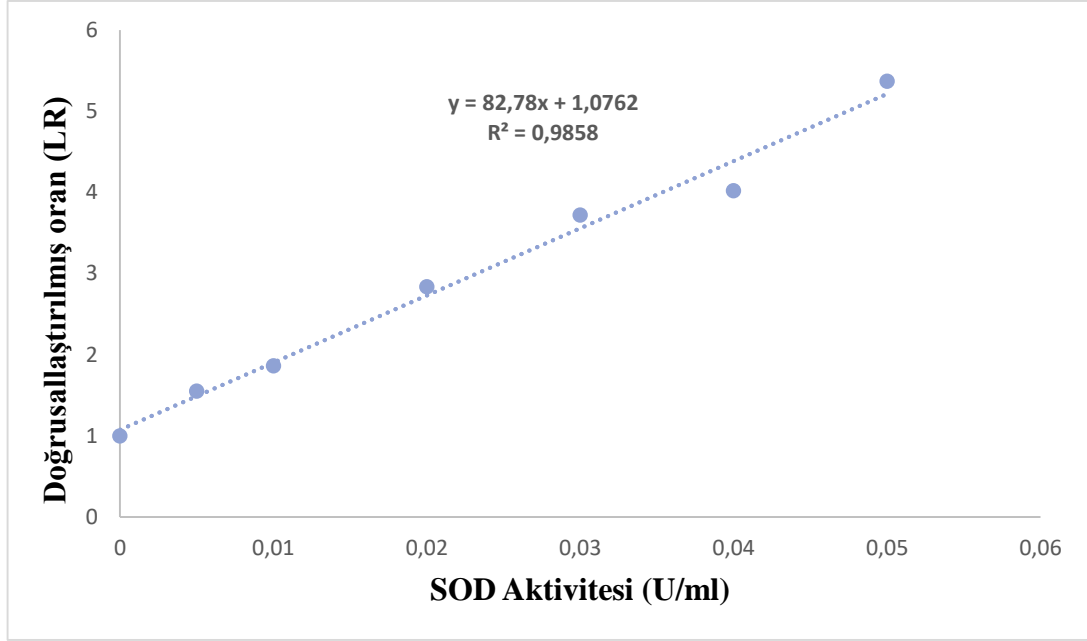
H₂O₂'ye dönüşümünü katalize eden metalloenzimlerdir. Metal içeriğine göre üç tip SOD (Cu/Zn, Mn ve Fe) vardır (231). Süperoksit dismutaz kiti, üç SOD tipini de tespit edebilmektedir ve kitin prensibi, hipoksantin ve ksantin oksidaz aracılığıyla üretilen süperoksit radikallerini tespit etmek için tetrazolyum tuzunun kullanımına dayanmaktadır. Ksantin, ksantin oksidaz aracılığıyla ürik aside dönüşümü sırasında oluşan O₂⁻ anyonunun SOD enzimi ile dismutasyonu, ortama eklenen tetrazolyum tuzunun, formazana dönüşümü ile tespit edilmekte ve formazan boyasının absorbansının 460 nm'de ölçülmesi ile SOD enzim miktarı tayin edilmektedir.

Yöntemin Uygulanışı:

- Tüm kuyucuklara 200 µl radikal dedektör eklenir.
- Ardından standart kuyucuklarına 10 µl standart çözeltisi ve örnek kuyucuklarına da 10 µl hücre lizatı eklenir.
- 20 µl ksantin oksidaz ilavesiyle reaksiyon başlatılır, plak birkaç saniye çalkalanır.
- Oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 30 dak inkübasyona bırakılır.
- Absorbans değerleri 460 nm'de ölçülür.

Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Hesaplanması:

Standart ve örnekler için ölçümlerin ortalama absorbans değerleri hesaplanır. Standart A'nın absorbansı kendisine ve diğer tüm standartlara ve örnek absorbanslarına bölünerek (Std A için $LR = \text{Abs Std A} / \text{Abs Std A}$; Std B için $LR = \text{Abs Std A} / \text{Abs Std B}$ şeklinde) doğrusallaştırılmış oran (LR) elde edilir. LR değerlerine karşı SOD standartlarının aktivitesi kullanılarak standart eğri çizilir.



Şekil 3.2. Süperoksit dismutaz standart eğrisi

Eğri denklemini kullanılarak örnekler için SOD aktivitesi hesaplanır. Bir birim (U) süperoksit anyonunun yarısını ürünlere dönüştürmek için gereken SOD miktarı olarak tanımlanır ve sonuçlar total protein değerlerine bölünerek, U/mg protein olarak ifade edilir.

Spesifik Aktivite (U/mg protein) = SOD (U/ml) / total protein (mg/ml) x Dilüsyon faktörü

3.5.9. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü

Yöntemin Esası:

Glutasyon peroksidaz (GPx) H₂O₂ dahil hidroperoksitlerin indirgenmesini katalize eden enzimlerden biridir (232). Glutasyon peroksidaz deney kiti, GPx aktivitesini dolaylı olarak ölçmektedir. Birleştirilmiş reaksiyonun ilk adımında, indirgenmiş GSH'nin oksitlenmiş glutatyona (GSSG) dönüşümü, hidroperoksitlerin GPx yoluyla indirgenmesiyle gerçekleşir. İkinci adımda, GSSG'nin GR yoluyla indirgenmiş GSH'ye geri dönüştürülmesi sırasında, NADPH, NADP⁺'ya dönüşür. NADPH'nin NADP⁺'ya dönüşümü sırasında absorbanstaki azalma 340 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

- Background ölçümü için 3 kuyucuğa 70 µl deney tamponu, 50 µl koubstrat karışımı ve 50 µl NADPH eklenir.
- Pozitif kontrol olarak 3 kuyucuğa 50 µl deney tamponu, 50 µl kosubstrat karışımı, 50 µl NADPH ve 20 µl GPx (kontrol) eklenir.
- Örnek kuyucuklarına 50 µl deney tamponu, 50 µl kosubstrat karışımı, 50 µl NADPH ve 20 µl hücre lizat örneği eklenir.
- Tüm kuyucuklara hızlı bir şekilde 20 µl kümen H₂O₂ eklenmesiyle reaksiyon başlatılır.
- Plak birkaç saniye dikkatlice çalkalanır.
- En az 5 zaman noktası elde edecek şekilde 340 nm'de dakikada bir kere absorbans ölçülür ve bu şekilde 5 dak boyunca absorbanstaki azalma kaydedilir.

GPx Aktivitesinin Hesaplanması:

Absorbans değerlerindeki dakika başına değişiklikler hesaplanarak, elde edilen zaman değerlerinin bir fonksiyonu olacak şekilde grafik çizilir. Background kuyucuklarının ortalama absorbans değeri örneklerden çıkarılır. Sonuçlar total protein miktarına bölüldükten sonra, 1 nmol NADPH'yi dakikada NADP⁺'ya dönüştüren enzim miktarı olarak nmol/dak/mg protein olarak ifade edilir.

$$\text{GPx aktivitesi (nmol/dak/ml)} = (\Delta A_{340}/0,00373^*) \times \text{Dilüsyon faktörü (47,5)}$$

*NADPH ekstinksiyon katsayısı

$$\text{Spesifik Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)} = \text{GPx aktivitesi (nmol/dak/ml)} / \text{total protein (mg/ml)}$$

3.5.10. Glutasyon Miktarının Ölçümü

Yöntemin Esası:

Kit prensibi GSH ölçümü için glutasyon redüktaz kullanan, dikkatlice optimize edilmiş bir enzimatik geri dönüşüm yöntemine dayanmaktadır. GSH'nin sülfidril grubu, DTNB ile reaksiyona girer ve sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)

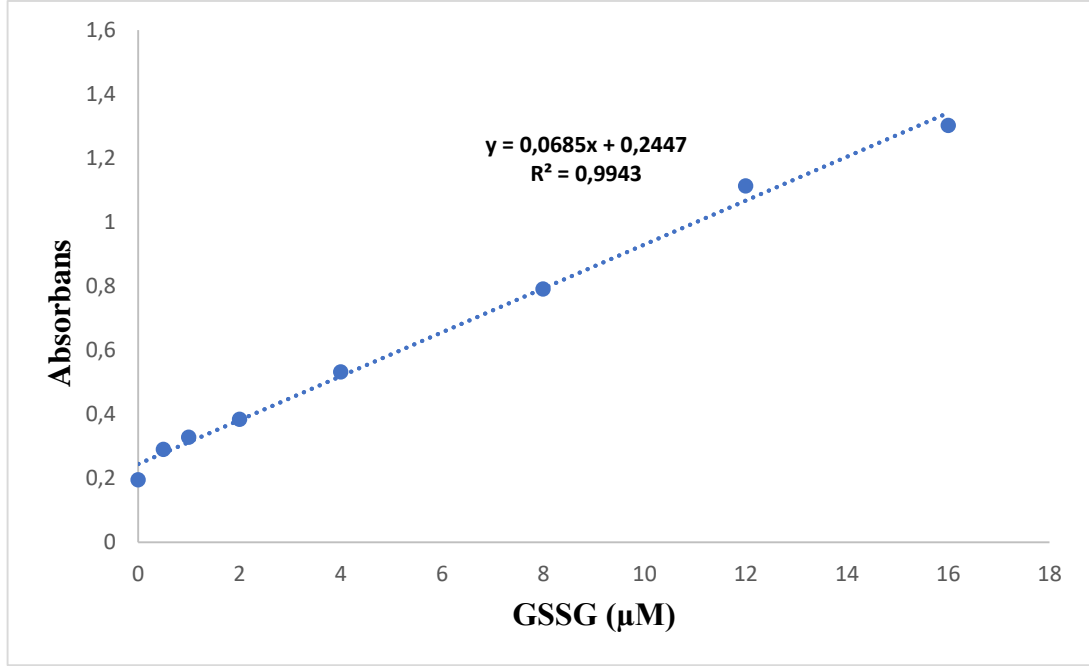
oluşturur. Ara ürün GSTNB (GSH ve TNB arasında disülfid bağıyla bağlı), GSH'yi geri dönüştürmek ve daha fazla TNB üretmek için glutatyon redüktaz tarafından indirgenir. TNB üretim hızı, bu geri dönüşüm reaksiyonu ile doğru orantılıdır ve bu da numunedeki GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. TNB'nin absorbensinin 414 nm'de ölçülmesiyle örneklerdeki GSH miktarı hesaplanır.

Yöntemin Uygulanışı:

- Standart çözeltilerinden 50 µl kuyucuklara eklenir.
- Test maddelerini içeren hücre lizatlarından 50 µl kuyucuklara eklenir.
- Taze hazırlanan deney kokteyl çözeltisinden 150 µl kuyucuklara pipetlenerek eklenir.
- Hücre kültür plağı karanlıkta çalkalayıcı üzerinde 25 dak süreyle inkübasyona bırakılır.
- 414 nm'de absorbens değerleri ölçülür.

Hesaplama:

Her standart ve örnek için ortalama absorbens değerleri hesaplanır. A standardının absorbens değeri kendisinden ve diğer tüm değerlerden (hem standartlar hem de örnekler) çıkarılarak düzeltilmiş absorbens değeri elde edilir. GSSG veya Toplam GSH konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak her standardın düzeltilmiş absorbens değerleri ile grafik çizilir. Sonuçlar total protein değerlerine bölünerek, nmol/mg protein cinsinden ifade edilir.



Şekil 3.3. Glutasyon standart eğrisi

3.5.11. Lipit Peroksidasyon Miktarının Ölçümü

Yöntemin Esası:

Malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyonu nedeniyle doğal bir ürün olarak oluşur. Asidik ortamda ve yüksek sıcaklıkta tiyobarbitürik asit ile MDA arasında reaksiyon meydana gelir. MDA miktarı, bu reaksiyonun ürünü olan kompleksin kolorimetrik ölçümü ile belirlenir.

Yöntemin Uygulanışı:

- Standartlar ve örneklerden 100 µl alınarak 5 ml'lik tüplere aktarılır.
- Tüm tüplere 100 µl SDS Solüsyonu eklenir ve hızlıca karıştırılır.
- Tüplerin dip kısmına yakın olacak şekilde her birine 4 ml renk reaktifi eklenir.
- Tüplerin ağzı kapatılır, kaynatma sırasında dik duracak şekilde yerleştirilir ve su banyosunda kaynayan suda (100°C) bir saat boyunca bekletilir.
- 1 saatlik sürenin sonunda tüpler hızlıca çıkarılır ve reaksiyonun durması için buz banyosuna konur ve 10 dak buz üzerinde inkübe edilir.
- 10 dakikanın sonunda tüpler 4°C'de 1.600 x g'de 10 dak santrifüjlenir.

- Tüplerden 150 µl alınarak hücre kültür plağına eklenir.
- Örneklerin absorbanans değeri 530-540 nm'de ölçülür.

Hesaplama:

Her standart ve örnek için ortalama absorbanans hesaplanır. A standardının (0 µM) absorbanans değeri kendisinden ve diğer tüm değerlerden (hem standartlar hem de örneklerden) çıkarılarak düzeltilmiş absorbanans değeri elde edilir. MDA konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak her standardın düzeltilmiş absorbanans değeri grafiğe aktarılır. Standart eğriden her numune için MDA değeri hesaplanır. Sonuçlar total protein değerlerine de bölüldükten sonra nmol/mg protein olarak ifade edilir.

3.5.12. Protein Karbonil Miktarlarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Protein karbonil kolorimetrik tayin kiti, plazma, serum, hücre lizatları veya doku homojenatlarındaki protein karbonil içeriğini ölçmek için DNPH reaksiyonunu kullanmaktadır. DNPH protein karbonilleriyle reaksiyona girerek, spektrofotometrik olarak analiz edilebilen hidrazonu üretmek için bir Schiff bazı oluşturur. Üretilen protein-hidrazon miktarı, 360-385 nm arasında bir absorbansta spektrofotometrik olarak ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

- 200 µl numune iki adet 2 ml'lik plastik tüpe aktarılır. Bir tüp örnek tüpü ve diğeri kontrol tüpü olacaktır.
- Örnek tüpüne 800 µl DNPH ve kontrol tüpüne 800 µl 2,5 M HCl eklenir.
- Her iki tüp de karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. İnkübasyon sırasında tüpler her 15 dakikada bir vortekslenir.
- Her tüpe 1 ml %20 TCA eklenir ve vortekslenir. Tüpler buz üzerine yerleştirilir ve 5 dak inkübe edilir.
- Tüpler 10,000 x g'de 10 dak 4°C'de mikrosantrifüjde santrifüjlenir.
- Süpernatant atılır ve pellet 1 ml %10 TCA içinde yeniden süspanse edilir. Tüpler buz üzerinde 5 dak bekletilir.

- Tüpler 10,000 x g'de 10 dak 4°C'de mikrosantrifüjde santrifüjlenir.
- Süpernatant atılır ve pellet 1 ml Etanol/Etil Asetat (1:1) karışımı içinde yeniden süspanse edilir. Pellet spatula ile manuel olarak süspande edilir, iyice vortekslenir ve 10,000 x g'de 4°C'de mikrosantrifüjde 10 dak boyunca santrifüjlenir.
- Son işlem 2 kez daha tekrarlanır.
- Son yıkamadan sonra, 500 µl guanidin hidroklorür içinde protein pelletleri vortekslenir.
- Kalan kalıntıları gidermek için tüpler 10,000 x g'de 4°C'de 10 dak boyunca mikrosantrifüjde santrifüjlenir.
- Örnek ve kontrol tüplerinden 220 µl süpernatant kuyucuklara aktarılır.
- 360-385 nm dalga boyunda absorban ölçülür.

Protein Karbonil Miktarlarının Hesaplanması:

Her örnek ve kontrolün ortalama absorban değerleri hesaplanır. Kontrollerin ortalama absorban değeri, örneklerin ortalama absorban değerlerinden çıkarılarak düzeltilmiş absorban (CA) hesaplanır. Bu değer denklemde yerine konarak karbonillerin konsantrasyonu hesaplanır. Ardından değerler total protein konsantrasyonuna bölünerek, protein karbonil miktarı nmol/mg protein cinsinden belirlenir.

Protein Karbonil (nmol/mg protein) = [(CA/0.011)*(320/100*2)] (nmol/ml) / total protein (mg/ml)

3.5.13. Total Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

İyi bilinen bir protein ölçüm yöntemi olan Bradford yöntemine göre, Coomassie® boyasının asidik ortamda proteinlere bağlandığında gösterdiği renk değişikliğinden yararlanır. Boya bağlandığında, maksimum absorpsiyonda 465 nm'den 595 nm'ye anında bir kayma olur ve aynı anda kahverengiden maviye bir renk değişimi olur. 595 nm'de absorban ölçümü yapılır ve absorban protein miktarıyla doğru orantılıdır.

Yöntemin Uygulanışı:

- Standart kuyucuklarına 100 µl BSA standartları eklenir.
- Örnek kuyucuklarına 100 µl örnek eklenir.
- Tüm kuyucuklara 100 µl deney reaktifi eklenir. Hücre plağı hafifçe karıştırılır. Plak oda sıcaklığında 5 dak inkübe edilir.
- 595 nm'de absorbans ölçülür.

Total protein miktarlarının hesaplaması:

Tüm kuyucukların absorbans değerleri ortalaması alınır. Kör kuyucuğunun absorbans değeri tüm standart ve örnek kuyucuklarının absorbanslarından çıkarılır. Standartların 595 nm'deki ortalama absorbans değerleri BSA konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak grafiğe aktarılır. Grafikten elde edilen standart eğri denklemine göre protein konsantrasyonları hesaplanır ve değerler mg/ml olarak ifade edilir.

3.5.14. DNA İzolasyonu**Yöntemin Esası:**

“Quick-DNA™ Miniprep” kiti herhangi bir biyolojik sıvı, hücre kültürü veya katı doku örneğinden total DNA ekstraksiyonu (örn. genomik, plazmit, mitokondriyal, viral) sağlayan kolay bir yöntem sunmaktadır.

Yöntemin Uygulanışı:

- Test maddeleriyle 24 saat muamele edilmiş hücrelerden pellet elde edilir. Hücre pelleti 1 ml besiyeri içinde süspande edilir.
- Hücre süspansiyonu 5 dak boyunca 1500 devir/dak hızda santrifüj edilir.
- Süpernatant uzaklaştırılır ve 500 µl genomik lizis tamponu eklenir.
- Örnekler oda sıcaklığında 10 dak inkübe edilir, ardından 1500 devir/dak hızda santrifüj edilir.
- Süpernatandan 400 µl deney kiti ile tedarik edilen kolonlara alınır, kolonlar tüp içine yerleştirilir ve 1 dak süreyle 15000 devir/dak hızda santrifüj edilir.
- Tüpler yenileri ile değiştirilir ve örnekler 200 µl DNA ön yıkama tamponu eklenir, 1 dak süreyle 15000 devir/dak hızda santrifüj edilir.

- Örnek kolonlarına 500 µl g-DNA yıkama tamponu eklenir ve 1 dak süreyle 15000 devir/dak hızda santrifüj edilir.
- Örnek kolonları temiz tüplere alınarak, 125µl DNA elüsyon tamponu eklenir.
- Oda sıcaklığında 5 dak inkübasyon sonrası 30 saniye süreyle 15000 devir/dak hızda santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası toplanan süpernatantlar ependorf içine alınarak ileri deneyler için -20°C'de saklanır.

3.5.15. RNA İzolasyonu

Yöntemin Esası:

Quick-RNA™ Miniprep Kiti, hücrelerden ve yumuşak, kolay parçalanarak dokulardan yüksek kaliteli total RNA izolasyonu için hızlı bir yöntem sağlamaktadır.

Yöntemin Uygulanışı:

- Test maddeleriyle 24 saat muamele edilmiş hücrelerden pellet elde edilir. Hücre pelleti RNA lizis tamponu ile süspand edilir.
- RNA lizis tamponuna alınan numune bir toplama tüpü içinde kit ile tedarik edilen sarı filtre içine aktarılır ve santrifüjlenir.
- Süpernatant toplanır.
- Süpernatanta etanol (1:1) eklenir ve iyice karıştırılır.
- Numune bir toplama tüpü içinde kit ile tedarik edilen yeşil filtre içine aktarılır ve santrifüjlenir. Süpernatant atılır.
- Kolon 400 µl RNA Yıkama Tamponu ile yıkanır ve santrifüjlenir. Süpernatant atılır. Nükleaz içermeyen tüpte 5 µl DNaz I ile 75 µl DNA Sindirim tamponu eklenir ve karıştırılır. Karışım doğrudan kolona eklenir. Kolon oda sıcaklığında 15 dak inkübe edilir.
- Kolona 400 µl RNA hazırlık tamponu eklenir ve santrifüjlenir.
- Süpernatant atılır.
- Kolona 700 µl RNA Yıkama Tamponu eklenir ve santrifüjlenir.
- Süpernatant atılır.

- Kolona 400 µl RNA Yıkama Tamponu eklenir ve kolon 1 dak santifüjlenir. Ardından kolon dikkatli bir şekilde nükleaz içermeyen tüpe aktarılır.
- 100 µl DNaz/RNaz içermeyen su doğrudan kolona eklenir ve santifüjlenir.
- Santrifüj sonrası toplanan süpernatantlar ependorf içine alınarak ileri deneyler için -20°C’de saklanır.

3.5.16. Hücre Örneklerinde DNA/RNA Miktarlarının Belirlenmesi

İzole edilen DNA ve RNA miktar ve saflıklarını ölçmek için Nanodrop spektrofotometrede 1-2 µl örneğin 230, 260 ve 280 nm’deki absorbansları ölçülür.

3.5.17. DNA/RNA Hasarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

DNA/RNA oksidatif hasar kiti, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), 8-hidroksi guanozin (8-OHG) ve 8-hidroksiguanozini ölçmek için kullanılabilen yarışmalı bir ELISA kitidir. Kitin prensibi reaksiyon ortamında sınırlı miktarda tutulan monoklonal antikor için, oksidatif olarak hasar görmüş guanin türleri ile bir 8-OHdG-asetilkolinesteraz konjugatı (tracer) arasındaki rekabete dayanmaktadır. Oksidatif olarak hasar görmüş guanin konsantrasyonu değişirken tracer miktarı sabit tutulduğundan, monoklonal antikora bağlanabilen tracer miktarı, kuyudaki oksidatif olarak hasar görmüş guanin konsantrasyonuyla ters orantılı olacaktır. Bu antikor-oksidatif olarak hasar görmüş guanin kompleksi, daha önce kuyuya eklenmiş olan *Keçi anti-fare IgG poliklonal* antikoruna bağlanır. Plak herhangi bir bağlanmamış reaktifi uzaklaştırmak için yıkanır ve daha sonra (Ake substratı içeren) Ellman's Reaktifi kuyucuklara eklenir. Bu enzimatik reaksiyonun ürünü, belirgin bir sarı renge sahiptir ve 412 nm'de güçlü bir absorbans verir.

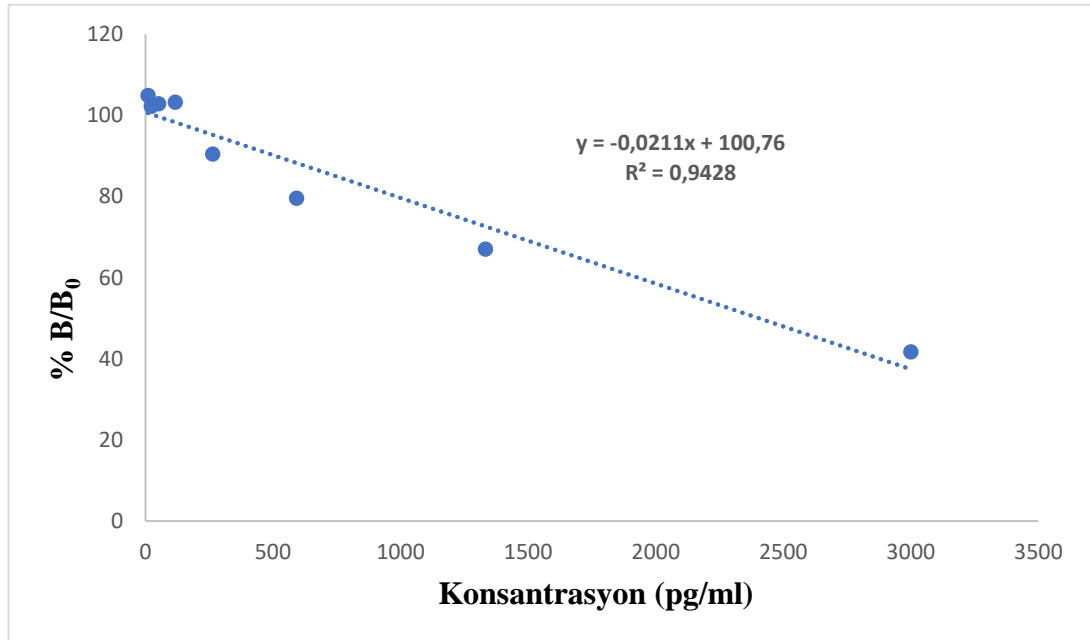
Yöntemin Uygulanışı:

- NSB kuyucuklarına 100 µl tampon ve 50 µl tracer, B0 kuyucuklarına 50 µl tampon, 50 µl tracer ve 50 µl antikor çözeltisi, standart ve örnek kuyucuklarına ise 50 µl standart/örnek, 50 µl tracer ve 50 µl antikor çözeltisi eklenir.
- Plak 4°C’de 18 saat boyunca inkübe edilir.

- Plak içeriği boşaltılır ve kuyucuklar yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkanır.
- Her kuyucuğa 200 µl Ellman reaktifi eklenir.
- TA kuyucuklarına 5 µl tracer eklenir.
- Plak çalkalayıcı üzerinde ışıktan korunarak 90-120 dak süreyle inkübe edilir.
- 405-420 nm’de absorbans değerleri ölçülür.

Hesaplama:

NSB ve B0 kuyucuklarından alınan absorbans okumalarının ortalaması alınır. NSB ortalaması, B0 ortalamasından çıkarılarak düzeltilmiş B₀ veya düzeltilmiş maksimum bağlama değeri elde edilir. Kuyucuklar için B/B₀ (Örnek veya Standart Sınır/Maksimum Sınır) hesaplanır. Bunu yapmak için, S1 absorbansından ortalama NSB absorbansı çıkarılır ve düzeltilmiş B₀'a bölünür. Tüm standart ve örnek kuyucukları için bu hesaplama yapılır. Standartların konsantrasyonlarına karşı B/B₀ grafiği çizilir. Standart eğri grafiğinden elde edilen denklem kullanılarak örnek konsantrasyonları belirlenir.



Şekil 3.4. 8-OHdG ve 8-OHG için standart eğri

3.5.18. Kaspaz 3, 8, 9 Aktivitelerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Kaspaz 3, 8 ve 9 multipleks aktivite (florometrik) tayin kiti apoptoza uğrayan hücrelerde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivitelerini izlemek için kullanılır. Kit, sırasıyla kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivitelerinin tayini için florojenik göstergeler olarak Asp-Glu-Val-Asp-ProRed (DEVD-ProRed™), (Z-Ile-Glu-Thr-Asp)₂-R110 (IETD-R110) ve Ac-Leu-Glu-His-Asp-7-Amino-4-methylcoumarin (LEHD-AMC)'yi kullanmaktadır. Kaspazların parçalanması ile üç farklı florofor salınır: ProRed™ (kırmızı floresan), R110 (yeşil floresan) ve AMC (mavi floresan). Bu floroforların spektral ayrımlarının çok net olması üç kaspaz düzeyinin aktivitelerinin etkin bir şekilde ölçümünü sağlamaktadır.

Yöntemin Uygulanışı:

- Kuyucuk başına 90 µl'de 20.000 hücre olacak şekilde hücreler plağa ekilir, üzerine 10 µl dozlanan maddeleri içeren besiyeri eklenir ve hücreler 1 gece inkübasyona (37°C, %5 CO₂) bırakılır.
- 10 ml deney tamponu içine her kaspaz substratından 50 µl eklenir, pipetleme ile iyice karıştırılarak deney çözeltisi hazırlanır.
- Kuyucuk başına 100 µl kaspaz deney çözeltisi doğrudan hücre plağına eklenir.
- Plak ışıktan korunarak oda sıcaklığında 30-60 dak inkübe edilir.
- Her kaspaz aktivitesi için aşağıda belirtilen dalga boylarında floresans ölçülür.

Kaspaz 3: $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 535/620$ nm (kırmızı)

Kaspaz 8: $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 490/525$ nm (yeşil)

Kaspaz 9: $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 370/450$ nm (mavi)

Kaspaz Aktivitelerinin Hesaplanması:

Kontrol kuyucukları için hesaplanan aktivite %100 kabul edilir ve diğer kuyucuklara ait kaspaz aktiviteleri kontrole oranlanarak hesaplanır.

3.5.19. Dopamin Miktarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Kit yarışmalı ELISA tekniği kullanılmaktadır. Standartlar ve örnekler dopamin ve HRP konjuge dopamine özgü bir antikorla birlikte, *keçi-anti-tavşan* antikoruyla kaplı olarak gelen kuyucuklara eklenir. Antikor ile HRP ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş dopamin arasında yarışmalı inhibisyon reaksiyonu başlatılır. Kuyucuklara bir substrat çözeltisi eklenir ve numunedeki dopamin miktarıyla ters orantılı olarak renk gelişir. Renk gelişimi durdurulur ve absorbans ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

- Herhangi bir çözelti içermeyen kör kuyucukları belirlenir.
- Kuyucuk başına 50µl Standart veya örnek çözeltileri eklenir.
- Her kuyucuğa (kör kuyucuğu hariç) 50µl HRP-konjugat ve ardından 50µl antikor çözeltisi eklenir, karıştırılır ve plak 37°C'de 1 saat inkübe edilir.
- 1 saatin sonunda kuyucukların içeriği boşaltılır ve yıkama tamponu ile 3 kez yıkanır ve plağın tam olarak kurumaması sağlanır.
- Her kuyucuğa 50µl Substrat A ve 50µl Substrat B çözeltisi eklenir, iyice karıştırılır. 37°C'de 15 dak ışıktan korunarak inkübe edilir.
- Tüm kuyucuklara 50µl durdurma çözeltisi eklenir, karışması sağlanır.
- 450 nm'de absorbans değerleri ölçülür.

Hesaplama:

Standart ve örnek kuyucuklarına ait absorbans değerlerinden, kör kuyucuğun absorbans değeri çıkarılır. Molecular Devices-Softmax® programı ile 4-parametre algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir. Örneklerdeki dopamin düzeyleri standart eğriden elde edilen denklem ile hesaplanır. Sonuçlar ng/ml cinsinden ifade edilmiştir.

3.5.20. DAT Miktarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Kit Sandviç ELISA prensibini kullanmaktadır. Kitle tedarik edilen plak insan DAT'ına özgü bir antikorla önceden kaplanmış haldedir. Standartlar veya örnekler kuyucuklara eklenir ve spesifik bir antikor ile birleştirilir. Daha sonra insan DAT ve Avidin-HRP konjugatına özgü biyotinlenmiş deteksiyon antikoruna kuyucuklara eklenir. İnkübasyon sonrası kuyucuklara bir substrat çözeltisi eklenir. Yalnızca İnsan DAT'ı, biyotinlenmiş deteksiyon antikoruna ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünecektir. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve sarı renk oluşur. 450 nm'de absorban değerleri ölçülür. Değerler insan DAT konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Yöntemin Uygulanışı:

- Herhangi bir çözelti içermeyen kör kuyucukları belirlenir.
- Standartlar ve örneklerden kuyucuk başına 100 µL eklenir.
- Plak 37°C'de 90 dak inkübe edilir.
- 90 dakikalık inkübasyon sonrası kuyucuklar boşaltılır, yıkanmaz. Her kuyucuğa hızlı ve dikkatli bir şekilde 100 µL biyotinlenmiş deteksiyon çözeltisi eklenir. Yavaşça karıştırılır.
- Plak 37°C'de 60 dak inkübe edilir.
- 1 saatin sonunda kuyucukların içeriği boşaltılır ve yıkama tamponu ile 3 kez yıkanır ve plağın tam olarak kuruması sağlanır.
- Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugatı eklenir.
- Plak 37°C'de 30 dak inkübe edilir.
- Kuyucukların içeriği boşaltılır ve yıkama tamponu ile 5 kez yıkanır ve plağın tam olarak kuruması sağlanır.
- Her kuyucuğa 90 µL Substrat Reaktif eklenir.
- Plak ışıktan korunarak 37°C'de yaklaşık 15 dak inkübe edilir. (Reaksiyon süresi renk değişimine göre kısaltılabilir veya uzatılabilir, ancak 30 dakikadan fazla olamaz.)

- Her kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi (substrat reaktifinin eklendiği sırayla) eklenir.
- 450 nm'de absorbans değerleri ölçülür.

Hesaplama:

Standart ve örnek kuyucuklarına ait absorbans değerlerinden, kör kuyucuğun absorbans değeri çıkarılır. Molecular Devices-Softmax® programı ile 4-parametre algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir. Örneklerdeki dopamin düzeyleri standart eğriden elde edilen denklem ile hesaplanır. Sonuçlar ng/ml cinsinden ifade edilmiştir.

3.5.21. Serotonin Miktarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Kit yarışmalı ELISA prensibine dayanmaktadır. Kitle sağlanan plak ST/5-HT ile kaplı olarak tedarik edilir. Reaksiyon sırasında standart/örneklerdeki ST/5-HT, ST/5-HT'ye özel biyotinlenmiş deteksiyon antikoru üzerindeki bağlanma bölgeleri için katı faz üzerinde sabitlenmiş belirli miktarda ST/5-HT ile rekabet eder. Fazla konjugat ve bağlanmamış standart/örnek plaktan yıkanarak uzaklaştırılır ve her kuyucuğa Avidin-HRP konjugatı eklenir ve plak inkübe edilir. Daha sonra her kuyucuğa bir TMB substrat çözeltisi eklenir. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve renk değişimi 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

- Herhangi bir çözelti içermeyen kör kuyucukları belirlenir.
- Standartlar ve örneklerden kuyucuk başına 50 µL eklenir.
- Her kuyucuğa hızlı ve dikkatli bir şekilde 50 µL biyotinlenmiş deteksiyon çözeltisi eklenir. Yavaşça karıştırılır.
- Plak 37°C'de 45 dak inkübe edilir.
- 45 dakikanın sonunda kuyucukların içeriği boşaltılır ve yıkama tamponu ile 3 kez yıkanır ve plağın tam olarak kuruması sağlanır.
- Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir.

- Plak 37°C'de 30 dak inkübe edilir.
- Kuyucukların içeriği boşaltılır ve yıkama tamponu ile 5 kez yıkanır ve plağın tam olarak kuruması sağlanır.
- Her kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklenir.
- Plak ışıktan korunarak 37°C'de yaklaşık 15 dak inkübe edilir (Reaksiyon süresi renk değişimine göre kısaltılabilir veya uzatılabilir, ancak 30 dakikadan fazla olamaz).
- Her kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi (substrat reaktifinin eklendiği sırayla) eklenir.
- 450 nm'de absorbans değerleri ölçülür.

Hesaplama:

Standart ve örnek kuyucuklarına ait absorbans değerlerinden, kör kuyucuğun absorbans değeri çıkarılır. Molecular Devices-Softmax® programı ile 4-parametre algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir. Örneklerdeki serotonin düzeyleri standart eğriden elde edilen denklem ile hesaplanır. Sonuçlar ng/ml cinsinden ifade edilmiştir.

3.5.22. SERT Miktarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Kit sandviç ELISA prensibine dayanmaktadır. Kitle sağlanan plak insan SERT'ine özgü bir antikor ile kaplı olarak tedarik edilir. Standart/örnekler kuyucuklara eklenir ve içerdikleri SERT bu spesifik antikor ile birleşir. Daha sonra insan SERT ve Avidin-HRP konjugatına özgü biyotinlenmiş deteksiyon antikorunu, her kuyucuğa eklenir ve inkübe edilir. Serbest kalan bileşenler plaktan yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra her kuyucuğa substrat çözeltisi eklenir. Bu aşamada insan SERT, biyotinlenmiş deteksiyon antikorunu ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünecektir. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır, renk sarıya döner ve renk değişimi 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

- Herhangi bir çözelti içermeyen kör kuyucukları belirlenir.
- Standartlar ve örneklerden kuyucuk başına 100 µL eklenir.
- Plak 37°C'de 90 dak inkübe edilir.
- Kuyucukların içeriği boşaltılır ancak yıkama yapılmaz.
- Her kuyucuğa hızlı ve dikkatli bir şekilde 100 µL biyotinlenmiş deteksiyon çözeltisi eklenir ve yavaşça karıştırılır.
- Plak 37°C'de 60 dak inkübe edilir.
- 60 dakikanın sonunda kuyucukların içeriği boşaltılır ve yıkama tamponu ile 3 kez yıkanır ve plağın tam olarak kuruması sağlanır.
- Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat çalışma çözeltisi eklenir.
- Plak 37°C'de 30 dak inkübe edilir.
- Kuyucukların içeriği boşaltılır ve yıkama tamponu ile 5 kez yıkanır ve plağın tam olarak kuruması sağlanır.
- Her kuyucuğa 90 µL Substrat Reaktif eklenir.
- Plak ışıktan korunarak 37°C'de yaklaşık 15 dak inkübe edilir. (Reaksiyon süresi renk değişimine göre kısaltılabilir veya uzatılabilir, ancak 30 dakikadan fazla olamaz.)
- Her kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi (substrat reaktifinin eklendiği sırayla) eklenir.
- 450 nm'de absorbans değerleri ölçülür.

Hesaplama:

Standart ve örnek kuyucuklarına ait absorbans değerlerinden, kör kuyucuğun absorbans değeri çıkarılır. Molecular Devices-Softmax® programı ile 4-parametre algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir. Örneklerdeki SERT düzeyleri standart eğriden elde edilen denklem ile hesaplanır. Sonuçlar pg/ml cinsinden ifade edilmiştir.

3.5.23. Global Metilasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Global DNA Metilasyon deney kiti kolorimetrik bir ölçüm sağlamaktadır. Örneklerdeki DNA, DNA'ya karşı çok yüksek afiniteye sahip olacak şekilde özel olarak işleme tabi tutulan kuyucuklara bağlanır. DNA'nın metillenmiş fraksiyonu, yakalama ve saptama antikorları kullanılarak saptanır ve ardından spektrofotometrede absorbans ölçülür. Metillenmiş DNA yüzdesi, ölçülen absorbans ile orantılıdır.

Yöntemin Uygulanışı:

- Negatif kontrol kuyucuklarına 100 µL bağlama çözeltisi ve 2 µL negatif kontrol, pozitif kontrol kuyucuklarına 100 µL bağlama çözeltisi ve standart bir eğri oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda (%0,1-%5) 2 µL pozitif kontrol eklenir.
- Örnek kuyucuklarına 100 µL bağlama çözeltisi ve 100 ng (2-4 µL) DNA örneği eklenir.
- Plak hafifçe çalkalanarak çözeltilerin karışması sağlanır ve 37°C'de 60 dak inkübe edilir.
- İnkübasyonun son 10 dakikası içinde 5-mC tespit kompleks çözeltisi hazırlanır. Bunun için her 1 ml 1X yıkama tamponuna, 1 µL 5-mC antikor çözeltisi, 1 µL sinyal indikatör çözeltisi ve 0,5 µL enhancer çözeltisi eklenir ve iyice karışmaları sağlanır.
- İnkübasyon süresinin sonunda kuyucukların içeriği boşaltılır ve her kuyucuğa 150 µL 1X Yıkama Tamponu eklenerek üç kez yıkama işlemi yapılır.
- Her kuyucuğa 50 µL 5-mC Tespit Kompleks Çözeltisi eklenir ve plak 50 dak oda sıcaklığında inkübe edilir.
- Kuyucukların içeriği boşaltılır ve her kuyucuğa 150 µL 1X Yıkama Tamponu eklenerek beş kez yıkama işlemi yapılır.
- Her kuyucuğa 100 µL enhancer çözeltisi eklenir ve plak düz bir yüzey üzerinde hafifçe çalkalanarak karıştırılır ve oda sıcaklığında 3-4 dak inkübe edilir.

- Kuyucuklardaki renk değişimi gözlenir. Birkaç dakika içinde enhancer çözeltisi, yeterli metillenmiş DNA varlığında maviye döner. Negatif kontrol kuyucuklarındaki renk ise genellikle değişmeden kalır.
- %5 pozitif kontrol kuyucuklarındaki renk koyu maviye döndüğünde her kuyucuğa 100 µL durdurma çözeltisi eklenerek enzim reaksiyonu durdurulur. Bu çözeltinin eklenmesiyle birlikte renk sarıya döner.
- Plak düz bir yüzey üzerinde hafifçe çalkalanarak karıştırılır ve 1-2 dak reaksiyonun tamamen durması beklenir.
- 450 nm’de absorbans ölçülür.

Hesaplama:

Metillenmiş DNA yüzdesini hesaplamak için % pozitif kontrollere karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek standart eğri oluşturulur. Doğrusal regresyon ve standart eğrinin en doğrusal kısmı kullanılarak optimal eğim hesaplanır. Örneğin absorbans değerlerinden negatif kontrol absorbans değeri çıkarılır, bu değer doğrunun eğimi ve örnekteki DNA miktarına bölünür ve 100 ile çarpılarak, örneklerdeki %5-mC değeri hesaplanır.

3.5.24. Histon Asetilasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Global histon H3 asetilasyon deney kiti, global histon H3 asetilasyonunu ölçmek için tasarlanmıştır. Kit ile tedarik edilen plak histon proteinleri ile kaplanmıştır. Asetillenmiş histon H3, yüksek afiniteli bir antikorla tanınır. Asetillenmiş histon H3’ün miktarı, HRP konjuge ikincil antikor-renk geliştirme sistemi aracılığıyla ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

- Hücre pelleti seyreltilmiş GF1 ile (200 µl/1×10⁶ hücre olacak şekilde) süspande edilir. Hücre süspansiyonu vial e alınır, 5 dak buz üzerinde inkübe edilir ve ara ara vortekslenir.
- 30 saniye boyunca 12.000 rpm’de santrifüjlenerek yeniden pellet haline getirilir.

- *Histone Ekstraksiyon İşlemi:*
 - GF2/Gliserol çözeltisini hazırlamak için GF2'ye 1:10 oranında gliserol eklenir.
 - Hücre pelleti üzerine GF1 (10 μ l/1 \times 10⁶ hücre olacak şekilde) eklenir, ardından bunun 3 katı hacimde GF2/Gliserol çözeltisi eklenir.
 - Vortekslenerek karıştırılır ve 5 dak buz üzerinde inkübe edilir.
 - 4°C'de 12.000 rpm'de 5 dak santrifüjlenir ve süpernatant vialer aktarılır.
 - Süpernatana 1:4 oranında %100 TCA solüsyonu eklenir (TCA final konsantrasyonu %25 olacak şekilde).
 - 30 dak buz üzerinde inkübe edilir.
 - 4°C'de 12.000 rpm'de 10 dak santrifüjlenir, süpernatant uzaklaştırılır. Pellet üzerine %0,1 HCl içeren 1 ml aseton eklenir, karıştırılır ve 1 dak buz üzerinde inkübe edilir.
 - 4°C'de 12.000 rpm'de 2 dak santrifüjlenir, süpernatant uzaklaştırılır. Pellet 1 ml aseton ile yıkanır, 1 dak buz üzerinde inkübe edilir.
 - 4°C'de 12.000 rpm'de 2 dak santrifüjlenir, süpernatant olabildiğince kuruluğa kadar uzaklaştırılır, pellet 5 dak boyunca kurutulur.
 - Pellet distile su ile (10 μ l/1 \times 10⁶ hücre olacak şekilde) çözülür ve histon protein konsantrasyonu ölçülür.
 - Histon ekstraktı ileri analizler için -80°C'de saklanabilir.

- *Histon H3 Asetilasyon Deteksiyon İşlemi:*
 - Örneklerdeki protein konsantrasyonu GF4 ile 200 ng/ μ l veya 400 ng/ μ l olacak şekilde ayarlanır ve kuyucuklara 5 μ l (1-2 μ g) örnek eklenir ve pipetlenerek karıştırılır.
 - Kör için kuyulara 5 μ l GF4 eklenir.
 - Pozitif kontrol için asetillenmiş histon H3 kontrolü GF4 ile 1-20 ng/ μ l'ye seyreltilir ve ardından kuyucuklara 5 μ l (5-100 ng) seyreltilmiş asetillenmiş histon H3 kontrol çözeltileri eklenir.
 - Plak 37°C'de 60-90 dak inkübe edilir.
 - Sürenin sonunda kuyucuklara 150 μ l GF5 eklenir ve plak 37°C'de 30 dak inkübe edilir.

- Kuyucuklar boşaltılır ve her biri 150 µl seyreltilmiş GF3 ile üç kez yıkanır.
- GF7, GF6 ile (1:100 oranında) 1 µg/ml'ye seyreltilir.
- Kuyucuklara 50 µl seyreltilmiş GF7 eklenir ve plak oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 60 dak inkübe edilir.
- Kuyucuklar boşaltılır ve her biri 150 µl seyreltilmiş GF3 ile dört kez yıkanır.
- GF8, GF6 ile (1:1000 oranında) seyreltilir.
- Kuyucuklara 50 µl seyreltilmiş GF8 eklenir ve oda sıcaklığında 30 dak inkübe edilir.
- Kuyucuklar boşaltılır ve her biri 150 µl seyreltilmiş GF3 ile dört kez yıkanır.
- Kuyucuklara 100 µl GF9 eklenir ve ışıktan korunarak 2-10 dak (renk değişimi izlenerek) oda sıcaklığında inkübe edilir.
- Kuyucuklara 50 µl GF10 eklenir ve 450 nm'de absorbans ölçülür.

Hesaplama:

Absorbans değerleri asetillenmiş histon H3 kontrol miktarlarına karşı grafiğe aktarılır ve eğim belirlenir. Örneklerin absorbans değerlerinden negatif kontrol absorbans değeri çıkarılır, bu değer doğrunun eğimi ve örnekteki protein miktarına bölünür ve 1000 ile çarpılarak, örneklerdeki asetillenmiş histon H3 miktarı hesaplanır. Sonuçlar ng/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.

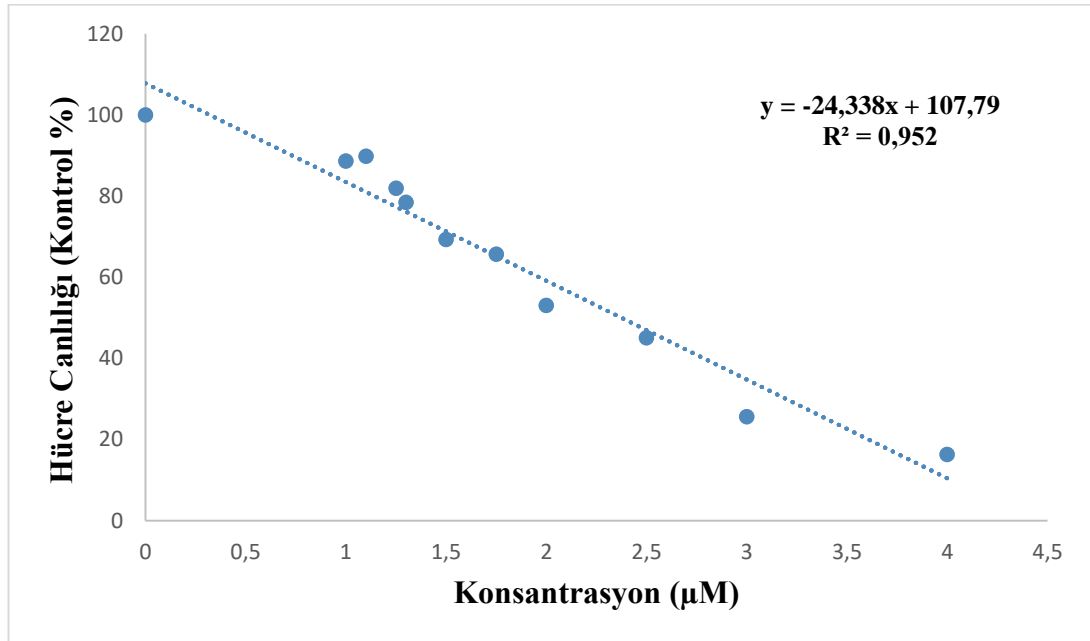
3.6. Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 22.0 (Chicago, IL) programı kullanılmıştır. Analiz edilen parametreler için tüm gruplardan elde edilen sonuçların karşılaştırılması Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapılmış ve gruplar arasındaki fark Student t testi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmuş, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

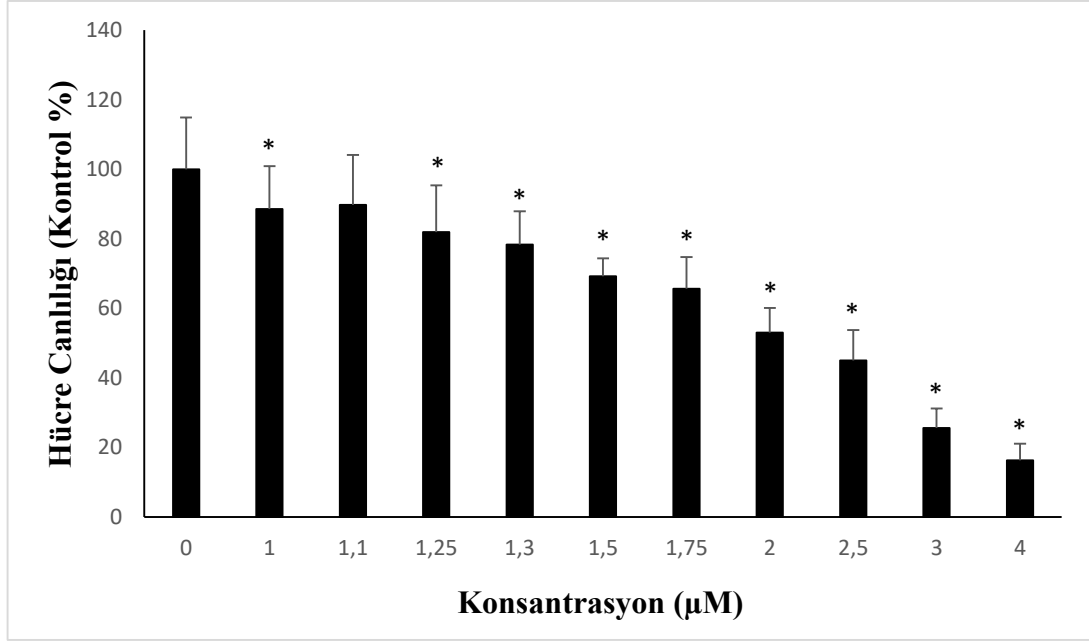
4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı ve Hücre Proliferasyonu

SH-SY5Y hücreleri 0-4 μM konsantrasyon aralığında tiyomersal ve 0-15 μM konsantrasyon aralığında metil cıvaya 24 saat maruz bırakılarak MTT yöntemiyle hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hücre canlılığı test maddelerine maruziyetin gerçekleşmediği kontrol hücrelerine göre % canlılık olarak hesaplanmıştır. Deneyler sonucunda tiyomersal ve metil cıva için hücre canlılığında %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon (IC50) değerleri sırasıyla 2,37 ve 7,40 μM ve hücre canlılığında %20 inhibisyona neden olan konsantrasyon (IC20) değerleri sırasıyla 1,15 ve 2,93 μM olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.)



Şekil 4.1. SH-SY5Y hücre hattında tiyomersalin (0-4 μM) canlılık üzerindeki etkisi.

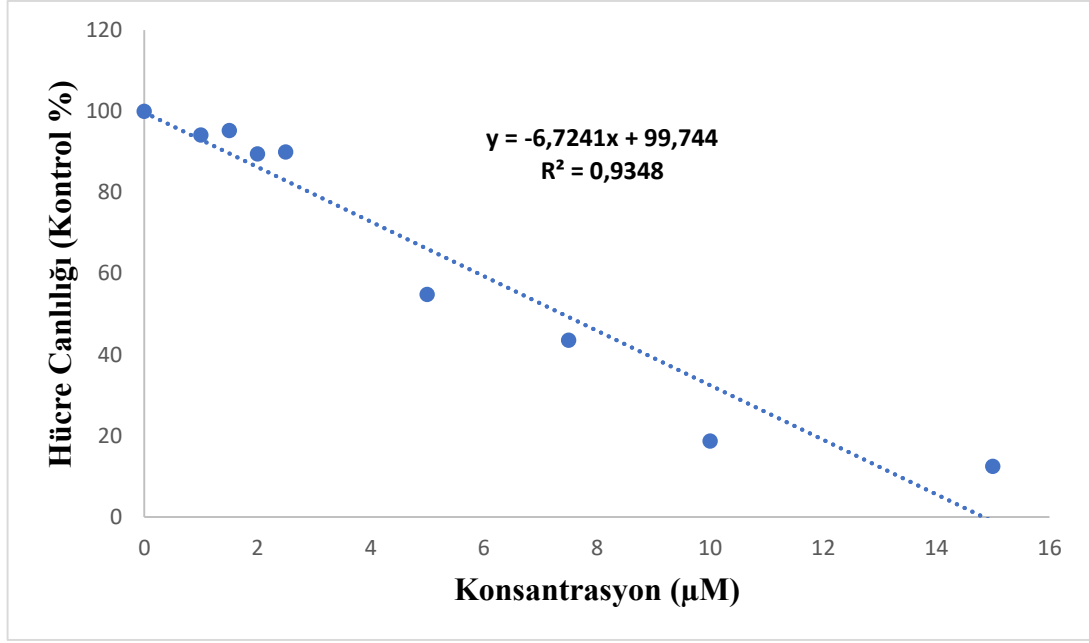


Şekil 4.2. SH-SY5Y hücre hattında tiyomersalin (0-4 µM) canlılık üzerindeki etkisi. *p<0,05.

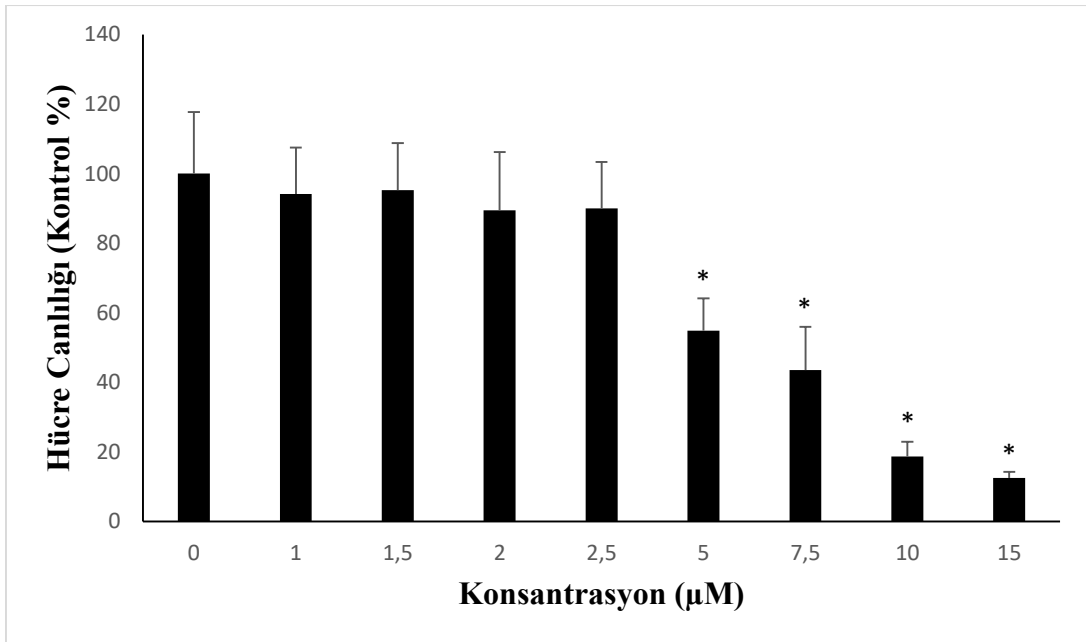
Tablo 4.1. Tiyomersal için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları.

Tiyomersal Konsantrasyonu (µM)	Hücre canlılığı (% kontrol)
0	100,00±15,35
1	88,59±12,69*
1,1	89,77±14,86
1,25	81,94±13,27*
1,3	78,39±12,61*
1,5	69,27±7,43*
1,75	65,63±9,61*
2	53,05±10,93*
2,5	45,04±13,64*
3	25,58±10,69*
4	16,28±5,35*

*p<0,05.



Şekil 4.3. SH-SY5Y hücre hattında metil cıvanın (0-15 µM) canlılık üzerindeki etkisi.



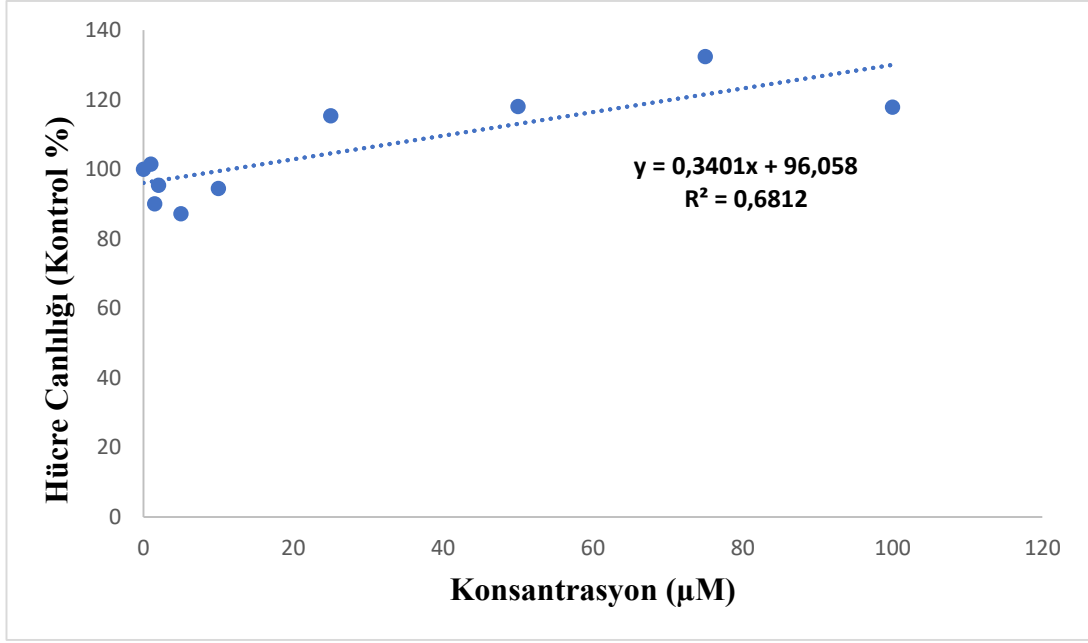
Şekil 4.4. SH-SY5Y hücre hattında metil cıvanın (0-15 µM) canlılık üzerindeki etkisi. *p<0,05.

Tablo 4.2. Metil cıva için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları.

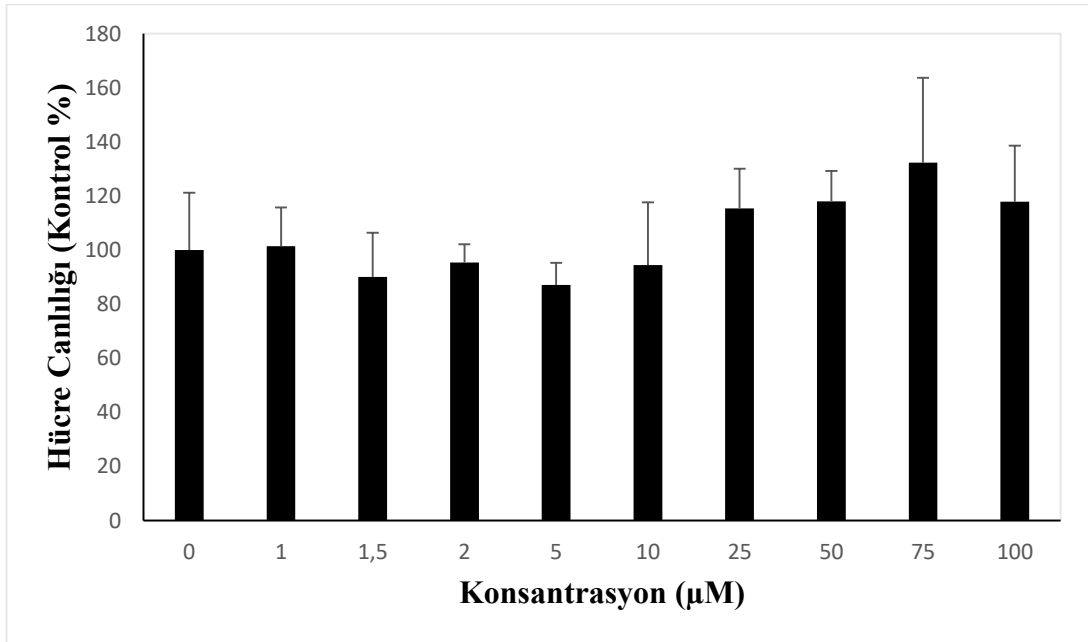
Metil Cıva Konsantrasyonu (μM)	Hücre canlılığı (% kontrol)
0	100,00 \pm 17,64
1	94,15 \pm 14,02
1,5	95,29 \pm 13,95
2	89,48 \pm 15,91
2,5	89,99 \pm 19,30
5	54,83 \pm 18,43*
7,5	45,54 \pm 12,96*
10	18,70 \pm 4,13*
15	12,50 \pm 1,89*

*p<0,05.

SH-SY5Y hücreleri 0-100 μM konsantrasyon aralığında testosteron ve 0-30 μM konsantrasyon aralığında estradiole 24 saat maruz bırakılarak MTT yöntemiyle hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Testosteron ve estradiol için hücre canlılığının kontrole yakın olduğu ve hücre çoğalmasının görülmediği dozlar, yüksek dozlar olarak seçilmiştir. (Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.) 17β -estradiolün kadın kan dolaşımında erkeklere göre ~10 kat daha fazla, testosteronun ise erkeklerde kadınlardan ~10 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu dozların 10'da 1'i dozlar, düşük dozlar olarak seçilmiştir. Dozlar, 17β -estradiol için sırasıyla 7,5 ve 0,75 μM , testosteron için 1 ve 0,1 μM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. SH-SY5Y hücre hattında testosteronun (0-100 µM) canlılık üzerindeki etkisi.

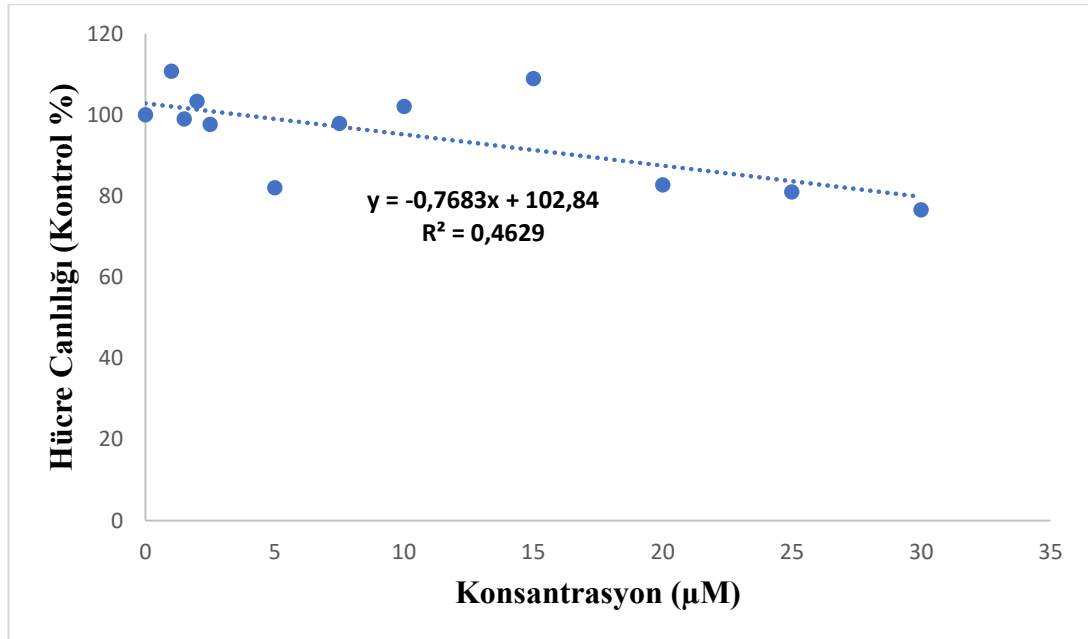


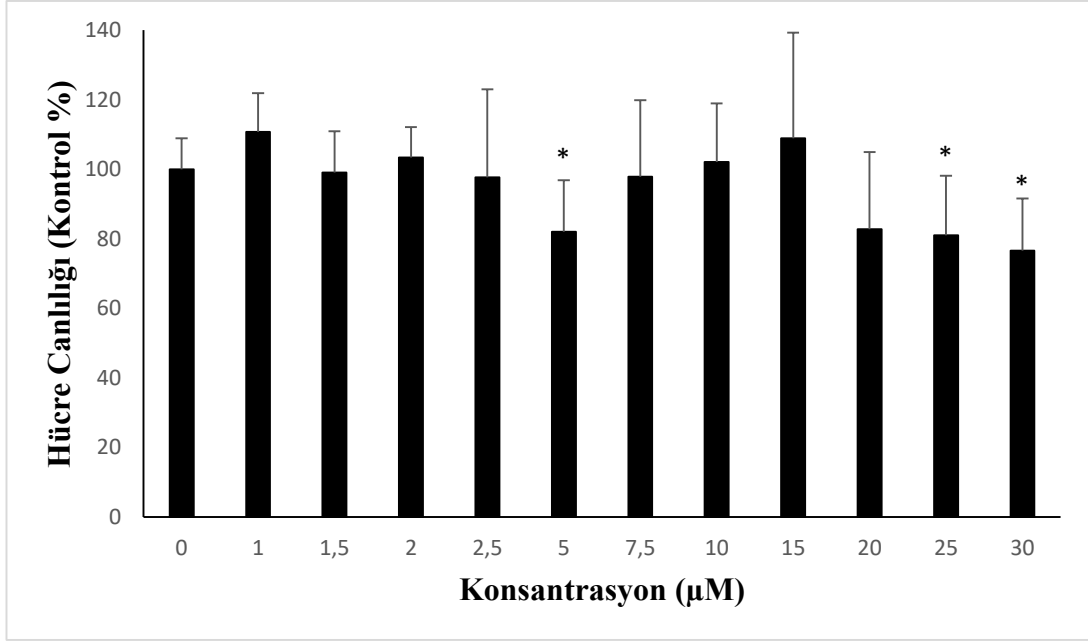
Şekil 4.6. SH-SY5Y hücre hattında testosteronun (0-100 µM) canlılık üzerindeki etkisi. *p<0,05.

Tablo 4.3. Testosteron için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları.

Testosteron Konsantrasyonu (μM)	Hücre canlılığı (% kontrol)
0	100,00 \pm 21,27
1	101,45 \pm 14,31
1,5	90,08 \pm 16,31
2	95,40 \pm 6,78
5	87,19 \pm 8,12
10	94,48 \pm 23,21
25	115,37 \pm 14,78
50	118,00 \pm 11,25
75	132,39 \pm 31,31
100	117,87 \pm 20,77

*p<0,05.

**Şekil 4.7.** SH-SY5Y hücre hattında estradiolün (0-30 μM) canlılık üzerindeki etkisi.



Şekil 4.8. SH-SY5Y hücre hattında estradiolün (0-30 µM) canlılık üzerindeki etkisi.
*p<0,05.

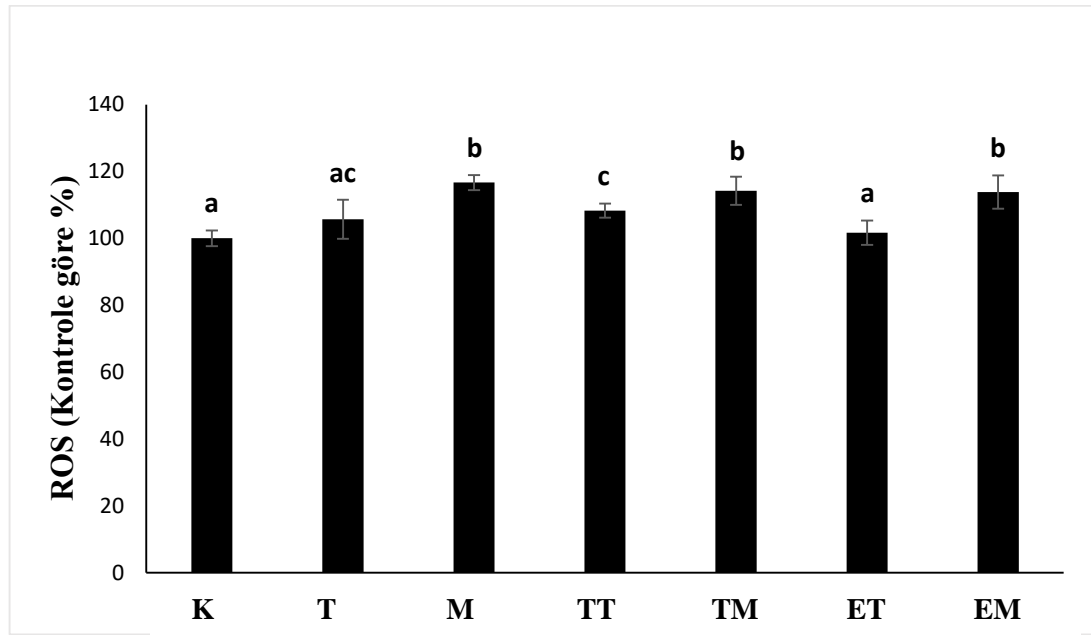
Tablo 4.4. Estradiol için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları.

Estradiol Konsantrasyonu (µM)	Hücre canlılığı (% kontrol)
0	100,00±8,93
1	110,78±11,09
1,5	99,05±11,91
2	103,37±8,78
2,5	97,71±25,28
5	82,07±14,79*
7,5	97,89±22,03
10	102,11±16,89
15	108,93±30,39
20	82,75±22,23
25	81,00±17,17*
30	76,60±15,04*

*p<0,05.

4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri

Çalışma gruplarında belirlenen hücre içi ROS kontrole kıyasla % ROS olarak hesaplanmış ve Şekil 4.9. ve Tablo 4.5.'de verilmiştir. T (%5,6; $p>0.05$) ve M gruplarının (%16,6; $p<0.05$) ROS düzeyleri kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Ayrıca ROS düzeyleri M grubunda (%10,4) T grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. TT ve ET grupları karşılaştırıldığında, TT grubundaki ROS düzeylerinin ET grubuna göre anlamlı olarak (%6,5) yüksek olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. Çalışma gruplarında hücre içi ROS düzeyleri.

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$).

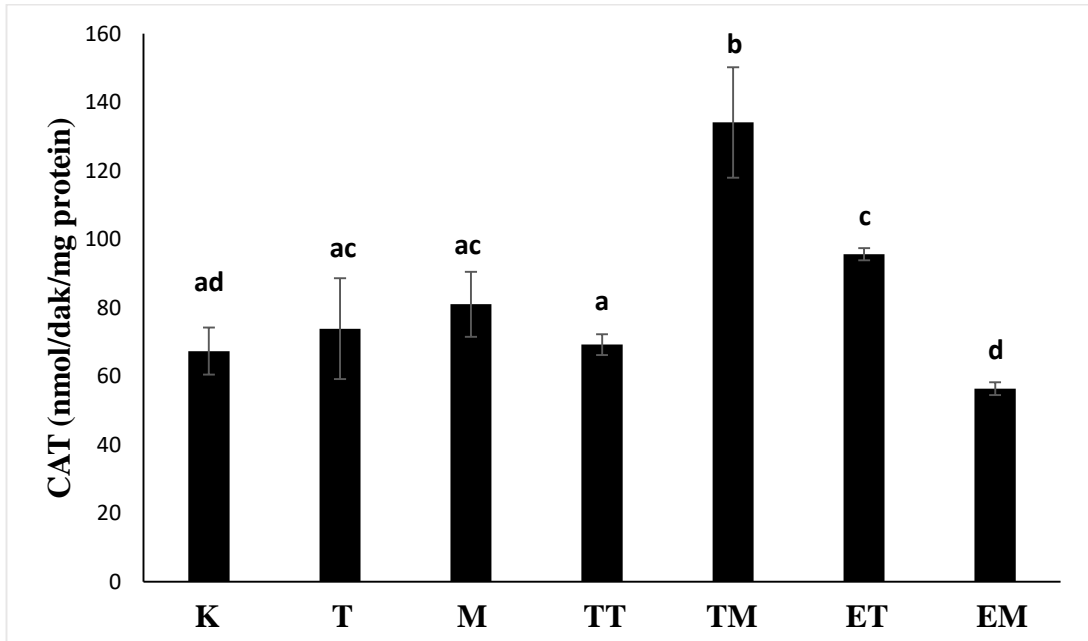
Tablo 4.5. Çalışma gruplarında hücre içi ROS düzeyleri.

Deney Grupları	ROS
K	100,00±2,35 ^a
T	105,66±5,84 ^{ac}
M	116,66±2,29 ^b
TT	108,29±2,15 ^c
TM	114,23±4,23 ^b
ET	101,66±3,64 ^a
EM	113,85±4,95 ^b

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$).

4.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Çalışma gruplarında CAT aktiviteleri Şekil 4.10. ve Tablo 4.6.'da verilmiştir. T ve M gruplarının CAT aktiviteleri kontrol grubuna göre biraz daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla %9,7 ve %20,3; $p>0,05$). Ayrıca CAT aktivitesi M grubunda T'den biraz daha yüksek (%9,6) tespit edilmiştir ($p>0,05$). TT ve ET grupları T grubu ile karşılaştırıldığında, ET grubunun CAT aktivitesi anlamlı olarak yüksek (%29,4; $p<0,05$) bulunmuştur. TT grubunun CAT aktivitesi T'den daha düşük (%6,31) bulunmuştur, ancak fark anlamlı tespit edilmemiştir. TT ve ET grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında, ET grubundaki CAT aktivitesinin TT grubuna göre anlamlı düzeyde (%38,15; $p<0,05$) yüksek olduğu bulunmuştur. TM ve EM grupları M grubu ile karşılaştırıldığında, M grubuna göre EM grubunun CAT aktivitesi anlamlı olarak daha yüksek (%30,4; $p<0,05$) ve TM grubunun CAT aktivitesi (%65,6; $p<0,05$) anlamlı olarak daha düşük tespit edilmiştir. TM ve EM grupları karşılaştırıldığında, TM grubunun CAT aktivitesi EM grubuna göre 2,8 kat daha yüksek ($p<0,05$) bulunmuştur.



Şekil 4.10. Çalışma gruplarında CAT aktiviteleri.

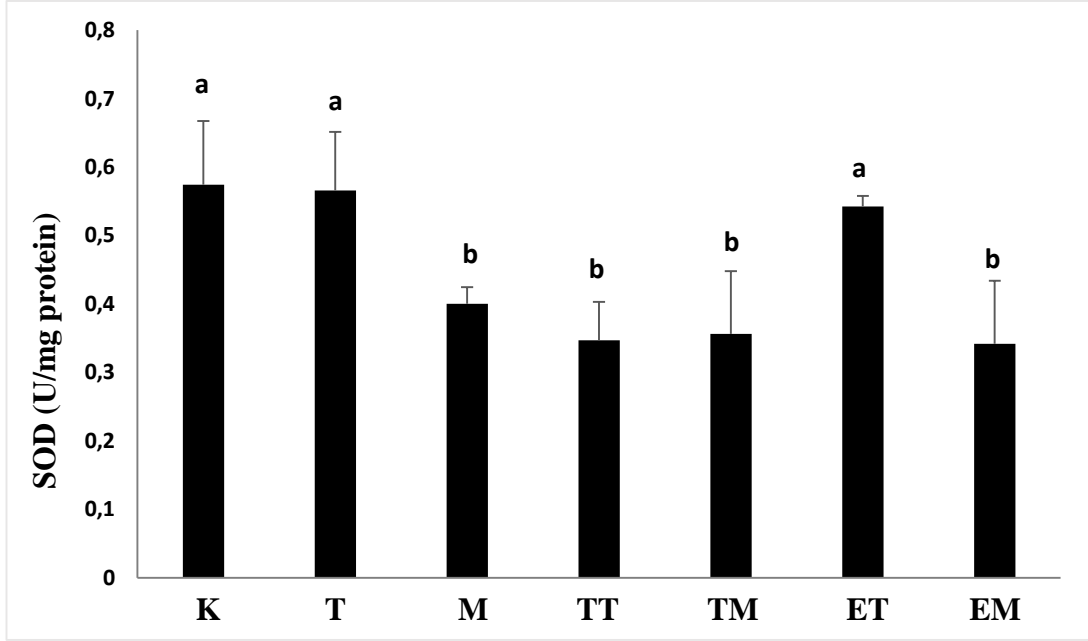
^{a,b,c,d}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

Tablo 4.6. Çalışma gruplarında CAT aktiviteleri.

Deney Grupları	CAT (nmol/dak/mg protein)
K	67,34±6,91 ^{ad}
T	73,87±14,69 ^{ac}
M	80,99±9,53 ^{ac}
TT	69,21±3,05 ^a
TM	134,08±16,14 ^b
ET	95,62±1,80 ^c
EM	56,35±1,91 ^d

^{a,b,c,d}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır (p<0.05).

Çalışma gruplarında SOD aktiviteleri Şekil 4.11. ve Tablo 4.7.'de verilmiştir. T grubunun SOD aktivitesi, kontrol ile hemen hemen aynıken; M grubunun SOD aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük (%30,3) bulunmuştur. Ayrıca SOD aktivitesinin M grubunda T grubuna göre anlamlı olarak daha düşük (%29,3) olduğu da tespit edilmiştir. TT ve ET grupları T grubu ile karşılaştırıldığında, TT grubunun SOD aktivitesinin T grubundan anlamlı derecede düşük olduğu (%38,7) ve ET grubunun SOD aktivitesinin T grubundan belirgin olarak farklı olmadığı görülmüştür. TT ve ET grupları birbiriyle karşılaştırıldığında, TT grubunda SOD aktivitesi ET grubuna göre anlamlı olarak (%36) daha düşük olduğu bulunmuştur. TM ve EM gruplarının SOD aktiviteleri M grubu ile ve birbirleriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir.



Şekil 4.11. Çalışma gruplarında SOD aktiviteleri.

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır ($p<0.05$).

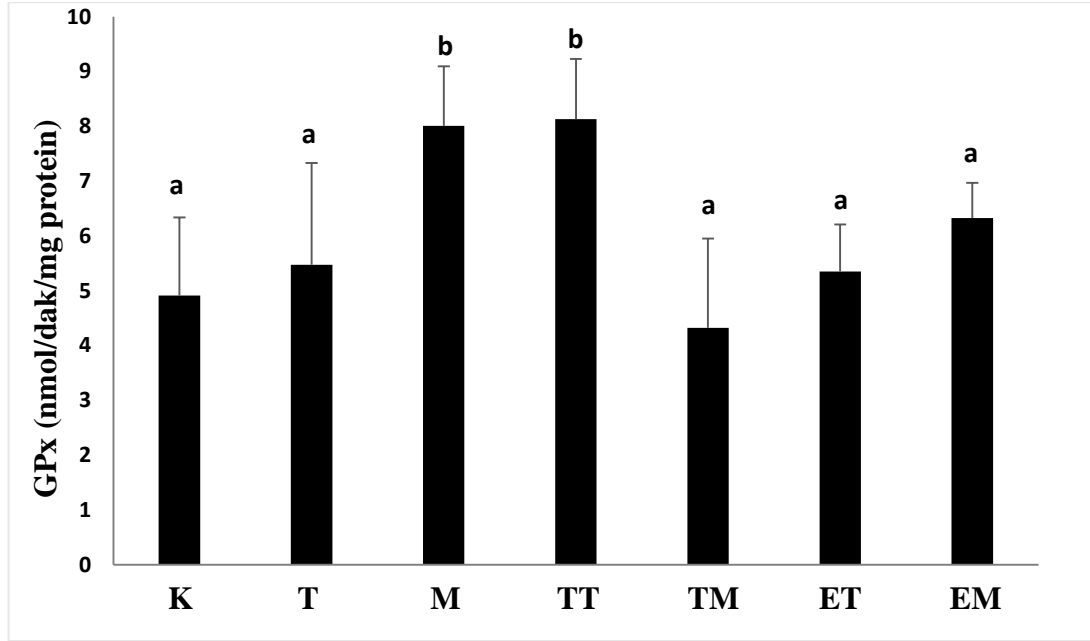
Tablo 4.7. Çalışma gruplarında SOD aktiviteleri.

Deney Grupları	SOD (U/mg protein)
K	0,57±0,09 ^a
T	0,57±0,08 ^a
M	0,40±0,02 ^b
TT	0,35±0,06 ^b
TM	0,36±0,09 ^b
ET	0,54±0,02 ^a
EM	0,34±0,09 ^b

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır ($p<0.05$).

Çalışma gruplarında GPx aktiviteleri Şekil 4.12. ve Tablo 4.8.'de verilmiştir. T grubunda GPx aktivitesi kontrole göre daha yüksek (%11,3; $p>0,05$) bulunmuştur. M grubunun GPx aktivitesi ise kontrol grubuna ve M grubuna göre anlamlı derecede yüksek (sırasıyla %63 ve %46,4) tespit edilmiştir. TT ve ET grupları T grubu ile karşılaştırıldığında, TT grubunun GPx aktivitesinin T grubundan anlamlı derecede yüksek (%48,6) olduğu; ET grubunun GPx aktivitesinin ise T grubundan farklı olmadığı gösterilmiştir. TT ve ET grupları karşılaştırıldığında, TT grubundaki GPx

aktivitesinin, ET grubuna göre önemli ölçüde (%52) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. TM ve EM grupları M grubu ile karşılaştırıldığında, TM ve EM gruplarının GPx aktivitelerinin (sırasıyla %46,1 ve %20,9) M grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu; TM ve EM gruplarının GPx aktiviteleri karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Çalışma gruplarında GPx aktiviteleri.

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır ($p<0.05$).

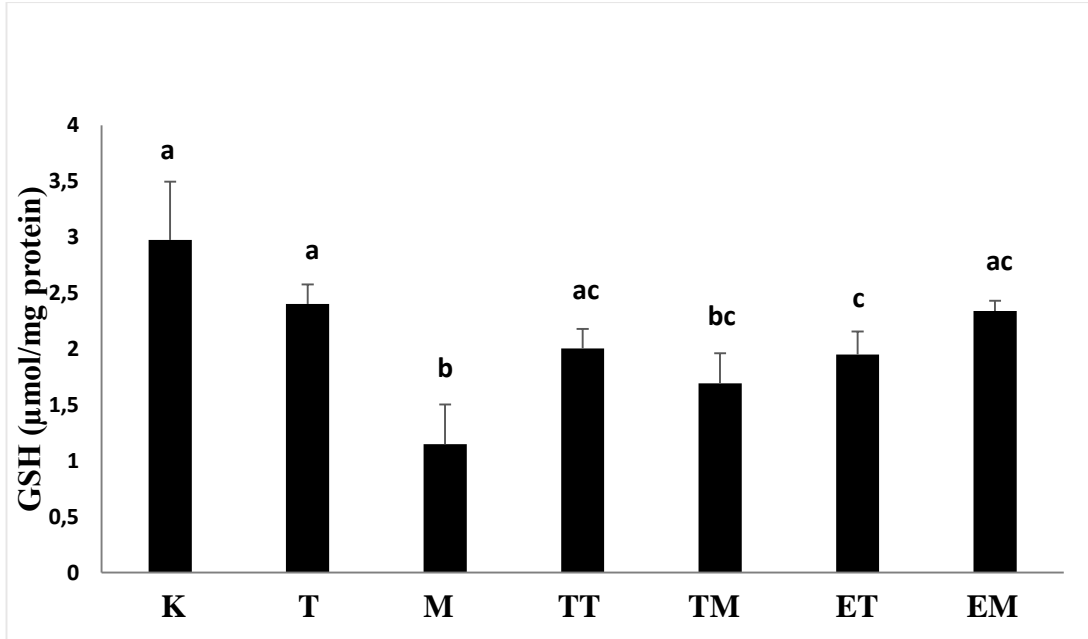
Tablo 4.8. Çalışma gruplarında GPx aktiviteleri.

Deney Grupları	GPx (nmol/dak/mg protein)
K	4,91±1,42 ^a
T	5,47±1,86 ^a
M	8,01±1,08 ^b
TT	8,13±1,10 ^b
TM	4,32±1,63 ^b
ET	5,35±0,86 ^a
EM	6,33±0,64 ^a

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır ($p<0.05$).

4.4. Oksidatif Stres Parametreleri

Çalışma gruplarında total GSH düzeyleri Şekil 4.13. ve Tablo 4.9.'da verilmiştir. T ve M grubunda total GSH düzeylerinin, kontrolden (sırasıyla %19,5; $p>0,05$ ve %61,4; $p<0,05$) düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca M grubunda GSH düzeyinin T grubuna göre anlamlı olarak daha düşük (%52,1; $p<0,05$) olduğu da gösterilmiştir. TT ve ET grupları, T grubu ile karşılaştırıldığında, TT ve ET gruplarının GSH düzeylerinin anlamlı düzeyde azaldığı (sırasıyla %16,6; $p<0,05$ ve %18,8; $p<0,05$) saptanmıştır. TT ve ET grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, bu grupların GSH düzeyleri arasında anlamlı fark olmadığı görülmüştür. TM ve EM grupları M grubu ile karşılaştırıldığında, EM ve TM grubunun GSH düzeylerinin daha yüksek (sırasıyla 2 kat; $p<0,05$ ve %47,2; $p>0,05$) olduğu gösterilmiştir. TM ve EM grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında, EM grubunun GSH düzeyinin anlamlı olarak yüksek (38,2; $p<0,05$) olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.13. Çalışma gruplarında total GSH düzeyleri.

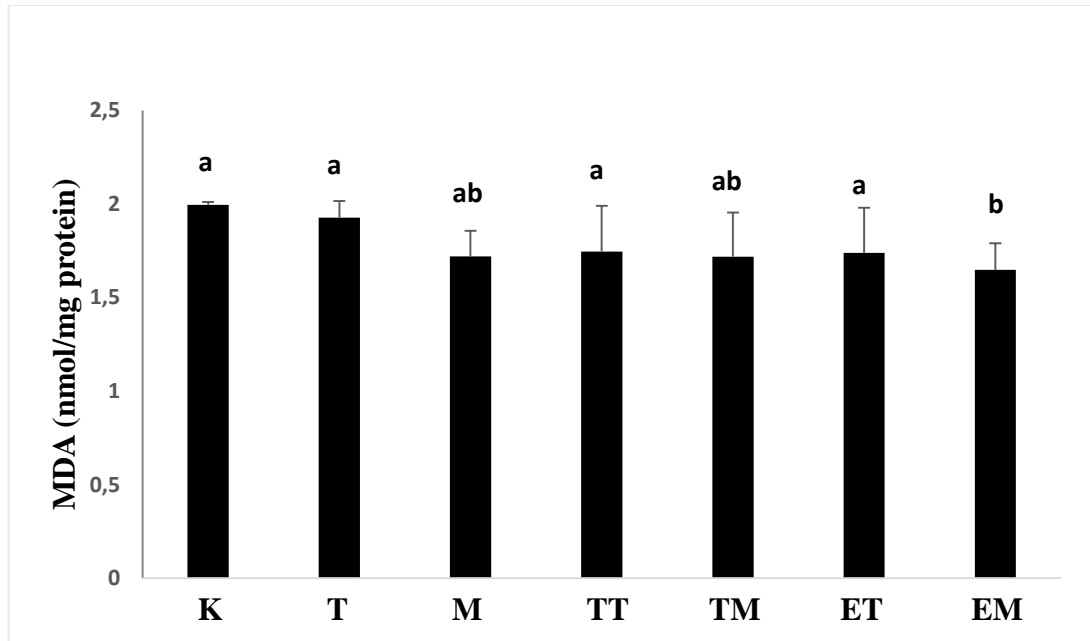
^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

Tablo 4.9. Çalışma gruplarında total GSH düzeyleri.

Deney Grupları	GSH ($\mu\text{mol/mg protein}$)
K	2,98 \pm 0,52 ^a
T	2,40 \pm 0,18 ^a
M	1,15 \pm 0,35 ^b
TT	2,00 \pm 0,18 ^{ac}
TM	1,69 \pm 0,27 ^{bc}
ET	1,95 \pm 0,21 ^c
EM	2,34 \pm 0,09 ^{ac}

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır ($p<0.05$).

Çalışma gruplarında MDA düzeyleri Şekil 4.14. ve Tablo 4.10.'da verilmiştir. Grupların MDA düzeyleri birbirinden farklı bulunmamıştır. Bununla birlikte, EM grubunun, kontrol (%17,5) ve TT (%5,7) gruplarına kıyasla belirgin şekilde daha düşük düzeylerde lipid peroksidasyonu gösterdiği bulunmuştur.

**Şekil 4.14.** Çalışma gruplarında MDA düzeyleri.

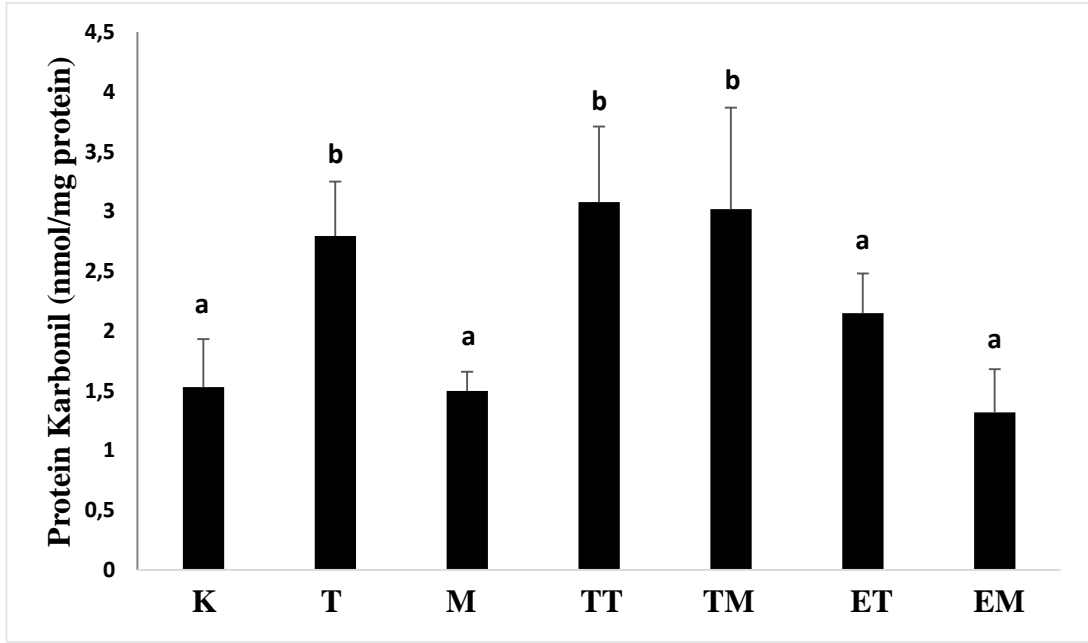
^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır ($p<0.05$).

Tablo 4.10. Çalışma gruplarında MDA düzeyleri.

Deney Grupları	MDA (nmol/mg protein)
K	1,99±0,02 ^a
T	1,93±0,09 ^a
M	1,72±0,14 ^{ab}
TT	1,75±0,24 ^a
TM	1,72±0,24 ^{ab}
ET	1,74±0,24 ^a
EM	1,65±0,14 ^b

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır (p<0.05).

Çalışma gruplarında protein karbonil düzeyleri Şekil 4.15. ve Tablo 4.11.'de verilmiştir. M grubunun protein karbonil düzeylerinin kontrolden farklı olmadığı; bununla birlikte, T grubunun protein karbonil düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde (%82,6) yüksek olduğu bulunmuştur. M grubunun protein karbonil düzeylerinin T grubuna göre anlamlı düzeyde (%46,4) düşük olduğu gösterilmiştir. TT ve ET grupları T grubu ile karşılaştırıldığında, TT grubunun protein karbonil düzeylerinin T grubundan farklı olmadığı; ancak ET grubunda protein oksidasyonunun hem T hem de TT gruplarına göre belirgin olarak azaldığı (sırasıyla %23,1 ve %30,2) görülmüştür. TM ve EM grupları M grubu ile karşılaştırıldığında, EM grubunun protein karbonil düzeylerinin M grubundan farklı olmadığı; TM grubunun protein karbonil düzeylerinin ise hem M hem de EM gruplarına göre anlamlı derecede yüksek (sırasıyla 2 kat ve 2,3 kat) olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.15. Çalışma gruplarında protein karbonil düzeyleri.

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$).

Tablo 4.11. Çalışma gruplarında protein karbonil düzeyleri.

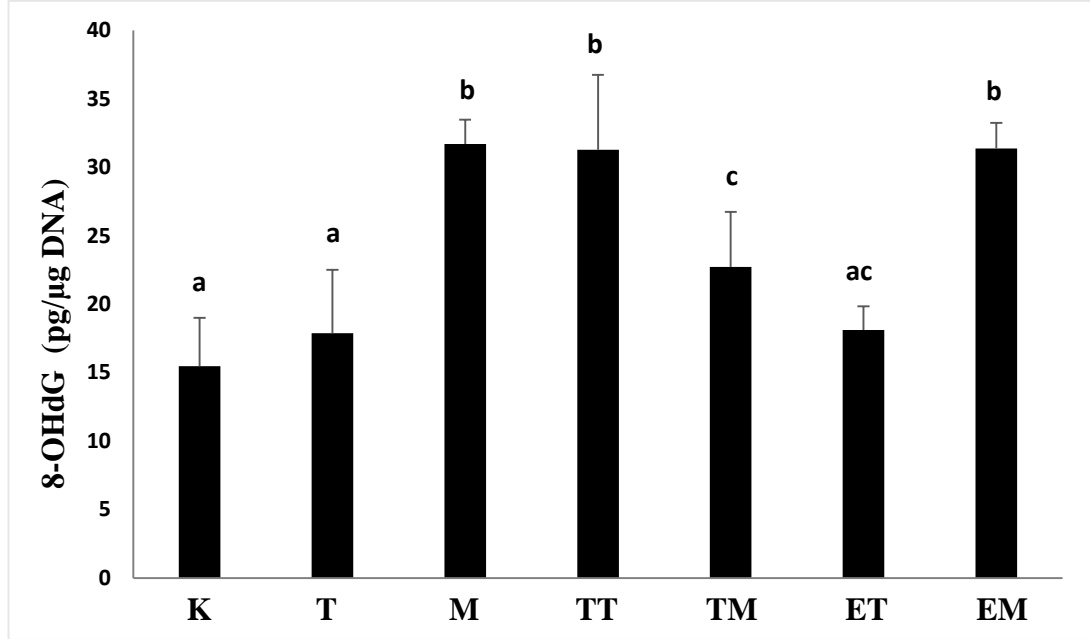
Deney Grupları	Protein Karbonil (nmol/mg protein)
K	1,53±0,40 ^a
T	2,79±0,46 ^b
M	1,50±0,16 ^a
TT	3,08±0,63 ^b
TM	3,02±0,85 ^b
ET	2,15±0,33 ^a
EM	1,32±0,36

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$).

4.5. Oksidatif DNA Hasarı

Çalışma gruplarında 8-OHdG düzeyleri Şekil 4.16. ve Tablo 4.12.'de verilmiştir. T grubunun 8-OHdG düzeylerinin kontrole göre yüksek (%15,5; $p>0,05$) olduğu; bununla birlikte, M grubunun 8-OHdG düzeylerinin kontrol grubunun 2 katına eriştiği bulunmuştur. Ayrıca, M grubunda 8-OHdG düzeylerinin T grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek (%77,3; $p<0,05$) olduğu da görülmüştür. TT ve ET grupları T grubu ile karşılaştırıldığında, ET grubunun 8-OHdG düzeylerinin T grubundan farklı olmadığı; TT grubunun 8-OHdG düzeylerinin ise T ve ET gruplarına göre belirgin

şekilde arttığı (sırasıyla %74,9 ve %72,7; $p<0,05$) belirlenmiştir. TM ve EM grupları M grubu ile karşılaştırıldığında, EM grubunun 8-OHdG düzeylerinin M grubundan farklı olmadığı; TM grubunun 8-OHdG düzeylerinin ise hem M hem de EM gruplarına göre anlamlı derecede azaldığı (sırasıyla %28,3 ve %27,6; $p<0,05$) tespit edilmiştir.



Şekil 4.16. Çalışma gruplarında 8-OHdG düzeyleri.

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

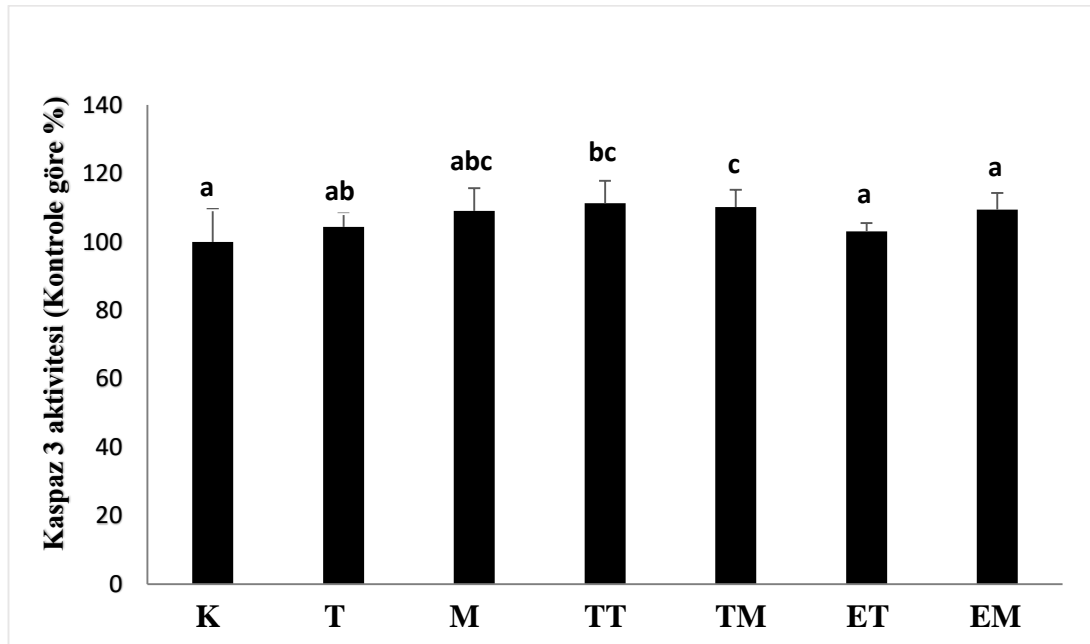
Tablo 4.12. Çalışma gruplarında 8-OHdG düzeyleri.

Deney Grupları	8-OHdG (pg/µg DNA)
K	15,48±3,51 ^a
T	17,88±4,63 ^a
M	31,70±1,77 ^b
TT	31,27±5,46 ^b
TM	22,72±4,02 ^c
ET	18,10±1,75 ^{ac}
EM	31,38±1,87 ^b

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

4.6. Apoptoz-Kaspaz 3, 8 ve 9 aktiviteleri

Çalışma gruplarında kaspaz 3 aktiviteleri Şekil 4.17. ve Tablo 4.13.'de verilmiştir. T ve M gruplarının kaspaz 3 aktivitelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek (sırasıyla %4,4 ve %9) ve M grubunun kaspaz 3 aktivitesinin de T grubuna göre daha yüksek (%4,5; $p>0,05$) olduğu bulunmuştur. TT ve ET grupları T grubu ile karşılaştırıldığında, ET grubunun kaspaz 3 aktivitesi T'den farklı bulunmazken, TT grubunun kaspaz 3 aktivitesi T'den (%6,6; $p>0,05$) anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir. TT grubunun kaspaz 3 aktivitesi ET grubuna göre de anlamlı olarak (%7,9) yüksek bulunmuştur. TM ve EM grupları M grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı; TM ve EM grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında, TM grubunun kaspaz 3 aktivitesinin EM grubuna göre yüksek (%10; $p<0,05$) olduğu görülmüştür.



Şekil 4.17. Çalışma gruplarında kaspaz 3 aktiviteleri.

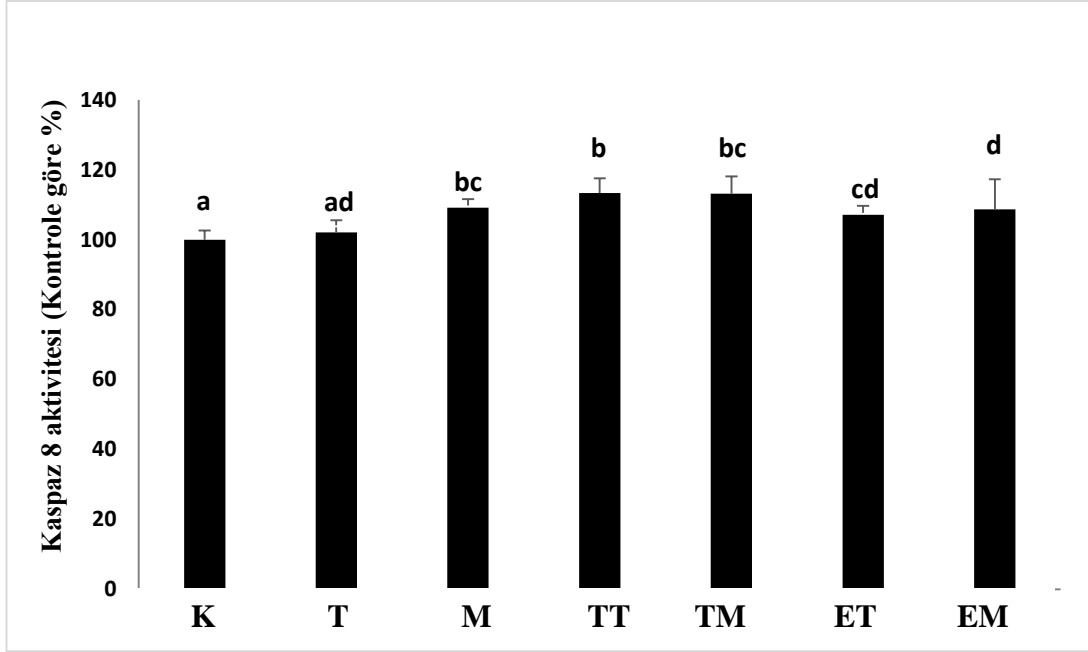
^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

Tablo 4.13. Çalışma gruplarında kaspaz 3 aktiviteleri.

Deney Grupları	Kaspaz 3 aktivitesi (Kontrole göre %)
K	100,00±9,64a
T	104,38±3,94 ^{ab}
M	109,06±6,60 ^{abc}
TT	111,32±6,54 ^{bc}
TM	110,15±5,07 ^c
ET	103,09±2,43 ^a
EM	109,43±4,83 ^a

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır (p<0.05).

Çalışma gruplarında kaspaz 8 aktiviteleri Şekil 4.18. ve Tablo 4.14.'de verilmiştir. T ve M gruplarının kaspaz 8 aktivitelerinin kontrol grubuna göre yüksek (sırasıyla %2,1; p>0.05 ve %9,2; p<0,05); M grubunun kaspaz 8 aktivitesinin de T grubuna göre daha yüksek (%7; p<0,05) olduğu bulunmuştur. TT ve ET grupları T grubu ile karşılaştırıldığında, TT grubunun kaspaz 8 aktivitesinin T'den anlamlı derecede yüksek (%11; p<0,05) olduğu; ET grubunun kaspaz 8 aktivitesindeki artışın ise anlamlı olmadığı (%5,1; p>0,05) görülmüştür. TT grubunun kaspaz 8 aktivitesinin ET grubuna göre anlamlı derecede yüksek (%5,29; p<0,05) olduğu belirlenmiştir. TM ve EM grupları M grubu ile karşılaştırıldığında, TM grubunun kaspaz 8 aktivitesinin M grubuna göre daha yüksek (%3,6; p<0,05) olduğu; EM grubunun kaspaz 8 aktivitesinin M grubundan farklı olmadığı ve EM grubunun kaspaz 8 aktivitesinin, TM grubuna göre daha düşük (%3,9; p<0,05) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.18. Çalışma gruplarında kaspaz 8 aktivitelemi.

a,b,c,d Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p < 0.05$).

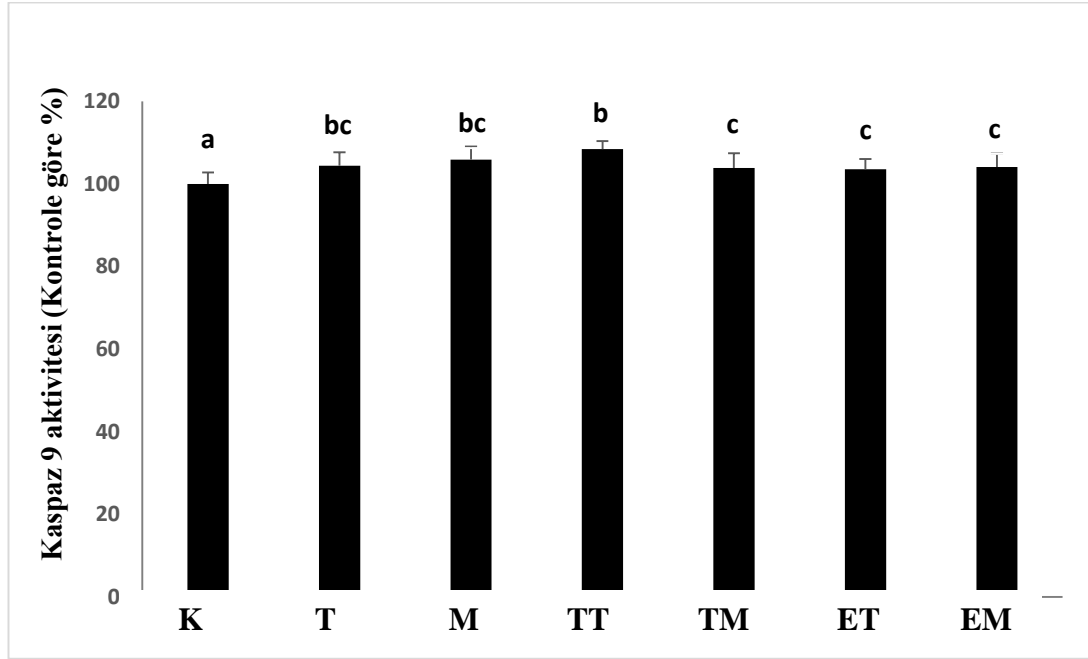
Tablo 4.14. Çalışma gruplarında kaspaz 8 aktivitelemi.

Deney Grupları	Kaspaz 8 aktivitesi (Kontrolle göre %)
K	100,00±2,60 ^a
T	102,11±3,48 ^{ad}
M	109,25±2,33 ^{bc}
TT	113,35±4,22 ^b
TM	113,18±4,88 ^{bc}
ET	107,35±2,29 ^{cd}
EM	108,70±8,61 ^d

a,b,c,d Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p < 0.05$).

Çalışma gruplarında kaspaz 9 aktivitelemi Şekil 4.19. ve Tablo 4.15.'da verilmiştir. T ve M gruplarının kaspaz 9 aktivitelemi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek (sırasıyla %5,7 ve %7,2; $p < 0,05$) olduğu bulunmuştur. TT ve ET grupları T grubu ile karşılaştırıldığında, TT'nin kaspaz 9 aktivitelemi daha yüksek (%3,9; $p < 0,05$) olduğu; ET'nin kaspaz 9 aktivitelemi ise azaldığı ($p > 0.05$) görülmüştür. Ayrıca TT grubunun kaspaz 9 aktivitelemi ET grubuna göre anlamlı

derecede yüksek (%4,8; $p<0,05$) olduğu belirlenmiştir. TM ve EM grupları M grubu ile karşılaştırıldığında, kaspaz 9 aktiviteleri arasında fark olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.19. Çalışma gruplarında kaspaz 9 aktiviteleri.

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

Tablo 4.15. Çalışma gruplarında kaspaz 9 aktiviteleri.

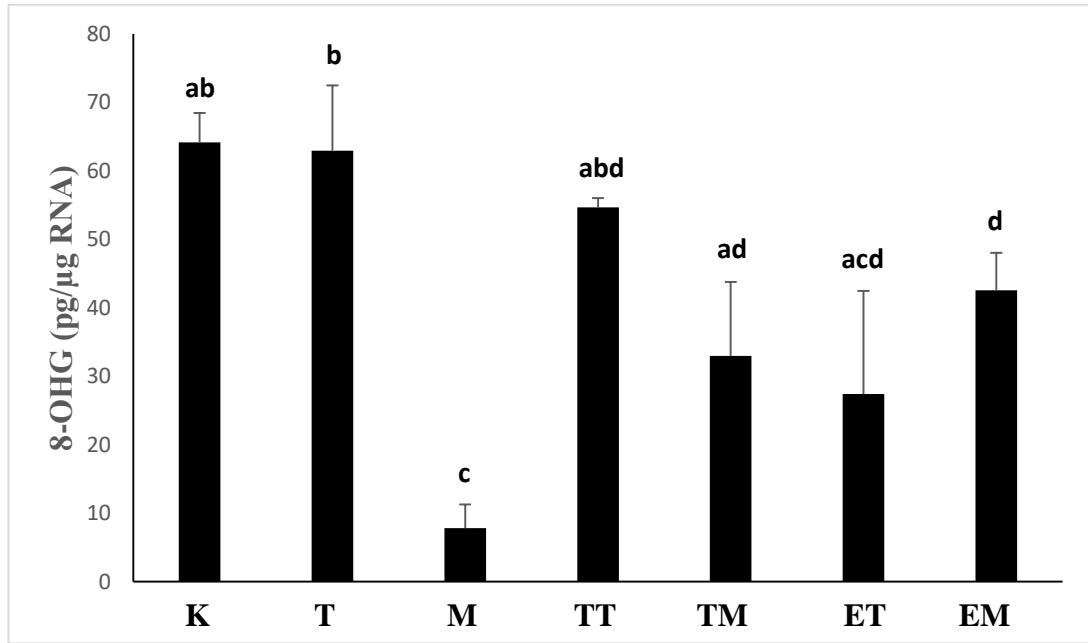
Deney Grupları	Kaspaz 9 aktivitesi (Kontrolle göre %)
K	100,00±2,77a
T	104,42±3,26 ^{bc}
M	105,92±3,17 ^{bc}
TT	108,49±1,92 ^b
TM	103,92±3,53 ^c
ET	103,56±2,53 ^c
EM	104,13±3,22 ^c

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

4.7. Oksidatif RNA Hasarı

Çalışma gruplarında oksidatif RNA hasarı düzeyleri Şekil 4.20. ve Tablo 4.16.'da verilmiştir. T ve M grupları kontrolle kıyaslandığında T grubunda değerlerin kontrole yakın olduğu M grubunda ise kontrole göre değerlerin anlamlı derecede

(%87,8; $p<0,05$) düşük olduğu bulunmuştur. TT ve ET grupları karşılaştırıldığında, TT grubunda düzeylerin ET grubuna göre anlamlı derecede (%99,5; $p<0,05$) yüksek olduğu görülmüştür. TT grubunda değerler T grubuna yakinken, ET grubunda değerler T grubuna göre anlamlı derecede (%56,5; $p<0,05$) düşük bulunmuştur. TM ve EM grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında, TM grubunda değerlerin EM grubuna göre düşük (%22) olduğu görülmüştür. TM ve EM gruplarında değerler M grubuna göre anlamlı derecede yüksek (sırasıyla %323 ve 446%; $p<0,05$) bulunmuştur.



Şekil 4.20. Çalışma gruplarında 8-OHG düzeyleri.

^{a,b,c,d}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

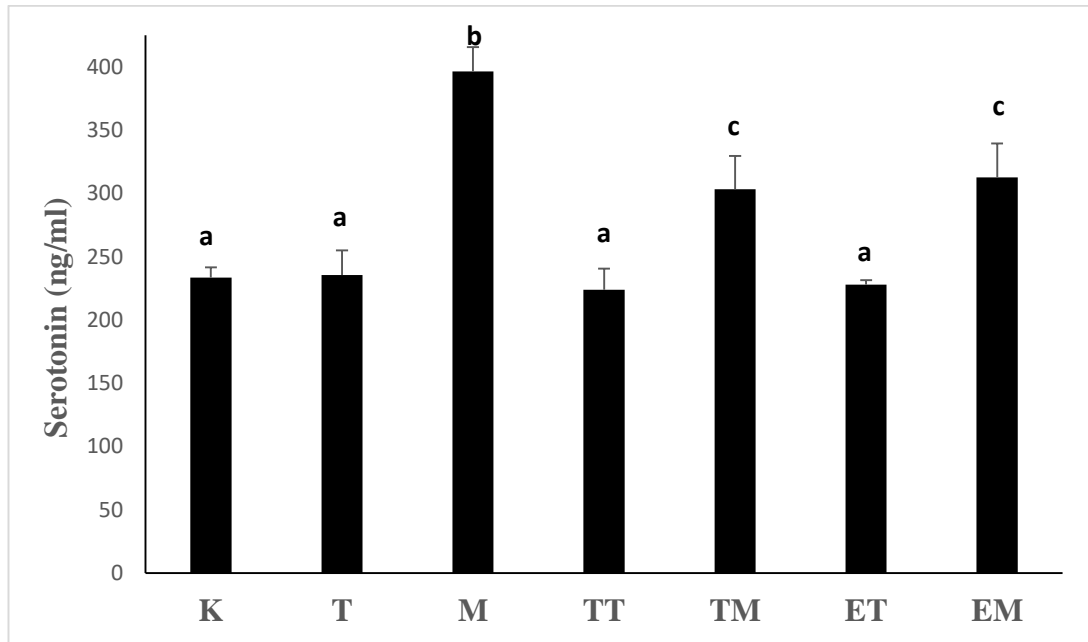
Tablo 4.16. Çalışma gruplarında 8-OHG düzeyleri.

Deney Grupları	8-OHG (pg/µg RNA)
K	64,14±4,31 ^{ab}
T	62,96±9,52 ^b
M	7,80±3,48 ^c
TT	54,66±1,34 ^{abd}
TM	32,97±10,82 ^{ad}
ET	27,39±15,08 ^{acd}
EM	42,54±5,48 ^d

^{a,b,c,d}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

4.8. Serotonin ve Serotonin Taşıyıcı Protein Düzeyleri

Çalışma gruplarında serotonin düzeyleri Şekil 4.21. ve Tablo 4.17.'de verilmiştir. T grubunun serotonin düzeyi kontrole çok yakınken, M grubunun serotonin düzeyini kontrol ve T gruplarına göre anlamlı derecede (sırasıyla %69 ve %68; $p<0,05$) yüksek olduğu bulunmuştur. TT ve ET grupları birbirleri ile ve T grubu ile karşılaştırıldığında, önemli bir fark görülmemiştir. TM ve EM grupları M grubu ile karşılaştırıldığında, serotonin düzeylerinin M grubundan (sırasıyla %23,5 ve %21) düşük olduğu görülmüştür.



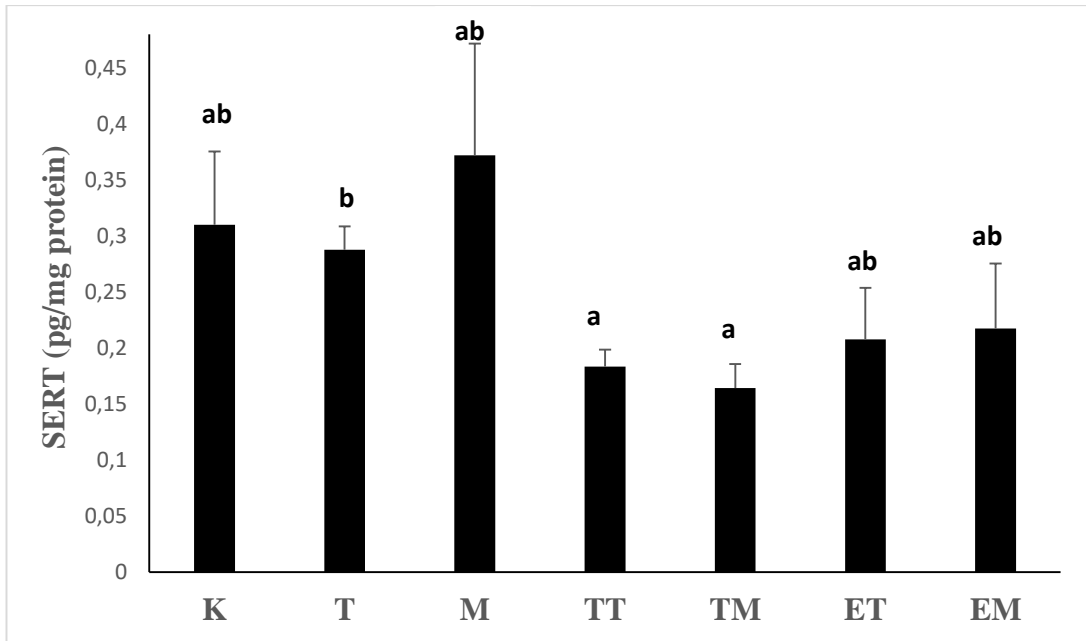
Şekil 4.21. Çalışma gruplarında serotonin düzeyleri.

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

Tablo 4.17. Çalışma gruplarında serotonin düzeyleri.

Deney Grupları	Serotonin (ng/ml)
K	233,33±8,28 ^a
T	235,47±19,43 ^a
M	396,33±19,33 ^b
TT	223,90±16,62 ^a
TM	303,21±26,29 ^c
ET	227,92±3,54 ^a
EM	312,51±26,82 ^c

Çalışma gruplarında SERT düzeyleri Şekil 4.22. ve Tablo 4.18.'de verilmiştir. T grubunun SERT düzeyi kontrolden (%7,2) düşükken, M grubunun SERT düzeyinin kontrol ve T gruplarına göre (sırasıyla %20 ve %29) yüksek olduğu bulunmuştur. TT ve ET grupları T grubu ile karşılaştırıldığında, SERT düzeylerinde düşüş (sırasıyla %35,7 ve %27,76) görülmüştür. ET grubunun SERT düzeyinin TT grubundan daha yüksek (%13,28) olduğu bulunmuştur. TM ve EM grupları M grubu ile karşılaştırıldığında, SERT düzeylerinin M grubundan düşük (sırasıyla %55,8 ve %41,5) olduğu görülmüştür. EM grubunun SERT düzeyinin TM grubundan daha yüksek (%32,43) olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.22. Çalışma gruplarında SERT düzeyleri.

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$).

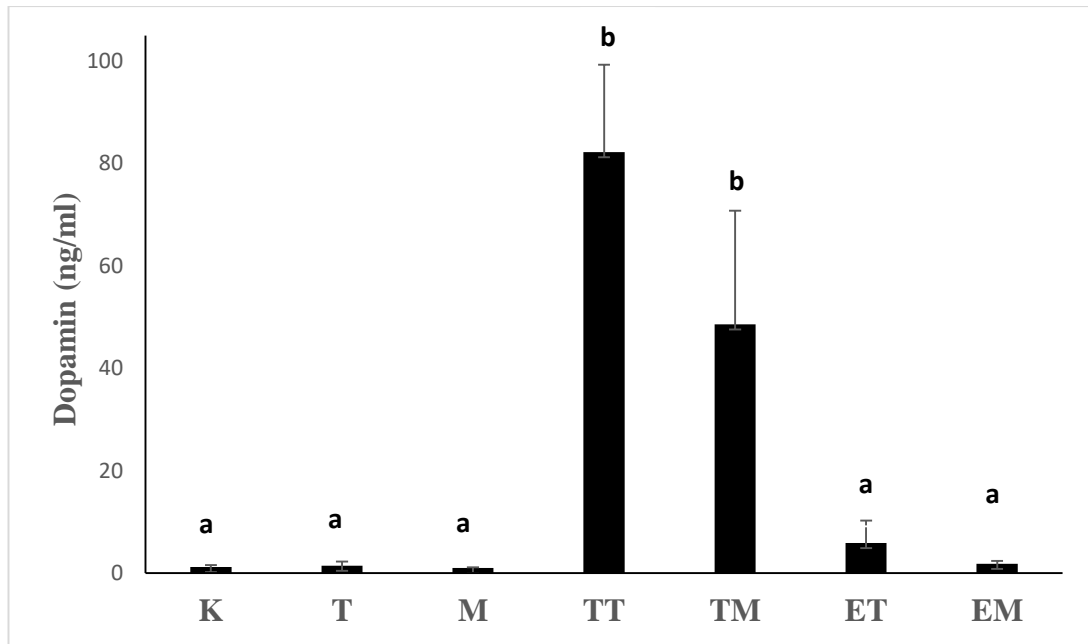
Tablo 4.18. Çalışma gruplarında SERT düzeyleri.

Deney Grupları	SERT (pg/mg protein)
K	0,31±0,06 ^{ab}
T	0,29±0,02 ^b
M	0,37±0,10 ^{ab}
TT	0,18±0,01 ^a
TM	0,16±0,02 ^a
ET	0,21±0,05 ^{ab}
EM	0,22±0,06 ^{ab}

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$).

4.9. Dopamin ve Dopamin Taşıyıcı Protein Düzeyleri

Çalışma gruplarında dopamin düzeyleri Şekil 4.23. ve Tablo 4.19.'da verilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında T grubunun dopamin düzeyinin yüksek (%24), M grubunun dopamin düzeyinin ise düşük (%13,96) olduğu ve T grubunun dopamin düzeyinin M grubundan yüksek (%44,74) olduğu görülmüştür. TT ve ET grupları T grubu ile kıyaslandığında dopamin düzeylerinin anlamlı derecede yüksek (sırasıyla %7000 ve %299) olduğu ve TT grubunun dopamin düzeyinin ET grubundan da anlamlı derecede (%1298,37) yüksek olduğu görülmüştür. TM ve EM grupları birbirleriyle ve M grubu ile karşılaştırıldığında, TM grubunda dopamin düzeylerinin M ve EM grubuna göre anlamlı derecede (sırasıyla %4670 ve %2551,75) yüksek olduğu görülmüştür. EM grubunun dopamin düzeyinin M grubundan yüksek (%79,89) olduğu görülmüştür.



Şekil 4.23. Çalışma gruplarında dopamin düzeyleri.

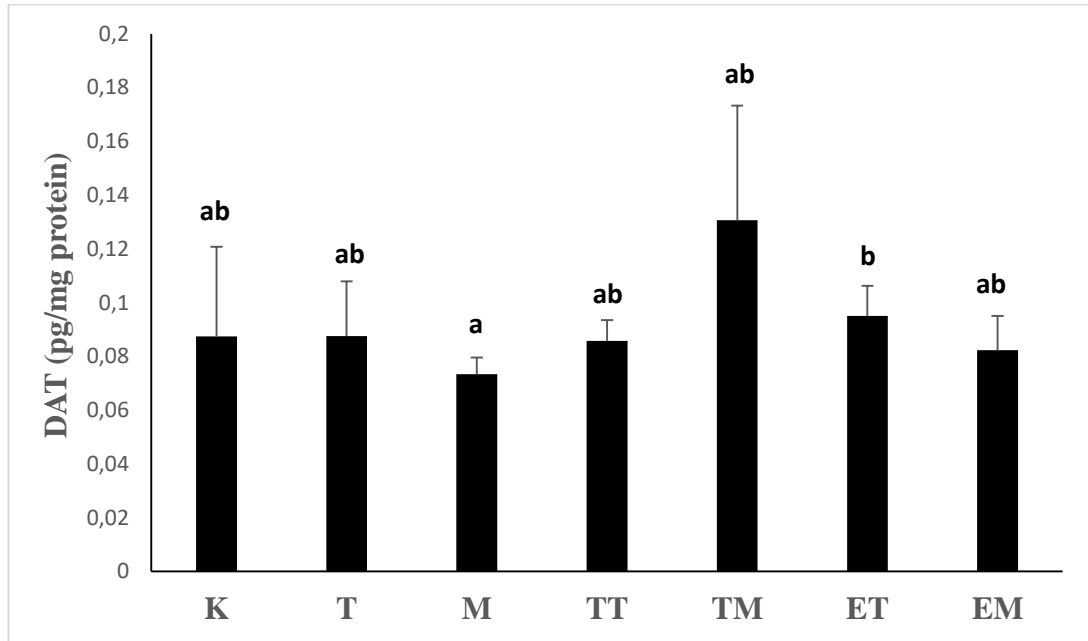
^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ($p < 0.05$).

Tablo 4.19. Çalışma gruplarında dopamin düzeyleri.

Deney Grupları	Dopamin (ng/ml)
K	1,18±0,38 ^a
T	1,48±0,82 ^a
M	1,02±0,12 ^a
TT	82,25±17,01 ^b
TM	48,62±22,14 ^b
ET	5,88±4,42 ^a
EM	1,83±0,58 ^a

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır (p<0.05).

Çalışma gruplarında DAT düzeyleri Şekil 4.24. ve Tablo 4.20.'de verilmiştir. T grubunun DAT düzeyi kontrole çok yakınken, M grubunun DAT düzeyinin kontrol ve T gruplarına göre (sırasıyla %16,09 ve %16,02) düşük olduğu bulunmuştur. TT ve ET grupları birbirleriyle ve T grubu ile karşılaştırıldığında, TT ve T gruplarının DAT düzeylerinin çok yakın ve ET grubunun DAT düzeyinin TT ve T gruplarına göre hafif (sırasıyla %10,74 ve %8,59) yüksek olduğu görülmüştür. TM ve EM gruplarının DAT düzeyleri birbirleriyle ve M grubu ile karşılaştırıldığında, EM grubu ile M grubunun DAT düzeylerinin yakın olduğu, TM grubunun DAT düzeyinin ise M ve EM gruplarından (sırasıyla %78,12 ve %58,72) yüksek olduğu bulunmuştur.

**Şekil 4.24.** Çalışma gruplarında DAT düzeyleri.

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır (p<0.05).

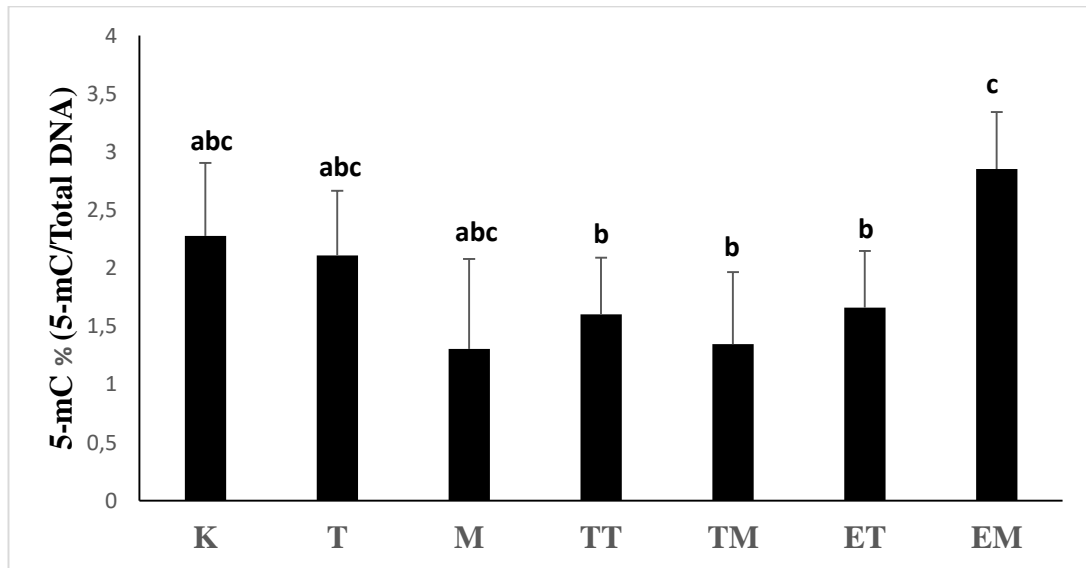
Tablo 4.20. Çalışma gruplarında DAT düzeyleri.

Deney Grupları	DAT (pg/mg protein)
K	0,09±0,03 ^{ab}
T	0,09±0,02 ^{ab}
M	0,07±0,01 ^a
TT	0,09±0,01 ^{ab}
TM	0,13±0,04 ^{ab}
ET	0,09±0,01 ^b
EM	0,08±0,01 ^{ab}

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır (p<0.05).

4.10. Global Metilasyon

Çalışma gruplarında global metilasyon düzeyleri Şekil 4.25. ve Tablo 4.21.'de verilmiştir. T ve M grupları kontrolle kıyaslandığında T grubunda mC değerlerinin kontrole yakın olduğu M grubunda değerlerin (%42,67) düşük olduğu bulunmuştur. TT ve ET grupları birbirleriyle ve T grubu ile karşılaştırıldığında, TT ve ET gruplarında değerlerin yakın ve T grubuna göre (sırasıyla %24,06 ve %21,37) düşük olduğu görülmüştür. TM ve EM grupları birbirleriyle ve M grubu ile karşılaştırıldığında, M ve TM grubunda mC değerlerinin yakın olduğu, EM grubunda ise düzeylerin M ve TM gruplarına göre (sırasıyla %118,65 ve %111,81) daha yüksek olduğu görülmüştür.

**Şekil 4.25.** Çalışma gruplarında 5-mC % düzeyleri.

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır (p<0.05).

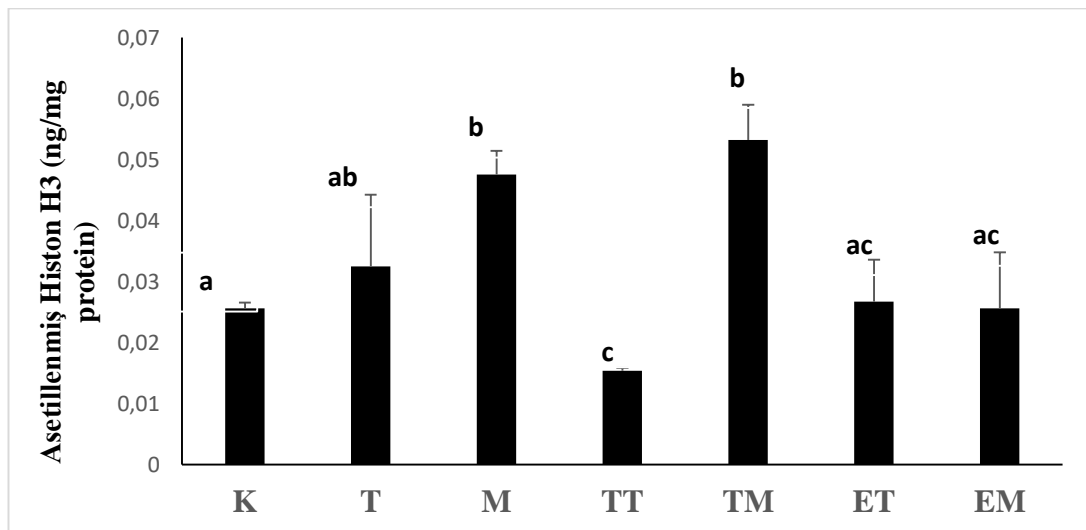
Tablo 4.21. Çalışma gruplarında 5-mC % düzeyleri.

Deney Grupları	Global Metilasyon (5-mC %)
K	2,28±0,63 ^{abc}
T	2,11±0,56 ^{abc}
M	1,30±0,77 ^{abc}
TT	1,60±0,49 ^b
TM	1,35±0,62 ^b
ET	1,66±0,49 ^b
EM	2,85±0,49 ^c

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır (p<0.05).

4.11. Histon Asetilasyonu

Çalışma gruplarında histon asetilasyon düzeyleri Şekil 4.26. ve Tablo 4.22.'de verilmiştir. T ve M gruplarında histon asetilasyon düzeylerinin kontrole göre (sırasıyla %26,92 ve %85,71) yüksek ve M grubundaki artışın T grubuna göre yüksek (%46,32) olduğu görülmüştür. TT ve ET grupları birbirleriyle ve T grubu ile karşılaştırıldığında, TT grubunda histon asetilasyon düzeyinin T ve ET gruplarından (sırasıyla %52,66 ve %42,44) düşük olduğu görülmüştür. TM ve EM grupları birbirleriyle ve M grubu ile karşılaştırıldığında, EM grubunda histon asetilasyon düzeyinin TM ve M gruplarına göre (sırasıyla %51,83 ve %46,12) düşük olduğu, TM grubu ile M grubunda değerlerin yakın olduğu bulunmuştur.

**Şekil 4.26.** Çalışma gruplarında asetillenmiş histon H3 düzeyleri.

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır (p<0.05).

Tablo 4.22. Çalışma gruplarında asetillenmiş histon H3 düzeyleri.

Deney Grupları	Histon Asetilasyon (ng/mg protein)
K	0,03±0,00 ^a
T	0,03±0,01 ^{ab}
M	0,05±0,00 ^b
TT	0,02±0,00 ^c
TM	0,05±0,01 ^b
ET	0,03±0,01 ^{ac}
EM	0,03±0,01 ^{ac}

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır (p<0.05).

5. TARTIŞMA

Cıva hem çevresel toksisitesi olan hem de insan sağlığına birçok olumsuz etkisi olan küresel bir kirleticidir. Elementel, inorganik ve organik cıva bileşikleri dahil olmak üzere birçok kimyasal formda bulunur (15, 233). Cıvaya maruziyet sıklıkla balık ve diğer deniz ürünleri gibi diyetle bağlı olabilir. Ayrıca, tiyomersal içeren aşılarda ve dental amalgamlar gibi diyet dışı kaynaklar yoluyla cıva maruziyeti gerçekleşebilir. Diğer taraftan, endüstriyel faaliyetler çevreye cıva yayılmasında önemli rol oynar. Cıva üreten iş yerlerinde çalışan işçilerinde farklı cıva formlarına yüksek düzeylerde teması söz konusudur. Farklı cıva formlarının insanlar üzerinde farklı toksik etkilere sahip olabileceği bildirilmiştir (15).

Organik cıva formları, element cıva karbon ile temas ettiğinde oluşur. Organik cıva formlarına maruziyet çok yaygındır ve metal maruziyetleri içinde en tehlikelilerden biridir (1). Organik cıva bileşiklerine maruziyet, temas süresine ve konsantrasyona bağlı olarak motor gelişim ve bilişsel aktivitelerdeki bozulmalardan ciddi nöromotor değişikliklere kadar değişebilen önemli nörotoksik etkilere neden olmaktadır (37, 234). Organik cıva bileşikleri nörotoksik etkilerini, birçok farklı mekanizmayla gösterir. Bu mekanizmalardan en iyi tanımlanmış olanları şunlardır (2, 235-237):

- Mitokondriyal homeostazdaki bozulma
- Kalsiyum dengesinde değişiklikler
- Nörotransmitter sistemlerdeki değişiklikler
- Aşırı ROS üretimi
- Hücre ölümünün indüklenmesi
- Önemli hücre antioksidanların tükenmesi
- Nöronal göçün inhibisyonu
- Glutamat taşınmasının inhibisyonu.

Metil cıva ve etil cıva en sık maruz kalınan organik cıva türleridir. Genellikle “kısa zincirli cıva molekülleri” olarak adlandırılırlar (37). Metil cıva merkezi sinir sisteminde ciddi hasara neden olduğu iyi bilinen bir nörotoksik bileşiktir. Etil cıva ise,

tiyomersalin moleküler ağırlığının ~%50'sini oluşturan bir diğer organik cıva bileşimidir (3). Tiyomersal, başta aşılarda olmak üzere birçok tıbbi ve kozmetik üründe bulunan antibakteriyel ve antifungal bir koruyucudur. Tiyomersalin toksikolojik profili son 30 yılda birçok bilim insanının dikkatini çekmiştir ve bileşiğin nörogelişimsel bozukluklara neden olabileceği ileri sürülmektedir (3, 37, 238).

Son yıllarda insan ve hayvan çalışmaları, nörotoksitede cinsiyet farklılıklarının beklenenden daha da önemli olduğunu ortaya koymuştur. Cinsiyete özgü semptomların tanınması, risk faktörlerinin gözlenmesi ve cinsiyetin kişiyi belirli metallerin ve kimyasalların toksisitesine karşı daha savunmasız hale getirebileceğini bilmek, etkili önleme ve tedavi stratejileri için son derece önemlidir (81).

Testosteron ve 17 β -estradiol esas olarak üreme işlevleriyle ilişkili steroid hormonlardır. Canlı organizmada hemen her hücre, doku ve organda bu hormonlara yanıtın geliştiği bilinmektedir. Esas olarak doku ve organ farklılaşması, kemik metabolizması ve enflamasyon gibi hücresel olayları etkilerler. Her iki hormonun da sinir sistemi, karaciğer ve kardiyovasküler sistem üzerinde etkileri olduğu bildirilmektedir (239-241).

Apoptozun düzenlenmesinde androjen ve östrojenlerin farklı hücre sinyali yolları ile hareket ettiği ve her iki steroid için de farklı dozlarda apoptotik ve anti-apoptotik davranış gözlenebildiği bilinmektedir. Bu nedenle bu hormonlar hücre tipi, hormon konsantrasyonu ve hücre ortamı gibi faktörlere bağlı olarak apoptoz üzerinde farklı etkiler gösterirler (241, 242). Oksidatif stresin çeşitli faktörlere bağlı olarak arttığı durumlarda testosteronun oksidatif strese bağlı hasarı şiddetlendirdiği bildirilmektedir (243). Testosteronun özellikle dopaminerjik nöronlarda oksidatif strese bağlı nörotoksiteyi artırdığı ve apoptoza yol açtığı bilinmektedir (93). Estradiolün nöronlar ve glial hücreler üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar, nöronların hayatta kalmasını desteklediğini ve nörodejeneratif hasarı azalttığını göstermektedir (244-247). Primer nöronal hücreler, tümör kaynaklı nöronal hücre dizileri, nöron/astroit kültürleri gibi birçok farklı hücre tipinde oluşturulan beyin hasarı modellerinde estradiolün hücre ölümüne karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (246, 247).

Sunulan bu tez çalışmasında, çevrede oldukça yaygın olarak bulunan ve çeşitli yollarla sıklıkla maruz kalınan çevresel nörotoksik bileşiklerden olan metil cıva ve

tiyomersalin neden olabileceği toksisite ile estradiol ve testosteronun bu toksik etkiler üzerinde meydana getireceği değişiklikler SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında incelenmiştir. Bu toksik etkilerin altında yatan olası mekanizmalar, oksidatif stres parametreleri, antioksidan enzim aktiviteleri, oksidatif DNA ve RNA hasarı, nörotransmitter ve nörotransmitter taşıyıcı düzeyleri, apoptoz ve epigenetik değişiklikler açısından kapsamlı olarak değerlendirilmiştir.

5.1. Hücre Canlılığı

Metil cıva ve tiyomersalin SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki toksik etkilerini inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır (153, 236, 248-254).

Sanfeliu ve ark. (248) SH-SY5Y hücrelerinde metil cıva kaynaklı nörotoksisiteyi araştırmışlar ve 24 saatlik inkübasyondan sonra metil cıva için letal konsantrasyon 50 (LC₅₀) değerini 6,9 µM olarak belirlemişlerdir. Toimela ve Tahti (153), SH-SY5Y hücrelerine 0,01-1000 µM arasında değişen konsantrasyonlarda metil cıva uygulamışlardır. Nöroblastoma hücrelerinin metil cıvaya çok duyarlı olduğu ve 24 saat için etkin doz 50 (EC₅₀) değerinin ~1 µM olduğunu bulmuşlardır. Franco ve ark. (236) SH-SY5Y hücrelerine 0,5; 1; 1,5 ve 2 µM konsantrasyonlarda metil cıva uygulamışlar ve hücre canlılığının doza bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Posser ve ark. (249) SH-SY5Y hücrelerini değişen konsantrasyonlarda (0,1-3 µM) metil cıvaya maruz bırakmışlar ve hücre canlılığını CellTiter-Blue® yöntemi ile incelemişlerdir. Araştırmacılar metil cıvanın doza bağlı bir şekilde hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Guida ve ark. (250) SH-SY5Y hücrelerini 24 saat boyunca değişen konsantrasyonlarda (0,01-1 µM) tiyomersale maruz bırakmışlar; MTT yöntemi ile hücre canlılığını belirlemişler ve 0,5 µM tiyomersalin hücrelerin yaklaşık %50'sinin ölümüne neden olduğunu bulmuşlardır. Ishihara ve ark. (251) SH-SY5Y hücrelerini 1 ve 10 µM metil cıva ile 24 saat inkübasyona bırakmışlar ve 1 µM metil cıvaya maruz kaldıktan sonra hücrelerin yaklaşık %40'ının öldüğünü tespit etmişlerdir. Ayrıca 10 µM metil cıvaya maruziyet sonrası hücrelerin neredeyse %100'ünün öldüğünü bulmuşlardır. Branco ve ark. (252) SH-SY5Y hücrelerini metil cıva ve etil cıvaya maruz bırakmışlar; sitotoksisiteyi laktat dehidrojenaz (LDH) analizi ile değerlendirmişler ve 24 saat inkübasyondan sonra etil cıva ve metil cıva için LC₅₀ değerlerini sırasıyla 4,6 ve 4,9 µM olarak belirlemişlerdir. Algarve ve ark. (253) metil

cıvaya maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığını incelemişler; hücre canlılığının 3 μM konsantrasyonda azalmaya başladığını ve canlı hücre sayısının 6 μM metil cıvaya maruz kaldıktan sonra yaklaşık %50'ye düştüğünü bulmuşlardır. Oguro ve ark. (254) SH-SY5Y hücrelerini 1-10 μM dozlarda metil cıvaya maruz bırakmışlar ve MTT analizi ile hücre canlılığını değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, 3 μM metil cıva maruziyetinin hücre canlılığını yaklaşık %40'a kadar azalttığını bildirmişlerdir. 10 μM metil cıva maruziyetinden sonra hiç hücre canlılığı gözlenmediği tespit edilmiştir. Araştırmacılar ayrıca 0-24 saat arasında inkübasyonda hücrelere 3 μM dozunda metil cıva uygulamışlar ve 2 saat sonra hücre canlılığının azalmaya başladığını tespit etmişlerdir.

Bu tez çalışmasında tiyomersal ve metil cıvanın insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y üzerindeki toksik etkileri değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Hücre canlılığı MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Tiyomersal ve metil cıva için IC_{50} değerleri sırasıyla 2,37 ve 7,40 μM ve IC_{20} değerleri sırasıyla 1,15 ve 2,93 μM olarak belirlenmiştir. Hem metil cıva hem de tiyomersal için hücre canlılığında doza bağlı bir azalma gözlenmiştir. Tiyomersalin IC_{50} değeri metil cıvaya göre daha düşük bulunmuştur. Ancak metil cıvanın değerlendirilen parametreler için daha belirgin toksisite gösterdiği belirlenmiştir.

Literatürde metil cıva ve tiyomersal (etil cıva) karşılaştırıldığında, dağılım ve eliminasyon davranışlarının, yani toksikokinetik profillerinin farklı olduğu ve etil cıvanın daha kısa yarı ömre sahip olduğu bildirilmiştir (3). Yeni doğan maymunlar üzerinde yapılan çalışmada, tiyomersal maruziyetinden sonra kandaki cıvanın başlangıç ve son yarılanma ömrü sırasıyla 2,1 ve 8,6 gün olarak tespit edilirken, metil cıva maruziyetinden sonra cıvanın eliminasyon yarı ömrü 21,5 gün olarak bulunmuştur. Metil cıvaya maruz bırakılan yavru maymunlarda beyindeki toplam cıva konsantrasyonunun, tiyomersale maruz kalanlara kıyasla yaklaşık 3 kat daha düşük olduğu, ortalama beyin-kan konsantrasyon oranının ise tiyomersale maruz bırakılan maymunlarda biraz daha yüksek olduğu (tiyomersal için $3,5 \pm 0,5$; metil cıva için $2,5 \pm 0,3$) da tespit edilmiştir. Tiyomersale maruz bırakılan maymunlarda beyindeki toplam cıvanın %34'ünün, metil cıvaya maruz kalanlarda ise %7'sinin inorganik cıva formunda olduğu da bildirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, metil cıvanın tiyomersal kaynaklı cıva maruziyeti riskinin değerlendirilmesi için uygun bir referans olmadığını,

tiyomersal içeren preparatların toksik etkilerinin doğru değerlendirilmesi için tiyomersal toksikokinetiğinin ve toksisitesinin daha kapsamlı çalışmalarla araştırılması gerektiğini göstermektedir (46).

5.2. Oksidatif Stres Parametreleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Cıva bileşikleri elektrofil olarak, hücre kültür ortamından gelen tiyollerle hızla reaksiyona girerler ve hücrelerin içine girdikten sonra biyomoleküllerin –SH ve -SeH gruplarına neredeyse tamamen bağlanmaları beklenir (3). Organik cıva bileşiklerine maruziyet sonucu oluşan tiyol/selenol redoks durumundaki değişiklikler, genellikle protein fonksiyonunun kaybına yol açar ve nörotoksisitelere önemli ölçüde katkıda bulunan bir oksidatif etki meydana gelir (3, 237, 255, 256). Tiyomersal ve biyotransformasyonundan sonra oluşan etil cıvanın toksikolojik mekanizmaları, GSH tüketmeleri ve ROS artışına yol açmaları; sonrasında ise mitokondriyal membran geçirgenliğinin artışı sonucu Ca^{+2} akışına neden olmaları şeklinde açıklanmıştır (257). Nöroblastoma hücrelerinin, merkezi sinir sistemi için tiyomersal içeren aşılarda ve bu bileşikler içeren diğer farmasötik formüllerin toksik potansiyelini oluşturan etil cıvaya bağlı gelişen oksidatif hasara karşı oldukça duyarlı olduğu bildirilmiştir (258, 259).

Sanfeliu ve ark. (248) SH-SY5Y hücrelerinde metil cıva kaynaklı nörotoksiteyi araştırdıkları çalışmada, GSH'nin metil cıvanın neden olduğu sitotoksositeye karşı önemli bir antioksidan olduğunu bildirmişlerdir. Franco ve ark. (236) yaptıkları çalışmada SH-SY5Y hücrelerinin 1, 1,5 ve 2 μ M metil cıva ile 24 saat inkübasyonu sonunda GPx aktivitesinde önemli bir düşüş görüldüğünü bildirmişlerdir. Petroni ve ark. (260), SH-SY5Y hücrelerini 0, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda metil cıva ile 48 saat inkübe etmişler ve GSH düzeylerinin doza bağlı olarak anlamlı ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Branco ve ark. (252) SH-SY5Y hücrelerinde etil ve metil cıvaya 5 μ M konsantrasyonda maruz kalmanın bir sonucu olarak, toplam GSH düzeylerinin etil cıva için %40 ($p < 0,01$) ve metil cıva için %20 ($p < 0,05$) oranında önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada oksidatif stresi değerlendirmek için GSH, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu düzeyleri ile antioksidan enzimler CAT, SOD ve GPx aktiviteleri ölçülmüştür. Lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında fark bulunmamıştır. Tiyomersal ve metil cıva

uygulanmış hücrelerde toplam GSH düzeyleri azalmıştır ve metil cıva grubundaki düşüş anlamlıdır. Protein karbonil düzeyleri metil cıva grubunda kontrole göre farklı bulunmazken, tiyomersal grubunda belirgin şekilde daha yüksek bulunmuştur. Testosteron ve estradiolün tiyomersal ve metil cıva ile muamele edilmiş hücrelerdeki etkileri değerlendirildiğinde, yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerde yalnız tiyomersal uygulanan gruba göre GSH düzeylerinin azaldığı ve protein karbonil düzeylerinin arttığı görülmüştür. Yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücreler yalnız tiyomersal uygulananlarla kıyaslandığında ise, GSH düzeyinde yine düşüş olduğu, protein karbonil düzeylerinin ise yakın değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında metil cıva uygulanan hücrelerde (yalnız metil cıva uygulanan hücrelere kıyasla), toplam GSH düzeylerinin biraz daha yüksek ve protein karbonil düzeylerinin önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücrelerde yalnız metil cıva uygulanan hücrelere kıyasla toplam GSH düzeylerinin önemli ölçüde yüksek olduğu ve protein karbonil düzeylerinin ise belirgin bir şekilde değişmediği tespit edilmiştir.

Hem tiyomersal hem de metil cıva uygulandıkları hücrelerde kontrol grubuna kıyasla CAT aktivitesinde önemli olmayan bir artışa neden olmuştur. GPx aktivitesinde tiyomersal kaynaklı artış önemli bulunmazken, metil cıva hem kontrol hem de tiyomersal gruplarına kıyasla belirgin bir artışa yol açmıştır. SOD aktivitesi, tiyomersal uygulanmış hücrelerde kontrole kıyasla azalırken, metil cıva grubunda hem kontrol hem de tiyomersal grupları ile karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde önemli bir düşüş gözlenmiştir. Testosteron ve estradiolün tiyomersal ve metil cıvaya maruz kalmış hücrelerdeki etkileri değerlendirildiğinde, yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında tiyomersal uygulanan hücreler yalnız tiyomersal uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında, CAT ve SOD aktivitelerinin azaldığı ve GPx aktivitesinin önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Yüksek estradiol düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerde SOD ve GPx aktivitelerinin sadece tiyomersal uygulananlara çok yakın olduğu, CAT aktivitesinde ise artış görüldüğü bulunmuştur. Yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında metil cıva uygulanan hücreler yalnız metil cıva uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında, CAT aktivitesinin önemli ölçüde arttığı ve GPx aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Yüksek estradiol/düşük

testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücrelerde yalnız metil cıva uygulananlara kıyasla CAT ve GPx aktiviteleri önemli ölçüde azaldığı, SOD aktivitesinde ise belirgin değişiklik olmadığı görülmüştür.

5.3. Hücre içi ROS Düzeyleri

Petroni ve ark. (260) SH-SY5Y hücrelerini 0, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda metil cıva ile 24 ve 48 saat inkübe etmişler ve her iki zaman periyodunda da 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda metil cıvanın ROS oluşumunu iki kat arttırdığını tespit etmişlerdir. Ishihara ve ark. (251) ROS ölçümü için floresan probu [2',7'-diklorodihidrofloresin diasetat (H₂DCFDA, diklorofloresin diasetat)] kullanılmış ve SH-SY5Y hücrelerinin 1 µM metil cıvaya maruz bırakılmasından sonra hücre içi ROS düzeylerinin önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir. Oguro ve ark. (254) SH-SY5Y hücrelerinde hücre içi ROS düzeylerinin, 3 µM metil cıva maruziyeti ile 2 saatlik inkübasyondan sonra önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada hücre içi ROS düzeyleri ölçülmüştür. Hücre içi ROS düzeyleri, kontrole karşı tiyomersal grubunda biraz artmıştır. Öte yandan, metil cıvaya maruz kalmış hücrelerde ROS düzeyleri, kontrole göre önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Testosteron ve estradiolün tiyomersal ve metil cıvaya maruz kalmış hücrelerdeki etkileri değerlendirildiğinde, yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerde hücre içi ROS düzeyleri yalnız tiyomersal uygulananlara kıyasla biraz artmıştır. Yüksek estradiol düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücre içi ROS düzeyleri yalnız tiyomersal uygulananlarla aynıdır. Yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında ise, metil cıva uygulanan ve yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücrelerde hücre içi ROS düzeyleri yalnız metil cıva uygulananlarla aynıdır.

5.4. Oksidatif DNA ve RNA Hasarı

Hem ekzojen hem endojen kaynaklı ROS hücresel DNA, RNA, protein ve lipitlere zarar verir. Bu reaktif bileşikler özellikle nükleik asitlerde kimyasal modifikasyonlara neden olabilmektedir. Cıva bileşiklerinin nükleik asitlerde hasarı indüklemeye ve mitokondriyal fonksiyon gibi önemli hücresel süreçleri bozma potansiyeline sahip oldukları bilinmektedir.

Algarve ve ark. (253) çalışmalarında 3 µM metil cıvaya maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde DNA hasarını değerlendirmişler ve metil cıvanın, kontrol grubuna kıyasla 8-deoksiguanozin (8-dOHG) düzeylerini yaklaşık 4 kat arttırdığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada DNA'da meydana gelen oksidatif hasarı tespit etmek için 8-OHdG düzeyleri ölçülmüştür. Tiyomersal ve metil cıva uygulanan hücrelerde 8-OHdG düzeylerinin kontrole göre arttığı ve bu artışın metil cıva verilen grupta iki kat kadar olduğu bulunmuştur. Ayrıca metil cıva verilen grupta 8-OHdG düzeylerinin T grubuna göre de anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Testosteron ve estradiolün tiyomersal ve metil cıvaya maruz kalmış hücrelerdeki etkileri değerlendirildiğinde, yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında tiyomersal uygulanan hücreler yalnız tiyomersal uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında, 8-OHdG düzeylerinin belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir. Yüksek estradiol düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerde 8-OHdG düzeylerinin T grubundan farklı olmadığı tespit edilmiştir. Yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında metil cıva uygulanan hücreler yalnız metil cıva uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında 8-OHdG düzeylerinin metil cıva uygulanan hücelere göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir. Yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücrelerde yalnız metil cıva uygulananlara kıyasla 8-OHdG düzeylerinin farklı olmadığı görülmüştür.

Bu çalışmada, RNA'da meydana gelen oksidatif hasarı tespit etmek için 8-OHG düzeyleri ölçülmüştür. Yalnız metil cıva uygulanan hücrelerde RNA hasar düzeylerinin yalnız tiyomersal uygulanan hücreler ve kontrole grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. Yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerde RNA hasarının yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerde RNA hasarı yalnız tiyomersal uygulanan hücelere göre daha düşük bulunmuştur.

5.5. Apoptoz (Kaspaz 3, 8 ve 9 Aktiviteleri)

Hücre ölümü, doku homeostazını koruyan, istenmeyen veya hasarlı hücreleri uzaklaştıran ve daha fazla büyüme ve farklılaşmayı destekleyen hücresel bileşenlerin

geri dönüşümünü sağlayan temel bir süreçtir. Ölen hücrelerin morfolojisine dayanarak, yaygın olarak incelenen iki farklı hücre ölümü tipi apoptoz ve nekrozdur. Kaspazlar, apoptozdaki rolleri iyi tanımlanmış sistein proteazlardır. Kaspaz 8, hücre ölümünde hem reseptör aracılı apoptoza hem de yokluğunda nekroptoza aracılık ederek ikili rol oynar. Kaspaz 8 ayrıca yetişkin T hücre popülasyonunun korunması ve homeostazında da işlev görür. Kaspaz 3, doku farklılaşması, rejenerasyon ve nöral gelişimde de etkili bir role sahiptir. Ayrıca, belirgin apoptotik aktivite göstermeden de regülasyonunu sağladığı birçok yolakta görev alır (261).

Toimela ve Tahti (153), mitokondriyal suda çözünen formazan 1 (WST-1) testi ve apoptoz düzeylerine göre metil cıvanın SH-SY5Y hücrelerinde doza ve zamana bağlı toksisiteye neden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada 6, 24 ve 48 saat sonra 0,1; 1 ve 10 μM konsantrasyonlarda metil cıva maruziyetine bağlı olarak kaspaz 3 aktivitesinde bir artış olduğu da gösterilmiştir. Franco ve ark. (236) metil cıva uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde apoptozu propidyum iyodür (PI) analizi ile değerlendirmişlerdir. 0,5 μM 'dan 1,5 μM konsantrasyonlara apoptotik çekirdek sayısının arttığını ve 24 saat süreyle 1 μM metil cıva ile inkübe edilen hücrelerde poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) bölünmesinin belirgin olduğunu bildirmişlerdir. Posser ve ark. (249) SH-SY5Y hücrelerini değişen konsantrasyonlarda (0,1-3 μM) metil cıvaya maruz bırakmışlar ve hücre ölümünü PI ve PARP yarıma analizi ile değerlendirmişlerdir. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda metil cıva uygulandıktan sonra, apoptotik hücre sayısında doza bağlı bir artış görüldüğü ve 0,5; 1 ve 1,5 μM metil cıva konsantrasyonlarının hücrelerde apoptotik çekirdekleri önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir. Ek olarak, 0,5 ve 1 μM metil cıva konsantrasyonlarının, 24 saatlik inkübasyondan sonra PARP bölünmesine neden olduğu da gösterilmiştir. Guida ve ark. (250) SH-SY5Y hücrelerini 24 saat boyunca değişen konsantrasyonlarda (0,01-1 μM) tiyomersale maruz bırakmışlar, Annexin V-PI boyamasını kullanarak tiyomersalin erken apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu belirlemişlerdir. Branco ve ark. (252) SH-SY5Y hücrelerinde hücre ölümünü kaspaz 3 aktivitesi ve apoptotik hücre sayımı ile değerlendirmişlerdir. 5 μM etil cıvanın kaspaz 3 aktivitesini 1,5 kat arttırdığını ve 24 saatin sonunda hem metil hem de etil cıva (0, 1, 5, 10, 25, 50 μM) uygulanan hücrelerde apoptotik hücre sayısının önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır. Algarve ve ark. (253) çalışmalarında 3 μM metil cıvaya maruz bırakılan SH-SY5Y

hücrelerinde hücre ölümünü değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, metil cıvanın, kontrol grubuna kıyasla kaspaz 3 ve kaspaz 8 düzeylerinin kontrole göre önemli ölçüde (sırasıyla yaklaşık 6 kat ve 7 kat) daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada tiyomersal ve metil cıva uygulanan hücrelerin kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivitelerinin kontrole göre ve metil cıva uygulanan hücrelerin kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivitelerinin tiyomersal uygulananlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Testosteron ve estradiolün tiyomersal ve metil cıva ile muamele edilmiş hücrelerdeki etkileri değerlendirildiğinde, yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında tiyomersal uygulanan hücreler yalnız tiyomersal uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında, kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivitelerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerde kaspaz 3 ve kaspaz 8 aktivitelerinin tiyomersal uygulanan hücrelerden farklı olmadığı, kaspaz 9 aktivitesinde ise azalma görüldüğü tespit edilmiştir. Yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında tiyomersal uygulanan hücreler, yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında ise, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivitelerinin anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında metil cıva uygulanan hücreler ve yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücreler yalnız metil cıva uygulanan hücrelerle kıyaslandığında kaspaz 3 aktivitesinde anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir. Ancak, yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında metil cıva uygulanan hücrelerde kaspaz 3 aktivitesinin yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücrelerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında metil cıva uygulanan hücreler yalnız metil cıva uygulanan hücrelerle kıyaslandığında kaspaz 8 aktivitesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücreler yalnız metil cıva uygulanan hücrelerle kıyaslandığında fark görülmemiştir. Yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücreler, yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında metil cıva uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında ise, kaspaz 8 aktivitesinin daha düşük olduğu bulunmuştur.

5.6. Nöroendokrin Parametreler

5.6.1. Dopamin ve Dopamin Taşıyıcı Protein

Beyin, metil cıvanın toksik etkilerinden en çok etkilenen organdır. Nöronal ölüm ve nörotransmisyonun bozulması, metil cıvanın neden olduğu davranışsal anormalliğin patolojik temelidir (41). Nörotransmitter dopamin, beyin devrelerinin pozitif ve negatif düzenlenmesinde rol oynayan bir nöromodulatördür. Dopamin yetersizliği veya aşırı yüklenmesi, nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların patogenezinde kilit rol oynayan nöral devrelerin anormal aktiviteleri ile ilişkilendirilmiştir (262). 1957'deki keşfinden bu yana, beyindeki dopaminin işlevsel çeşitliliğine ilişkin bilgiler önemli ölçüde ilerlemiştir (263). Dopaminerjik nöronlar, gönüllü hareket, ödül davranışları ve endokrin fonksiyonları düzenlemek için ayrı beyin bölgelerinde işlev gösterir (264). Dopaminerjik nöronlar çevresel faktörlere karşı oldukça savunmasızdır (262, 265). Nörotoksik etkileri iyi bilinen bir madde olan metil cıvanın kemirgenlerde ve *Caenorhabditis elegans* modellerinde dopaminerjik nöron hasarına yol açtığına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (262). Nörotoksik bir bileşik olan MPTP, *substantia nigradaki* dopaminerjik nöronları seçici olarak hedefler ve yaygın olarak PD'nin in vitro modellemelerinde kullanılır (266). Bir genomik ve proteomik çalışmada, metil cıvanın MPTP ile benzer selüler hedeflere sahip olduğu bulunmuştur. Özellikle hem metil cıva hem de MPTP tarafından değiştirilen gen ürünleri, dopamin sinyal yolunda yer almaktadır (267). Önemli olarak, metil cıvanın kaudat-putamende (268) ve fare striatal dilimlerinde (269) beyin dopamin homeostazıyla ilgili sayısız son noktayı etkilediği gösterilmiştir. Metil cıvanın sıçanlarda intrastriatal uygulamasının, dopamin salınımında konsantrasyona bağlı bir artışa yol açtığı tespit edilmiştir (270). Ayrıca, metil cıvanın ventral mezensefalik nöronal hücre kültürlerinde hücre küçülmesi ve nörit sayısında azalma gibi önemli değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (271). Bununla birlikte, metil cıva maruziyeti üzerine dopaminerjik nörodejenerasyon ile ilişkili mekanizmalar henüz tanımlanmamıştır. Metil cıvanın dopamin salınımına yol açan dopamin taşıyıcı protein ile de etkileşimi olduğu bildirilmiştir (270, 272-274). Metil cıvaya maruz kalan hayvanların yetişkinlikte dopaminerjik ajanlara karşı bir duyarlılık gösterebileceği belirtilmiştir (275).

Hem prepubertal hem de yetişkin erkek sıçanlarda metil cıvaya [0,5 mg/kg/gün, gestasyonel gün (GD)7-postnatal gün (PND)7] maruziyetin ardından değişmiş dopaminerjik sinir iletimini üzerinde etkilerinin olduğunu düşündüren davranış değişiklikleri (lökomotor aktivitede ve uzamsal öğrenme yeteneğinde azalma, ortama uyum sağlama ve uyarana yanıtlarda düşüş) gözlemlenmiştir (10, 11). Metil cıvanın kronik intraperitoneal enjeksiyonunun (2 ve 3 ay boyunca 0,1 mg/gün, 2 ay boyunca 0,5 mg/gün ve 1 ay boyunca 2 mg/gün), dopamin ve/veya metabolitleri 3,4-dihidroksifenilasetik asit (DOPAC) ve homovanilik asidin *in vivo* sıçan *striatum*undan salınımını arttırdığı bulunmuştur (276). Metil cıvanın farklı deneysel merkezi sinir sistemi doku örneklerinde monoaminlerin spontan salınımını uyarabileceği gösterilmiştir (277, 278).

Metil cıvanın dopamin metabolizmasını ve dopaminin taşınmasını bozduğu bilinmektedir. Metil cıvanın dopamin ve metaboliti DOPAC (düzeylerini artırdığını veya azalttığını (211, 268, 279, 280), sıçan korteksindeki D1 benzeri reseptörlerin yoğunluğunu ve korteks ve kaudat-putamenlerdeki D2 benzeri reseptörlerin afinitesini ve yoğunluğunu azalttığını (281, 282), dopamin reseptörlerinin gen ekspresyonunu azalttığını (Drd1a, Drd2 ve Drd3) (283), dopaminin spontan salınımını arttırdığını (273, 279) ve dopamin aracılıklı lokomotor aktiviteyi arttırdığını (282) gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Erken yaşamda metil cıva maruziyetinin, yabani tip solucanlarda yaşamın ilerleyen dönemlerinde dopaminerjik fonksiyon kaybı için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (284).

Metil cıvanın neden olduğu sitotoksitede farklı nörotransmitterlerin nasıl bir rol oynayabileceğini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada, 10 µM dopaminin MN9D dopaminerjik sinir hücrelerini düşük konsantrasyonlarında uygulanan metil cıva kaynaklı toksisiteden önemli ölçüde koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca araştırmacılar metil cıva ve 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP+) uygulanan dopaminerjik nöron hücrelerindeki dopaminerjik sinyal iletiminin en çok etkilenen yol olduğunu belirtmişlerdir (267). Metil cıvanın farklılaşmamış PC12 hücrelerinde dopaminin metabolik profilini değiştirdiği gösterilmiştir (280). Mohamed Moosa ve ark. (285) 6-hidroksidopamin (6-OHDA, oksidopamin)'e maruz kaldıktan sonra, *in utero* metil cıvaya maruz kalan sıçanların kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha düşük bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tiyomersal grubunun dopamin düzeylerinin hafif yüksek, metil cıva grubunun dopamin düzeyinin ise hafif düşük olduğu ve T grubunun dopamin düzeyinin M grubundan yüksek olduğu görülmüştür. Yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında tiyomersal uygulanan hücreler yalnız tiyomersal uygulanan hücreler ve yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücreler ile kıyaslandığında dopamin düzeyinin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında metil cıva uygulanan hücrelerde de dopamin düzeyleri, yalnız metil cıva uygulanan ve yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücrelere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada DAT düzeyleri incelendiğinde, metil cıva uygulanan hücrelerde DAT düzeyinin kontrol grubu ve tiyomersal uygulanan hücrelere göre düşük olduğu bulunmuştur. Yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerde DAT düzeylerinin yalnız tiyomersal uygulanan ve yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında metil cıva uygulanan hücrelerde DAT düzeyinin ise yalnız metil cıva uygulanan ve yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücrelerden yüksek olduğu bulunmuştur.

Organik cıva bileşiklerinin kalsiyum homeostazını ve kalsiyuma bağımlı süreçleri bozarak, dopaminerjik sinaptik işlevi ve nörotransmisyonu değiştirebileceği düşünülmektedir. Dopamin miktarındaki artış olumsuz sosyal deneyimler ve sosyal yenilgi benzeri duygularda artışa neden olmaktadır (286). Yüksek dopamin düzeyleri öfori, uyku bozuklukları, dürtü kontrolünde zayıflıklar ve agresyon ile de ilişkilidir. Birçok nörodejeneratif bozuklukta dopaminin işlevi bilinmektedir. Farklı nörodavranışsal bozukluklarda beynin belirli bölgelerinde dopamin artışı belirli bölgelerinde dopamin düşüşü gözlenir. Cıvanın dopamin salınımını arttırdığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (270). Bu artış cıvanın depolama veziküllerinden dopamin salınımını artırması, monoamin oksidazı inhibe etmesi ya da sinaptik klefte nörotransmitterin ana eliminasyon mekanizması olan dopamin geri alımını inhibe etmesinden kaynaklanabilir. Çalışmamızda yüksek testosteron ortamında metil cıva ve tiyomersal verilen gruplarda dopamin düzeyleri anlamlı olarak artmıştır. Bu durum testosteron baskın ortamda dopamin salınımının arttığı ve dopamin yüksekliğine bağlı

olarak gözlenen değişikliklerin erkek beyin modelinde daha belirgin olabileceğini düşündürmektedir.

5.6.2. Serotonin ve Serotonin Taşıyıcı Protein

Metil cıva uygulamasının nörokimyasal fonksiyon üzerindeki akut ve kronik etkilerini araştıran çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Metil cıvanın kalsiyuma bağımlı serotonin salınımına (287) ve 7 ve 21 gün besiyeri ortamında kalan astrosit hücrelerine 30 dakika süreyle 10 μ M metil cıva uygulanmasının *in vitro* serotonin alımının inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir (288). Bu etkilerin *in vivo* olarak da görüldüğü bildirilmiştir. Zhou ve ark. (289) Fundulus heteroclitus balık larvalarını 10 μ g/L metil cıvaya maruz bırakmışlardır. Larvalarda metil cıvanın nörokimyasal değişiklikleri indüklediği, 7. günde serotonerjik aktivitenin arttığı ve 14. günde serotonin düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Daha düşük metil cıva dozlarının, serotonin sentezini değiştirdiği gösterilmiştir (290).

Araştırmacılar sıçanlara doğum sonrası 5. Günden başlayarak nörolojik bozuklukların görüldüğü toksisite evresine kadar 24 saat aralıklarla 0,01 M (5 mg Hg/kg veya 6.26 mg CH₃HgCl/kg olacak şekilde) metil cıva uygulamışlar ve erken postnatal dönem metil cıva maruziyetinden sonra sıçan serebral korteksinde artan serotonin düzeyleri belirlemişlerdir (268). Ayrıca, akut tek doz düşük metil cıvaya (1,0 ya da 5,0 μ g/g i.p) akut olarak maruz kalan zebra balıklarında beyin hücre dışı sıvısında serotonin düzeylerinde azalma, buna eşlik eden anksiyete benzeri semptomlar ve artan lipit peroksidasyonu tespit edilmiştir (291).

Metil cıvanın neden olduğu sitotoksistede farklı nörotransmitterlerin nasıl bir rol oynayabileceğini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada 20 μ M serotoninin MN9D dopaminerjik sinir hücrelerini 100 nM metil cıva kaynaklı toksisiteden önemli ölçüde koruyabildiği ancak daha yüksek metil cıva konsantrasyonlarına karşı koruma sağlamadığı tespit edilmiştir (267, 292).

Bu tez çalışmasında yalnız metil cıva uygulanan hücrelerde serotonin düzeylerinin yalnız tiyomersal uygulanan hücreler ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Yalnız metil cıva uygulanan hücrelerde serotonin düzeyinin yüksek testosteron/düşük estradiol ve yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücrelerden daha yüksek olduğu da

görülmüştür. SERT düzeyleri incelendiğinde ise, yalnız tiyomersal uygulanan hücrelerde SERT düzeyi kontrole göre düşük bulunurken, yalnız metil cıva uygulanan hücrelerde kontrol ve yalnız tiyomersal uygulanan hücelere göre yüksek bulunmuştur. Yalnız tiyomersal uygulanan hücrelerde SERT düzeylerinin yüksek testosteron/düşük estradiol ve yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerden yüksek olduğu görülmüştür. Yalnız metil cıva uygulanan hücrelerde SERT düzeylerinin yüksek testosteron/düşük estradiol ve yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücrelerden yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Yüksek serotonin düzeyleri, serotonin sendromu olarak da bilinen bir dizi belirtiyeye yol açmaktadır. Bu belirtiler arasında sinirlilik, bulantı, kusma, ishal, büyümüş gözbebekleri, tremorlar, ajitasyon, huzursuzluk, kas seğirmeleri ve spazmlar, konfüzyon, hezeyan, kalp atış hızında artış, yüksek kan basıncı, nöbetler ve bayılmak sayılabilir. Serotonin düzeylerindeki değişikliklerin migren, epilepsi, PH, MS, ALS, ADHD ve OSB'nin patofizyolojisinde rol oynayabileceği bilinmektedir. Merkezi sinir sistemi ve periferik serotonin reseptörlerindeki artış serotonerjik aktivite, nöromusküler hiperaktivite, zihinsel değişiklikler ve otonomik semptomlarla sonuçlanır. Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda metil cıva uygulanan grupta serotonin artışı görülmektedir. Metil cıvanın potasyum etkisini taklit ederek hücre içi kalsiyum düzeylerini değiştirdiği ve serotonin salınımını bu şekilde artırabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda serotonin taşıyıcı protein düzeylerinin de serotonin ile uyumlu olarak metil cıva verilen grupta arttığı tespit edilmiştir. Bu durum SERT'in hücre içi serotonin düzeylerinin kontrolünde önemli bir mekanizma olduğunu destekleyebilir.

5.7. Epigenetik Değişiklikler

Epigenetik bilimi, nükleotid dizilerindeki modifikasyonlardan bağımsız olarak meydana gelen gen ekspresyonundaki kalıtsal değişiklikleri inceler (293). Gen ekspresyonunun kontrolü, hücrenin normal fizyolojik işleyişi için esastır ve epigenetik mekanizma bu süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Epigenetik düzenleme, DNA'nın hipometilasyonunu ya da hipermetilasyonunu, histon modifikasyonlarını ve miRNA ekspresyonunu içerir. Çeşitli nörodejeneratif

bozuklukların gelişmesinde epigenetik değişikliklerin görev aldığı öne sürülmektedir (294). Epigenetik değişiklikleri indükleyen çevresel toksik maddeler, çevresel kaynaklı kronik hastalıkların duyarlılığında ve ilerlemesinde rol oynar (295, 296). DNA metilasyon değişiklikleri, sitozinlerin 5' pozisyonuna bir metil grubunun eklenmesi yoluyla öncelikle CpG bölgelerinde meydana gelir ve sıklıkla genlerin sessizleştirilmesi ile sonuçlanır (297). Nükleozomun histon 3 ve histon 4'ündeki lizin kalıntılarının asetilasyonu veya metilasyonu en yaygın bilinen histon modifikasyonlarıdır ve genellikle sırasıyla aktif veya bastırılmış bir kromatin durumuna neden olur (298).

Metil cıvanın epigenetik değişiklikler üzerindeki etkilerini inceleyen *in vitro* çalışmalar genellikle nöral kaynaklı hücrelerle sınırlıdır. Konsantrasyon ve maruziyet süresine göre değişiklikler gösterse de miRNA ekspresyonu, histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu üzerinde etkiler gözlenmiştir (299). SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde 24 saat 1 μ M metil cıva maruziyetine bağlı olarak histon deasetilaz 4 (HDAC4) proteininde artış görüldüğü bildirilmiştir (300). Bu artışın HDAC4'ün beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) promotörüne bağlanmasının da artması ve SH-SY5Y hücrelerinde global histon 4 (H4) asetilasyonunun azalması ile korele olduğu da tespit edilmiştir (300, 301). Metil cıvaya 48 saat 2,5 ya da 5 nM dozlarda maruz bırakılan sıçan kortikal nöral kök hücrelerinde, azalmış DNA metiltransferaz (DNMT)-3b gen ekspresyonu ile ilişkili olarak global DNA metilasyonunda azalma olduğu görülmüştür (302). Guida ve ark. (303) tiyomersalin, HDAC5, 6, 7 ve 9'yı değil, spesifik olarak HDAC4 protein ekspresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasında yalnız metil cıva uygulanan hücrelerde 5-mC değerlerinin yalnız tiyomersal uygulanan hücreler ve kontrol grubuna göre düşük olduğu görülmüştür. Yalnız tiyomersal uygulanan hücrelerde 5-mC düzeylerinin yüksek testosteron/düşük estradiol ve yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerden yüksek olduğu bulunmuştur. Yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücrelerde 5-mC düzeylerinin yalnız metil cıva uygulanan ve yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında metil cıva uygulanan hücrelerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, yaptığımız çalışmalarda tiyomersal ve metil cıva uygulanan hücrelerde histon asetilasyonun kontrole göre yüksek olduğu ve metil cıva grubundaki histon asetilasyon

düzeşinin de tiyomersal uygulanan gruba göre yüksek olduğu bulunmuştur. Yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında tiyomersal uygulanan hücrelerde histon asetilasyon düzeyinin, yalnız tiyomersal ve yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında tiyomersal uygulanan hücelere göre daha düşük olduğu görülmüştür. Yüksek estradiol/düşük testosteron ortamında metil cıva uygulanan hücelerde histon asetilasyon düzeyinin yalnız metil cıva uygulanan ve yüksek testosteron/düşük estradiol ortamında metil cıva uygulanan hücelere göre daha düşük olduğu bulunmuştur.

DNA metilasyonu son derece karmaşık bir düzenleyici mekanizmaya sahip olan dinamik bir süreçtir. DNA'nın hipermetilasyonu transkripsiyonu baskılarken, hipometilasyon transkripsiyonu artırarak gen etkinliğini değiştirmektedir. Belirli bölgelerde metilasyonun kaybı sonrası kromozal instabilite, imprinting kaybı ve protoonkogenlerin aktivasyonu meydana gelebilir. Metil cıva grubunda görülen düşük %5-mC düzeylerinin böyle bir etki meydana getirebileceği düşünülebilir. Estradiol baskın ortamda metil cıva verilen grupta ise metilasyon düzeyleri artmıştır. Testosteron ve estradiol baskınlığının metilasyon paternini değiştirdiği görülmektedir. Tiyomersal grubunda görülen metilasyon artışı ise embriyonik ve nöronal büyümeşeyi etkileyecek sonuçlar meydana getirebilir. DNA metilasyonu nörogelişimsel süreçlerde hücelerde stres yaratan bir durumdur ve hem yüksekliği hem de düşüklüğu süreçte önemli sonuçlar doğurabilir (304). Histon asetilasyonu, kromatini açarak veya yoğunlaştırarak genlerin aktivitesini düzenleyen dinamik ve geri dönüşümlü bir süreçtir. Genel olarak histon asetilasyonu, gen transkripsiyonel aktivasyonuna yol açarken, deasetilasyon gen susturulmasına neden olur. Bu çalışmada tiyomersal ve metil cıvanın histon H3 asetilasyon düzeylerini arttırdığı görülmüştür. Estradiol baskın ortamda ise her iki grupta da düzeyler kontrole yakındır. Estradiolün asetilasyon süreci üzerinde bir koruyucu etkisi olabileceği söylenebilir. Testosteron baskın ortamda tiyomersal verilen grupta düzeyler düşerken, metil cıva verilen grupta yükselmiştir. Epigenetik değişiklikler açısından metil cıva ve tiyomersalin farklı etki mekanizmalarına sahip olduğu ve testosteronun iki madde üzerinde farklı etkiler meydana getirdiği de düşünülebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tiyomersal, birçok kozmetik üründe ve tıbbi formüllerde, özellikle aşılarda kullanılan bir koruyucudur. Olası toksik etkileriyle ilgili endişeler nedeniyle birçok aşidan çıkarılmış olmasına rağmen, çeşitli ürünlerle bu maddeye maruziyet halen devam etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında tiyomersalin olası etkilerini karşılaştırmak için nörotoksik etkileri iyi bilinen bir organik cıva bileşiği olduğu için metil cıva seçilmiştir. Organik cıva bileşiklerine maruz kaldıktan sonra gözlenen nörotoksik etkiler ile otizm semptomları arasındaki benzerlikler, özellikle erken çocukluk döneminde tiyomersal maruziyetinin otizm ile ilişkilendirilmesine yol açmıştır. Otizm spektrum bozukluklarının görülme sıklığı, birçok nörodejeneratif bozuklukta olduğu gibi cinsiyete göre farklılık gösterdiğinden, çalışma kapsamında testosteron ve estradiolün bu organik cıva bileşiklerinin toksik etkilerini nasıl değiştirdiğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Otizme yatkınlıkta seks steroidlerinin olası etkilerini hangi moleküler mekanizmalar ile gerçekleştirildiklerine dair kesin bilgiler literatürde bulunmamaktadır. Amniyotik sıvıdaki yüksek fetal testosteron düzeylerini otistik semptomlarla ilişkilendiren (305) ve otistik bireylerin lenfoblastoid hücrelerinde daha yüksek testosteron düzeylerini saptayan çalışmalar literatürde bulunmaktadır (306). Sarachana ve ark. (307), kadın ve erkek cinsiyet hormonlarının SH-SY5Y hücre dizisinde bir otizm adayı gen olan retinoik asit reseptör (RAR) ilişkili yetim reseptör A (RORA)'nın ekspresyonunu farklı şekilde düzenlediğini göstermişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, RORA'nın ekspresyonunun, ilgili reseptörleri aracılığıyla testosteron ve estradiol tarafından düzenlenebileceğini ve transkripsiyonel hedeflerinden birinin, testosteronun östrojene dönüştürülmesinden sorumlu bir enzim olan sitokrom P450 19A1 (CYP19A1, aromataz) olduğunu göstermiştir. RORA ekspresyonunun testosteron etkisiyle negatif, estradiol etkisiyle pozitif geri bildirim gösterdiği de tespit edilmiştir. Çalışmanın sonuçları, testosteronun otizmde rol oynadığı mekanizma için öneriler sunmaktadır.

Spesifik nörotoksik etkileri iyi bilinen bir bileşik olan metil cıva ile özellikle aşılardan maruz kalınarak ciddi tartışmalara konu olan tiyomersalin insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında hem tiyomersal hem de metil cıvanın toksik etkileri olduğu söylenebilir. Bu toksik etkiler oksidatif hasar,

antioksidan savunma sürecini etkileme, hücre ölüm mekanizmalarını tetikleme, oksidatif DNA ve RNA hasarı, epigenetik değişiklikler ve nöroendokrin parametreler üzerindeki etkiler ile kendini göstermektedir. Metil cıvanın birçok parametre için tiyomersalden daha şiddetli sonuçlar ürettiği gözlemlenmiş; ancak tiyomersalin toksik etkilerinin de ihmal edilemeyecek düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Son yıllarda hemen hemen tüm nörogelişimsel bozukluklarda önemli bir cinsiyet farkı olduğu çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada, tiyomersal ve metil cıvanın ortaya koyduğu toksik etkilerin yüksek estradiol/düşük testosteron ve yüksek testosteron/düşük estradiol ortamlarında değişip değişmediğini incelemek için iki farklı hücresel model oluşturulması amaçlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda seks steroid hormonları uygulayarak dişi ve erkek beyinlerini taklit etmeye çalıştığımız bu modeller, bu cinsiyet farklılıklarının metil cıva ve tiyomersalin toksik etkileri üzerindeki etkilerini değerlendirmede başarılı görünmektedir. Testosteronun oksidatif stres ile ilgili birçok parametrede önemli değişiklikler yaparak tiyomersal kaynaklı toksisite üzerinde önemli artırıcı etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Nörotoksik ajanların farklı cinsiyetlerde farklı etkiler gösterebileceği sonucuna varılabilir. Bu *in vitro* çalışma, *in vivo* koşulları tam olarak yansıtmasa da testosteron ve estradiolün fizyolojik konsantrasyonlarda toksik etkiyi değiştirdiği gözlemlenmiştir. Nörodejeneratif bozukluklarda cinsiyet farklılığının etkilerine yönelik çalışmaların yapılması önerilebilir. Bu şekilde, olası moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında testosteron ve estradiolün etkisi açıklığa kavuşturulabilir.

Sonuç olarak, tiyomersal ve metil cıvanın nörotoksik etkilerinin erkek ve dişi beyinlerindeki etkilerinin farklı olabileceği, yüksek testosteron düzeylerinin daha yüksek toksik etkiler ile ilişkilendirilebileceği ve otizm gibi hastalıklarda ve nörodejeneratif hastalıklarda testosteronun hastalıkların gelişmesi açısından önemli bir etkiye sahip olduğu söylenebilir. Yüksek estradiol düzeylerinin ise, tiyomersal ve metil cıva toksisitesinde modifiye edici rolünün olabileceği ve yüksek estradiol/düşük testosteron ile oluşturulan dişi *in vitro* modellemesinde koruyucu olabileceği ifade edilebilir. Testosteron ve estradiolün otizm ve nörodejeneratif hastalıklardaki rollerini daha detaylı ortaya koyabilecek mekanistik *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Crowe W, Allsopp PJ, Watson GE, Magee PJ, Strain JJ, Armstrong DJ, ve ark. Mercury as an environmental stimulus in the development of autoimmunity-A systematic review. *Autoimmun Rev.* 2017;16(1):72-80.
2. Clarkson TW, Magos L, Meyers GJ. Human exposure to mercury: the three modern dilemmas. *J Trace Elem Exp Med.* 2003;16:321-43.
3. Dórea JG, Farina M, Rocha JB. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *J Appl Toxicol.* 2013;33(8):700-11.
4. Falluel-Morel A, Sokolowski K, Sisti HM, Zhou X, Shors TJ, Diccico-Bloom E. Developmental mercury exposure elicits acute hippocampal cell death, reductions in neurogenesis, and severe learning deficits during puberty. *J Neurochem.* 2007;103(5):1968-81.
5. Haase H, Engelhardt G, Hebel S, Rink L. Mercuric ions inhibit mitogen-activated protein kinase dephosphorylation by inducing reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;250(1):78-86.
6. Waly M, Olteanu H, Banerjee R, Choi SW, Mason JB, Parker BS, ve ark. Activation of methionine synthase by insulin-like growth factor-1 and dopamine: a target for neurodevelopmental toxins and thimerosal. *Mol Psychiatry.* 2004;9(4):358-70.
7. Deth R, Muratore C, Benzecry J, Power-Charnitsky VA, Waly M. How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox/methylation hypothesis. *Neurotoxicology.* 2008;29(1):190-201.
8. Niedhammer I, Saurel-Cubizolles MJ, Piciotti M, Bonenfant S. How is sex considered in recent epidemiological publications on occupational risks? *Occup Environ Med.* 2000;57:521-7.
9. Vahter M, Gochfeld M, Casati B, Thiruchelvam M, Falk-Filippson A, Kavlock R, ve ark. Implications of gender differences for human health risk assessment and toxicology. *Environ Res.* 2007;104(1):70-84.
10. Rossi AD, Ahlbom E, Ogren SO, Nicotera P, Ceccatelli S. Prenatal exposure to methylmercury alters locomotor activity of male but not female rats. *Exp Brain Res.* 1997;117(3):428-36.
11. Giménez-Llort L, Ahlbom E, Daré E, Vahter M, Ögren S, Ceccatelli S. Prenatal exposure to methylmercury changes dopamine-modulated motor activity during early ontogeny: age and gender-dependent effects. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2001;9(3):61-70.
12. Sakamoto M, Nakano A, Akagi H. Declining Minamata male birth ratio associated with increased male fetal death due to heavy methylmercury pollution. *Environ Res.* 2001;87(2):92-8.
13. Minami T, Sakita Y, Ichida S, Dohi Y. Gender difference regarding selenium penetration into the mouse brain. *Biol Trace Elem Res.* 2002;89(1):85-93.

14. Scallet AC, Muskhelishvili L, Slikker W Jr, Kadlubar FF. Sex differences in cytochrome P450 1B1, an estrogen-metabolizing enzyme, in the rhesus monkey telencephalon. *J Chem Neuroanat.* 2005;29(1):71-80.
15. Sudo K, VAN Dao C, Miyamoto A, Shiraishi M. Comparative analysis of in vitro neurotoxicity of methylmercury, mercury, cadmium, and hydrogen peroxide on SH-SY5Y cells. *J Vet Med Sci.* 2019;81(6):828-37.
16. National Research Council (NRC) 2000. *Toxicological Effects of Methylmercury.* Washington, DC: The National Academies Press.
17. United Nations Environmental Program (UNEP) (Chemicals). *Global Mercury Assessment UNEP Chemicals Geneva; Published by United Nations: Geneva, Switzerland, 2002.*
18. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1999. *Toxicological Profile for Mercury. (Update).* U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
19. Executive Summary. EPA-452/R-97-003. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Air Quality Planning and Standards and Office of Research and Development. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1997.
20. Drevnick PE, Lamborg CH, Horgan MJ. Increase in mercury in Pacific yellow fin tuna. *Environ Toxicol Chem.* 2015;34:931-4.
21. World Health Organization (WHO). *Health Risks of Heavy Metals from Long-Range Transboundary Air-Pollution; WHO, Regional Office for Europe: Copenhagen, Denmark, 2007.*
22. Sibley R, Mutter J, Moore E, Naumann J, Walach H. A Hypothesis and Evidence That Mercury May be an Etiological Factor in Alzheimer's Disease. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(24):5152.
23. Aschner M, Aschner JL. Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood-brain barrier transport. *Neurosci Biobehav Rev.* 1990;14(2):169-76.
24. Carvalho CM, Matos AI, Mateus ML, Santos AP, Batoreu MC. High-fish consumption and risk prevention: assessment of exposure to methylmercury in Portugal. *J Toxicol Environ Health A.* 2008;71(18):1279-88.
25. Nunes E, Cavaco A, Carvalho C. Exposure assessment of pregnant Portuguese women to methylmercury through the ingestion of fish: cross-sectional survey and biomarker validation. *J Toxicol Environ Health A.* 2014;77(1-3):133-42.
26. Sykes LK, Geier DA, King PG, Kern JK, Haley BE, Chaigneau CG, et al. Thimerosal as discrimination: vaccine disparity in the UN Minamata Convention on mercury. *Indian J Med Ethics.* 2014;11(4):206-18.
27. Bigham M, Copes R. Thiomersal in vaccines: balancing the risk of adverse effects with the risk of vaccine-preventable disease. *Drug Saf.* 2005;28(2):89-101.

28. Dórea JG, Marques RC. Modeling neurodevelopment outcomes and ethylmercury exposure from thimerosal-containing vaccines. *Toxicol Sci.* 2008;103(2):414-6.
29. Kjellström T, Kennedy P, Wallis S, Stewart A, Friberg L, Lind B ve ark. Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish. Stage 2: Interviews and psychological tests at age 6. National Swedish Environmental Protection Board. 1989; Report No:3642.
30. Shamlaye CF, Marsh DO, Myers GJ, Cox C, Davidson PW, Choisy O, ve ark. The Seychelles child development study on neurodevelopmental outcomes in children following in utero exposure to methylmercury from a maternal fish diet: background and demographics. *Neurotoxicology.* 1995;16(4):597-612.
31. Vas J, Monestier M. Immunology of mercury. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1143:240-67.
32. Virtanen JK, Voutilainen S, Rissanen TH, Mursu J, Tuomainen TP, Korhonen MJ, ve ark. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(1):228-33.
33. Barboni MT, Feitosa-Santana C, Zachi EC, Lago M, Teixeira RA, Taub A ve ark. Preliminary findings on the effects of occupational exposure to mercury vapor below safety levels on visual and neuropsychological functions. *J Occup Environ Med.* 2009;51(12):1403-12.
34. Debes F, Budtz-Jørgensen E, Weihe P, White RF, Grandjean P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicol Teratol.* 2006;28(3):363-75.
35. Yassa HA. Autism: a form of lead and mercury toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014;38(3):1016-24.
36. Pletz J, Sánchez-Bayo F, Tennekés HA. Dose-response analysis indicating time-dependent neurotoxicity caused by organic and inorganic mercury-Implications for toxic effects in the developing brain. *Toxicology.* 2016;347-349:1-5.
37. Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol.* 2006;36(8):609-62.
38. Budnik LT, Casteleyn L. Mercury pollution in modern times and its socio-medical consequences. *Sci Total Environ.* 2019;654:720-34.
39. Shao Y, Wang L, Langlois P, Mironov G, Chan HM. Proteome changes in methylmercury-exposed mouse primary cerebellar granule neurons and astrocytes. *Toxicol In Vitro.* 2019;57:96-104.
40. Jackson AC. Chronic Neurological Disease Due to Methylmercury Poisoning. *Can J Neurol Sci.* 2018;45(6):620-3.
41. Bjørklund G, Dadar M, Mutter J, Aaseth J. The toxicology of mercury: Current research and emerging trends. *Environ Res.* 2017;159:545-54.
42. Adams J, Barone S Jr, LaMantia A, Philen R, Rice DC, Spear L ve ark. Workshop to identify critical windows of exposure for children's health:

- neurobehavioral work group summary. *Environ Health Perspect.* 2000;108Suppl 3(Suppl 3):535-44.
43. Stein J, Schettler T, Wallinga D, Valenti M. In harm's way: toxic threats to child development. *J Dev Behav Pediatr.* 2002;23(1 Suppl):S13-S22.
 44. Spurgeon A. Prenatal methylmercury exposure and developmental outcomes: review of the evidence and discussion of future directions. *Environ Health Perspect.* 2006;114(2):307-12.
 45. Clarkson TW, Vyas JB, Ballatori N. Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med.* 2007;50(10):757-64.
 46. Burbacher TM, Shen DD, Liberato N, Grant KS, Cernichiari E, Clarkson T. Comparison of blood and brain mercury levels in infant monkeys exposed to methylmercury or vaccines containing thimerosal. *Environ Health Perspect.* 2005;113(8):1015-21.
 47. Davis LE, Kornfeld M, Mooney HS, Fiedler KJ, Haaland KY, Orrison WW ve ark. Methylmercury poisoning: long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family. *Ann Neurol.* 1994;35(6):680-8.
 48. Chang LW, Reuhl KR, Lee GW. Degenerative changes in the developing nervous system as a result of in utero exposure to methylmercury. *Environ Res.* 1977;14(3):414-23.
 49. Lapham LW, Cernichiari E, Cox C, Myers GJ, Baggs RB, Brewer R ve ark. An analysis of autopsy brain tissue from infants prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicology.* 1995;16(4):689-704.
 50. Newland MC, Reile PA, Langston JL. Gestational exposure to methylmercury retards choice in transition in aging rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2004;26:179-94.
 51. Burke K, Cheng Y, Li B, Petrov A, Joshi P, Berman RF ve ark. Methylmercury elicits rapid inhibition of cell proliferation in the developing brain and decreases cell cycle regulator, cyclin E. *Neurotoxicology.* 2006;27(6):970-81.
 52. Gilbert SG, Grant-Webster KS. Neurobehavioral effects of developmental methylmercury exposure. *Environ Health Perspect* 1995;103(Suppl 6):135-42.
 53. Goldey ES, O'Callaghan JP, Stanton ME, Barone S Jr, Crofton KM. Developmental neurotoxicity: evaluation of testing procedures with methylazoxymethanol and methylmercury. *Fundam Appl Toxicol.* 1994;23(3):447-64.
 54. Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K ve ark. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol.* 1997;19(6):417-28.
 55. Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F. Cognitive performance of children prenatally exposed to "safe" levels of methylmercury. *Environ Res.* 1998;77(2):165-72.
 56. Marsh DO, Myers GJ, Clarkson TW, Amin-Zaki L, Tikriti S, Majeed MA. Fetal methylmercury poisoning: clinical and toxicological data on 29 cases. *Ann Neurol.* 1980;7(4):348-53.

57. Baraldi M, Zanoli P, Tascadda F, Blom JM, Brunello N. Cognitive deficits and changes in gene expression of NMDA receptors after prenatal methylmercury exposure. *Environ Health Perspect*. 2002;110Suppl5(Suppl 5):855-8.
58. Chang LW, Annau Z. Developmental neuropathology and behavioral teratology of methylmercury. In: Yanai J, editor. *Neurobehavioral Teratol*. New York: Elsevier Science Publishers; 1984.
59. Doré FY, Goulet S, Gallagher A, Harvey PO, Cantin JF, D'Aigle T, ve ark. Neurobehavioral changes in mice treated with methylmercury at two different stages of fetal development. *Neurotoxicol Teratol*. 2001;23(5):463-72.
60. Gilbert SG, Burbacher TM, Rice DC. Effects of in utero methylmercury exposure on a spatial delayed alternation task in monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1993;123(1):130-6.
61. Goulet S, Doré FY, Mirault ME. Neurobehavioral changes in mice chronically exposed to methylmercury during fetal and early postnatal development. *Neurotoxicol Teratol*. 2003;25(3):335-47.
62. Hughes JA, Sparber SB. D-Amphetamine unmasks postnatal consequences of exposure to methylmercury in utero: methods for studying behavioral teratogenesis. *Pharmacol Biochem Behav*. 1978;8(4):365-75.
63. Olson K, Bousch GM. Decreased learning capacity in rats exposed prenatally and postnatally to low doses of mercury. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1975;13(1):73-9.
64. Rice DC. Age-related increase in auditory impairment in monkeys exposed in utero plus postnatally to methylmercury. *Toxicol Sci*. 1998;44(2):191-6.
65. Vorhees CV. Behavioral effects of prenatal methylmercury in rats: a parallel trial to the Collaborative Behavioral Teratology Study. *Neurobehav Toxicol Teratol*. 1985;7(6):717-25.
66. Sharpe MA, Livingston AD, Baskin DS. Thimerosal-Derived Ethylmercury is a Mitochondrial Toxin in Human Astrocytes: Possible Role of Fenton Chemistry in the Oxidation and Breakage of mtDNA. *Journal of Toxicology*. 2012:1-12.
67. Fonacier L, Boguniewicz M. Contact Dermatitis. In: *Pediatric Allergy: Principles and Practice* Eds. Donald Y.M. Leung, Stanley J. Szefler, Francisco A. Bonilla, Cezmi A. Akdis, Hugh A. Sampson (Third Edition), 2016
68. T.C. Sağlık Bakanlığı. Aşı Portalı. Aşı içerikleri. <https://asi.saglik.gov.tr/genel-bilgiler/36-asi-icerikleri.html> 2018. (Erişim Tarihi: 27.04.2022)
69. Dórea JG. Low-dose Thimerosal (ethyl-mercury) is still used in infants` vaccines: Should we be concerned with this form of exposure? *J Trace Elem Med Biol*. 2018;49:134-9.
70. Heron J, Golding J; ALSPAC Study Team. Thimerosal exposure in infants and developmental disorders: a prospective cohort study in the United kingdom does not support a causal association. *Pediatrics*. 2004;114(3):577-83.
71. Andrews N, Miller E, Grant A, Stowe j, Osborne V, Taylor B. Thimerosal exposure in infants and developmental disorders: a retrospective cohort study in

- the united kingdom does not support a causal association. *Pediatrics*. 2004;114(3):584-91.
72. Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M. Association between thimerosal-containing vaccine and autism. *JAMA*. 2003;290(13):1763-6.
 73. Madsen KM, Hviid A, Vestergaard M, Schendel D, Wohlfahrt j, Thorsen P, ve ark. A population-based study of measles, mumps, and rubella vaccination and autism. *N Engl j Med*. 2002;347(19):1477-82
 74. Pichichero ME, Cernichiari E, Lopreiato J, Treanor J. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: a descriptive study. *Lancet*. 2002;360(9347):1737-41.
 75. Verstraeten T, Davis RL, DeStefano F, Lieu TA, Rhodes PH, Black SB, ve ark. Safety of thimerosal-containing vaccines: a two-phased study of computerized health maintenance organization databases. *Pediatrics*. 2003;112(5):1039-48. Erratum in: *Pediatrics*. 2004;113(1):184.
 76. World Health Organization. Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 2006. <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccine-standardization/thiomersal>
Erişim Tarihi: 11.12.2019.
 77. Ruigrok AN, Salimi-Khorshidi G, Lai MC, Baron-Cohen S, Lombardo MV, Tait RJ, ve ark. A meta-analysis of sex differences in human brain structure. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;39(100):34-50.
 78. Zaidi ZF. Gender Differences in Human Brain: A Review. *The Open Anatomy Journal*. 2010;2:37-55.
 79. Allen JS, Damasio H, Grabowski TJ, Bruss J, Zhang W. Sexual dimorphism and asymmetries in the gray-white composition of the human cerebrum. *NeuroImage*, 2003;18(4):880-94.
 80. Cahill L. Why sex matters for neuroscience. *Nature reviews. Neuroscience*, 2006;7(6):477-84.
 81. Patočka J. Neurotoxicity of heavy metals in the light of gender studies. *Journal of Nursing, Social Studies, Public Health and Rehabilitation*. 2014;1-2:70-82.
 82. Cohen-Bendahan CC, van de Beek C, Berenbaum SA. Prenatal sex hormone effects on child and adult sex-typed behavior: methods and findings. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(2):353-84.
 83. Knickmeyer RC, Baron-Cohen S. Fetal testosterone and sex differences in typical social development and in autism. *Journal of child neurology*, 2006;21(10):825-45.
 84. Arnold AP. The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Horm Behav*. 2009;55(5):570-8.
 85. McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev*. 2008;88(1):91-124.

86. Tobet S, Knoll JG, Hartshorn C, Aurand E, Stratton M, Kumar P, ve ark. Brain sex differences and hormone influences: a moving experience? *J Neuroendocrinol.* 2009;21(4):387-92.
87. Reddy RC, Estill CT, Meaker M, Stormshak F, Roselli CE. (2014). Sex differences in expression of oestrogen receptor α but not androgen receptor mRNAs in the foetal lamb brain. *J Neuroendocrinol.* 2014;26(5):321-8.
88. Kenchappa RS, Diwakar L, Annepu J, Ravindranath V. Estrogen and neuroprotection: higher constitutive expression of glutaredoxin in female mice offers protection against MPTP-mediated neurodegeneration. *FASEB.* 2004;18(10):1102-4.
89. Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;216(2):473-82.
90. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, ve ark. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol.* 1997;51(4):535-41.
91. Behl C, Holsboer F. The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant. *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20(11):441-4.
92. Branch DR. (2009). Gender-selective toxicity of thimerosal. *Exp Toxicol Pathol.* 2009;61(2):133-6.
93. Holmes S, Singh M, Su C, Cunningham RL. Effects of Oxidative Stress and Testosterone on Pro-Inflammatory Signaling in a Female Rat Dopaminergic Neuronal Cell Line. *Endocrinology.* 2016;157(7):2824-35.
94. Son SW, Lee JS, Kim HG, Kim DW, Ahn YC, Son CG. Testosterone depletion increases the susceptibility of brain tissue to oxidative damage in a restraint stress mouse model. *J Neurochem.* 2016;136(1):106-17.
95. Shores MM. Testosterone treatment and cardiovascular events in prescription database studies. *Asian J Androl.* 2018;20(2):138-44.
96. McCombe PA, Greer JM, Mackay IR. Sexual dimorphism in autoimmune disease. *Curr Mol Med.* 2009;9(9):1058-79.
97. Kivity S, Ehrenfeld M. (2010). Can we explain the higher prevalence of autoimmune disease in women? *Expert Rev Clin Immunol.* 2010;6(5):691-4.
98. De Simoni MG, Milia P, Barba M, De Luigi A, Parnetti L, Gallai V. (2002). The inflammatory response in cerebral ischemia: focus on cytokines in stroke patients. *Clin Exp Hypertension.* 2002;24(7-8):535-42.
99. Marquardt L, Ruf A, Mansmann U, Winter R, Buggle F, Kallenberg K, ve ark. Inflammatory response after acute ischemic stroke. *Journal of the neurological sciences,* 2005;236(1-2):65-71.
100. Silberberg D. Millennium Reflections. *Mult Scler.* 2001;7(1):1.
101. Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, ve ark. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research. Brain Res Rev.* 2004;47(1-3):263-74.

102. Grammas P, Ovase R. Inflammatory factors are elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2001;22(6):837-42.
103. Moore AH, O'Banion MK. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(12):1627-56.
104. Hirsch EC, Hunot S, Hartmann A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2005;11 Suppl 1:S9-S15.
105. Kurkowska-Jastrzebska I, Litwin T, Joniec I, Ciesielska A, Przybyłkowski A, Członkowski A, ve ark. Dexamethasone protects against dopaminergic neurons damage in a mouse model of Parkinson's disease. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(10-11):1307-18.
106. Fahrig T, Gerlach I, Horváth E. A synthetic derivative of the natural product rocaglaol is a potent inhibitor of cytokine-mediated signaling and shows neuroprotective activity in vitro and in animal models of Parkinson's disease and traumatic brain injury. *Mol Pharmacol*. 2005;67(5):1544-55.
107. Lei DL, Long JM, Hengemihle J, O'Neill J, Manaye KF, Ingram DK, ve ark. Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in the hippocampus of aged female mice. *Neuroscience*. 2003;121(3):659-66.
108. Ospina JA, Duckles SP, Krause DN. 17beta-estradiol decreases vascular tone in cerebral arteries by shifting COX-dependent vasoconstriction to vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(1):H241-H250.
109. Mor G, Nilsen J, Horvath T, Bechmann I, Brown S, Garcia-Segura LM, ve ark. Estrogen and microglia: A regulatory system that affects the brain. *J Neurobiol*. 1999;40(4):484-96.
110. Baker AE, Brautigam VM, Watters JJ. Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 2004;145(11):5021-32.
111. Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. *Endocrine reviews*, 1996;17(4):369-84.
112. Gaillard RC, Spinedi E. Sex- and stress-steroids interactions and the immune system: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Domest Anim Endocrinol*. 1998;15(5):345-52.
113. Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 2000;24(6):627-38.
114. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update*. 2005;11(4):411-23.
115. Iqbal MJ, Dalton M, Sawers RS. Binding of testosterone and oestradiol to sex hormone binding globulin, human serum albumin and other plasma proteins: evidence for non-specific binding of oestradiol to sex hormone binding globulin. *Clin Sci (London, England)*. 1983;64(3):307-14.
116. Białek M, Zaremba P, Borowicz KK, Czuczwar SJ. (2004). Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *Polish J Pharmacol*. 2004;56(5):509-18.

117. Xie W, Ren M, Li L, Zhu Y, Chu Z, Zhu Z, ve ark. Perinatal testosterone exposure potentiates vascular dysfunction by ER β suppression in endothelial progenitor cells. *PloS one*, 2017;12(8):e0182945.
118. Khasnavis S, Ghosh A, Roy A, Pahan K. Castration induces Parkinson disease pathologies in young male mice via inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2013;288(29):20843-55.
119. Kovacs GG. Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):189.
120. Angelova, D.M. & Brown, D.R. (2015). Iron, Aging, and Neurodegeneration. *Metals* 5, 2070-2092.
121. Salta E, De Strooper B. Noncoding RNAs in neurodegeneration. *Nature reviews. Neuroscience*, 2017;18(10):627-40.
122. Yanguas-Casás N. Sex Differences in Neurodegenerative Diseases. *SM J Neurol Disord Stroke*. 2017;3:1014.
123. Cosgrove KP, Mazure CM, Staley JK. Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry. *Biol Psychiatry*. 2007;62(8):847-55.
124. Gillies GE, McArthur S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev*. 2010;62(2):155-98.
125. McCarthy MM, Arnold AP, Ball GF, Blaustein JD, De Vries GJ. Sex differences in the brain: the not so inconvenient truth. *The Journal of neuroscience:the official journal of the Society for Neuroscience*, 2012;32(7):2241-7.
126. Hanamsagar R, Bilbo SD. Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: Focus on microglial function and neuroinflammation during development. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;160:127-33.
127. Seshadri S, Wolf PA, Beiser A, Au R, McNulty K, White R, ve ark. Lifetime risk of dementia and Alzheimer's disease. The impact of mortality on risk estimates in the Framingham Study. *Neurology*. 1997;49(6):1498-504.
128. Plassman BL, Langa KM, McCammon RJ, Fisher GG, Potter GG, Burke JR, ve ark. Incidence of dementia and cognitive impairment, not dementia in the United States. *Ann Neurol*. 2011;70(3):418-26.
129. Irvine K, Laws KR, Gale TM, Kondel TK. Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: a meta analysis. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2012;34(9):989-98.
130. Viña J, Lloret A. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis*. 2010;20Suppl 2:S527-S533.
131. Miller IN, Cronin-Golomb A. Gender differences in Parkinson's disease: clinical characteristics and cognition. *J Mov Disord*. 2010;25(16):2695-703.
132. Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, ve ark. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold

- higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurol.* 2000;55(9):1358-63.
133. Elbaz A, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, et al. Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol.* 2002;55(1):25–31.
 134. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain.* 2003;126(Pt 4):770-82.
 135. Voskuhl RR, Gold SM. Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Nature reviews. Neurology.* 2012;8(5):255-63.
 136. del Aguila MA, Longstreth WT Jr, McGuire V, Koepsell TD, van Belle G. Prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Neurology.* 2003;60(5):813-9.
 137. McCombe PA, Henderson RD. Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gender medicine,* 2010;7(6):557–570.
 138. Nolen-Hoeksema S, Girgus JS. The emergence of gender differences in depression during adolescence. *Psychol Bull.* 1994;115(3):424-43.
 139. Altemus M, Sarvaiya N, Neill Epperson C. Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. *Front Neuroendocrinol.* 2014;35(3):320-30.
 140. Cole WR, Mostofsky SH, Larson JCG, Denckla MB, Mahone EM. Age-related changes in motor subtle signs among girls and boys with ADHD. *Neurology.* 2008;71:1514-20.
 141. Bálint S, Czobor P, Komlósi S, Mészáros A, Simon V, Bitter I. Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): gender- and age-related differences in neurocognition. *Psychol Med.* 2009;39(8):1337-45.
 142. Catalá-López F, Peiró S, Ridao M, Sanfélix-Gimeno G, Gènova-Maleras R, Catalá MA. Prevalence of attention deficit hyperactivity disorder among children and adolescents in Spain: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *BMC Psychiatry.* 2012;12:168.
 143. Willcutt EG. The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Neurotherapeutics.* 2012;9(3):490-9.
 144. McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev.* 2008;30:67-76.
 145. Goldstein JM, Cherkerzian S, Tsuang MT, Petryshen TL. Sex differences in the genetic risk for schizophrenia: history of the evidence for sex-specific and sex-dependent effects. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2013;162B(7):698-710.
 146. Rutter M, Caspi A, Moffitt TE. Using sex differences in psychopathology to study causal mechanisms: unifying issues and research strategies. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip.* 2003;44(8):1092–115.

147. Morken TS, Sonnewald U, Aschner M, Syversen T. Effects of methylmercury on primary brain cells in mono- and co-culture. *Toxicol Sci.* 2005;87(1):169-175.
148. Tamm C, Duckworth J, Hermanson O, Ceccatelli S. High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation. *J Neurochem.* 2006;97(1):69-78.
149. Engin AB, Engin ED, Golokhvast K, Spandidos DA, Tsatsakis AM. Glutamate mediated effects of caffeine and interferon γ on mercury-induced toxicity. *Int J Mol Med.* 2017;39(5):1215-23.
150. Chung YP, Yen CC, Tang FC, Lee KI, Liu SH, Wu CC, Hsieh SS, Su CC, Kuo CY, Chen YW. Methylmercury exposure induces ROS/Akt inactivation-triggered endoplasmic reticulum stress-regulated neuronal cell apoptosis. *Toxicology.* 2019;425:152245.
151. Liu W, Yang T, Xu Z, Xu B, Deng Y. Methyl-mercury induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptosis pathways activation in rat cortical neurons. *Free Radic Res.* 2019;53(1):26-44.
152. Sakaue M, Okazaki M, Hara S. Very low levels of methylmercury induce cell death of cultured rat cerebellar neurons via calpain activation. *Toxicology.* 2005;213(1-2):97-106.
153. Toimela T, Tähti H. Mitochondrial viability and apoptosis induced by aluminum, mercuric mercury and methylmercury in cell lines of neural origin. *Arch Toxicol.* 2004;78(10):565-74.
154. Biamonte F, Latini L, Giorgi FS, Zingariello M, Marino R, De Luca R, D'Ilio S, Majorani C, Petrucci F, Violante N, Senofonte O, Molinari M, Keller F. Associations among exposure to methylmercury, reduced Reelin expression, and gender in the cerebellum of developing mice. *Neurotoxicology.* 2014;45:67-80.
155. Fujimura M, Usuki F. Methylmercury induces oxidative stress and subsequent neural hyperactivity leading to cell death through the p38 MAPK-CREB pathway in differentiated SH-SY5Y cells. *Neurotoxicology.* 2018;67, 226-233.
156. Desaulniers D, Xiao GH, Lian H, Feng YL, Zhu J, Nakai J, Bowers WJ. Effects of mixtures of polychlorinated biphenyls, methylmercury, and organochlorine pesticides on hepatic DNA methylation in prepubertal female Sprague-Dawley rats. *Int J Toxicol.* 2009;28(4):294-307.
157. Carvan MJ 3rd, Kalluvila TA, Klingler RH, Larson JK, Pickens M, Mora-Zamorano FX, Connaughton VP, Sadler-Riggelman I, Beck D, Skinner MK. Mercury-induced epigenetic transgenerational inheritance of abnormal neurobehavior is correlated with sperm epimutations in zebrafish. *PLoS One.* 2017;12(5):e0176155.
158. Onishchenko N, Karpova N, Sabri F, Castren E, Ceccatelli S. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. *J Neurochem.* 2008;106:1378-87.

159. Thomas DJ, Fisher HL, Sumler MR, Marcus AH, Mushak P, Hall LL. Sexual differences in the distribution and retention of organic and inorganic mercury in methyl mercury-treated rats. *Environ Res.* 1986;41(1):219-34.
160. Thomas DJ, Fisher HL, Sumler MR, Mushak P, Hall LL. Sexual differences in the excretion of organic and inorganic mercury by methyl mercury-treated rats. *Environ Res.* 1987 Jun;43(1):203-16.
161. Nielsen JB, Andersen O. Methyl mercuric chloride toxicokinetics in mice. I: Effects of strain, sex, route of administration and dose. *Pharmacol Toxicol.* 1991;68(3):201-7.
162. Sarafian T, Verity MA. Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity. *Int J Dev Neurosci.* 1991;9(2):147-53.
163. Fredriksson A, Gårdlund AT, Bergman K, Oskarsson A, Ohlin B, Danielsson B, Archer T. Effects of maternal dietary supplementation with selenite on the postnatal development of rat offspring exposed to methyl mercury in utero. *Pharmacol Toxicol.* 1993;72(6):377-82.
164. Atchison WD, Hare MF. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. *FASEB.* 1994;8(9):622-9.
165. Daré E, Götz ME, Zhivotovsky B, Manzo L, Ceccatelli S. Antioxidants J811 and 17beta-estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury-induced apoptotic cell death. *J Neurosci Res.* 2000;62(4):557-65.
166. Usuki F, Yasutake A, Umehara F, Tokunaga H, Matsumoto M, Eto K, et al. In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci Lett.* 2001;304(3):199-203.
167. Carrillo MC, Kanai S, Sato Y, Kitani K. Age-related changes in antioxidant enzyme activities are region and organ, as well as sex, selective in the rat. *Mech Ageing Dev.* 1992;65(2-3):187-98.
168. Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Viña J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(5):546-52.
169. Olczak M, Duszczyk M, Mierzejewski P, Meyza K, Majewska MD. Persistent behavioral impairments and alterations of brain dopamine system after early postnatal administration of thimerosal in rats. *Behav Brain Res.* 2011;223(1):107-18.
170. Sulkowski ZL, Chen T, Midha S, Zavacki AM, Sajdel-Sulkowska EM. Maternal thimerosal exposure results in aberrant cerebellar oxidative stress, thyroid hormone metabolism, and motor behavior in rat pups; sex- and strain-dependent effects. *Cerebellum.* 2012;11(2):575-86.
171. Khan A, Sulkowski ZL, Chen T, Zavacki AM, Sajdel-Sulkowska EM. Sex-dependent changes in cerebellar thyroid hormone-dependent gene expression following perinatal exposure to thimerosal in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2012;63(3):277-83.

172. Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport*, 1998;9(11):2565-8.
173. Olivieri G, Novakovic M, Savaskan E, Meier F, Baysang G, Brockhaus M, Müller-Spahn F. The effects of beta-estradiol on SHSY5Y neuroblastoma cells during heavy metal induced oxidative stress, neurotoxicity and beta-amyloid secretion. *Neuroscience*. 2002;113(4):849-55.
174. Gao Y, Yan CH, Tian Y, Wang Y, Xie HF, Zhou X, Yu XD, Yu XG, Tong S, Zhou QX, Shen XM. Prenatal exposure to mercury and neurobehavioral development of neonates in Zhoushan City, China. *Environ Res*. 2007;105(3):390-9.
175. Islam T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research* 2017;39(1):73-82.
176. Maynard S, Fang EF, Scheibye-Knudsen M, Croteau D, Bohr VA. DNA Damage, DNA Repair, Aging, and Neurodegeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5(10):a025130.
177. Coppedè F, Migliore L. DNA damage in neurodegenerative diseases. *Mutation Research* 2015;776:84-97.
178. Tran SS, Jun HI, Bahn JH, Azghadi A, Ramaswami G, Van Nostrand EL, Nguyen TB, Hsiao YHE, Lee C, Pratt GA, Martínez-Cerdeño V, Hagerman RJ, Yeo GW, Geschwind DH, Xiao X. Widespread RNA editing dysregulation in brains from autistic individuals. *Nature Neuroscience*, 2018;22(1):25.
179. Jarskog LF, Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA. Apoptotic mechanisms in the pathophysiology of schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry* 2005;29:846-858.
180. Silver WG, Rapin I. Neurobiological basis of autism. *Pediatr Clin N Am* 2012;59:45-61.
181. Masland RH. Neuronal cell types. *Curr Biol*. 2004;14(13):R497-R500.
182. Weis S, Sonnberger M, Dunzinger A, Voglmayr E, Aichholzer M, Kleiser R, Strasser P. Neurotransmitter Systems, In: *Imaging Brain Diseases A Neuroradiology, Nuclear Medicine, Neurosurgery, Neuropathology and Molecular Biology-based Approach*. Springer Vienna, 2019. p: 369-399.
183. Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR. *Fundamentals neuroscience*. California: Academic Press;1999.
184. Hyman SE. Neurotransmitters. *Curr Biol*. 2005;15(5):r154-r158.
185. Hensler JG. Serotonin. In: *Basic Neurochemistry*. 2012.
186. Zarindast M R, Rezayof A. Neurobiology of Addiction. *Advances in Cognitive Sciences*. 2002; 4 (1) :1-5
187. Guyton C, Hall E. *Text Book of Medical Physiology*. Department of Physiology and Biophysics University of Mississippi Medical Center Jackson, Mississippi Elsevier Saunders; 2006.

188. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. 2007;132(1):397-414.
189. Mengod G, Palacios JM, Cortés R. Cartography of 5-HT1A and 5-HT2A receptor subtypes in prefrontal cortex and its projections. *ACS Chem Neurosci* 2015;6:1089-98.
190. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med*. 2009;60:355-366.
191. Kinast K, Peeters D, Kolk SM, Schubert D, Homberg JR. Genetic and pharmacological manipulations of the serotonergic system in early life: neurodevelopmental underpinnings of autism-related behavior. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:72.
192. Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol Interv*. 2004;4(2):109-23.
193. Rudnick G, Sandtner W. Serotonin transport in the 21st century. *J Gen Physiol*. 2019;151(11):1248-64.
194. Andrews AM, Murphy DL. Fluoxetine and desipramine selectively attenuate 2'-NH₂-MPTP-induced depletions in serotonin and norepinephrine. *Eur J Pharmacol*. 1993;250(2):215-21.
195. Andrews AM, Murphy DL. Sustained depletion of cortical and hippocampal serotonin and norepinephrine but not striatal dopamine by 1-methyl-4-(2'-aminophenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine (2'-NH₂-MPTP): a comparative study with 2'-CH₃-MPTP and MPTP. *J Neurochem*. 1993;60(3):1167-70.
196. Schuldiner S, Steiner-Mordoch S, Yelin R, Wall SC, Rudnick G. Amphetamine derivatives interact with both plasma membrane and secretory vesicle biogenic amine transporters. *Mol Pharmacol*. 1993;44(6):1227-31.
197. Luellen BA, Miller DB, Chisnell AC, Murphy DL, O'Callaghan JP, Andrews AM. Neuronal and astroglial responses to the serotonin and norepinephrine neurotoxin: 1-methyl-4-(2'-aminophenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307(3):923-31.
198. Gnegy ME. (2012). Catecholamines. In S. T. Brady (Ed.), *Basic neurochemistry*. San Diego: Elsevier.
199. McHugh PC, Buckley DA. The structure and function of the dopamine transporter and its role in CNS diseases. *Vitam Horm*. 2015;98:339-69.
200. Barbeau A. The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Can Med Assoc J*. 1962;87(15):802-7.
201. Robinson S, Rainwater AJ, Hnasko TS, Palmiter RD. Viral restoration of dopamine signaling to the dorsal striatum restores instrumental conditioning to dopamine deficient mice. *Psychopharmacology*. 2007;191(3):567-78.
202. Weiner RI, Ganong WF. Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiol Rev*. 1978;58(4):905-76.

203. Kienast T, Heinz A. Dopamine and the diseased brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2006;5(1):109-31.
204. Jones DC, Miller GW. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(5):569-81.
205. Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang DN. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*. 2003;301(5633):616-20.
206. Huang X, Zhan CG. How dopamine transporter interacts with dopamine: insights from molecular modeling and simulation. *Biophys J*. 2007;93(10):3627-39.
207. Egaña LA, Cuevas RA, Baust TB, Parra LA, Leak RK, Hochendoner S ve ark. Physical and functional interaction between the dopamine transporter and the synaptic vesicle protein synaptogyrin-3. *J Neurosci*. 2009;29(14):4592-604.
208. Kristensen AS, Andersen J, Jørgensen TN, Sørensen L, Eriksen J, Loland CJ, Strømgaard K, Gether U. (2011) SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. *Pharmacol Rev*. 63:585-640.
209. Laasonen-Balk T, Kuikka J, Viinamäki H, Husso-Saastamoinen M, Lehtonen J, Tiihonen J. Striatal dopamine transporter density in major depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999;144(3):282-5.
210. Mateos JJ, Lomeña F, Parellada E, Font M, Fernandez E, Pavia J ve ark. Decreased striatal dopamine transporter binding assessed with [123I] FP-CIT in first-episode schizophrenic patients with and without short-term antipsychotic-induced parkinsonism. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005;181(2):401-6.
211. Agrawal A, Wetherill L, Bucholz KK, Kramer J, Kuperman S, Lynskey MT ve ark. Genetic influences on craving for alcohol. *Addict Behav*. 2013;38(2):1501-8.
212. Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*. 1996;379(6566):606-12.
213. Kukucka J, Wyllie T, Read J, Mahoney L, Suphioglu C. Human neuronal cells: epigenetic aspects. *Biomol Concepts*. 2013;4(4):319-33.
214. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
215. Wen KX, Miliç J, El-Khodori B, Dhana K, Nano J, Pulido T ve ark. The Role of DNA Methylation and Histone Modifications in Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167201.
216. Rickards H. Depression in neurological disorders: Parkinson's disease, multiple sclerosis, and stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76 Suppl 1(Suppl 1):i48-i52.

217. Sun H, Kennedy PJ, Nestler EJ. Epigenetics of the depressed brain: role of histone acetylation and methylation. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):124-37.
218. Levenson JM, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(2):108-18.
219. Jarome TJ, Thomas JS, Lubin FD. The epigenetic basis of memory formation and storage. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;128:1-27.
220. Henikoff S, Matzke MA. Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet*. 1997;13(8):293-5.
221. Sepehri Z, Beacon TH, Osman FDS, Jahan S, Davie JR. DNA methylation and chromatin modifications. In: *Translational Epigenetics*, Editor(s): Bradley S. Ferguson, *Nutritional Epigenomics*, Academic Press, 2019;14:13-36.
222. Khan F, Momtaz S, Abdollahi M. The relationship between mercury exposure and epigenetic alterations regarding human health, risk assessment and diagnostic strategies. *J Trace Elem Med Biol*. 2019;52:37-47.
223. Mattson MP. Methylation and acetylation in nervous system development and neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev*. 2003;2(3):329-42.
224. Costello JF. DNA methylation in brain development and gliomagenesis. *Front Biosci*. 2003;8:s175-s184.
225. Konsoula Z, Barile FA. Epigenetic histone acetylation and deacetylation mechanisms in experimental models of neurodegenerative disorders. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2012;66(3):215-20.
226. Shen S, Casaccia-Bonnel P. Post-translational modifications of nucleosomal histones in oligodendrocyte lineage cells in development and disease. *J Mol Neurosci*. 2008;35(1):13-22.
227. Saha RN, Pahan K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ*. 2006;13(4):539-50.
228. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:75-100.
229. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 26;22(23):12827.
230. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019, 9613090–19.
231. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: Role in redoxsignaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Red Signal*. 2011;15:1583-606.
232. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3289-303.
233. Driscoll CT, Mason RP, Chan HM, Jacob DJ, Pirrone N. Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects. *Environ Sci Technol*. 2013;47(10):4967-83.

234. Branco V, Caito S, Farina M, Teixeira da Rocha J, Aschner M, Carvalho C. Biomarkers of mercury toxicity: Past, present, and future trends. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2017;20(3):119-54.
235. Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JB, Farina M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(3):285-91.
236. Franco JL, Posser T, Dunkley PR, Dickson PW, Mattos JJ, Martins R, Bairy AC, Marques MR, Dafre AL, Farina M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(4):449-57.
237. Farina M, Aschner M, Rocha JB. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;256(3):405-17.
238. Davidson PW, Myers GJ, Weiss B. Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics.* 2004;113(4 Suppl):1023-9.
239. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med.* 2002;346(5):340-52.
240. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest.* 2006;116(3):561-70.
241. Vasconsuelo A, Pronsato L, Ronda AC, Boland R, Milanese L. Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis. *Steroids.* 2011;76(12):1223-31.
242. Morkuniene R, Arandarcikaite O, Borutaite V. Estradiol prevents release of cytochrome c from mitochondria and inhibits ischemia-induced apoptosis in perfused heart. *Exp Gerontol.* 2006;41(7):704-8.
243. Pomara C, Neri M, Bello S, Fiore C, Riezzo I, Turillazzi E. Neurotoxicity by synthetic androgen steroids: oxidative stress, apoptosis, and neuropathology: A review. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13(1):132-45.
244. Bourque M, Dluzen DE, Di Paolo T. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol.* 2009;30(2):142-57.
245. Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron AM. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol.* 2009;30(2):239-58.
246. Suzuki S, Brown CM, Wise PM. Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Front Neuroendocrinol.* 2009;30(2):201-11.
247. Etgen AM, Jover-Mengual T, Zukin RS. Neuroprotective actions of estradiol and novel estrogen analogs in ischemia: translational implications. *Front Neuroendocrinol.* 2011;32(3):336-52.
248. Sanfeliu C, Sebastià J, Ki SU. Methylmercury neurotoxicity in cultures of human neurons, astrocytes, neuroblastoma cells. *Neurotoxicology.* 2001;22(3):317-27.
249. Posser T, Dunkley PR, Dickson PW, Franco JL. Human neuroblastoma cells transfected with tyrosine hydroxylase gain increased resistance to methylmercury-induced cell death. *Toxicol In Vitro.* 2010;24(6):1498-503.

250. Guida N, Laudati G, Mascolo L, Cuomo O, Anzilotti S, Sirabella R, Santopaolo M, Galgani M, Montuori P, Di Renzo G, Canzoniero LM, Formisano L. MC1568 Inhibits Thimerosal-Induced Apoptotic Cell Death by Preventing HDAC4 Up-Regulation in Neuronal Cells and in Rat Prefrontal Cortex. *Toxicol Sci.* 2016;154(2):227-40.
251. Ishihara Y, Tsuji M, Kawamoto T, Yamazaki T. Involvement of reactive oxygen species derived from mitochondria in neuronal injury elicited by methylmercury. *J Clin Biochem Nutr.* 2016;59:182-90.
252. Branco V, Coppo L, Solá S, Lu J, Rodrigues C, Holmgren A, et al. Impaired cross-talk between the thioredoxin and glutathione systems is related to ASK-1 mediated apoptosis in neuronal cells exposed to mercury. *Red Biol.* 2017;13:278-87.
253. Algarve TD, Assmann CE, Cadoná FC, Machado AK, Manica-Cattani MF, Sato-Miyata Y, et al. Guarana improves behavior and inflammatory alterations triggered by methylmercury exposure: An in vivo fruit fly and in vitro neural cells study. *Environ Sci Poll Res Int.* 2019;26:15069-83.
254. Oguro A, Fujita K, Ishihara Y, Yamamoto M, Yamazaki T. DHA and its metabolites have a protective role against methylmercury-induced neurotoxicity in mouse primary neuron and SH-SY5Y cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):3213.
255. Ayyathan DM, Chandrasekaran R, Thiagarajan K. Neuroprotective effect of Brahmi, an ayurvedic drug against oxidative stress induced by methyl mercury toxicity in rat brain mitochondrial-enriched fractions. *Nat Prod Res.* 2015;29(11):1046-51.
256. Farina M, Campos F, Vendrell I, et al. Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. *Toxicol Sci.* 2009;112(2):416-426.
257. Migdal C, Foggia L, Tailhardat M, Courtellemont P, Haftek M, Serres M. Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling. *Toxicology.* 2010;274(1-3):1-9.
258. Cinca I, Dumitrescu I, Onaca P, Serbănescu A, Nestorescu B. Accidental ethyl mercury poisoning with nervous system, skeletal muscle, and myocardium injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1980;43(2):143-9.
259. Ida-Eto M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M. Prenatal exposure to organomercury, thimerosal, persistently impairs the serotonergic and dopaminergic systems in the rat brain: implications for association with developmental disorders. *Brain Dev.* 2013;35(3):261-4.
260. Petroni D, Tsai J, Agrawal K, Mondal D, George W. Low-dose methylmercury-induced oxidative stress, cytotoxicity, and tau-hyperphosphorylation in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Environ Toxicol.* 2012;27(9):549-55.
261. Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity.* 2019;50(6):1352-64.

262. Ke T, Tsatsakis A, Santamaría A, Antunes-Soare FA, Tinkov AA, Docea AO ve ark. Chronic exposure to methylmercury induces puncta formation in cephalic dopaminergic neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology*. 2020;77:105-13.
263. Yeragani VK, Tancer M, Chokka P, Baker GB. Arvid Carlsson, and the story of dopamine. *Indian J Psychiatry*. 2010;52(1):87-8.
264. Gerfen CR, Surmeier DJ. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:441-66.
265. Chaudhuri A, Bowling K, Funderburk C, et al. Interaction of genetic and environmental factors in a *Drosophila* parkinsonism model. *J Neurosci*. 2007;27(10):2457-67.
266. Meredith GE, Rademacher DJ. MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *J Parkinsons Dis*. 2011;1(1):19-33.
267. Shao Y, Figeys D, Ning Z, Mailloux R, Chan HM. Methylmercury can induce Parkinson's-like neurotoxicity similar to 1-methyl-4-phenylpyridinium: a genomic and proteomic analysis on MN9D dopaminergic neuron cells. *J Toxicol Sci*. 2015;40(6):817-28.
268. O'Kusky JR, Boyes BE, McGeer EG. Methylmercury-induced movement and postural disorders in developing rat: regional analysis of brain catecholamines and indoleamines. *Brain Res*. 1988;439(1-2):138-46.
269. Kalisch BE, Racz WJ. The effects of methylmercury on endogenous dopamine efflux from mouse striatal slices. *Toxicol Lett*. 1996;89(1):43-9.
270. Faro LR, do Nascimento JL, San José JM, Alfonso M, Durán R. Intrastratial administration of methylmercury increases in vivo dopamine release. *Neurochem Res*. 2000;25(2):225-9.
271. Götz ME, Koutsilieri E, Riederer P, Ceccatelli S, Daré E. Methylmercury induces neurite degeneration in primary culture of mouse dopaminergic mesencephalic cells. *J Neural Transm (Vienna)*. 2002;109(5-6):597-605.
272. Bondy SC, Anderson CL, Harrington ME, Prasad KN. The effects of organic and inorganic lead and mercury on neurotransmitter high-affinity transport and release mechanisms. *Environ Res*. 1979;19:102-11.
273. Faro LR, Durán R, Do Nascimento JL, Perez-Vences D, Alfonso M. Effects of successive intrastratial methylmercury administrations on dopaminergic system. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2003;55(2):173-7.
274. Lakshmana MK, Desiraju T, Raju TR. Mercuric chloride-induced alterations of levels of noradrenaline, dopamine, serotonin and acetylcholine esterase activity in different regions of rat brain during postnatal development. *Arch Toxicol*. 1993;67(6):422-7.
275. Newland MC, Rasmussen EB. Aging unmasks adverse effects of gestational exposure to methylmercury in rats. *Neurotoxicol Teratol*. 2000;22(6):819-28.
276. Faro LR, Durán R, do Nascimento JL, Alfonso M, Picanço-Diniz CW. Effects of methyl mercury on the in vivo release of dopamine and its acidic metabolites

- DOPAC and HVA from striatum of rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1997;38(2):95-8.
277. Komulainen H, Tuomisto J. Interference of methyl mercury with monoamine uptake and release in rat brain synaptosomes. *Acta Pharmacol Toxicol.* 1981;48(3):214-22.
278. Minnema DJ, Cooper GP, Greenland RD. Effects of methylmercury on neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1989;99(3):510-21.
279. Dreiem A, Shan M, Okoniewski RJ, Sanchez-Morrissey S, Seegal RF. Methylmercury inhibits dopaminergic function in rat pup synaptosomes in an age-dependent manner. *Neurotoxicol Teratol.* 2009;31:312-7.
280. Tiernan CT, Edwin EA, Hawong HY, Ríos-Cabanillas M, Goudreau JL, Atchison WD, ve ark. Methylmercury impairs canonical dopamine metabolism in rat undifferentiated pheochromocytoma (PC12) cells by indirect inhibition of aldehyde dehydrogenase. *Toxicol Sci.* 2015;144(2):347-56.
281. Coccini T, Roda E, Castoldi AF, Poli D, Goldoni M, Vettori MV, ve ark. Developmental exposure to methylmercury and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) affects cerebral dopamine D1-like and D2-like receptors of weanling and pubertal rats. *Arch Toxicol.* 2011;85(10):1281-94.
282. Daré E, Fetissoff S, Hökfelt T, Hall H, Ogren SO, Ceccatelli S. Effects of prenatal exposure to methylmercury on dopamine-mediated locomotor activity and dopamine D2 receptor binding. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003;367(5):500-8.
283. Zimmer B, Schildknecht S, Kuegler PB, Tanavde V, Kadereit S, Leist M. Sensitivity of dopaminergic neuron differentiation from stem cells to chronic low-dose methylmercury exposure. *Toxicol Sci.* 2011;121(2):357-67.
284. Martinez-Finley EJ, Chakraborty S, Slaughter JC, Aschner M. Early-life exposure to methylmercury in wildtype and pdr-1/parkin knockout *C. elegans*. *Neurochem Res.* 2013;38(8):1543-52.
285. Mohamed Moosa Z, Daniels WM, Mabandla MV. The effects of prenatal methylmercury exposure on trace element and antioxidant levels in rats following 6-hydroxydopamine-induced neuronal insult. *Metab Brain Dis.* 2014;29(2):459-69.
286. Schalbroeck R, van Velden FHP, de Geus-Oei LF, Yaqub M, van Amelsvoort T, Booij J, ve ark. Striatal dopamine synthesis capacity in autism spectrum disorder and its relation with social defeat: an [18F]-FDOPA PET/CT study. *Transl Psychiatry.* 2021;11(1):47.
287. Oudar P, Caillard L, Fillion G. In vitro effect of organic and inorganic mercury on the serotonergic system. *Pharmacol Toxicol.* 1989;65(4):245-8.
288. Dave V, Mullaney KJ, Goderie S, Kimelberg HK, Aschner M. Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: effects on D-aspartate and serotonin uptake. *Dev Neurosci.* 1994;16(3-4):222-31.

289. Zhou T, Racemacher DJ, Steinpreis RE, Weis JS. Neurotransmitter levels in two populations of larval *Fundulus heteroclitus* after methylmercury exposure. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol.* 1999;124(3):287-94.
290. Sharma RP, Aldous CN, Farr CH. Methylmercury induced alterations in brain amine syntheses in rats. *Toxicol Lett.* 1982;13(3-4):195-201.
291. Maximino C, Araujo J, Leão LK, Grisolia AB, Oliveira KR, Lima MG, ve ark. Possible role of serotonergic system in the neurobehavioral impairment induced by acute methylmercury exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol.* 2011 Nov-Dec;33(6):727-34.
292. Petersen MS, Weihe P, Choi A, Grandjean P. Increased prenatal exposure to methylmercury does not affect the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 2008;29(4):591-5.
293. Schnekenburger M, Talaska G, Puga A. Chromium cross-links histone deacetylase 1-DNA methyltransferase 1 complexes to chromatin, inhibiting histone-remodeling marks critical for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 2007;27(20):7089-101.
294. Migliore L, Coppedè F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res.* 2009;674(1-2):73-84.
295. Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21(2):243-51.
296. Kanthasamy A, Jin H, Anantharam V, Sondarva G, Rangasamy V, Rana A, ve ark. Emerging neurotoxic mechanisms in environmental factors-induced neurodegeneration. *Neurotoxicology.* 2012;33(4):833-7.
297. Martin C, Zhang Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(3):266-72.
298. Suganuma T, Workman JL. Crosstalk among Histone Modifications. *Cell.* 2008;135(4):604-7.
299. Culbreth M, Aschner M. Methylmercury Epigenetics. *Toxics.* 2019;7(4):56.
300. Guida N, Laudati G, Mascolo L, Valsecchi V, Sirabella R, Selleri C ve ark. p38/Sp1/Sp4/HDAC4/BDNF Axis Is a Novel Molecular Pathway of the Neurotoxic Effect of the Methylmercury. *Front Neurosci.* 2017;11:8.
301. Guida N, Laudati G, Anzilotti S, Sirabella R, Cuomo O, Brancaccio P ve ark. Methylmercury upregulates RE-1 silencing transcription factor (REST) in SH-SY5Y cells and mouse cerebellum. *Neurotoxicology.* 2016;52:89-97.
302. Bose R, Onishchenko N, Edoff K, Janson Lang AM, Ceccatelli S. Inherited effects of low-dose exposure to methylmercury in neural stem cells. *Toxicol Sci.* 2012;130(2):383-90.
303. Guida N, Laudati G, Mascolo L, Cuomo O, Anzilotti S, Sirabella R ve ark. MC1568 Inhibits Thimerosal-Induced Apoptotic Cell Death by Preventing HDAC4 Up-Regulation in Neuronal Cells and in Rat Prefrontal Cortex. *Toxicol Sci.* 2016;154(2):227-40.

304. Pan J, Li X, Liu H, Wang C, Xu S, Xu B, et al. Exploring the molecular mechanisms underlie the endoplasmic reticulum stress-mediated methylmercury-induced neuronal developmental damage. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022;245:114099.
305. Auyeung B, Baron-Cohen S, Ashwin E, Knickmeyer R, Taylor K, Hackett G. Fetal testosterone and autistic traits. *British J Psychol.* 2009;100:1-22.
306. Hu VW, Nguyen A, Kim KS, Steinberg ME, Sarachana T, Scully MA, Soldin SJ, Luu T, Lee NH. Gene expression profiling of lymphoblasts from autistic and nonaffected sib pairs: Altered pathways in neuronal development and steroid biosynthesis. *PLoS ONE.* 2009;4:e5775.
307. Sarachana T, Xu M, Wu RC, Hu VW. Sex hormones in autism: Androgens and estrogens differentially and reciprocally regulate RORA, a novel candidate gene for autism. *PLoS ONE.* 2011;6:e17116.

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu Ekran Görüntüsü

Cinsiyete Dayalı Farklılıklar Açısından Metil Cıva ve Tiyomersalin Toksisitelerinin İnsan Nöroblastoma Hücrelerinde Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi- Selinay Başak ERDEMLİ KÖSE- 150 Sayfa

ORIJINALLIK RAPORU

% 13	% 12	% 2	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 5
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
3	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
4	Selinay Başak Erdemli.Köse, Anıl Yirün, Aylin Balcı.Özyurt, Pınar Erkekoğlu. "Modification of the toxic effects of methylmercury and thimerosal by testosterone and estradiol in SH.SY5Y neuroblastoma cell line", Journal of Applied Toxicology, 2021 Yayın	<% 1
5	turkiveklinikleri.com	% 1

EK-3. Tez Çalışması ile İlgili Yayın ve Bildiriler

1. Erdemli-Kose SB, Yirün A, Balcı-Özyurt, A, Erkekoglu P. Modification of the toxic effects of methylmercury and thimerosal by testosterone and estradiol in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Journal of Applied Toxicology*. 2022;42(6):981-994. doi: 10.1002/jat.4269
2. Erdemli-Kose SB, Balcı A, Yirun A, Erkekoğlu P. Tiyomersal Maruziyeti ve Otizm Spektrum Bozuklukları Arasındaki Olası İlişkinin Değerlendirilmesi. *J Lit Pharm Sci*. 2020;9(3):304-18. doi: 10.5336/pharmsci.2020-73289
3. Erdemli-Kose SB, Balcı A, Yirun A, Erkekoğlu P. The Effects of Gender in Neurological Disorders: A Special Focus on Autism Spectrum Disorders and Thiomersal Toxicity. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences* 2022;47(3): 393-418.
4. Erdemli-Kose SB, Yirün A, Balcı-Özyurt, A, Erkekoglu P. Modifying Effects of Gender on the Toxicity of Methyl Mercury and Thimerosal. (Sözlü Sunum)
11th International Congress of the Turkish Society of Toxicology
02.11.2022-05.11.2022 (Antalya- Türkiye)

9. ÖZGEÇMİŞ