

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

**DOĞAL VE SENTETİK ENDOKRİN BOZUCU KİMYASAL
MADDELERİN 3T3- L1 HÜCRELERİNDE ADİPOJENEZLE
İLGİLİ PROTEİNLER ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. İzem BİLİNMIŞ

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2024

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

**DOĞAL VE SENTETİK ENDOKRİN BOZUCU KİMYASAL
MADDELERİN 3T3- L1 HÜCRELERİNDE ADİPOJENEZLE
İLGİLİ PROTEİNLER ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. İzem BİLİNMIŞ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe Nurşen BAŞARAN

Farmasötik Toksikoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2024

ONAY SAYFASI

DOĞAL VE SENTETİK ENDOKRİN BOZUCU KİMYASAL MADDELERİN 3T3-L1 HÜCRELERİNDE ADİPOJENEZLE İLGİLİ
PROTEİNLER ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Öğrenci: Adı ve Soyadı: İzem BİLİNİMİŞ

Danışman: Unvanı Adı ve Soyadı: Prof.Dr.Ü.Pınar ERKEKOĞLU

İkinci Danışman: Unvanı, Adı ve Soyadı: Prof:Dr.A.Nurşen BAŞARAN

Bu tez çalışması 07.08.2024 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji
Yüksek Lisans Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Doç.Dr.Gözde GİRGIN

H.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Prof.Dr.Ü.Pınar ERKEKOĞLU

H.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Üye:

Dr.Öğr.Üyesi Anıl YİRÜN

Ç.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

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

16 Ağustos 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ 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.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

14/08/2024

İzem BİLİNMIŞ

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

(1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze 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 işbirliği 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. Ü. Pınar ERKEKOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. İzem BİLİNİMİŞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince değerli bilgi ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden ve desteklerini esirgemeyen, tezimi başarıyla tamamlamamda büyük emeği olan ve akademik gelişimim sırasında sonsuz sabır ve özen gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU'na,

Bu süreçte karşılaştığım zorlukları aşarken bana her daim destek olan ve hem akademik hem de kişisel anlamda bakış açımı geliştiren, rehberliği gelecekteki çalışmalarım da ilham kaynağı olacak olan değerli hocam Prof. Dr. A. Nurşen BAŞARAN'a,

Akademik gelişimime katkı sağlayan ve bana değerli bilgileri ile yol gösteren Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma,

Tez çalışmam boyunca tecrübelerini benimle paylaşarak destek olan Moleküler Biyolog Deniz Arca ÇAKIR'a, Uzm. Ecz. Hülya Tezel Yalçın'a,

Varlıklarının bu yolculuğu daha anlamlı ve katlanılabilir kıldığı, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayarak bana güç ve motivasyon veren annem, babam ve kardeşime,

Her adımda yanımda olarak beni motive eden ve zor zamanlarımda moralimi yüksek tutmamı sağlayan sevgili eşime ve oğluma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Bilinmiş, İ. Doğal ve Sentetik Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelerin 3T3-L1 Hücrelerinde Adipojeneze İlgili Proteinler Üzerindeki Toksik Etkilerinin Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2024. Obezite son yıllarda dünyada hızla artan ve yaşam kalitesini önemli ölçüde düşüren ciddi bir sağlık sorunudur. Endokrin bozucu kimyasallar (EBK'ler), çevrede yaygın olarak bulunan maddelerdir ve insanlar bu kimyasallara farklı yollardan maruz kalmaktadır. Bisfenoller bu bileşikler arasında en dikkat çeken EBK'lerdir. Bisfenol A (BPA) özellikle polikarbonat plastiklerde bulunan ve maruziyeti obezite dahil bir çok patolojik durumla ilişkilendirilen bir bisfenol türevidir. Bisfenol F (BPF) BPA'nın alternatifleri arasında dikkat çeken analoglardandır. Bazı doğal bileşiklerin de endokrin bozucu özelliği olduğundan şüphelenilmektedir. Fitoöstrojenler, üzerinde en çok araştırma yapılan doğal endokrin bozuculardır. Ancak, son yıllarda resveratrol (RV), rosmarinik asit (RA) ve epigallokateşin gallat (EGCG) gibi bazı bitkisel kökenli bileşiklerin de endokrin bozucu etkilerinden şüphelenilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, doğal (RV, RA and EGCG) ve sentetik EBK (BPA,BPF)'lerin diferensiyel edilmiş ve adipozite dönüştürülmüş 3T3-L1 fibroblastlarındaki etkileri aromataz, yağ asidi bağlayıcı protein (FABP4), peroksisom proliferatör aktive reseptör alfa (PPAR α), peroksisom proliferatör aktive reseptör gama (PPAR γ) ve CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein beta (C/EBP β) düzeyleri ölçülerek belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda uygulanan EGCG, BPA ve BPF'nin aromataz, FABP4, PPAR α ve C/EBP β düzeylerinde anlamlı derecede artışlara neden olduğu; EGCG ve BPF'nin PPAR γ düzeylerini anlamlı derecede arttırdığı görülmüştür. RV ve RA'nın ölçülen parametreleri anlamlı bir şekilde değiştirmedeği belirlenmiştir. Sonuçta, BPA, BPF ve EGCG'nin obezogenik etkilere yol açabileceği; RV ve RA'nın ise adipogenezde rolleri olan proteinlerle etkileşime girmediği öne sürülebilir.

Anahtar Kelimeler: Endokrin bozucu kimyasallar, Bisfenol A, Bisfenol F, Rosmarinik asit, Resveratrol, Epigallokateşin gallat

ABSTRACT

Bilinmiş, İ. Comparative Evaluation of the Toxic Effects of Natural and Synthetic Endocrine Disrupting Chemicals on Adipogenesis-Related Proteins in 3T3-L1 Cells, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmaceutical Toxicology Program, Master Thesis, Ankara, 2024. Obesity, a serious health problem that has been rapidly increasing in the world in recent years, significantly reduces the quality of life. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are substances that are widely found in the environment and humans are exposed to these chemicals through different routes. Bisphenols are the most notable EDCs among these compounds. Bisphenol A (BPA) is a bisphenol derivative found especially in polycarbonate plastics and its exposure has been associated with many pathological conditions including obesity. Bisphenol F (BPF) is one of the notable analogues among the alternatives to BPA. Some natural compounds are also suspected to have endocrine disrupting properties. Phytoestrogens are the most researched natural endocrine disruptors. However, in recent years, some plant-based compounds such as resveratrol (RV), rosmarinic acid (RA) and epigallocatechin gallate (EGCG) have also been suspected to have endocrine disrupting effects. Within the scope of this thesis study, the effects of natural (RV, RA and EGCG) and synthetic (BPA, BPF) EDCs on differentiated and adipocyte-transformed 3T3-L1 fibroblasts were examined by measuring aromatase, fatty acid protective protein (FABP4), peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α), peroxisome proliferator activating receptor gamma (PPAR γ) and CCAAT/enhancer protective protein beta (C/EBP β) levels. According to the results, it was observed that EGCG, BPA and BPF applied at non-cytotoxic concentrations caused significant increases in aromatase, FABP4, PPAR α and C/EBP β levels; EGCG and BPF significantly increased PPAR γ levels. It was determined that RV and RA did not significantly change the measured parameters. In conclusion, it can be suggested that BPA, BPF and EGCG may cause obesogenic effects, while RV and RA do not interact with proteins that play roles in adipogenesis.

Keywords: Endocrine disrupting chemicals, Bisphenol A, Bisphenol F, Rosmarinic acid, Resveratrol, Epigallocatechin gallate

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 DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Obezite	4
2.2. Adipogenez	7
2.2.1. Aromataz	9
2.2.2. Peroksisom proliferatör aktive reseptörler	10
2.2.3. Yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4, aP2)	14
2.2.4. CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein (CCAAT/enhancer binding protein- C/EBPβ)	15
2.3. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler	15
2.4. Endokrin Bozucuların Sağlık Üzerine Etkileri	17
2.5. Endokrin Bozucu Kimyasalların Obezite ve Adipojenez Üzerine Etkileri	18
2.6. Obeziteye Neden Olan Endokrin Bozucuların Olası Etki Mekanizmaları	18
2.7. Bisfenoller	21
2.8. Bisfenol A	22
2.8.1. Bisfenol A'nın Biyotransformasyonu	24
2.8.2. Bisfenol A kullanım alanları ve maruziyet yolları	25
2.8.3. Bisfenol A'nın Toksisitesi	25
2.8.4. Bisfenol A'nın Obezite ile İlişkisi	27
2.8.5. BPA'ya Prenatal Maruziyet ve Gelişimsel Toksiste	28
2.9. Bisfenol F	29

2.9.1. Bisfenol F'ye Maruziyet	29
2.9.2. Bisfenol F'in Biyotransformasyonu	30
2.9.3. Bisfenol F'in Toksisitesi	30
2.10. Doğal Kaynaklı Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler	31
2.11. Doğal Kaynaklı Endokrin Bozucu Kimyasallar ve Adipojenez	31
2.12. Resveratrol	34
2.13. Rosmarinik Asit	36
2.14. Epigallokateşin gallat	38
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	41
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	41
3.2. Kullanılan Kitler, Araç ve Gereçler	42
3.3. Kullanılan Hücre Hattı	43
3.4 Deneyleerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	43
3.4.1. Besiyerinin Hazırlanması	43
3.4.2. 3T3-L1 Hücrelerinin Farklılaştırılmasında Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması	44
3.4.3. 3T3-L1 Hücrelerinin Farklılaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler	44
3.4.4. 2X Tripsin-EDTA Çözeltisinin Hazırlanması	46
3.4.5. 3-(4,5- Dimetiltiyazol- 2- il) – 2,5 – Difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	47
3.4.6. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler	48
3.4.7. Aromataz Düzeyinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler	49
3.4.8. PPAR α Düzeyinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler	50
3.4.9. PPAR γ Düzeylerinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler	50
3.4.10. Yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4) Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler	51
3.4.11. CCAT/ Arttırıcı Bağlayıcı Protein β (CEBP β) Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler	52
3.5. Hücre Kültürü	52
3.5.1. Donmuş Hücrelerin Çözülmesi	52
3.5.2. Hücrelerin Pasaj İşlemi	53
3.5.3. Pasaj Yapılan Hücrelerde Besiyeri Değişimi	54

3.5.4. 3T3-L1 Hücrelerinin Farklılaştırma İşlemi	54
3.5.5. Hücrelerin Dondurulması	55
3.5.6 Hücrelerin Sayılması	56
3.6. Yöntemler	57
3.6.1. 3T3-L1 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	57
3.6.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	59
3.6.3. Aromataz Düzeylerinin Ölçülmesi	60
3.6.4. Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör Alfa (PPAR α) Düzeylerinin Ölçülmesi	61
3.6.5. Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör Gama (PPAR γ) Düzeylerinin Ölçülmesi	63
3.6.6. Yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4) Ölçülmesi	64
3.6.7. CCAAT/Arttırıcı Bağlayıcı Protein β (C/EBP β) Ölçülmesi	66
3.6.8. Protein Miktarının Ölçülmesi	67
4. BULGULAR	69
4.1. 3T3-L1 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksisite Tayini	69
4.2. Aromataz Düzeylerinin Belirlenmesi	77
4.3. FABP4 Düzeylerinin Belirlenmesi	78
4.4. PPAR α Düzeylerinin Belirlenmesi	79
4.5. PPAR γ Düzeylerinin Belirlenmesi	80
4.6. CEBP β Düzeylerinin Belirlenmesi	81
4.7. Sitopatoloji	82
5. TARTIŞMA	87
5.1. Doğal ve Sentetik Yapılı Endokrin Bozucu Kimyasalların Aromataz Düzeyleri Üzerindeki Etkileri	91
5.2. Doğal ve Sentetik Yapılı Endokrin Bozucu Kimyasalların Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör Alfa (PPAR α) Düzeyleri Üzerindeki Etkileri	93
5.3. Doğal ve Sentetik Yapılı Endokrin Bozucu Kimyasalların Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör Gama (PPAR γ) Düzeyleri Üzerindeki Etkileri	95
5.4. Doğal ve Sentetik Yapılı Endokrin Bozucu Kimyasalların Yağ asidi Bağlayıcı Protein 4 (FABP4) Düzeyleri Üzerindeki Etkileri	98

5.5. Doğal ve Sentetik Yapılı Endokrin Bozucu Kimyasalların CCAAT/Arttırıcı Bağlayıcı Protein β (C/EBP β) Düzeyleri Üzerindeki Etkileri	100
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	102
7. KAYNAKLAR	104
8. EKLER	122
EK 1. Tez Çalışması Orjinallik Raporu Ekran Görüntüsü	
EK 2. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	124

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

11β-HSD	11 β -hidroksisteroid Dehidrogenaz
11β-HSD1	11 β -hidroksisteroid Dehidrogenaz tip 1
5α-R	5 α -redüktaz
ACC	Asetil-CoA Karboksilaz
ACO	Açıl-CoA Oksidaz
AMPK	Aktifleştirilen Protein Kinaz
ATCC	American Type Cell Collection
Aβ	Amiloid Beta
BAT	Kahverengi Yağ Dokusu
BPA	Bisfenol A
BPAG	BPA-Glukuronit
BPAS	BPA-Sülfat
BPF	Bisfenol F
BPS	Bisfenol S
BSA	Sığır Serum Albumini
C/EBPα	CCAAT/arttırıcı Bağlayıcı Protein Alfa
C/EBPβ	CCAAT/arttırıcı Bağlayıcı Protein Beta
CCAAT	Sitozin-Sitozin-Adenozin-Adenozin-Timidin
CDC	Hastalık Kontrol Merkezi
COX2	Siklooksijenaz 2
CuSO₄	Bakır (II) Sülfat
CYP2C18	Sitokrom P2C18
CYP2C19	Sitokrom P2C19
CYP450	Sitokrom P450
DEHP	Di-2-etilhekzil Ftalat
DES	Dietilstilbesterol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi
EBK	Endokrin Bozucu Kimyasal
EGCG	Epigallokateşin Gallat

ER	Estrojen Reseptörler
ERα	Östrojen Reseptörü Alfa
ERβ	Östrojen Reseptörü Beta
FABP4	Yağ Asidi Bağlayıcı Protein 4
FAS	Yağ Asidi Sentazın
FBS	Fötal Sığır Serumu
FCS	Fötal Buzağı Serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
GC	Glukokortikoidler
GTC	Gallokateşinler
HPA-v	İnsan Viseral Preadiposit
HRP	Yaban Turbu Peroksidaz
HSL	Hormon Duyarlı Lipaz
IBMX	3-izobütil-1-metilksantin
LMO3	LIM Domain Only 3
LOAEL	En Düşük Advers Etki Gözlenen Düzey
LXR	Karaciğer X Reseptörü
MSC	Mezenkimal Kök Hücreleri
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum Bromür
Na/K	Sodyum/Potasyum
Na₂CO₃	Sodyum Karbonat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
ncRNA	Kodlamayan RNA
NOAEL	Öngörülen Advers Etki Gözlenmeyen Düzey
NTP	Ulusal Toksikoloji Programı
-OH	Hidroksil Grubu
OR	Olasılık Oranı
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PGC1α	Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gama Koaktivatörü 1
PIP	Piperin
PKOS	Polikistik Over Sendromu

PPAR	Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör
PPARα	Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör Alfa
PPARγ	Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör Gama
PPARβ	Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör Beta
PPRE	Peroksizom Proliferatör Yanıt Elemanı
RA	Rosmarinik Asit
RXR	Retinoid X Reseptörleri
SIRT1	Sirtülin 1 Proteini
StAR	Steroidojenik Akut Düzenleyici Protein
T₃	Triiyodotironin
T4	Tiroksin
TBT	Tributiltin
TFAM	Transkripsiyon Faktörü A
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TR	Tiroit Hormon Reseptörü
TSH	Tiroit Stimüle Edici Hormon
UCP-1	Ayrıştırma Proteini 1
UCP1	Termojenin
UGT	Uridin 5-difosfo-glukuronosiltransferaz
VKİ	Vücut Kitle İndeksi
WAT	Beyaz Yağ Dokusu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Aromataz enzim reaksiyonu.	9
2.2. EBK'lerin maruziyet kaynakları.	16
2.3. Obezogenlerin etki mekanizmaları.	20
2.4. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı.	22
2.5. BPA kaynakları, maruziyet yolları, etki mekanizması ve maddenin sağlık üzerine olası etkileri.	23
2.6. Bisfenol F'nin Kimyasal Yapısı.	29
2.7. Resveratrolün Kimyasal Yapısı.	34
2.8. Rosmarinik Asitin Kimyasal Yapısı.	37
2.9. Rosmarinik Asitin Olası Biyolojik Etkileri.	37
2.10. Epigallokateşin Gallatın Kimyasal Yapısı.	39
3.1. Protein Miktarı Standart Eğrisi	68
4.1. Epigallokateşin gallatın 0-500 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	69
4.2. Epigallokateşin gallatın 0-500 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	70
4.3. Rosmarinik asidin 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi	71
4.4. Rosmarinik asidin 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	71
4.5. Resveratrolün 0-100 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	72
4.6. Resveratrolün 0-100 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	73
4.7. Bisfenol A'nın 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	74
4.8. Bisfenol A'nın 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	74
4.9. Bisfenol F'nin 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	75
4.10. Bisfenol F'nin 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	76
4.11. Deney gruplarında belirlenen aromataz düzeyleri.	77
4.12. Deney gruplarında belirlenen FABP4 düzeyleri.	78

4.13.	Deney gruplarında belirlenen PPAR α düzeyleri.	79
4.14.	Deney gruplarında belirlenen PPAR γ düzeyleri.	80
4.15.	Deney gruplarında belirlenen CEBP β düzeyleri.	81
4.16.	Farklılaşmanın 0. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x10).	83
4.17.	Farklılaşmanın 3. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x20).	83
4.18.	Farklılaşmanın 3. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x40).	84
4.19.	Farklılaşmanın 6. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x20).	84
4.20.	Farklılaşmanın 6. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x40).	85
4.21.	Farklılaşmanın 8. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x20).	85
4.22.	Farklılaşmanın 8. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x40).	86

TABLULAR

Tablo		Sayfa
4.1.	Epigallokateşin gallatın 0-500 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	70
4.2.	Rosmarinik asidin 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	72
4.3.	Resveratrolün 0-100 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi	73
4.4.	Bisfenol A'nın 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	75
4.5.	Bisfenol F'nin 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi	76
4.6.	Deney gruplarında belirlenen aromataz düzeyleri.	77
4.7.	Deney gruplarında belirlenen FABP4 düzeyleri	78
4.8.	Deney gruplarında belirlenen PPARα düzeyleri	79
4.9.	Deney gruplarında belirlenen PPARγ düzeyleri	80
4.10.	Deney gruplarında belirlenen CEBPβ düzeyleri.	81

1. GİRİŞ

Obezite, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından "sağlığı önemli ölçüde bozan aşırı yağ kütlesi birikimi" olarak tanımlanan kronik, karmaşık bir hastalıktır. Dünya çapında yaklaşık iki milyar yetişkin aşırı kilolu (vücut kitle indeksi (VKİ) ≥ 25 kg/m^2) ve 650 milyondan fazla kişi obezdir (VKİ ≥ 30 kg/m^2) (1).

Günümüzde dünyada aşırı kilolu veya obez olarak sınıflandırılan insan sayısı yetersiz beslenen insan sayısından çok daha fazladır ve obezite hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Obezite, enerji alımı ile toplam enerji harcaması arasındaki dengesizlik ile karakterize edilir. Bunun sonucunda yağ hücrelerinde lipit birikimi artar ve vücutta aşırı yağ depolanır. Ancak son çalışmalar, kalorisi yoğun bir diyetin fiziksel hareketsizlik ve genetik yapıyla birleşmesinin yetişkinler ve çocuklar arasında artan obeziteyi açıklayamayacağını göstermiştir. Geçtiğimiz on yılda, kimyasal madde üretiminde önemli bir artış olmuştur. Artan kimyasal madde maruziyetinin obezite ve metabolik sendromundaki hızlı artışa katkıda bulunabileceğine dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (2).

Endokrin bozucu kimyasal maddeler (EBK'ler), hormon biyosentezini, metabolizmasını veya eylemini taklit ederek veya engelleyerek endokrin sistemin işlevine müdahale edebilen bir grup doğal veya sentetik ekzojen kimyasal maddelerdir. EBK'ler, endokrin sistem ile etkileşerek, örneğin bir hormon reseptörünün aktivasyonu veya inhibisyonu yoluyla veya hormonların sentezine, metabolizmasına veya taşınmasına müdahale ederek olumsuz etkilere neden olabilirler (3). Sentetik EBK'ler genellikle plastikler, pestisitler, endüstriyel yan ürünler, kişisel bakım ürünleri, kozmetikler başta olmak üzere birçok endüstriyel üründe bulunabilir. Ayrıca hava, toprak ve suyu yaygın olarak kontamine edebilirler ve bu bileşiklere günlük yaşamda sürekli farklı yollarla maruziyet söz konusudur. Endokrin aktiviteye sahip olduğu bilinen maddeler arasında sentetik hormonlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, pestisitler, poliklorlu bifeniller, bisfenol A (BPA) ve analogları, ftalatlar, dioksinler ve doğal olarak bulunan kimyasal maddeler (örn. fitoöstrojenler) ve doğal hormonlar (estron, estradiol, estriol, progesteron, testosteron) ve yer almaktadır (3).

Doğal EBK'ler birçok bitkide yaygın olarak bulunur. Fitoöstrojenler (daidzein, genistein gibi), üzerinde en çok araştırma yapılan doğal EBK'lerdir. Ancak, son

yıllarda resveratrol (RV), rosmarinik asit (RA) ve epigallokateşin gallat (EGCG) gibi bazı bitkisel kökenli bileşiklerin de endokrin bozucu etkilerinden şüphelenilmektedir. Bu maddeler ile endokrin bozucu etkileri üzerinde yapılan çalışmalar sınırlı olsa da mevcut veriler endokrin sistem ile etkileşebileceklerine dair kanıtlar sunmaktadır.

Sentetik EBK'ler arasında BPA, tüm dünyada çeşitli endüstriyel uygulamalarda günlük olarak kullanılan, en yüksek üretim hacmine sahip kimyasallardan biridir (4). BPA, sentetik östrojene yapısal benzerliği nedeniyle iki hidroksifenil grubu içeren bir difenilmetanın türevidir. Birçok çalışma, BPA'nın östrojeni taklit ettiğini ve östrojen reseptörleri α ve β 'ye ($ER\alpha$ ve $ER\beta$) bağlanmak ve östrojene duyarlı gen ekspresyonunu düzenlemek için östrojenle rekabet ettiğini bildirmiştir (5).

Birçok endokrin organ ve hormon metabolizmayı ve vücut ağırlığını düzenlemek için birlikte çalıştığından, endokrin sistemin vücuttaki enerji dengesi, yağ birikimi ve yağ dağılımında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (6). Birçok EBK'nin karmaşık endokrin sinyal yollarına müdahale edebildiği ve gelişmekte olan organizmada olumsuz sonuçlara yol açabildiği de iyi bilinmektedir. EBK'lerin hormonların yapısı, hormon sinyal mekanizmaları ve reseptörleriyle etkileşmesi üzerine karmaşık etkilerinin yağ hücreleri ve kilo kontrol mekanizmalarını etkileyebileceği söylenmektedir. Mekanistik çalışmalar, EBK'lerin yağ hücresi oluşumu, gelişimi ve enerji dengesi üzerindeki etkilerini ayrıntılı olarak incelemiştir (7, 8). Yapılan araştırmalar, bazı EBK'lerin yağ hücreleri ve hepatositler gibi hedef hücrelerde lipit birikimini uyarabileceğini veya hassas metabolik süreçleri bozarak obezite ve metabolik sendroma yol açabileceğini göstermiştir (9). Son bulgular, EBK'lerin bazılarının adipogenez ve metabolik yolları düzenleyen hormonal reseptörlere müdahale edebileceğini göstermiştir (10).

Obezojenik etkili EBK'ler, özellikle yağ hücresi farklılaşmasını etkileyebilir, yağ hücresi proliferasyonunu artırabilir ve iştah ve tokluk kontrolü de dahil olmak üzere metabolik ve endokrin fonksiyonları bozabilirler. EBK'lerin bazıları ise, lipit metabolizmasında rol alan hormonların transkripsiyonel regülasyonunu değiştirebilirler (11).

Obezojenlerin etkiledikleri bilinen ve en çok çalışılmış mekanizmalardan biri peroksisom proliferatör aktive reseptör γ ($PPAR\gamma$)'nin aktivasyonudur. $PPAR\gamma$,

başlıca yağ dokusunda bulunur ve yağ hücresi proliferasyonu ve farklılaşması, glikoz metabolizması, enerji depolaması ve insülin duyarlılığını kontrol eden çeşitli genlerin ifadesini düzenler (9). Yağ hücresi dönüşümü sırasında, CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein beta (C/EBP β), PPAR γ ve CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein α (C/EBP α) dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörleri indüklenir. PPAR γ 'nin ekspresyonu, C/EBP α veya C/EBP β 3T3 fibroblastlarında adipogenezi uyarır ve bu transkripsiyon faktörlerinin adipogenezi düzenlemedeki temel rollerini öne çıkarmaktadır. Dahası, PPAR γ ve C/EBP α 'nın ekspresyonları miyoblastlarda yağ hücresi dönüşümünü uyardırma sinerjik etkilere sahiptir. Bu nedenle, PPAR γ ve C/EBP α 'nın terminal yağ hücresi farklılaşmasını sağlamak için iş birliği içinde çalışmasının muhtemel olduğu düşünülmektedir (12).

Bu tez çalışması kapsamında, doğal [resveratrol (RV), rosmarinik asit (RA) ve epigallokateşin gallat (EGCG)] ve sentetik EBK [Bisfenol A (BPA), Bisfenol F (BPF)]'ların diferensiyel edilmiş ve adipozite dönüştürülmüş 3T3-L1 fibroblastlarındaki etkileri aromataz, yağ asidi bağlayıcı protein (FABP4), peroksisom proliferatör aktive reseptör alfa (PPAR α) ve CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein beta (C/EBP β) ve peroksisom proliferatör aktive reseptör gama (PPAR γ) düzeyleri değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Obezite

Obezite, bulaşıcı olmayan hastalıklar arasında dünya genelinde en sık görülen patolojik durumlardan biridir ve Birleşmiş Milletler Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri tarafından kabul edilen önemli bir küresel sağlık sorunudur (13).

Vücut kitle indeksi (VKİ), obezite için mevcut sınıflandırma sisteminin temel taşıdır ve avantajları uluslararası gözetimden bireysel hasta değerlendirmesine kadar uzanan disiplinlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (13). VKİ, bir bireyin kilosunun boyunun karesine oranıdır (kg/m^2) ve bir kişinin kiloyla ilişkili sağlık sorunları riskini tahmin etmek için kullanılır. VKİ, belirli bir boydaki fazla vücut ağırlığını ölçer. Vücut yağının doğrudan bir ölçüsü değildir ancak vücut yağıyla korelasyon gösterdiği gösterilmiştir (14). Genel popülasyonda 25 kg/m^2 üzerindeki VKİ'nin kardiyovasküler, metabolik ve kas-iskelet sistemi hastalıkları için bir risk faktörü olduğu savunulmaktadır (15). VKİ obeziteyi değerlendirmek için bir tarama aracıdır. Ancak, VKİ obezite tanısında tek başına kullanılmamalıdır (16). Zira, VKİ artan kas dokusunun ağırlığını, vücudun su tutması ve yağ dokusunun dağılımını hesaba katmada yetersiz kalmaktadır. Benzer beden kitle indeksine sahip olan bireylerin özellikle karın yağ dokusunun farklılık gösterebildiği ifade edilmiştir (17).

Mevcut veriler, küresel obezite prevalansının 1975'ten günümüze neredeyse üç kat arttığını ve dünya yetişkin nüfusunun yaklaşık %39'unun fazla kilolu, %13'ünün ise obez olarak sınıflandırıldığını göstermektedir (18). Amerikan Hastalık Kontrol Merkezi 2008'de obezitenin salgın boyutlarına ulaştığını ve yetişkinlerin %60'ından fazlasının obez veya aşırı kilolu olduğunu bildirmiştir (7).

Obezite toplumun her yaş ve kesiminde görülebilir. Çoğu obez ve aşırı kilolu çocuk büyüdüğünde obez yetişkinler olduğu için, çocukluk çağı obezitesi toplum için özel bir endişe kaynağıdır. Ondört çalışmanın meta-analizi sonucunda, gebelik sırasında annenin sigara içmesinin çocukluk çağı obezitesi riskinin %50 daha yüksek olmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Gebelik sırasında annenin aşırı kilo alması insülin direncine, gestasyonel diyabete ve yüksek doğum ağırlığına yol açabilir. Literatürde bulunan birkaç çalışma yüksek doğum ağırlığı ile yaşamın

ilerleyen dönemlerinde görülen yüksek VKİ arasında doğrudan bir ilişki bulmuştur (19, 20).

Obezitenin geliştikten sonra etkili bir şekilde tedavi edilmesi zor ve zaman alan bir süreçtir. Obezite ve aşırı kilonun olumsuz sağlık etkileri olduğu; tip 2 diyabet, hiperinsülinemi, insülin direnci, koroner kalp hastalığı, yüksek tansiyon, felç, gut, karaciğer hastalığı, astım ve akciğer sorunları, safra kesesi hastalığı, böbrek hastalığı, üreme sorunları, osteoartrit ve bazı kanser türleri gibi bir dizi ciddi tıbbi durumun riskini ve prognozunu etkilediği bilinmektedir (7, 21).

Yüksek kalorili diyet, düşük fiziksel aktivite ve genetik yatkınlık, obezitenin ana nedenleri olarak kabul edilir. Ancak, obezogenik EBK'lere maruz kalma gibi faktörlerin obezite ve ilgili diğer metabolik bozuklukların gelişimine katkıda bulunduğu dair artan kanıtlar vardır (22).

Obezitenin Etiyolojisi

Son yıllarda dünya nüfusunun en kalıcı sağlık sorunları arasında yer alan obezite, hücresel düzeyde genellikle adipositlerin hipertrofisi ve hiperplazisine ve yağ dokusunda enerji depolanmasına atfedilen artan yağ kütlesi ile karakterize edilir. Obezite ile ilişkili metabolik bozukluğa katkıda bulunan adipogenez ve adipoz doku disfonksiyonunun altında yatan moleküler mekanizmaları daha iyi anlamak için son zamanlarda kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (23, 24).

Obezitede enerji alımı artışına veya enerji harcanması azalmasına bağlı enerji homeostazı bozulur. Genetik, epigenetik, fizyolojik, davranışsal, sosyokültürel ve çevresel pek çok fizyopatolojik etmen obezite gelişimine zemin hazırlamaktadır. Enerji dengesinin düzenlenmesi ve yağ depolarının oluşmasından biyolojik ortam (genetik/epigenetik etmenler) ile çevresel faktörler (davranışsal/ sosyal etmenler, kronik stres) arasındaki etkileşimler sorumludur. Kültürel, davranışsal ve çevresel etmenler (yüksek enerjili beslenme, büyük porsiyonlar, fiziksel inaktivite, sedanter yaşam tarzı) ve buna ek olarak yeme bozuklukları obezite gelişimini hızlandırır. Ayrıca adipositlerde oluşan hipertrofi, hiperplazi ve inflamasyon adipoz dokunun yapısında ve adipokinlerin sekresyonunda birçok değişikliğe yol açmaktadır (25).

Yağ dokusu insan vücudunda sadece lipit birikimi açısından değil aynı zamanda endokrin fonksiyonlar açısından da önemli bir rol oynamaktadır. Beyaz yağ

dokusu (WAT)'ın artması dolaşımdaki adipokinleri arttırır. Benzer şekilde, termojenez için önemli olan kahverengi yağ dokusu (BAT)'ın aktivitesindeki bozukluklar da obezite durumunu yönlendirmede ek bir rol oynamaktadır (25).

Obezite Patofizyolojisi

Obezitenin temel dogması “alınan kalori ve harcanan kalori arasındaki enerji denge bozukluğu” olarak ifade edilebilir. Beslenme düzenine sağlıklı yiyeceklerin dahil edilmesi ve daha fazla egzersiz yapılması ile obezitenin tam olarak engellenememesi, bu faktörlerin obezitedeki tek etmenler olmadığına işaret etmektedir (7). Ancak birçok araştırmacı, obezitenin patofizyolojisinin daha karmaşık olduğuna inanmaktadır (26).

Obezitenin genetik, davranışsal ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık bir etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir. Son 20 yıldır genetik obezite üzerine yapılmış birçok çalışma, genetik mutasyonların, polimorfizmlerin ve gen ifadesindeki değişimlerin bireyleri obeziteye yatkınlaştırmada rol oynadığını ortaya koymuştur (26).

2002 yılında Baillie-Hamilton, obezite salgınının son 40 yılda çevredeki endüstriyel kimyasalların belirgin artışıyla aynı zamana denk geldiğini göstererek, obezite etiolojisinde kimyasal maddelerin önemini vurgulamıştır. Organoklorlu pestisitler, poliklorlu bifeniller, polibromlu bifeniller, ftalatlar, bisfenoller, ağır metaller ve bazı çözücüler dahil olmak üzere kimyasal maddelerin kilo alımına neden olduğu çok sayıda çalışmada ifade edilmiştir. Bu kimyasal maddelerin vücut ağırlığının kontrolünde görev alan hormonların miktarlarını, nörotransmitterlere duyarlılığını veya sempatik sinir sisteminin aktivitesini değiştirerek kilo homeostazına müdahale ettiği belirtilmiştir. Çalışmalar, çevresel açıdan önemli düşük dozlarda, farklılaşmanın kritik dönemlerinde EBK'lere maruz kalmanın, obeziteye yol açan gelişimsel programlamayı değiştirebileceğini göstermiştir (27).

Leptin ve adiponektin, insülin duyarlılığını ve enerji dengesini düzenleyen 3T3-L1 adipositlerinden salgılanan anahtar adipokinlerdir (28). Obezitede, aşırı leptin salgılanır ve bu da sonunda leptin direncine yol açar. Hipotalamustaki hücreler leptine dirençli hale geldiğinde, tokluk sinyali alınmaz ve kişi açlık hisseder (26). Diğer taraftan, obezitede yağ asitlerinin adipositlerde depolanmasında aşırı bir artış gözlenir.

Yağ asitlerinin yağ hücreleri içinde triasilgliserol olarak depolanmasının yağ asidi toksisitesine karşı koruduğu varsayılmıştır; aksi takdirde, serbest yağ asitleri damarlarda serbestçe dolaşır ve vücuda yayılarak oksidatif strese yol açabilirler. Serbest yağ asitlerinin aşırı salınması ve yüksek yağ asidi metabolitinin oluşumu, endoplazmik retikulum ve mitokondride oksidatif stres yarattığı için lipotoksisiteyi tetikler. Oluşan lipotoksisite hem yağ dokusunu hem de diğer dokuları etkiler. Özellikle de karaciğer ve pankreas gibi dokular lipotoksisiteden çok yüksek miktarda etkilenir (21). Diğer taraftan, bağırsak mikrobiyotasının bileşimindeki dengesizlikler de insülin direnci ve vücut ağırlığı artışının oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (29).

2.2. Adipogenez

Adipogenez, mezenkimal kök hücreler (MSC'ler)'in ve preadipositlerin olgun adipositlere dönüşümüne yol açan çok adımlı bir süreçtir. Adipogenez MSC'lerin adipositlere bağlanması, mitotik klonal genişleme ve terminal farklılaşma olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. PPAR γ ve C/EBP'ler farklılaşmanın erken aşamalarında önemli transkripsiyon faktörleridir. Terminal farklılaşma aşamasında preadipositlerin, insülin duyarlılığı, lipit sentezi ve taşınması ve adipositlere özgü proteinlerin salgılanması gibi olgun adipositlerin özelliklerini kazandığı bilinmektedir (9).

1990'lara kadar adipositler sadece "metabolik yakıt için depolama hücreleri" olarak düşünülmüştür. Ancak, enerji rezervi bilgilerini adipositlerden merkezi sinir sistemi de dahil olmak üzere vücudun diğer organlarına ileten "leptin" adı verilen bir adiposit türevi hormonun keşfinin ardından, bu "yağ depolama hücreleri"nin aslında bir endokrin organ olarak işlev gördüğü belirlenmiştir ve günümüzde de adipositlerin endokrin işlevlerinin olduğu kabul edilmektedir. Leptinin keşfinden bu yana, adipositlerin organizmanın büyümesinde ve farklılaşmasında ve ayrıca diğer endokrin organlara bilgi geri bildiriminde önemli roller oynayan birçok başka sitokin ve büyüme faktörü salgıladığına dair kanıtlar gösterilmiştir (30).

Yağ dokusu yalnızca enerji depolamada yer almaz, aynı zamanda çok sayıda protein üreten bir endokrin organ olarak da işlev görür; yağ dokusu tarafından üretilen proteinler "adipokinler" olarak adlandırılır. Adipokinler lokal olarak etki edebilir (otokrin, parakrin etki) veya kan dolaşımına salgılanarak uzak organlar ve dokular üzerinde etkilerini gösterebilirler (endokrin etki). Adipokinler vücuttaki çeşitli fizyolojik

süreçleri düzenlemede önemli bir rol oynar. Bu rollere örnek olarak enerji metabolizması, insülin duyarlılığı, iştah düzenlemesi, lipit metabolizması, üreme işlevleri, immün işlevler ve kardiyovasküler işlevler verilebilir. Obezite ve metabolik bozukluklarda sıklıkla görülen adipokinlerin düzensizliği insülin direnci, inflamasyonla ilişkili bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çok sayıda kronik durumun gelişmesine katkıda bulunur (31).

Yağ dokusu, vücuttaki ana enerji kaynağıdır. Adipositler yağ dokusunun ana yapı taşları olmasına rağmen, preadipositler, makrofajlar, monositler, kök hücreler ve endotel hücreleri gibi hücreler de yağ doku oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Memelilerde, bu doku 2 ana türe ayrılır: WAT ve BAT (32). WAT, yetişkinlerde baskın yağ deposudur ve vücut ağırlığının yaklaşık %20'sini temsil eder. Periferde bulunan büyük bir lipit damlacığı ve çekirdeğini içeren beyaz yağ hücrelerinden oluşur. Vücut tarafından enerjik substrat olarak kullanılacak serbest yağ asitleri ve gliserol ürettikleri lipoliz işlemini gerçekleştirirler (33). WAT ayrıca endokrin fonksiyonlara sahiptir ve homeostatik roller oynayan birçok peptid, hormon ve steroid salgılar. Aşırı depolanmış yağ, adipositlerin hipertrofisine ve hiperplazisine neden olur. Artan adiposit hacmi ve sayısı ise kronik inflamasyona neden olur (34). BAT adipositler, iç zarında ayrıştırma proteini 1 (UCP-1) ifade etme özelliğine sahip çok sayıda mitokondri, merkezi oval bir çekirdek ve çoklu lipid damlacıkları içermektedir. BAT yağ hücreleri, ısı üretme kapasitesiyle yakın ilişkisi olan genlerin yüksek ifadesiyle karakterize edilir (33).

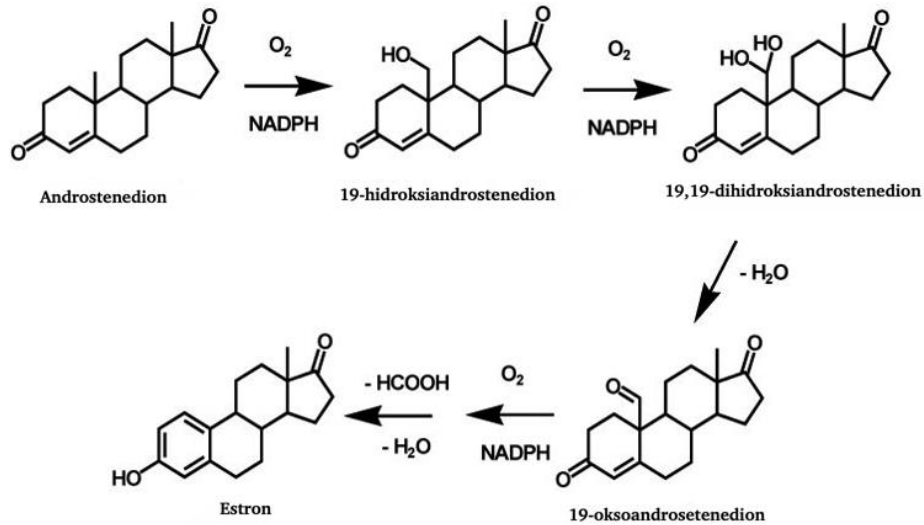
Bir yağ hücresinin yaşam döngüsü, miyoblastlar ve yağ hücreleri de dahil olmak üzere birden fazla hücre tipine farklılaşabilen çok potansiyelli bir kök hücre aşamasında başlar. PPAR γ gibi çeşitli transkripsiyonel düzenleyicilerin ifadesi yağ hücrelerinin farklılaşmasını yönlendirmektedir (35).

Adipogenez, pre-adiposit öncü hücrelerinin, lipit doldurma kapasitesine sahip adipositlerin yanı sıra hormon ve sitokinlerin ekspresyonuna farklılaşma sürecini ifade eder. Nükleer PPAR γ reseptörü, adiposit farklılaşmasının gerçek bir ana düzenleyicisidir. PPAR γ kararlı adiposit öncü hücrelerinde veya "preadipositlerde" eksprese edilir. PPAR γ ve C/EBP α , hücre büyümesi ve durdurulması sürecinde yer alan ve ardından tamamen farklılaşmış adiposit fenotipine ilerleme sürecinde yer alan önemli transkripsiyon faktörleridir (36).

2.2.1. Aromataz

Aromataz (östrojen sentetaz veya östrojen sentaz), aromatisasyon işlemi yoluyla androjenik steroidlerin östrojenlere katalizinde yer alan anahtar bir enzimdir (37). Aromataz, insanlarda 15. kromozomun 21.2 bölgesinde bulunan tek bir gen olan CYP19 tarafından kodlanır. Bu gen 123 kb uzunluğundadır ve gonadlar, kemik, meme, yağ dokusu, vasküler doku, cilt, plasenta ve beyin dahil olmak üzere birçok farklı dokuda eksprese edilir (38). Aromataz enzimine ait reaksiyon Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Aromataz, androjen öncüllerinin östrojenlere dönüşümünü sağlayan bir sitokrom P450 (CYP450) enzimidir. Östrojenler, sitokrom P450 19A1 (CYP19A1) geni tarafından kodlanan aromataz enzim tarafından sentezlenir. Bu enzim, androstenedion ve testosteron gibi androjenlerin, A halkasının aromatisasyonu yoluyla sırasıyla estron ve estradiol gibi östrojenlere dönüştürülmesinden sorumludur (39).



Şekil 2.1. Aromataz enzim reaksiyonu.

Aromataz enziminin varlığına dair ilk deneysel ve dolaylı kanıt, Steinach ve Kun'un erkeklere işaretlenmemiş testosteron propionat verilmesinin ardından idrarda artan östrojenik aktiviteyi gösterdiği 1937 yılına dayanmaktadır. Kesin ve doğrudan kanıt, 1980'lerde plasenta mikrozomlarından insan aromataz proteininin saflaştırılması

ve aromataz aracılığı ile androstendionun östrona dönüşümünün gösterilmesiyle gerçekleşmiştir (40).

Androjenlerin endokrin sistemde önemli bir rol oynayan östrojenlere dönüşümünü katalize eden aromatazın, bu rolü nedeniyle EBK'lerin hedefi olması muhtemeldir (41). Aromataz aktivitesindeki herhangi bir sorun, dokulardaki östrojen seviyelerinin dengesizliğine neden olur ve bu da östrojen aracılı fizyolojik tepkileri daha da bozarak endokrin sistemin bozulmasına yol açar (42).

Etki Mekanizması

Aromataz, androjenin östrojene aromatisasyonundan sorumludur. Aromataz enzimi CYP450 hemoprotein ve bir flavoprotein olan NADPH-CYP450 redüktazdan oluşan bir komplekstir. Bu kompleks, östrojen sentezinde hız sınırlayıcı son adım olan steroidal C-19 androjenlerin (androstenedion ve testosteron) C-18 östrojenlere (estron ve estradiol) dönüşümünü katalize etmekten sorumludur. Aromataz, ergenlik döneminde meme ve uterus büyümesi ve kemik olgunlaşması dahil olmak üzere bir dizi önemli biyolojik süreçte önemli bir rol oynar. Yetişkinlerde aromataz kemik mineralizasyonunu, lipit metabolizmasını ve kardiyovasküler sistemi etkiler (43).

Aromatazın yer aldığı enzimatik reaksiyon, her biri 1M eşdeğer NADPH ve oksijen gerektiren üç adımdan oluşur. İlk adım, 19-hidroksi ara ürünü üretmek için C-19'da androjen substratının hidroksilasyonunu içerir. İkinci adımda 19-hidroksi ara ürünü, 19-okso bileşiği üretmek için oksitlenir. Aromatisasyon reaksiyonunun son adımını daha az tanımlanmıştır. Ancak, bu adımın östrojen (estron ve estradiol) ve formik asit üretmek için C10-19 bağının oksidatif olarak parçalanmasını içerdiği düşünülmektedir (40).

2.2.2. Peroksisom proliferatör aktive reseptörler

Peroksisom proliferatör aktive reseptörler (PPAR'ler), ligandla aktifleşen transkripsiyon faktörleri olarak görev yapan ve dolayısıyla çeşitli metabolik yolları modüle eden nükleer reseptörlerdir. Bu reseptörler 1990'larda kemirgenlerde tanımlanmış ve peroksisom proliferasyonu özelliklerine göre adlandırılmıştır. PPAR ailesi dokular arasında farklı şekilde eksprese edilen üç izoformdan oluşur: PPAR α ,

PPAR β/δ ve PPAR γ . PPAR'lar, lipid ve glikoz metabolizması için önemli olan çeşitli genlerin ekspresyonunu kontrol eder.

PPAR'lar, retinoid X reseptörleri (RXR'ler) ile heterodimerler oluşturur ve bu heterodimerler, çeşitli genlerin transkripsiyonunu düzenler. PPAR'lar, enerji metabolizmalarını düzenlemede ve lipid ve glikoz homeostazlarını korumada temel rol almaktadırlar (44-46).

PPAR'ler hiperlipidemi, diyabet ve obezite gibi bazı hastalıkların gelişimiyle potansiyel olarak bağlantılı olan metabolik süreçlerde yer alan çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenlemekten sorumludurlar (47).

Peroksizom proliferatör aktive edici reseptörler (PPAR'ler), genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleri olarak işlev gören bir grup nükleer reseptör proteindir. PPAR'lar, üç izoformda bulunur: PPAR α , PPAR β/δ ve PPAR γ . Transkripsiyon faktörleri olarak işlev görürler ve gen ifadesini düzenlemek için hareket ederek çeşitli metabolik işlevleri etkilerler (48).

Proksizom proliferatör aktive reseptör alfa (PPAR α)

PPAR α , lipidlerin, karbonhidratların ve amino asitlerin metabolizmasını düzenleyen ve spesifik ligandlar tarafından aktive edilen bir transkripsiyon faktörüdür. PPAR α , enerji gereksinimlerinin yüksek bir kısmını lipidlerden alan dokular olan karaciğer, kalp ve iskelet kaslarında yüksek düzeyde eksprese edilmektedir (49) ve serbest yağ asidi oksidasyonunun ana düzenleyicilerinden birisidir (50).

PPAR α genindeki genetik varyantların lipid konsantrasyonlarını etkileyerek dislipidemi ve kardiyovasküler hastalık geliştirme riskiyle ilişkilendirildiğine dair kanıtlar vardır. PPAR α 'nın ligandları tarafından aktivasyonunun, hücrede özellikle vücut enerji üretimiyle ilişkili mekanizmalarda etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca, inflamatuvar yanıtta önemi olan birden fazla biyolojik süreci değiştirebildiği bilinmektedir (47).

İn vivo çalışmalarda, PPAR α knockout farelerin yüksek yağlı bir diyetle beslenmesinin vücut ağırlığında aşırı bir artışa yol açtığı; buna karşın PPAR α 'nın aktivasyonunun kilo alımını azalttığını gösterilmiştir (51). Ayrıca, obeziteye bağlı insülin direnci olan farelerde PPAR α eksikliğinin, pankreas β hücrelerinin insülin sekresyonunda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (50).

Etki Mekanizması

PPAR'ların DNA'ya bağlanabilmesi için retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimerizasyon gerekir. PPAR α için, PPAR α -RXR kombinasyonu hedef gende bulunan peroksizom proliferatör yanıt elemanları (PPRE'ler) ile etkileşime girer. PPRE içeren genlere örnek olarak açıl-CoA oksidaz (ACO), peroksisomal bifonksiyonel enzim, karaciğer yağ asidi bağlayıcı protein ve mikrozomal CYP4A verilebilir (52).

PPAR α 'nın mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunda anahtar olan enzimlerin düzenlenmesi yoluyla yağ asidi metabolizmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (52). PPAR α 'nın, yağ asidi taşınmasında ve peroksisomal ve mitokondriyal yağ asidi β - oksidasyonunda yer alan genlerin up regülasyonu aracılığı ile yağ asitlerinin kullanımını ve katabolizmasını teşvik ettiği bilinmektedir (53).

Son yıllarda, PPAR α 'nın glikoz metabolizması ve insülin duyarlılığının önemli bir düzenleyicisi olduğunu gösteren kanıtlar ortaya çıkmıştır. PPAR α , gliserol-3-fosfat dehidrojenaz, gliserol kinaz ve gliserol taşıma proteinlerini upregüle ederek açlık durumları sırasında glikoz sentezini düzenler. Ayrıca, PPAR α , piruvat dehidrojenaz kinaz 4'ün ekspresyonunu uyararak glukoneojenez düzenler; böylece serbest yağ asidi sentezi yerine glukoneojenez için piruvat kullanımını teşvik eder. Başta fenofibrat olmak üzere PPAR α agonistleri ile tedavi, tip 2 diyabetli farelerde ve sıçan modellerinde yağlanmayı azaltarak, periferik insülin etkisini iyileştirerek ve pankreas β -hücreleri üzerinde yararlı etkiler sağlayarak insülin direncini ve glisemik kontrolü önemli ölçüde iyileştirmiştir (50).

Proksizom proliferatör aktive reseptör gama (PPAR γ)

PPAR γ hücreSEL büyüme, farklılaşma ve apoptozu düzenleyen nükleer hormon reseptör ailesinin bir üyesidir (54). Glikoz metabolizması, yağ asidi depolanması, yağ hücrelerinin farklılaşması (adipogenez), insülin duyarlılığı ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde rol oynar (53).

PPAR γ geni, üç izoform üreten üç promotör içermektedir: PPAR γ 1, PPAR γ 2 ve PPAR γ 3. PPAR γ 1 ve PPAR γ 3 RNA transkriptleri aynı PPAR γ 1 proteinine dönüşür. PPAR ekspresyonu dokuya bağlıdır. PPAR γ 1 çok çeşitli

dokularda bulunurken, PPAR γ 2 yağ dokusuyla sınırlıdır. PPAR γ 3, makrofajlarda, kalın bağırsakta ve beyaz yağ dokusunda yüksek miktarlarda bulunur. Linoleik asit, araşidonik asit ve eikosapentaenoik asitler gibi çoklu doymamış yağ asitleri, PPAR γ 'nin endojen ligandlarıdır (46).

PPAR γ , kararlı adiposit öncü hücrelerinde veya "preadipositlerde" eksprese edilir. Ayrıca, PPAR γ 'nın fibroblastlardan veya mezenkimal kökenli hücrelerden adiposit farklılaşmasını sağlayabileceği *in vitro* olarak gösterilmiştir (55).

PPAR γ , adiposit farklılaşmasının gerçek bir ana düzenleyicisidir ve adipositlerde yüksek konsantrasyonlarda mevcuttur (49). PPAR γ 'nin aktivasyonu hem adiposit farklılaşmasının uyarır hem de olgun lipit dolu adipositlerde apoptozu da teşvik eder. Olgun hücrelerde ligand kaynaklı bu apoptoz, pre-adiposit öncüllerinden adiposit oluşumunun uyarılmasına neden olur ve bunun sonucunda küçük, nispeten insüline duyarlı adipositlerin sayısı artar (49).

Birçok EBK'nın adipogenezi, PPAR γ 'nin aktivasyonunu, adipoz enflamasyonunu ve artan lipit üretimini teşvik ettiği; böylece tüm enerji metabolizmasını düzensizleştirdiği ve kilo alımına yatkınlık kazandırdığı öne sürülmüştür (56). Yapılan çalışmalar, EBK'lerin ve obezogenlerin, özellikle PPAR γ üzerinden lipit akışını, adiposit proliferasyonunu ve adiposit farklılaşmasını kontrol eden transkripsiyonel düzenleyicilere müdahale ettiğini ve adipositlerin sayısını ve boyutunu artırabildiğini öne sürmüştür (57).

Etki mekanizması

Endojen ligandlar, EBK'ler veya farmasötik ilaçlar PPAR γ 'e bağlandığında, PPAR γ 'nin aktivasyonu gerçekleşir ve RXR ile bir heterodimer oluşturmasına neden olur. PPAR γ :RXR heterodimeri daha sonra hedef genlerin DNA'sında "PPRE'ler" adı verilen spesifik bölgelere bağlanır ve bu da ko-transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve hedef genin sonraki mRNA ekspresyonuna neden olur (9). PPAR γ :RXR heterodimerinin aktivasyonu, adipoz dokuda preadipositlerin farklılaşmasını destekleyerek lipit biyosentezi ve depolanmasını düzenlemektedir (57).

Dolaşımdaki serbest yağ asitlerinin artan düzeyleri ve yağ olmayan dokudaki lipit birikimi, insülin direncinin gelişmesinde rol oynar. Uzun yıllardır PPAR γ yoğun

araştırmaların odak noktası olmuştur. Bunun nedeni PPAR γ ligandlarının tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan güçlü insülin sensitizrleri olmasıdır (58).

2.2.3. Yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4, aP2)

Yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABP'ler), hemen hemen tüm memeli hücrelerinde yüksek oranda ekprese edilen sitoplazmik proteinlerdir. FABP'ler hücrelerdeki lipit yanıtını düzenlerler, hücre membranı ve hücre içi proteinler arasındaki etkileşimde aracı bir rol oynarlar ve metabolik ve inflamatuvar yollarla ilişkilidirler. FABP'ler, hücreler içindeki yağ asitleri için hücre içi şaperonlar olarak görev almaktadır (59, 60).

FABP4, tüm FABP ailesinin en iyi karakterize edilmiş molekülüdür. Tipik bir hücre içi lipit şaperonu olarak görev yapar ve lipit depolanmasını, dağılımını, taşınmasını, parçalanmasını ve metabolizmasını desteklemekten sorumludur. Yağ hücrelerindeki lipit damlacıkları içinde fazla yağ asitlerinin birikmesini desteklerken, yağ hücrelerindeki lipolizin önemli bir düzenleyicisi olan hormon duyarlı lipaz (14) için bir bağlanma bölgesine de sahiptir. FABP4, yağ hücrelerinde, vasküler endotel hücrelerinde ve makrofajlarda farklı roller üstlenir (61).

Japonya'da yapılan bir nüfus temelli çalışmanın sonuçları, diğer FABP'lerle karşılaştırıldığında, FABP4 düzeylerinin genel popülasyonda en yüksek olduğunu ve kadınların ve de özellikle yüksek vücut yağ oranına sahip kadınların erkeklere göre daha yüksek FABP4 düzeylerine sahip olduğunu göstermektedir (62).

FABP4 esas olarak adipositler ve makrofajlarda ekprese edilmektedir (63). Son alışmalar, yağ hücrelerinin ve makrofajların dış faktörler tarafından indüklendiğinde FABP4 salgılayabileceğini ve dolaşımdaki FABP4'n obeziteyle ilişkili yeni bir adipokin olarak işlev görebileceğini göstermiştir (64).

Plazma FABP4 düzeyleri obez bireylerde önemli ölçüde yükselmektedir ve obezlerde farklı dokularda artmış FABP4 düzeyleri saptanmıştır (65). FABP4'n lipit birikimini yöneterek obez bireylerde metabolizmanın düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (66). Bunun muhtemel nedeni yağ kütlesi başına salgılanmanın artmasıdır. Obezite, ateroskleroz, iskemik inme, kardiyovasküler olaylar, akut koroner sendrom, insülin direnci, hipertansiyon, uyku apnesi ve diyabet gibi patolojik durumda dolaşımdaki FABP4 içeriği yükselir (65, 67). Erbay ve ark. (2009)'nın yaptığı

çalışmanın sonucunda, FABP4 eksikliğinin ateroskleroz üzerinde önemli bir koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. İlgili çalışmada, FABP4 geni knock-out farelerin ateroskleroz geliştirme şansının daha düşük olduğu ifade edilmiştir (68).

FABP4'ün, PPAR γ düzeylerini ve adipogenezi azalttığı ve yağ dokusunda düzeylerinin PPAR γ ile ters orantılı olduğu bulunmuştur. Viserel yağda FABP4 tarafından PPAR γ 'nin baskılanmasının, obezite ile ilişkili morbiditelerin gelişiminde FABP4'ün bildirilen rolünü açıklayabileceği ifade edilmektedir (69, 70). Yapılan çalışmalar sonucunda FABP4'ün etkili bir klinik biyomarkör olarak kullanılabilirliği ve FABP4 inhibitörlerinin geniş terapötik etkilere sahip olabileceği bildirilmiştir (71).

2.2.4. CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein (CCAAT/enhancer binding protein- C/EBP β)

CCAAT'ler, tümü C-terminalinde dimerizasyon ve DNA bağlanmasında yer alan yüksek oranda korunmuş bazik-lösin fermuar alanı içeren bir transkripsiyon faktörleri ailesidir. Ailenin en az altı üyesi bugüne kadar izole ve karakterize edilmiştir. Bu proteinlerin ekspresyonu, hormonlar, mitojenler, sitokinler, besinler ve belirli toksinler dahil olmak üzere bir dizi faktörün etkisi yoluyla çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik koşullar da birçok düzeyde düzenlenmektedir (72-74).

C/EBP β ve C/EBP δ adipogenezin erken evrelerinde geçici olarak indüklenirken, C/EBP α 'nın adipogenezin son evrelerinde upregüle olduğu bilinmektedir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, her birinin bu süreçte önemli bir rol oynadığını göstermiştir (72, 73). C/EBP β 'nin ekspresyonu adipogenez için gereklidir ve C/EBP α ve PPAR γ 'yi aktive eder (75).

BPA, BPF ve BPS'nin obezogenik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, BPS ve ardından BPF'nin, BPA'dan daha büyük bir nötr lipit depolama kapasitesine yol açtıkları göstermiştir. Bu durum C/EBP α , PPAR γ ve FABP4 ekspresyonunda artışlarla gösterilmiştir (76).

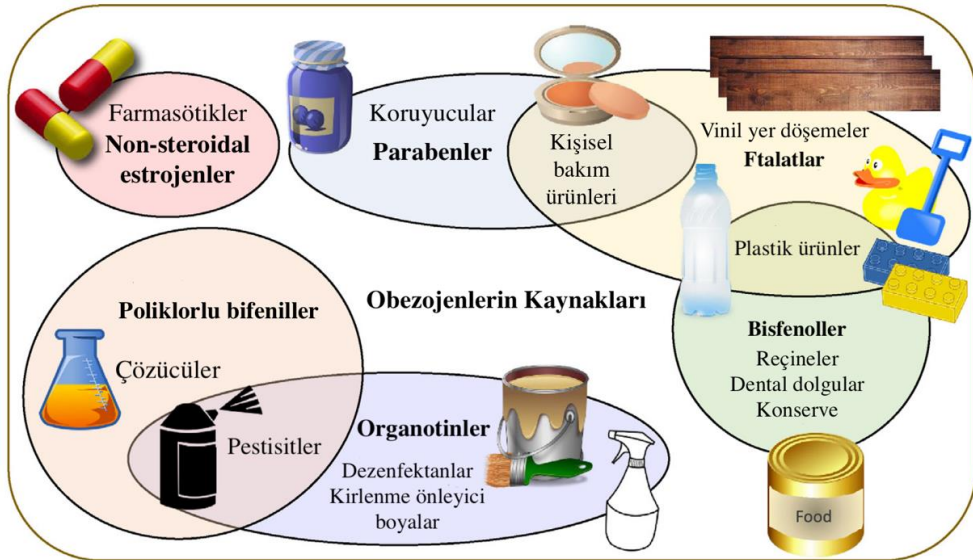
2.3. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler

Endokrin bozucu kimyasallar (EBK'ler), endojen hormonların sentezine, depolanmasına, salınmasına, taşınmasına, metabolizmasına, bağlanmasına, etkisine ve/veya eliminasyonuna müdahale edebilen ekzojen ajanlardır (3). EBK olarak

sınıflandırılmak için kriterleri karşılayan yaklaşık 1000 kimyasal tanımlanmıştır. Bu bileşikler, gıda ambalajları, yapı malzemeleri, pestisitler, giyim, deterjanlar, plastikler ve tıbbi ekipman dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere çeşitli tüketici ürünlerinde kullanılmaktadır. Toplum genelinde maruziyet oral, dermal temas, inhalasyon ve hatta deri altı ve intravenöz yollarla (tıbbi cihazlar aracılığıyla) gerçekleşebilir (77).

EBK'ler, hormon reseptörlerine bağlanabilir ve agonist veya antagonist olarak etki edebilir; böylece hormonal eylemleri taklit edebilir, güçlendirebilir, azaltabilir veya bloke edebilir. EBK'ler, çok sayıda sinyal yolağına müdahale ederek birden fazla organ ve sistemde (beyin, pankreas, karaciğer, yağ dokusu, gastrointestinal sistem, üreme ve merkezi sinir sistemi) farklı seviyelerde etki etme potansiyeline sahiptir. Bu etkiler hücre tipine, reseptör tipine, reseptör yoğunluğuna, kofaktörlerin varlığına, yaşam döngüsüne ve diğer faktörlere bağlı olarak değişir. EBK'ler ayrıca farklı hücre tiplerindeki hormon reseptörlerinin sayısını ve dolaşımdaki hormonların konsantrasyonunu değiştirebilir. EBK'ler, insülin, ghrelin ve adipositokinler (örneğin leptin ve adiponektin) gibi periferik moleküllerin sinyallerini spesifik olarak değiştirebilir (18, 56).

EBK'ler, BPA, pestisitler, ftalatlar ve diğer kimyasallar gibi çevrede bulunan çeşitli maddeleri kapsar. Bu bileşikler, endokrin sistemin normal düzenlemesini bozabilen östrojen benzeri ve/veya anti-androjenik özellikler sergiler (78). EBK'nin maruziyet kaynakları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. EBK'lerin maruziyet kaynakları.

2.4. Endokrin Bozucuların Sağlık Üzerine Etkileri

Birçok EBK yapısal olarak hormonlara benzer. EBK'ler hormon düzeylerini değiştirerek, hormonların sentezini veya metabolizmasını etkileyerek veya hormonların işlevlerini değiştirerek endokrin sistemi bozabilir. Progestinler, androjenler ve östrojenler gibi kritik üreme hormonları birçok EBK'nin birincil hedefidir. Bu tip EBK'lere örnek olarak pestisitler, deterjanlar, yüzey aktif maddeler, plastizerler gibi endüstriyel bileşikler ve bazı doğal bitki türevleri verilebilir.

Literatürde var olan önemli kanıtlar, EBK'lerin insan ve hayvan üreme sağlığını etkilediğini ve üreme bozukluklarına katkıda bulunduğunu göstermektedir (3). Birçok çalışma, bu EBK'lere maruz kalmanın hem insanlarda hem de hayvanlarda fertilitenin azalması ve anormal cinsel gelişim gibi üreme kusurlarına yol açtığını göstermektedir (79). Endokrin sistemin homeostazının bozulması özellikle fetal gelişim, çocukluk ve ergenlik gibi hassas yaşam dönemlerinde meydana gelirse, potansiyel olarak ciddi veya kalıcı etkilere yol açabilir (80).

Dünya Sağlık Örgütü ve Birleşmiş Milletler Çevre Programı tarafından yayınlanan bulgular ışığında, küresel olarak over, endometriyal, prostat ve testis kanseri oranlarının arttığı bildirilmiştir. Ayrıca, meme kanseri insidansında son on yılda %10-15'lik bir artış gerçekleşmiştir. Birçok Avrupa ülkesinde ve Amerika'da kadınlarda prematür telarj ve puberte prekoks vakalarında; erkeklerde ise jinekomasti vakalarında ciddi artışlar gözlenmektedir. Ayrıca, her iki cinste de yaşamın erken yıllarından başlayarak obezite ve/veya metabolik sendrom ve tip iki diyabet gibi EBK maruziyeti ile ilişkilendirilen metabolik durumlar önemli ölçüde artmıştır (81). EBK'lere maruziyet ile meme, prostat, testis gibi kanserlerin insidansında artışı; erkek çocukların feminizasyonunu; azalmış sperm sayısı, motilite ve spermin anormal morfolojisini; hipospadias ve kriptorşidizm gibi doğum kusurlarını; gestasyonel diyabet, düşük doğum ağırlığı, endometriozis ve polikistik over sendromu (PKOS)'nu ilişkilendiren çalışmalar da literatürde mevcuttur (82).

EBK'ler lipofilik yapılara sahiptir; bu nedenle hormonal etkiye müdahale edebilir ve normal endokrin işlevlerini bozabilir. Bazı EBK'ler steroid ve tiroit hormonlarına müdahale ederken, diğerleri metabolizmayı bozar ve yağ hücrelerinin işlevlerini bozar. Bazı EBK'ler yağ hücresi işlevine müdahale ederek obeziteye yol açabilir ve bu nedenle obezojenler olarak da adlandırılırlar (26).

2.5. Endokrin Bozucu Kimyasalların Obezite ve Adipojen Üzerine Etkileri

Obezogenler olarak da bilinen obezogenik etkili EBK'ler, bazı hormonların etkisini bloke veya taklit edebilen, böylece adipogenez ve yağ dokusu gelişimini etkileyen ekzojen kimyasallardır (83).

Obezogenler moleküler etkilerini hipertrofi veya hiperplazi ile adipoz doku kütlelerinde bir artış, artan lipid üretimine yol açan adiposit fonksiyonunda bir bozulma, dislipidemi indüksiyonu, metabolik hormon profillerinde bozulma, preadiposit farklılaşmasında artış veya MSC'lerin adipojenik farklılaşmaya uğrama durumunda artış gibi farklı mekanizmalarla gösterebilirler (84). Doğum öncesi EBK'lere maruz kalmanın, gelişmekte olan embriyonun metabolizmasını epigenetik mekanizmalar yoluyla etkilediği ve sonraki nesillerde obeziteyi teşvik ettiği gösterilmiştir (10). Bu nedenle, annenin EBK'lere maruz kalmasının, gelişen embriyonun metabolizmasını epigenetik mekanizmalar yoluyla etkileyebileceği ve bunun sonucu olarak yaşamın ilerleyen dönemlerinde obeziteye yatkınlığa yol açabileceği düşünülmektedir (85, 86). Ayrıca, belirli EBK'lerin yağ dokusu gibi lipofilik dokularda biyolojik olarak biriktiği gösterilmiştir. İnsan adipoz dokusundaki bu tür EBK'ler nedeni ile glisemi, insülin duyarlılığı ve inflamasyon parametreleri arasındaki korelasyonlar, bunların adiposit hipertrofisine, bozulmuş glikoz metabolizmasına, sistemik inflamasyona ve yağ dağılımındaki değişkenliğe katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (10).

2.6. Obeziteye Neden Olan Endokrin Bozucuların Olası Etki Mekanizmaları

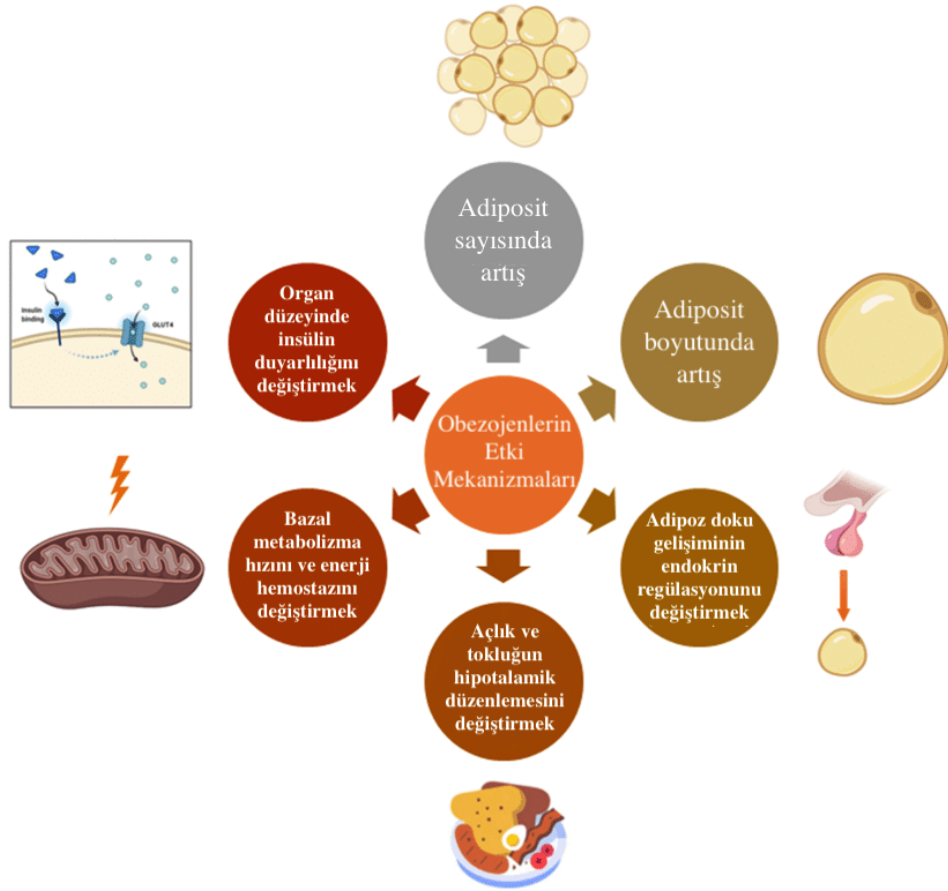
Obezogenler çeşitli mekanizmalar aracılığıyla obezitenin gelişimine katkıda bulunurlar. Doğal hormonların işlevini taklit edebilirler veya hücrel veya nükleer reseptörlere bağlanarak, sinyal yollarını, hücrel reaksiyonları ve gen ifadesini değiştirerek hormonal dengeye müdahale edebilirler. Bu etkiler, düşük moleküler ağırlığa, lipofilik yapılarına, uzun yarı ömürlerine ve doğal hormonlara benzer kimyasal yapılarına bağlıdır (87).

Sağlıklı WAT hücreleri, metabolik homeostazı korumada önemli bir rol oynayan leptin ve adiponektin gibi adipokinleri uygun miktarlarda salgırlar.

Obezogenler primer olarak leptin ve adiponektini etkiler. Obezogenlerin etkisi altında üretilen yağ hücrelerinin leptin ve adiponektin üzerinde bir etkiye sahip olduğu ve böylece tokluk ve açlığın hormonal kontrolünü etkilediği bulunmuştur. Leptin ve adiponektin dışında birçok farklı hormonun düzeyi de obezogenlerden etkilenir. Bunlara, üreme işlevlerinin ötesinde enerji metabolizmasının homeostazında ve yağ dokusu işlevinde önemli bir rol oynayan androjenler ve östrojenler dahildir. Seks steroidlerinin, özellikle östrojenlerin, metabolizma ve enerji dengesi üzerindeki kesin etki mekanizmaları karmaşıktır. Belirli obezogenler, hücrel aktivitelere ve ardından gelen endokrin sistemini bozmak için östrojen ve androjen reseptörlerine bağlanma yeteneğine sahiptir (87).

Obezogenlerin vücut ağırlığını artırarak, yağ hücrelerinin hipertrofinde ve/veya hiperplazisine neden olarak, yağ oluşumunu uyararak, lipit ve glikoz metabolizmasını bozarak, açlık ve tokluğun nöroendokrin düzenlenmesine müdahale ederek, enerji harcamasını ve/veya BAT termojenezini inhibe ederek, inflamasyonu artırarak ve bağırsak mikrobiyotasının taksonomik ve metabolik profillerini değiştirerek obeziteyi tetikleyebileceği bildirilmiştir (9). Ayrıca, obezogenler sadece yağ dokusunun çoğalması yoluyla değil, aynı zamanda 'sağlıksız' yağ hücrelerinin oluşumu, hormon müdahalesi ve artan inflamatuvar yanıtlar yoluyla da obeziteye katkıda bulunurlar. Sağlıklı WAT hücreleri, metabolik homeostazi korumada önemli bir rol oynayan leptin ve adiponektin gibi adipokinleri uygun miktarlarda salgırlar. Obezogenlerin etkisi altında üretilen yağ hücrelerinin bu hormonlar üzerinde bir etkiye sahip olduğu ve böylece tokluk ve açlığın hormonal kontrolünü etkilediği bulunmuştur. Tributiltin (TBT)'nin leptin seviyelerini artırdığı ve adiponektin seviyelerini azalttığı; en yaygın ftalat türü olan di-2-etilhekzil ftalat (DEHP)'in ise farelerde hem adiponektin hem de leptin seviyelerini azalttığı bulunmuştur. Benzer şekilde, yaşamın erken dönemlerinde 3T3-L1 yağ hücrelerinin BPA'ya maruz kalmasının leptin seviyelerini artırdığı ve beslenme davranışı ve enerji homeostazında rol oynayan hipotalamik devreyi bozduğu bulunmuştur (77, 88).

Obezogenlerin etki mekanizmaları Şekil 2.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Obezogenlerin etki mekanizmaları.

Obeziteye neden olan kimyasallara maruz kalmanın kritik dönemleri doğum öncesi, yenidoğan, ergenlik ve üreme dönemleridir (89). Obezogenik maddelere en duyarlı olanlar fetüsler ve yenidoğanlardır. Bir çalışma, yenidoğan döneminde dietilstilbesterol'e (DES) maruz kalmanın fareleri 4-6 aylıkken obez olmaya yatkın hale getirdiğini bulmuştur (7).

Yapılan araştırmalar, BPA'nın bir obezogen olduğunu önermektedir. BPA, PPAR γ ekspresyonunun indükler ve bunun sonucunda adipogenezde bir artışa yol açar (90).

2.7. Bisfenoller

Bisfenoller günümüzde en yaygın maruz kalınan kimyasal maddelerdendir. Temel olarak plastiği sertleştirmek için kullanılan bisfenollerin farklı kullanım alanları da mevcuttur. Günümüzde birçok bisfenol analoguna günlük hayatta temas söz konusu olup, sağlık üzerine etkilerinin incelendiği birçok *in vitro*, *in vivo* ve insan çalışmasının sonuçları, maddelerin temel olarak östrojenik veya anti-androjenik etkili olduğunu göstermiştir (91-93).

Bisfenoller, bir benzen çekirdeğine bağlı iki hidroksil grubu (-OH) ile karakterize edilen fenoller sınıfındaki organik kimyasal bileşiklerdir. Bu bileşikler polimerizasyon ve direnç özelliklerinden dolayı plastiklerde, reçinelerde ve kaplamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (94). Gıda ambalajlarında, şişe kapaklarında, su borularında ve metal kutulardaki epoksi kaplamalarda kullanılan reçinelerde ve plastiklerde yaygın olarak bulunan organik bileşiklerdir. Bisfenoller bu malzemelerden gıdalara geçerek insanların maruz kalmasına yol açabilir. Birçok bisfenol analogunun endokrin bozucu etkiler dahil farklı olumsuz sağlık etkilerine neden olduğu belirlenmiştir. Bisfenol türevleri birçok patolojik durumla ilişkilendirilmektedir. Bu durumlar arasında fertilité bozuklukları, tiroit bozuklukları, metabolik hastalıklar, pankreas sorunları, nörolojik bozukluklar, farklı kanserler, obezite ve metabolik sendrom yer almaktadır (95).

Gıdalarla bisfenol maruziyetinin yüksek olması dünya çapında gıda güvenliği konusunda endişeleri arttırmaktadır (96). Araştırmalar, gıdayla temas eden plastiklerde ve gıda saklama kapları, su şişeleri, biberonlar, bardaklar ve oyuncaklar gibi çocuklara yönelik ürünlerde bisfenollerin, özellikle de BPA'nın salındığını göstermektedir. BPA ve BPS'nin insan makrofaj hücre hattına uygulanması sonucu, bu bisfenol türevlerinin PPAR γ aktivatörleri olarak etki gösterdiği ve lipid metabolizması ile ilgili genlerin ekspresyonunu önemli ölçüde indüklediğini gösterilmiştir (97).

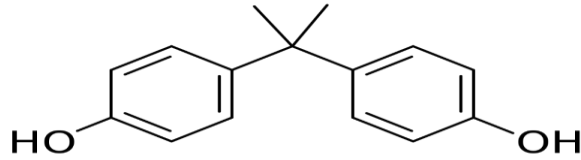
Yapılan bir diğer çalışmada, BPA ve BPS'nin 3T3-L1 hücrelerine uygulanması sonucunda BPS'nin bu hücrelerde lipid birikimini indüklediği belirlenmiştir ve anahtar adipojenik markörlerin mRNA ve protein ekspresyonunu arttırmıştır (98).

2.8. Bisfenol A

Bisfenol A (BPA), her yıl dünya çapında milyonlarca ton üretilen, en yüksek üretim hacmine sahip kimyasallardan biridir (99). BPA'ya yüksek oranda çevresel maruziyet söz konusudur ve tipik bir çevresel EBK olarak kabul edilmiştir (100). BPA'nın kimyasal yapısı Şekil 2.4'de gösterilmiştir.

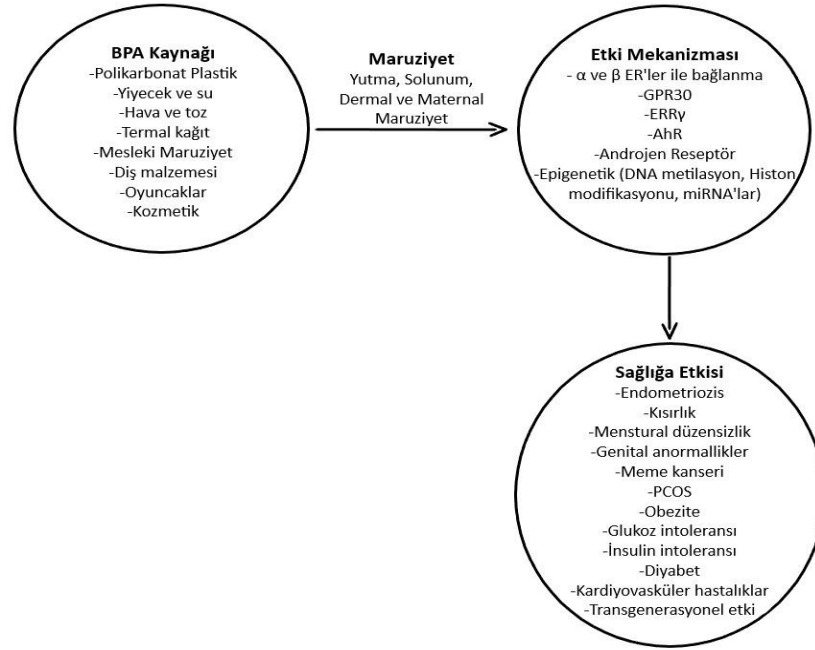
BPA sert plastiklerde, epoksi reçinelerde, tıbbi cihazlarda, diş dolgularında, bebek oyuncaklarında, mutfak eşyalarında, termal fiş kağıtlarında ve gıda ve içecek ambalaj kutularının/kaplarının iç kaplamalarında yaygın olarak bulunan bir kimyasaldır. BPA'ya maruz kalınması, endokrin sinyal yollarını bozar ve düşük dozlarda bile patolojilere yol açabilir (101).

BPA'ya en çok oral, inhalasyon ve dermal yollarla temas söz konusudur (102). En önemli maruziyet yolu kontamine gıdaların, konserve ürünlerin, önceden paketlenmiş gıdaların, paketlenmiş bebek mamalarının, bebek biberonlarının ve gıda saklamak için kullanılan kapların kullanımındadır (77). Şekil 2.4.'de BPA'nın kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı.

BPA kaynakları, maruziyet yolları, etki mekanizması ve maddenin sağlık üzerine olası etkileri ise Şekil 2.5.'de özetlenmiştir.



Şekil 2.5. BPA kaynakları, maruziyet yolları, etki mekanizması ve maddenin sağlık üzerine olası etkileri.

ABD Ulusal Toksikoloji Programı (NTP), BPA'nın fetüs, bebek ve çocuklarda beyin gelişimini, davranışı ve prostat gelişimini etkileyebileceğini bildirmiştir. Bu nedenle 2008 yılında Kanada, dünyada bebek maması kaplarında BPA'yı yasaklayan ilk ülke olmuştur. Daha sonra Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Avrupa Birliği ve Çin de BPA'nın biberonlar ve diğer çocuklara yönelik yiyecek kapları için yasaklanmasına yönelik yasa ve yönetmelikleri yürürlüğe koymuştur (96).

Birçok çalışmada BPA, amniyotik sıvı, plasenta dokusu, göbek kordonu kanı ve anne sütünde tespit edilmiştir. Çok sayıda çalışmaya göre, nüfusun %95'inin idrar, anne kanı, anne sütü, plasenta ve ter gibi farklı biyolojik sıvılarında saptanabilir BPA konsantrasyonları vardır.

Diğer taraftan, düşük lipofilisitesine ve hızlı bozunmasına (4-5 saatlik yarı ömre sahip) rağmen, yakın tarihli çalışmalar, BPA'nın yağ asitlerine olan yüksek afinitesi nedeniyle yağ dokusunda potansiyel bir biyoakümülyasyonu olduğunu ileri sürmektedir (103).

2.8.1. Bisfenol A'nın Biyotransformasyonu

Çeşitli çalışmalarda gösterildiği gibi, sıçanlarda BPA'nın biyoyararlanımı ve biyotransformasyonundaki önemli farklılıklar, uygulama yoluna bağlıdır. BPA'nın oral biyoyararlanımı düşüktür ve karaciğerde yoğun biyotransformasyon meydana gelir. Maruziyet sonrası BPA hızla metabolize olur. BPA, oral emilimi takiben insan karaciğerinde hızla ana olarak sitokrom P450 (CYP450) enzimlerinden CYP2C18 ve daha az olarak CYP2C19 ve CYP2C9 enzimleri ile metabolize edilir. Takiben, konjuge türlerin oluşumuyla sonuçlanan Faz II biyotransformasyonu gerçekleşir (104). Literatür verileri, BPA'nın çoğunun gastrointestinal sistem tarafından adsorbe edilebileceğini ve karaciğer ve böbrekte temel olarak uridin 5-difosfoglukuronosiltransferazlar (UGT'ler) gibi faz II enzimleri tarafından glukuronidasyon ve daha az da sülfatasyon yoluyla metabolize edilebileceğini; bunun da BPA-glukuronit (BPAG) ve daha az miktarda BPA-sülfat (BPAS) üretimiyle sonuçlandığını göstermektedir (105). İnsanlarda ve diğer birçok türde BPA'nın birincil detoksifikasyon yolu glukuronidasyon olduğundan ve yaşamın erken dönemlerinde UGT ekspresyonu ve miktarları az olduğundan, BPA'ya erken dönemde maruz kalmanın yetişkinliğe göre daha ciddi sonuçlara yol açması mümkündür (106). Ortalama altı saatlik bir yarılanma ömrü vardır ve yaklaşık 42 saatte tamamına yakını idrarla atıldığı gösterilmiştir. BPA'nın toplam (serbest artı konjuge) idrar konsantrasyonu, BPA'ya maruz kalmanın geçerli bir biyobelirteçidir (107).

Otuz gönüllü üzerinde yapılan bir çalışmada, idrarda saptanan ana metabolit BPAG olmuştur (uygulanan dozun %69,5'i); ardından BPA sülfat (%21,0) ve konjuge olmayan BPA (%9,5) gelmektedir (92, 108-110). İnsan ve sıçan karaciğer mikrozomları kullanılarak yapılan çalışmalarda, BPA uygulaması sonrasında 3-hidroksil metaboliti (BPA katekol) oluştuğu görülmüş ve bu bileşiğin östrojenik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Glukuronit metabolitinin östrojenik aktiviteye sahip olmadığı gösterilmiştir (111). BPA metabolitleri sadece idrarda ve kanda değil, aynı zamanda plasental dokularda ve amniyotik sıvıda da bulunur; bu da annenin maruziyeti nedeniyle yavrular üzerinde potansiyel artan etkileri olabileceği anlamına gelir (112).

2.8.2. Bisfenol A kullanım alanları ve maruziyet yolları

Bisfenol A, polikarbonat plastik ve epoksi reçine sentezinde, gıda ambalaj malzemeleri, biberonlar ve tıbbi ekipmanlarda yaygın olarak kullanılan EBK'lerden biridir; bu nedenle insanlar günlük yaşamda kaçınılmaz olarak BPA'ya maruz kalmaktadır (113).

Tüketicilerin gıda ve içme suyu yoluyla BPA'ya maruz kalmasına yol açan ambalaj, şişe ve teneke kaplamalar gibi gıda ile temas eden malzemelerde de kullanılmaktadır. İnsanlar, oral maruziyetin (diyetle alım-gıda maddesi içeren kutulardan veya plastik kapların migrasyon, bebek maması kaplarından migrasyon ile) yanı sıra inhalasyon ve dermal yollarla da BPA'ya maruz kalmaktadır. Genel popülasyonda BPA maruziyetinin ana kaynağı konserve gıdaların tüketilmesidir. (114, 115). BPA, sentetik polimerlerden yapılmış eşyalardan geçtiği için tozda da bulunur (93) Termal yazar kaşa fişleri gibi kağıtlarla da dermal temas söz konusu olabilir (92). Ocak 2011'de Avrupa Komisyonu, BPA'nın plastik biberonlarda kullanımını da kısıtlamış ve Temmuz 2012'de Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), BPA'nın biberonlarda ve çocuk ürünlerinde kullanımını resmi olarak yasaklamıştır (116).

2.8.3. Bisfenol A'nın Toksisitesi

BPA hem östrojenik hem de anti-androjenik özelliklere sahip, iyi bilinen bir endokrin bozucudur. BPA'nın estrogen reseptörlerine (ER'ler) bağlanma ve ER'lerle ilgili yolları aktive etme özellikleri olduğu bildirilmiştir (117). İnsan sağlığı üzerindeki etkileri arasında üreme sistemi bozuklukları, nörolojik gelişimdeki değişiklikler, diyabet ve kanser gibi bazı kronik hastalıkların riskinde artış ve hatta obezite ve metabolizma üzerindeki etkiler yer almaktadır (94).

Fenolik yapısı nedeniyle BPA'nın östrojen reseptörleri ile etkileşime girdiği ve östrojen reseptörüne (ER) bağımlı sinyal yolları aracılığıyla agonist veya antagonist olarak hareket ettiği gösterilmiştir (118, 119). BPA ve analogları, iyi bilinen östrojenik ve anti-androjenik aktivitelere sahip çevresel kirleticilerdir (92). BPA, birkaç genomik olmayan sinyal yolu aracılığıyla hipofiz hücrelerinde endojen östrojenlerin etkilerine potansiyel olarak müdahale edebileceğinden, bir EBK olarak son on yılda büyük ilgi görmüştür (120).

BPA'nın östrojenik etkilerine bağlı üreme toksisitesine sahip olduğu ve östrus döngüsünü bozduğu, seks hormonu düzeylerini etkilediği ve folikül büyümesini ve gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (113). BPA'ya kısa süreli maruz kalmanın, yetişkin sıçanların prostat ve prefrontal korteksindeki aromataz ve 5 α -redüktaz (5 α -R) enzimlerinin ekspresyonunu değiştirdiğini kanıtlayan çalışmalar mevcuttur. Castro ve ark., (2018)'nin gerçekleştirdiği araştırmanın sonucu fetal ve neonatal prostat gelişimi sırasında düşük doz BPA'nın, aromataz ve 5 α -R enzimleri aracılığıyla genç sıçanların prostat bezinde *in situ* östrojen ve androjen üretimine müdahale ettiğini desteklemektedir (121). Karaciğer detoksifikasyon enzimleri henüz tam olarak gelişmediği için özellikle fetal dönemde ve yenidoğanlarda BPA'nın toksik etkilerinin daha ağır olarak görülebileceği düşünülmektedir (122). BPA'ya kronik maruz kalma, endokrin sistemin homeostazını bozarak infertilite, obezite ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere endokrin ve metabolik hastalık riskini artırabilir. BPA'nın kadın ve erkeklerde infertilite, puberte prekoks, meme ve prostat kanseri gibi hormona bağlı tümörler ve polikistik over sendromu (PCOS) dahil olmak üzere birçok endokrin bozukluğun patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (118, 119).

Metabolomik çalışmalar, BPA maruziyetinin pürin metabolizması ve pirimidin metabolizması gibi spesifik biyokimyasal yolları bozduğunu ileri sürmektedir (123). BPA, bir ksenoöstrojen olarak davranabilir ve insan üreme sistemi bozuklukları üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. BPA'nın, farklı hücre içi sinyal yollarını aktive ederek prostat ve yumurtalık kanseri hücre hatlarında hücre apoptozunu indüklediği bildirilmiştir (124, 125). BPA'nın seks hormonları, leptin, insülin ve tiroksin gibi çeşitli hormonların işlevini bozduğu ve hepatotoksik, immünotoksik, mutajenik ve kanserojenik etkilere neden olduğu ifade edilmiştir (93).

Östrojenik etkilerin yanı sıra, DNA'nın genotoksik etkilerinin de olabileceği belirtilmiştir. Izzotti ve ark. (2009)'nin yaptığı çalışmanın sonuçları BPA'nın kemirici karaciğerinde hem *in vitro* hem de *in vivo* DNA katım ürünü oluşturma yeteneğini doğrulamaktadır. Ayrıca, farelere oral BPA uygulamasının meme epitel hücrelerinde de DNA hasarı oluşumuna neden olduğuna dair kanıtlar vardır. BPA, östrojen ve androjen reseptörlerinin yanı sıra endokrin sistem hormonları ve vücudun diğer sistemleri ile ilişkili aril hidrokarbon reseptörü ve peroksizom proliferatörü aktive reseptörler (PPAR'ler) dahil olmak üzere, çeşitli reseptörlere bağlanabilir (93). Diğer

tarafından, bisfenollere maruz kalmanın epigenetik etkileri de son yıllarda araştırmacılar arasında endişe yaratmıştır. BPA epigenetik toksisitesini DNA metilasyonu, histon proteinleri ve kodlamayan RNA (ncRNA) ekspresyonlarını etkileyerek gösterebilir. Epigenetik modeller üremede çok önemli bir rol oynar. Zira bunlar yalnızca germ hücresi kaderi spesifikasyonunu düzenlemekle kalmaz; aynı zamanda embriyo gelişimi için bir şablon görevi de görür (100).

BPA'nın endokrin bozucu etkisinin yanı sıra nörolojik bozukluklara da yol açabileceği ifade edilmiştir. Çeşitli çalışmalar, gebelikte BPA'ya maruz kalmanın anksiyete, depresyon, saldırganlık ve hiperaktiviteye neden olabileceğine işaret etmiştir (126).

2.8.4. Bisfenol A'nın Obezite ile İlişkisi

In vitro çalışmalar, BPA'nın adiposit hücre farklılaşmasını arttırdığını ve aşırı yağ birikmesine yol açtığını göstermiştir. Aynı zamanda, kemirgen çalışmaları BPA'ya maruz kalmanın yağ dokusu kütlesini artırdığını ve kilo alımını teşvik ettiğini doğrulamaktadır (127). Bazı *in vitro* çalışmalar ise, BPA'ya maruz kalmanın, preadipositlerin adipositlere dönüşümünü indükleyen ve intrasitosolik lipit birikimini artıran doğrudan adipogenik etkilere sahip olduğunu göstermiştir. BPA'nın adipogenik farklılaşmayı desteklediği kesin moleküler mekanizma hala bilinmemektedir. BPA'nın adipojenik etkilerinin ER α ve ER β aktivasyonuna bağlı olduğu öne sürülmüştür. Son çalışmalarda ise, BPA kaynaklı adipogenezin potansiyel etki mekanizmalarının, PPAR γ , C/EBP α ve C/EBP β 'nin doza bağlı indüksiyonunu içerdiği ileri sürülmüştür. Bu nedenle, BPA'ya doğrudan maruz kalmanın, adipoz doku fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunabilecek ve obezite riskini artıracak adipojenik, lipojenik ve inflamatuvar yolları etkilediği düşünülmektedir (128, 129).

Yağ dokusu gelişiminin kritik evreleri sırasında BPA'ya maruz kalmanın, inflamasyonun indüklenme olasılığını ve bunun sonucunda adipositin metabolik işlev bozukluğunu artırabildiği ve sonuç olarak obezite ile ilişkili hastalıkların gelişme riskini artırdığı bildirilmiştir (130).

Lakind ve ark. (2014)'nin idrar BPA konsantrasyonları ve çocukluk çağı obezitesi üzerine gerçekleştirdiği bir meta-analizin sonuçlarına göre, yüksek maruziyet

grubunun düşük maruziyet grubuna göre çocuklukta obezite riskinin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu gösterilmiştir (131).

Wu ve ark. (2020) tarafından gerçekleştirilen bir sistematik inceleme insanlarda BPA'ya maruz kalma düzeyi ile obezite riski arasında, en yüksek ve en düşük BPA maruziyeti düzeyi için 1,49'luk birleştirilmiş olasılık oranı (OR) (%95 GA: 1,38-1,61) ile pozitif bir korelasyon tespit etmiştir (127).

2.8.5. BPA'ya Prenatal Maruziyet ve Gelişimsel Toksikite

"Çevresel obezite hipotezi" ve BPA'nın adiposit farklılaşmasını kalıcı bir şekilde artırması dikkate alındığında, BPA'ya prenatal maruziyet ile adipogenez arasında bir ilişki olabileceği ifade edilebilir. Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, prenatal dönemde düşük dozlarda BPA maruziyetinin adipozite artışına neden olabileceğini göstermiştir (132). Hayvan deneylerinden elde edilen kanıtlar, doğum öncesi BPA'ya maruz kalmanın vücut ağırlığını ve genel olarak yağlanmayı artırdığını ve metabolik sendroma yol açtığını doğrulamıştır (90).

Hayvanlarda doğum öncesi BPA maruziyeti serum leptin seviyelerini artırır ve serum adiponektin seviyelerini azaltarak adiposit disfonksiyonuna katkıda bulunur. Bu sonuçlar lipid birikimini ve yağ kütlesindeki ve obezitedeki artışı açıklayabilir (133).

Kemirgenlerde gebelik ve emzirme sırasında annenin BPA maruziyetinin doğum sonrası kilo alımını ve yavrularda yağ dokusu kütlesini artırdığı gösterilmiştir. Bu etkilerin, özellikle öngörülen advers etki gözlenmeyen düzey (NOAEL)'in altındaki BPA dozlarında ortaya çıkması özellikle kritiktir. Ayrıca, gelişim sırasında BPA'ya maruz kalan dişi farelerde fiziksel aktivitede azalma ve karbonhidrat metabolizmasında artış rapor edilmiştir (134).

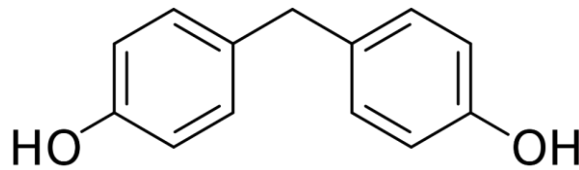
Sıçanlarda gebelik ve emzirme sırasında annenin düşük doz BPA'ya maruz kalmasının hem F1 hem de F2 yavrularında bozulmuş glikoz homeostazisine yol açtığı rapor edilmiştir. BPA'nın epigenetik değişikliklere yol açtığı, özellikle metabolik yolları düzenleyen genlerin DNA metilasyonunu etkilediği ve trans-jenerasyonel etkilere neden olduğu ifade edilmiştir (135).

Adipogenez dışında da BPA'nın farklı gelişimsel toksik etkileri olabilir. BPA plasentaya geçebildiği için bu bisfenol analoguna prenatal maruziyet, plasenta

gelişimini ve işlevini bozarak preeklampsi, fetal büyümenin kısıtlanması ve tekrarlayan düşüklere yol açabilir (136).

2.9. Bisfenol F

Kimyasal adı bis(4-hidroksifenil)metan olan BPF yapısal olarak metilen ile birbirine bağlanmış iki fenol halkasına sahiptir. BPF, düşük viskozitesi ve BPA'ya göre çözücülere karşı daha iyi direnci nedeniyle giderek daha fazla kullanılmaktadır ve üretimi birçok ülkede artmaktadır. Son zamanlarda BPA'nın yüksek sağlık riski göz önüne alındığında, Çin dahil birçok ülke BPA kullanımını kısıtlayacak düzenlemeler getirmiş olup bu da BPF gibi BPA'ya benzer kimyasal yapıya sahip alternatiflerin yaygın şekilde kullanılmasına yol açmıştır (113). BPF, epoksi reçinelerin ve polikarbonatların üretiminde kullanımıyla endüstriyel sektörde geniş bir uygulama yelpazesi bulmuştur ve endüstride BPA'nın yerini alabileceği ifade edilmektedir (120). BPF'nin kimyasal yapısı Şekil 2.6'de verilmiştir.



Şekil 2.6. Bisfenol F'nin Kimyasal Yapısı.

2.9.1. Bisfenol F'ye Maruziyet

Bisfenol F, özellikle daha fazla kalınlık ve dayanıklılık gerektiren sistemler için epoksi reçineler ve kaplamalar üretmek için kullanılır. Endüstriyel alanlardaki çeşitli kullanımları sonucunda BPF'nin çevredeki varlığı önemli ölçüde artmıştır (137).

BPF gıda ambalajlarında, boru kaplamalarında, diş dolgularında, endüstriyel zeminlerde, derz dolgularında, kaplamalarda, cilalarda, plastiklerde ve yapıştırıcılarda kullanılan bir kimyasal maddedir ve özellikle kişisel bakım ürünlerinde yaygın bulunmaktadır (138).

İçeceklerde ve enerji içeceklerinde, konserve yiyeceklerde, gıda teması olan geri dönüşüm kağıtlarında, evsel atık olan kağıt ve kağıt ürünlerinde, ticari sütte BPF kalıntılarına rastlanmıştır. Ayrıca, BPF nehir suyu, içme suyu, yüzey ve yeraltı suları, toprak ve gübre gibi çeşitli çevresel matrislerde de bulunmuştur (139).

2.9.2. Bisfenol F'in Biyotransformasyonu

Bisfenol F, BPA gibi oral yoldan absorpsiyon sonrasında plasenta dahil birçok bariyerini geçerek üreme organları ve fetüs dahil olmak üzere tüm organizmaya dağılır. BPF üzerinde yapılan bir metabolik profillemeye çalışması, BPF'nin esas olarak idrarla atıldığını ancak dozun %7-9'unun sıçanlara tek oral dozun uygulanmasından 96 saat sonra dokularda mevcut olduğunu bulmuştur. İdrarda bulunan ana metabolit, sülfat konjugatıdır (140).

Hidroksilasyon *di-*, *orto* ve *meta-* hidroksile BPF metabolitlerinin oluşumuyla ana metabolik yoldur. Ancak, BPF-dimerleri oluşumu da belgelenmiştir. *İn vitro* biyotransformasyonun incelenmesi sonucunda, insan ve sıçan karaciğer alt hücre fraksiyonlarıyla BPF-glukuronit ve BPF-sülfat oluşumu gözlemlenmiştir ve böylece daha hidrofilik hale gelerek atıldığı belirlenmiştir (141).

2.9.3. Bisfenol F'in Toksisitesi

Bisfenol A'nın analogları olan ve alternatifleri olarak kullanılan BPS ve BPF, son yıllarda ABD'de yetişkinlerin idrarında giderek artan oranda tespit edilmektedir ve bu bisfenol analoglarının adipojenik etkiler ve obezite ile ilişkili hastalıklarla (örn., tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalık, vb.) ilişkisi olduğu bildirilmiştir (83).

Memeliler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda BPF'nin BPA ile benzer endokrin bozucu etkilere sahip olduğu bulunmuştur. BPF'nin, β -estradiol ve estronun sentezini uyararak, insan over adenokarsinomu hücre hattında ER ve androjen reseptörleri üzerinde BPA'ya benzer etkiler gösterdiği bulunmuştur (142).

Mu ve ark. (2022), zebra balıkları ile yaptıkları araştırmanın sonucunda uzun süreli BPF maruziyetinin fertilitenin azalmasına, gonadal morfolojinin bozulmasına ve anormal F1 embriyonik gelişimine yol açtığını rapor etmiştir (137). Başka bir çalışmada ise, zebra balığı larvalarında BPF'nin kalp ödemi, kraniyofasiyal anormallik, omurga malformasyonu, yumurta deformitesi ve pigmentasyonda azalma gibi çeşitli morfolojik kusurlara neden olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda, BPF'nin hiperglisemiye yol açan insülin sinyal iletimini bozarak glikoz metabolizmasını da bozduğu saptanmıştır (143). Yang ve ark. (2018)'nin yaptığı çalışmada zebra balığının erken yaşam evrelerinde BPF'ye maruz kalması, cinsel farklılaşma üzerinde olumsuz etkilere neden olmuştur. Ayrıca, yumurta sayısında ve kuluçkada azalmaya neden

olarak zebra balığındaki üreme fonksiyonunu bozmuştur (144). Başka bir çalışmada ise, zebra balıklarında uzun süreli BPF maruziyetinin fertilitenin azalmasına, gonadal morfolojinin bozulmasına ve anormal F1 embriyonik gelişimine yol açtığı bildirilmiştir. İlgili çalışmada BPF'nin fertilitayı azaltıcı etkisini destekleyen *in vivo* kanıt sağlanmış ve parental BPF maruziyetinin F1 yavrularında gelişimsel anormalliklere neden olduğu tespit edilmiştir (145).

Yapılan bir çalışmada bir BPA, BPF ve bisfenol S (BPS) karışımının, tek başına BPA, BPF veya BPS'den daha düşük konsantrasyonlarda endokrin bozucu aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir. BPF ve BPS'nin, BPA'dan daha yüksek konsantrasyonlarda BPA ile benzer östrojenik ve anti-androjenik etkilere sahip olduğunu da gösterilmiştir (91).

2.10. Doğal Kaynaklı Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler

Doğal olarak bulunan birçok bitkisel maddenin endokrin bozucu etkilerinin olabileceğinden şüphelenilmektedir. Bunların arasında en iyi bilinenleri soya fasulyesinde bulunan “fitoöstrojen” olarak adlandırılan izoflavonlardır. Soyadaki baskın izoflavon genistein olup, kalan izoflavonlardan en önemlileri daidzein ve glisitindir. Soya içinde, izoflavonlar neredeyse tamamen şekerlere bağlanır ve ilgili genistin, daidzin ve glisit bileşiklerini üretir. Soya izoflavonları sayısız sağlık etkisi ile ilişkilendirilmiştir. Ancak ilişkilerin gücü ve etkilerin yararı ve zararı önemli tartışma konusudur (146). Diğer taraftan, resveratrol gibi polifenollerin, rosmarinik asit gibi kafeik asit türevlerinin ve EGCG gibi kateşin türevlerinin olası östrojenik aktiviteleriyle ilgili de bazı çalışmalar yürütülmektedir. Ancak, RV, RA ve EGCG gibi maddelerin östrojenik aktivitelerinin bisfenoller kadar yüksek olmadığı; bu tip doğal bileşiklerin aslında çok daha hızlı metabolize edilerek atılabildikleri bilinmektedir (41, 147, 148). Bu maddelerin yağ hücreleri üzerindeki etkileri tam olarak araştırılmamış olsa da bu konuda en fazla sayıda çalışma EGCG üzerinedir.

2.11. Doğal Kaynaklı Endokrin Bozucu Kimyasallar ve Adipojeniz

İnsanlar ve hayvanlar evrim yoluyla fitoöstrojenlere adapte olmuş olsalar da bu bileşiklerin bazılarının yüksek konsantrasyonlarına maruz kalmak, hücresel düzeyde

hormon üretimi, metabolizması ve bunların yanı sıra protein sentezi, malign hücre proliferasyonu veya anjiyogenezdeki değişikliklerle ilişkilendirilmektedir (149).

Yeşil çay (*Camellia sinensis L.*) tüm dünyada yaygın olarak tüketilmekte ve çay yapraklarının yüksek antioksidan ve kilo verme aktivitesine sahip olduğu bildirilmektedir. EGCG ve kateşin, yeşil çayın içeriğinde bulunan başlıca biyoaktif polifenolik bileşenleridir (28).

Bose ve ark. (2008) 16 hafta boyunca yüksek yağlı bir diyetle beslenen farelerin diyetine 3.2 g/kg EGCG (bu çalışmada farelerde kullanılan 3.2 g EGCG/kg diyet dozu, günde 10 tane 200 mL lik fincanlarda yeşil çaya (fincan başına 2 g çay yaprağı içerir) karşılık gelmektedir) takviyesinin, tedavi edilmemiş farelere göre vücut ağırlığı artışını, vücut yağ yüzdesini ve iç organ yağ ağırlığını azalttığını göstermiştir. Sonuçlar ayrıca EGCG tedavisinin obezite gelişimini, metabolik sendromla ilişkili semptomları ve hepatik steatozu azalttığını göstermektedir. 16 haftalık EGCG tedavisinin toplam vücut yağ yüzdesini ve visseral vücut yağ ağırlığını da önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (150).

Suzuki ve ark., tarafından yapılan çalışmada, yeşil çay ve gallokateşinlerin (GTC)C/EBP α , PPAR γ ve karaciğer X reseptörü (LXR) dahil olmak üzere adipogenezde yer alan genlerin ve proteinlerin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (151).

3T3-L1 hücrelerinde piperin (PIP) ve EGCG'nin anti-adipojenik aktivitesini değerlendirmeyi amaçlayan çalışmanın sonuçları, PIP + EGCG (her biri 20 μ M) kombinasyonu uygulanan 3T3-L1 adipositlerinde leptin düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını ve adiponektin düzeylerinde artışı göstermektedir (28).

Soyada bulunan fitoöstrojenler olan genistein hakkındaki çalışmalar, insanlardaki serum genistein konsantrasyonları düzeylerinde farelere verilen genisteinin, ovariektomize farelerde anti-lipojenik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Genisteinin adipoz doku üzerindeki etkilerinin, en azından kısmen lipoprotein lipaz enziminin inhibisyonundan kaynaklandığı ifade edilmiştir. 3T3-L1 ve diğer hücre hatları ile yapılan kapsamlı çalışmalar, genisteinin *in vitro* adipojenik farklılaşmayı engelleyebileceğini göstermiştir (152).

Dang ve ark., (2003)'ün yaptığı bir *in vitro* çalışmada, yüksek konsantrasyonlarda genisteinin, PPAR γ agonisti olarak hareket ettiğini ve adipogenez

stimüle ederek adipojenik farklılaşmayı ve hücre sayısını uyarabildiğini ileri sürmüştür. İlgili çalışmanın sonuçlarına göre, genistein düşük konsantrasyonlarda ($\leq 1 \mu\text{M}$), östrojen gibi etki ederek osteogenezi uyararak adipogenezi inhibe ederken, yüksek konsantrasyonlarda ($>1 \mu\text{M}$), adipogenezin upregülasyonuna ve osteogenezin down-regülasyona yol açan bir PPAR γ ligandı gibi davrandığı ifade edilmiştir (153).

Kurkumin ve resveratrol gibi polifenollerin lipit ve enerji metabolizması ve potansiyel vücut ağırlığı değişimi üzerinde yararlı etkiler sergilediği bildirilmiştir (71).

Rivera ve ark., (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmanın sonuçları, yüksek dozda kuersetin uygulamasının, obez Zucker sıçanlarında adipoz doku tümör nekroz faktörü α (TNF- α) üretimini ve plazma nitrat + nitrit konsantrasyonunu azaltırken, plazma adiponektin konsantrasyonunu artırarak önemli bir anti-inflamatuar etki sağladığını göstermektedir (154).

Ahn ve ark., (2008) tarafından kuersetinin 3T3-L1 hücrelerinde adipogenezi ve apoptozu etkilediği moleküler mekanizmaların araştırıldığı bir çalışmanın sonuçlarına göre, 3T3-L1 preadipositlerinin kuersetin maruziyetinin, adipogenezin ve adipogenez ile ilişkili faktörlerin ve enzimlerin ekspresyonunun azalmasını sağladığı belirlenmiştir. Kuersetinin, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyon düzeylerini azaltarak preadipositlerin adipositlere farklılaşmasını baskıladığını gösterilmiştir (155).

Lee ve ark., (2016) gerçekleştirdiği 12 haftalık, 36 denek içeren, randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada kuersetinin (100 mg/gün/kişi) toplam vücut yağını ve özellikle koldaki yağ yüzdesini önemli ölçüde azalttığını ve fazla kilolu veya obez deneklerin VKİ'sini azalttığını göstermiştir (156).

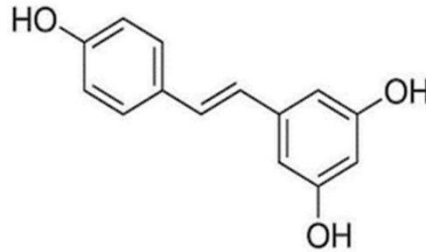
Kim ve ark., (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmanın sonucuna göre, primer insan adipositlerinde ve fare 3T3-L1 adipositlerinde, kurkumin uygulanması PPAR γ ve C/EBP α ekspresyonlarını baskılamıştır. Anti-adipojenik etkilere ek olarak, kurkuminin preadipositlerin olgun adipositlere farklılaşmasını da baskıladığı da ifade edilmiştir. Kurkuminin 3T3-L1 preadipositlerinin farklılaşmasını doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği ve adiposit farklılaşmasının erken aşamasında C/EBP α ve PPAR γ mRNA'ların ekspresyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir. Kurkumin tarafından adiposit farklılaşmasının tam olarak inhibisyonunun *in vitro* 30 μM 'ye kadar konsantrasyonlar gerektirdiği ifade edilmiştir (157).

Obez bireylerde adiponektin düzeyleri düşük bulunsa da adipojenik farklılaşma sırasında adiponektin düzeyleri yükselir ve bu durum olgun adipositte uygun insülin duyarlılığının uyarılmasını sağlar. Vasileva ve ark., (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, insan adipositlerine RA uygulanmasının lipit birikimini baskıladığı, lipolizi artırdığı ve temel adipojenik faktörleri down-regüle ettiği ifade edilmiştir. İlgili çalışmada, RA'nın adipositlerde adiponektin protein ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur. RA tarafından adipojenik farklılaşmanın moleküler düzenlenmesi için en olası doğrudan hedef olarak C/EBP α olarak belirtilmiştir (24).

2.12. Resveratrol

Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben), üzüm, kıvılcık ve yer fıstığı gibi birbiriyle bağımsız çok sayıda bitki türünde ve ayrıca birçok bitkisel ilaçta bulunan doğal olarak oluşan bir polifenoldür (158). Resveratrolün kimyasal yapısı Şekil 2.7.'de gösterilmiştir.

Resveratrol, cis - ve trans - izomerleri olarak bulunan bir stilbendir. Trans izomerin, cis izomerden daha fazla antikarsinojen ve kardiyoprotektif özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (159).



Şekil 2.7. Resveratrolün Kimyasal Yapısı.

Deneyisel hayvan modellerinde resveratrolün hipertansiyon, kalp yetmezliği, iskemi ve kalp hastalığı insidansını azalttığı ve kemirgenlerde insülin duyarlılığını iyileştirdiği; kan glikoz düzeylerini düşürdüğü ve yüksek yağlı diyetle bağlı gelişen obeziteyi azalttığını gösteren yeterli kanıtlar vardır. Resveratrol, deneyisel hayvan modellerinde nöroprotektif etkiler de göstermiştir (160).

Epidemiyolojik kanıtlar, fitoöstrojenlerin kanser başlangıcı ve büyümesinin inhibisyonu, serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi ve osteoporoz tedavisine olan

faidaları dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. RV'nin, ER'lere bağlanma ve aktive etme özelliği olan bir fitoöstrojen olduğu iddia edilmiştir (159). Diğer taraftan, aralarında resveratrolün de bulunduğu birçok doğal ve sentetik bileşiğin aromataz aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, test edilen bileşiklerden RV ve ketokonazolün aromatazın aktif bölgesine yerleşebileceğini ve potansiyel olarak aromataz aktivitesini inhibe edebileceği gösterilmiştir (41).

RV'nin estrojenik aktivitesini incelemek için gerçekleştirilen bir çalışmada, *in vitro* ve *in vivo* meme modelleri kullanılmış; çalışmanın sonucunda, resveratrolün meme dokularında karışık östrojenik/antiöstrojenik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca RV, dişi Sprague Dawley sıçanlarına uygulandığında N-metil-N-nitrozüre ile indüklenen meme karsinogenezinin erken aşamalarını inhibe etmiştir (161).

Furimsky ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmanın sonucunda farmakolojik dozlarda RV'nin, östrojenlerin metabolizmalarını inhibe ettiği ve homeostazlarını değiştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, sülfatasyon yoluyla metabolize olan östrojenik veya steroidil ilaçlar ile RV arasında potansiyel bir etkileşim olduğu ileri sürülmüştür. Dişi CD-1 farelerde resveratrole prepubertal maruziyetin meme ve üreme sisteminin gelişimi ve işlevi üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmaların sonuçları, ergenlik öncesi resveratrolün farmakolojik dozlarının, kısmen agonistik, antagonistik veya her iki etkinin bir karışımı olabilen östrojenik bir etki mekanizması yoluyla endokrin sistemin homeostazını bozduğunu göstermektedir (161, 162).

RV ve çeşitli sentetik asetoksi ve metoksi türevleri, sıçan Leydig hücrelerinde Cyp17a1 ekspresyonunu azaltmıştır. Bu genetik etki, hücrelerde insan koryonik gonadotropin (hCG) kaynaklı steroidogenez baskılayarak progesteron birikimine ve androstenedion üretiminin azalmasına neden olmuştur (163).

Obezite ve adipogenezde RV'nin etkilerini inceleyen *in vitro* bir çalışmada, 3T3-L1 hücrelerinde resveratrolün PPAR γ ve C/EBP α gibi adipogenezde yer alan anahtar transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu azaltarak adiposit farklılaşmasını ve lipit birikimini azalttığı belirtilmiştir (164). Ayrıca, WAT'daki sirtülin 1 proteini (SIRT1), için RV tarafından aktive edildiği ifade edilmiştir (164, 165). Diğer taraftan, RV'nin BAT aktivitesini de düzenleme olasılığı gösterilmiştir. Alberdi ve ark. (2013), RV takviyeli bir diyetle beslenen farelerin BAT ve iskelet kaslarında termojenin

(UCP1)'in ekspresyonunun arttığını bulmuşlardır (166). Ayrıca, farelere oral RV uygulanması da WAT'daki SIRT1 ekspresyonunu arttırmıştır (167). Araştırmacılar, artmış UCP1 ekspresyonunun, iyileştirilmiş enerji verimliliğine ve azalmış yağ kütlesine katkıda bulunan SIRT1'in uyarılmasından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir (25).

Yapılan bazı çalışmaların sonuçları RV'nin yağ dokusu üzerindeki etkisinin, adenosin monofosfat ile aktifleştirilen protein kinaz (AMPK) yolağını aktive etmesinden kaynaklanabileceğine işaret etmektedir (168). Bu yolak, beyaz yağ hücrelerindeki UCP-1 mRNA'sını ve proteini artırır ve yağ dokusunda spesifik esmerleşme belirteçlerinin ekspresyonunu güçlendirir (169).

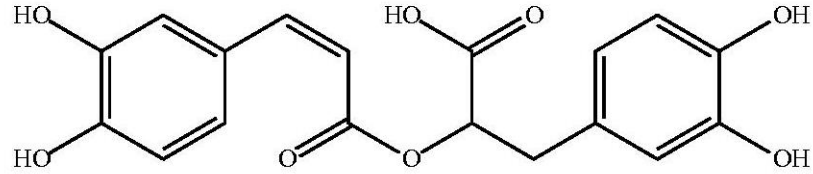
Sıçanlarda yapılan bir çalışmada resveratrolün 6 hafta boyunca günde 30 mg/kg uygulanması, sıçanlarda termojenezi indüklemiş ve vücut yağ birikimini azaltmıştır. Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM), siklooksijenaz 2 (COX2), SIRT1, PPAR β , PPAR γ , peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama koaktivatörü 1 (PGC1 α) ve UCP-1 gibi genlerin ifadesinin artması ve BAT'ta PGC1 α 'nın deasetilasyonu ile ilişkilidir (166). Ayrıca, resveratrolün farelere uygulanması (2 ayda 4 g/kg yemle beraber), AMPK α aktivasyonu ile WAT'ın esmerleşmesini ve SIRT1 aracılığıyla BAT'ta termojenezi indükleyebilmektedir (170).

Yapılan bir çalışmada, resveratrolün insan visceral preadiposit (HPA-v) proliferasyon ve farklılaşmasını *in vitro* olarak engellediği belirlenmiştir ve 10, 20 ve 50 μ M konsantrasyonlarda C/EBP β , FABP4, asetil-CoA karboksilaz (ACC) ve yağ asidi sentazın (FAS) mRNA ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. LIM domain only 3 (LMO3)'ün mRNA ve protein seviyeleri, ≥ 20 μ M RV ile önemli ölçüde azalmış ve LMO3'ün aşırı ekspresyonu, PPAR γ transkripsiyonel aktivitesini artırarak, resveratrol kaynaklı HPA-v farklılaşmasındaki azalmayı kısmen düşürmüştür (171).

2.13. Rosmarinik Asit

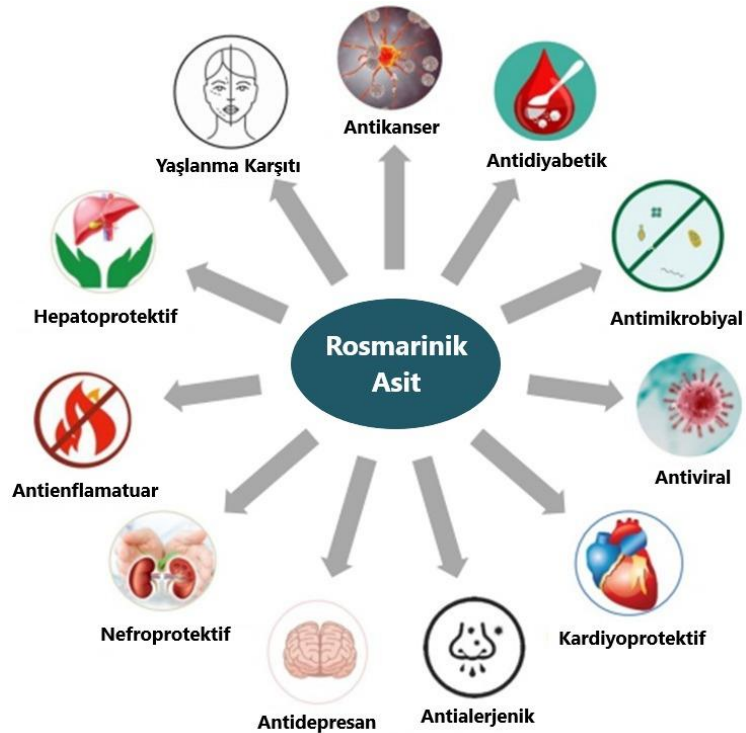
Rosmarinik asit, kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenil laktik asidin bir esteridir. RA yaygın olarak *Boraginaceae* türlerinde ve *Lamiaceae*'nin *Nepetoideae* alt familyasında bulunur ve ilk olarak biberiye (*Rosmarinus officinalis*)'den saf bir bileşik olarak izole edilmiştir. RA, biberiye dışında, nane (*Mentha* spp.) ve melisa (*Melissa officinalis* L.)

gibi *Lamiaceae* familyasının birçok tıbbi bitkisinde ve ayrıca geleneksel Çin tıbbında kullanılan bitkilerde yoğun miktarda bulunur (172, 173). Kimyasal yapısı Şekil 2.8.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Rosmarinik Asitin Kimyasal Yapısı.

Rosmarinik asit antiviral, antibakteriyel, antikanser, antioksidan, yaşlanma karşıtı, antidiyabetik, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, nefroprotektif, antidepresan, antialerjik ve antiinflamatuvar aktiviteler dahil olmak üzere dikkate değer biyolojik etkilere sahiptir (148). RA'nın olası biyolojik etkileri Şekil 2.9.'da özetlenmiştir.



Şekil 2.9. Rosmarinik Asitin Olası Biyolojik Etkileri.

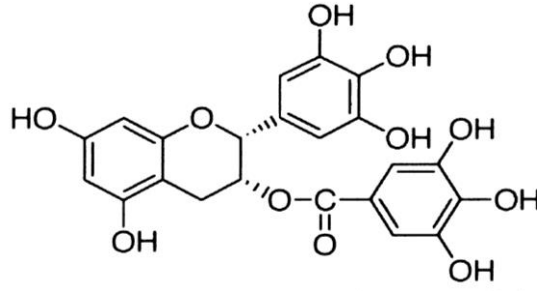
Sıçanlara oral yoldan verildiğinde RA'nın gastrointestinal kanalda kolayca absorbe olduğu, pasif difüzyonla bağırsak epitelini geçtiği ve uygulamadan yarım saat sonra doruk plazma konsantrasyonuna ulaştığını gösterilmiştir. Faz II biyotransformasyon sonucu RA'nın glukuronidasyonu, sülfatasyonu ve metilasyonu gerçekleşir ve bu metabolitler daha sonra idrarla atılmaktadır (147, 174). Sıçanlarda yapılan deneyler, topikal olarak uygulanan RA'nın deriden absorbe olduğunu ve deri, kan, kemik ve kasta dağıldığını; intravenöz olarak uygulanan RA'nın ise akciğer, dalak, kalp ve karaciğer gibi çeşitli dokulara dağıldığını göstermiştir (175).

RA, sıçanlarda kısmen kumarik asit ve kafeik aside metabolize edilir. Kafeik asit ve sinapik asitin, östrojen eksikliği olan sıçanlarda serum estradiol konsantrasyonlarını arttırdığı belirlenmiştir. Sıçanlarda ovülasyonda, yağ dokusu, deri, kemikler ve beyin gibi yumurtalık dışı dokular estradiol kaynağıdır. Bu kısımlarda C19 sentezlenmemektedir. C19 steroidler (androjenler), aromataz ile östrojenlere dönüştürülebilir. Bu nedenle, RA veya metabolitlerinin aromataz aktivitesini arttırması mümkün görünmektedir. Kafeik asit, sadece soya içeren standart gıda ile beslenen sıçanlarda estradiolü arttırmış ve toplam kolesterol konsantrasyonlarını azaltmıştır (147, 148).

2.14. Epigallokateşin gallat

İnsan vücudunda, kateşinler metal iyonlarını, özellikle demir iyonunu şelatlayarak serbest radikallerin miktarını azaltma yeteneğine sahiptir. EGCG güçlü bir antioksidan, anti-inflamatuvar, antibakteriyel ve antiviral ajandır ve lipit metabolizmasını değiştirerek bazı yolakları modüle etme yeteneğine sahiptir. EGCG, toplam çay kateşinlerinin %50-80'ini oluşturur ve 2,5 g yeşil çay yaprağı ile demlenmiş bir fincan çay yaklaşık 130-180 mg EGCG içerir (176). Yeşil çay kateşinlerinin önemli bir bileşeni olan EGCG'nin, kateşinler arasında en güçlü metabolik etkileri gösterdiği ve antioksidan ve anti-tümör aktivitesinin olduğu bildirilmiştir (177).

EGCG'nin kimyasal yapısı Şekil 2.10.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Epigallokateşin Gallatın Kimyasal Yapısı.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, EGCG'nin obezite, kanser, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, karaciğer hastalıkları ve inflamasyonda profilaktik ve terapötik bir ajan olarak faydalı etkileri olduğunu göstermektedir (178). EGCG'nin, kemopreventif ve kemoterapötik aktivitesi çeşitli *in vitro* ve *in vivo* hayvan çalışmalarında incelenmiştir (179). EGCG kullanımının deri, meme, prostat, kolorektal, karaciğer ve akciğer kanseri dahil olmak üzere çok çeşitli kanser türlerinde *in vitro* ve hayvan modellerinde, yalnızca başlangıç sırasında değil, ilerleme ve metastaz sırasında da kanseri geriletebildiği gösterilmiştir (180).

Li ve ark. (2010)'nın yaptığı çalışmanın sonucunda, EGCG'nin nispeten düşük bir tedavi konsantrasyonu ile, ER α -negatif meme kanseri hücrelerinde belirgin bir şekilde ER α ekspresyonunu yeniden aktive edebildiği gözlemlenmiştir. Bu veri, EGCG'nin ER α 'nın yeniden ekspresyonunu düzenleyerek östrojen sinyal yollarını yeniden etkinleştirebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, EGCG'nin histon asetilasyonu ve metilasyon durumunu değiştirerek ER α promotörünün kromatin yapısının yeniden şekillenmesine neden olabileceği ve böylece ER α 'nın yeniden aktivasyonuna yol açabileceği bulunmuştur (181).

Gianfredi ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilen sistematik inceleme ve meta-analiz sonuçları, EGCG'nin MDA-MB-231 hücre hattında ER ekspresyonun indüklenmesine neden olarak epigenetik olayları ve değişiklikleri modüle ettiğini göstermektedir. EGCG ve bazı biyoaktif diyet bileşiklerinin, spesifik histon bölgelerini modifiye etme özellikleri olduğu ve spesifik genlerin ekspresyonunu değiştirdiği belirlenmiştir (182).

Farklı EGCG konsantrasyonlarının erkek fertilizasyon potansiyeli üzerindeki etkisinin değerlendirildiği çalışmaya göre, EGCG'nin konsantrasyonlara bağlı olarak

östrojenik veya antiöstrojenik aktivite gösterebildiği bildirilmiştir. Bu etkinin daha yüksek dozlarda antiöstrojenik ve daha düşük dozlarda ER α için koöstrojenik etki olabileceği ifade edilmiştir. EGCG'nin gallat grubu aracılığıyla ER α ve ER β üzerinde etki gösterebileceği ve böylece 17 β -estradiolün (E2) 17 α -pozisyonunu taklit edebileceği ifade edilmiştir (183).

Literatürde, EGCG'nin, bazı nörodejeneratif hastalıklarda C ve E vitaminlerinden daha etkili olduğu belirtilmiştir (177). Çayda bulunan EGCG gibi biyoaktif bileşenlerin potansiyel olarak nöroprotektif etkilerinin altında yatan çok sayıda mekanizma ve bunların Alzheimer hastalığına karşı önleyici etkinlikleri, prelinik çalışmalarda aydınlatılmıştır. EGCG'nin metal şelatlayıcı etkisinin, Alzheimer hastalığında amiloid β (A β) oluşumunu azaltmada kritik bir rol oynadığı da ileri sürülmüştür (176, 184).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum (MTT)	bromür	Sigma-Aldrich
Bakır (II) sülfat (CuSO ₄)		Sigma-Aldrich
Bisfenol A		Sigma-Aldrich
Bisfenol F		Sigma-Aldrich
Deksametazon (DEX)		Cayman
Dimetil Sülfoksit (DMSO)		Sigma-Aldrich
Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi (DPBS)		Biowest
Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri (DMEM) Yüksek Glikoz		Biowest
Epigallokateşin gallat		DSM
Etanol		JT Baker
Fare Aromataz ELISA Kiti		BT Lab
Fare DDIT3 ELISA Kiti		BT Lab
Fare FABP4 ELISA Kiti		BT Lab
Fare PPARalfa ELISA Kiti		BT Lab
Fare PPARgama ELISA Kiti		BT Lab
Folin Fenol		Sigma-Aldrich
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)		Himedia
Fötal Buzağı Serum (FCS)		Biowest
Fötal Sığır Serum (FBS)		Biowest
Hidroklorik Asit		Sigma-Aldrich
İnsülin Solüsyonu		Sigma-Aldrich
3-izobütil-1-metilksantin (IBMX)		Cayman
Penisilin- Streptomisin karışımı		Biowest
Penisilin-Streptomisin Karışımı		Biowest
Resveratrol		Sigma-Aldrich
Rozmarinik Asit		Sigma-Aldrich
Sığır Serum Albumini (BSA)		Sigma-Aldrich

Sodyum Hidroksit (NaOH)	Riedel-de Haën
Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃)	Riedel-de Haën
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Sodyum/Potasyum (Na/K) Tartarat	Panreac Química
	SLU
Tripsin-EDTA	Biowest

3.2. Kullanılan Kitler, Araç ve Gereçler

96 kuyulu plak	Greiner Bio-One, Nest
Biyolojik güvenlik kabini	Holten Lamin Air
Buzdolabı	Arçelik
Chamberslide	Ibidi
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Distile su cihazı	Mes MP Minipure/Thermo Scientific
Enjektör filtresi (0,22 µm)	Merck
Fare Aromataz ELISA Kiti	BT Lab
Fare DDIT3 ELISA Kiti	BT Lab
Fare FABP4 ELISA Kiti	BT Lab
Fare PPARalfa ELISA Kiti	BT Lab
Fare PPARgama ELISA Kiti	BT Lab
Floresans mikroskopu	Leicia
Hassas terazi	Mettler Toledo, XS105
Hücre kültür flaskları (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner
Hücre sayım cihazı	NanoEntek
Işık mikroskobu	Leica
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments Function
İnverted mikroskop	Nikon
Kriyo tüp	Greiner Bio-One
Laboratuvar Tipi Kırık Buz Yapma Cihazı	Scotsman AF100
Lamel	Isolab
Neubauer Lamı	Marienfeld

Otoklav	Nüve NC40M
Otomatik pipet (1-10 µl, 10- 100 µl, 20- 200 µl, 100-1000 µl, 1 – 5 ml)	Eppendorf, Isolab
Otomatik pipet uçları (1,10 µl, 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl, 1-5 ml)	Eppendorf, TrueLine
Santrifüj	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
Spektrofotometre	Molecular Devices Sprektra Max M2
Steril santrifüj tüpleri	Greiner Bio-One
Steril serolojik pipetler (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One
Su banyosu	Memmert, Edelstaht Rostfrei
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX 3000L

3.3. Kullanılan Hücre Hattı

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda 3T3-L1 (ATCC, CL-173) hücre hattı kullanılmıştır. 3T3-L1 hücreleri, American Type Cell Collection (ATCC)'den dondurulmuş olarak tedarik edilmiştir. Hücre hattının kökeni fare embriyosudur. 3T3-L1, yağ dokusu üzerinde biyolojik araştırmada kullanılan 3T3 hücrelerinden türetilen bir hücre hattıdır. 3T3-L1 hücreleri fibroblast benzeri bir morfolojiye sahiptir. Ancak uygun koşullar altında hücreler adiposit benzeri bir fenotipe farklılaşır. Bu hücreler fibroblast yapısında, adherent hücrelerdir. Hücreler farklılaştırma prosedürüne uygun şekilde (185, 186) yağ hücrelerine dönüştürülüp deneyler takiben gerçekleştirilmiştir.

3.4 Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Besiyerinin Hazırlanması

Hücrelerin çoğaltılması için besiyeri DMEM- yüksek glikozlu kullanılmıştır. Besiyeri çözeltisi hazırlanırken 500 ml DMEM- yüksek glikozlu'nun üzerine 90 ml FCS (%15 konsantrasyonda), %1 (h/h) olacak şekilde 6 mL penisilin/streptomisin antibiyotik karışımı ve 6 ml esansiyel olmayan aminoasit çözeltisi eklenmiştir. Deneyler bittikten sonra buzdolabında +4°C sıcaklıkta en fazla 30 gün muhafaza edilmiştir.

3.4.2. 3T3-L1 Hücrelerinin Farklılaştırılmasında Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

Ön-Adiposit Oluşturma Besiyeri

Ön adiposit oluşumu için besiyeri olarak DMEM- yüksek glikozlu kullanılmıştır. Ön adiposit oluşturmak için kullanılan besiyeri çözeltisinde 500 ml DMEM- yüksek glikozlu'nun üzerine 55,5 ml FCS (%10 konsantrasyonda) ve 5,6 mL penisilin/streptomisin antibiyotik karışımı eklenmiştir. Buzdolabında +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

Farklılaştırma Besiyeri

Hücrelerin farklılaştırılmasında kullanılan besiyeri hazırlanırken DMEM- yüksek glikozlu kullanılmıştır. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaştırılmasında kullanılan besiyeri hazırlanırken 500 ml DMEM'in üzerine 55,5 ml FBS (%10 konsantrasyonda) eklenmiştir. Üzerine 5,6 mL penisilin/streptomisin antibiyotik karışımı, 1.0 µM deksametazon, 0.5 mM 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX) ve 1.0 µg/mL insulin ilave edilerek farklılaştırma besiyeri hazırlanmıştır. Buzdolabında +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

Adiposit Büyüme Besiyeri

Adipositlerin büyüme ortamı için kullanılan besiyeri hazırlanırken DMEM- yüksek glikozlu kullanılmıştır. 500 ml DMEM-yüksek glikozlu'nun üzerine 55,5 ml FBS (%10 konsantrasyonda) eklenmiştir. Üzerine 5,6 mL penisilin/streptomisin antibiyotik karışımı, 1.0 µg/mL insulin ilave edilerek, adiposit büyüme besiyeri hazırlanmıştır. Buzdolabında +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

3.4.3. 3T3-L1 Hücrelerinin Farklılaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler

Deksametazon Çözeltisinin Hazırlanması

Deksametazon çözeltisi (1 µM) hazırlamak için hassas terazide 1,96 mg deksametazon tartılarak ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 100 µL DMSO eklenerek pipetaj yapılmış ve deksametazonun çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen karışım, 50

ml besiyerine eklenerek 100 μ M ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu karışımdan 400 μ L hacimde alınarak besiyeri ile 40 ml ye tamamlanmış ve 1 μ M konsantrasyonda 40 ml çözelti hazırlanmıştır.

3-izobütil-1-metilksantin (IBMX) Çözeltisinin Hazırlanması

IBMX çözeltisi (0.5 mM) hazırlamak için hassas terazide 4,45 mg IBMX tartılarak ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 100 μ L DMSO eklenerek pipetaj yapılmış ve IBMX'İN çözünmesi sağlanmıştır. Bun karışımdan, 50 ml besiyerine karıştırılarak 0.5 mM 40 ml hacimde çözelti hazırlanmıştır.

İnsülin Çözeltisinin Hazırlanması

İnsülin çözeltisi (1 μ g/mL) hazırlamak için 10 mg/mL'lik insülin çözeltisinden mikropipet yardımıyla 4 μ L alınarak, besiyeri ile 40 ml'ye tamamlanmıştır.

Epigallokateşin Gallat Çözeltisinin Hazırlanması

Epigallokateşin Gallat moleküler ağırlığı 458,37 g/mol'dür. Hassas terazide 2,3 mg EGCG tartılmış ve 5 ml besiyerine karıştırılarak 100 μ M stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltden 500 μ L alınarak besiyeri ile 40 ml'ye tamamlanmıştır.

Rosmarinik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

Rosmarinik Asit moleküler ağırlığı 360,31 g/mol'dür. Hassas terazide 1,4 mg RA tartılmış ve ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 100 μ L DMSO eklenerek pipetaj yapılmış ve RA'nın çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen karışım, 40 ml besiyerine karıştırılarak, 10 μ M konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır.

Resveratrol Çözeltisinin Hazırlanması

Resveratrol moleküler ağırlığı 228.25 g/mol'dür. Hassas terazide 1,14 mg RV tartılmış ve ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 500 μ L DMSO eklenerek pipetaj yapılmış ve resveratrolün çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen karışım, 10 ml besiyerine karıştırılarak, 50 μ M stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltden 4 ml

alınarak besiyeri ile 40 ml ye tamamlanmış ve 5 μ M 40 ml hacimde çözelti hazırlanmıştır.

Bisfenol A Çözeltisinin Hazırlanması

Bisfenol A moleküler ağırlığı 228,29 g/mol'dür. Hassas terazide 1,14 mg BPA tartılmış ve ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 100 μ L DMSO eklenerek pipetaj yapılmış ve BPA'nın çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen karışım, 10 ml besiyerine karıştırılarak, 50 μ M stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 4 ml alınarak besiyeri ile 40 ml'ye tamamlanmış ve 5 μ M 40 ml hacimde çözelti hazırlanmıştır.

Bisfenol F Çözeltisinin Hazırlanması

Bisfenol F moleküler ağırlığı 200,237 g/mol'dür. Hassas terazide 1 mg BPF tartılmış ve ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 100 μ L DMSO eklenerek pipetaj yapılmış ve BPF'nin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen karışım, 10 ml besiyerine karıştırılarak 50 μ M stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 4 ml alınarak besiyeri ile 40 ml ye tamamlanmış ve 5 μ M 40 ml hacimde çözelti hazırlanmıştır.

3.4.4. 2X Tripsin-EDTA Çözeltisinin Hazırlanması

Tripsin-EDTA çözeltisi (10X konsantrasyonda) DPBS kullanılarak 2X konsantrasyona seyreltilmiş ve hücre kültürü deneylerinde hücreleri tutunduğu yüzeyden kaldırmak için 2X konsantrasyona sahip Tripsin-EDTA çözeltisi kullanılmıştır. Seyreltme işlemi, 10 ml hacimde 10X Tripsin-EDTA çözeltisi 50 ml hacimde falkon tüpe aktararak üzerine 40 ml DPBS eklenmiş ve karışması sağlanmıştır.

3.4.5. 3-(4,5- Dimetiltiyazol- 2- il) – 2,5 – Difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Dimetil sülfoksit, kullanılmaya hazır halde bulunan uçucu yapıya sahip bir sıvıdır. Deneyler yapılırken DMSO ışıkla temas etmemesi için için amber renkli şişelerde ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

3-(4,5- Dimetiltiyazol- 2- il) – 2,5 – Difeniltetrazolyum bromür Çözeltisi

Hassas terazide 25 mg MTT tartılmış ve 50 ml besiyeri içerisinde çözülerek MTT reaksiyonu için gereken 0,5 mg/ml konsantrasyonda MTT çözeltisi elde edilmiştir. Kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlanmış ve 24 saat içerisinde kullanılmıştır. Işıktan korunarak saklanmıştır.

Bisfenol A Standartlarının Hazırlanması

Bisfenol A moleküler ağırlığı 228,29 g/mol'dür. Hassas terazide 4,56 mg BPA tartılmış ve ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 200 µL DMSO eklenerek pipetaj yapılmış ve BPA'nın çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen karışım, 20 ml besiyerine karıştırılarak 1000 µM ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin dilüsyonu ile kullanılan diğer standart çözeltiler hazırlanmıştır.

Bisfenol F Standartlarının Hazırlanması

Bisfenol F moleküler ağırlığı 200,237 g/mol'dür. Hassas terazide 4 mg BPF tartılmış ve ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 200 µL DMSO eklenerek pipetaj yapılmış ve BPF'nin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen karışım, 20 ml besiyerine karıştırılarak 1000 µM ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin dilüsyonu ile kullanılan diğer standart çözeltiler hazırlanmıştır.

Epigallokateşin Gallat Standartlarının Hazırlanması

Epigallokateşin Gallat moleküler ağırlığı 458,37 g/mol'dür. Hassas terazide 4,58 mg EGCG tartılmış 20 ml besiyerine karıştırılarak 500 µM ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin dilüsyonu ile kullanılan diğer standart çözeltiler hazırlanmıştır.

Rosmarinik Asit Standartlarının Hazırlanması

Rosmarinik Asit moleküler ağırlığı 360,31 g/mol'dür. Hassas terazide 1,8 mg RA tartılmış ve ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 100 µL DMSO eklenerek pipetaj yapılmış ve RA'nın çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen karışım, 10 ml besiyerine karıştırılarak 500 µM ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin dilüsyonu ile kullanılan diğer standart çözeltiler hazırlanmıştır.

Resveratrol Standartlarının Hazırlanması

Resveratrol moleküler ağırlığı 228.25 g/mol'dür. Hassas terazide 1,14 mg RV tartılmış ve ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 500 µL DMSO eklenerek pipetaj yapılmış ve Resveratrol 'ün çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen karışım, 50 ml besiyerine karıştırılarak 100 µM ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin dilüsyonu ile kullanılan diğer standart çözeltiler hazırlanmıştır.

3.4.6. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Bakır Reaktifi

Hassas terazide 20 mg bakır (II) sülfat (CuSO_4) tartılarak 2 ml distile suda çözünmesi sağlanmıştır. Ardından hassas terazide 40 mg sodyum/potasyum (Na^+/K^+) tartarat tartılarak 2 ml distile suda çözünmesi sağlanmıştır. 40 mL 0,5 M sodyum hidroksit çözeltisi içerisinde 4 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözülmüştür. 0,4 mL CuSO_4 ve 0,4 mL Na^+/K^+ tartarat, 20 mL Na_2CO_3 karıştırılarak bakır reaktifi deneyden önce taze olarak hazırlanmıştır.

Folin Fenol Reaktifi

Hazır halde bulunan Folin fenol reaktifi 1/10 oranında distile su ile seyreltilmiştir.

Albümin Standartları

15, 31, 62,5, 125, 250, 500 ve 1000 µg/ml sığır serum albümini çözeltileri hazırlanmıştır. 1000 µg/ml konsantrasyona sahip çözelti hazırlanırken 1 mg BSA tartılarak 1 ml distile suda çözülmüştür. Daha sonra bu çözeltiden seyreltmeler yapılarak 15, 31, 62,5, 125, 250 ve 500 µg/ml konsantrasyonlara sahip diğer çözeltiler hazırlanmıştır.

3.4.7. Aromataz Düzeyinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltisi: 960 ng/L konsantrasyonda, 0.5 ml hacimde 1 adet standart çözeltisi aromataz ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Standart Dilüsyon Çözeltisi: Aromataz ELISA kitin içerisinde 3 ml çözelti hazır olarak yer almaktadır. Referans standardı seyreltmek için kullanılmıştır. Standart çalışma çözeltisinden dilüsyonla 480 ng/L, 240 ng/L, 120 ng/L, 60 ng/L ve 30 ng/L konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.

Streptavidin-yaban turbu peroksidaz (horse radish peroxidase, HRP): 6 ml Streptavidin-HRP aromataz ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Substrat A Solüsyonu: 6 ml substrat A solüsyonu aromataz ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Substrat Reaktifi B: 6 ml substrat B solüsyonu aromataz ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Durdurma (20) Solüsyonu: Reaksiyonun durdurulması amacıyla kullanılan 6 ml stop solüsyonu aromataz ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Konsantre Yıkama Tamponu: Aromataz ELISA kitin içerisinde 20 ml hacimde 25X konsantrasyondaki yıkama tamponu hazır olarak bulunmaktadır. Deneylerde 20 ml yıkama tamponu konsantresini 25X oranında distile suyla seyrelterek, 500 ml 1X yıkama tamponu kullanılmıştır.

3.4.8. PPAR α Düzeyinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltisi: 19,2 ng/ml konsantrasyonda, 0,5 ml hacimde 1 adet standart çözeltisi PPAR α ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Standart Dilüsyon Çözeltisi: PPAR α ELISA kitin içerisinde 3 ml çözelti hazır olarak yer almaktadır. Referans standardı seyreltmek için kullanılmıştır. Standart çalışma çözeltisinden dilüsyonla 9,5 ng/ml, 4,8 ng/ml, 2,4 ng/ml, 1,2 ng/ml ve 0,6 ng/ml konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlanmıştır.

Streptavidin-HRP: 6 ml hacimde Streptavidin-HRP PPAR α ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Substrat A Solüsyonu: 6 ml hacimde substrat A solüsyonu PPAR α ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Substrat Reaktif B: 6 ml hacimde substrat B solüsyonu PPAR α ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Durdurma Solüsyonu: Reaksiyonun durdurulması amacıyla kullanılan 6 ml stop solüsyonu PPAR α ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Konsantre Yıkama Tamponu: PPAR α ELISA kitin içerisinde 20 ml hacimde 25X konsantrasyondaki yıkama solüsyonu hazır olarak bulunmaktadır. Deneyleerde 20 ml yıkama tamponu konsantresini 25X oranında distile suyla seyrelterek 500 ml 1X yıkama tamponu kullanılmıştır.

3.4.9. PPAR γ Düzeylerinin Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltisi: 128 ng/ml konsantrasyonda, 0,5 ml hacimde 1 adet standart çözeltisi PPAR γ ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Standart Dilüsyon Çözeltisi: PPAR γ ELISA kitin içerisinde 3 ml çözelti hazır olarak yer almaktadır. Referans standardı seyreltmek için kullanılmıştır. Standart çalışma çözeltisinden dilüsyonla 64 ng/ml, 32 ng/ml, 16 ng/ml, 8 ng/ml ve 4 ng/ml konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.

Streptavidin-HRP: 6 ml hacimde Streptavidin-HRP PPAR γ ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Substrat A Solüsyonu: 6 ml hacimde substrat A solüsyonu PPAR γ ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Substrat Reaktifi B: 6 ml hacimde substrat B solüsyonu PPAR γ ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Durdurma Solüsyonu: Reaksiyonun durdurulması amacıyla kullanılan 6 ml hacimde stop solüsyonu PPAR γ ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Konsantre Yıkama Tamponu: PPAR γ ELISA kitin içerisinde 20 ml hacimde 25X konsantrasyondaki yıkama solüsyonu hazır olarak bulunmaktadır. Deneylerde 20 ml yıkama tamponu konsantresini 25X oranında distile suyla seyrelterek 500 ml 1X yıkama tamponu kullanılmıştır.

3.4.10. Yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4) Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltisi: 4800 ng/L konsantrasyonda, 0.5 ml hacimde 1 adet standart çözeltisi FABP4 ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Standart Dilüsyon Çözeltisi: FABP4 ELISA kitin içerisinde 3 ml çözelti hazır olarak yer almaktadır. Referans standardı seyreltmek için kullanılmıştır. Standart çalışma çözeltisinden dilüsyonla 2400 ng/L, 1200 ng/L, 600 ng/L, 300 ng/L ve 150 ng/L konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.

Streptavidin-HRP: 6 ml hacimde Streptavidin-HRP FABP4 ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Substrat A Solüsyonu: 6 ml hacimde substrat A solüsyonu FABP4 ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Substrat Reaktifi B: 6 ml hacimde substrat B solüsyonu FABP4 ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Durdurma Solüsyonu: Reaksiyonun durdurulması amacıyla kullanılan 6 ml stop solüsyonu FABP4 ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Konsantre Yıkama Tamponu: FABP4 ELISA kitin içerisinde 20 ml hacimde 25X konsantrasyondaki yıkama solüsyonu hazır olarak bulunmaktadır. Deneylerde 20 ml yıkama tamponu konsantresini 25X oranında distile suyla seyrelterek 500 ml 1X yıkama tamponu kullanılmıştır.

3.4.11. CCAT/ Arttırıcı Bağlayıcı Protein β (CEBP β) Ölçülmesinde Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltisi: 64 ng/ml konsantrasyonda, 0.5 ml hacimde 1 adet standart çözeltisi DNA hasarı ile indüklenabilir transkript 3 (DDIT3) ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır. Kullanım öncesinde oda sıcaklığına getirilerek kullanılmıştır.

Standart Dilüsyon Çözeltisi: 3 ml çözelti DDIT3 ELISA kitin içerisinde hazır olarak yer almaktadır. Referans standardı seyreltmek için kullanılmıştır. Standart çalışma çözeltisinden dilüsyonla 32 ng/ml, 16 ng/ml, 8 ng/ml, 4 ng/ml ve 2 ng/ml konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.

Streptavidin-HRP: 6 ml hacimde Streptavidin-HRP DDIT3 ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Substrat A Solüsyonu: 6 ml hacimde substrat A solüsyonu DDIT3 ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir

Substrat Reaktif B: 6 ml hacimde substrat B solüsyonu DDIT3 ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Durdurma Solüsyonu: Reaksiyonun durdurulması amacıyla kullanılan 6 ml stop solüsyonu DDIT3 ELISA kitin içerisinde hazır olarak temin edilmiştir.

Konsantre Yıkama Tamponu: ELISA kitin içerisinde 20 ml hacimde 25X konsantrasyondaki yıkama solüsyonu hazır olarak bulunmaktadır. Deneylerde 20 ml yıkama tamponu konsantresini 25X oranında distile suyla seyrelterek 500 ml 1X yıkama tamponu kullanılmıştır.

3.5. Hücre Kültürü

3.5.1. Donmuş Hücrelerin Çözülmesi

1. Su banyosu açılarak su seviyesi kontrol edilmiştir. Ardından 37-40°C sıcaklığa ulaşana kadar beklenmiştir.
2. Hücrelerin pasajlanmasında kullanılan besiyeri buzdolabından (4°C) alınarak su banyosu içerisinde uygun sıcaklığa gelmesi sağlanmıştır.
3. -80°C sıcaklıkta kriyovial içerisinde saklanan hücreler dondurucudan çıkarılarak hızlıca buz üzerine alınmıştır.

4. Daha sonra su banyosunda uygun sıcaklıkta hücrelerin çözülmesi için kriyovial 1-2 dakika süre ile ısıtılmıştır.
5. Su banyosundan alınan kriyovial içerisindeki hücreler %70 lik etanol ile sterilize edilerek biyogüvenlik kabini içine alınmıştır.
6. Steril edilmiş 15 ml hacme sahip bir santrifüj tüpüne 4 ml hacimde besiyeri eklenmiş ve ardından kriyovialdeki hücreler eklenmiştir. Nazik bir şekilde pipetaj yapılarak hücrelerin besiyerinde homojen hale gelmesi sağlanmıştır.
7. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.
8. Santrifüj işlemi sonrasında pipetle çekilerek süpernatant alınmış ve dipte kalan pellet üzerine besiyeri eklenmiştir.
9. Pipetaj işlemi ile besiyerinde hücrelerin homojen dağılımı sağlanmıştır.
10. Uygun boyutlardaki flasklara pasaj için kullanılan besiyeri eklenmiş ve üzerine besiyeri içinde homojen dağılmış olan hücreler eklenmiştir.
11. Işık mikroskobu altında hücreler kontrol edilmiştir.
12. Flasklar 37°C sıcaklığa sahip ve %100 nem, %5 CO₂ içeren inkübatör içerisine yerleştirilmiştir.

3.5.2. Hücrelerin Pasaj İşlemi

1. Flaskların içerisindeki hücreler her gün kontrol edilerek ışık mikroskobu altında incelenmiştir.
2. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler için pasajlama işlemine başlanmıştır.
3. Buzdolabında saklanan Tripsin-EDTA çözeltisi ve besiyeri 37°C sıcaklığa ayarlanan su banyosunda ısıtılmıştır.
4. Flaskların içerisinde bulunan besiyeri steril pipet yardımıyla çekilerek atılmıştır.
5. Daha sonra hücrelerin yüzeyden kalkması için 4 ml hacimde Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek flasklar 5 dak süre ile inkübatörde bekletilmiştir.
6. Hücreler ışık mikroskobu altında kontrol edilmiş ve flask tabanından kalktıkları gözlemlendikten sonra tripsinin aktivitesini durdurmak için 6 ml besiyeri eklenmiştir.
7. Hücre kaybı yaşanmaması için flasktan dikkatlice alınan hücreler 15 ml hacme sahip santrifüj tüplerine aktarılmıştır.

8. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.
9. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant steril pipetle çekilerek atılmıştır.
10. Dipekteki pellet üzerine yeterli miktarda besiyeri eklenerek pipetaj yapılmış ve hücrelerin besiyeri içerisinde homojen dağılımı sağlanmıştır.
11. Uygun boyutlardaki flakslara yeni besiyeri eklenerek üzerine süspansiyon edilen hücreler eklenmiştir.
12. Flaskların üzerine hücre tipi, tarih, pasaj no bilgileri yazılarak hücreler biyogüvenlik kabini dışarı alınmış ve %70 alkol çözeltisi ile sterilizasyon sonrası flasklar 37°C sıcaklığa sahip ve %100 nem, %5 CO₂ içeren inkübatör içerisine yerleştirilmiştir.

3.5.3. Pasaj Yapılan Hücrelerde Besiyeri Değişimi

1. İnkübatördeki flaskların dışarı alınmasının ardından mikroskopta hücre morfolojileri kontrol edilmiştir.
2. Flask içerisinde atık besiyeri steril pipet ile nazik bir şekilde hücrelere zarar vermeden çekilmiştir.
3. Flasklar içerisine 10 ml taze besiyeri eklenerek 37°C sıcaklığa sahip ve %100 nem, %5 CO₂ içeren inkübatör içerisine yerleştirilmiştir.

3.5.4. 3T3-L1 Hücrelerinin Farklılaştırma İşlemi

1. Hücreler 48 saat süreyle veya kültür %100 doluluk oranına ulaşana kadar ön adiposit oluşturma besiyeri ile beslenerek yeterli doluluğa ulaşması sağlanmıştır.
2. Buzdolabında (4°C) saklanan Tripsin-EDTA çözeltisi ve ön adiposit oluşturma besiyeri 37 °C sıcaklığa ayarlanan su banyosunda ısıtılmıştır.
3. İnkübatördeki flaskların dışarı alınmasının ardından mikroskopta hücre morfolojileri kontrol edilmiştir.
4. Flaskların içerisinde bulunan besiyeri steril pipet yardımıyla çekilerek atılmıştır.
5. Daha sonra hücrelerin yüzeyden kalkması için 4 ml hacimde Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek flasklar 5 dak süre ile inkübatörde bekletilmiştir.

6. Hücreler ışık mikroskobu altında kontrol edilmiş ve flask tabanından kalktıkları gözlemlendikten sonra tripsinin aktivitesini durdurmak için 6 ml besiyeri eklenmiştir.
7. Hücre kaybı yaşanmaması için flasktan dikkatlice alınan hücreler 15 ml hacme sahip santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
8. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.
9. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant steril pipetle çekilerek atılmıştır.
10. Dipteki pellet üzerine yeterli miktarda ön adiposit oluşturma besiyeri eklenerek pipetaj yapılmış ve hücrelerin besiyeri içerisinde homojen dağılımı sağlanmıştır.
11. Uygun boyutlardaki flakslara ön adiposit oluşturma besiyeri eklenerek üzerine süspand edilen hücreler eklenmiştir.
12. Hücreler 48 saat inkübe edilmiştir.
13. Her bir flasktan besiyerleri steril pipet yardımıyla çekilerek aynı hacimde farklılaştırma besiyeri eklenmiştir.
14. Farklılaşma ortamında 48 saat inkübe edilmiştir.
15. 48 saat sonunda her bir flasktan besiyerleri steril pipet yardımıyla çekilerek aynı hacimde adiposit büyüme besiyeri eklenmiştir.
16. Her 48 saatte bir besiyeri tazelenerek lipit damlacık oluşumunun gözlemlenmesi ve farklılaşma sürecinin işleyişi takip edilmiştir.

3.5.5. Hücrelerin Dondurulması

1. Işık mikroskobu yardımıyla flasklar kontrol edilerek yeterli yoğunluğa ulaşan hücrelerin daha sonra yapılacak deneylerde kullanılabilmesi için dondurulmasına karar verilmiştir.
2. Su banyosu açılarak 37°C sıcaklığa ulaşması sağlanmıştır.
3. Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için gerekli olan ve 4°C'de saklanan Tripsin-EDTA çözeltisi 37°C sıcaklığa ayarlanan su banyosunda ısıtılmıştır.
4. 4°C'de saklanan besiyeri de 37°C sıcaklığa ayarlanan su banyosunda ısıtılmıştır.
5. Dondurma işlemi için gerekli besiyeri çözeltisi, 200 µL DMSO ve 1800 µL besiyeri içerecek şekilde 2 ml olarak hazırlanmıştır.

6. İnkübatörden alınan flasklar içerisindeki besiyeri steril pipet yardımı ile atılmıştır.
7. 3 ml hacimde Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek flasklar 5 dak süre ile inkübatörde bekletilmiştir.
8. Işık mikroskobu ile kontrol sağlanarak hücrelerin flask yüzeyinden kalktığından emin olunduktan sonra 6 ml besiyeri flasklara eklenerek Tripsin enzim aktivitesinin durması sağlanmıştır.
9. Hücre kaybını en aza indirmek için flask yüzeyi yıkanarak hücreler steril pipet yardımı ile 15 ml hacimli santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
10. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.
11. Santrifüj sonrası üstte kalan kısım dipteki pellete zarar vermeden steril pipet yardımıyla çekilerek atılmıştır.
12. Dondurma işlemi için hazırlanan besiyerinden 2 ml dipteki hücre pelletinin üzerine eklenerek pipetaj yapılmış ve hücrelerin süspende olması sağlanmıştır.
13. Süpande olan hücreler pipetle alınarak kriyovialle aktarılmıştır.
14. Kriyovial birkaç saat -20°C de dondurulduktan sonra -80°C ye alınmış ve kullanıma kadar -80°C de muhafaza edilmiştir.

3.5.6 Hücrelerin Sayılması

Tez çalışması kapsamında hücre sayımı için Tripan mavisi ile boyama prosedürü uygulanmıştır. Negatif yüke sahip olan Tripan mavisi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin içerisine girerek boyanmasına neden olmaktadır. Bu şekilde ölü hücreler maviye boyanarak canlı hücrelerden ayırt edilebilmektedir.

1. Hücreler ışık mikroskobuyla kontrol edilerek incelenmiş ve yeterli yoğunluğa ulaşan hücrelerin bulunduğu flasklar içerisindeki besiyeri steril pipet yardımıyla atılmıştır.
2. Flasklara 3 ml hacimde tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek flasklar, 5 dak süre ile inkübatörde bekletilmiştir.
3. Hücreler ışık mikroskobuyla kontrol edilmiş ve hücrelerin flask yüzeyinden kalktığından emin olunduktan sonra 6 ml besiyeri flasklara eklenerek tripsin enzim aktivitesinin durması sağlanmıştır.

4. Hücre kaybını en aza indirmek için flask yüzeyi yıkanarak hücreler steril pipet yardımı ile 15 ml hacimli santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
5. 1500 rpm'de 5 dak santrifüj yapılmıştır.
6. Santrifüj sonrası üstte kalan kısım dipteki pellete zarar vermeden steril pipet yardımıyla çekilerek atılmıştır.
7. Dipteki hücre pelletinin üzerine 1 ml besiyeri eklenerek pipetaj yapılmış ve hücrelerin homojen dağılması sağlanmıştır.
8. 50 ml hacimli falkona 19 ml besiyeri eklenerek süspande olan hücreler besiyeri içerisine aktarılmıştır.
9. Hücrelerin homojen dağılımı sağlandıktan sonra karışımdan mikropipet ile 10 µL hacimde alınarak ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 10 µL Tripan mavisi (%0.4) eklenerek süspande edilmiştir.
10. Mikropipet kullanılarak EVE™ hücre sayma lamının A kısmına örnek karışımından 10 µL eklenmiştir.
11. Lam, A tarafı önde olacak şekilde cihazın lam portuna yerleştirilmiştir.
12. Yakınlaştır düğmesine basılmıştır ve odak düğmesini kullanarak görüntü ayarlanmıştır (doğru analiz için referans görüntüsünü kontrol edilmiştir).
13. Sonuçları elde etmek için "Hücreleri Say" düğmesine basılmıştır.
14. Hücre sayısı kaydedilmiştir.
15. Lamın B tarafı için de aynı işlemler (10-14. adımlar) tekrar edilerek A ve B tarafında sayılan hücre sayılarının ortalaması alınarak hesaplama yapılmıştır.

3.6. Yöntemler

3.6.1. 3T3-L1 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

MTT Yönteminin Esası

MTT yöntemi, hücre canlılığı, hücrelerin çoğalmasını ve ve sitotoksitenin ölçülmesini sağlayan kolorimetre esasına dayanan bir yöntemdir. MTT, yalnızca metabolik olarak aktif canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal enzimler tarafından indirgenerek mor renkli formazan ürününe dönüşen bir tetrazolyum tuzudur. Canlı hücreler, MTT'yi formazana indirgeyen NAD(P)H-bağımlı oksidoredüktaz enzimleri

içerirler. Üretilen formazan miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olduğundan oluşan mor renk de hücre canlılığına göre değişmektedir. Tez kapsamında yapılan deneylerde kullanılan maddelerin inhibitör konsantrasyonlarının saptanması için bu yöntem kullanılmıştır.

Yöntemin Uygulanışı

1. Hücreler 100 μ L'de 20.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir ve 37°C ve %5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
2. Kuyucuklardaki besiyeri 24 saatin sonunda hücrelerin kalkmamasına dikkat edilerek kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır.
3. Hücrelere 3T3-L1 hücreleri için hazırlanan besiyeri içerisinde çözülmüş, 0-500 μ M konsantrasyon aralığında Epigallokateşin gallat çözeltisi, 0-1000 μ M konsantrasyon aralığında Rosmarinik asit çözeltisi, 0-100 μ M konsantrasyon aralığında Resveratrol çözeltisi, 0-1000 μ M konsantrasyon aralığında Bisfenol A çözeltisi, 0-1000 μ M konsantrasyon aralığında Bisfenol F çözeltisi uygulanmıştır.
4. Kontrol grubunda yer alan hücrelere yalnızca besiyeri uygulanmıştır.
5. 24 saat inkübasyonun sonrasında hücrelerin üzerindeki çözeltiler hücrelerin kalkmamasına özen gösterilerek uzaklaştırılmıştır.
6. Her bir kuyucuğa 100 μ L hacimde 0,5 mg/ml konsantrasyonda taze hazırlanan MTT çözeltisi eklenmiştir.
7. MTT çözeltisi eklendikten sonra plaklar 3 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ ve nem oranına sahip inkübatörde bekletilmiştir.
8. MTT'nin ışıktan etkilendiği bilindiği için MTT çözeltisinin ve plağın ışıktan korunmasına dikkat edilmiştir.
9. İnkübasyon süresinin sonunda MTT çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır. Oluşan formazan kristallerinin üzerine 150'şer μ l DMSO eklenmiştir ve çalkalayıcıda 5 – 10 dk çalkalanarak çözünmesi sağlanmıştır.
10. Absorbanslar spektrofotometri yöntemiyle 570 nm dalgaboyunda ölçülmüştür.
11. Kontrol grubunun absorbans değerlerinin ortalaması, %100 olarak kabul edilerek her bir doz için hücre canlılıkları hesaplanmıştır.

12. Deneyle 3 farklı günde, her gün içinde 2 ayrı tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

Hücre Canlılığının Hesaplanması

Kontrol grubuna yalnızca besiyeri uygulanmış olup, kontrol grubunda bulunan hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. Deneyle gruplarının canlılığı ise kontrol grubuna kıyasla % canlılık olarak belirlenmiştir. Hesaplama yapılırken “%Canlılık = 100 X (Çalışma gruplarının absorbans değeri ortalaması / Kontrol grubunun absorbans değeri ortalaması)” formülü kullanılmıştır.

3.6.2. Deneyle Gruplarının Oluşturulması

1. Kontrol (C): Sadece besiyeri uygulaması

2. BPA uygulama grubu (BPA): Sitotoksisite yaratmayan en yüksek konsantrasyonda farklılaştırma prosedürü boyunca her besiyeri değişiminde BPA uygulanan grup

3. BPF uygulama grubu (BPF): Sitotoksisite yaratmayan en yüksek konsantrasyonda farklılaştırma prosedürü boyunca her besiyeri değişiminde BPF uygulanan grup

4. Resveratrol uygulama grubu (RV): Sitotoksisite yaratmayan en yüksek konsantrasyonda farklılaştırma prosedürü boyunca her besiyeri değişiminde RV uygulanan grup

5. Rosmarinik asit uygulama grubu (RA): Sitotoksisite yaratmayan en yüksek konsantrasyonda farklılaştırma prosedürü boyunca her besiyeri değişiminde RA uygulanan grup

6. Epigallokateşin gallat uygulama grubu (EGCG): Sitotoksisite yaratmayan en yüksek konsantrasyonda farklılaştırma prosedürü boyunca her besiyeri değişiminde EGCG uygulanan grup

3.6.3. Aromataz Düzeylerinin Ölçülmesi

Yöntemin Esası

Aromataz düzeylerinin ölçülmesinde sandviç ELISA prensibini kullanan fare aromataz kiti kullanılmıştır. Plak, fare CYP19A1 antikoru ile önceden kaplanmıştır. Örnekteki CYP19A1 kuyucuklara kaplanan antikorlara bağlanmaktadır. Daha sonra biyotinlenmiş fare CYP19A1 Antikoru eklenir ve örnekteki CYP19A1'e bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve Biyotinlenmiş CYP19A1 antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP, yıkama adımı sırasında yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir ve renk Fare CYP19A1 miktarına orantılı olarak gelişir. Reaksiyon, asidik durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve absorban 450 nm'de ölçülür (187).

Yöntemin Uygulanışı

1. Tüm reaktifler, standart çözeltileri ve numuneler talimatlara uygun şekilde hazırlanmıştır. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiş ve deney oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
2. Test için gereken strip sayısı belirlenerek stripler kullanılmak üzere çerçevelere yerleştirilmiş ve kullanılmayan stripler 2-8°C'de saklanmıştır.
3. Standart kuyucuğa 50 µL standart çözeltisi eklenmiştir. Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyucuğa antikor eklenmemiştir.
4. Numune kuyucuklarına 40 µL numune eklenmiştir. Ardından numune kuyucuklarına 10 µL fare CYP19A1 antikoru eklenmiştir. Son olarak numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP eklenmiştir. Plak ışık almayacak şekilde kapatılarak 37°C'de 60 dak inkübe edilmiştir.
5. Plağın üstündeki kapatıcı çıkarılarak 5 kez yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Bu aşamada her yıkama için kuyucuklar 300 µL yıkama tamponuyla 30 saniye ile 1 dakika arasında yıkanmıştır. Plak süzgeç kağıdına sertçe vurularak sıvıdan arındırılmıştır.
6. Her bir kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu A eklenmiş ve ardından her kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu B eklenmiştir. Plak bir kapatıcıyla kapatılmış ve karanlıkta 37°C'de 10 dak boyunca inkübe edilmiştir.

7. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiştir. Mavi renk sarıya dönüşmüştür.
8. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 10 dak içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropalak okuyucu kullanarak her bir kuyucuğun absorbans (OD) değeri belirlenmiştir.

Hesaplama

Her standart için ortalama OD'yi yatay (X) eksenindeki konsantrasyona karşı dikey (Y) ekseninde çizerek standart bir eğri oluşturulmuş ve grafikteki noktalar aracılığıyla en uygun eğri çizilmiştir. Bu hesaplamalar, bilgisayar tabanlı eğri uydurma yazılımıyla gerçekleştirilmiş ve en iyi uyan çizgi regresyon analizi ile değerler belirlenmiştir.

3.6.4. Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör Alfa (PPAR α)

Düzeylerinin Ölçülmesi

Yöntemin Esası

PPAR α düzeylerinin ölçülmesinde sandviç ELISA prensibini kullanan fare PPAR α kiti kullanılmıştır. Plaka, Fare PPAR α antikoruyla önceden kaplanmıştır. Örnekte bulunan PPAR α eklenir ve kuyucuklara kaplanan antikorlara bağlanır. Daha sonra biyotinlenmiş fare PPAR α antikoru eklenir ve örnekteki PPAR α 'ya bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş PPAR α antikoru bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP, yıkama adımı sırasında yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir ve renk fare PPAR α miktarına orantılı olarak gelişir. Reaksiyon, asidik durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve absorbans 450 nm'de ölçülür (188).

Yöntemin Uygulanışı

1. Tüm reaktifler, standart çözeltileri ve numuneler talimatlara uygun şekilde hazırlanmıştır. Kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına getirilmiştir. Deney oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

2. Test için gereken strip sayısı belirlenmiştir. Stripler kullanılmak üzere çerçevelere yerleştirilmiştir.
3. Standart kuyucuğa 50 µL standart çözeltisi eklenmiştir. Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyucuğa antikor eklenmemiştir.
4. Numune kuyucuklarına 40 µL numune eklenmiştir. Ardından numune kuyucuklarına 10 µL Fare PPAR α antikor eklenmiştir. Son olarak numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP eklenmiştir. İyice karıştırılmıştır. Plak ışık almayacak şekilde kapatılarak 37°C'de 60 dak inkübe edilmiştir.
5. Her yıkama için kuyucuklar 300 µL yıkama tamponuyla 30 saniye ila 1 dakika süreyle yıkanmıştır. Plak süzgeç kağıdına sertçe vurularak sıvıdan arındırılmıştır.
6. Her bir kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu A eklenmiştir ve ardından her kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu B eklenmiştir. Plaka yeni bir kapaticıyla kaplanmış olarak karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
7. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiştir. Mavi renk sarıya dönüşmüştür.
8. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra, 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropalak okuyucu kullanılarak her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) hemen belirlenmiştir.

Hesaplama

Her standart için ortalama OD'yi yatay (X) eksenindeki konsantrasyona karşı dikey (Y) ekseninde çizerek standart bir eğri oluşturulmuş ve grafikteki noktalar aracılığıyla en uygun eğri çizilmiştir. Bu hesaplamalar, bilgisayar tabanlı eğri uydurma yazılımıyla gerçekleştirilmiş ve en iyi uyan çizgi regresyon analizi ile değerler belirlenmiştir.

3.6.5. Peroxisom Proliferatör Aktive Reseptör Gama (PPAR γ) Düzeylerinin Ölçülmesi

Yöntemin Esası

PPAR γ düzeylerinin ölçülmesinde sandviç ELISA prensibini kullanan fare PPAR γ kiti kullanılmıştır. Plak, fare PPAR γ antikoru ile önceden kaplanmıştır. Numunede mevcut olan PPAR γ kuyucuklardaki antikorlara bağlanır. Daha sonra biyotinlenmiş fare PPAR γ antikoru eklenir ve numunedeki PPAR γ 'a bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş PPAR γ antikoru bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP, yıkama adımı sırasında yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir ve fare PPAR γ miktarıyla orantılı olarak renk gelişir. Reaksiyon asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılır ve absorbans 450 nm'de ölçülür (189).

Yöntemin Uygulanışı

1. Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler talimatlara uygun şekilde hazırlanmıştır. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiştir. Deney oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
2. Test için gereken strip sayısı belirlenir. Stripler kullanmak üzere çerçevelere yerleştirilmiştir. Kullanılmayan stripler 2-8°C'de saklanmıştır.
3. Standart kuyucuğa 50 μ L standart çözeltisi eklenmiştir. Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyucuğa antikor eklenmemiştir.
4. Numune kuyucuklarına 40 μ L numune eklenmiştir ve ardından numune kuyucuklarına 10 μ L fare PPAR γ antikoru eklenmiştir; ardından numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklara 50 μ L streptavidin-HRP eklenmiştir. İyice karıştırılmıştır. Plak ışık almayacak şekilde kapatılarak 37°C'de 60 dak inkübe edilmiştir.
5. Kapatici çıkarılmış ve plak 5 kez yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Her yıkama için kuyucuklar 300 μ L yıkama tamponuyla 30 saniye ila 1 dakika süreyle yıkanmıştır. Plak süzgeç kağıdına sertçe vurularak sıvıdan arındırılmıştır.

6. Her bir kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu A eklenmiştir ve ardından her kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu B eklenmiştir. Plak ışık almayacak şekilde kapatılarak 37°C'de 60 dak inkübe edilmiştir.
7. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiştir. Mavi renk sarıya dönüşmüştür.
8. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra, 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropalak okuyucu kullanılarak her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) hemen belirlenmiştir.

Hesaplama

Her standart için ortalama OD'yi yatay (X) eksenindeki konsantrasyona karşı dikey (Y) ekseninde çizerek standart bir eğri oluşturulmuş ve grafikteki noktalar aracılığıyla en uygun eğri çizilmiştir. Bu hesaplamalar, bilgisayar tabanlı eğri uydurma yazılımıyla gerçekleştirilmiş ve en iyi uyan çizgi regresyon analizi ile değerler belirlenmiştir.

3.6.6. Yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4) Ölçülmesi

Yöntemin Esası

FABP4 düzeylerinin ölçülmesinde sandviç ELISA prensibini kullanan fare FABP4 kiti kullanılmıştır. Plaka, Fare FABP4 antikoruna ile önceden kaplanmıştır. Numunede bulunan FABP4 eklenir ve kuyucuklar üzerinde kaplanmış antikorlara bağlanır. Daha sonra biyotinlenmiş Fare FABP4 Antikoru eklenir ve numunedeki FABP4'e bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve Biyotinlenmiş FABP4 antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP, yıkama adımı sırasında yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir ve Fare FABP4 miktarıyla orantılı olarak renk gelişir. Reaksiyon asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılır ve absorbanans 450 nm'de ölçülür (190).

Yöntemin Uygulanışı

1. Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler talimatlara uygun şekilde hazırlanır. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilir. Deney oda sıcaklığında gerçekleştirilir.
2. Test için gereken strip sayısı belirlenir. Stripler kullanmak üzere çerçevelere yerleştirilir. Kullanılmayan stripler 2-8°C'de saklanmalıdır.
3. Standart kuyucuğa 50 µL standart çözeltisi eklenmiştir. Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyucuğa biyotinlenmiş antikor eklenmemiştir.
4. Numune kuyucuklarına 40 µL numune eklenmiş ve ardından numune kuyucuklarına 10 µL anti-FABP4 antikor eklenmiştir, ardından numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklara 50 µL streptavidin-HRP eklenmiştir. İyice karıştırılmıştır. Plak ışık almayacak şekilde kapatılarak 37°C'de 60 dak inkübe edilmiştir.
5. Kapatıcı çıkarılmış ve plak 5 kez yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Her yıkama için kuyucuklar 300 µL yıkama tamponuyla 30 saniye ile 1 dakika süreyle yıkanmıştır. Plak süzgeç kağıdına sertçe vurularak sıvıdan arındırılmıştır.
6. Her bir kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu A eklenmiş ve ardından her kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu B eklenmiştir. Plak yeni bir kapatıcıyla kaplanmış olarak karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
7. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiştir. Mavi renk sarıya dönüşmüştür.
8. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra, 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropalak okuyucu kullanılarak her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) hemen belirlenmiştir.

Hesaplama

Her standart için ortalama OD, yatay (X) eksenindeki konsantrasyona karşı dikey (Y) ekseninde çizilerek bir standart eğri oluşturulur ve üzerindeki noktalar aracılığıyla en uygun eğri çizilir. Bu hesaplamalar, bilgisayar tabanlı eğri uydurma yazılımıyla en iyi şekilde gerçekleştirilmiş ve en iyi uyan çizgi regresyon analizi ile belirlenmiştir.

3.6.7. CCAAT/Arttırıcı Bağlayıcı Protein β (C/EBP β) Ölçülmesi

Yöntemin Esası

CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein düzeylerinin ölçülmesinde sandviç ELISA prensibini kullanan fare DDIT3 kiti kullanılmıştır. Plak, fare DDIT3 antikoru ile önceden kaplanmıştır. Numuneler kuyucuklara eklenir ve kuyucukların üzerinde kaplanmış antikorlara bağlanır. Daha sonra biyotinlenmiş fare Ddit3 Antikoru eklenir ve örnekteki Ddit3'e bağlanır. Streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş DDIT3 antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP, yıkama adımı sırasında yıkılarak uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir ve fare DDIT3 miktarıyla orantılı olarak renk gelişir. Reaksiyon asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılır ve absorban 450 nm'de ölçülür (191).

Yöntemin Uygulanışı

1. Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler kit içinde sunulan talimatlara uygun şekilde hazırlanmıştır. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiştir. Deney oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
2. Test için gereken strip sayısı belirlenmiştir. Stripler kullanmak üzere çerçevelere yerleştirilir. Kullanılmayan strip 2-8°C'de saklanmıştır.
3. Standart kuyucuğa 50 μ L standart çözeltisi eklenmiştir. Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyucuğa antikor eklenmemiştir.
4. Numune kuyucuklarına 40 μ L numune eklenmiş ve ardından numune kuyucuklarına 10 μ L Fare DDIT3 antikoru eklenmiştir ve ardından numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklara 50 μ L streptavidin-HRP eklenmiştir. İyiçe karıştırılmıştır. Plak ışık almayacak şekilde kapatılarak 37°C'de 60 dak inkübe edilmiştir.
5. Kapatıcı çıkarılmış ve plak 5 kez yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Her yıkama için kuyucuklar 300 μ L yıkama tamponuyla 30 saniye ila 1 dakika süreyle yıkanmıştır. Plak süzgeç kağıdına sertçe vurularak sıvıdan arındırılmıştır.
6. Her bir kuyucuğa 50 μ L substrat solüsyonu A eklenmiş ve ardından her kuyucuğa 50 μ L substrat solüsyonu B eklenmiştir. Plak yeni bir kapatıcıyla kaplanmış olarak karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

7. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiştir. Mavi renk sarıya dönüşmüştür.
8. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra, 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropalak okuyucu kullanılarak her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) hemen belirlenmiştir.

Hesaplama

Her standart için ortalama OD'yi yatay (X) eksenindeki konsantrasyona karşı dikey (Y) ekseninde çizerek standart bir eğri oluşturulmuş ve grafikteki noktalar aracılığıyla en uygun eğri çizilmiştir. Bu hesaplamalar, bilgisayar tabanlı eğri uydurma yazılımıyla gerçekleştirilmiş ve en iyi uyan çizgi regresyon analizi ile değerler belirlenmiştir.

3.6.8. Protein Miktarının Ölçülmesi

Yöntem Esası

Tez deneyleri kapsamında protein miktar tayini için kullanılan yöntem modifiye bir Lowry yöntemidir. Bu yöntemde, bir numunedeki proteinlerle reaksiyona girmesi ve bakır-protein kompleksi oluşturmak amacıyla bakır reaktifi kullanılmaktadır. Yöntemin prensibi, iki değerlikli bakır iyonunun alkali koşullarda, tartarat varlığında, tek değerlikli bir iyon indirgenmesi ve peptit bağları ile bir kompleks oluşturmasıdır. Oluşan bu kompleks daha sonra Folin-Fenol Reaktifinin indirgenmesiyle oluşan mavi-mor rengin 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tespit edilmektedir.

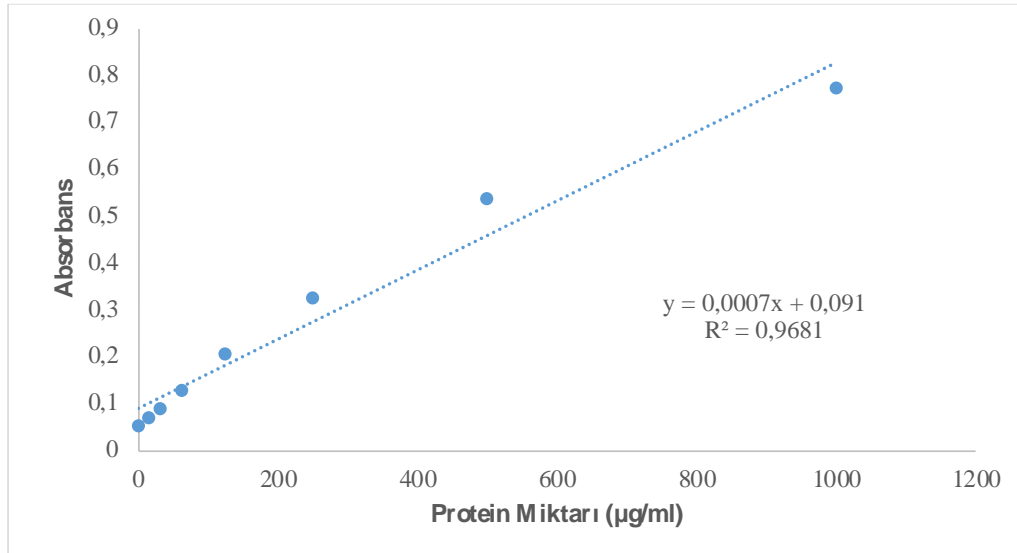
Yöntem Uygulanışı

1. 96 kuyucuklu bir plağa kör olarak deiyonize su, standartlar ve örneklerden her kuyucuğa 40 µL hacimde olacak şekilde mikropipet yardımıyla eklenmiştir.
2. Sonrasında kuyucukların üzerine deneyden önce taze hazırlanmış olan 40 µL hacimde bakır reaktifi mikropipet yardımıyla eklenmiştir.
3. Plak oda sıcaklığında 10 dak inkübe edilmiştir.

4. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 120 µL Folin-Fenol Reaktifi ilave edilerek ardından pllak 50°C sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon süresinin sonunda spektrofotometre ile 540 nm'de absorbans ölçülmüştür.

Protein Miktarının Hesaplanması

Protein miktarı hesaplanmasında, kalibrasyon doğrusu denklemi kullanılmıştır. Örneklerin kendi içerisinde absorbans değerlerinin ortalaması alınmıştır. Kör değeri, diğer tüm deney gruplarının değerlerinden çıkarılmıştır. Standartların 540 nm'deki ortalama absorbans değerleri ile oluşturulan bir standart grafiği çizilmiştir.



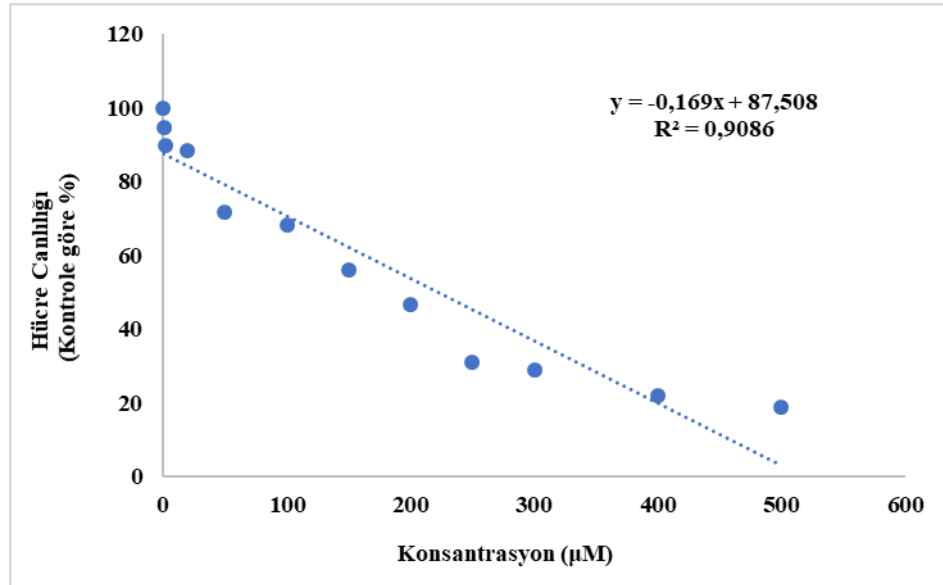
Şekil 3.1. Protein Miktarı Standart Eğrisi

4. BULGULAR

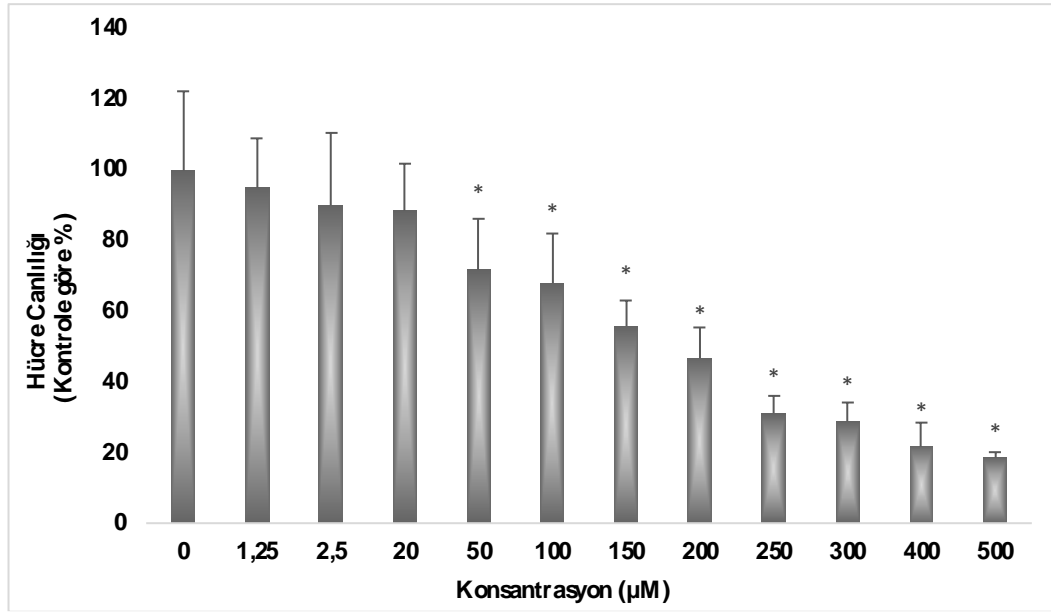
4.1. 3T3-L1 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksosite Tayini

BPA, BPF, RA, RV ve EGCG maddelerinin 3T3-L1 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Hücrelere besiyeri içerisinde hazırlanmış 0-500 μM konsantrasyon aralığında EGCG çözeltisi, 0-1000 μM konsantrasyon aralığında RA çözeltisi, 0-100 μM konsantrasyon aralığında RV çözeltisi, 0-1000 μM konsantrasyon aralığında BPA çözeltisi ve 0-1000 μM konsantrasyon aralığında BPF çözeltisi uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücrelere sadece besiyeri uygulanmıştır. Deney sonuçları kontrol grubu hücrelerinin canlılığına göre kıyaslanarak her bir doz için hücre canlılığı % canlılık olarak hesaplanmıştır.

0-500 μM konsantrasyon aralığında EGCG çözeltilerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 4.1., Şekil 4.2. ve Tablo 4.1.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Epigallokateşin gallatın 0-500 μM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.2. Epigallokateşin gallatın 0-500 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.

Tablo 4.1. Epigallokateşin gallatın 0-500 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.

EGCG Konsantrasyonu (µM)	Hücre Canlılığı (Kontrolle göre %)
0	100
1,25	94,72072
2,5	89,978896
20	88,338612
50	71,816669*
100	68,107434*
150	56,028704*
200	46,746044*
250	31,109192*
300	28,876366*
400	21,880502*
500	18,877222 *

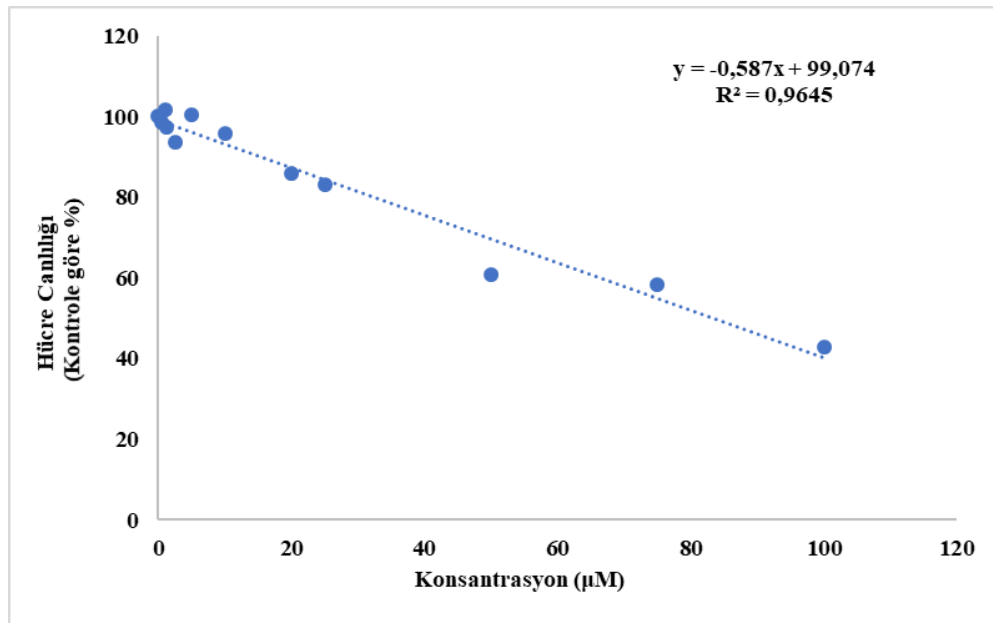
*p<0,05.

Tablo 4.2. Rosmarinik asidin 0-1000 μM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.

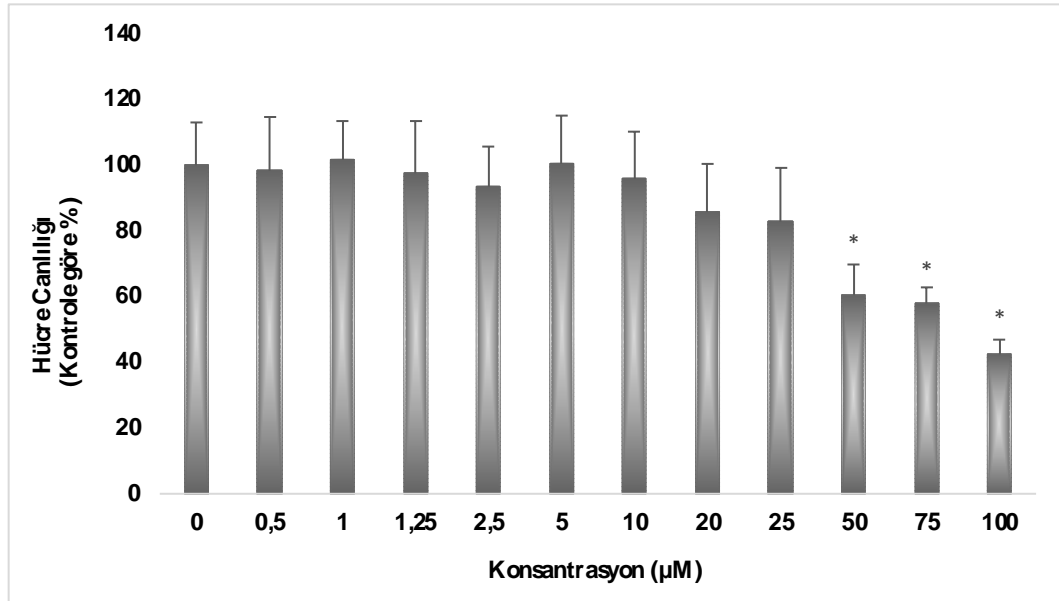
RA Konsantrasyonu (μM)	Hücre Canlılığı (Kontrole göre %)
0	100
5	106,00396
10	99,76665
20	89,459382
100	79,985083
200	62,232405*
300	52,048088*
400	46,795501*
500	44,474451*
750	42,448992*
1000	39,598973*

* $p < 0,05$.

0-100 μM konsantrasyon aralığında RV çözeltilerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 4.5., Şekil 4.6. ve Tablo 4.3.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.5. Resveratrolün 0-100 μM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.



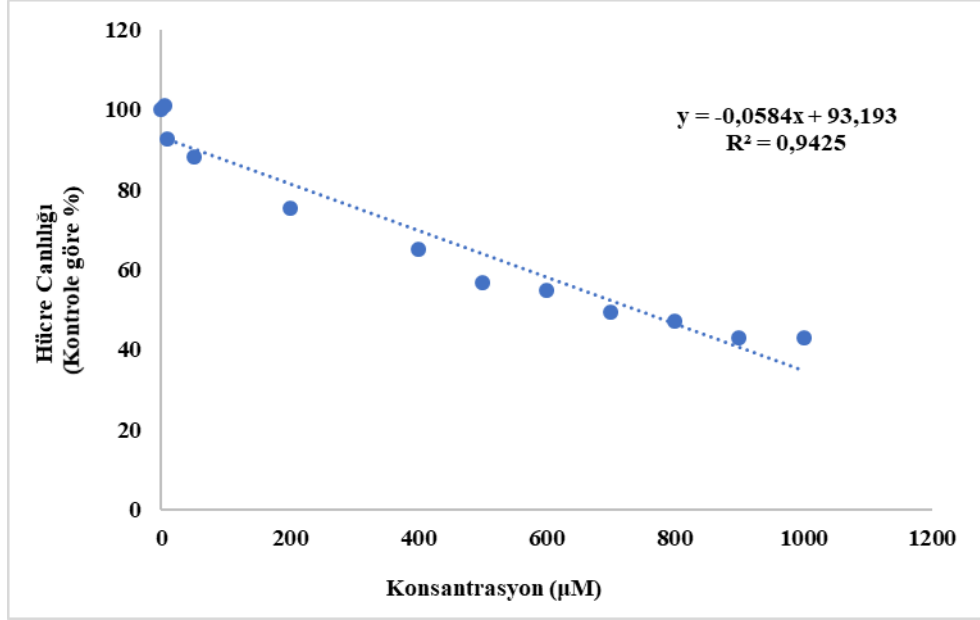
Şekil 4.6. Resveratrolün 0-100 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.

Tablo 4.3. Resveratrolün 0-100 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi

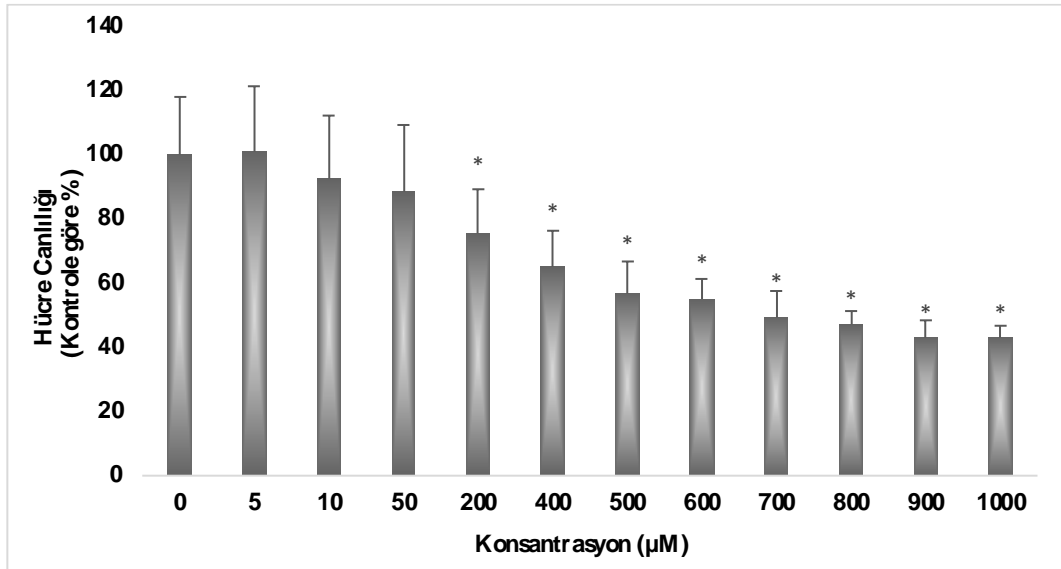
RV Konsantrasyonu (µM)	Hücre Canlılığı (Kontrolle göre %)
0	100
0,5	98,554807
1	101,80808
1,25	97,417939
2,5	93,725231
5	100,56773
10	95,848824
20	85,879233
25	83,077665
50	60,694302*
75	58,211632*
100	42,731106*

*p<0,05

0-1000 μM konsantrasyon aralığında BPA çözeltilerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 4.7., Şekil 4.8. ve Tablo 4.4.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.7. Bisfenol A'nın 0-1000 μM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.



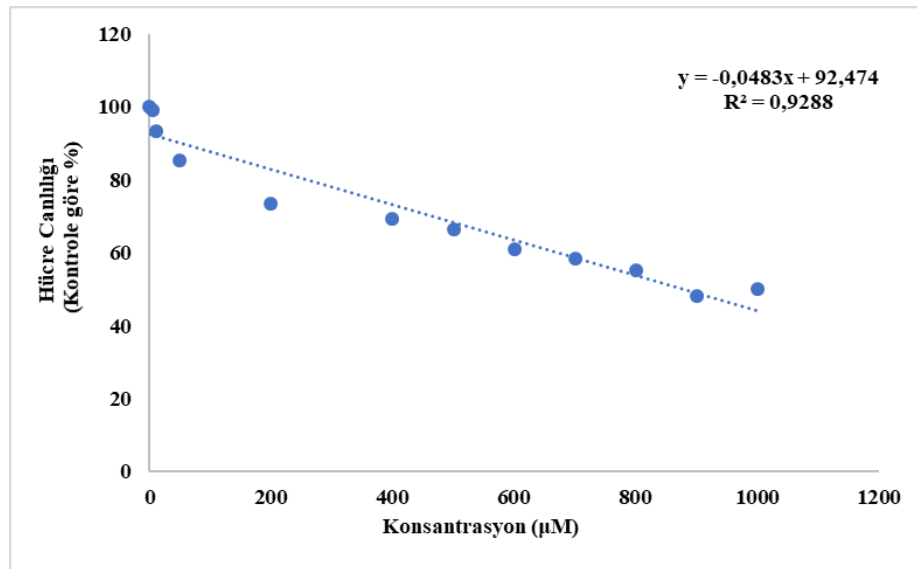
Şekil 4.8. Bisfenol A'nın 0-1000 μM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.

Tablo 4.4. Bisfenol A'nın 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.

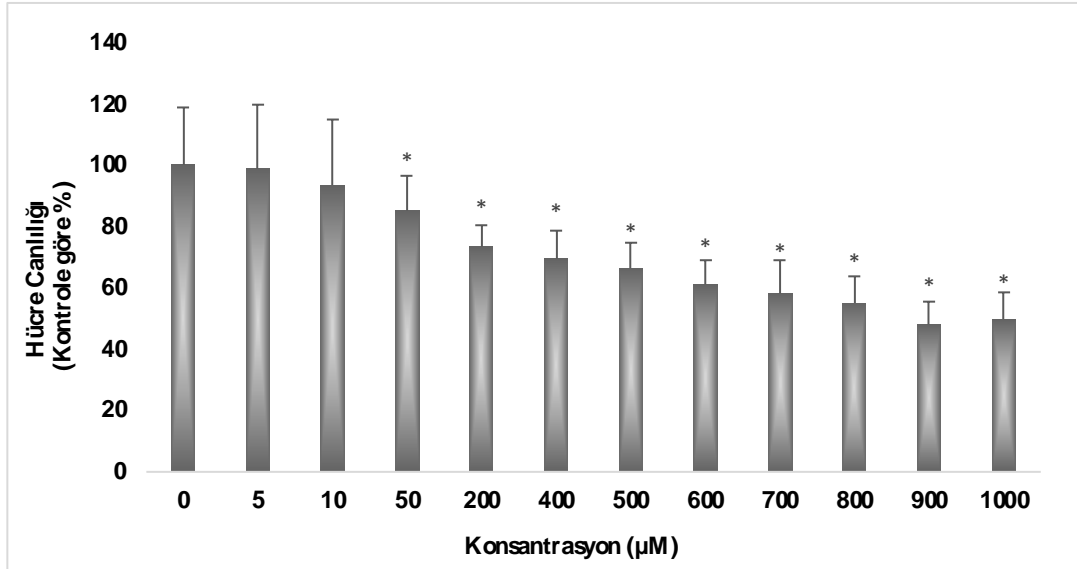
BPA Konsantrasyonu (µM)	Hücre Canlılığı (Kontrole göre %)
0	100
5	101,0337
10	92,66601
50	88,35542
200	75,36751*
400	65,16583*
500	56,78724*
600	54,94605*
700	49,26135*
800	47,17757*
900	43,08422*
1000	42,838*

*p<0,05

0-1000 µM konsantrasyon aralığında BPF çözeltilerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 4.9., Şekil 4.10. ve Tablo 4.4.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.9. Bisfenol F'nin 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.10. Bisfenol F'nin 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi.

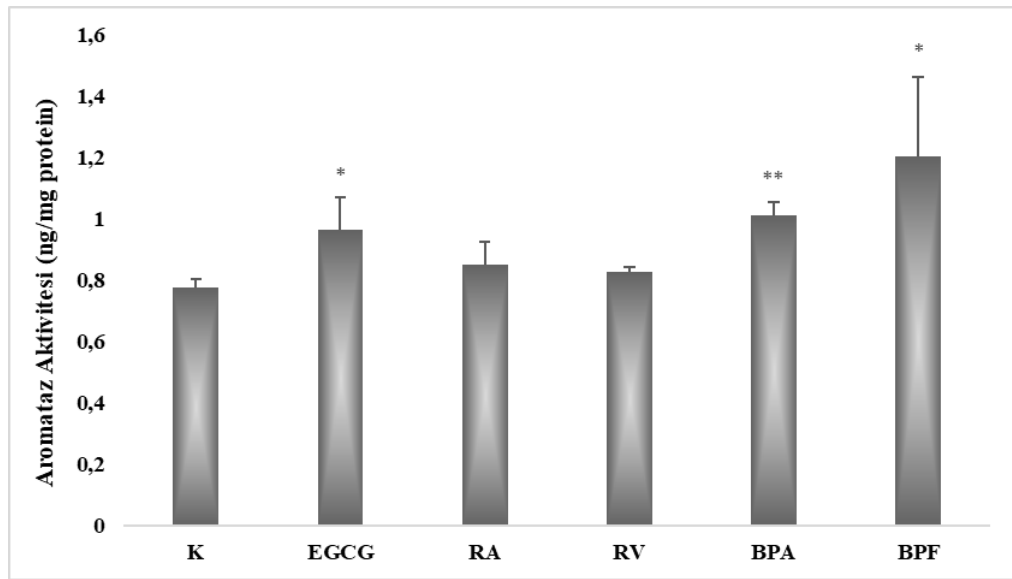
Tablo 4.5. Bisfenol F'nin 0-1000 µM konsantrasyon aralığında 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisi

BPF Konsantrasyonu (µM)	Hücre Canlılığı (Kontrolle göre %)
0	100
5	99,091828
10	93,476322
50	85,461815*
200	73,530723*
400	69,446179*
500	66,515057*
600	61,074943*
700	58,277594*
800	55,260263*
900	48,078124*
1000	50,037159*

*p<0,05

4.2. Aromataz Düzeylerinin Belirlenmesi

Deney gruplarında tespit edilen aromataz düzeyleri Şekil 4.11. ve Tablo 4.6.'da gösterilmektedir. Kontrol grubuna kıyasla EGCG (%24,44), BPA (%30,22) ve BPF (%55,21) gruplarına ait aromataz düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$, hepsi). Diğer gruplardaki değişiklikler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.11. Deney gruplarında belirlenen aromataz düzeyleri.

K: Kontrol grubu, EGCG: Epigallokateşin gallet grubu, RA: Rosmarinik asit grubu, RV: Resveratrol grubu, BPA: Bisfenol A grubu, BPF: Bisfenol F grubu
* $p<0,05$, ** $p<0,005$

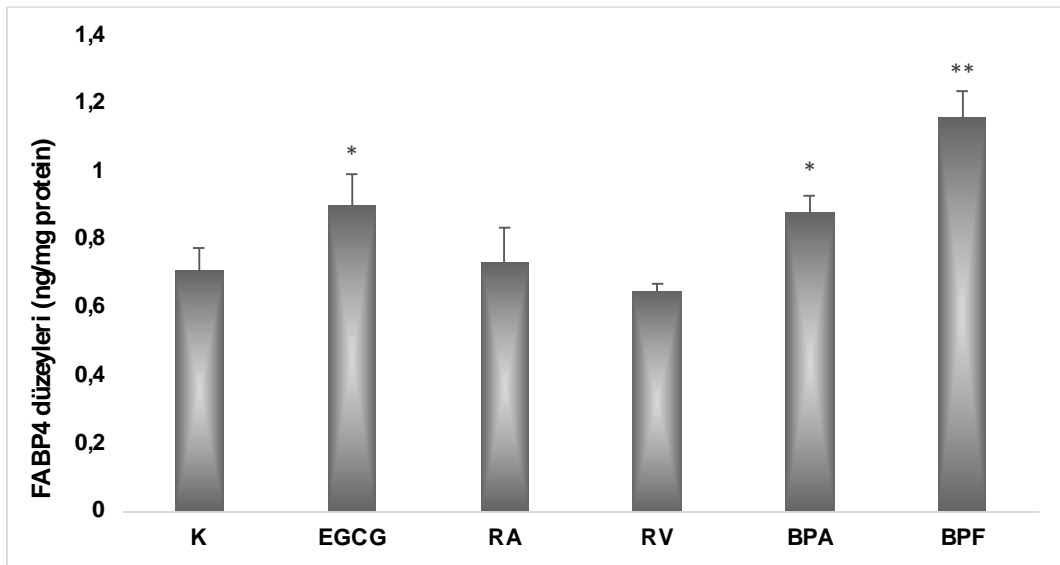
Tablo 4.6. Deney gruplarında belirlenen aromataz düzeyleri.

Deney Grubu	Aromataz Aktivitesi (ng/mg protein)
K	0,775 ±0,029
EGCG	0,965 ±0,104*
RA	0,849 ±0,077
RV	0,828 ±0,015
BPA	1,010±0,043**
BPF	1,203 ±0,260*

K: Kontrol grubu, EGCG: Epigallokateşin gallet grubu, RA: Rosmarinik asit grubu, RV: Resveratrol grubu, BPA: Bisfenol A grubu, BPF: Bisfenol F grubu
* $p<0,05$, ** $p<0,005$

4.3. FABP4 Düzeylerinin Belirlenmesi

Deney gruplarında belirlenen FABP4 düzeyleri Şekil 4.12. ve Tablo 4.7.'de gösterilmektedir. Kontrol grubuna kıyasla EGCG (%27,17), BPA (%24,46) ve BPF (%63,42) gruplarına ait FABP4 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0.05$, hepsi). Diğer gruplardaki değişiklikler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.12. Deney gruplarında belirlenen FABP4 düzeyleri.

K: Kontrol grubu, EGCG: Epigallokateşin gallet grubu, RA: Rosmarinik asit grubu, RV: Resveratrol grubu, BPA: Bisfenol A grubu, BPF: Bisfenol F grubu

* $p<0,05$, ** $p<0,005$

Tablo 4.7. Deney gruplarında belirlenen FABP4 düzeyleri

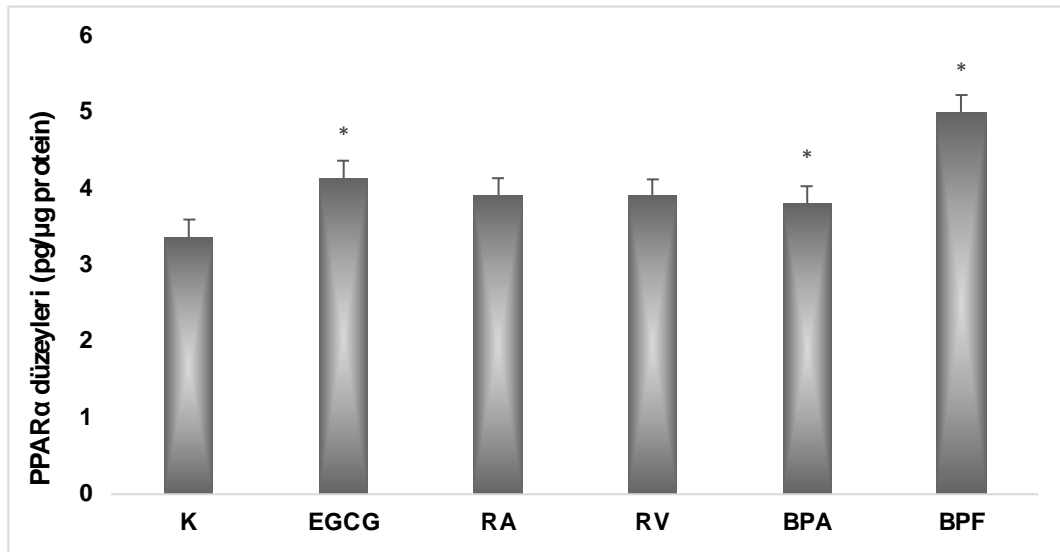
Deney Grubu	FABP4 Düzeyleri (ng/mg protein)
K	0,707 ± 0,068
EGCG	0,899 ± 0,092*
RA	0,731 ± 0,102
RV	0,645 ± 0,023
BPA	0,880 ± 0,048*
BPF	1,155 ± 0,079**

K: Kontrol grubu, EGCG: Epigallokateşin gallet grubu, RA: Rosmarinik asit grubu, RV: Resveratrol grubu, BPA: Bisfenol A grubu, BPF: Bisfenol F grubu

* $p<0,05$, ** $p<0,005$

4.4. PPAR α Düzeylerinin Belirlenmesi

Deney gruplarında belirlenen PPAR α düzeyleri Şekil 4.13. ve Tablo 4.8.'de gösterilmektedir. Kontrol grubuna kıyasla EGCG (%22,73), BPA (%12,98) ve BPF (%48,16) gruplarına ait PPAR α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0.05$). Diğer gruplardaki değişiklikler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.13. Deney gruplarında belirlenen PPAR α düzeyleri.

K: Kontrol grubu, EGCG: Epigallokateşin gallet grubu, RA: Rosmarinik asit grubu, RV: Resveratrol grubu, BPA: Bisfenol A grubu, BPF: Bisfenol F grubu
* $p<0,05$

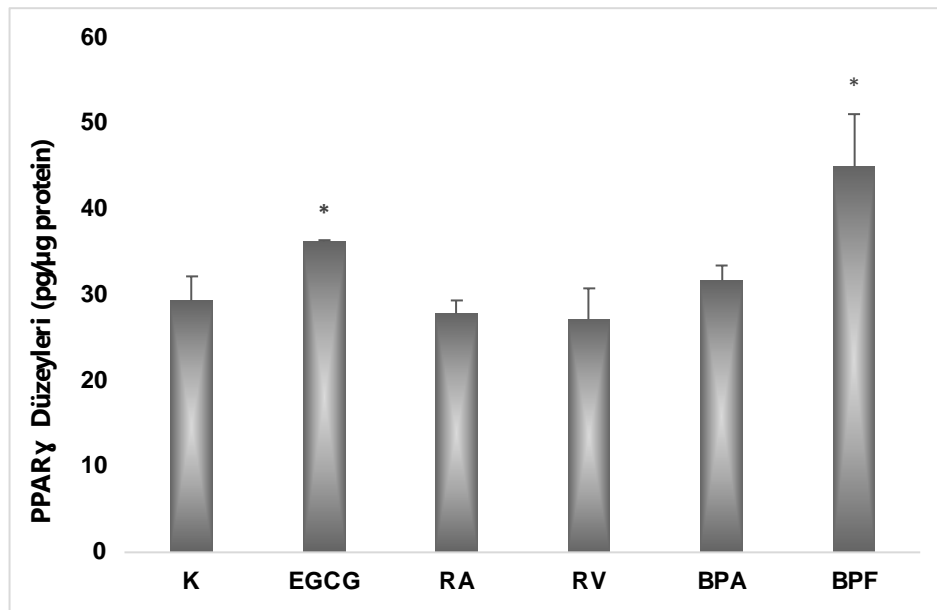
Tablo 4.8. Deney gruplarında belirlenen PPAR α düzeyleri

Deney Grubu	PPAR α Düzeyleri (pg/ μ g protein)
K	3,376 \pm 0,180
EGCG	4,143 \pm 0,261*
RA	3,917 \pm 0,807
RV	3,911 \pm 0,995
BPA	3,814 \pm 0,237*
BPF	5,002 \pm 0,832*

K: Kontrol grubu, EGCG: Epigallokateşin gallet grubu, RA: Rosmarinik asit grubu, RV: Resveratrol grubu, BPA: Bisfenol A grubu, BPF: Bisfenol F grubu
* $p<0,05$

4.5. PPAR γ Düzeylerinin Belirlenmesi

Deney gruplarında belirlenen PPAR γ düzeyleri Şekil 4.12. ve Tablo 4.7.'de gösterilmektedir. Kontrol grubuna kıyasla EGCG (%23,90) ve BPF (%53,50) gruplarına ait PPAR γ düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0.05$). Diğer gruplardaki değişiklikler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.14. Deney gruplarında belirlenen PPAR γ düzeyleri.

K: Kontrol grubu, EGCG: Epigallokateşin gallet grubu, RA: Rosmarinik asit grubu, RV: Resveratrol grubu, BPA: Bisfenol A grubu, BPF: Bisfenol F grubu

* $p<0,05$

Tablo 4.9. Deney gruplarında belirlenen PPAR γ düzeyleri

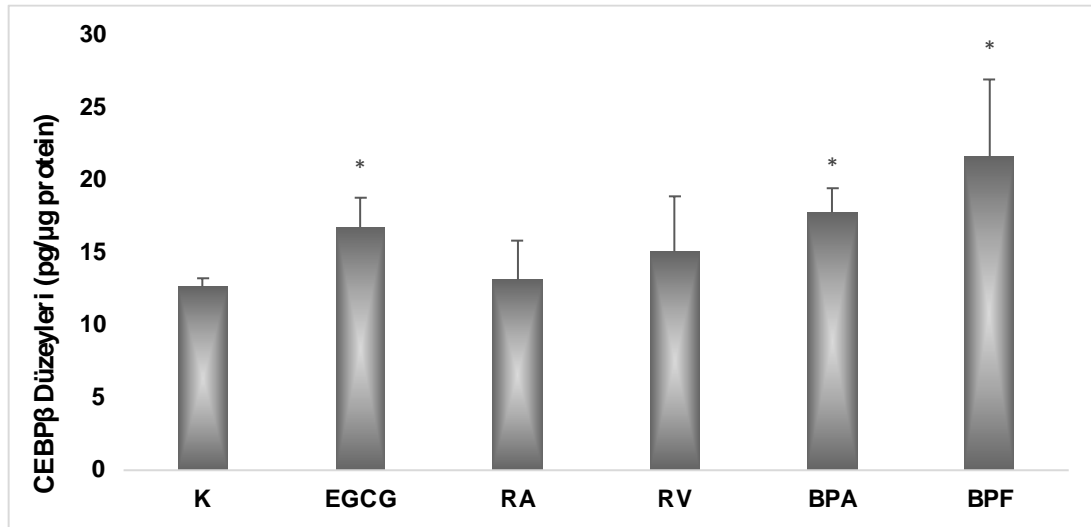
Deney Grubu	PPAR γ Düzeyleri (pg/ μ g protein)
K	29,336 \pm 2,861
EGCG	36,348 \pm 0,105*
RA	27,851 \pm 1,602
RV	27,201 \pm 3,596
BPA	31,761 \pm 1,734
BPF	45,033 \pm 6,070*

K: Kontrol grubu, EGCG: Epigallokateşin gallet grubu, RA: Rosmarinik asit grubu, RV: Resveratrol grubu, BPA: Bisfenol A grubu, BPF: Bisfenol F grubu

* $p<0,05$

4.6. CEBP β Düzeylerinin Belirlenmesi

Deney gruplarında belirlenen CEBP β düzeyleri Şekil 4.13. ve Tablo 4.8.'de gösterilmektedir. Kontrol grubuna kıyasla EGCG (%32), BPA (%39,44) ve BPF (%69,90) gruplarına ait CEBP β düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0.05$). Diğer gruplardaki değişiklikler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.15. Deney gruplarında belirlenen CEBP β düzeyleri.

K: Kontrol grubu, EGCG: Epigallokateşin gallet grubu, RA: Rosmarinik asit grubu, RV: Resveratrol grubu, BPA: Bisfenol A grubu, BPF: Bisfenol F grubu
* $p<0,05$

Tablo 4.10. Deney gruplarında belirlenen CEBP β düzeyleri.

Deney Grubu	CEBP β Düzeyleri (pg/ μg protein)
K	12,735±0,485
EGCG	16,811±1,974*
RA	13,205±2,603
RV	15,107±3,818
BPA	17,757±1,689*
BPF	21,637±5,354*

K: Kontrol grubu, EGCG: Epigallokateşin gallet grubu, RA: Rosmarinik asit grubu, RV: Resveratrol grubu, BPA: Bisfenol A grubu, BPF: Bisfenol F grubu
* $p<0,05$

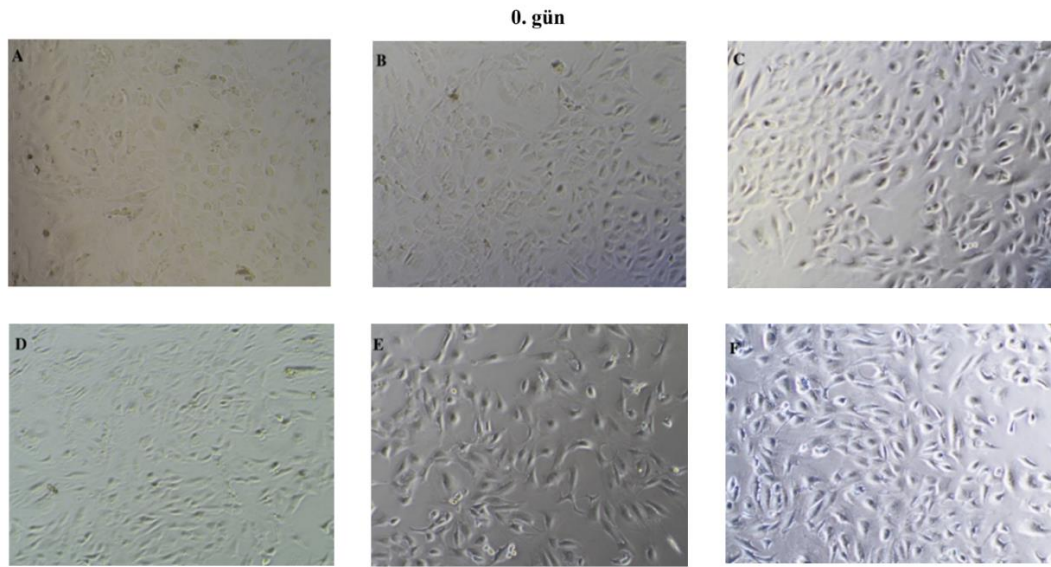
4.7. Sitopatoloji

Deney gruplarına ait örneklerin Nikon inverted mikroskop altında incelenmesinde fibroblasttan farklılaştırma prosedürü ile adiposite dönüştürülen 3T3-L1 hücreleri izlenmiştir. Farklılaşmanın 0. gününde tüm deney gruplarında flasklarda fibroblast benzeri iğsi görünümde hücreler izlenmiştir (Şekil 4.16.)

Farklılaşmanın 3. gününde hücrelerin adiposite dönüşümü gözlenmeye başlanmıştır. EGCG, BPA ve BPF gruplarında adiposite dönüşen 3T3-L1 hücreleri çoğunlukta iken RA ve RV gruplarında diğer gruplara ve kontrole kıyasla daha seyrek olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.).

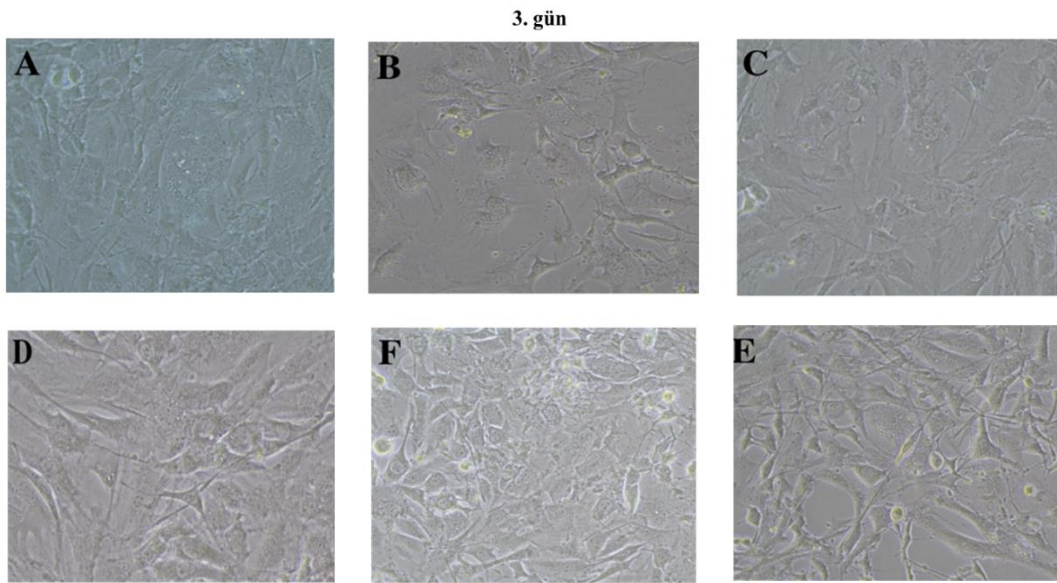
Farklılaşmanın 6. gününde hücrelerin adiposite dönüşümünün devam ettiği ve buna ek olarak yağ hücresine dönüşen hücrelerin sayı ve boyutlarında artış da gözlemlenmiştir. EGCG, BPA ve BPF gruplarında bu durum daha yoğun gözlemlenirken, RA ve RV gruplarında diğer gruplara ve kontrole kıyasla daha az olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.19. ve Şekil 4.20.).

Farklılaşmanın 8. gününde hücrelerin adiposite dönüşümünün devam ettiği ve buna ek olarak yağ hücresine dönüşen hücrelerin sayı ve boyutlarında da artış gözlemlenmiştir. EGCG, BPA ve BPF gruplarında bu durum daha yoğun gözlemlenirken, RA ve RV gruplarında diğer gruplara ve kontrole kıyasla daha az olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.21. ve Şekil 4.22.).



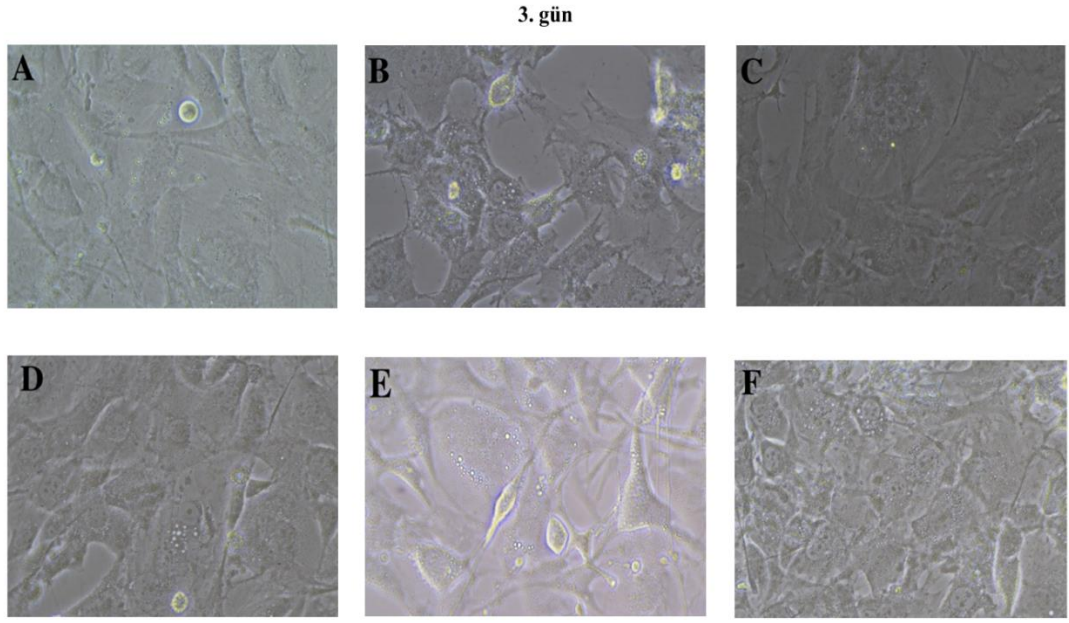
Şekil 4.16. Farklılaşmanın 0. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x10).

A: Kontrol B: Epigallokateşin gallat, C: Rosmarinik asit, D: Resveratrol, E: Bisfenol A, F: Bisfenol F.



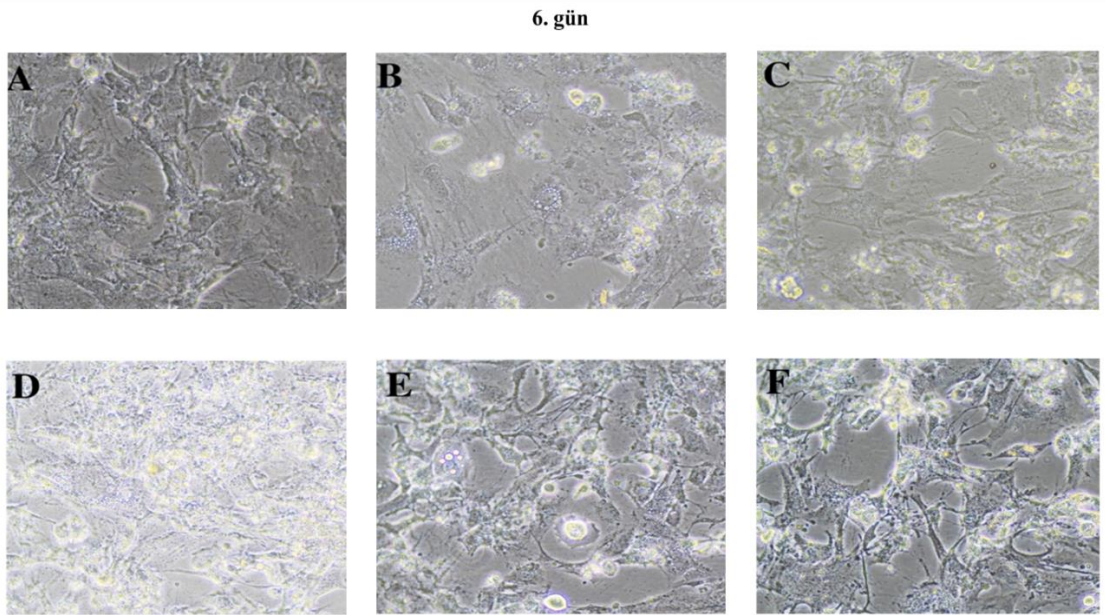
Şekil 4.17. Farklılaşmanın 3. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x20).

A: Kontrol B: Epigallokateşin gallat, C: Rosmarinik asit, D: Resveratrol, E: Bisfenol A, F: Bisfenol F.



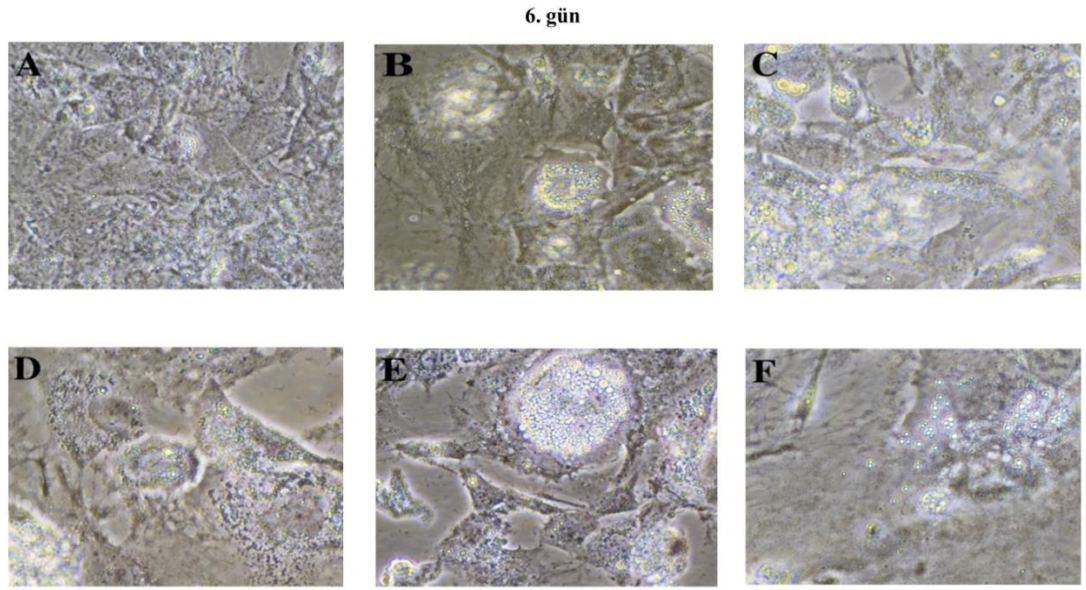
Şekil 4.18. Farklılaşmanın 3. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x40).

A: Kontrol B: Epigallokateşin gallat, C: Rosmarinik asit, D: Resveratrol, E: Bisfenol A, F: Bisfenol F.



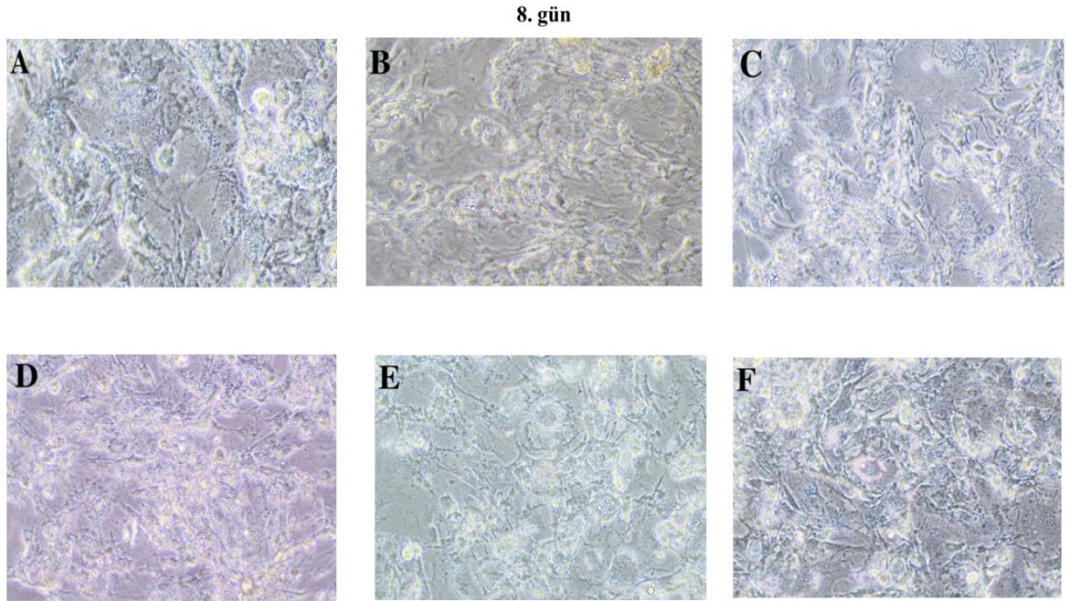
Şekil 4.19. Farklılaşmanın 6. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x20).

A: Kontrol B: Epigallokateşin gallat, C: Rosmarinik asit, D: Resveratrol, E: Bisfenol A, F: Bisfenol F.



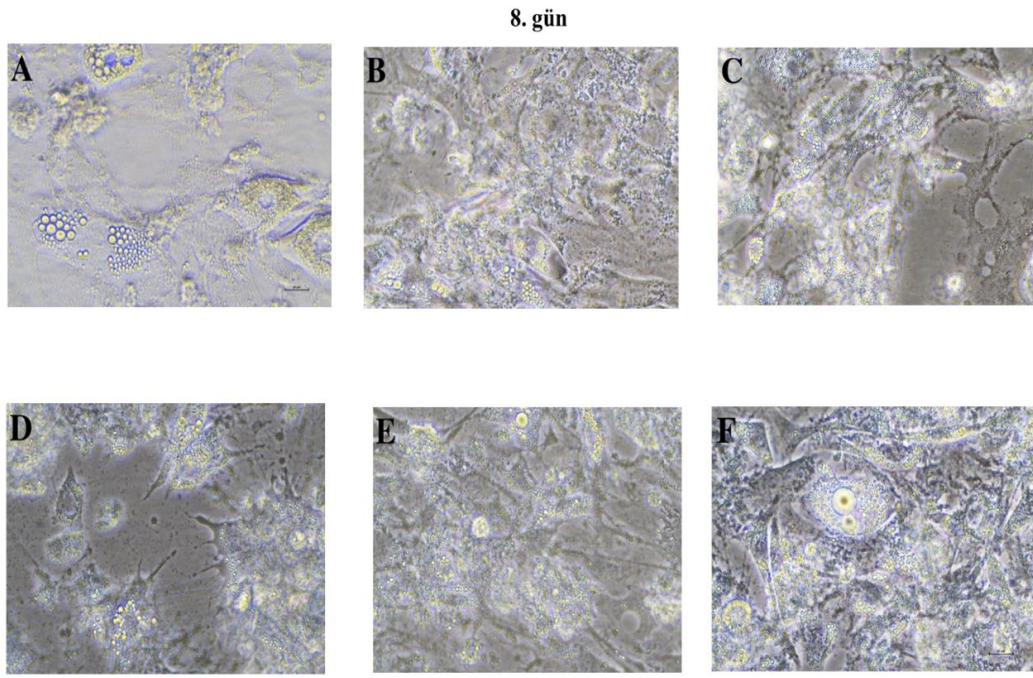
Şekil 4.20. Farklılaşmanın 6. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x40).

A: Kontrol B: Epigallokateşin gallat, C: Rosmarinik asit, D: Resveratrol, E: Bisfenol A, F: Bisfenol F.



Şekil 4.21. Farklılaşmanın 8. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x20).

A: Kontrol B: Epigallokateşin gallat, C: Rosmarinik asit, D: Resveratrol, E: Bisfenol A, F: Bisfenol F.



Şekil 4.22. Farklılaşmanın 8. gününde deney gruplarının mikroskop altındaki görüntüsü (x40).

A: Kontrol B: Epigallokateşin gallat, C: Rosmarinik asit, D: Resveratrol, E: Bisfenol A, F: Bisfenol F.

5. TARTIŞMA

Obezite, son otuz yılda prevalansı büyük artış gösteren, henüz kesin bir tedavisi olmayan önemli bir sağlık sorunudur (15). Obezite, diyabet, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalık gibi metabolik hastalıklar için en önemli risk faktörlerinden biridir (192).

Obezitede genetik yatkınlık en önemli etmen olmasına rağmen aşırı kalori alımı, yüksek yağlı diyet ve düşük fiziksel aktivite gibi yaşam tarzı faktörleri de etkindir. Ancak, EBK'ler dahil olmak üzere çevre kirleticilerinin obeziteye ve metabolik bozuklukların gelişimine katkıda bulunabileceğine dair artan kanıtlar da vardır. EBK'ler enerji dengesi, adipogenez ve lipit metabolizmasında yer alan kritik yolları etkileyebilir (193, 194).

Obezite, yağ dokusunun aşırı artışı ile karakterizedir. Yağ dokusu oluşumunun altında yatan moleküler mekanizmaların ve adipogenezde etkili faktörlerin anlaşılması, obezite ve ilgili hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için büyük önem arz etmektedir. Adipogenez, preadipositlerin adipositlere farklılaşmasına ve hücre içi yağ birikimiyle karakterize karmaşık bir süreçtir ve adipogenez sürecinin PPAR γ ve C/EBP'ler gibi ana adipojenik düzenleyiciler de dahil olmak üzere bir dizi adipojenik transkripsiyonel biyomarkör tarafından düzenlendiği iyi bilinmektedir (195).

3T3-L1 preadiposit hücreleri, obezojenlerin lipit akümüülasyonu ile ilgili yolların belirlenmesi ve adiposit farklılaşmasının değerlendirilmesi için sıklıkla kullanılmaktadır (192, 194).

Östrojen biyosentezindeki anahtar enzim olan ve aromataz, androstenedionu östrona ve testosteronu östradiole dönüştürür. Aromataz overler, plasenta, kemik, beyin, deri ve yağ dokusu gibi çeşitli dokularda eksprese edilir. Aromataz enzimi CYP 19A1 tarafından kodlanır ve ekspresyonu dokuya özgü promotörler tarafından kontrol edilmektedir (196).

PPAR α , ağırlıklı olarak karaciğerde eksprese edilen ve adipositlerde lipit depolanmasına yol açan adipogenezin temel düzenleyicilerinden birisidir (196). *İn vivo* çalışmalarda, PPAR α knock-out farelerin yüksek yağlı bir diyetle beslenmesinin vücut ağırlığında aşırı bir artışa yol açtığı; buna karşın PPAR α 'nın aktivasyonunun kilo alımını azalttığını gösterilmiştir (51). Ayrıca, obeziteye bağlı insülin direnci olan farelerde PPAR α eksikliğinin, pankreas β hücrelerinin insülin sekresyonunda

azalmayla yol açtığı gösterilmiştir (50). PPAR γ ise, adiposit farklılaşmasının en önemli regülatörlerinden biridir ve adipositlerde yüksek miktarlarda bulunur (49). EBK'lerin ve obezojenlerin, özellikle PPAR γ üzerinden lipit akışını, adiposit proliferasyonunu ve adiposit farklılaşmasını kontrol eden transkripsiyonel düzenleyicilere müdahale ettiği ve adipositlerin sayısını ve boyutunu artırabildiği öne sürülmektedir (57).

FABP4, tüm FABP ailesinin en iyi karakterize edilmiş molekülüdür. Tipik bir hücre içi lipit şaperonu olarak görev yapar ve lipit depolanmasını, dağılımını, taşınmasını, parçalanmasını ve metabolizmasını desteklemekten sorumludur (61). Plazma FABP4 düzeyleri obez bireylerde önemli ölçüde yükselmektedir ve obez bireylerde çeşitli doku türlerinde artmış FABP4 düzeyleri saptanmıştır (65). C/EBP β karaciğer, akciğer ve yağ dokusunda yüksek seviyelerde ekprese edilen transkripsiyon faktörlerinden birisidir (197).

Adipogenezin, aralarında C/EBP β 'nin önemli bir rol oynadığı çok sayıda transkripsiyonel faktörden oluşan transkripsiyonel bir kaskad tarafından kontrol edildiği bilinmektedir (198). C/EBP β , adipojenik uyarıcıların eklenmesinden sonra hızla indüklenerek iki ana adipojenik transkripsiyon faktörü olan C/EBP α ve PPAR γ 'nin ekspresyonunu, promotörlerine bağlanarak indüklemekten sorumludur ve C/EBP β 'nin terminal adiposit farklılaşmasını desteklediği düşünülmektedir (199). 3T3-L1 adiposit farklılaşması sırasında, C/EBP β 'nin terminal adiposit farklılaşmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür (199).

Adipogenezin kontrol eden süreçlerin ayrıntılı bir şekilde anlaşılması, obeziteye karşı mücadelede büyük önem arz etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, doğal [RV, RA ve EGCG] ve sentetik EBK [BPA, BPF]'lerin diferensiyel edilmiş ve adipozite dönüştürülmüş 3T3-L1 fibroblastlarındaki etkileri aromataz, FABP4, PPAR α , PPAR γ ve C/EBP β düzeyleri ölçülerek değerlendirilmiştir.

Bisfenol analogları çevrede yaygın olarak bulunan çevresel EBK'lerdir (200). Dong ve ark., (2018) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, 1 ve 10 nM BPA'nın insan mezenkimal kök hücreleri (hMSC) adipogenezini anormal şekilde up regüle edebileceği kanıtlanmıştır (201). BPS ve BPF'in de *in vitro* olarak, özellikle fare 3T3-L1 preadipositleri gibi hücrelerde adipogenezin indüklediği ve hücre içi lipit birikimine yol açtığı gösterilmiştir. BPS ve BPF'nin farklı konsantrasyonlarına (0.01, 0.1, 1, 10

ve 25 μM) maruz kalan insan adiposit kaynaklı kök hücreleriyle (hASC'ler) yapılan bir araştırmada, BPF ve BPS uygulamalarının, adipojenik etkileri artırarak, hASC'lerin farklılaşmasını etkilediği belirlenmiştir. Sonuçlar, her iki bisfenolün de potansiyel obezojenler olduğunu ve yağ hücrelerinin sayısını ve/veya boyutunu artırarak obeziteyi indüklediğini göstermektedir (22). İnsan adiposit kaynaklı kök hücreleriyle (hASC'ler) ile yapılan başka bir çalışmada, BPF veya BPS uygulamalarının hücre içi lipit birikiminde ve FABP4 dahil adipojenik biyomarkörlerin gen ekspresyonunda doz-bağımlı artışlara yol açtığı gözlemlenmiştir (Reina-Pérez ve ark., 2021).

Rosenmai ve ark. (2015) BPF'nin, β -estradiol ve estron sentezini stimüle ederek, insan over adenokarsinomu hücre hattında ER ve androjen reseptörü aktiviteleri üzerinde BPA'ya benzer etkiler gösterdiğini bulmuşlardır (202). Yamasaki ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada BPF'nin genç farelerde over büyümesini hızlandırabileceği belirlenmiştir. Ayrıca, *in vitro* BPF uygulaması, fare fetal testis eksplantlarında ve fare Leydig hücrelerinde testosteron üretimini etkilemiştir (Tyner ve ark., 2022). Ancak, Chen ve ark. (2022)'nin yaptığı bir çalışmada, 3T3-L1 hücre hattı adipositlere diferensiye edilmiş ve 24 saat veya 48 saat boyunca 0, 1, 5, 10 ve 20 μM BPF'ye maruz bırakılmıştır. Bu konsantrasyonlarda BPF'nin 3T3-L1 adipositlerde lipit birikimi üzerinde hiçbir etkisi olmadığı belirlenmiştir (203).

Tetzlaff ve ark. (2019), 3T3-L1 hücrelerini 0-40 μM aralığında BPA ve BPF'ye maruz bırakmış, lipit birikiminin en çok 10 μM konsantrasyonda meydana geldiğini ifade etmişlerdir. Aynı alışmada 30 μM 'ye kadar olan konsantrasyonlarda PPAR γ transaktivasyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki bulunmamıştır (204).

Masuno ve ark. (2005), BPA'nın 3T3-L1 hücrelerinin adipositlere terminal farklılaşmasını hızlandırma yeteneğine sahip olup olmadığını incelemişler ve 3T3-L1 hücrelerine 40 ve 80 μM dozlarda 6 gün süre ile uygulanan BPA'nın, trigliserit içeriğini sırasıyla %110 ve %310 oranında arttırdığını ifade etmişlerdir (200).

Taxvig ve ark. (2012), BPA'nın 3T3-L1 adipositlerinde terminal farklılaşma ve lipit birikimi üzerindeki etkisini incelemiştir. Çalışma kapsamında hücrelere farklılaşma ortamında 6 gün boyunca uygulanan BPA ile sırasıyla 10 ve 20 μM konsantrasyonlarından itibaren lipit birikiminin indüklendiği ifade edilmiştir. BPA ayrıca 10 ila 1000 nM aralığındaki düşük konsantrasyonlarda da test edilmiş; ancak

düşük konsantrasyonlarda lipit birikimi üzerinde önemli bir etkisinin bulunmadığı ifade edilmiştir (205).

Resveratrol gibi polifenollerin, RA gibi kafeik asit türevlerinin ve EGCG gibi kateşin türevlerinin olası östrojenik aktiviteleriyle ilgili de bazı çalışmalar yürütülmüştür. Ancak, RV, RA ve EGCG gibi maddelerin östrojenik aktivitelerinin bisfenoller kadar yüksek olmadığı; bu tip doğal bileşiklerin aslında çok daha hızlı metabolize edilerek atılabildikleri bilinmektedir (41, 147, 148). 2021 yılında yapılan bir çalışmada, insan yağ hücrelerinde RA uygulamasının lipit birikimini baskıladığı, lipolizi arttırdığı ve temel yağ oluşumunu azalttığı görülmüştür (206).

Bose ve ark. (2008) 16 hafta boyunca yüksek yağlı bir diyetle beslenen farelerin diyetine 3.2 g/kg EGCG (bu çalışmada farelerde kullanılan 3.2 g EGCG/kg diyet dozu, günde 10 tane 200 mL lik fincanlarda yeşil çaya ve fincan başına 2 g çay yaprağına karşılık gelmektedir) takviyesinin, EGCG uygulanmamış farelere göre vücut ağırlığı artışını, vücut yağ yüzdesini ve iç organ yağ ağırlığını azalttığını göstermiştir. Sonuçlar, ayrıca EGCG tedavisinin obezite gelişimini, metabolik sendromla ilişkili semptomları ve hepatik steatozu azalttığını göstermektedir. 16 haftalık EGCG tedavisinin toplam vücut yağ yüzdesini ve visseral vücut yağ ağırlığını da önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (150).

Suzuki ve ark., (2016) tarafından yapılan çalışmada, yeşil çay ve gallokateşinlerin (GTC) C/EBP α , PPAR γ ve LXR dahil olmak üzere adipogenezde yer alan genlerin ve proteinlerin ekspresyonunu baskıladığını göstermiştir (151). 3T3-L1 hücrelerinde PIP ve EGCG'nin anti-adipojenik aktivitesini değerlendirmeyi amaçlayan çalışmanın sonuçları, PIP + EGCG (her biri 20 μ M) kombinasyonu uygulanan 3T3-L1 adipositlerinde leptin düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını ve adiponektin düzeylerinde artışı göstermektedir (28).

Obezite ve adipogenezde RV'nin etkilerini inceleyen *in vitro* bir çalışmada, 3T3-L1 hücrelerine RV uygulamasının PPAR γ ve C/EBP α gibi adipogenezde yer alan anahtar transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu azaltarak adiposit farklılaşmasını ve lipit birikimini azalttığı belirlenmiştir (164).

Tez kapsamında ölçülen parametrelere dair literatür verileri ve tez bilgilerinin tartışılması beş başlık altında toplanmıştır:

5.1. Doğal ve Sentetik Yapılı Endokrin Bozucu Kimyasalların Aromataz Düzeyleri Üzerindeki Etkileri

Vatanabe ve ark. (2012), BPA'nın aromataz ekspresyonu üzerindeki etkilerini insan osteoblastik (SV-HFO) ve yumurtalık granüloza benzeri (KGN) hücre hatlarında incelemişlerdir. Aromataz enzim aktivitesinin her iki hücre hattında da BPA varlığında doza bağlı bir şekilde baskılandığı sonucuna ulaşmışlardır. SV-HFO hücrelerinde 35 µM ve KGN hücrelerinde 50 µM BPA konsantrasyonuna 24 saatlik maruziyet sonrası aromatazın akitivitesinde ciddi bir azalma olduğunu ifade etmişlerdir (207).

Huang ve Leung, 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada JEG-3 ve PL30 hücrelerinde BPA'nın aromataz düzeylerine etkisini incelemişlerdir. JEG-3 hücrelerinde 5 µM ve PL30 hücrelerinde 25 µM ve üzerindeki konstrasyonlarda BPA'ya 24 saatlik maruziyetin aromataz düzeylerinde azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir (208).

2014 yılında yayınlanan bir çalışmada ise, yetişkin erkek ve dişi murray gökküşağı balıklarında (*Melanotaenia fluviatilis*) 100 veya 500 µg/L konsantrasyonlarda 24, 48 ve 96 saatlik BPA maruziyetinin aromataz düzeylerinde herhangi bir değişime neden olmadığı ifade edilmiştir (209). 2019 yılında insan meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada 10^{-8} M konsantrasyonda BPA'ya 7 günlük maruziyet sonrasında aromataz düzeylerinde ve aromataz enzim aktivitelerinde önemli düzeyde bir artış olduğu belirtilmiştir (210).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 5 µM konsantrasyonda BPA uygulanmıştır. BPA uygulamasının aromataz düzeylerini kontrole göre %30,22 arttırdığı belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla BPA grubunda aromataz düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$). Bilgimiz dahilinde literatürde BPF'nin 3T3-L1 hücrelerindeki aromataz düzeyleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında BPF uygulamasının aromataz düzeylerini kontrole göre %55,21 arttırdığı belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla BPA grubunda aromataz düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$).

Satoh ve ark. (2002)'nin yaptığı bir çalışmada, erkek sıçanlara 2-8 hafta boyunca %5 oranında yeşil çay özütü ve kateşinleri içeren solüsyonun oral yoldan

verilmesinin konsantrasyona bağılı olarak aromataz aktivitesi üzerinde inhibe edici etkileri olduğunu ifade edilmiştir (211). Monteiro ve ark. (2006)'nın yaptıkları çalışmada ise, koryokarsinom kaynaklı JAR hücrelerinde 3 saatlik temastan sonra, EGCG'nin aromataz aktivitesini inhibe ettiğini ve IC₅₀ değerinin 1770 µmol/L olduğunu bildirilmiştir (212).

Goodin ve Rosengren 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada dişi Swiss-Webster farelerine 7 gün boyunca 12,5, 25 veya 50 mg/kg/gün dozlarda intraperitoneal enjeksiyon yoluyla EGCG uygulamışlardır. Bunun sonucunda 25 ve 12,5 mg/kg dozlarında EGCG uygulanmasının over aromataz aktivitesini kontrole göre yaklaşık %56 oranında azalttığını bulmuşlardır (213).

Hasan ve ark., (2019), erkek sıçanlara 80 mg/kg/gün optimum dozda intraperitoneal olarak 49 gün boyunca EGCG uygulamış ve ECGC maruziyetinin aromataz ekspresyonunu indüklediğini ifade etmişlerdir (214). Rosario ve ark. 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada erkek sıçanlara 6 ay boyunca 52,8 ± 6,4 mL/gün dozunda yeşil çayı oral uygulama ile vererek aromataz düzeyleri ve adiposit boyutundaki artışları incelemişlerdir. Yeşil çay maruziyeti adiposit boyutunda azalmaya neden olurken, aromataz ekspresyonunda kontrole göre ciddi bir artışa yol açmıştır. Aromataz ekspresyonundaki bu artışın, daha yüksek plazma 17 β -estradiol konsantrasyonuna neden olduğu ifade edilmiştir (215).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 1,25 µM konsantrasyonda EGCG uygulanmıştır. EGCG uygulamasının aromataz düzeylerini kontrole göre %24,44 arttırdığı belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla EGCG grubunda aromataz düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür (p<0,05).

Wang ve ark., 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada MCF-7aro hücre hattına 25 µM'lik bir IC₅₀ konsantrasyonuyla 48 saat boyunca uygulanan RV'nin aromataz düzeyleri üzerinde inhibitör bir etki gösterdiğini ifade etmişlerdir. Aynı çalışmada, meme kanseri hücre hattı SK-BR-3 kullanılarak 3 gün boyunca 50 µM RV uygulaması, aromataz ekspresyonunda %55'lik bir düşüşe yol açmıştır (216). Chottanapund ve ark., (2014) yapılan çalışmada T47D meme tümör hücrelerinin meme fibroblastları ile birleştirilmesi ile oluşturulan T47D-BAF kültüründe, 20 µM konsantrasyonda uygulanan RV'nin aromataz inhibitörü olarak etki gösterdiği öne sürülmüştür (217).

Wang ve Leung (2007), RV'nin insan plasental JEG-3 hücrelerine 24 saat 25 μ M uygulanmasının aromataz ekspresyonunda %75'lik bir düşüşe yol açtığını belirtmişlerdir (218) .

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 5 μ M konsantrasyonda RV uygulanmıştır. RV uygulamasının aromataz düzeylerini kontrole göre %6,8 arttırdığı belirlenmiştir. Aromataz düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

RA, sıçanlarda kısmen kumarik asit ve kafeik aside metabolize edilir. Kafeik asit ve sinapik asitin, östrojen eksikliği olan sıçanlarda serum estradiol konsantrasyonlarını arttırdıkları belirlenmiştir. Sıçanlarda ovülasyonda, yağ dokusu, deri, kemikler ve beyin gibi over dışı dokular da estradiol kaynağıdır ve bu dokularda da C19 steroidler (androjenler) sentezlenmektedir. C19 steroidler, aromataz ile östrojenlere dönüştürülebilir. Bu nedenle, RA veya metabolitlerinin aromataz aktivitesini artırması mümkün görünmektedir. Kafeik asit, sadece soya içeren standart gıda ile beslenen sıçanlarda estradiolü arttırmış ve toplam kolesterol konsantrasyonlarını azaltmıştır (147, 148). Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 10 μ M konsantrasyonda RA uygulanmıştır. RA uygulamasının aromataz düzeylerini kontrole göre %9,5 arttırdığı belirlenmiştir. Aromataz düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

5.2. Doğal ve Sentetik Yapılı Endokrin Bozucu Kimyasalların

Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör Alfa (PPAR α) Düzeyleri Üzerindeki Etkileri

Bilgimiz dahilinde BPA ve BPF'nin 3T3-L1 hücrelerindeki PPAR α düzeyleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 5 μ M konsantrasyonlarda BPA ve BPF uygulamasının PPAR α düzeylerini kontrole göre sırasıyla %12,98 ve %48,16 arttırdığı belirlenmiştir. PPAR α düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Zhang ve ark. (2013)'nın, insan pankreas hücre hattı PANC1 ve yumurtalık kanseri hücre hattı A2780 kullanarak gerçekleştirdikleri bir çalışmada hücrelere 24 saat boyunca farklı EGCG konsantrasyonlarına (0, 50 ve 100 μ M) maruz bırakılmasının her 2 hücre hattında da doz artışına paralel şekilde EGCG'nin PPAR α ekspresyon düzeylerini artırdığını belirlenmiştir (219).

Lukitasari ve ark. (2018) metabolik sendromlu Sprague-Dawley sıçanlarda, yeşil çay ekstresinin 200, 300 ve 400 mg/kg dozlarda 9 hafta boyunca uygulanmasının PPAR α gen ekspresyonunu anlamlı derecede artırdığını ifade etmişlerdir (220). 2019 yılında yapılan bir çalışmada, COS-1 hücreleri 24 saat boyunca yeşil çay ekstresine maruz bırakılmıştır. Yeşil çay ekstresinin %0,001 konsantrasyonunda PPAR α aktivasyonu uyarılmaya başlanmış ve %0,01 konsantrasyonun üzerindeki seviyeler stabil bir PPAR α aktivasyonuna neden olmuştur. İlgili çalışmanın sonuçlarına göre, yeşil çay ekstreleri ve taze yeşil çay yapraklarının önemli bir bileşeni olan EGCG, kontrol ile karşılaştırıldığında PPAR α düzeylerini 1,5-2 kat artırmıştır (221).

Marinovic ve ark. 2022 yılında yaptığı bir çalışmada, 293T hücrelerinde bir transaktivasyon testi gerçekleştirmişlerdir ve 100 nM dozda EGCG'nin PPAR izoformlarından (*PPAR α* , *PPAR δ* ve *PPAR γ*) hiçbirini aktive edemediğini gözlemlemişlerdir. Artan konsantrasyonlarda EGCG'nin PPAR α 'ya düşük bir afiniteyle doğrudan bağlanabildiğini ve EGCG'nin düşük afiniteli bir PPAR α ligandı olduğunu ifade etmişlerdir (222).

Huang ve ark. (2015) yılında yaptıkları bir araştırmada, tavuklarda 2 hafta boyunca oral yol ile vücut ağırlığı başına 40 mg/kg günlük dozda EGCG uygulamasının hepatik PPAR α gen ekspresyonunu önemli ölçüde upregüle ettiğini göstermişlerdir. İlgili çalışmanın sonuçları, 2 hafta boyunca EGCG takviyesinin, tavukların karaciğerlerindeki lipit metabolizmasıyla ilişkili genlerin ekspresyonunu ve anahtar enzimlerin aktivitelerini önemli ölçüde değiştirdiğini göstermiştir (196).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 1,25 μ M konsantrasyonda EGCG uygulamasının PPAR α düzeylerini kontrole göre %22,73 arttırdığı belirlenmiştir. PPAR α düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Huang ve ark.'nın 2019 yılında HepG2 hücrelerinde yaptığı bir çalışmada 48 saat boyunca 40 μM RV uygulamasının hücrelerde lipit birikimini azalttığını ve PPAR α ekspresyonunu indüklediği belirlenmiştir (223). Inoue ve ark. (2003) fare deneysel felç modelinde, 20 mg/kg dozda 3 günlük RV uygulamasının PPAR α düzeylerinde artışa neden olduğunu ifade etmişlerdir (224).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 5 μM konsantrasyonda RV uygulamasının PPAR α düzeylerini kontrole göre %15,84 artırdığı belirlenmiştir. PPAR α düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Vasileva ve ark. (2021)'nin yaptığı bir çalışmada, SGBS preadipositleri ile farklılaşmanın 9. gününde hücrelerin 24 saat boyunca RA'ya 5 ve 25 μM konsantrasyonlarda maruz bırakılmasının PPAR α gen ekspresyonunda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (206).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 10 μM konsantrasyonda RV uygulamasının PPAR α düzeylerini kontrole göre %16 artırdığı belirlenmiştir. PPAR α düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

5.3. Doğal ve Sentetik Yapılı Endokrin Bozucu Kimyasalların

Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör Gama (PPAR γ) Düzeyleri Üzerindeki Etkileri

Salehpour ve ark. (2020)'nin yaptığı bir çalışmada insan yağ dokusundan elde edilen mezenşimal kök hücrelerin 2 hafta boyunca sürekli olarak 10^{-8} M konsantrasyonlarda BPA'ya maruz bırakılması sonucunda PPAR γ ekspresyonunun indüklendiğini ve kontrol grubuna kıyasla PPAR γ protein düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldüğünü ifade etmişlerdir (195). Gao ve ark. (2020)'nin insan monosit hücre hattı ile yaptıkları bir çalışmada, 1, 10, 100 μM dozlarda uygulanan BPA'nın PPAR γ aktivasyonunu ve ekspresyonunu indüklediğini ifade etmişlerdir. Sonuçlar, BPA'nın yalnızca PPAR γ ekspresyonunu artırmadığını, aynı zamanda makrofajlarda PPAR γ hedef genlerinin ekspresyonunu da uyardığına işaret etmektedir. Aynı çalışmada BPA'ya oral olarak sürekli maruziyeti simüle etmek için, içme suyuna 10 hafta boyunca 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ hesaplanmış dozlarda BPA eklenmesi

sonucunda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fare karaciğerindeki PPAR γ mRNA ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişim göstermediği ifade edilmiştir (225). Bir başka çalışmada ise, perinatal olarak tahmini 70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ BPA'ya maruz kalan dişi sıçan yavrularında, PPAR γ ekspresyonunda artış gösterilmiştir (226).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 5 μM konsantrasyonda BPA uygulamasının PPAR γ düzeylerini kontrole göre %8,26 arttırdığı belirlenmiştir. PPAR γ düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Reina-Pérez ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada insan yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerde adipogenik farklılaşmanın 14. gününde 10 μM ve 25 μM dozlarda BPF uygulanmasının PPAR γ ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığını (sırasıyla 1,72 ve 2,06 kat) belirlenmişlerdir (193).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 5 μM konsantrasyonda BPF uygulamasının PPAR γ düzeylerini kontrole göre %53,50 arttırdığı belirlenmiştir. PPAR α düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Lukitasari ve ark. (2018) metabolik sendromlu Sprague Dawley sıçanlara, yeşil çay ekstresinin 200, 300 ve 400 mg/kg dozlarda 9 hafta boyunca uygulamış ve tüm dozlarda PPAR γ gen ekspresyonunda anlamlı derecede artış olduğunu ifade etmişlerdir (220).

Sakurai ve ark. (2009)'nın yaptığı bir çalışmada 3T3-L1 hücrelerine 16 gün boyunca 0-200 μM konsantrasyonlarda EGCG uygulamışlardır. 3T3-L1 hücrelerinde yağ hücresi farklılaşması sırasında PPAR γ gen ekspresyonundaki değişimler incelediğinde, 10 μM EGCG konsantrasyonunda farklılaşmanın erken aşamasında (0-8 günler) FABP4 gen ifadesinin önemli ölçüde arttığını; ancak geç aşamasında (8-16 günler) artmadığını ifade etmişlerdir (227).

Jeong ve ark. (2014)'nın sığır kemik iliği mezenşimal kök hücrelerinde yaptığı bir çalışmada, hücreler 6 gün boyunca çeşitli EGCG konsantrasyonlarına (0, 10, 50, 100 ve 200 μM) maruz bırakılmıştır. 6 günün sonunda PPAR γ ekspresyon seviyelerinin kontrole kıyasla doz bağımlı olarak önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (228).

Lee ve ark. (2013)'nin 3T3-L1 hücreleri ile yaptığı bir çalışmada, 6 gün süre ile 100 μ M EGCG uygulamasının PPAR γ ekspresyonunu zaman ve doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır (229).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 1,25 μ M konsantrasyonda EGCG uygulamasının PPAR γ düzeylerini kontrole göre %23,90 arttırdığı belirlenmiştir. PPAR α düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

2013 yılında yapılan ve 3T3-L1 preadipositlerinde RV'nin adipojenik farklılaşmayı inhibisyon mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmada, 3T3-L1 hücrelerine 8 gün boyunca 100 μ M konsantrasyonda uygulanan RV'nin PPAR γ düzeylerinde azalmaya neden olduğu ifade edilmiştir (230).

Li ve ark. (2018)'nin 3T3-L1 hücreleriyle yaptığı çalışmada toplam 6 gün süren farklılaşma prosedürünün 3. gününden itibaren 10 μ M konsantrasyonda uygulanan RV'nin PPAR γ ekspresyonunda önemli ölçüde azalmaya neden olduğunu bulunmuştur (231).

Kang ve ark. (2012)'nin yaptıkları bir çalışmada, RV'nin 10, 20 ve 40 μ mol/L konsantrasyonlarda 4 gün boyunca 3T3-L1 hücrelerine uygulanması ile PPAR γ 'nin protein ekspresyonunun, 20 ve 40 μ mol/L RV uygulamasından sonra sırasıyla %57 ve %15 oranında önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (232).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 5 μ M konsantrasyonda RV uygulamasının PPAR γ düzeylerini kontrole göre %7,23 azalttığı belirlenmiştir. PPAR γ düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Vasileva ve ark. (2021)'nin yaptıkları bir çalışmada SGBS preadipositleri ile farklılaşmanın 9. gününde hücrelerin 24 saat boyunca 5 ve 25 μ M konsantrasyonlarda RA'ya maruz bırakılmasının PPAR γ gen ekspresyonunda azalmaya neden olduğunu belirlenmiştir (206).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 10 μ M konsantrasyonda RA uygulamasının PPAR γ düzeylerini kontrole göre %5,06 azalttığı belirlenmiştir. PPAR γ düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

5.4. Doğal ve Sentetik Yapılı Endokrin Bozucu Kimyasalların Yağ asidi Bağlayıcı Protein 4 (FABP4) Düzeyleri Üzerindeki Etkileri

Park ve ark. (2024)'nın yaptıkları bir çalışmada BPA'nın köpek yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerde adipojenik farklılaşmayı indükleyerek FABP4 ekspresyon düzeylerini yükselttiği bulunmuştur (233). Ahmed ve ark. (2020) ise insan yağ dokusu kültüründe yaptıkları bir çalışmada, 24 saat boyunca 10 nM dozda BPA maruziyetinin FABP4'ün gen ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir (234).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 5 µM konsantrasyonda BPA uygulamasının FABP4 düzeylerini kontrole göre %24,46 artırdığı belirlenmiştir. Kontrole göre BPA grubunda belirlenen FABP4 düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Salehpour ve ark. (2020), insan yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücreleri 2 hafta boyunca sürekli olarak 10^{-8} M konsantrasyonlarda BPA'ya maruz bırakmış; sonuçta FABP4 ekspresyonunun baskılandığını ve kontrol grubuna kıyasla FABP4 protein düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görüldüğünü ifade etmişlerdir (195).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 5 µM konsantrasyonda BPF uygulamasının FABP4 düzeylerini kontrole göre %63,42 artırdığı belirlenmiştir. Kontrole göre BPF grubunda belirlenen FABP4 düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Sakurai ve ark. (2009), 3T3-L1 hücrelerine 16 gün boyunca 0-200 µM konsantrasyonlarda EGCG uygulamışlardır. 3T3-L1 hücrelerinde yağ hücresi farklılaşması sırasında FABP4 gen ifadesindeki değişimler incelediğinde, 10 µM EGCG konsantrasyonunda farklılaşmanın erken aşamasında (0-8 günler) FABP4 gen ifadesinin önemli ölçüde arttığını; ancak geç aşamasında (8-16 günler) artmadığını ifade etmişlerdir. Aynı çalışmada, EGCG 0. günden başlayarak 2 gün boyunca 3T3-L1 hücrelerine 5 µM konsantrasyonda uygulandığında FABP4 gen ekspresyonunun 0. ve 2. günler arasında önemli ölçüde arttığı sonucuna ulaşmışlardır (227).

Jeong ve ark. (2014) sığır kemik iliği mezenşimal kök hücrelerine 6 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50, 100 ve 200 µM) EGCG uygulamışlardır.

6 günün sonunda FABP4 ekspresyon seviyelerinin kontrole göre doz bağımlı bir şekilde önemli ölçüde azaldığını ifade etmişlerdir (228). Lee ve ark. (2013), 3T3-L1 hücrelerine 6 gün süre ile 100 µM EGCG uygulamasının FABP4 ekspresyonunu belirgin şekilde baskıladığını belirlemişlerdir (229).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 1,25 µM konsantrasyonda EGCG uygulamasının FABP4 düzeylerini kontrole göre %27,17 arttırdığı belirlenmiştir. Kontrole göre EGCG grubunda belirlenen FABP4 düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

2013 yılında yapılan ve 3T3-L1 preadipositlerinde RV'nin adipojenik farklılaşmayı inhibisyon mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmada, 3T3-L1 hücrelerine 8 gün boyunca 100 µM konsantrasyonda uygulanan RV'nin FABP4 düzeylerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (230).

Li ve ark. (2018), 3T3-L1 hücreleriyle yaptığı bir çalışmada toplam 6 gün süren farklılaşma prosedürünün 3.gününden itibaren uygulanan 10 µM konsantrasyonda RV'nin FABP4 protein ekspresyonunun önemli ölçüde azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır (231).

Kang ve ark. (2012), 3T3-L1 hücrelerine RV'nin 0, 20 ve 40 µmol/L konsantrasyonlarda 4 gün boyunca uygulanması ile, FABP4'ün protein ekspresyonunu doz bağımlı olarak önemli ölçüde azalttığı sonucuna ulaşmışlardır (232).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 5 µM konsantrasyonda RV uygulamasının FABP4 düzeylerini kontrole göre %8,75 azalttığı belirlenmiştir. FABP4 düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bilgimiz dahilinde literatürde RA'nın 3T3-L1 hücrelerindeki FABP4 düzeyleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında 3T3-L1 hücrelerine 10 µM konsantrasyonda rosmarinik asit uygulamasının FABP4 düzeylerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde değiştirmedeği sonucuna varılmıştır.

5.5. Doğal ve Sentetik Yapılı Endokrin Bozucu Kimyasalların CCAAT/Arttırıcı Bağlayıcı Protein β (C/EBP β) Düzeyleri Üzerindeki Etkileri

Bilgimiz dahilinde literatürde BPA ve BPF'nin 3T3-L1 hücrelerindeki C/EBP β düzeyleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 5 μ M konsantrasyonlarda BPA ve BPF uygulanması sonucunda C/EBP β düzeylerinin kontrole göre sırasıyla %39,44 ve %69,90 arttığı belirlenmiştir. Kontrole göre BPA ve BPF gruplarında belirlenen C/EBP β düzeylerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

Sakurai ve ark. (2009), 3T3-L1 hücrelerine 16 gün boyunca 0-200 μ M konsantrasyonlarda EGCG uygulamışlardır. 3T3-L1 hücrelerinde yağ hücresi farklılaşması sırasında C/EBP β 'nin gen ifadesindeki değişimler incelediğinde, 10 μ M EGCG konsantrasyonunda farklılaşmanın erken aşamasında (0-8 günler) C/EBP β gen ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını ancak geç aşamasında (8-16 günler) artmadığını ifade etmişlerdir (227).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 1,25 μ M konsantrasyonda EGCG uygulamasının C/EBP β düzeylerini kontrole göre %32 arttırdığı belirlenmiştir. Kontrole göre EGCG grubunda belirlenen C/EBP β düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

Kang ve ark. (2012), 3T3-L1 hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada RV'nin 10, 20 ve 40 μ mol/L konsantrasyonlarda 4 gün boyunca uygulanması ile, C/EBP β 'nin protein ekspresyonunun, doz bağımlı bir şekilde kontrole kıyasla %78, %56 ve %30 oranında önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır (232).

Bu tez çalışması kapsamında 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma prosedürü boyunca 48 saatte bir besiyeri değiştirilerek 8 gün süresince 5 μ M konsantrasyonda RV uygulamasının C/EBP β düzeylerini kontrole göre %18,63 arttırdığı belirlenmiştir. C/EBP β düzeylerindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bilgimiz dahilinde literatürde RA'nın 3T3-L1 hücrelerindeki C/EBP β düzeyleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında 3T3-L1 hücrelerine 10 μ M konsantrasyonda RA uygulamasının C/EBP β

düzeylerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde değiştirmediği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, sentetik EBK olan BPA ve BPF'nin diferensiyel edilmiş ve adipozite dönüştürülmüş 3T3-L1 fibroblastlarındaki aromataz, FABP4, PPAR α , PPAR γ ve C/EBP β düzeylerine etkileri doğal endokrin bozucu olduklarından şüphelenilen RV, RA ve EGCG ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve aşağıda yer alan sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Deney gruplarında tespit edilen aromataz düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla EGCG (%24,44), BPA (%30,22) ve BPF (%55,21) gruplarına ait aromataz düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0,05$, hepsi). Diğer gruplardaki değişiklikler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır.
2. Deney gruplarında belirlenen FABP4 düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla EGCG (%27,17), BPA (%24,46) ve BPF (%63,42) gruplarına ait FABP4 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0,05$, hepsi). Diğer gruplardaki değişiklikler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır.
3. Deney gruplarında belirlenen PPAR α düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla EGCG (%22,73), BPA (%12,98) ve BPF (%48,16) gruplarına ait PPAR α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0,05$). Diğer gruplardaki değişiklikler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır.
4. Deney gruplarında belirlenen PPAR γ düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla EGCG (%23,90) ve BPF (%53,50) gruplarına ait PPAR γ düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0,05$). Diğer gruplardaki değişiklikler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır.
5. Deney gruplarında belirlenen CEBP β düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla EGCG (%32), BPA (%39,44) ve BPF (%69,90) gruplarına ait CEBP β düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0,05$). Diğer gruplardaki değişiklikler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır.
6. Sitopatolojik incelemede, fibroblasttan farklılaştırma prosedürü ile adiposite dönüştürülen 3T3-L1 hücreleri izlenmiştir. Farklılaşmanın 0. gününde tüm deney gruplarında flasklarda fibroblast benzeri iğsi görünümde hücreler

izlenmiştir. BPA, BPF ve EGCG gruplarına ait hücrelerde 3.günden itibaren yağ hücresine belirgin bir dönüşüm gözlemlenmiştir. Bu dönüşüm yağ hücresine dönüşen hücrelerin sayı ve boyutlarında artış şeklinde saptanmıştır. Farklılaştırma prosedürünün sonunda BPA, BPF ve EGCG gruplarında adiposite dönüşen 3T3-L1 hücreleri çoğunlukta iken RA ve RV gruplarında diğer gruplara kıyasla daha seyrek olduğu saptanmıştır.

Bu sonuçlardan hareketle; EBK'lar arasında olan BPA ve BPF'nin obezogenik etkisinin yüksek olduğu, doğal kaynaklı endokrin bozulardan olan EGCG'nin da BPA ve BPF'ye benzer obezogenik etki potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Doğal kaynaklı olan RV ve RA bileşikleri ise obezogenik etki potansiyeli göstermemişlerdir. Ancak bu konuda daha detaylı araştırmalar ve beraberinde in vivo çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Dicken SJ, Batterham RL. Ultra-processed Food and Obesity: What Is the Evidence? *Curr Nutr Rep.* 2024;13(1):23-38.
2. Cuciureanu M, Carataşu C-C, Gabrielian L, Frăsinariu OE, Checheriţă LE, Trandafir LM, ve ark. 360-Degree Perspectives on Obesity. *Medicina.* 2023;59(6):1119.
3. Laws MJ, Neff AM, Brehm E, Warner GR, Flaws JA. Endocrine disrupting chemicals and reproductive disorders in women, men, and animal models. *Adv Pharmacol.* 2021;92:151-90.
4. Czarny K, Szczukocki D, Krawczyk B, Zieliński M, Miękoś E, Gadzała-Kopciuch R. The impact of estrogens on aquatic organisms and methods for their determination. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* 2017;47(11):909-63.
5. Khan NG, Correia J, Adiga D, Rai PS, Dsouza HS, Chakrabarty S, ve ark. A comprehensive review on the carcinogenic potential of bisphenol A: clues and evidence. *Environmental Science and Pollution Research.* 2021;28(16):19643-63.
6. Heindel JJ, Blumberg B. Environmental Obesogens: Mechanisms and Controversies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2019;59:89-106.
7. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Environmental estrogens and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2009;304(1):84-9.
8. Heindel JJ. Endocrine Disruptors and the Obesity Epidemic. *Toxicological Sciences.* 2003;76(2):247-9.
9. Kowalczyk M, Piwowarski JP, Wardaszka A, Średnicka P, Wójcicki M, Juszczyk-Kubiak E. Application of In Vitro Models for Studying the Mechanisms Underlying the Obesogenic Action of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) as Food Contaminants—A Review. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(2):1083.
10. Biemann R, Blüher M, Isermann B. Exposure to endocrine-disrupting compounds such as phthalates and bisphenol A is associated with an increased risk for obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2021;35(5):101546.
11. Mascarenhas C, Sousa ACA, Rato L. Effects of Pharmaceutical Substances with Obesogenic Activity on Male Reproductive Health. *International Journal of Molecular Sciences.* 2024;25(4):2324.
12. Shao D, Lazar MA. Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ , CCAAT/Enhancer-binding Protein α , and Cell Cycle Status Regulate the Commitment to Adipocyte Differentiation*. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272(34):21473-8.
13. Prentice AM, Jebb SA. Beyond body mass index. *Obesity Reviews.* 2001;2(3):141-7.

14. Nihiser AJ, Lee SM, Wechsler H, McKenna M, Odom E, Reinold C, ve ark. Body Mass Index Measurement in Schools. *Journal of School Health*. 2007;77(10):651-71.
15. Adıbelli D, İlaslan E, Taylan S, Özkan İ. Üniversite Öğrencilerinin Obezite Farkındalıkları ile Beden Kitle İndeksleri Arasındaki İlişki. *Acibadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2020.
16. Barlow SE, Dietz WH. Obesity Evaluation and Treatment: Expert Committee Recommendations. *Pediatrics*. 1998;102(3):e29-e.
17. Taşlı H, Sağır S. Obezitenin Belirlenmesinde Kullanılan Beden Kütle İndeksi, Bel Çevresi, Bel Kalça Oranı Metotlarının Karşılaştırılması. *Ahi Evran Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*. 2021;7.
18. Biemann R, Blüher M, Isermann B. Exposure to endocrine-disrupting compounds such as phthalates and bisphenol A is associated with an increased risk for obesity. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2021;35(5):101546.
19. Oken E, Levitan EB, Gillman MW. Maternal smoking during pregnancy and child overweight: systematic review and meta-analysis. *International Journal of Obesity*. 2008;32(2):201-10.
20. Moon RJ, D'Angelo S, Holroyd CR, Crozier SR, Godfrey KM, Davies JH, ve ark. Parent-Offspring Associations in Body Composition: Findings From the Southampton Women's Survey Prospective Cohort Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2023;108(9):e726-e33.
21. Redinger RN. The pathophysiology of obesity and its clinical manifestations. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2007;3(11):856-63.
22. Reina-Pérez I, Olivas-Martínez A, Mustieles V, Ruiz-Ojeda FJ, Molina-Molina JM, Olea N, ve ark. Bisphenol F and bisphenol S promote lipid accumulation and adipogenesis in human adipose-derived stem cells. *Food Chem Toxicol*. 2021;152:112216.
23. Zaiou M, El Amri H, Bakillah A. The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2018;28(2):91-111.
24. Vasileva LV, Savova MS, Tews D, Wabitsch M, Georgiev MI. Rosmarinic acid attenuates obesity and obesity-related inflammation in human adipocytes. *Food Chem Toxicol*. 2021;149:112002.
25. Azhar Y, Parmar A, Miller CN, Samuels JS, Rayalam S. Phytochemicals as novel agents for the induction of browning in white adipose tissue. *Nutrition & Metabolism*. 2016;13(1):89.
26. Masood B, Moorthy M. Causes of obesity: a review. *Clinical Medicine*. 2023;23(4):284-91.
27. Baillie-Hamilton PF. Chemical Toxins: A Hypothesis to Explain the Global Obesity Epidemic. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2002;8(2):185-92.

28. Oruganti L, Reddy-Sankaran K, Dinnupati H, Kotakadi VS, Meriga B. Anti-adipogenic and lipid-lowering activity of piperine and epigallocatechin gallate in 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2021;129:1-8.
29. González Jiménez E. Obesity: Etiologic and pathophysiological analysis. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*. 2013;60(1):17-24.
30. Collins S. Overview of clinical perspectives and mechanisms of obesity. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2005;73(7):470-1.
31. Hagberg CE, Spalding KL. White adipocyte dysfunction and obesity-associated pathologies in humans. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2024;25(4):270-89.
32. Sandoval-Bórquez A, Carrión P, Hernández MP, Pérez JA, Tapia-Castillo A, Vecchiola A, ve ark. Adipose Tissue Dysfunction and the Role of Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles in Obesity and Metabolic Syndrome. *Journal of the Endocrine Society*. 2024;8(8).
33. Concha F, Prado G, Quezada J, Ramirez A, Bravo N, Flores C, ve ark. Nutritional and non-nutritional agents that stimulate white adipose tissue browning. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2019;20(2):161-71.
34. Iqbal J, Al Qarni A, Hawwari A, Alghanem FA, Ahmed G. Metabolic Syndrome, Dyslipidemia and Regulation of Lipoprotein Metabolism. *Current Diabetes Reviews*. 2018;14(5):427-33.
35. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, ve ark. PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. *Molecular Cell*. 1999;4(4):611-7.
36. Fève B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;19(4):483-99.
37. Molehin D, Filleur S, Pruitt K. Regulation of aromatase expression: Potential therapeutic insight into breast cancer treatment. *Mol Cell Endocrinol*. 2021;531:111321.
38. Brann DW, Lu Y, Wang J, Zhang Q, Thakkar R, Sareddy GR, ve ark. Brain-derived estrogen and neural function. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2022;132:793-817.
39. Almeida CF, Teixeira N, Oliveira A, Augusto TV, Correia-da-Silva G, Ramos MJ, ve ark. Discovery of a multi-target compound for estrogen receptor-positive (ER(+)) breast cancer: Involvement of aromatase and ERs. *Biochimie*. 2021;181:65-76.
40. Gennari L, Merlotti D, Nuti R. Chapter 6 - Aromatase activity and bone loss. In: Makowski GS, editor. *Advances in Clinical Chemistry*. 54: Elsevier; 2011. p. 129-64.
41. Baravalle R, Ciaramella A, Baj F, Di Nardo G, Gilardi G. Identification of endocrine disrupting chemicals acting on human aromatase. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2018;1866(1):88-96.

42. Caballero Alfonso AY, Mora Lagares L, Novic M, Benfenati E, Kumar A, Chayawan. Exploration of structural requirements for azole chemicals towards human aromatase CYP19A1 activity: Classification modeling, structure-activity relationships and read-across study. *Toxicol In Vitro*. 2022;81:105332.
43. Shaheenah D, Fellow SGK, Buzdar AU. Aromatase. In: Offermanns S, Rosenthal W, editors. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 218-21.
44. Zheng Y, Shao M, Zheng Y, Sun W, Qin S, Sun Z, ve ark. PPARs in atherosclerosis: The spatial and temporal features from mechanism to druggable targets. *Journal of Advanced Research*. 2024.
45. Seminotti B, Grings M, Glänzel NM, Vockley J, Leipnitz G. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists as a potential therapy for inherited metabolic disorders. *Biochemical Pharmacology*. 2023;209:115433.
46. Kota BP, Huang TH-W, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*. 2005;51(2):85-94.
47. Contreras AV, Torres N, Tovar AR. PPAR- α as a Key Nutritional and Environmental Sensor for Metabolic Adaptation. *Advances in Nutrition*. 2013;4(4):439-52.
48. Gad SC. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology (Fourth Edition)*. Oxford: Academic Press; 2024. p. 393-7.
49. Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2005;26(5):244-51.
50. Chiazza F, Collino M. Chapter 9 - Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in Glucose Control. In: Mauricio D, editor. *Molecular Nutrition and Diabetes*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 105-14.
51. Hostetler HA, Balanarasimha M, Huang H, Kelzer MS, Kaliappan A, Kier AB, ve ark. Glucose regulates fatty acid binding protein interaction with lipids and peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Lipid Res*. 2010;51(11):3103-16.
52. Baran KP. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs). In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Oxford: Academic Press; 2014. p. 812-4.
53. Agarwal S, Yadav A, Chaturvedi RK. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) as therapeutic target in neurodegenerative disorders. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;483(4):1166-77.
54. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, ve ark. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*. 2013;19(5):557-66.
55. Vishvanath L, Gupta RK. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *J Clin Invest*. 2019;129(10):4022-31.

56. Ramírez V, González-Palacios P, Baca MA, González-Domenech PJ, Fernández-Cabezas M, Álvarez-Cubero MJ, ve ark. Effect of exposure to endocrine disrupting chemicals in obesity and neurodevelopment: The genetic and microbiota link. *Science of The Total Environment*. 2022;852:158219.
57. Gupta R, Kumar P, Fahmi N, Garg B, Dutta S, Sachar S, ve ark. Endocrine disruption and obesity: A current review on environmental obesogens. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 2020;3:100009.
58. Janesick A, Blumberg B. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2011;93(1):34-50.
59. Başarır Sivri FN, Çiftçi S. A New Insight into Fatty Acid Binding Protein 4 Mechanisms and Therapeutic Implications in Obesity-Associated Diseases: A Mini Review. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2024;68(8):2300840.
60. Xu H, Diolintzi A, Storch J. Fatty acid-binding proteins: functional understanding and diagnostic implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2019;22(6):407-12.
61. van der Ark-Vonk EM, Puijk MV, Pasterkamp G, van der Laan SW. The Effects of FABP4 on Cardiovascular Disease in the Aging Population. *Current Atherosclerosis Reports*. 2024;26(5):163-75.
62. Ishimura S, Furuhashi M, Watanabe Y, Hoshina K, Fuseya T, Mita T, ve ark. Circulating Levels of Fatty Acid-Binding Protein Family and Metabolic Phenotype in the General Population. *PLOS ONE*. 2013;8(11):e81318.
63. Mallick R, Basak S, Das RK, Banerjee A, Paul S, Pathak S, ve ark. Fatty Acids and their Proteins in Adipose Tissue Inflammation. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2024;82(1):35-51.
64. Hao J, Zhang Y, Yan X, Yan F, Sun Y, Zeng J, ve ark. Circulating Adipose Fatty Acid Binding Protein Is a New Link Underlying Obesity-Associated Breast/Mammary Tumor Development. *Cell Metabolism*. 2018;28(5):689-705.e5.
65. Liu S, Wu D, Fan Z, Yang J, Li Y, Meng Y, ve ark. FABP4 in obesity-associated carcinogenesis: Novel insights into mechanisms and therapeutic implications. *Front Mol Biosci*. 2022;9:973955.
66. Dahlström EH, Saksi J, Forsblom C, Uglebjerg N, Mars N, Thorn LM, ve ark. The Low-Expression Variant of FABP4 Is Associated With Cardiovascular Disease in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2021;70(10):2391-401.
67. Lv J, Hu Y, Li L, He Y, Wang J, Guo N, ve ark. Targeting FABP4 in elderly mice rejuvenates liver metabolism and ameliorates aging-associated metabolic disorders. *Metabolism*. 2023;142:155528.
68. Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, Makowski L, Charles KN, Snitow ME, ve ark. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nature Medicine*. 2009;15(12):1383-91.

69. Floresta G, Pistarà V, Amata E, Dichiarà M, Marrazzo A, Prezzavento O, ve ark. Adipocyte fatty acid binding protein 4 (FABP4) inhibitors. A comprehensive systematic review. *Eur J Med Chem.* 2017;138:854-73.
70. Garin-Shkolnik T, Rudich A, Hotamisligil GS, Rubinstein M. FABP4 attenuates PPAR γ and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR γ in adipose tissues. *Diabetes.* 2014;63(3):900-11.
71. Zhao W, Rasheed A, Tikkanen E, Lee J-J, Butterworth AS, Howson JMM, ve ark. Identification of new susceptibility loci for type 2 diabetes and shared etiological pathways with coronary heart disease. *Nature Genetics.* 2017;49(10):1450-7.
72. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 1991;5(9):1538-52.
73. Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* 1995;9(2):168-81.
74. Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.* 2002;365(Pt 3):561-75.
75. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annual Review of Biochemistry.* 2012;81(Volume 81, 2012):715-36.
76. Martínez MÁ, Blanco J, Rovira J, Kumar V, Domingo JL, Schuhmacher M. Bisphenol A analogues (BPS and BPF) present a greater obesogenic capacity in 3T3-L1 cell line. *Food and Chemical Toxicology.* 2020;140:111298.
77. Mosca A, Manco M, Braghini MR, Cianfarani S, Maggiore G, Alisi A, ve ark. Environment, Endocrine Disruptors, and Fatty Liver Disease Associated with Metabolic Dysfunction (MASLD). *Metabolites.* 2024;14(1):71.
78. Xue S, Li X, Zhou S, Zhang J, Sun K, Peng X, ve ark. Effects and mechanisms of endocrine disruptor bisphenol AF on male reproductive health: A mini review. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2024;276:116300.
79. Gupta RK, Archambeault DR, Yao HHC. 11.30 - Genetic Mouse Models for Female Reproductive Toxicology Studies. In: McQueen CA, editor. *Comprehensive Toxicology (Second Edition).* Oxford: Elsevier; 2010. p. 561-75.
80. Wiklund L, Beronius A. Systematic evaluation of the evidence for identification of endocrine disrupting properties of Bisphenol F. *Toxicology.* 2022;476:153255.
81. Williams GP, Darbre PD. Low-dose environmental endocrine disruptors, increase aromatase activity, estradiol biosynthesis and cell proliferation in human breast cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2019;486:55-64.
82. Kawa IA, Akbar M, Fatima Q, Mir SA, Jeelani H, Manzoor S, ve ark. Endocrine disrupting chemical Bisphenol A and its potential effects on female health. *Diabetes Metab Syndr.* 2021;15(3):803-11.

83. Choi SI, Kwon HY, Han X, Men X, Choi YE, Jang GW, ve ark. Environmental obesogens (bisphenols, phthalates and parabens) and their impacts on adipogenic transcription factors in the absence of dexamethasone in 3T3-L1 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2021;214:105994.
84. Mohajer N, Du CY, Checkcinco C, Blumberg B. Obesogens: How They Are Identified and Molecular Mechanisms Underlying Their Action. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:780888.
85. Behl M, Rao D, Aagaard K, Davidson TL, Levin ED, Slotkin TA, ve ark. Evaluation of the association between maternal smoking, childhood obesity, and metabolic disorders: a national toxicology program workshop review. *Environ Health Perspect*. 2013;121(2):170-80.
86. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS One*. 2013;8(1):e55387.
87. Nicolaou M, Toumba M, Kythreotis A, Daher H, Skordis N. Obesogens in Adolescence: Challenging Aspects and Prevention Strategies. *Children*. 2024;11(5):602.
88. MacKay H, Patterson ZR, Abizaid A. Perinatal Exposure to Low-Dose Bisphenol-A Disrupts the Structural and Functional Development of the Hypothalamic Feeding Circuitry. *Endocrinology*. 2017;158(4):768-77.
89. Dalamaga M, Kounatidis D, Tsilingiris D, Vallianou NG, Karampela I, Psallida S, ve ark. The Role of Endocrine Disruptors Bisphenols and Phthalates in Obesity: Current Evidence, Perspectives and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(1):675.
90. Hoepner LA. Bisphenol a: A narrative review of prenatal exposure effects on adipogenesis and childhood obesity via peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Environ Res*. 2019;173:54-68.
91. Park C, Song H, Choi J, Sim S, Kojima H, Park J, ve ark. The mixture effects of bisphenol derivatives on estrogen receptor and androgen receptor. *Environ Pollut*. 2020;260:114036.
92. Gramec Skledar D, Peterlin Mašič L. Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;47:182-99.
93. Michałowicz J. Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;37(2):738-58.
94. Santos CRd, Arcanjo GS, Araújo AAD, Santos LVdS, Amaral MCS. Occurrence, environmental risks, and removal of bisphenol A and its analogues by membrane bioreactors. *Chemical Engineering Journal*. 2024;494:153278.
95. Wang H, Liu Z-h, Tang Z, Zhang J, Yin H, Dang Z, ve ark. Bisphenol analogues in Chinese bottled water: Quantification and potential risk analysis. *Science of The Total Environment*. 2020;713:136583.

96. Zhang B, Wei J, Wang Z, Li X, Liu Y. Sample preparation and analytical methods for bisphenol endocrine disruptors from foods: State of the art and future perspectives. *Microchemical Journal*. 2024;204:111033.
97. Luo C, Zou L, Sun H, Peng J, Gao C, Bao L, ve ark. A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol*. 2020;11:153.
98. Ahmed S, Atlas E. Bisphenol S- and bisphenol A-induced adipogenesis of murine preadipocytes occurs through direct peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(10):1566-73.
99. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJR, Schoenfelder G. Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*. 2010;118(8):1055-70.
100. Deng X, Liang S, Tang Y, Li Y, Xu R, Luo L, ve ark. Adverse effects of bisphenol A and its analogues on male fertility: An epigenetic perspective. *Environmental Pollution*. 2024;345:123393.
101. den Braver-Sewradj SP, van Spronsen R, Hessel EVS. Substitution of bisphenol A: a review of the carcinogenicity, reproductive toxicity, and endocrine disruption potential of alternative substances. *Critical Reviews in Toxicology*. 2020;50(2):128-47.
102. Nunez AA, Kannan K, Giesy JP, Fang J, Clemens LG. Effects of Bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere*. 2001;42(8):917-22.
103. Naomi R, Yazid MD, Bahari H, Keong YY, Rajandram R, Embong H, ve ark. Bisphenol A (BPA) Leading to Obesity and Cardiovascular Complications: A Compilation of Current In Vivo Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(6):2969.
104. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration. *Chemical Research in Toxicology*. 2002;15(10):1281-7.
105. Zhu M, Zeng R, Wu D, Li Y, Chen T, Wang A. Research progress of the effects of bisphenol analogues on the intestine and its underlying mechanisms: A review. *Environmental Research*. 2023;243:117891.
106. Nachman RM, Hartle JC, Lees PSJ, Groopman JD. Early Life Metabolism of Bisphenol A: A Systematic Review of the Literature. *Current Environmental Health Reports*. 2014;1(1):90-100.
107. Ye X, Wong L-Y, Bishop AM, Calafat AM. Variability of Urinary Concentrations of Bisphenol A in Spot Samples, First Morning Voids, and 24-Hour Collections. *Environmental Health Perspectives*. 2011;119(7):983-8.
108. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*. 2002;15(10):1281-7.

109. Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2005;383(4):638-44.
110. Durmaz E, Giray BK. Çevresel bir endokrin bozucu: Bisfenol A ve toksik etkilerinin değerlendirilmesi. *Cocuk Sagligi ve Hastaliklari Dergisi.* 2013;56:192-9.
111. Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, ve ark. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol Sci.* 2005;84(2):249-59.
112. Guo J, Liu K, Yang J, Su Y. The association between prenatal exposure to bisphenol A and offspring obesity: A systematic review. *Environmental Pollution.* 2024;344:123391.
113. Zhang N, Zhao Y, Zhai L, Bai Y, Wei W, Sun Q, ve ark. Urinary concentrations of bisphenol A and its alternatives: Potential predictors of and associations with antral follicle count among women from an infertility clinic in Northern China. *Environmental Research.* 2024;249:118433.
114. Thoene M, Rytel L, Nowicka N, Wojtkiewicz J. The state of bisphenol research in the lesser developed countries of the EU: a mini-review. *Toxicology Research.* 2018;7(3):371-80.
115. Hartle JC, Navas-Acien A, Lawrence RS. The consumption of canned food and beverages and urinary Bisphenol A concentrations in NHANES 2003–2008. *Environmental Research.* 2016;150:375-82.
116. Martínez-Guijarro K, Gevao B, Porcelli M, Al-Salem S, Uddin S, Bahloul M, ve ark. Assessment of bisphenols in children's toy and baby products in the Middle East. *Emerging Contaminants.* 2024;10(3):100374.
117. Sigvaldsen A, Frederiksen H, Højsager FD, Andersson A-M, Juul A, Boye H, ve ark. Prenatal and childhood exposure to bisphenols and bone mineral density in 7-year-old children from the Odense Child Cohort. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 2024;260:114408.
118. Konieczna A, Rutkowska A, Rachoń D. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2015;66(1):5-11.
119. Wen X, Zhu M, Li Z, Li T, Xu X. Dual effects of bisphenol A on wound healing, involvement of estrogen receptor β . *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022;231:113207.
120. Shao Y, Zhu L, Chen Z, Thalmann B, Zhou S, Hollert H, ve ark. Evidence of increased estrogenicity upon metabolism of Bisphenol F - Elucidation of the key metabolites. *Science of The Total Environment.* 2021;787:147669.
121. Castro B, Sánchez P, Torres JM, Ortega E. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on the intraprostatic levels of aromatase and 5 α -reductase isozymes in juvenile rats. *Food Chem Toxicol.* 2018;115:20-5.

122. Matsumoto J, Yokota H, Yuasa A. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2002;110(2):193-6.
123. Zhao H, Liu M, Lv Y, Fang M. Dose-response metabolomics and pathway sensitivity to map molecular cartography of bisphenol A exposure. *Environ Int.* 2022;158:106893.
124. Sengupta S, Obiorah I, Maximov PY, Curpan R, Jordan VC. Molecular mechanism of action of bisphenol and bisphenol A mediated by oestrogen receptor alpha in growth and apoptosis of breast cancer cells. *Br J Pharmacol.* 2013;169(1):167-78.
125. Wang C, Zhang J, Li Q, Zhang T, Deng Z, Lian J, ve ark. Low concentration of BPA induces mice spermatocytes apoptosis via GPR30. *Oncotarget.* 2017;8(30):49005-15.
126. Inadera H. Neurological Effects of Bisphenol A and its Analogues. *International Journal of Medical Sciences.* 2015;12(12):926-36.
127. Wu W, Li M, Liu A, Wu C, Li D, Deng Q, ve ark. Bisphenol A and the Risk of Obesity a Systematic Review With Meta-Analysis of the Epidemiological Evidence. *Dose-Response.* 2020;18(2):1559325820916949.
128. Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In Vitro and in Vivo Interactions of Bisphenol A and Its Metabolite, Bisphenol A Glucuronide, with Estrogen Receptors α and β . *Chemical Research in Toxicology.* 2001;14(2):149-57.
129. Biemann R, Navarrete Santos A, Navarrete Santos A, Riemann D, Knelangen J, Blüher M, ve ark. Endocrine disrupting chemicals affect the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in distinct ontogenetic windows. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2012;417(2):747-52.
130. Engin AB, Engin A. The effect of environmental Bisphenol A exposure on breast cancer associated with obesity. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2021;81:103544.
131. LaKind JS, Goodman M, Mattison DR. Bisphenol A and indicators of obesity, glucose metabolism/type 2 diabetes and cardiovascular disease: A systematic review of epidemiologic research. *Critical Reviews in Toxicology.* 2014;44(2):121-50.
132. Xue J, Wu Q, Sakthivel S, Pavithran PV, Vasukutty JR, Kannan K. Urinary levels of endocrine-disrupting chemicals, including bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers, benzophenones, parabens, and triclosan in obese and non-obese Indian children. *Environ Res.* 2015;137:120-8.
133. Urbanetz LAML, Junior JMS, Maciel GAR, Simões RdS, Baracat MCP, Baracat EC. Does bisphenol A (BPA) participates in the pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)? *Clinics.* 2023;78:100310.
134. Wei J, Lin Y, Li Y, Ying C, Chen J, Song L, ve ark. Perinatal Exposure to Bisphenol A at Reference Dose Predisposes Offspring to Metabolic Syndrome in Adult Rats on a High-Fat Diet. *Endocrinology.* 2011;152(8):3049-61.

135. Li G, Chang H, Xia W, Mao Z, Li Y, Xu S. F0 maternal BPA exposure induced glucose intolerance of F2 generation through DNA methylation change in Gck. *Toxicol Lett.* 2014;228(3):192-9.
136. Cao Y, Chen Z, Zhang M, Shi L, Qin S, Lv D, ve ark. Maternal exposure to bisphenol A induces fetal growth restriction via upregulating the expression of estrogen receptors. *Chemosphere.* 2022;287(Pt 3):132244.
137. Mu X, Qi S, Liu J, Wang H, Yuan L, Qian L, ve ark. Environmental level of bisphenol F induced reproductive toxicity toward zebrafish. *Science of The Total Environment.* 2022;806:149992.
138. Usman A, Ikhlas S, Ahmad M. Occurrence, toxicity and endocrine disrupting potential of Bisphenol-B and Bisphenol-F: A mini-review. *Toxicology Letters.* 2019;312:222-7.
139. Fromme H, Kuchler T, Otto T, Pilz K, Müller J, Wenzel A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research.* 2002;36(6):1429-38.
140. Cabaton N, Chagnon M-C, Lhuguenot J-C, Cravedi J-P, Zalko D. Disposition and Metabolic Profiling of Bisphenol F in Pregnant and Nonpregnant Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2006;54(26):10307-14.
141. Dumont C, Perdu E, de Sousa G, Debrauwer L, Rahmani R, Cravedi J-P, ve ark. Bis(hydroxyphenyl)methane—bisphenol F—metabolism by the HepG2 human hepatoma cell line and cryopreserved human hepatocytes. *Drug and Chemical Toxicology.* 2011;34(4):445-53.
142. Jones-Otazo HA, Clarke JP, Diamond ML, Archbold JA, Ferguson G, Harner T, ve ark. Is house dust the missing exposure pathway for PBDEs? An analysis of the urban fate and human exposure to PBDEs. *Environ Sci Technol.* 2005;39:5121.
143. Alexander HC, Dill DC, Smith LW, Guiney PD, Dorn P. Bisphenol a: Acute aquatic toxicity. *Environ Toxicol Chem.* 1988;7(1):19.
144. Yang F, Qiu W, Li R, Hu J, Luo S, Zhang T, ve ark. Genome-wide identification of the interactions between key genes and pathways provide new insights into the toxicity of bisphenol F and S during early development in zebrafish. *Chemosphere.* 2018;213:559-67.
145. Mu X, Qi S, Liu J, Wang H, Yuan L, Qian L, ve ark. Environmental level of bisphenol F induced reproductive toxicity toward zebrafish. *Sci Total Environ.* 2022;806(Pt 1):149992.
146. Barrett JR. The science of soy: what do we really know? *Environ Health Perspect.* 2006;114(6):A352-8.
147. Zych M, Folwarczna J, Trzeciak HI. Natural phenolic acids may increase serum estradiol level in ovariectomized rats. *Acta Biochim Pol.* 2009;56(3):503-7.
148. Shahbaz M. Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review. *Applied Sciences.* 2019;9:3139.

149. Llanea P, González C, Fernández-Iñarrea J, Alonso A, Díaz F, Pérez-López FR. Soy isoflavones improve insulin sensitivity without changing serum leptin among postmenopausal women. *Climacteric*. 2012;15(6):611-20.
150. Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *The Journal of nutrition*. 2008;138 9:1677-83.
151. Suzuki T, Pervin M, Goto S, Isemura M, Nakamura Y. Beneficial Effects of Tea and the Green Tea Catechin Epigallocatechin-3-gallate on Obesity. *Molecules*. 2016;21(10).
152. Cooke PS, Naaz A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229(11):1127-35.
153. Cai W, Yang T, Liu H, Han L, Zhang K, Hu X, ve ark. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): A master gatekeeper in CNS injury and repair. *Prog Neurobiol*. 2018;163-164:27-58.
154. Rivera F, Costa G, Abin A, Urbanavicius J, Arruti C, Casanova G, ve ark. Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. *Neurotoxicity Research*. 2008;13(2):105-14.
155. Ahn J, Lee H, Kim S, Park J, Ha T. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(4):545-9.
156. Lee JS, Cha YJ, Lee KH, Yim JE. Onion peel extract reduces the percentage of body fat in overweight and obese subjects: a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutr Res Pract*. 2016;10(2):175-81.
157. Kim G-D, Park YS, Jin Y-H, Park C-S. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;99(5):2083-92.
158. Widlund AL, Baral K, Dalgaard LT, Vang O. Functional Mitochondria Are Important for the Effect of Resveratrol. *Molecules*. 2017;22(5).
159. Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 2000;141(10):3657-67.
160. Vang O, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, ve ark. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One*. 2011;6(6):e19881.
161. Bhat KP, Lantvit D, Christov K, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Res*. 2001;61(20):7456-63.
162. Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, ve ark. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol*. 2004;18(6):803-11.

163. Qasem RJ. The estrogenic activity of resveratrol: a comprehensive review of in vitro and in vivo evidence and the potential for endocrine disruption. *Crit Rev Toxicol.* 2020;50(5):439-62.
164. Rayalam S, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA, Baile CA. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives.* 2008;22(10):1367-71.
165. Leiberer A, Mündlein A, Drexel H. Phytochemicals and their impact on adipose tissue inflammation and diabetes. *Vascular pharmacology.* 2013;58(1-2):3-20.
166. Alberdi G, Rodríguez VM, Miranda J, Macarulla MT, Churruga I, Portillo MP. Thermogenesis is involved in the body-fat lowering effects of resveratrol in rats. *Food chemistry.* 2013;141(2):1530-5.
167. Andrade JMO, Frade ACM, Guimaraes JB, Freitas KM, Lopes MTP, Guimarães ALS, ve ark. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *European journal of nutrition.* 2014;53:1503-10.
168. Um J-H, Park S-J, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, ve ark. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes.* 2010;59(3):554-63.
169. Wang S, Liang X, Yang Q, Fu X, Rogers CJ, Zhu M, ve ark. Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) α 1. *International journal of obesity.* 2015;39(6):967-76.
170. Andrade JMO, Frade ACM, Guimarães JB, Freitas KM, Lopes MTP, Guimarães ALS, ve ark. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *European Journal of Nutrition.* 2014;53(7):1503-10.
171. Sun W, Yu S, Han H, Yuan Q, Chen J, Xu G. Resveratrol Inhibits Human Visceral Preadipocyte Proliferation and Differentiation in vitro. *Lipids.* 2019;54(11-12):679-86.
172. Amoah SK, Sandjo LP, Kratz JM, Biavatti MW. Rosmarinic Acid--Pharmaceutical and Clinical Aspects. *Planta Med.* 2016;82(5):388-406.
173. Kim GD, Park YS, Jin YH, Park CS. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(5):2083-92.
174. Nakazawa T, Ohsawa K. Metabolism of rosmarinic acid in rats. *J Nat Prod.* 1998;61(8):993-6.
175. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded

- and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life Sci.* 2004;75(2):165-78.
176. Lange KW, Lange KM, Nakamura Y. Green tea, epigallocatechin gallate and the prevention of Alzheimer's disease: Clinical evidence. *Food Science and Human Wellness.* 2022;11(4):765-70.
 177. Azambuja JH, Mancuso RI, Via FID, Torello CO, Saad STO. Protective effect of green tea and epigallocatechin-3-gallate in a LPS-induced systemic inflammation model. *J Nutr Biochem.* 2022;101:108920.
 178. Furniturewalla A, Barve K. Approaches to overcome bioavailability inconsistencies of epigallocatechin gallate, a powerful anti-oxidant in green tea. *Food Chemistry Advances.* 2022;1:100037.
 179. Granja A, Pinheiro M, Reis S. Epigallocatechin Gallate Nanodelivery Systems for Cancer Therapy. *Nutrients.* 2016;8(5).
 180. Lecumberri E, Dupertuis YM, Miralbell R, Pichard C. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as adjuvant in cancer therapy. *Clin Nutr.* 2013;32(6):894-903.
 181. Li Y, Yuan YY, Meeran SM, Tollefsbol TO. Synergistic epigenetic reactivation of estrogen receptor- α (ER α) by combined green tea polyphenol and histone deacetylase inhibitor in ER α -negative breast cancer cells. *Mol Cancer.* 2010;9:274.
 182. Gianfredi V, Vannini S, Moretti M, Villarini M, Bragazzi NL, Izzotti A, et al. Sulforaphane and Epigallocatechin Gallate Restore Estrogen Receptor Expression by Modulating Epigenetic Events in the Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2017;10(3-4):126-35.
 183. De Amicis F, Santoro M, Guido C, Russo A, Aquila S. Epigallocatechin gallate affects survival and metabolism of human sperm. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56(11):1655-64.
 184. Youn K, Ho C-T, Jun M. Multifaceted neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in Alzheimer's disease: an overview of pre-clinical studies focused on β -amyloid peptide. *Food Science and Human Wellness.* 2022;11(3):483-93.
 185. Technical Documents:
Chemically-Induced Differentiation of ATCC® CL-173TM (3T3-L1) Using Single-Component Commercially-Available Reagents [Internet]: ATCC (American Type Culture Collection); 2024 [Available from: <https://www.atcc.org/resources/technical-documents/chemically-induced-method-of-adipogenesis>].
 186. Technical Document: A Chemically-induced Method of Adipogenesis 2024 [updated 04 August 2024. Available from: <https://www.atcc.org/resources/technical-documents/chemically-induced-method-of-adipogenesis>].

187. Technical Documents: Mouse Aromatase, ARO ELISA Kit [Internet] 2024 [updated 04 Aġustos 2024. Available from: https://www.bt-laboratory.com/index.php/Shop/Index/productShijiheDetail/p_id/2506.html.
188. Technical Documents: Mouse Peroxisome Proliferators Activator Receptors Alpha, PPAR-A ELISA Kit [Internet] 2024 [updated 04 Aġustos 2024. Available from: https://www.bt-laboratory.com/index.php/Shop/Index/productShijiheDetail/p_id/2240.html.
189. Technical Documents: Mouse Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma, PPAR-G ELISA Kit [Internet] 2024 [updated 04 Aġustos 2024. Available from: https://www.bt-laboratory.com/index.php/Shop/Index/productShijiheDetail/p_id/2261.html.
190. Technical Documents: BT LABS Bioassay Technology Laboratory [Internet] 2024 [updated 04 Aġustos 2024. Available from: <https://www.bt-laboratory.com/>.
191. Technical Documents: Mouse DNA Damage-inducible Transcript 3 Protein, DDIT3 ELISA Kit [Internet] 2024 [updated 04 Aġustos 2024. Available from: https://www.bt-laboratory.com/index.php/Shop/Index/productShijiheDetail/p_id/10222.html.
192. Zhang X-H, Huang B, Choi S-K, Seo J-S. Anti-obesity effect of resveratrol-amplified grape skin extracts on 3T3-L1 adipocytes differentiation. *Nutr Res Pract.* 2012;6(4):286-93.
193. Reina-Pérez I, Olivas-Martínez A, Mustieles V, Ruiz-Ojeda FJ, Molina-Molina JM, Olea N, ve ark. Bisphenol F and bisphenol S promote lipid accumulation and adipogenesis in human adipose-derived stem cells. *Food and Chemical Toxicology.* 2021;152:112216.
194. Pomatto V, Cottone E, Cocci P, Mozzicafreddo M, Mosconi G, Nelson ER, ve ark. Plasticizers used in food-contact materials affect adipogenesis in 3T3-L1 cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2018;178:322-32.
195. Salehpour A, Shidfar F, Hedayati M, Neshatbini Tehrani A, Farshad AA, Mohammadi S. Bisphenol A enhances adipogenic signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Genes and Environment.* 2020;42(1):13.
196. Huang JB, Zhang Y, Zhou YB, Wan XC, Zhang JS. Effects of epigallocatechin gallate on lipid metabolism and its underlying molecular mechanism in broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 2015;99(4):719-27.
197. Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A Role for C/EBP β in Regulating Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Activity during Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes*. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(21):18464-71.
198. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism.* 2006;4(4):263-73.

199. Guo L, Li X, Tang Q-Q. Transcriptional Regulation of Adipocyte Differentiation: A Central Role for CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP) β^* . *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(2):755-61.
200. Masuno H, Iwanami J, Kidani T, Sakayama K, Honda K. Bisphenol A Accelerates Terminal Differentiation of 3T3-L1 Cells into Adipocytes through the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *Toxicological Sciences*. 2005;84(2):319-27.
201. Dong H, Yao X, Liu S, Yin N, Faiola F. Non-cytotoxic nanomolar concentrations of bisphenol A induce human mesenchymal stem cell adipogenesis and osteogenesis. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018;164:448-54.
202. Rosenmai AK, Dybdahl M, Pedersen M, Alice van Vugt-Lussenburg BM, Wedeby EB, Taxvig C, ve ark. Are structural analogues to bisphenol a safe alternatives? *Toxicol Sci*. 2014;139(1):35-47.
203. Chen H, Li J, Zhang Y, Zhang W, Li X, Tang H, ve ark. Bisphenol F suppresses insulin-stimulated glucose metabolism in adipocytes by inhibiting IRS-1/PI3K/AKT pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2022;231:113201.
204. Ramskov Tetzlaff CN, Svingen T, Vinggaard AM, Rosenmai AK, Taxvig C. Bisphenols B, E, F, and S and 4-cumylphenol induce lipid accumulation in mouse adipocytes similarly to bisphenol A. *Environmental Toxicology*. 2020;35(5):543-52.
205. Taxvig C, Dreisig K, Boberg J, Nellemann C, Schelde AB, Pedersen D, ve ark. Differential effects of environmental chemicals and food contaminants on adipogenesis, biomarker release and PPAR γ activation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012;361(1):106-15.
206. Vasileva LV, Savova MS, Tews D, Wabitsch M, Georgiev MI. Rosmarinic acid attenuates obesity and obesity-related inflammation in human adipocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 2021;149:112002.
207. Watanabe M, Ohno S, Nakajin S. Effects of bisphenol A on the expression of cytochrome P450 aromatase (CYP19) in human fetal osteoblastic and granulosa cell-like cell lines. *Toxicology Letters*. 2012;210(1):95-9.
208. Huang H, Leung LK. Bisphenol A downregulates CYP19 transcription in JEG-3 cells. *Toxicology Letters*. 2009;189(3):248-52.
209. Shanthanagouda AH, Nugegoda D, Patil JG. Effects of Bisphenol A and Fadrozole Exposures on cyp19a1 Expression in the Murray Rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2014;67(2):270-80.
210. Williams GP, Darbre PD. Low-dose environmental endocrine disruptors, increase aromatase activity, estradiol biosynthesis and cell proliferation in human breast cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2019;486:55-64.
211. Satoh K, Sakamoto Y, Ogata A, Nagai F, Mikuriya H, Numazawa M, ve ark. Inhibition of aromatase activity by green tea extract catechins and their

- endocrinological effects of oral administration in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2002;40(7):925-33.
212. Monteiro R, Azevedo I, Calhau C. Modulation of Aromatase Activity by Diet Polyphenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(10):3535-40.
213. Goodin MG, Rosengren RJ. Epigallocatechin Gallate Modulates CYP450 Isoforms in the Female Swiss-Webster Mouse. *Toxicological Sciences*. 2003;76(2):262-70.
214. Hassan E, Kahilo K, Kamal T, Hassan M, Saleh Elgawish M. The protective effect of epigallocatechin-3-gallate on testicular oxidative stress in lead-induced toxicity mediated by Cyp19 gene / estradiol level. *Toxicology*. 2019;422:76-83.
215. Monteiro R, Assunção M, Andrade JP, Neves D, Calhau C, Azevedo I. Chronic Green Tea Consumption Decreases Body Mass, Induces Aromatase Expression, and Changes Proliferation and Apoptosis in Adult Male Rat Adipose Tissue¹². *The Journal of Nutrition*. 2008;138(11):2156-63.
216. Wang Y, Lee KW, Chan FL, Chen S, Leung LK. The Red Wine Polyphenol Resveratrol Displays Bilevel Inhibition on Aromatase in Breast Cancer Cells. *Toxicological Sciences*. 2006;92(1):71-7.
217. Chottanapund S, Van Duursen MBM, Navasumrit P, Hunsonti P, Timtavorn S, Ruchirawat M, ve ark. Anti-aromatase effect of resveratrol and melatonin on hormonal positive breast cancer cells co-cultured with breast adipose fibroblasts. *Toxicology in Vitro*. 2014;28(7):1215-21.
218. Wang Y, Leung LK. Pharmacological concentration of resveratrol suppresses aromatase in JEG-3 cells. *Toxicology Letters*. 2007;173(3):175-80.
219. Zhang S, Yang X, Luo J, Ge X, Sun W, Zhu H, ve ark. PPAR α Activation Sensitizes Cancer Cells to Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Treatment via Suppressing Heme Oxygenase-1. *Nutrition and Cancer*. 2014;66(2):315-24.
220. Lukitasari M, Nugroho DA, Rohman MS. 28 GREEN TEA EXTRACT ADMINISTRATION HAD A BENEFICIAL EFFECT ON PPAR ALPHA AND PPAR GAMMA GENE EXPRESSION IN METABOLIC SYNDROME RAT MODEL. *Journal of Hypertension*. 2018;36:e9.
221. Lee K. Transactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by green tea extracts. *J Vet Sci*. 2004;5(4):325-30.
222. Marinovic MP, Sousa-Filho CPB, Batista FAH, Avelino TM, Cogliati B, Figueira ACM, ve ark. Green tea extract increases adiponectin and PPAR α levels to improve hepatic steatosis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2022;103:108957.
223. Huang Y, Lang H, Chen K, Zhang Y, Gao Y, Ran L, ve ark. Resveratrol protects against nonalcoholic fatty liver disease by improving lipid metabolism and redox homeostasis via the PPAR α pathway. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2020;45(3):227-39.

224. Inoue H, Jiang X-F, Katayama T, Osada S, Umesono K, Namura S. Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor α in mice. *Neuroscience Letters*. 2003;352(3):203-6.
225. Gao P, Wang L, Yang N, Wen J, Zhao M, Su G, ve ark. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) activation and metabolism disturbance induced by bisphenol A and its replacement analog bisphenol S using in vitro macrophages and in vivo mouse models. *Environment International*. 2020;134:105328.
226. Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, Cederroth CR, Combescure C, Nef S, ve ark. Perinatal Exposure to Bisphenol A Alters Early Adipogenesis in the Rat. *Environmental Health Perspectives*. 2009;117(10):1549-55.
227. Sakurai N, Mochizuki K, Kameji H, Shimada M, Goda T. (-)-Epigallocatechin gallate enhances the expression of genes related to insulin sensitivity and adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes at an early stage of differentiation. *Nutrition*. 2009;25(10):1047-56.
228. Jeong JY, Suresh S, Jang M, Park MN, Gobianand K, You S, ve ark. Epigallocatechin-3-gallate suppresses the lipid deposition through the apoptosis during differentiation in bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*. 2015;39(1):52-64.
229. Lee H, Bae S, Yoon Y. The anti-adipogenic effects of (-)epigallocatechin gallate are dependent on the WNT/ β -catenin pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013;24(7):1232-40.
230. Mitterberger MC, Zwerschke W. Mechanisms of Resveratrol-Induced Inhibition of Clonal Expansion and Terminal Adipogenic Differentiation in 3T3-L1 Preadipocytes. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2013;68(11):1356-76.
231. Li C, Cheng B, Fang S, Zhou H, Gu Q, Xu J. Design, syntheses and lipid accumulation inhibitory activities of novel resveratrol mimics. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;143:114-22.
232. Kang NE, Ha AW, Kim JY, Kim WK. Resveratrol inhibits the protein expression of transcription factors related adipocyte differentiation and the activity of matrix metalloproteinase in mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocytes. *Nutr Res Pract*. 2012;6(6):499-504.
233. Park E-J, Lee S, Kim J-Y, Choi J, Lee Y-S, Park M, ve ark. The obesogen bisphenol A promotes adipogenesis in canine adipose-derived stem cells: Potential implication in dog obesity. *Chemosphere*. 2024;362:142579.
234. Ahmed F, Sarsenbayeva A, Katsogiannos P, Aguer C, Pereira MJ. The effects of bisphenol A and bisphenol S on adipokine expression and glucose metabolism in human adipose tissue. *Toxicology*. 2020;445:152600.

8. EKLER

EK 1. Tez Çalışması Orjinallik Raporu Ekran Görüntüsü

DOĞAL VE SENTETİK ENDOKRİN BOZUCU KİMYASAL MADDELERİN 3T3- L1 HÜCRELERİNDE ADİPOJENEZLE İLGİLİ PROTEİNLER ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 18	% 17	% 8	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 6
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 3
3	turkish.elisatest-kit.com İnternet Kaynağı	% 2
4	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
5	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	acikerisim.harran.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
8	b-ok.cc İnternet Kaynağı	<% 1

EK 2. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: İzem Bilinmiş
Ödev başlığı: DOĞAL VE SENTETİK ENDOKRİN BOZUCU KİMYASAL MADDEL...
Gönderi Başlığı: DOĞAL VE SENTETİK ENDOKRİN BOZUCU KİMYASAL MADDEL...
Dosya adı: I_zem_BI_LI_NMI_S_YL_TEZ.pdf
Dosya boyutu: 3.9M
Sayfa sayısı: 143
Kelime sayısı: 32,648
Karakter sayısı: 212,260
Gönderim Tarihi: 16-Ağu-2024 11:22ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2432883834



9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: İzem Bilinmiş