

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

**BİSFENOL A’NIN SH-SY5Y NÖROBLASTOMA
HÜCRELERİNDEKİ ASETİLKOLİNESTERAZ GEN
EKSPRESYONUNA OLAN ETKİLERİNİN
NİTRİK OKSİT SENTAZ ARACILIĞIYLA İNCELENMESİ**

Dr. Ecz. Beyza AYAZGÖK

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2017

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

**BİSFENOL A’NIN SH-SY5Y NÖROBLASTOMA
HÜCRELERİNDEKİ ASETİLKOLİNESTERAZ GEN
EKSPRESYONUNA OLAN ETKİLERİNİN
NİTRİK OKSİT SENTAZ ARACILIĞIYLA İNCELENMESİ**

Dr. Ecz. Beyza AYZGÖK

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Z.Tuba TÜYLÜ KÜÇÜKKILINÇ**

ANKARA

2017

ONAY SAYFASI

BİSFENOL A'NIN SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDEKİ ASETİLKOLİNESTERAZ GEN EKSPRESYONUNA OLAN ETKİLERİNİN NİTRİK OKSİT SENTAZ ARACILIĞIYLA İNCELENMESİ

Ecz. Beyza AYAZGÖK

Bu çalışma 30.01.2017 tarihinde jürimiz tarafından "Biyokimya Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof.Dr. Derya AKAYDIN ALDEMİR

(Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

Tez Danışmanı: Doç.Dr.Tuba Tüylü KÜÇÜKKILINÇ

(Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

Üye: Prof. Dr. YEŞİM ÖZKAN

(Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

Üye: Doç.Dr.Ayşe ERCAN

(Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

Üye: Doç.Dr. Ebru BODUR

(Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Diclehan Orhan

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.

- o **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenikle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

- X **Tezimin/Raporumun 30.01.2023 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

- o **Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- o **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

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

Dr. Ecz. Beyza AYAZGÖK

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, Doç. Dr. Tuba TÜYLÜ KKKILI danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Ecz. Beyza AYAZGÖK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının her aşamasında yanımda olan, bilgisini ve deneyimlerini benimle cömertçe paylaşan, desteğini her zaman hissettiğim, bana her konuda yardımcı ve öğretici olan, beraber çalışmaktan onur duyduğum saygıdeğer Tez Danışmanım Doç. Dr. Z.Tuba TÜYLÜ KÜÇÜKKILINÇ'a,

Çalışmalarım sırasında sorularımı yanıtsız bırakmayan, her zaman çözüm önerisi getiren, destekleyen, maddi manevi imkanlarını benimle cömertçe paylaşan saygıdeğer Hocam Doç. Dr. Ayşe ERCAN'a,

Doktora eğitim sürecinin başlangıcından sonuna kadar bana karşı ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer Hocam Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gülberk UÇAR'a,

Tezimin son aşamalarında laboratuvardaki cihazlarını bana cömertçe sunan değerli Hocam Prof.Dr. Özden TACAL'a,

Bu zorlu süreçte laboratuvardaki cihaz imkanlarını benden esirgemeyen Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı değerli öğretim üyesi Doç. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ'ye,

Tezimin son aşamalarında laboratuvardaki cihazlarla ilgili bilgi ve tecrübelerini benimle cömertçe paylaşan Yrd. Doç. Dr. Kevser BİBEROĞLU'na,

Çalışmam süresince beni yalnız bırakmayan, en zor zamanlarımda bile sevgi, yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Arş. Gör Selin ÖNCÜL'e, Arş Gör. İpek BAYSAL'a ve Arş.Gör. Açelya ERİKÇİ'ye,

Zorlu tez yazım süreci boyunca beni hep destekleyen Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Çalışanlarına,

Hayatım boyunca hep yanımda olup beni her zaman destekleyen, yüreklendiren, onlarla paylaştığım her an için daima şükrettiğim, bu tezin her aşamasında emeğini esirgemeyen Sevgili İkizim Büşra AYZGÖK'e ve Sevgili Kardeşim Süleyman AYZGÖK'e,

Hayatım boyunca beni maddi ve manevi her konuda koşul gözetmeksizin destekleyen, sevgilerini, ilgilerini hep hissettiğim, onların evladı olmaktan gurur duyduğum Sevgili Annem Zehra AYZGÖK ve Sevgili Babam Hasan AYZGÖK'e,

Teşekkürlerimi bir borç bilirim.

ÖZET

Ayazgök, B. Bisfenol A' nin SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinde Asetilkolinesteraz Gen Ekspresyonuna olan Etkilerinin Nitrik Oksit Sentaz Aracılığıyla İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017. Bu tez çalışmasında SH-SY5Y hücrelerine düşük dozlarda Bisfenol A (BPA) uygulanmıştır. BPA endüstride sıklıkla kullanılan bir endokrin bozucu maddedir. BPA'nın SH-SY5Y hücrelerin olan sitotoksitesisi MTT ve LDH deneyleriyle, NO düzeyleri Griess yöntemiyle belirlenmiştir. Hücrelerin asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BuChE) gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR, enzim aktiviteleri Ellman yöntemiyle belirlenmiştir. Hücrelerin % popülasyonları Tali sitometresi ile TNF α ve kaspaz-8 düzeyleri Elisa kitlerle ölçülmüştür. Hücrelerin % canlılık değerinin monotik olmayan doz cevabı verdiği ve sitotoksitesite sonuçları ile NO düzeyleri arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. BPA'nın AChE ve BuChE enzimleri için IC₅₀ değeri sırayla 2,2 mM ve 1,98 mM bulunmuştur. 48 saatte 1 pM ve 1 nM BPA, AChE gen ekspresyon düzeyini kontrole göre sırasıyla 0,61 ile 1,03'e; ve BuChE gen ekspresyon düzeyini sırayla 2.18 ve 0,73'e değiştirdiği gözlenmiştir. Spesifik AChE aktivitesinin; 1 pM BPA uygulamasıyla 2. ve 12. saatte arttığı, 4. saat sonunda ise azaldığı görülmüştür. 1 nM BPA uygulamasıyla 4 saatte spesifik AChE enzim aktivitesi artmıştır. 1 pM BPA ve 1 nM BPA uygulamasının 48. saatte TNF- α düzeyini sırasıyla 0,073'e ve 0,084'e azalttığı görülmüştür. 24. saatte ise sadece 1 pM BPA'nın 0,302'e azalttığı belirlenmiştir. Kaspaz-8 düzeyi 24. saatte 1 pM ve 1 nM BPA ile sırasıyla % 154,7 ve % 287'lik; 48. saatte ise % 297,3 ve %160,2'lik artış göstermiştir. 1 pM BPA ve 1 nM BPA ile apoptotik % hücre popülasyonu sırayla 6. saatte (%7,3, %7,7) artıp 48. saatte (%1,3, %1) azalırken nekrotik % hücre popülasyonu ise 4. ve 6. saatte (%20,3; %18,3-%19,3; %21,3) azalıp 48. saatte ise (%23,7; %27) artmıştır. Bu tez çalışmanın sonuçları SH-SY5Y hücrelerine 1 pM ve 1 nM BPA uygulanmasıyla 48 saatte hücrenin apoptozdan yine programlı bir ölüm şekli olan nekroptozla doğru yöneldiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bisfenol A, Asetilkolinesteraz, Nitrik Oksit, Nekroptoz, Apoptoz

ABSTRACT

Ayazgök, B. Examination of the Effects of Bisphenol A on the Expression of Acetylcholinesterase in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells via Nitric Oxide Synthase. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Doctorate Thesis in Biochemistry, Ankara, 2017. In this study, SH-SY5Y human neuroblastoma cells treated with low doses of Bisphenol A (BPA). BPA is a commonly used endocrine disruptor. The cytotoxicity of BPA to SH-SY5Y cells was determined by MTT and LDH assays, and NO levels were determined by the Griess method. The acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) gene expression levels of the cells were determined by RT-PCR and enzyme activities by the Ellman method. % Populations of cells were determined by Tali cytometer and TNF α and caspase-8 levels were measured with Elisa kits. It was determined that % viability of cells gave a non-monotonic dose response and a correlation between cytotoxicity results and NO levels. The IC₅₀ values for AChE and BuChE enzymes were found to be 2.2 mM and 1.98 mM, respectively. The AChE gene expression level with 1 pM and 1 nM BPA at 48 hours was changed to 0.61 and 1.03 respectively and BuChE gene expression level was changed to 2.18 and 0.73 in comparison with the control. 1 pM BPA and 1 nM BPA decreased TNF- α levels to 0.073 and 0.084 respectively, at 48 hours. At 24 hours, it was determined that only 1 pM BPA treatment decreased TNF- α levels to 0.302. Caspase-8 levels were increased to 168.4%, 297.3% and 287%, 160.2% at 24 and 48 hours with 1 pM and 1 nM BPA, respectively. The apoptotic % cell population with 1 pM BPA and 1 nM BPA increased sequentially at 6 hours (7.3%, 7.7%) and decreased at 48 hours (1.3%, 1%) while the necrotic cell population decreased in 4. and 6. hours (20.3%, 18.3% -19.3%, 21.3%) and increased in 48 hours (23.7%, 27%). The results of this study demonstrate that cell switches from apoptosis to a necroptosis, a programmed death, at 48 hours by applying 1 pM and 1 nM BPA to SH-SY5Y cells.

Key Words: Bisphenol A, Acetylcholinesterase, Nitric Oxide, Necroptosis, Apoptosis

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iii
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1 SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattı	9
2.2 Bisfenol A (BPA)	9
2.3 Östrojen	15
2.3.1 Östrojen Reseptörleri	16
2.3.2 BPA'nın Östrojen Reseptörü Üzerine Etkileri	16
2.3.3 BPA'nın Östrojenin Beyindeki Rolüne olan Etkileri	18
2.4 Nitrik Oksit Sentaz (NOS)	20
2.5 Kolinesterazlar ve Kolinergik Sistem	22
2.5.1 Kolinesteraz Enzimlerinin Moleküler Formları	24
2.5.2 Kolinesteraz Enzimlerinin Aktif Merkez Yapısı	26
2.5.3 Kolinergik Antiinflamatuvar Yolak	27
2.6 Apoptoz	29
2.7 Nekroptoz	32
2.8 Nekroz	34
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	36
3.1 Gereçler	36
3.1.1 Hücreler	36
3.1.2 Kimyasal Maddeler ve Kitler	36

3.1.3 Cihazlar	37
3.2 Yöntemler	38
3.2.1 Hücre Kültürü	38
3.2.2 Thoma Lamı ile Hücre Sayımı	39
3.2.3 MTT Sitotoksosite Deneyi	39
3.2.4 Nitrik Oksit (NO) Düzeyinin Griess Yöntemiyle Ölçülmesi	40
3.2.5 Laktat Dehidrogenaz (LDH) Deneyi	41
3.2.6 SH-SY5Y Hücrelerinin Plakalara Ekilmesi	42
3.2.7 SH-SY5Y Hücrelerinden RNA Eldesi ile RNA'ların Miktar ve Saflık Tayini	42
3.2.8 RNA için Denatüre Edici Agaroz Jelin Hazırlanması ve RNA'ların Jel Görüntüsünün Eldesi	43
3.2.9 SH-SY5Y RNA'larından cDNA Eldesi	43
3.2.10 Kantitatif Eş Zamanlı PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	44
3.2.11 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi Amacıyla Tasarlanan Primerlerin Dizileri	45
3.2.12 BPA'nın AChE ve BuChE Enzim Aktivitesine Etkisi	45
3.2.13 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin Spesifik AChE Aktivitelerinin Belirlenmesi	46
3.2.14 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin TNF- α Düzeylerinin Belirlenmesi	48
3.2.15 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin Kaspaz-8 Düzeylerinin Belirlenmesi	48
3.2.16 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin Tali Görüntülü Hücre Sitometresi ile Değerlendirilmesi	49
3.2.17 İstatiksel Değerlendirme	50
4. BULGULAR	51
4.1 SH-SY5Y Hücrelerinin Işık Mikroskopuyla Elde Edilen Görüntüsü	51
4.2 BPA'nın SH-SY5Y Hücrelerinde Sitotoksik Etkisi	51
4.2.1 Mtt Sitotoksosite Deneyi	51
4.3 SH-SY5Y Hücrelerinde nNOS Gen Ekspresyon Düzeyi Sonuçları	53

4.4 Nitrik Oksit (NO) Düzeyinin Griess Yöntemiyle Ölçüm Sonuçları	54
4.5 Laktat Dehidrogenaz (LDH) Deneyi	58
4.6 SH-SY5Y Hücrelerinden Elde Edilen RNA Örnekleri ile İlgili Sonuçlar	59
4.7 SH-SY5Y Hücrelerinden Elde Edilen RNA Örneklerinin Jel Görüntüleri	60
4.8 SH-SY5Y Hücrelerinden Saflaştırılan RNA'lardan Oluşturulmuş cDNA'lerin Miktar ve Saflık Tayini	61
4.9 SH-SY5Y Hücrelerinde AChE ve BuChE Genlerinin Ekspresyon Düzeyi Sonuçları	61
4.1 BPA'nın AChE ve BuChE Enzimleri için IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	63
4.2 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin Spesifik AChE Aktivitelerinin Belirlenmesi	64
4.2.1 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücre Örneklerindeki Protein Miktarının belirlenmesi	64
4.2.2 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücre Örneklerindeki Spesifik AChE Aktivitelerinin Belirlenmesi	65
4.3 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin TALİ Görüntülü Hücre Sitometresi ile Değerlendirilmesi	67
4.4 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin TNF- α Düzeyleri	71
4.5 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin Kaspaz-8 Düzeyleri	72
5. TARTIŞMA	75
6. ÖNERİLER	81
7. KAYNAKLAR	82
8. ÖZGEÇMİŞ	93

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
AchE	Asetilkolinesteraz
AHR	Arilhidrokarbon
ARP	AchE-R peptidi
Bcl	İnsan B hücresi foliküler lenfoması
Bid	BH3 ile etkileşen bölge ölüm agonisti
bis- DMA	Bisfenol A dimetrilat
bis-GMA	Bisfenol-A Glisidil Metakrilat
BPA	Bisfenol A
BuChE	Butirilkolinesteraz
ChAT	Kolinasetiltransferaz
CHT1	Yüksek Afiniteli Kolin Taşıyıcı
CLAMs	Kolinesteraz benzeri adhezyon molekülleri
DAI	İnterferon Regülatör Faktörlerin DNA bağımlı Aktivatörü
DES	Dietilstilböstrol
DIABLO	Düşük Pı'ya sahip IAP bağlanma proteini
DISC	Ölümü İndükleyen Sinyal Kompleksi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
E2	17 β - Estradiol
EDC	Endokrin Bozucu Kimyasal
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
Enos	Endotelyal NOS
ER	Östrojen Reseptör
ER α	Östrojen Reseptör α

ER β	Östrojen Reseptör β
FADD	Fas ile İlişkili Ölüm Bölgesi
FasL	Fas Ligandı
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GFP	Yeşil floresans proteini
GPER	G-protein Bağlı ER1
GPR30	G-protein Bağlı Reseptör 30
Gr B	Granzim B
HI FBS	Isı ile İnaktive Edilmiş Fetal Sığır Serumu
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IFN- γ	İnterferon-gamma
IL-4	İnterlökin 4
IL-8	İnterlökin 8
INSERM	Fransa Ulusal Sağlık ve Medikal Araştırma Enstitüsü
ISO-OMPA	isotetramonoisopropilpirofosfattatramid
İnos	Uyarılabilir NOS
LH	Luteinleştirici Hormon
LOAEL	Yan Etki Gösteren En Düşük Doz
mAChR	Muskarinik Asetilkolin Reseptörü
MLKL	Mixed Lineage Kinaz Domain-Like Protein
nAChR	Nikotinik Asetilkolin Reseptörü
Nek-1	Nekrostatin-1
NF κ B	Nükleer Faktör Kappa B
NMDR	Monotik Olmayan Doz Cevabı
Nnos	Nöronal NOS
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz

NP-40	Nonidet P-40
NSA	Nekrosülfonamit
NTP	Ulusal Toksikoloji Programı
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PC	Polikarbonat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PNS	Perifer Sinir Sistemi
PPAR	Peroksizom Proliferatör- aktive Reseptör
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RFP	Kırmızı floresan proteini
RIPK1	Reseptör Aracılı Protein Kinaz 1
RIPK3	Reseptör Aracılı Protein Kinaz 3
SSS	Santral Sinir Sistemi
T3	Triyodotironin
T4	Tiroksin
TDI	Tolere Edilebilen Günlük Doz
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör Alpha
TRLs	Toll like Reseptörler
TSH	Tiroid Stimüle Edici Hormon
U.S. EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
U.S. FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
VAcHT	Veziküler Asetilkolin Taşıyıcı

ŞEKİLLER

1.1	BPA'nın kimyasal formülü.	5
1.2	BPA'nın sentez reaksiyonu	5
2.1	SK-N-SH ve SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.	9
2.2	BPA'nın kronik hastalıklar üzerine etkileri	12
2.3	BPA'nın immun sistem hücrelerine etkileri.	14
2.4	Östrojenin ölüm ve sağkalım mekanizmalarına etkisi	17
2.5	BPA'nın ER α /ER β dengesine olan etkisi.	18
2.6	Östrojen sinyalizasyonunun fizyolojik işlevleri.	19
2.7	Nitrik Oksitin beyindeki işlevleri.	21
2.8	Asetilkolin (ACh) sentezi.	23
2.9	AChE ve BChE'nin moleküler formları.	25
2.10	Asetilkolinesteraz enzimi moleküler yapısı	26
2.11	Kolinerjik anti-inflamatuar yolak	28
2.12	Ekstrinsik apoptoz yolağı	30
2.13	İntrinsik apoptoz yolağı.	31
2.14	Nekroptoz yolağı ve düzenleyicileri.	32
2.15	Hücre Ölüm yolakları..	35
3.1	MTT ve MTT-formazan kimyasal yapıları	40
3.2	Laktat Dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyon.	41
3.3	Ellman metodunun kimyasal mekanizması.	46
4.1	SH-SY5Y hücrelerinin ışık mikroskopu altındaki görüntüsü.	51
4.2	Artan derişimlerde BPA (0-100 μ M) uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde farklı saatlerdeki yüzde canlılık grafiğı.	52
4.3	1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerindeki nNOS gen ekspresyon düzeyi sonuçları.	54
4.4	NaNO ₂ için elde edilen standart eğri grafiğı.	54
4.5	Farklı saatlerde artan derişimlerde BPA (0-100 μ M) uygulanmış SH-SY5Y hücrelerindeki % NO düzey grafiğı.	56
4.6	Artan derişimlerde BPA (0-100 μ M) uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde % canlılık sonuçları ile % NO değerleri korelasyon grafiğı.	57

4.7	48 saat süresince düşük doz (1 pM ve 1 nM) BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin % MTT , % LDH ve % NO değerlerinin karşılaştırma grafiği.	59
4.8	Hücrelerden saflaştırılan total RNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri.	60
4.9	1 pM ve 1 nM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde AChE ve BuChE genlerinin ekspresyon düzeyleri grafiği.	62
4.10	BPA'nın AChE enzimine ait inhibisyon grafiği.	64
4.11	BPA'nın BuChE enzimine ait inhibisyon grafiği.	64
4.12	BSA için elde edilen standart eğri grafiği.	65
4.13	Düşük doz BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin spesifik AChE enzimi aktivite sonuç grafiği (U/mg protein).	66
4.14	1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin farklı saatlerdeki apoptotik, nekrotik, geç apoptotik ve canlı % hücre popülasyon grafiği.	68
4.15	48 saat boyunca 1 nM BPA ve Nek-1 uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin TALİ sitometresi ile değerlendirilme sonuçları.	70
4.16	48 saat süresince BPA uygulanmamış kontrol grubu (A) 1 nM BPA uygulanmış olan (B) ve 1 nM BPA ile Nek-1 uygulanan (C) SH-SY5Y hücrelerinin mikroskop görüntüleri.	70
4.17	1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin TNF- α /protein pg/ μ g düzeyleri grafiği.	72
4.18	Düşük doz BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin kaspaz-8 düzeyleri grafiği	73
5.1	Düşük doz BPA'nın SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki etki mekanizması.	80

TABLOLAR

1.1	Kimyasal yapılarına göre endokrin sistem hormonları sınıflandırılması.	1
1.2	Endokrin bozucuların üreme sistemi dışındaki etkileri.	4
3.1	RT-PCR işlemi için hazırlanan reaksiyon ortamı	44
3.2	Gen ekspresyonu çalışmaları için tasarlanmış primerler	45
3.3	BSA standart çözeltilerinin stok BSA ile hazırlanışı	47
4.1	Artan derişimlerde BPA (0-100 µM) uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde yapılan farklı saatlerdeki yüzde canlılık verileri	52
4.2	1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde nNOS gen ekspresyon düzeyi sonuçları.	53
4.3	Artan derişimlerde (0-100 µM) BPA uygulanmış hücrelerin NO derişimleri (µg/ml).	55
4.4	Artan derişimlerde BPA (0-100 µM) uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin Griess yöntemiyle elde edilmiş % NO verileri.	55
4.5	MTT sitotoksosite deney sonuçları ve Griess yöntemiyle elde edilmiş %NO verilerinin birlikte değerlendirilmesi	57
4.6	48 saat süresince 1 pM ve 1 nM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin % MTT, % LDH ve % NO değerleri	58
4.7	SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen RNA örneklerinin saflığı ve miktarı	60
4.8	SH-SY5Y hücrelerinden saflaştırılan RNA'lardan oluşturulmuş cDNA'lerin miktar ve saflık tayini sonuçları	61
4.9	48 saat süresince artan dozda (1 pM, 1 nM) BPA uygulanmış olan SH-SY5Y hücrelerinde AChE ve BuChE genlerinin ekspresyon düzeyleri	62
4.10	1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin ortalama spesifik AChE aktivite verileşlri (U/mg protein)	66
4.11	1 pM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerin TALİ görüntülü hücre sitometresi ile elde edilen apoptotik, nekrotik, geç apoptotik ve canlı % hücre popülasyon ortalama değerleri.	67
4.12	48 saat boyunca 1 nM BPA ve Nek-1 uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin apoptotik, nekrotik, geç apoptotik ve canlı % hücre popülasyon ortalama değerleri.	69

- 4.13** BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde birim protein derişimine düşen TNF- α miktarı ortalama değerleri (pg/ μ g). 71
- 4.14** Düşük doz BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde protein derişimine göre normalize edilen % Kontrol Absorbans ortalama değerleri. 73

1. GİRİŞ

Vücut dokuları ile organlar arasındaki koordinasyonun sağlanmasında iki ana sistem rol üstlenmektedir; bu sistemler sinir sistemi ve endokrin sistemdir (1). Sinir sistemine özgü nöronlar, hücreler arası sinaptik boşlukta salınan nörotransmitter aracılığıyla sinyal gönderme ve alma işlemini hızlıca gerçekleştirmektedir (2). Endokrin sistem ise özelleşmiş organlar ve kimyasal sinyaller salgılayan bezlerden oluşmuştur. Endokrin sistem tarafından ekstraselüler sıvıya sekrete edilen hormon adı verilen kimyasal sinyaller vücutta bulunan her hücreye kan aracılığıyla taşınabilmektedir. Bu hormonlar büyüme, sindirim, üreme, homeostaz gibi metabolik işlevlerde ve bu işlevlerin kontrolünde önemli görev almaktadır (1). Hormonlar kimyasal yapılarına göre Tablo 1.1 'de sunulduğu gibi steroid hormonlar, protein ve peptit yapılı hormonlar ve aminoasitten türeyen hormonlar olarak üç kategoride sınıflandırılmaktadır.

Tablo 1.1 Kimyasal yapılarına göre endokrin sistem hormonları sınıflandırılması.

Kimyasal Yapı	Endokrin Bez	Hormon
Protein ve Peptit Yapılı Hormonlar	Anterior Hipofiz	Luteinleştirici hormon Folikül-stimüle edici hormon Adrenokortikotropik hormon Tiroid-stimüle edici hormon Büyüme hormonu Prolaktin
	Hipotalamus	Somatostatin Büyüme hormonu-salgılatıcı hormone Tirotropin-salgılatıcı hormone Gonadotropin-salgılatıcı hormone
	Paratiroid	Paratiroid Hormonu
	Gastrointestinal Sistem	Gastrin Kolesistokinin Sekretin
	Pankreas	İnsülin Glukagon Somatostatin
	Tiroid	Kalsitonin
	Adrenal Korteks	Aldosteron Kortisol
	Yumurtalık	Estradiol Progesteron

Steroid Yapıda Olan Hormonlar		Testosteron
	Testis	Testosteron Estradiol
Aminoasitten Türeyen Hormonlar	Gastrointestinal Sistem	Serotonin
	Adrenal Medulla	Epinefrin Norepinefrin
	Hipotalamus	Dopamin
	Tiroid	Tiroksin (T4) Triiyodotironin (T3)

Endokrin bezleri ve hormonları vücuttaki homeostazın kontrolünün en önemli bileşenlerindedir (3). Hormonlar indirekt olarak spesifik reseptör proteinlere bağlanarak etki edebilirler. Reseptör proteinler hormon ile etkileştiğinde sinyal iletim sistemi hormonal cevabın oluşumu için devreye girer. İki temel sinyal iletim sistemi tanımlanmıştır. Hipotalamik ve hipofiz hormonları gibi hidrofilik hormonlar hücre membranlarını kolayca geçemediklerinden transmembran reseptörlerinin ekstraselüler bileşenlerine bağlanırlar. Hidrofilik hormonların membrana bağlı reseptöre bağlanması sonucunda intraselüler sinyalizasyon yolağı aktive olur ve böylece kısa sürede hücre fonksiyonlarında değişiklikler meydana gelebilmektedir. Diğer iletim sistemi ise vücutta sentezlenen en güçlü östrojen olan 17 β -estradiol (E2) gibi steroid yapılı cinsiyet hormonlarını içeren lipofilik hormonlar tarafından kullanılmaktadır (4). Bu hormonlar intraselüler reseptörlere bağlanıp spesifik genlerin transkripsiyonunu indüklemektedir. Bu intraselüler reseptörler ligand bağımlı transkripsiyon faktörler gibi davranır ve nükleer reseptör süper ailesine aittirler. Östrojen reseptörleri gibi triiyodotironin, retinoik asit, kortizol, androjen, progesteron ve aldosteron reseptörleri de bu aileye ait reseptörlerdendir (5). E2, üreme organlarının gelişimi, kardiyovasküler düzenleme ve inflamasyonun modülasyonu gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde görevli steroid yapılı hormonların başında gelmektedir. Bu steroid yapılı hormon sekonder cinsiyet karakteristiklerinin ve seksüel davranışların gelişmesinde ve hipotalamik gonadotropin-salğılatıcı hormonun ekspresyonu salgılanmasında önemli rol üstlenmektedir. Luteinleştirici Hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) ovülasyonda östrojenin üretimini kontrol etmektedir (6).

E2'nin metabolitleri olan östron ve estriol yüksek afiniteli ligandlar olup östrojen reseptörleri üzerinde zayıf agonistlerdir. Bu metabolitlerin inaktif olduğu

düşünülürken güncel bilgiler dokulara spesifik rollerinin olduğunu göstermektedir (7). Östrojenlerin hücrel sinyalizasyonu östrojen reseptör α (ER_{α}) ve östrojen reseptör β (ER_{β}) olmak üzere iki östrojen reseptörü tarafından düzenlenmektedir. Her iki östrojen reseptörü de nükleer reseptör ailesinin üyeleridir (8). Nükleer reseptörler hem spesifik hormonlara bağlanan hem de belirli genlerin transkripsiyonunu etkileyen transkripsiyon faktörler gibi aktive gösteren protein ailesinden oluşmuştur (9). ER_{α} 1950'lerin sonlarında Elwood Jensen tarafından tanımlanmıştır (10). ER_{β} 'nin ratlarda izole edilmesine kadar östrojen reseptörü olarak sadece ER_{α} biliniyordu (11). Daha sonrasında ise insanda ER_{β} östrojen reseptör alt tipi olarak tanımlanmıştır (12). Sekonder östrojen reseptörü olan ER_{β} ve diğer reseptör izoformlarının tanımlanması östrojen sinyalizasyonunun kompleks yapısını doğrulamıştır. Aynı zamanda bu durum ER_{α} sentezlenmeyen dokulardaki östrojenik aktiviteyi açıklar niteliktedir. ER_{β} yüksek derecede klasik östrojen reseptörü ER_{α} ile benzer sekansa sahipken ER_{β} 'nin 17 β -estradiol'e olan afinitesi ER_{α} 'ya kıyasla daha azdır (8).

Endokrin bozucular, endokrin sistemin gelişimi ve fonksiyonunda değişik düzeylerde değişime yol açan ekzojen madde veya madde karışımlarıdır. Bu maddeler, hormonların üretimi, salınımı, taşınma, aktivite, yıkım ve vücuttan atılımları üzerine etki etmektedir. Endokrin bozucular olarak nitelendirilen kimyasallar poliklorine bifeniller, fitalatlar, BPA, pestisidler, fitoöstrojenler, bazı endüstriyel veya ticari maddeler, tıbbi veya farmasötik ürünlerdir (13).

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (U.S. EPA) endokrin bozucuları hedef reseptör veya dokudaki hormonların etkisini durduran veya taklit eden ya da direkt olarak endokrin sistem hormonlarının üretimini stimüle veya inhibe eden kimyasallar olarak tanımlamıştır (14).

Endokrin bozucular üreme sistemi üzerine etki etmektedir. Bu dört şekilde olabilmektedir:

1. Östrojen Reseptörlerini Uyararak Etkileyenler: Bisfenol A ve B, Dietilstilböstrol, Metoksiklor, Klordekon, Oksifenol, Nonilfenol, Genistein, DTT ve metabolitleri
2. Androjen Reseptörlerini İnhibe Ederek Etkileyenler: Vinklozin, Flutamid, DTT ve metabolitleri, Metoksiklor, Fenitroton, Prosimidon, Linuron

3. Steroit Hormon Sentezini İnhibe Edenler: Fitalatlar, Trifeniltin, Feniramirrol, Fadrozol, Ketokonazol, Finasterid, Endosulfan
4. Apoptozise Neden Olanlar: Deltamerin, Oksilfenol, 1,2-dibromo-3 kloropropan

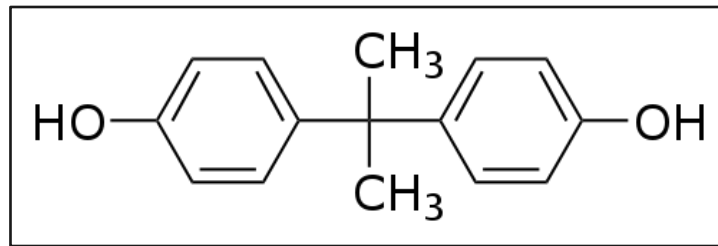
Endokrin bozucuların üreme sistemi dışındaki etkileri Tablo 1.2’de özetlenmiştir (15-17).

Tablo 1.2 Endokrin bozucuların üreme sistemi dışındaki etkileri.

	Dişi	Erkek
Kanser	Kanser hücre çoğalmasının ve anjinogenezisin azalması (fitoöstrojenler), iyi ve kötü huylu kanserlerde azalma (soyalı ürünler) dışında endometrial hiperplazi, vajinal adenokarsinom, uterus kanseri, meme kanseri gelişme risk artışı	Testis kanseri riskinin artması, prostat kanseri gelişme riskinin artması veya azalması
Teratojenik Etkileri	İskelet kalsifikasyonları, ventriküllerde genişleme, gebelerde yavru sıçan sayısının azalması, yaşayan yavru sıçan sayısının azalması, intrauterin ölüm, abortus, düşük doğum kilosu	
Tiroid Fonksiyonları	Fetal tiroid hormon bozuklukları, tiroid hormonu konjugasyon bozukluğu, serum tiroksin seviyelerinde düşüklük	
Kardiyovasküler Etkiler	Kolesterol düşüklüğü ve antioksidan etkiler (fitoöstrojenler), trombosit agregasyon bozuklukları	
Kemik	Kemik mineral dansitesi üzerine olumlu (fitoöstrojenler) ve olumsuz etkiler, epifizlerin erken veya geç kapanması	
Diğer	Postnatal büyüme bozuklukları, vücut ağırlığı azlığı, erkek/kız yavru oranının bozulması	

Bisfenol A, (BPA, 2,2-bis(4-hidroksifenil) propan) polikarbonat plastik yapısındaki epoksi reçine yapımında ve polimer olmayan diğer plastiklerde katkı maddesi olarak sıklıkla kullanılan endüstriyel bir bileşendir (18). BPA Şekil 1.1’de görülebileceği üzere iki metil fonksiyonel grup içeren bir metil köprüsü ile birbirine bağlanmış iki fenol halkadan oluşmuş bir kimyasaldır (19). BPA dünya genelinde en fazla üretilen kimyasallar arasındadır. 2011 yılında yaklaşık olarak 24 milyar liralık

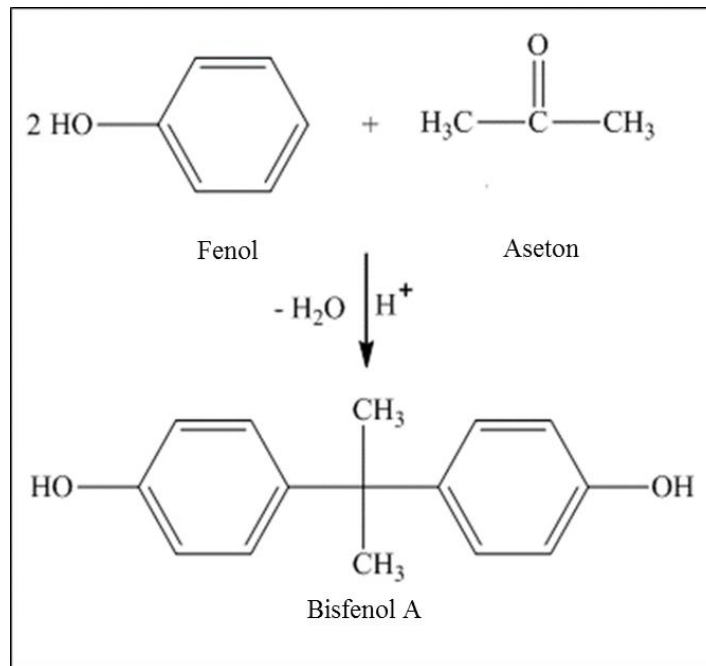
değerde BPA üretimine ulaşılmış olup yılda 100 tonun üzerinde BPA'nın atmosfere salındığı bildirilmiştir (20-22).



Şekil 1.1 BPA'nın kimyasal formülü.

BPA ilk olarak A. P. Dianin tarafından 1891 yılında sentezlenmiş olup 1930'lu yıllarda sentetik östrojen eldesi için yapılan çalışmalarda detaylıca araştırılmıştır. Bu araştırmalar esnasında BPA'nın östrojenik etkileri ele alınsa da BPA analogu olan dietilstilböstrol (DES)'ün östrojenik etkisinin BPA'dan daha fazla olduğu anlaşılınca BPA'nın farmasötiksel kullanımına son verilmiştir (21)

BPA iki mol fenol ve 1 mol asetonun reaksiyona girmesiyle asit katalizi sonucunda sentezlenen bir moleküldür. Şekil 1.2'de BPA'nın sentez reaksiyonu görülmektedir (23).



Şekil 1.2 BPA'nın sentez reaksiyonu

Birçok insan, günümüzde kullanılan geri dönüştürülmüş şişelerde, epoksi reçinelerle kaplı teneke kaplarda ve polikarbonat kutulardaki içerisine BPA sızmış olan yiyecek ve içecekleri tüketerek bu kimyasala maruziyet yaşamaktadır. BPA moleküllerinin epoksi reçinelere ve polikarbonatlara bağlanmasını sağlayan ester bağlarının hidrolizi sıcaklık, asidite ve ısı gibi çevresel faktörlerle artabilmektedir (24).

Bisfenol A (BPA) yapılan çoğu çalışmada östrojenik özellik göstermesinden ötürü endokrin bozucu kimyasal (EDC) olarak nitelendirilmiştir. 1938'de BPA'nın insan östrojen reseptörüne (ER) bağlandığı ve aktive ettiği Dodds ve Lawson tarafından bildirilmiştir (25). BPA molekülü ER α ve ER β olmak üzere iki adet ER alt tipine bağlanabilmektedir. BPA her iki östrojen reseptörü alt tipine bağlanarak gen ekspresyonunu aktivasyon veya baskılama yoluyla değiştirerek etkisini gösterebilmektedir. BPA, bazı dokularda östrojen agonisti olarak etki gösterirken bazı dokularda östrojen antagonisti olarak işlev gördüğünden östrojenik aktivite bakımından iyi bir seçici+ östrojen reseptör modülatörü olarak tanımlanmaktadır (26). BPA molekülü, en aktif östrojen molekülü olarak bilinen 17 β -estradiol'e kıyasla östrojenik reseptörlerine 1000-2000 kat daha az afinite göstermektedir (27).

BPA zayıf östrojen olarak sınıflandırılmış olsa da güncel çalışmalarda düşük derişimlerde bile nükleer reseptörlere bağlanarak hücre ve dokuların fizyolojik fonksiyonlarını etkileyebildiği ortaya konmuştur (28). Ayrıca BPA'nın tiroid hormon reseptörleri, androjen reseptörleri, peroksizom proliferatör aktif reseptörleri, diğer endokrin sistem reseptörleriyle de etkileştiği bilinmektedir (27).

BPA, Fransa Ulusal Sağlık ve Medikal Araştırma Enstitüsü INSERM in 2010 yılında yayımladığı raporda üreme sistemi toksik maddesi olarak kategori 3'te sınıflandırılmıştır. Üreme için endişe verici düzeyde toksik olduğu bu raporda belirtilmiştir (29). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) BPA hakkındaki ilk risk değerlendirmesini 2006'da yayınlamıştır. Bu değerlendirmede BPA için tolere edilebilen günlük alımın (TDI) 50 μ g/kg vücut ağırlığı/gün olduğunu bildirmiş ve besinler aracılığıyla erişkinler, gençler ve bebeklerin maruz kaldığı BPA'nın bu değerden düşük olduğunu belirtmiştir (30). EFSA 2008 ve 2010'da yayımladığı diğer raporlarda da BPA için belirlenen TDI'nın düşürülmesine gerek olmadığını vurgulamıştır (31,32). Ancak belirlenen bu referans değerinden daha düşük derişimdeki BPA'nın da birçok etki gösterebildiği yapılan *in-vivo* ve *in-vitro*

deneylerde gözlemlenmiş ve BPA'nın doğrusal olmayan doz cevap (non monotik doz cevabı - NMDR) etkilerine dikkat çekilmiştir (33). Bu çalışmalar sonrasında Amerikan Gıda ve ilaç Dairesi (U.S. FDA) tarafından 2010'da ve EFSA'nın ise 2015'de yayınladığı raporda BPA için belirlenen TDI derişimi 4 µg/kg vücut ağırlığı/gün olarak güncellenmiştir (34,35). Güncelleme öncesinde yayınlanan raporlarda yalnızca BPA'nın besin aracılığıyla alımı incelenmiştir. Bununla beraber BPA'ya maruziyetin büyük bir miktarda yiyecek kaynaklı olmayan doğadaki su kaynakları, hava, toz, termal kâğıt, diğer kâğıt türleri, kozmetik, dental malzemeler, tıbbi cihazlar ve diğer sağlık uygulamaları gibi yollarla da olduğu bilinmektedir (36).

BPA doğadaki su kaynaklarına BPA içeren ürünlerden sızabildiği gibi arıtma tesisleri ve depolama sitelerinden çıkan atık sulardan da karışabilmektedir. Birçok çalışma doğal su kaynaklarındaki BPA düzeyinin analizi ve kontrolüne katkı sağlamaktadır (37). Yapılan çalışmalara göre atık su arıtma tesislerinden çıkan sulardaki BPA düzeyi 370 µg/L'a çıkabilmektedir. Yüzey sularındaki BPA düzeyinin ise 56 µg/L'a kadar çıkabildiği tespit edilmiştir (38).

Literatürdeki BPA'nın atmosferdeki düzeyi ile ilgili Asya'dan üç, Kuzey Amerika'dan iki, Avrupa'dan bir olmak üzere toplamda 6 çalışma mevcuttur (38). Bu çalışmalarda dış havada, evlerdeki ve işyerlerindeki iç ortam havasında BPA varlığı ve plastik fabrikalarındaki mesleki maruziyet araştırılmıştır. Maksimum iç hava BPA konsantrasyonları Çin Halk Cumhuriyeti'nde reçine fabrikalarında bildirilmiş (> 50.000 ng / m³), düşük BPA konsantrasyonları (<100 ng / m³ iken) ise konut ve ticari binalarda bulunmuştur. Atmosferde tespit edilen BPA'nın evsel ve elektrik atıklarının yakılması ve sprey boyamadan kaynaklı olduğu bildirilmiştir. BPA'nın düşük uçuculuk ve düşük hava emisyon özelliği göstermesi, hızlı fotooksidasyon yarı ömüre (<7 saat), sahip olması gibi nedenlerden dolayı atmosferdeki varlığının ihmal edilebilir özellikte olduğu öne sürülmüştür (38).

BPA'nın evlerin iç mekanlarında bulunan epoksi temelli zemin malzemeleri, yapıştırıcılar, boyalar, elektronik malzemeler gibi birçok üründe yaygın kullanımı sonucunda BPA bu ürünlerden buharlaşıp veya sızıntı yoluyla evdeki ortamlara salınabilmektedir. Bu da başka bir BPA'ya maruziyet yolunu açıklamaktadır (36). 2011 de yapılan bir çalışmada Amerika Birleşik Devletleri'nin doğusunda iki farklı yöreden toplanan 56 toz örneğinin % 95'inde BPA varlığı bildirilmiştir.

Numunelerdeki BPA derişiminin 0.5'den 10.200 ng/g'a kadar değişebildiği gösterilmiştir. En yüksek derişim olan 10.200 ng/g BPA, laboratuvar kapılarında bulunan hava filtrelerinin yüzeyinde tespit edilmiştir (39).

BPA, göz lensleri, tüp bağlantıları, kan oksijenatörleri, yenidoğan inkübatörleri, nebulizatörler, kateterler, enteral beslenme tüpleri, diyaliz gibi birçok tıbbi cihazda veya sağlık hizmeti uygulamalarında kullanılmaktadır. Ayrıca BPA'nın polikarbonat konteyner kapakları veya epoksi astarlı metal bidonlar ile paketlenmiş olan sıvı veya süspansiyon formdaki ilaç formülasyonuna sızabildiği US. FDA tarafından 2009 yılında yayınlanan değerlendirmede belirtilmiştir (40).

Diş hekimlerince kullanılan reçine temelli dental malzemeler genellikle polimer matriks ve reçine matrikse silikonla birleştirilmiş inorganik dolgu malzemelerinden oluşmaktadır. Diş tedavisinde en çok kullanılan reçine metakrilatlardır (41). Dental kompozit reçineler ko-monomer karışımlarından oluşur ve genellikle bisfenol-A glisidil metakrilat (bis-GMA) temellidir. Ayrıca bu reçineler bisfenol-A dimetrilat (bis-DMA) gibi diğer monomerleri de içerebilmektedir. Bu monomerin salyada bulunan esterazlarla hidrolizi sonucu BPA salyaya geçebilmektedir (36).

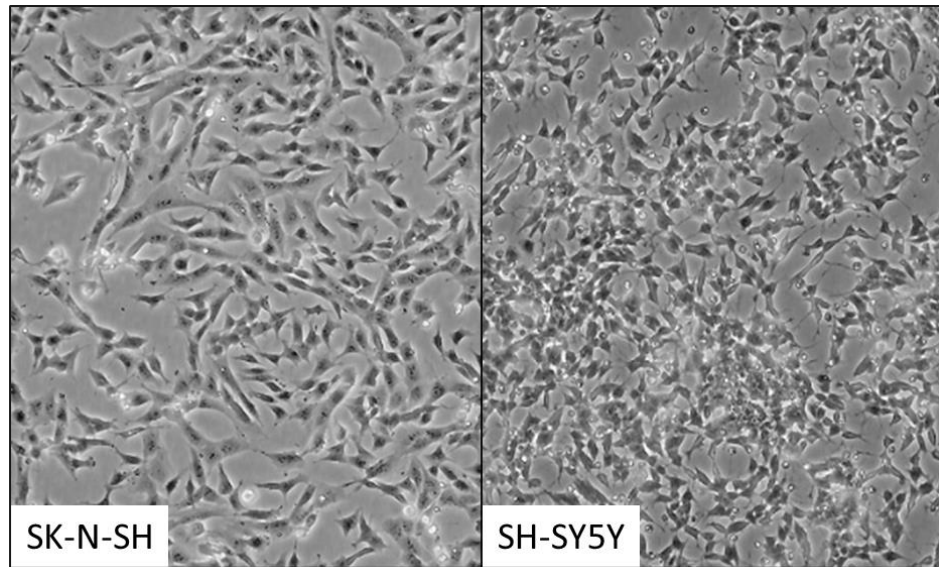
Yukarıda da belirtildiği gibi BPA günlük yaşantımızda neredeyse her alanda, fark ettiğimiz veya etmediğimiz birçok şekilde bize ulaşıp etki gösterebilen, dünya genelinde büyük ölçüde üretilen ve üretilmesine de devam edileceği düşünölen bir kimyasaldır. BPA'ya maruziyet böylece kaçınılmaz iken; maruziyetin sonucundaki etkilerinin incelenmesi de bir o kadar önemli ve gerekli hale gelmiştir.

Bu tez kapsamında düşük doz BPA'nın insan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki ölüm mekanizmalarına olan etkilerinin kolinesteraz enzimleri çerçevesinde aydınlatılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattı

SH-SY5Y hücreleri insan kemik iliği dokusundan elde edilmiş nöroblastoma hücreleridir. Morfolojik olarak epitelyal özellik gösteren SH-SY5Y hücreleri kültürel olarak hem tutunan hem yüzebilen karma tip hücrelerdir. SH-SY5Y hücreleri, SK-N-SH insan nöroblastoma hücre dizininden sub-klonlanarak elde edilmiş olan SH-SY hücre hattından türevlendirilmiştir (42). Parental SK-N-SH hücre dizini ilk olarak 1970’de 4 yaşındaki kız çocuğuna ait metastatik kemik iliği dokusundan elde edilmiştir (43). Bu hücre hattı spesifik bileşenlerin eklenmesiyle çeşitli tipte fonksiyonel nöronlara dönüştürülebildiğinden nörodejeneratif hastalıklar için model oluşturabilecek özelliğe sahiptir (44). SK-N-SH ve SH-SY5Y hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri Şekil 2.1’de verilmiştir (45,46).



Şekil 2.1 SK-N-SH ve SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.

2.2 Bisfenol A (BPA)

BPA ilk olarak A.P.Dianin tarafından 1891 yılında sentezlenmiştir. Sonrasında 1930’lu yıllarda sentetik östrojen eldesi için yapılan çalışmalar kapsamında ise ayrıntılı şekilde araştırılmıştır. Bu araştırmalar esnasında BPA’nın östrojenik

özellikleri ele alınmıştır ama farmasötiksel kullanımı BPA analogu olan dietilstilböstrol (DES)'ün östrojenik etkisinin BPA'dan daha fazla olduğu anlaşılınca durdurulmuştur. BPA östrojen reseptörlerinden (ER) hem ER α 'ya hem ER β 'ya bağlanabilmektedir. BPA'nın ER β 'ya olan afinitesi 10 kat daha fazladır. Bununla beraber BPA'nın östrojenik reseptörler (ER) için afinitesi estradiol'den 10.000 kat daha zayıftır (21).

BPA'nın biyoyararlanımı maruziyet yoluna göre değişkenlik gösterdiğinden insanda BPA'nın maruziyet riskinin değerlendirilmesinde önemli bir faktördür. BPA oral yolla alındığında çoğunluğu hızlı bir şekilde emilime uğrar. Gastrointestinal sistemde ve karaciğerde bulunan üridin difosfat glukuronoziltransferaz (UGT) izoformları ve sülfontransferaz aracılığıyla alınan miktarın neredeyse tamamı konjugatlarına dönüşmektedir (47).

1938 yılında Dodds ve çalışma arkadaşlarının BPA'nın analog molekülü olan DES'in daha yüksek östrojenik etkiye sahip olmasını açığa çıkarmasıyla BPA molekülünün ilaç olarak bir geleceğinin olmayacağı anlaşılmıştır (48). BPA'nın plastik yapımında kullanılabileceği öne sürülmüş ve 1940'lı yıllarda reçine yapımında kullanılmasına başlanmıştır. 1957'de Bayer ve General Elektrik içecek ve yiyecek paketlemesinde kullanılan polikarbonat (PC) oluşturan BPA polimerizasyonunu keşfetmiştir. Bu gelişme plastik yapımındaki BPA kullanımında hızlı bir şekilde artışa sebep olmuş ve BPA'yı dünyada en çok kullanılan ticari ürün haline getirmiştir (49). Bu kadar sık kullanımı olan bir molekülün bir süre sonra yasaklanıp kontrol altına alınmak istenmesinin bazı sebepleri vardır. Bu sebeplerin en başında BPA'nın kullanıldığı ürünlerden çevreye sızabilmesi ve kronik maruziyet yaratabilmesi BPA'nın çevreye ve yiyeceklere kontaminasyonuna, epoksi reçine ve polikarbonat gibi BPA polimerlerin üretimi, uygulaması, kimyasal işlemi, difüzyonu ve hidrolizi katkı sağlamaktadır. Bunun sonucunda BPA monomerleri, polikarbonat (PC) plastiklerden ekosisteme ve yiyeceklere salınmaktadır (50,51). PC'lerden BPA monomerlerinin sızmasına dair yapılan çalışmalar sonucunda düşük pH değerine sahip çözeltilere PC'lerden daha yüksek miktarda BPA sızıntısının olduğu ve çözeltilerdeki katyon varlığının PC hidrolizini önemli bir şekilde etkilemediği gözlemlenmiştir (50). PC içeren şişelerden BPA sızıntısı oranı şişelerin içerisindeki sıvının kimyasal özelliğine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Etanol ve su karışımı içerisinde BPA

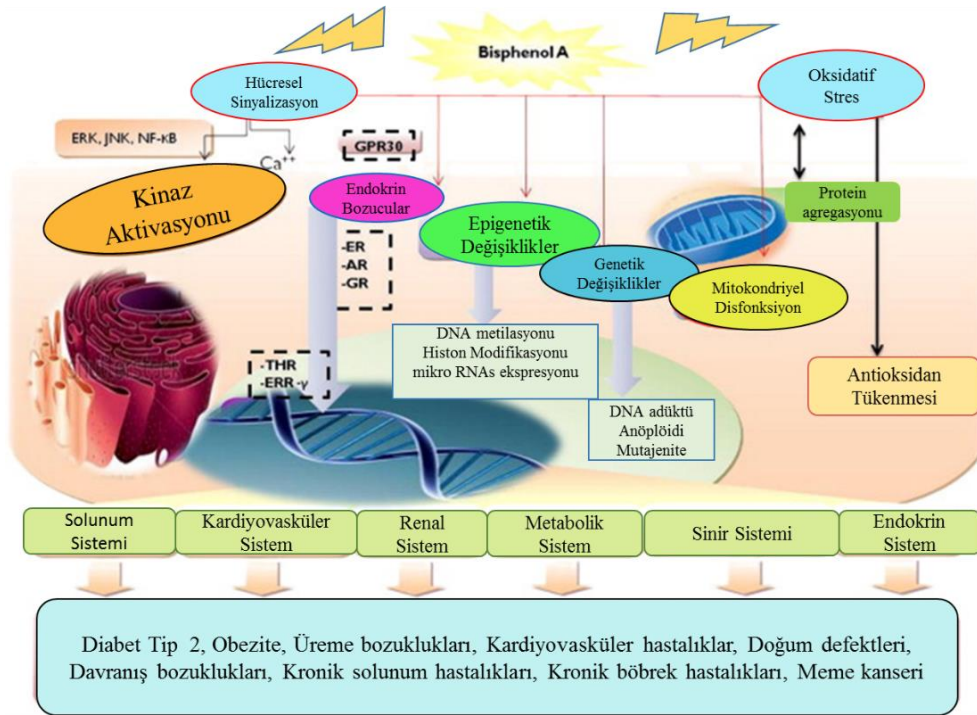
sızıntısı sadece su içeren PC plastik şişelere kıyasla daha hızlı iken, zeytinyağı içeren PC plastik şişelerden BPA sızıntısının ise ihmal edilebilecek derecede az miktarda olduğu belirlenmiştir (52).

Yapılan diğer bir araştırmada, sıcaklık artışının epoksi reçinelerden BPA salınımını artırdığı ispatlanmıştır (53). Pastörizasyon işlemi sırasında besinlerin konulduğu, yapımında epoksi reçine kullanılmış tenke kutuların ısı 100 ° C'ye çıkmaktadır. Bu sıcaklık artışının BPA'nın polimerlerden 18 kat daha hızla salınmasına yol açtığı ortaya konmuştur. Ayrıca kutularda kullanılan epoksi reçinelerden salınan BPA konsantrasyonu ile kalaylı gıda maddelerinin pastörizasyon sıcaklığı arasında bir ilişki olduğunu kanıtlanmıştır. Pastörize edilmeyen aynı ambalajla paketlenmiş besinlere BPA sızıntısının önemli ölçüde az miktarda olduğu da aynı çalışmada gösterilmiştir (50).

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (U.S. EPA) endokrin bozucu maddelerin “düşük doz” etkilerini geleneksel toksikolojik çalışmalarda kullanılan dozlardan daha düşük dozlarda yapılmış risk değerlendirme çalışmalara bakarak gündemine almıştır. 1997 öncesinde BPA için risk değerlendirmesi amacıyla yapılmış çalışmalarda kullanılan en düşük doz, yan etki görülen en düşük düzey (LOAEL) olarak kabul edilen 50 mg/kg/gün idi. Bu belirlenen doz EPA'nın referans dozunu 50 µg/kg/gün olarak belirlemesindeki hesaplamalarda dikkate alınmıştır. (54,55). 2001'de Amerika Ulusal Toksikoloji Programı tarafından düşük dozdaki EDC lerle ilgili yayınlanan raporda EPA tarafından öncesinde belirlenmiş 50 µg/kg/gün referans dozun altında da BPA'nın zararlı etkilerinin görülebileceğine dikkat çekilmiştir. 2005'de Saal ve Hughes düşük doz BPA'nın etkilerini gösteren birçok çalışmayı kapsayan bir derleme yayınlamıştır (54). 2006'da Saal ve Welshons LOAEL'in altındaki BPA'nın etkilerini ortaya koyan 100'ün üzerinde çalışmayı rapor etmişlerdir (56). 50 µg/kg/gün dozun altındaki BPA'nın etkilerini inceleyen 40 çalışma da aynı yılda literatüre sunulmuştur (56). 2009'da Ulusal Çevresel Sağlık Bilimleri Enstitüsü (NIEHS) BPA'nın toksisitesi ile ilgili veri boşluklarını tamamlamak ve yeni bir çerçeve belirlemek amacıyla bir çalışma başlatmıştır. Bu çalışma çerçevesinde *in-vitro* ve *in-vivo* BPA toksisitesi 100 çalışmada ele alınıp incelenmiştir. BPA için düşük doz 10⁻⁷ M olarak belirlenmiştir. Ele alınan 105 *in-vivo* çalışmada ise EPA tarafından belirlenen referans doz olan 50µg/kg ve daha düşük derişimde BPA dikkate alınmıştır.

Bu araştırmalardan birçoğunda 5 µg/kg' dan daha düşük derişimde BPA'nın da *in-vivo* etkinliği belirlenmiştir. Memeli olmayan deney hayvanlarıyla yapılan *in-vivo* alışmalarda ise 17.2 mg/L BPA düşük doz olarak belirlenmiştir (57).

Son yıllarda BPA'nın düşük dozlarda endokrin sistemi olumsuz yönde etkilediği ayrıca merkezi sinir sisteminde bozukluk ve immün sistem üzerine de olumsuz etkileyebileceği belirtilmektedir (58). Ayrıca BPA maruziyetinin kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, ve renal sistem üzerine olumsuz etkilerinin olduğu ve doğum defektleri ile meme kanseri gibi rahatsızlıklara yola açabildiği bildirilmiştir (59). BPA'nın bu etkileri Şekil 2.2'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.2 BPA'nın kronik hastalıklar üzerine etkileri (59).

BPA maruziyeti santral sinir sistemi (SSS) fizyolojisine her yaşta etkili olsa bile beynin gelişme evresinde BPA maruziyeti tehlikesi, lipofilik kimyasal yapının BPA'nın kan-plasenta ve kan-beyin bariyerlerini kolayca geçmesine olanak vermesinden ötürü laktasyon süresince de fazladır (60). Erişkin maruziyetindekinden farklı olarak SSS'in embriyonik/fetal/neonatal gelişiminin erken evresindeki BPA maruziyeti başlıca beyin fizyolojisini değiştirdiği bildirilmiştir (61,62). Ayrıca aynı

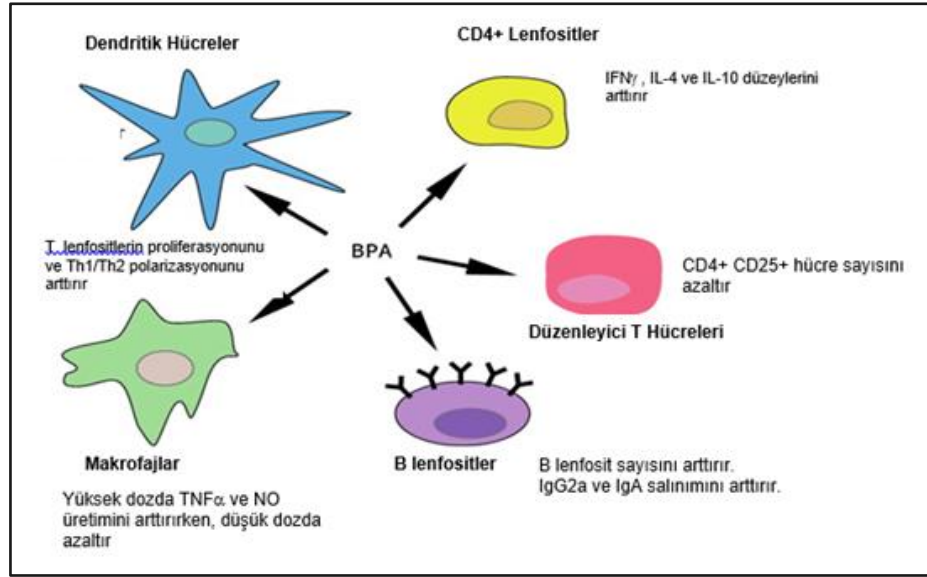
çalışmada fizyoloji değişikliğinin BPA maruziyeti yaşayan hayvandan yavrularına da epigenetik olarak aktarıldığı belirtilmiştir (62). Buna ek olarak BPA'nın, östrojenik ve antiandrojenik aktivitesinden dolayı endokrin sistem ve beyin fonksiyonlarını kontrol eden nöronal ağın dimorfik gelişimini etkileyebildiği Delfosse ve arkadaşları tarafından 2014'te yayınlanmıştır (60,63). Tiroid hormonlarının beyin gelişiminde önemli role sahip olmasından ötürü yapılan diğer araştırmalarda tiroid hormonu ve BPA arasındaki ilişki irdelenmiştir. Doğum öncesi BPA maruziyeti doğum sonrası erkek bebekte tiroid stimüle edici hormonun (TSH) serumdaki seviyesinde azalmaya yol açtığı ortaya çıkarılmıştır (64). Bir diğer çalışmada ergenlik çağındakiler ve erişkinlerde idrardaki BPA ile TSH ve/veya total tiroksin (T4) arasında negatif ilişki varlığı saptanmıştır (57). Bu ilişkiyi inceleyen diğer bir çalışmada idrardaki BPA düzeyi yüksek gebe kadınların yenidoğan kız çocuklarının kordon serumunda TSH seviyelerinin düşüklüğü tespit edilmiş ve araştırmacılar tarafından doğum öncesi BPA maruziyetinin TSH düzeyini düşürebildiği öne sürülmüştür (65). BPA'nın tiroid hormon reseptörü antagonisti olarak etki ettiği ve reseptörün tiroid hormon (T3) tarafından stimüle edilen transkripsiyonel aktivitesini baskıladığı açığa çıkarılmıştır (66). *In-vivo* ve *in-vitro* koşullarda insanda saptanan plazma düzeyinden daha düşük doz BPA'nın (10^{-9} M) tiroid hormon sentezinden sorumlu genlerin ekspresyonunu ve transkripsiyonel faktörlerini etkilediği diğer bir çalışmada belirtilmiştir (67).

BPA'ya maruziyetin yaygın bir şekilde birden çok yolla olduğuna dikkat çeken bir çalışma Calafat ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (68). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi tarafından Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bu çalışmada insanlardan alınan idrar örneklerinin % 95' inde 0,4 ppb ile 8 ppb aralığında BPA varlığı tespit edilmiştir (68). Ayrıca insan kan ve dokusunda bulunan konjuge olmayan BPA miktarı da aynı aralıkta bulunmuştur. Elde edilmiş bu sonuç BPA'nın hızlıca metabolize olduğunu, BPA maruziyetinin devam eden bir süreç olduğunu ve aynı zamanda birçok kaynaktan olabileceğini açıkça göstermektedir (54). Çin Halk Cumhuriyeti'nde yapılan bir diğer çalışmada BPA'ya yaygın bir şekilde maruz kaldığı düşünülen gençlerden oluşan bir gruptan idrar örnekleri toplanıp analiz edilmiştir. İdrar örneklerindeki total BPA derişiminin 0,19 ve 23,9 ng/mL aralığında olduğu bildirilmiştir. Elde edilen verilerin BPA için EFSA tarafından 2006'da ve Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (U.S. EPA) tarafından 2007'de belirlenen

tolere edilebilen günlük doz (TDI)' dan daha düşük olduğu da aynı çalışmada belirtilmiştir (69).

BPA'nın immün sistemini ER, arilhidrakerbon reseptör (AHR) ve muhtemelen peroksizom proliferator-aktive reseptör (PPAR) etkileyerek düzenleyebildiği düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar, BPA'nın immün sistem hücrelerini hem stimüle hem inhibe ederek etkileyebileceğini ortaya koymaktadır (70,71). BPA'nın immünomodülatör etkisine ait çalışmalar az olup, immün sistemdeki hücresel hedefleri ve fonksiyonları tam olarak anlayamamıştır (72-74). BPA'nın immün sistem hücrelerine etkileri kısaca Şekil 2.3'de özetlenmiştir.

İçme suyu yoluyla BPA'ya maruz bırakılan farelerden elde edilen T-lenfositlerin interferon gama (IFN γ) üretiminde artış ve interlökin 4 (IL-4) üretiminde azalış saptanmıştır (70). Bununla beraber 2010'da tamamlanan başka bir *in-vitro* çalışmada, fare T lenfositlerindeki IL-4 ve interlökin- 8 (IL-8) seviyelerinde artış gözlenmiştir (50).



Şekil 2.3 BPA'nın immün sistem hücrelerine etkileri (71).

Düşük doz (10 nM) BPA'nın sıçan peritoneal makrofajlarında adherans belirteçlerinin azalmasına yol açtığı bir diğer *in-vitro* çalışmada belirtilmiştir (75). Araştırmacılar bu sonuçlardan yola çıkarak BPA'nın immün ve inflamatuvar cevaplarda düzenleyici rol üstlendiğini önermektedir. Kim ve arkadaşlarının çalışmasında

BPA'nın immün sistem düzenlenmesini, nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) transaktivasyonunu inhibe etmek suretiyle nitrik oksit (NO) ve tümör nekrozis faktör-alpha (TNF- α) düzeyini azaltarak etkileyebileceği belirtilmiştir (18,76).

BPA'nın yukarıda açıklandığı gibi olumsuz birçok etkisi sebebiyle kullanımına dair sınırlandırma ve yasaklama getirilmesi konusu, bilim dünyası ve sağlık otoriteleri tarafından ele alınmıştır. Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) 2008'de yayınladığı raporunda da fetüs, erişkin ve çocuklardaki güncel BPA maruziyetinin beyin, davranış ve üremedeki etkilerine dair endişelerini kamuoyuyla paylaşmıştır. 2010'da FDA de NTP ile aynı endişeleri paylaştığını bildirmiştir. Ardından Kanada hükümeti BPA içeren biberonların satış ve ithalatını yasakladığını açıklamıştır. Bu gelişmeler sonucunda Avrupa Komisyonu 2011'de polikarbonat beslenme şişelerinin üretiminde BPA kullanımını sınırlandırmıştır (77). Sonrasında FDA Amerika Kimya Birliği'nin talebine cevaben BPA içeren biberonların kullanımını 2012'de yasaklamıştır. FDA, BPA içeren reçinelerin paketlemelerde kaplama malzemesi olarak kullanılmasını da 2013'de engellemiştir (67). Ülkemizde de Avrupa Komisyonu'nun beslenme şişeleri üretimindeki BPA kullanımını sınırlandırma kararına paralel olarak Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından 2011 Haziran ayında BPA içerikli biberonlar ve diğer beslenme gereçleri toplatılmıştır (78).

2.3 Östrojen

Östrojen molekülü ilk kez 1929 yılında Tadeus Reichstein, Adolf Butenandt, ve Edward Adelbert Doisy tarafından izole edilip karakterize edilmiştir (79).

Östrojen yumurtalıklarda, beyinde ve diğer dokularda üretilmektedir. Östrojen her dokuda ergenlik döneminde, üreme döngüsünde, beyin gelişimde ve nöroproteksiyonda farklı görevler üstlenebilmektedir (80).

Estradiol östrojenin biyoaktif formudur ve östrojenin diğer formları olan östron ve estriol da dişilerde üretilmektedir (81). Aromataz, estradiolün sentezinin son basamağını katalizleyen ve genellikle birçok dokuda ekprese edilen bazı dokulara spesifik formları olan bir enzimdir. (82).

Östrojen menstrüel döngü ve üreme sistemi gelişiminde önemli role sahip olan bir hormondur. Östrojenin üreme, doku ve organlarının fizyolojisi lipid

metabolizması, protein sentezi, kompleks etkileri vardır (83). Östrojenler homeostazi ve birçok dokunun gelişmesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde görev alan steroid yapılı hormonlardır (84). Östrojen sinyalizasyon yolağındaki aksaklık tümör gelişimi, immün sistem hastalıkları, nörodejeneratif, kardiyovasküler sistem ve metabolik hastalıklara yol açabilmektedir (84).

2.3.1 Östrojen Reseptörleri

Östrojenin hücrel sinyalizasyonunu nükleer reseptör ailesine ait östrojen reseptörleri olan ER_{α} ve ER_{β} ile düzenlenmektedir. Nükleer reseptörler spesifik hormonlara bağlanan ve ayrıca belirli genlerin transkripsiyonunu etkileyen transkripsiyon faktörler gibi aktivite gösteren protein ailesinden oluşmuştur (9). ER_{α} 1950'lerin sonlarında Elwood Jensen tarafından östrojen reseptörü olarak tanımlanmıştır (10). ER_{β} 1996 yılında klonlanmış olup ER_{α} 'ya kıyasla daha az karakterize edilmiştir. ER_{α} ve ER_{β} homoloji sekansları birbirine çok benzerdir. ER_{α} ve ER_{β} DNA bağlayan bölgeleri %95 oranında, ligand bağlayan bölgeleri ise %60 oranında muhafaza edilmişken; transkripsiyonel aktivite bölgesi AF-1'in bulunduğu NH₂-terminal bölgesi sadece %20 oranında korunmuştur (85,86).

Her iki östrojen reseptörü de 17 β -estradiol'e afinite göstermektedir. ER_{β} 'nin 17 β -estradiol'e olan afinitesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (85). Östrojen reseptör alt tiplerinin benzer yanları olduğu gibi dokulardaki dağılımları, transkripsiyonel aktiviteleri gibi farklılıkları da mevcuttur. Östrojenin etki ettiği fizyolojik işlemlerin düzenlenmesinde iki reseptör türünün selektif yolların oluşmasına yol açtığı anlaşılmıştır (87).

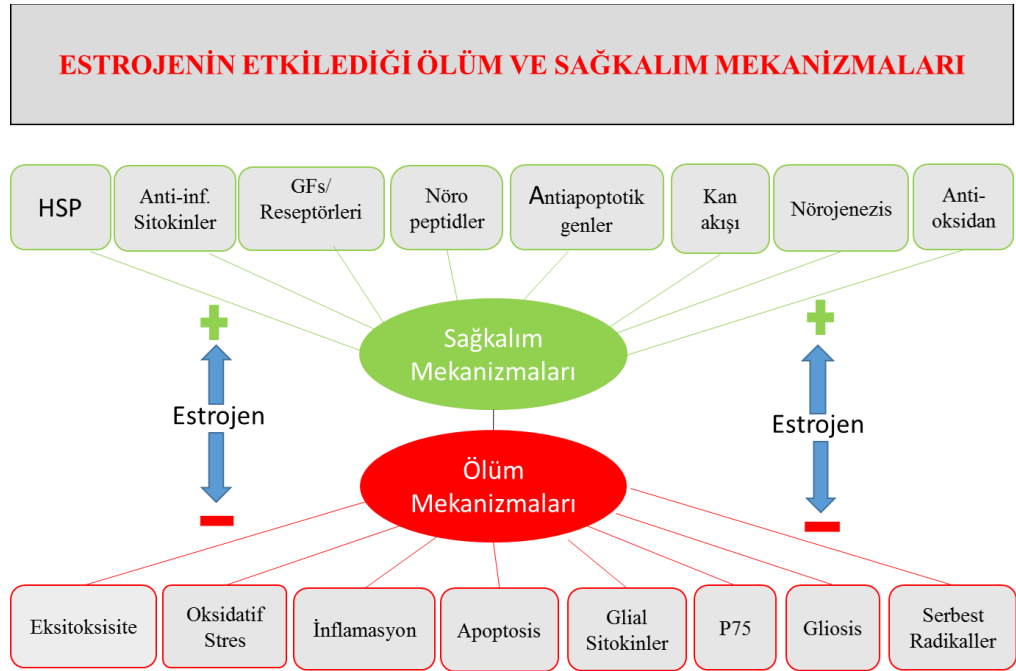
ER_{α} ve ER_{β} reseptörü haricinde G-protein bağlı ER1 (GPER) olarak da bilinen G-protein bağlı reseptör 30 (GPR30) üçüncü östrojen reseptörü olarak kabul görmüştür. GPER östrojen ve diğer ligandlara afinite gösteren membrana bağlı bir reseptördür (88).

2.3.2 BPA'nın Östrojen Reseptörü Üzerine Etkileri

Endokrin bozucuların insanda sentezlenen endojen östrojenin etkilerini taklit edebileceği öne sürülmüş ve endokrin fonksiyonları bozup fertilitede azalmaya, üreme kanalında konjenital malformasyona ve östrojen ile etkileşen dokulardaki kanser

riskinde artmaya yol açtığı anlaşılmıştır (89). Östrojenik aktivite gösteren bu kimyasallardan biri de BPA'dır. BPA'nın sadece östrojen taklit edici özellikte olmadığı aynı zamanda östrojen reseptörlerinden ER_{α} ile etkileştiği ve östrojenik aktivite gösterdiği HepG2 hepatoma hücre hattında yapılmış çalışmada gösterilmiştir (90). Dişi ratlarda üreme döngülerininin farklı fazlarında BPA'nın ER 'lere olan etkisini uzun süreli etkisini analiz etmek amacıyla yapılmış bir çalışmada ER 'lerin sayısında değişikliğe yol açtığı bildirilmiştir (91).

BPA ER_{α} 'ya bağlanmasıyla E2'yi taklit edici özellik göstermesi hızlı ekstrasükleer yolağın aktivasyonuna yol açmaktadır. BPA'nın ER_{α} ekstrasükleer mekanizmasına olan etkisine diğer bir örnek ise intrasükleer depodan Ca^{++} salınmasının hücre motilitesinde, sinyalizasyon işlemlerinde ve ekzositoziste değişikliklere yol açmasıdır (92). Şekil 2.4' de östrojenin ölüm ve sağkalım mekanizmalarına olan etkileri görülmektedir.

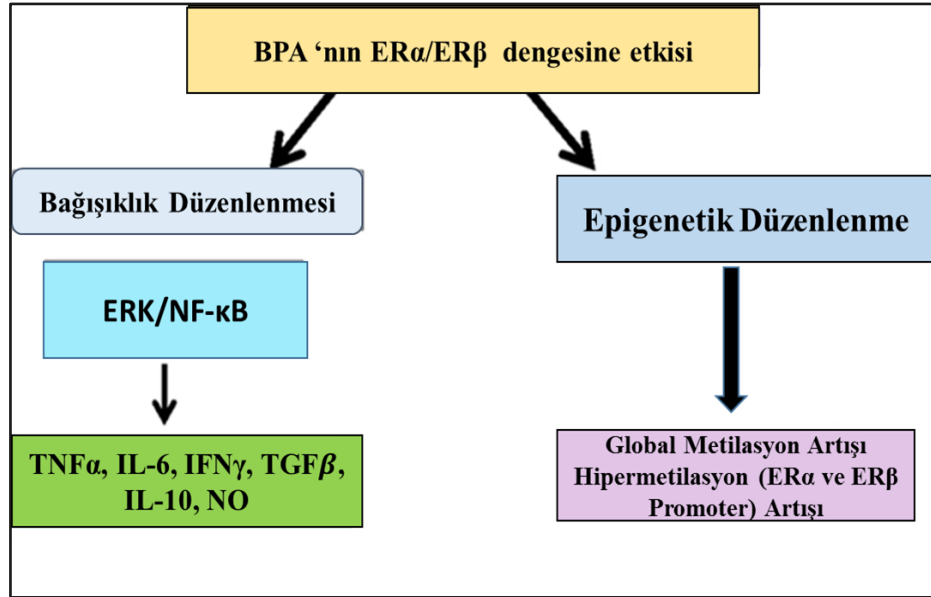


Şekil 2.4 Östrojenin ölüm ve sağkalım mekanizmalarına etkisi (93).

ER_{α} sinyali hücreleri proliferasyona sevk ederken, E2 ise ER_{β} hızlı sinyalinin hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bu sebepten ötürü ER_{α}/ER_{β} sinyalizasyonu

arasındaki denge E2 aracılı hücre ölümü ve proliferasyonunda çok önemli bir noktadır (94).

Düşük doz BPA maruziyetinin ER α üzerinden proliferasyona yol açtığı yapılan araştırmalarda bildirilmiştir (95,96). BPA'nın ER β karşısında ise E2-ER β kompleks antagonisti olarak etki ettiği tespit edilmiştir (97,98). Bu veriler BPA'nın E2-aracılı hücre ölümü ve proliferasyonunu düzenlediğini ortaya çıkarmıştır. Diğer yandan BPA'nın ER β aktivitesi dengesini kurmadan yalnızca hücre proliferasyonunu teşvik ederek hücreleri kanser transformasyonuna sürükleyebileceği aynı çalışmada belirtilmiştir (27). Şekil 2.5'de BPA'nın ER α /ER β sinyalizasyonu arasındaki dengeye olan etkileri görülmektedir.

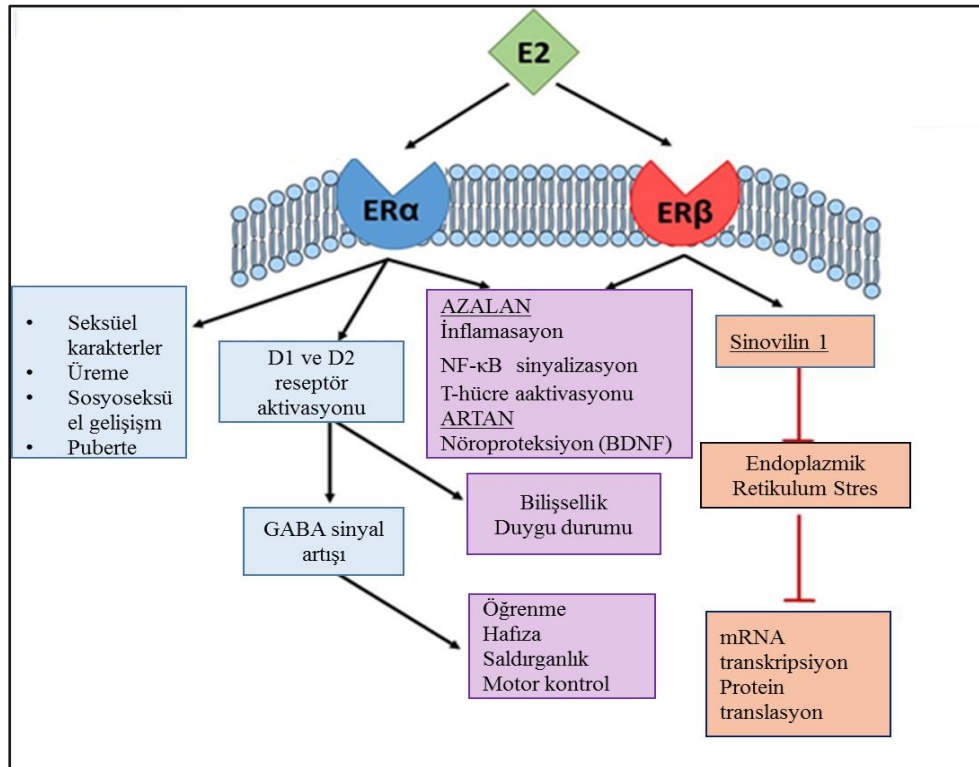


Şekil 2.5 BPA'nın ER α /ER β dengesine olan etkisi (99).

2.3.3 BPA'nın Östrojenin Beyindeki Rolüne olan Etkileri

Güncel çalışmalar östrojenin bilişsel, öğrenme, hafıza, sinirsel gelişim gibi birçok beyin fonksiyonunda kritik bir rol oynadığına dikkat çekmektedir. Klinik ve prelinik çalışmaların çoğunda östrojenin nörogelişimsel hastalıklarda koruyucu rolünün varlığına vurgu yapılmaktadır (81). Östrojen reseptör düzeylerindeki değişiklikler şizofreni gibi nörogelişimsel hastalıklarda tanımlanmıştır (81).

ER α 'nın cinsiyet karakteristiği ve buluş çağı gibi nörobiyolojik üreme sistemini modüle etmekten sorumlu olduğu düşünülmektedir. ER β 'nin ise anksiyete lokomasyon, korku, hafıza ve öğrenme gibi üreme sistemiyle ilişkili olmayan nörobiyolojik sistemin düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir. Aynı zamanda ER β korteks hipokampus ve serebellumda sentezlenen temel östrojen reseptörüdür (81). Östrojen reseptörlerinin fizyolojik işlevleri Şekil 2.6'da şematize edilmiştir.



Şekil 2.6 Östrojen sinyalizasyonunun fizyolojik işlevleri.

Östrojenin biyoaktif formu olan 17 β -estradiol (E2)'ün nöroproteksiyonda bilişsel fonksiyonlarda ve sinaptik plastisitide etkili olduğu bilinmektedir (100-102). Diğer yandan kronik östrojen yoksunluğu sonucu nörolojik hastalıkların riskinde artış olduğu bildirilmiştir (103). Estradiol serebral kan akışını artırdığından ve glukoz metabolizmasını kolaylaştırdığından beyinin korunmasında önem arz etmektedir (104,105). Ayrıca östrojenin elektron transport sistemi aktivitesini artırarak nöronlara enerji sağlaması ile de östrojenin beyindeki nöroprotektif etkisi açıklanabilmektedir (106).

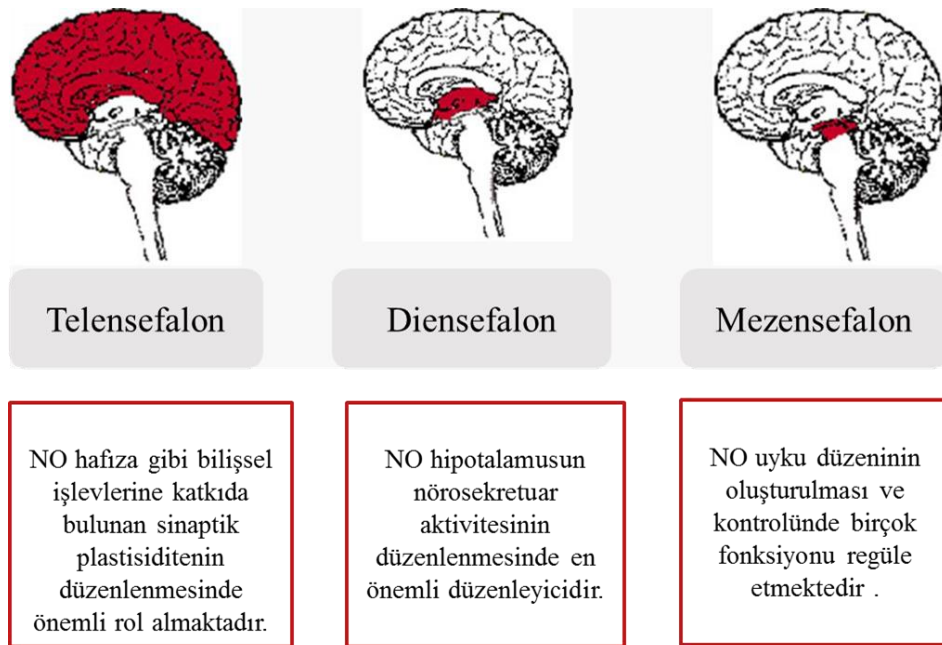
Çoğu çalışmada BPA'nın yetişkin beyin gelişimine etkisi *in-vivo* veya *in-vitro* koşullarda incelenmiştir. Embriyonik BPA maruziyetinin normal neokortikal gelişimini ve yetişkin kortikal organizasyonunu bozduğu bildirilmiştir (107,108). Yokosuka ve arkadaşların tarafından gerçekleştirilen çalışmada yüksek doz (500 µg/gün) BPA'nın dentritik ve sinaptik gelişiminde değişikliklere sebep olduğu açıklanmıştır. Diğer yandan kemirgen ve maymunlarda hipokampüse uygulanan düşük doz BPA (40–50 µg/kg/gün) sinaptogeneziste anti-östrojenik etki göstermiştir (109,110). Erişkin dişi beyinlerinde E2 sinaps oluşumunu artırmakta ve bu etki eşzamanlı BPA uygulamasıyla bloklanmaktadır.

Birçok çalışma gelişme evresindeki fetüsün östrojenik kimyasallara erişkinlere kıyasla daha hassas olduğunu göstermektedir. Anneler östrojenik endokrin bozucu kimyasalları transplasental yolla aktarabilmekte ve doğum sonrasında emzirme süresince bu maruziyet yenidoğanlarda devam edebilmektedir (111). Yetişkin farelerde prenatal ve laktasyonel BPA maruziyetinin davranışlara olan etkisini irdelemek amacıyla planlanan çalışmada hamile farelere subkutan 20 mg/kg/gün BPA uygulanmıştır (112). Davranışsal testler uygulanmış elde edilen veriler sonucunda BPA uygulanan grupta motor aktivitenin baskılandığı, bununla beraber çevresini keşfetme motivasyonunun, anksiyetenin ve spatial öğrenme ile hafızasının etkilenmediği tespit edilmiştir (112).

2.4 Nitrik Oksit Sentaz (NOS)

Nitrik oksit (NO) son yıllarda tanınan birçok biyolojik olayda önemli rolü olan, çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. NO ve diğer bir son ürün olan sitrüllin, argininden NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. NOS'ın genetik olarak farklı üç izoformu tespit edilmiştir. Bunlar; düşük miktarlarda üretilerek vasküler tonusu ayarlayan bir konstitutif endotelial izoform (eNOS), yine düşük miktar üretilen sinaptik şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen bir konstitutif nöronal izoform (nNOS) ve yüksek miktarda üretilerek, immün/inflamatuar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili bir komponent olan uyarılabilir form iNOS dur. nNOS ve eNOS izoenzimleri NO üretimi için Ca^{++} kalmodulin kompleksine bağımlıdır. Buna karşın iNOS bundan bağımsızdır. NO fizyolojik konsantrasyonlarda hemen hemen bütün organ sistemlerinde değişik biyolojik etkilere sahiptir. NO

gastrointestinal sistem, solunum, kavernoöz dokulardaki vasküler düz kasların gevşemesinde önemli bir mediyatördür. NO merkezi sinir sisteminde, hafızanın şekillenmesini de içeren çeşitli fonksiyonları bir nörotransmitter olarak destekler (113). NO nörotransmitter olarak direkt etki edebilen ve beynin birçok alanında klasik nörotransmitterlerin salımını düzenleyen bir bileşiktir. Dolaylı olarak ise nükleus akkumbesde komşu glutaminerjik nöronları uyarıp asetilkolin salınmasını stimüle etmektedir (114). Telensefalonda ve serebellumda NO hafıza gibi bilişsel işlevlerine katkıda bulunan sinaptik plastisiditenin düzenlenmesinde önemli rol almaktadır. Diensefalonda, NO hipotalamusun nörosekretuar aktivitesinin düzenlenmesinde en önemli düzenleyicidir. Mezensefalonda ise NO uyku düzeninin oluşturulması ve kontrolünde birçok fonksiyonu regüle etmektedir (115). NO'in beyindeki işlevleri Şekil 2.7'de özetlenmiştir.



Şekil 2.7 Nitrik Oksitin beyindeki işlevleri.

Periferde ise gastrointestinal, solunum ve genitoüriner sistemle ilgili çeşitli fonksiyonları düzenler. İlave olarak NO'nun konak savunması ve immünolojik reaksiyonlarda da fonksiyonu vardır (113). NO hormonlar gibi birçok endojen faktör (Örn. östrojen) tarafından düzenlenmektedir. Östrojenin immünolojik dokulardaki NO düzeyine etkisini ortaya çıkarmak için yapılmış bir çalışmada farelere östrojen

uygulanması sonucunda iNOS mRNA düzeyinde, iNOS protein düzeyinde, ve splenositlerdeki NO aktivitesinde artış belirlenmiştir (116). NO miktarındaki bu artışa IFN- γ ve östrojen tarafından arttırılan pro-inflamatuar sitokinler kısmen aracılık etmektedir. Bu sonuç östrojenlerin sadece immun cevapların düzenlenmesinde değil aynı zamanda birçok otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermektedir (117).

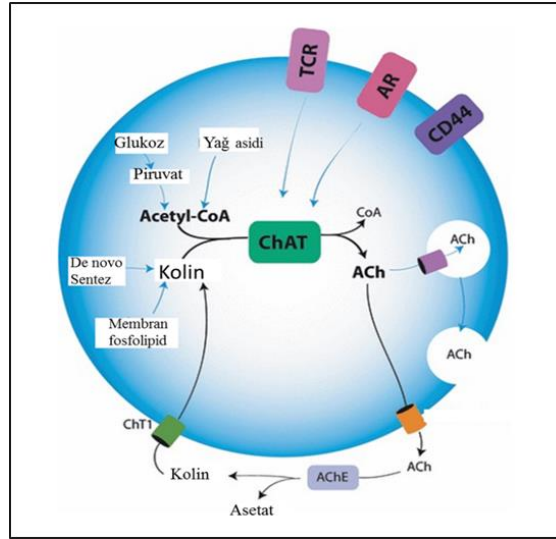
Östrojenin santral ve periferel sinir sisteminde nöroendokrin aktivitelerin, bilişsel işlevlerin, otonomik fonksiyonların ve nöroprotektif etkilerin düzenlenmesi gibi çeşitli fizyolojik etkileri vardır. Bu etkilerin birçoğu NO'nun aracılığıyla gerçekleşmektedir (116). Nöroblastoma hücrelerinin 17- β estradiol uygulanması sonucunda beyin çeşitli bölgelerinde NO üreten nöronların sayısında ve NO sentaz (NOS) ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir (118). Ayrıca nöronal NO (nNOS) ekspresyonu da erkek ve dişi fare beyinlerinde östrojen reseptörleri ile düzenlendiği bildirilmiştir (119). Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde NO'in östrojenin nöronal dokulardaki etkisinin oluşmasında kritik rol üstlendiği görülmektedir.

NO kolinerjik nörotransmisyonunda önemli rol üstlenmekte ve Alzheimer hastalığının (AD) ilerleyişinde etkili olmaktadır (120). Kolinerjik nörotransmisyon NOS ekspresyonu ile ilişkili olup literatürdeki çalışmalar NO'nun kolin asetiltransferaz (ChAT) ekspresyonunu modüle ettiğini bildirmektedir (121). Alzheimer hastalarında beyin dokularındaki ChAT ile NOS arasında ilişkinin var olup olmadığına dair yapılmış bir çalışmada hipokampüsteki enzim düzeyleri arasında anlamlı bir farkın olmadığı bulunmuş buna karşın kontrol grubu ile ve Alzheimer hastalarının frontal korteks örneklerinde iki enzimin aktivitelerinin arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir (121).

2.5 Kolinesterazlar ve Kolinerjik Sistem

Asetilkolin (ACh) sinir sisteminde iletim yolağında kritik rol üstlenen kolin ve aktif asetilden (CoA) oluşmuş bir nörotransmitterdir. Perifer ve merkezi sinir sisteminde bulunan birçok temel fizyolojik ve biyokimyasal işlemlerde görev almaktadır (122,123). ACh'in sinir uçlarındaki sentezi, yüksek afiniteli kolin taşıyıcı (CHT1) ile alınma ve kolinin Asetil-CoA ile asetilasyonunu katalizleyen kolin

asetiltransferaz enzimine (ChAT) bağı olarak değişmektedir (124). ACh sentezi Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8 Asetilkolin (ACh) sentezi (123).

ACh sentezlendikten sonra sinaptik veziküle veziküler asetilkolin taşıyıcı (VAcHT) ile taşınır. Taşınma işlemi V-tip proton ATPaz tarafından oluşturulan elektrokimyasal gradiente bağı olarak gerçekleşir. Sinir uyarısının kolinerjik sinir ucuna iletilmesiyle membran depolarizasyonu ve Ca^{++} akışı vezikül füzyonunu ve sinaptik boşluğa ACh salınmasını tetikler (125). Salınan ACh presinaptik ve postsinaptik muskarinik (mAChR) ve nikotinik (nAChR) reseptörlerine bağlanır.

ACh sinaptik boşlukta asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BuChE) enzimleri ile milisaniyede hidrolize olduğundan yarılanma ömrü çok kısadır (124). Farklı nöronal sistemlerde bulunan pre- ve post sinaptik reseptörlere bağlanmış olan ACh nöronal uyarılmayı değiştirebildiği, sinaptik iletimi etkileyebildiği, sinaptik esnekliği indükleyebildiği bildirilmiştir (126-128). Periferik sinir sistemindeki (PNS) ACh, pupilla ve düz kas kontraksiyonunda, kardiyovasküler etkilerde ve gastrik ve tükürük bezlerinin uyarılmasında rol alır. ACh, periferde esasen uyarıcı bir role sahip olmakla birlikte, SSS'de daha çok nöromodülatör olarak etki eder (126).

Asetilkolinesteraz (AChE, E.C 3.1.1.7) kolinerjik sistemde nörotransmitter olan asetilkolini hidrolizleyerek nörotransmisyonun sonlanmasını sağlayan anahtar enzimdir. BChE, (E.C.3.1.1.8) butiriltiyokolini hidrolizlemekte olup fizyolojik

işlevleri henüz bilinmemektedir (129). AChE kolinerjik olmayan etkileri arasında amiloid fibril oluşturma hematopoesis, hücre farklılaşması, tümörjenezis gibi işlemlerin olduğu bilinmektedir (130,131).

Kolinesteraz enzimlerinin ekspresyonu ve moleküler formlarının dağılımı, gelişim ve hücrel farklılaşma açısından önemli bir rol üstlenmektedir. İki enzimin doku dağılımları arasında bir ilişki bulunmamaktadır. Kolinesteraz enzimleri; çözünür, membran bağlı ya da bazal laminaya çapalı formlar gibi çok çeşitli moleküler polimorfizm gösterirler. AChE, BChE'in çok daha az miktarda bulunduğu kas, sinir sistemi ve eritrosit membranında belirgin miktarda bulunur (132). BChE'in ise başlıca karaciğerde sentezlenip plazmaya salınarak yaygın bir dağılım sergileyerek yüksek aktivite gösterdiği bilinmektedir. Bunun dışında barsak, kalp, böbrek ve akciğerde de yüksek oranda dağılım göstermektedir (133). AChE ve BChE'in kolinerjik sinapsın dışında da bulunuşu, kolinesterazların sinaptik boşluktaki asetilkolin hidrolizinden daha başka işlevlerinin olabileceğini de göstermektedir (132).

Asetilkolinesteraz (AChE) gerçek kolinesteraz (E.C. 3.1.1.7); Bütirilkolinesteraz (BChE) psödokolinesteraz (E.C.3.1.1.8) veya nonspesifik kolinesteraz olarak isimlendirilmektedir. AChE ile BChE'ı farklı kılan diğer bir özellik de yüksek substrat derişimlerinde BChE'in aktive AChE'in ise inhibe olmasıdır (134). Kolinesteraz enzimleri selektif inhibitörleri de farklı olan enzimlerdir. AChE selektif olarak 1,5-bis (4-allildimetilaminopropilpentan-3-on-dibromür) ile inhibisyona uğrarken BChE ise 10-(2-dietilaminopropil)-fenotiyazid (etopropazin) ve isotetramonoisopropilpirofosfattetramid (iso-OMPA) ile seçici olarak inhibe olmaktadır. Amino asit sekans içeriklerinde %65 benzerlik gösteren bu enzimler sırasıyla 7. ve 3. kromozomlarda kodlanırlar (134,135).

2.5.1 Kolinesteraz Enzimlerinin Moleküler Formları

Kolinesteraz enzimleri, doku ve vücut sıvılarında amfifilik ya da çözünür moleküler formda bulunmaktadır. Bu formlar aşağıdaki gibi kategorize edilmiştir.

1. Tip 1 amfifilik dimerler: AChE'in en çok bulunan formudur.

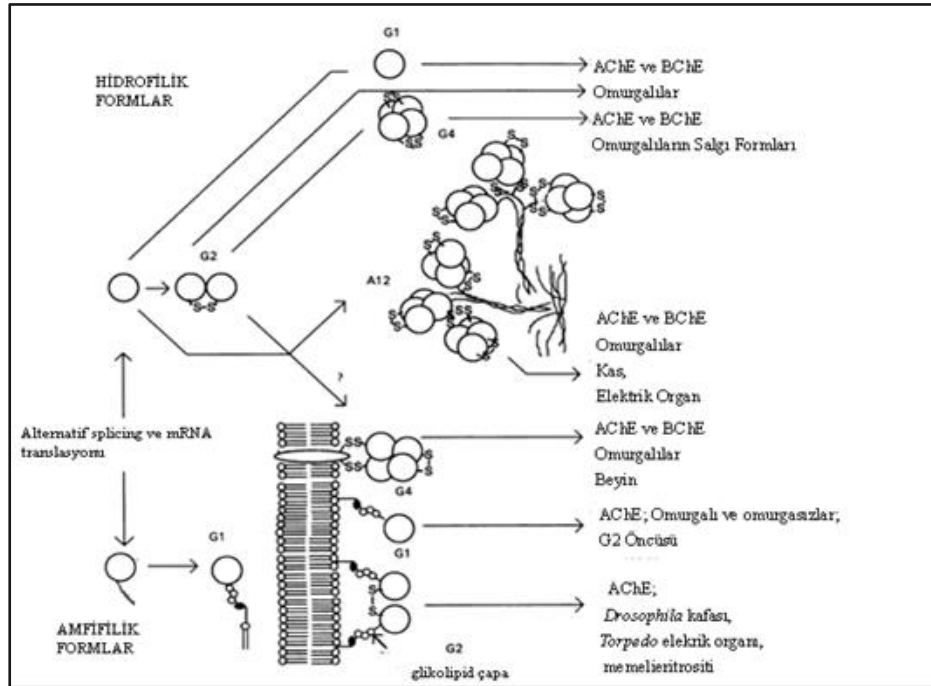
Glikofosfatidilinozitol bir uzantıyla membrana kovalent bağlı dimerik formda bulunur sadece deterjanlarla çözülebilmekte ve deterjan yokluğunda agreg olmaktadır.

2. Tip 2 amfifilik monomer ve dimerler: Bu form Tip 1 de bulunan glikolipid çapası içermemekte, Tip 1 formundan farklı olarak deterjan yokluğunda agregre olmamaktadır. Fakat tuz çözeltileriyle çözünebilmektedir. Beyin kas ve bağırsakta her iki kolinesterazın da bu formu genellikle bulunmaktadır.

3. Hidrofobik-kuyruklu tetramerler: Bu form AChE'in memeli merkezi sinir sistemindeki sıklıkla bulunan formudur. Plazma membranına hidrofobik, 20 kDa uzunluğundaki bir polipeptid çapasıyla bağlanmış formdur.

4. Kollajen benzeri kuyruklu ya da asimetrik formlar: Sinir-kas bağlantılarında BChE yerine AChE için daha yaygın olarak bulunan formudur. Bu formların tanımlanabilmesi için basal laminaya tutunmalarını sağlayan kollajen benzeri bir kuyruk aracılığıyla gerçekleşir. Bu kuyruk kollajenik 3'lü helikal altbirimlerden oluşur ve her biri bir (A4), iki (A8) ya da üç (A12) kolinesteraz tetrameri ile ilişkilidir.

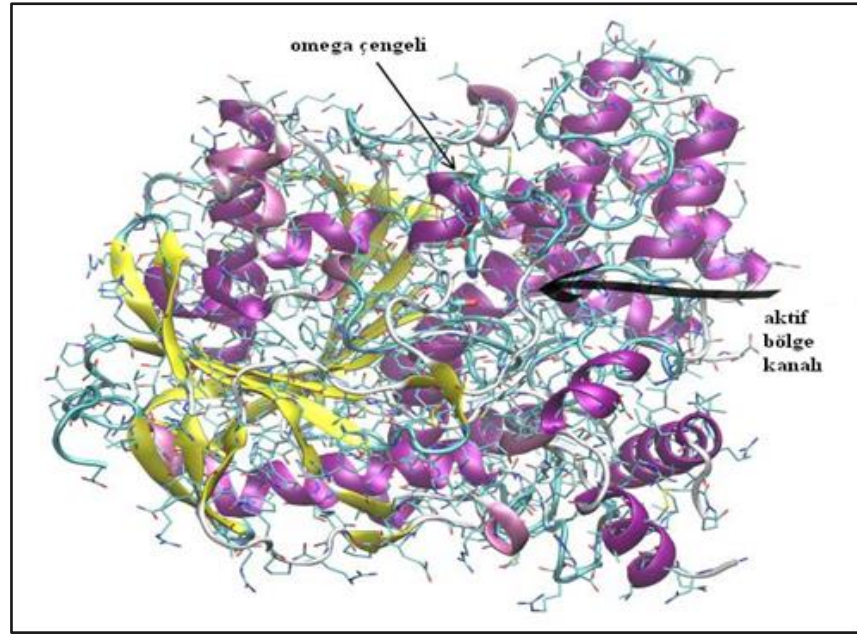
5. Çözünür tetramerik form (G4) : Bu form 4 eş monomerden oluşur. Monomerlerin C terminalindeki hidrofobik aminoasitlerin etkileşimleriyle kararlı hale gelebilmektedir. BChE'in memeli vücut sıvılarındaki ve doku homojenatlarının çözünür fraksiyonlarındaki yaygın formudur (134). AChE ve BChE'in moleküler formları Şekil 2.9'de gösterilmektedir.



Şekil 2.9 AChE ve BChE'in moleküler formları (136).

2.5.2 Kolinesteraz Enzimlerinin Aktif Merkez Yapısı

BChE aktif merkezinde aktif bölge oyuğu 20Å derinliğinde, dar ve yaklaşık 55 aminoasitlik bir bölgedir (134). Bu aktif merkez AChE'nin aktif merkez oyuğundan içerdiği aromatik asitlerle farklılık gösterir. AChE'da BuChE'dan farklı olarak aktif merkezdeki on dört aromatik aminoasitten altısının yerini alifatik aminoasitler almıştır. Bu sebepten dolayı AChE'nin aktif merkez girintisi BChE'a göre daha küçüktür. Aktif merkezlerinde aminoasit içeriklerinin farklı olması enzimlerin substrat seçiciliğini ve inhibitör aktivitelerini de etkilemektedir (137). Asetilkolinesteraz enzimi moleküler yapısı Şekil 2.10'da gösterilmiştir.



Şekil 2.10 Asetilkolinesteraz enzimi moleküler yapısı (138).

Enzimin aktif bölge oyuğunda 5 alt bölge tanımlanmıştır:

- 1) Periferal anyonik bölge (PAS),
- 2) Kolin bağlama (Katyon- π kompleksi) bölgesi,
- 3) Oksi-anyon Deliği (OAD),
- 4) Açıl bağlama cebi,
- 5) Katalitik triad.

AChE ve BChE'in inhibitörler için selektif olması aktif bölge oyuğundaki üç farklı bölge ile gerçekleşmektedir: İlki açıl bağlanma cebidir. İkinci bölge, aktif bölge oyuğunun hemen giriş kısmında bulunmaktadır. Üçüncü bölge ise kolin bağlanma bölgesi olarak ifade edilmektedir (139). 1 mM'dan daha düşük substrat derişimlerinde Michaelis-Menten modeliyle uyumlu kinetik davranış sergiledikleri bilinmektedir (140).

AChE'in katalitik aktivitesinden farklı olarak hücre büyümesi ve adezyonunun kontrolü gibi görevlerinin olduğu ve vücudun farklı bölgelerinde de eksprese edildiği bilinmektedir (141) Literatürde birçok çalışmada AChE'in kolinerjik sinapslarda uyarı iletimini sonlandırması işlevinin dışında katalitik olmayan işlevlerinin olduğu bildirilmektedir. Bu tür 'klasik olmayan' fonksiyonlar, ACh'nin sinaptik olmayan bir bağlamda hidrolizi ile ilgilidir. Ayrıca, R ekleme varyantı tarafından stresle indüklendiğinde üretilen, insan AChE'in hematopoietik farklılaşmayı modüle ettiği bildirilmiştir (142,143). AChE, kolinesteraz benzeri adhezyon molekülleri (CLAMs) olarak adlandırılan bir dizi nöronal adhezyon proteinine dizi ve varsayılan yapısal homoloji gösterdiği bilinmektedir (144). Bu, AChE'nin 'klasik olmayan' rollerinden birinin, sinaptik gelişim ve bakımda yer alan bir yapışma proteini olabileceğini düşündürmektedir (145). AChE'yi bir kemik matris proteini ile ilişkilendiren ilginç bulgular literatüre sunulmuş ve AChE'in bazal membran proteini laminin ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (146,147). Ayrıca AChE'nin nörit büyümesindeki rolüne ilişkin bulgular rapor edilmiştir (148-150). Diğer yandan, bir vakada, AChE'nin katalitik olarak inaktif bir formu ile uyarılan nörit büyümesi bildirilmiştir (151).

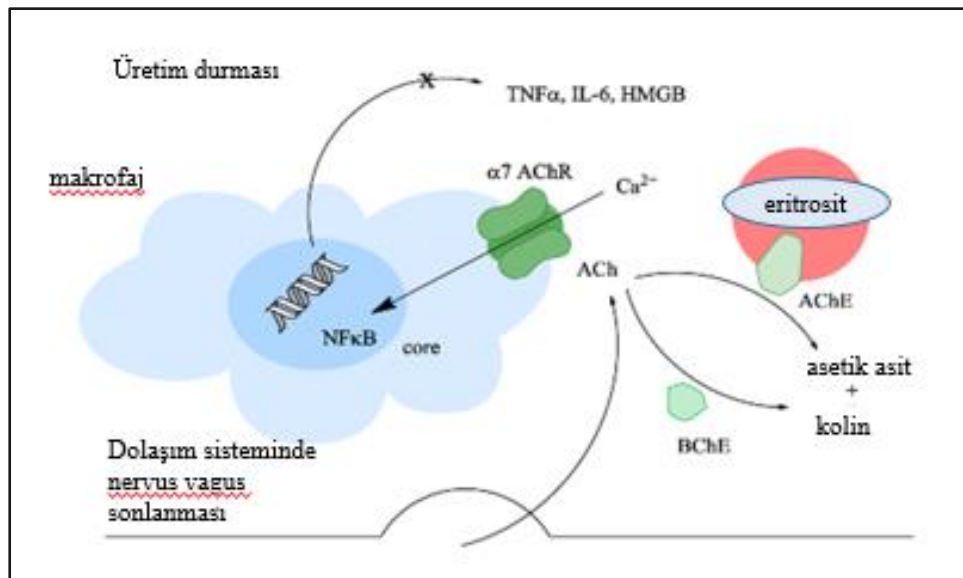
2.5.3 Kolinerjik Antiinflamatuvar Yolak

Kolinerjik anti-inflamatuvar yolak literatürde yeni tanımlanmış olup, vagus sinirini etkileyen temel nörotransmitter olan asetilkolinin immün sistemin nöral modulasyonunda görev aldığı gösterilmiştir (152). Asetilkolinin etki gösterdiği muskarinik ve nikotinik reseptörlerin beyin ve sinir hücreleri dışında lenfositler başta olmak üzere sitokin uyarıcı çeşitli immün sistem hücrelerinde eksprese edildiği gözlemlenmiştir (153).

Nikotinik asetilkolin reseptörleri ligand kapılı iyon kanalı ailesinden olup pentamerik yapıdadırlar. Bu reseptör ailesinin temel fonksiyonu merkezi ve periferel

sinir sistemindeki nöromusküler kavşaklardaki asetilkolin sinyallerini iletmektir. İnsanlarda 16 farklı nikotinik asetilkolin reseptör altünitesi ($\alpha 1-7$, $\alpha 9-10$, $\beta 1-4$, δ , ϵ , γ) belirlenmiştir. Bu alt üniteler farklı özellik ve fonksiyon gösterecek şekilde çok sayıda homo veya heteropentamerik yapı meydana getirebilir (154).

Asetilkolinin makrofajlardaki $TNF\alpha$ üretimini $\alpha 7$ nikotinik asetilkolin reseptörü ($\alpha 7nAChR$) aracılığıyla inhibe ettiği bildirilmiştir (155,156). $TNF\alpha$ IL-1, HGMB1, nitrik oksit ve reaktif oksijen türleri gibi proinflamatuvar medyatörlerin salınımını artırarak inflamasyonu artırıcı etki göstermektedir (155). Asetilkolinin ayrıca IL-1 β , IL-6 ve IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinleri post-transkripsiyonel mekanizmalarla azalttığı rapor edilmiştir. $TNF\alpha$ ekspresyonunun NF- κB yolu üzerinden kolinerjik inhibisyonu için STAT3 protein ekspresyonu gereklidir. $\alpha 7nAChR$ 'nün STAT3'ün fosforilasyonunu engellemekte ve fosforile olmamış STAT3 de NF- κB yolunu inhibe etmektedir. Oluşan antiinflamatuvar etkinin de novo protein sentezinden bağımsız olarak NF- κB 'nin kolinerjik inhibisyonuna bağlı olarak yürüdüğü belirtilmiştir (157). *İn-vitro* çalışmalarda BPA'nın Ca^{++} düzeyini, NF- κB yolunu etkilediği ve STAT3 aktivasyonunu arttırdığını göstermiştir. Bu çalışmalar ışığında BPA'nın kolinerjik anti-inflamatuvar yolunu etkilemesi olasıdır (158). Kolinerjik anti-inflamatuvar yolak Şekil 2.11'da kısaca şematize edilmiştir.

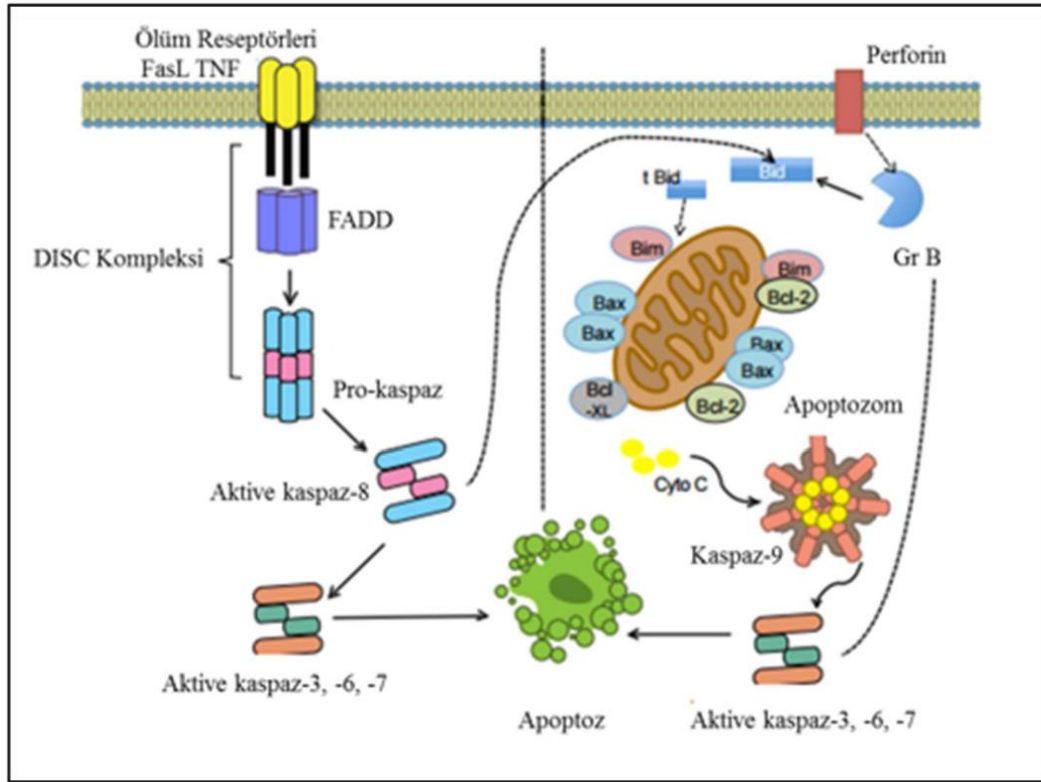


Şekil 2.11 Kolinerjik anti-inflamatuvar yolak (159).

2.6 Apoptoz

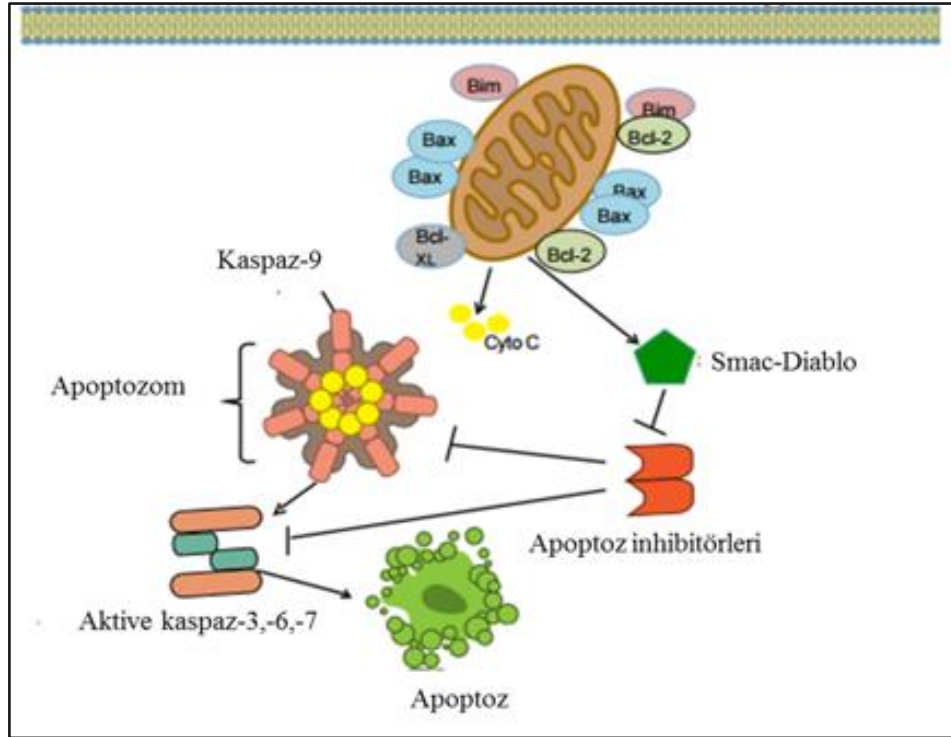
Apoptoz sözcüğü Yunanca'da 'sonbaharda ağaç yapraklarının dökülmesi' anlamına gelmektedir. Apoptoz hücrenin belirli uyarıları alması üzerine kendi kendini yok etmesi tahrip etmesi ve ölüme gitmesi olarak tanımlanmaktadır. Apoptoz yolağı iyi düzenlenen ve son derece korunan bir hücre ölüm mekanizmasıdır (160). Apoptoz terimi belirli özgün morfolojik ve biyokimyasal özelliklerle karakterize programlanmış hücre ölümü diye de nitelendirilmektedir (161). Hücrede stres oluşturabilen kemoterapötik ajanlar, radyasyon, oksitatif ve endoplazmik stres apoptoz başlamasını tetikleyebilen etmenler arasında yer almaktadır. Apoptoza özgü morfolojik değişiklikler; kromatin kondensasyonu, nükleer fragmentasyon, hücre hacminin azalması gibi değişikliklerdir. Apoptoz ile karakterize olan biyokimyasal değişiklikler ise; kaspaz aktivasyonu, DNA/protein yıkımı ve zar yüzeyi değişiklikleri, fagositik hücreler tarafından tanınma olarak bilinmektedir (162). Apoptozun birçok türünde sistein proteaz ailesine ait kaspazlar aktivasyonları ile hem başlatıcı hem ölüme götürücü şekilde rol almaktadır. Kaspazlar inaktif proenzimler olarak sentezlenirler ve aktifleştiklerinde nükleus ve sitoplazmada birçok substrata bağlanırlar. Bu durum hücre büzülmesi, hücre şekil kaybı gibi apoptoza özgü morfolojik özelliklerin oluşmasına yol açmaktadır (163).

Apoptozun düzenlenmesi, normal hücresel homeostazın sürdürülebilmesi için kritik öneme sahiptir. Bununla beraber apoptozun deregülasyonu kronik inflamasyon, ateroskleoris, kanser, solunum yolu hastalıkları ve Alzheimer ile Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojilerle ilişkilendirilmiştir (164) Apoptoz üç ana sinyalizasyon yolağıyla tetiklenmektedir. Bu yolakların ikisi, apoptozun intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü) yolaklarıdır. Üçüncü yolak ise intrinsik endoplazmik (ER) yolağıdır (160). İntrinsik yolak ve ekstrinsik yolak Şekil 2.12 ve Şekil 2.13'de şematize edilmiştir (165).



Şekil 2.12 Ekstrinsik apoptoz yolağı (165).

Ölüm reseptör sinyali FasLigand (FasL) ve Tümör nekroz faktörü (TNF) gibi ölüm reseptörü süperailisinin üyeleriyle tetiklenir. FasL'nin Fas bölgesine bağlanmasıyla reseptör kümelenmesi ve ölümü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Bu kompleks kaspaz-8'nin birikmesini aktive etmektedir. Kaspaz-8 apoptozu kaspaz-3, kaspaz-7'nin kesilmesiyle veya mitokondriyal yolağtaki diğer tetikleyici Bid'in kesilmesiyle tetiklemektedir (165,166). GranzimB/perforin aracılı yolağta ise Granzim B (Gr B) sitoplazma içerisine alınması gözenek oluşturabilen perforin proteini ile kolaylaştırılmaktadır. Sitoplazmada GrB apoptozu Bid'in kesilmesiyle tetiklemektedir. Bid ise sonrasında sırasıyla sitokrom c salınımını apoptozomun oluşumunu ve kaspaz-3,ve kaspaz-7'nin aktive oluşunu tetikler. Aynı zamanda Gr B mitokondri aracılı yolağta geçebilmekte ve direkt olarak kaspaz aktivasyonunu başlatıp ve/veya kaspaz substratlarını temizlemektedir (167,168).



Şekil 2.13 İntrensik apoptoz yolağı (165).

İntrensik apoptoz yolağı (mitokondriyal) mitokondri membranının geçirgenliğini değıştiren sitokrom c ve Smac/DIABLO gibi apoptogenetik faktörlerin stres sinyalleri ile başlamaktadır. Mitokondriyal membran permeabilizasyonu, pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 aile üyelerinin (Bcl-2, Bcl-XL, Bim, Bax, Bak) uygulayıcı eylemlerinin dengesiyle düzenlenir. Sitokrom c'nin salınması, kaspaz-9, APAF-1 ve sitokrom c içeren bir kompleks olan apoptozom oluşumunu tetikler. Aktifleşen kaspaz-9 kaspaz-3, kaspaz-7' nin aktivasyonunu sağlayarak apoptozu indüklemiş olur (165,169).

Literatürdeki son yıllarda yapılan çalışmalarda AChE'in apoptoz ve nekroptoz gibi farklı tipteki hücre ölüm türlerindeki rolü bildirilmiştir (170,171). Apoptoz düzenli bir hücre ölümü olarak diabet, Alzheimer hastalığı, kanser gibi birçok hastalığın gelişmesi ve patolojisinde rol sahibidir. Artmış AChE aktivitesi ve enzim aktivitesindeki artışın apoptoz ile ilişkisi farklı hücre tipleri için rapor edilmiştir (172).

BPA'nın birçok hücre tipinde apoptozu başlattığı bilinmektedir. BPA'nın nöronal hücre ölümünde de aktivasyon rolü bildirilmiştir. BPA'nın kaspaz-3 ve

TNF- α uyarısıyla aktif hale geçen TNF reseptörü (TNFR) RIP1 ile etkileşime geçip plazma membrana bağlı kompleksi oluşturan apoptoz proteinlerinin hücrel inhibitorleri (cIAP1 ve cIAP2) 'nin toplanmasını sağlar. Böylece RIP1'in poliubikitinleşmesi (Ubs) gerçekleşir. Sonrasında RIP1 FADD'ye ve prokaspaz-8 bağlanıp kaspaz-8 aktivasyonunu gerçekleştiren kompleks oluşturur böylece apoptoz indüklenmiş olur.

Kaspaz-8 aktivitesi inhibisyona uğrarsa, RIP1 RIP3'e bağlanıp nekrozom oluşmasını gerçekleştirir (176,179). RIP1 ailesi üyelerinden olan RIP3'ün rekombinant ekspresyonu nekroptoza yatkın olmayan hücre dizinlerinde nekroptoz meydana getirmektedir. Her iki protein de %33 oranında kinaz bölgesinde benzerlik göstermektedir (180). RIP1, RIP3'ün oto-fosforilasyonunu ve sonraki aktivasyonunu destekler. Böylece de RIP3, MLKL'nin fosforillenmesine olanak sağlar. Bu, MLKL'nin oligomerizasyonu, MLKL oligomerlerinin membrana yerleşmesi, plazma ve hücre içi membran bütünlüğünün bozulması ve nekroptotik ölümle sonuçlanır (181). FASL, TRAIL, LPS, dsRNA, IFN γ gibi nekroptoz uyarıları nekroptozun başlatılması için RIP1 ve/veya RIP3 aktifleştirebilmek amacıyla kendi reseptörlerini uyarabilmektedir. Viral enfeksiyon RIP3'ü direkt olarak interferon regülatör faktörlerin DNA bağımlı aktivatörü (DAI) aracılığıyla aktifleştirebilmektedir. Antikanser bileşenler ve genotoksik stres de RIP1/RIP3 bağımlı nekroptozu indükleyebilmektedir (182). Nekroptoz yolağını inhibe eden birçok bileşik mevcuttur. Bunlardan RIP1'i inhibe eden Nek-1 ve RIP3 inhibitörlerinden GSK843 ve GSK872 örnek verilebilir. Diğer yandan MLKL inhibisyonu da nekrosülfonamit (NSA) ile gerçekleşmektedir (176,183).

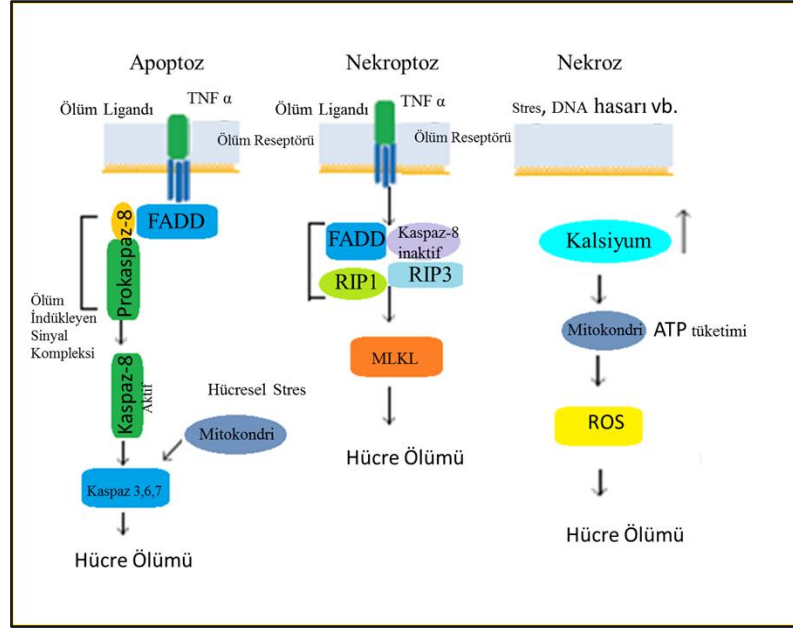
BPA'nın çeşitli hücre hatlarında apoptoz ve nekrozu indüklediği bildirilmiştir (184-187). Henüz literatürde BPA'nın nekroptoza olan etkisine dair bir çalışma yoktur.

AChe nekroptoz çalışmaları literatürde yeni olmakla beraber yumurtalıklarda yapılan bir çalışmada, stresle indüklenen varyant olan AChE-R follüküler sıvı, granüloza ve theca hücrelerinde olduğu kadar luteal hücrelerde de bulunmuştur. Katalitik olmayan rollerini anlamak için yapılmış bir çalışmada ise sentetik bir AChE-R peptidi (ARP) kullanılmış ve birincil, kültürlenmiş insan granüloza hücrelerinde, farklı bir balon benzeri morfoloji ve laktat dehidrojenaz salınımı ile kaspazdan

bağımsız hücre ölüm şekli indüklenmiştir. RIPK1 inhibitörü Nekrostatin-1'in ve MLKL-bloke edici nekrosülfonamidin bu hücre ölüm şeklini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Böylece, AChE-R'nin yeni, enzimatik olmayan bir fonksiyonu olarak, RIPK1 / MLKL'ye bağlı düzenlenmiş nekroptozu uyardığı ortaya çıkarılmıştır (170).

2.8 Nekroz

Nekroz Yunanca bir kelime olan “necros” ’dan türetilen bir kelimedir. Doku ölmesi anlamına gelmektedir. Uzun süre boyunca patologlar tarafından patolojik infeksiyon, hücre yaralanması sonucu görülen hücre veya doku ölümünün morfolojisini tanımlamak için kullanılmıştır. Nekroz terimi günümüzde ise rastlantısal, spesifik olmayan, düzenlenmeyen kontrolsüz hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (177). Nekrotik hücre ölümü sıcaklık, asidasyon, osmotik şok, mekanik stres gibi etmenlerle oluşan aşırı fizikokimyasal stres sonucunda hızlıca görülebilmektedir. Nekrotik hücreler; hücre membran bütünlüğünün bozulmasından, hücre ve organellerin şişerek patlamasından, internükleozomal DNA parçalarının eksikliğinden ve hücresel kollaps gibi belirteçlerden tanınabilmektedir (177). Nekrotik hücre ölümünde mitokondriyel kalsiyum yüklenmesine sebep olan kalsiyum, proteazların ve fofolipazların aktivitesi gibi biyolojik etkiler, reaktif oksijen türleri (ROS), iyon kanalı deregülasyonu ve membran bütünlüğünün bozulması gibi süreçler rol oynamaktadır (178). Apoptoz, nekroptoz programlı hücre ölümü iken nekroz kontrollü olmayan hücre ölümü şeklindedir (Şekil 2.15) (188).



Şekil 2.15 Hücre Ölüm yolları. Fas birleşik ölüm bölgesi (FADD); Reseptör aracılı protein 1 (RIP1); Reseptör aracılı protein 3 (RIP3); Mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) (189).

Monositlerde hücre ölümü ile ilgili yapılmış bir çalışmada BPA'nın sitotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir. Değişik konsantrasyonlarda BPA'nın monosit hücrelerinde nekrozu aktive ettiği bildirilmiştir (190).

Bu tez kapsamında BPA'nın SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi sonrasında kolinesteraz enzimleri ile ilişki olarak hücre ölümü yollarına olan etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1 Gereçler

3.1.1 Hücreler

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Pelin KELİCEN UĞUR tarafından hediye edilmiştir.

3.1.2 Kimyasal Maddeler ve Kitler

Bisphenol A (99%, 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan) (BPA) (CAS No 80-05-7) ve necrostatin-1 \geq 98% (HPLC) 5-(1-İndol-3-ilmetil)-3-metil-2-tiyokso-4-imidazolidinon, 5-(İndol-3-ilmetil)-3-metil-2-tiyo-Hidantoin) (CAS No 4311-88-0) ve hücre kültüründe kullanılan kimyasallar; dulbecco's Modified Eagle's Medium 4500 mg/L glukoz ve sodyum bikarbonat, L-glutamine, sodium piruvat içermeyen (DMEM) (D1145), Siprofloksasin \geq 98.0% (HPLC) (CAS No 85721-33-1), tazobaktam (CAS No 89786-04-9) ve Tiyazolil Blue Tetrazolyum Bromid (3-(4,5-Dimethyl-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromid (MTT) (CAS No 298-93-1) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından satın alınmıştır. Diğer hücre kültürü kimyasalları, ısı ile inaktive edilmemiş Fetal Sığır Serum (FBS), Gamma Irradiated (S181G-500) Biowest (Güney Amerika) firmasından getirilmiş ve L-Glutamine 200mM (17-605E) Lonza firmasından temin edilmiştir. Hyclone Tripsin, 0.25% 1X 1g/L EDTA (SV30031.01) ve HyClone Fosfat tamponlu Salin (PBS) (SH30256.01) Thermo Scientific şirketinden satın alınarak kullanılmıştır. Dimetil sülfoksit (DMSO) (67-68-5) ise Merck (Darmstadt, Almanya) şirketinden temin edilmiştir.

Enzim aktivitesi belirleme deneyinde kullanılan kimyasallar, rekombinant Asetilkolinesteraz insan enzimi (C1682), at serumundan elde edilmiş butirilkolinesteraz (1057), asetiltiyokolün iyodür (A5751), S-Butiriltiyokolün iyodür (B3253) Sigma-Aldrich şirketinden temin edilirken 5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) CALBIOCHEM (Los Angeles, Kaliforniya) firmasından satın alınmıştır.

Laktat dehidrogenaz (LDH) deneyinde kullanılan kimyasallardan olan, β -Nikotinamid adenin dinukleotid disodyum tuzu (NADH), Tris.HCl Sigma-Aldrich

(USA) şirketinden temin edilmiş ve sodyum piruvat Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Griess ayıraç çözeltisi hazırlamak için kullanılmış olan, sulfanilamid, fosforik asit, N-(1-Naftil) etilendiamin dihidroklorid kimyasalları Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletler) firmasından temin edilmiştir.

Total RNA saflaştırılması için kullanılan RNAGEM Tissue kiti ZyGEM (Yeni Zelanda) firmasından alınmış, total RNA örneklerinin cDNA'e çevrilmesinde kullanılan Proto Script First Strand cDNA Synthesis Kit BioLabs (İngiltere) den temin edilmiştir. Real Time Polimer zincir Reaksiyonu (RT-PCR) işleminde kullanılmış diğer kimyasal olan Fast Eva Green qpcr Master Mix Trial Size Biotum şirketinden getirilmiştir. Serolojik pipetler ve hücre kültürü malzemeleri ile DNaz-RNaz-pirojen bulundurmayan pipet uçları Corning Incorporated (Amerika Birleşik Devletleri)'den temin edilmiştir.

Apototik, nekrotik ve canlı hücre popülasyonunun belirlendiği deney işlemlerinde kullanılan kit olan Tali® Apoptosis Kit- Annexin V Fluor 488 and PI (propidium iodide) ThermoFisher Scientetifics firmasından, BPA uygulanmış hücrelerdeki kaspaz-8 ve TNF- α düzeyinin belirlendiği deneylerde kullanılmış olan ab119507-Caspase-8 Human ELISA Kit ABCAM şirketinden, LEGEND MAX™ Human TNF- α ELISA Kit with Pre-coated Plates ise BioLegend (San Diego) firmasından, BCA protein tayini için kullanılan BCA deney kiti Santa Cruz Biotechnology firmasından temin edilmiştir.

3.1.3 Cihazlar

SHSY-5Y nöroblastoma hücreleri Sanyo MCO-18 model ve Panasonic MCO-18AC- PE model karbondioksit inkübatöründe (Japonya) inkübe edilmiştir. Hücre kültürü işlemleri Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı bünyesindeki hücre kültürü odası içerisinde bulunan Clean Air Techniek (Hollanda) isimli firmadan temin edilen laminar akış kabini tamamlanmıştır. Hücrelerin kontrolü ve sayımı işlemlerinde ise NIKON Eclipse TS100 (Amerika Birleşik Devletleri) ışık mikroskobundan yararlanılmıştır. Santrifüj işlemlerinde Hettich Rotina 35R (Almanya) marka cihaz kullanılmıştır. Hücre hatlarının ve hücrelerden

elde edilen RNA ve cDNA örneklerinin saklanması amacıyla Panasonic marka MDF-U5386S-PE ULT model derin dondurucudan faydalanılmıştır.

Elde edilen RNA örneklerinin jel elektroforezinde yürütülmesinde Invitrogen (İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri) marka yatay jel elektroforez tankı ve ZOOM Dual Power Supply (Amerika Birleşik Devletleri) marka güç kaynağı kullanılmıştır. Trans UV altında görüntü alabilmek için Gel Logic 200 Imaging System sistemi ve KODAK MI SE adlı bilgisayar programı kullanılmıştır. Elde edilmiş RNA örneklerinin miktar tayini UV-1800 SHIMADZU (Japonya) spektrofotometre cihazı ve Shimadzu Biospec nano ile gerçekleştirilmiştir. Diğer deneylerdeki spektrofotometrik ölçümlerde Biotek PowerWave XS marka mikropilaka okuyucu cihaz kullanılmıştır.

PCR işlemlerinde AB Applied Biosystem Veriti 96 well thermal cyclers cihazı kullanılmıştır. Kantitatif RT-PCR işlemlerinde Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında mevcut olan Applied Biosystems'dan (Amerika Birleşik Devletleri)'den satın alınmış olan ViiA™ 7 Real-Time PCR System cihazından faydalanılmıştır.

Deneylerde kullanılan tüm tampon ve çözeltilerin pH ayarlamaları için Orion 520A pH metre kullanılmıştır. Tartım işlemleri ise Mettler Toledo AGI35 isimli hassas terazi ve Sartorius tartı cihazı ile yapılmıştır.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Hücre Kültürü

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri 10% HI FBS, %1 L-glutamin, %0,5 siprofloksasin ve %0,01 tazobaktam içeren DMEM ortamında 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin canlılıkları ve çoğalmaları sık aralıklarla ışık mikroskopunda incelenmiş, gün aşırı olmak üzere medyaları değiştirilmiştir. Hücrelerin %80 doluluk oranına eriştikleri gözlemlendiğinde pasajlanmıştır. Besiyerinin aspire edilmiş, hücreler fosfat tamponlu salin (PBS) pH 7.4 ile yıkanmıştır. Hücrelere %0,25'lik Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve 37°C'de 2-3 dakika süre ile bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda DMEM eklenmiş oda sıcaklığında 10 dakika süre ile 250 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant aspire edilip, hücrelere DMEM eklenip homojen çözümleri sağlandıktan sonra

belirlenen seyreltme oranına göre yeni kültür kaplarına alınmıştır. Kültür kapları üzerine pasajlama işlemi sonrasındaki yeni pasaj numarası ve tarihi not düşülmüştür. Hücreler 37°C’de ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde saklanılmaya devam edilmiştir.

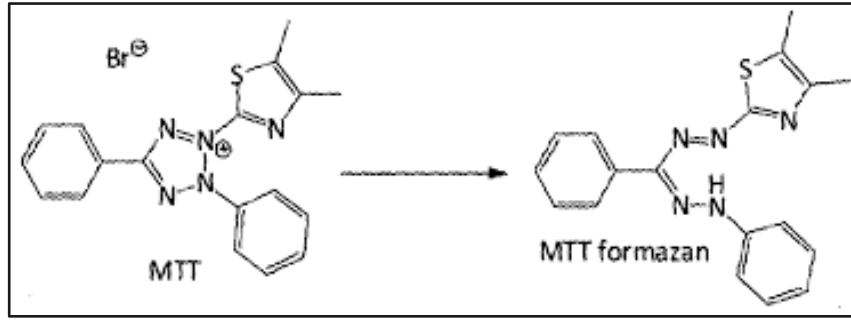
3.2.2 Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

Hücreler steril falkon tüplere aktarılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika süresince 250xg’de santrifüj edilmiştir. Sonrasında elde edilen pellet besiyerinde çözünmüş ve Thoma lamında sayılmak üzere tripan mavi boyası ile (1:1) seyreltilmiştir. Membran bütünlüğünün korunması esasına göre ölü hücreler boya alırlar. Thoma lamının esası, 0,1 mm³ hacimde sayım yapılmasıdır. Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir. Bir damla tripan mavisi-hücre karışımı thoma lamına konmuş ve lamel ile kapatılmıştır. Işık mikroskopunda canlı hücreler sayılmıştır. Canlı hücrelerin mililitredeki toplam sayısını elde etmek için aşağıdaki formül kullanılarak canlı hücrelerin sayısı 2 (tripan mavisi için seyreltme faktörü) ile sonrasında 10000 ile çarpılmıştır.

Toplam hücre sayısı = Sayılan canlı hücre sayısı x 10,000 x seyreltme faktörü

3.2.3 MTT Sitotoksisite Deneyi

3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-difenil tetrazolyum bromür (MTT) sitotoksisite deneyi, MTT solüsyonunun mitokondriyal dehidrogenaz ile tetrazolyumun mor renkli formazana indirgenmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.1). MTT tetrazolium tuzu kolorimetrik deneyi Mosmann tarafından 1983’de tanımlanan hücre proliferasyonunu, hücre aktivitesini ve sitotoksisiteyi ölçmek için tanımlanmış bir yöntemdir (191). MTT sulu çözeltilerinde stabil değildir. Her deney işlemi için öncesinde 5 mg/ml derişiminde MTT solüsyonu hazırlanmalıdır. Bu çözelti 0-5 °C’de ışıktan korunacak şekilde saklanmalıdır.



Şekil 3.1 MTT ve MTT-formazan kimyasal yapıları

SH-SY5Y hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına kuyucuk başına 5.000 hücre olacak şekilde ekilmiş 37°C %5 CO₂ içeren ortamda 24veya 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi bitiminde deneyin kontrolü olan kuyucuklara hiç BPA eklenmezken, diğer kuyucuklardaki hücreler farklı derişimlerde (0µM- 100 µM) BPA' ya farklı süreler (8, 24, 48, 72 saat) boyunca maruz bırakılmıştır. Maruziyet süresi bitiminde kuyucuklara 100 µl PBS'de çözülmüş 5mg/ml MTT eklenmiştir. MTT eklenmesinden sonra 4 saat içerisinde kuyucuklarda mor kristallerin oluşumu ışık mikroskopunda gözlenmiştir. Kristallerin çözünmesi için 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiş orbital çalkalayıcı yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. 96 kuyucuklu plaka, plaka okuyucuda 690nm ve 570 nm'de okunmuştur. Değişik derişimlerdeki (0µM- 100 µM) BPA'ya maruz bırakılan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin canlılık yüzdeleri;

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = (A_k 690\text{nm} - A_k 570\text{nm}) \times 100 / (A_0 690\text{nm} - A_0 570\text{nm})$$
 formülüne göre hesaplanmıştır. Formülde yer alan **A_k**; kontrol grubunun absorbans değerini belirtirken **A₀**; örneklerin absorbans değerini belirtmektedir.

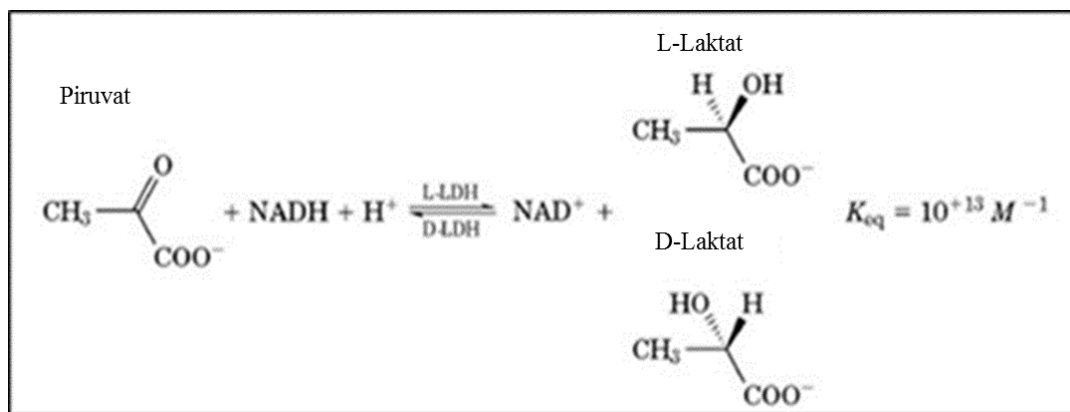
3.2.4 Nitrik Oksit (NO) Düzeyinin Griess Yöntemiyle Ölçülmesi

SH-SY5Y hücrelerindeki değişik derişimlerdeki BPA maruziyeti sonucu NO düzeyinin saptanması için Griess yöntemi kullanılmıştır. Griess ayıraç çözeltisi hazırlamak için %5 fosforik asit içerisinde hazırlanan %1 sulfanilamid ve suda hazırlanmış % 0,1 naftiletilediamin dihidroklorid çözeltileri eşit hacimde karıştırılıp renkli şişelerde saklanmıştır. Uygulama yapılmış 96 kuyucuklu mikropalakada her

kuyucuktan 50 µL besiyeri alınmış yeni plakadaki kuyucuklara aktarılmıştır. Bu kuyucukların her birine hazırlanmış olan Griess ayıraç çözeltisinden 50 µL eklenmiş ve plaka ışıktan korunması için alüminyum folyo ile sarılmıştır. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiş ardından 540 nm’de plaka okuyucuda absorbansları ölçülmüştür. Önceden artan derişimlerde hazırlanmış NaNO₂ solüsyonlarının (0, 25µM, 50µM, 100µM, 150µM, 200µM) Griess yöntemi ile nitrit ölçümü yapılmış ve bir standart eğri elde edilmiştir. Standart eğri yardımıyla elde edilen denkleme göre SHSY5Y hücrelerinin 8, 24, 48, 72 saat boyunca BPA’ya maruziyetleri sonucunda NaNO₂ derişimleri hesaplanmıştır.

3.2.5 Laktat Dehidrogenaz (LDH) Deneyi

Diğer bir sitotoksisite ölçüm yöntemi olan Laktat Dehidrogenaz (LDH) deneyi yapılmıştır. Bu deney membran bütünlüğü bozulan hücrelerin sitoplazmik LDH enzimi aktivitesinin ölçümü esasına dayanmaktadır. LDH membranı zarar görmesiyle hızla ekstraselüler sıvıya salınan sitoplazmik bir enzimdir (192). LDH pirüvik asit (piruvat; P) ile laktik asitin (laktat; L) birbirine dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Enzim, NAD⁺ /NADH koenzim sistemini kullanarak, hidrojen transferini gerçekleştirir. (193). LDH enziminin katalizlediği reaksiyon Şekil 3.2’de görülmektedir.



Şekil 3.2 Laktat Dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyon.

Bu deney için 0,2 M Tris-HCl pH 7.3, 6,6 mM sodyum piruvat (NADH) çözeltileri hazırlanmıştır ve karıştırılarak LDH deney çözeltisi elde edilmiştir. Her kuyucuğa LDH deney çözeltisinden 50 µL eklenmiştir. Kontrol grubu olan kuyucuklar 200 µL lizis tamponu (50 mM Tris. HCl, %0.5 Nonidet P40, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF pH 7. 5) ile 1 saat bekletilmiştir. Absorbans değerleri 25 °C de 340 nm’de ölçülmüştür.

% LDH Aktivitesi = $(A_{\text{ö}} 340\text{nm}) \times 100 / (A_{\text{k}} 340\text{nm})$ formülüne göre her örnekteki % hücre proliferasyonu hesaplanmıştır. Formülde yer alan **A_k** kontrol grubunun absorbans değerini belirtirken **A_ö** örneklerin absorbans değerini belirtmektedir.

3.2.6 SH-SY5Y Hücrelerinin Plakalara Ekilmesi

Hücreler toplanıp hücre sayımı yapılmıştır. Her kuyucuğa kuyucuk alanıyla orantılı olacak sayıda hücre ekimiştir. Her kuyucuğa 4-5 ml besiyeri eklendikten sonra 37°C’de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler tutunmaları için 24 saat boyunca inkübatörde bırakılmıştır. Kuyucuklardaki hücreler % 80-90 oranında doluluğa ulaştığında, besiyeri aspire edilmiş, FBS içermeyen besiyeri içinde artan dozlarda BPA (1 pM, 1 nM, 1µM) uygulanmıştır. Deney kontrolü amacıyla kullanılacak kuyucuğa hiç BPA eklenmemiştir. Hücreler 48 saat süre ile 37°C’de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir.

3.2.7 SH-SY5Y Hücrelerinden RNA Eldesi ile RNA’ların Miktar ve Safılık Tayini

6 kuyucuklu plakalara 300.000 hücre /kuyucuk olacak şekilde ekilen hücrelere 1 pM, 1 nM, 1µM BPA eklenmiş ve 48 saat 37°C’de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Hücrelerden RNA izolasyonu Zygem RNAGEM Tissue PLUS kiti ile yapılmıştır. RNA saflaştırma işlemi bütün örnekler için 3 kez tekrar edilmiştir. Kit RNAGEM enzimi, 10X silver tamponu, 10X Tris-EDTA saklama tamponu içermektedir. Hücreler inkübasyon süresi sonucunda soğuk PBS ve tripsin aracılığıyla flasktan kaldırılıp 200xg’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Supernatan atılıp çökelti 1X silver tamponuyla yıkanmıştır. Çökelti 5 µl 10X silver tampon içerisinde çözdürülmüş

1 µl RNAGEM enzimi eklenmiş total hacim distile su ile 50 µl'ye tamamlanmış ardından vortekslenmiştir. 75°C'de 10 dakika ısıtılmıştır.

RNA miktar tayini için, örneklerin spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm'de verdikleri absorbans değeri ölçülmüştür. Nükleik asitler 260 nm'de; proteinler ise 280 nm'de maksimum absorbans verdiği için bu iki değerde ölçülen absorbans değerlerinin oranı (A_{260}/A_{280}), örneğin saflık derecesini göstermektedir. 260 nm'de 1 optik dansiteye karşılık gelen RNA miktarı 40 µg RNA/ml dir. A_{260}/A_{280} oranının 1.8-2.1 arasında olması gerekmektedir. Elde edilen total RNA'nın 1µg'lık hacimleri belirlenip hazırlanmıştır. Tüm örnekler işlem sonrasında -86 ° C 'da saklanmıştır.

3.2.8 RNA için Denatüre Edici Agaroz Jelin Hazırlanması ve RNA'ların Jel Görüntüsünün Eldesi

%1 agaroz jelini hazırlamak için 0,4 g agaroz tartılıp %1 sodyum hipoklorit eklenen %10 1 X Tris-Asetik Asit EDTA (TAE) tamponunda ısıtılarak çözündürülür (194). Solüsyonun sıcaklığı düştüğünde son derişim 0,5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür (EtBr) eklenmiş ve jel elektroforez kasetine dökülmüştür. Jel donduktan sonra 1X TAE tamponuna eklenmiş ve 40 µg RNA içeren örnekler jele yüklenip 30 dakika süre ile 100 V'da yürütülmüştür. Orange G renkli jel yükleme solüsyonu (6X) seyreltilerek (1X) kullanılmıştır. Yürütülen RNA örnekleri KODAK Görüntüleme cihazı ile UV altında görüntülenmiştir.

3.2.9 SH-SY5Y RNA'larından cDNA Eldesi

SH-SY5Y hücrelerine ait total RNA örneklerinden cDNA oluşturulması için her örnek için 1 µg RNA'lık hacim belirlenmiş reaksiyon ortamı için gerekli diğer hesaplamalar yapılmıştır. Saflaştırılmış 1 µg RNA popülasyonuna 2 µl Oligo (dT) primeri eklenir ve karışım nükleaz içermeyen suyla 12 µl hacime tamamlanmıştır. Karışım 3 dakika 80°C'de bekletildikten sonra 2 µl 10 X RT-tamponu, 4 µl dNTP karışımı, 1 µl MMLV-RT ters transkriptaz enzimi ve 1µl RNaz inhibitörü eklenip 44°C'de 1 saat ardından 80°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Böylece RNA sekansına komplementer cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA lar -20 ° C'de muhafaza edilmiş ve cDNA'ların miktarı ve saflığı Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

İlaç ve Kozmetik Ar-Ge ve Kalite Kontrol Laboratuvarı bünyesinde bulunan Shimadzu Biospec Nano spektrofotometre cihazı aracılığıyla belirlenmiştir.

3.2.10 Kantitatif Eş Zamanlı PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Bundan sonraki aşamada cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) yöntemi uygulanarak AChE, BuChE ve nNOS genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Kontrol geni olarak GAPDH seçilmiş ve GAPDH'ın gen ekspresyon düzeyi ile normalize edilmiştir. Bu yöntemde, mRNA'dan ters transkripsiyon ile elde edilen cDNA, florokromlu bir prob varlığında araştırılan gene özgü primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilmekte ve oluşan sinyal PCR işlemi esnasında ölçülmektedir. Bu yöntemde çeşitli örneklerden izole edilen RNA'ların tam olarak karşılaştırılabilmesi için, test probunun floresansı referans proba (18S rRNA, GAPDH vb.) karşı normalizasyonu yapılmaktadır. RT-PCR işlemi için reaksiyon ortamına 10 μ M ileri (forward) ve geri (reverse) primerlerden 1 μ L, 2 μ L cDNA örneği, 2 μ L 1X ROX solüsyonu, 4 μ l nükleaz içermeyen H₂O ve 10 μ L 2X fast eva green master mix eklenmesiyle hacim 20 μ l' ye tamamlanmıştır. Reaksiyon hacimleri belirlenmiş ve deney ortamına en son cDNA örnekleri eklenmiştir (Tablo 3.1). Karışım 50 °C'de 2 dakika, 95 °C'de 10 dakika, 95 °C'de 15 dakika, 60 °C'de 60 saniye 50 döngü, erime noktası 60 °C'de olacak şekilde PCR işlemine bırakılmıştır.

Tablo 3.1 RT-PCR işlemi için hazırlanan reaksiyon ortamı.

Malzemeler	Stok Derişim	Son Derişim	1 Reaksiyon (μ L)
Master Mix	2X	1X	10
İleri Primer	10 μ M	1 μ M	1
Geri Primer	10 μ M	1 μ M	1
ROX (1X)	-	-	2
ddH ₂ O	-	-	4
cDNA	-	-	2
Final	-	-	20

AChE ve BuChE, nNOS mRNA sekansları kullanılarak ileri (forward) ve geri (reverse) primer dizileri belirlenmiştir. Bu primerlerin başka herhangi bir bölgeye bağlanmadıkları Pubmed BLAST kullanılarak kontrol edilmiştir. Her bir gen için ayrı reaksiyon ortamı hazırlanmış ve her gen için 3 tekrarlı çalışılmıştır.

3.2.11 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi Amacıyla Tasarlanan Primerlerin Dizileri

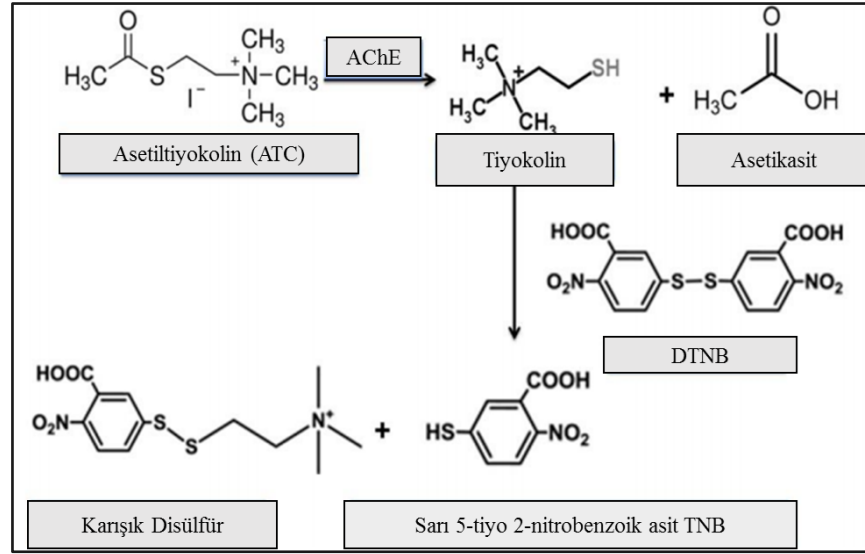
RT-PCR işleminde kullanılan cDNA'ler 1 µg total RNA'dan sentezlenmiştir. PCR sonucunda seçilmiş genlerin Ct değerleri gözönüne alınarak hesaplama yapılmıştır. GAPDH'ın Ct değerine diğer genlerin Ct değerleri karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır. Tablo 3.2'de primerlerin sekansları (5'-3'), %GC değerleri ile Tm (°C) değerleri sunulmuştur. Kantitatif RT-PCR yönteminde kullanılan bu primerler yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile saflaştırılmış ve liyofilize haldedir.

Tablo 3.2 Gen ekspresyonu çalışmaları için tasarlanmış primerler.

Primer Adı	Primer Sekansı (5'-3')	Tm (°C)	% GC
AChE (F)	CCTGTCCTCGTCTGGATCTATG	68,00	73,18
AChE (R)	AAGAAGCGGCCATCGTACAC	62,00	70,30
BuChE (F)	TGGCTCGGGTTGAAAGAGTTA	62,00	68,88
BuChE (R)	TCCTGGCAAAGCTAAGAATCCT	64,00	69,45
nNOS (F)	GAAGGAGCGGGTCAGTAAGC	64,00	72,35
nNOS (R)	CCCCACGAATCAGGTCAGAGA	66,00	72,79
GAPDH(F)	GTCGTATTGGGCGCCTGGTCAC	65,93	63,64
GAPDH (R)	GCCAGCATCGCCCCACTTGATT	66,00	59,09

3.2.12 BPA'nın AChE ve BuChE Enzim Aktivitesine Etkisi

BPA'nın AChE ve BuChE enzim aktivitesine etkisini belirleme çalışmaları kolorimetrik Ellman metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Elmann metodu tiyokolinin 5, 5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-tiyo 2-nitrobenzoikasit (TNB) birleşiminin oluşması esasına dayanmaktadır (Şekil 3.3) (195,196).



Şekil 3.3 Ellman metodunun kimyasal mekanizması.

AChE enzim aktivitesi için hazırlanan reaksiyon ortamında 10 mM KP pH 7.4, 0.5 mM asetiltiyokolin (ATC) bulunmaktadır. Reaksiyon ortamına ayrıca 0.125 mM DTNB ve gerekli miktarda enzim eklenmiştir. Reaksiyonlar substrat eklenmesiyle başlatılmış spektroskopik olarak 412 nm’de UV-visible 1700 Shimadzu PC spektrofotometre ile 25°C sabit sıcaklıkta aktivite ölçümleri yapılmıştır (197). BPA’nın AChE ve BuChE için IC₅₀ değerleri değişik derişimlerdeki BPA ilavesiyle ve Graphpad Prism 5 program analiziyle hesaplanmıştır.

3.2.13 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin Spesifik AChE Aktivitelerinin Belirlenmesi

1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin spesifik AChE aktivitesini belirlemek amacıyla 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 saat uygulama süresi sonunda örnekler tripsinize edilmiş ve 5 dakika +4 °C’de 3700xg’de santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılıp pellet üzerine 1 damla gliserol ilavesi sonrasında 10x5 sn %21 amplitüt ile sonikasyon yapılmış ve her işlem arasında 50 sn beklenmiştir. Pellet 50 mM Tris-HCl, % 0,5 Triton X 100, % 1 Nonidet P40, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl ve proteaz inhibitörü içeren pH 7.4 olan lizis tamponuyla 7 kat seyreltilip 30 dakika buz üzerinde orbital çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bu süre sonunda tekrar 14 000xg’de

4 °C de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Örneklerdeki protein miktarını hesaplayabilmek için Calchem SantaCruz BCA protein tayini kiti kullanılmıştır. BCA tayini için 2mg/ml derişiminde stok sığır serum albümin (BSA) ile hazırlanan 8 farklı derişimdeki BSA solüsyonları yardımıyla standart eğri elde edilmiştir. Hazırlanan BSA solüsyonlarının derişimleri Tablo 3.3’de sunulmuştur.

Tablo 3.3 BSA standart çözeltilerinin stok BSA ile hazırlanışı.

Kuyucuk	μL PBS	Hacim μL	Derişim ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
A	0	100 μL stok	2000
B	50	150 μL stok	1500
C	100	100 μL stok	1000
D	100	100 μL vial B	750
E	100	100 μL vial C	500
F	100	100 μL vial E	250
G	100	100 μL vial F	125
H	100	0	0

Kit içerisindeki A ve B çözeltileri 50:1 oranında karıştırılıp AB çözeltisi elde edilmiş ve ışıktan korunmuştur. 96 kuyucuklu plakalara her BSA standartından ve örnekten 25 μl eklenmiştir

Her standart ve örnek için 3 tekrar yapılmıştır. Hazırlanan AB çözeltisinden her kuyucuğa 200 μl eklendikten sonra alüminyum folyo ile sarılmış ve 60 °C’de 15 dakika sıcak su banyosunda inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra mikropkaya okuyucuda 562 nm’de her kuyucuğun absorbansı ölçülmüştür. Standart eğri denklemi yardımıyla örneklerin protein derişimi hesaplanmıştır.

Örneklerdeki AChE aktivite tayini Ellman metoduna uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki mg protein başına düşen AChE enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

3.2.14 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin TNF- α Düzeylerinin Belirlenmesi

1 pM ve 1 nM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin TNF- α düzeyleri LEGEND MAX™ Human TNF- α ELISA Kit ile Biotek Power Wave XS mikropilaya okuyucuda belirlenmiştir. Kite bulunan 1,000 pg/ml ana standart çözeltiden 25 μ L alınmış ve 475 μ L Assay Buffer A eklenmiştir. Böylece ana standart çözeltisi 6 seri halinde ikişer kat seyreltilip farklı derişimlerde standartlar elde edilmiştir. Her kuyucuk 4 kez 1X yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 50 μ L Assay buffer A eklenmiştir. 50 μ L standart dilüsyonları ve örnekler uygun kuyucuklara eklenmiş ve oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 200 rpm hızla 2 saat süreyle çalkalanmıştır. Kuyucuk içeriğindeki sıvı aspire edildikten sonra plaka 4 kez 1X yıkama tamponu ile yıkanmıştır. 100 μ L Human TNF- α Detection Antibody solüsyonu her kuyucuğa eklenmiş ve plaka oda sıcaklığında 1 saat süresince inkübe edilmiştir. 100 μ L Avidin-HRP B solüsyonu her kuyucuğa eklenip tekrar oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 30 dakika çalkalanmıştır. Plaka 5 kez 1X yıkama solüsyonu ile yıkanıp son yıkanma seferinde solüsyon 30 saniye bekletilmiştir. 100 μ L substrat solüsyonu D her kuyucuğa eklenip 15 dakika karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Reaksiyonun sonlandırılması için 100 μ L durdurma çözeltisi kuyucuklara ilave edilmiştir. 450 nm ve 570 nm' de verdikleri absorbans plaka okuyucuda ölçülmüştür.

3.2.15 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin Kaspaz-8 Düzeylerinin Belirlenmesi

1 pM ve 1 nM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin kaspaz-8 düzeyleri ab119507–kaspaz-8 Human ELISA Kit ile belirlenmiştir. 20 ng/ml ana standart solüsyonundan seyreltilerek diğer standart tüpler hazırlanmıştır. Plakalardaki her kuyucuk iki kez 400 μ L 1X yıkama tamponu ile yıkanmıştır. 100 μ L standart çözeltisi ve 50 μ L örnek ve örnek seyreltme çözeltisi uygun kuyucuklara eklenmiştir. 50 μ L 1X Deteksiyon Antikoru her kuyucuğa eklenmiş oda sıcaklığında iki saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda plaka üç kez yıkanmıştır. 100 μ L 1X anti-rabbit-IgG-HRP her kuyucuğa ilave edilmiştir. Mikropilaya yapışkan bir film ile kaplanıp oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 100 μ l TMB substrat solüsyonu her kuyucuğa pipetlenmiştir. 15 dakika süresince oda sıcaklığındaki inkübasyon süresi

sonucunda enzim reaksiyonu 100µL durdurma çözeltisi ile durdurulmuştur. Her kuyucuğun 450 nm’de absorbans değerleri mikropilaka okuyucu ile belirlenmiştir.

3.2.16 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin Tali Görüntülü Hücre Sitometresi ile Değerlendirilmesi

1 pM ve 1 nM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin % hücre popülasyonunu apoptotik ve nekrotik olarak belirlenebilmesi amacıyla Tali® Apoptosis Kit- Annexin V Fluor 488 and PI (propidium iyodür) kiti ile Tali(TM) Görüntü Bazlı Sitometre cihazı kullanılmıştır. Tali sitometresi, apoptoz ve hücre canlılığı deneyleri gibi süspanse hücre bazlı deneyleri yapabilme imkanı sunan otomatik olarak görüntü analizini dijital görüntü bazlı hücre sayımı ve floresans deteksiyon algoritmi işlemleriyle gerçekleştirebilen bir cihazdır (188).

Sağlıklı hücrelerde plazma membranı iç ve dış kısmında asimetrik olarak konumlanan lipitlerden oluşmaktadır. Bu lipitlerden fosfatidilserin (PS) ise plazma membranının iç kısmında bulunup hücre sitoplazmasında görünmektedir. Apoptoz esnasında lipid asimetrisi bozulup PS plazma membranının dış kısmına doğru çıkabilmektedir. Annexin V PS'lere bağlanan, 36-kDa molekül ağırlığında kalsiyum bağlayıcı bir proteindir. Böylece apoptotik hücrelerin dış kısmında görülen PS'lerin belirlenmesinde Annexin V kullanılabilir. Nekrotik hücrelerin membran bütünlüğünün bozulması sonucu Annexin V hücre içerisine geçebilmekte apoptotik hücreler gibi nekrotik hücreleri de boyayabilmektedir. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin ayırt edilebilmesi amacıyla nekrotik hücrelere girip apoptotik hücrelere girmeyen propidium iyodür (PI) ile boyama yapılmıştır (198).

SH-SY5Y hücreleri her kuyucukta 100.000 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu petri kaplarına ekilmiştir ve DMEM besiyeri ortamında çoğaltılmıştır. SH-SY5Y hücreleri petri tabanına tutunmaları için 24 saat süre ile 37°C ve %5 lik CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Sonrasında kuyucuklara artan konsantrasyonlarda (1 pM – 1 µM) BPA ve/veya DMSO’da çözünmüş 50 µM Nekrostatin 1 uygulaması yapılmıştır. Petrilere 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24,48 saat sonunda 100 µL örnekler toplanmış ve santrifüj edilmiştir. Elde edilen örnekler 100 µL annexin bağlayıcı tampon ile tekrardan çözülmüş ve 5 µL Annexin V (conjugated whit Alexa Fluor® 488) eklenmiştir. Sonrasında örnekler oda sıcaklığında karanlık bir yerde 20 dakika

bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örnekler tekrardan 100 µL annexin bağlayıcı tamponda çözünmüş 1 µL Propodyum İyodür (PI) eklenip oda sıcaklığında ışıktan korunacak şekilde 1–4 dakika bekletilmiştir. Analiz işlemi için Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD'ında Prof.Dr. Mustafa ARK'ın araştırma laboratuvarında bulunan Tali® Görüntü Bazlı Sitometre cihazı kullanılmıştır.

3.2.17 İstatiksel Değerlendirme

Bu tez kapsamında yapılmış olan MTT sitotoksisite deneyi, Nitrik Oksit (NO) düzeyinin Griess yöntemiyle ölçülmesi deneyi, Laktat Dehidrogenaz (LDH) deneyi, Kantitatif eş zamanlı PCR yöntemi ile gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi deneyi, düşük doz BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin spesifik AChE aktivitelerinin belirlenmesi, TNF- α düzeylerinin ve Kaspaz-8 düzeylerinin belirlenmesi, hücre popülasyonlarının belirlenmesi deneyi verileri istatistiksel anlamda değerlendirilirken Graphpad Prism 5 programı kullanılmıştır. Kontrol grubu ile örnek grupları arasındaki anlamlı bir farklılığın var olup olmadığı two-way Anova testi ve korelasyon testi ile anlaşılmaya çalışılmış, $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 SH-SY5Y Hücrelerinin Işık Mikroskopuyla Elde Edilen Görüntüsü

SH-SY5Y hücreleri, gereçler ve yöntemler başlığı altında anlatılan şekliyle pasajlanmış ve kültür kaplarına ekimi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonrasında hücrelerin canlılık durumları, ışık mikroskobu altında incelenmiştir. SH-SY5Y hücreleri ekim sonrası 2-3 gün içinde tutunup çoğalmaya başlamakta, hücrelerinin % 90 doluluk oranına ulaşması yaklaşık 4-5 gün içerisinde gerçekleşmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 SH-SY5Y hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (10x büyütme).

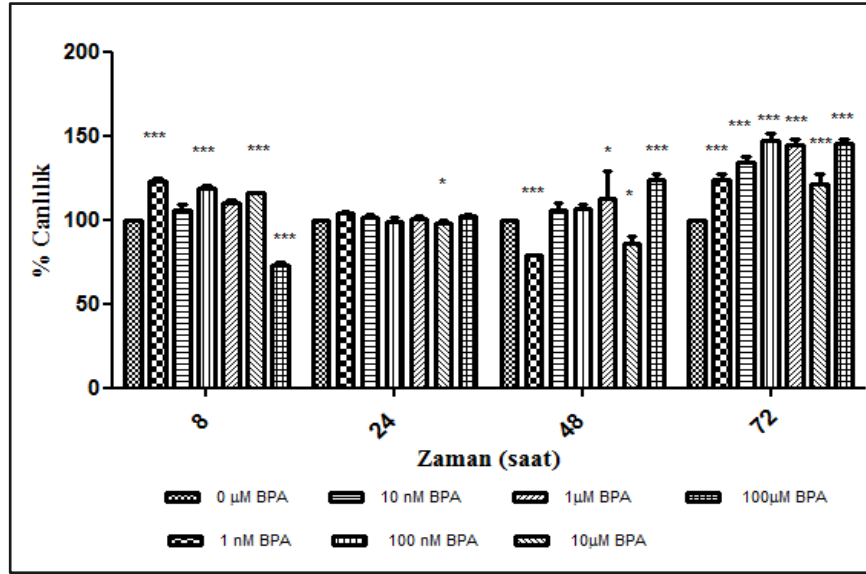
4.2 BPA'nın SH-SY5Y Hücrelerinde Sitotoksik Etkisi

4.2.1 Mtt Sitotoksikite Deneyi

Değişik derişimlerdeki (0 μ M- 100 μ M) BPA'ya 8, 24, 48, 72 saat boyunca maruz bırakılan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin canlılık yüzdeleri n=8 tekrar deneyle hesaplanmış, değerlendirilen veriler Tablo 4.1'de verilerden elde edilen grafik ise Şekil 4.2'de sunulmuştur.

Tablo 4.1 Artan derişimlerde BPA (0-100 µM) uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde yapılan farklı saatlerdeki yüzde canlılık verileri (* p<0,05, ***p<0,001).

DERİŞİM BPA	8 saat %Canlılık	24 saat %Canlılık	48 saat %Canlılık	72 saat %Canlılık
0	100,00	100,00	100,0	100
1 nM	125,8*** ± 3,4	104,0 ± 3,4	79*** ± 12,6	123,7*** ± 7,9
10 nM	105,8 ± 10,1	102,0 ± 3,9	106,0 ± 11,5	134,4*** ± 8,6
100 nM	118,6*** ± 4,2	99,2 ± 7,8	107,1 ± 5,6	147,5*** ± 10,3
1 µM	110,2 ± 6,1	100,4 ± 4,9	129,4* ± 0,4	144,7*** ± 9,5
10 µM	116,0*** ± 1,6	98,0 ± 4,8	85,9* ± 9,4	117,6*** ± 12,2
100 µM	73,1*** ± 5,7	102,5 ± 3,0	124,5*** ± 6,5	145,4*** ± 8,4



Şekil 4.2 Artan derişimlerde BPA (0-100 µM) uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde farklı saatlerdeki yüzde canlılık grafiği (*p<0,05; *** p<0,001).

Artan derişimlerde BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde yapılan MTT sitotoksosite deneyinin farklı saatlerdeki yüzde canlılık verileri incelendiğinde 8 saat süresince 1 nM, 100 nM, 10 µM BPA uygulaması canlılık yüzdesinde kontrol grubuyla

kıyasla anlamlı bir artışa yol açarken; 100 μ M BPA uygulamasının canlılık yüzdesini anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir (**p<0,001).

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin canlılık yüzdelerinde 24 saat süresince artan derişimlerde BPA uygulaması ile belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir.

48 saat boyunca 1 nM, 1 μ M ve 100 μ M derişimlerde uygulanan BPA, hücrelerin canlılık yüzdesinde anlamlı bir artışa yol açmıştır (sırayla * p<0,05; *p<0,05; **p<0,001). Aynı saat dilimindeki 10 μ M BPA uygulamasının hücrelerin canlılık yüzdesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür. 1 μ M ve 100 μ M düzeydeki her üç derişimdeki BPA'nın hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açtığı bulunmuştur (**p<0,001) .

72 saat boyunca uygulanan artan derişimlerdeki BPA'nın hücrelerin canlılık yüzdesi değerlerini her derişimde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir (**p<0,001). Canlılık yüzdesi değerlerindeki en yüksek artışın ise 100 nM BPA uygulaması ile olduğu kaydedilmiştir.

4.3 SH-SY5Y Hücrelerinde nNOS Gen Ekspresyon Düzeyi Sonuçları

Kontrol grubu ve 48 saat süresince artan dozda (1 pM, 1 nM) BPA uygulanmış olan SH-SY5Y hücrelerinde nNOS geninin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla n=4 deney tekrarı ile yapılan RT-PCR işlemi sonucu elde edilmiş veriler, gen ekspresyonu sabit olduğundan kontrol geni olarak seçilen GAPDH genine göre normalize edilmiş olup Tablo 4.2'de sunulmuştur. Elde edilen grafik ise Şekil 4.3'de görülmektedir.

Tablo 4.2 1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde nNOS gen ekspresyon düzeyi sonuçları.

	nNOS
Kontrol	1
1 pM BPA	1,1 \pm 0,2
1 nM BPA	1,0 \pm 0,4

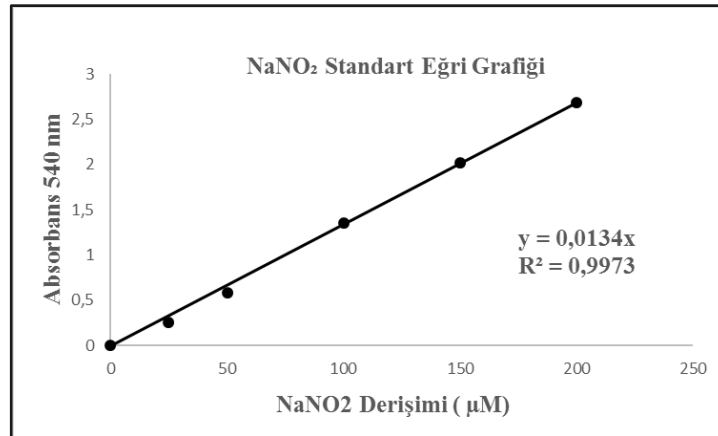


Şekil 4.3 1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerindeki nNOS gen ekspresyon düzeyi sonuçları.

48 saat süresince BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerindeki nNOS gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

4.4 Nitrik Oksit (NO) Düzeyinin Griess Yöntemiyle Ölçüm Sonuçları

Önceden artan derişimlerde hazırlanmış NaNO_2 solüsyonu ile (25 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM) Griess yöntemi ile nitrit ölçümü yapılmış ve Şekil 4.4'de görülen standart eğri elde edilmiştir.



Şekil 4.4 NaNO_2 için elde edilen standart eğri grafiği.

Griess yöntemiyle n=8 tekrar deneyiyle ölçülen artan derişimlerde (0-100 μM) BPA uygulanmış hücrelerin NO düzeyleri $\mu\text{g/ml}$ cinsinden Tablo 4.3’de verilmiştir.

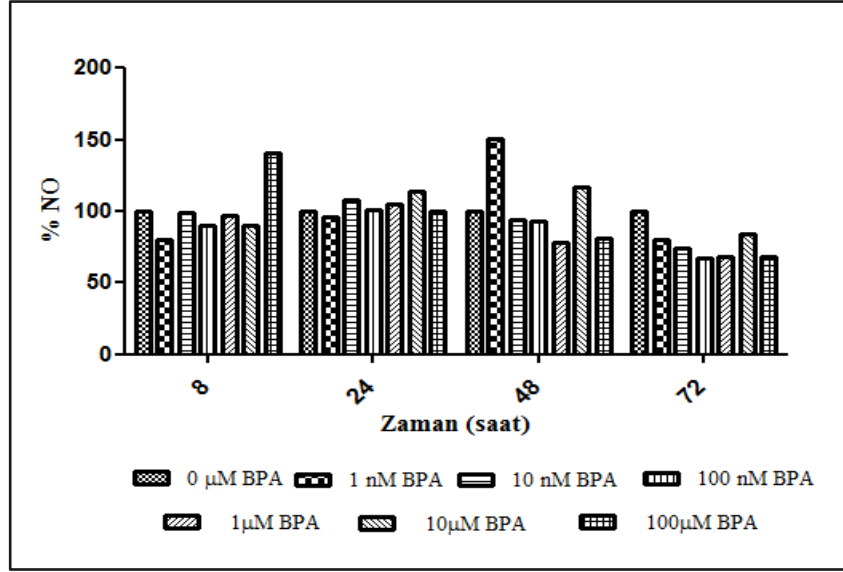
Tablo 4.3 Artan derişimlerde (0-100 μM) BPA uygulanmış hücrelerin NO derişimleri ($\mu\text{g/ml}$).

Zaman	8 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
BPA Derişim	NO ($\mu\text{g/ml}$)	NO ($\mu\text{g/ml}$)	NO ($\mu\text{g/ml}$)	NO ($\mu\text{g/ml}$)
0	7,49	3,97	3,97	4,00
1 nM	7,56	3,97	3,98	3,98
10 nM	7,82	4,25	3,97	3,97
100 nM	7,99	3,97	3,96	3,97
1 μM	7,98	4,17	3,97	3,97
10 μM	7,81	4,72	3,97	3,97
100 μM	7,71	4,22	3,96	3,97

Tablo 4.3’ de belirtilen veriler ($\mu\text{g/ml}$) hücre sayısına göre normalize edilerek %NO şeklinde Tablo 4.4’ de sunulmuştur. Verilerle elde edilmiş grafik ise Şekil 4.5’ te görülmektedir.

Tablo 4.4 Artan derişimlerde BPA (0-100 μM) uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin Griess yöntemiyle elde edilmiş % NO verileri.

ZAMAN	8 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
BPA DERİŞİM (μM)	%NO	%NO	%NO	%NO
0	100,0 \pm 0,003	100,0 \pm 0,001	100,0 \pm 0,006	100,0 \pm 0,062
1 nM	80,2 \pm 0,002	96,2 \pm 0,003	150,1 \pm 0,01	80,3 \pm 0,009
10 nM	98,7 \pm 0,003	107,6 \pm 0,043	94,1 \pm 0,003	73,8 \pm 0,011
100 nM	90,0 \pm 0,008	101,0 \pm 0,007	93,3 \pm 0,002	67,2 \pm 0,007
1 μM	96,7 \pm 0,009	104,6 \pm 0,228	78,5 \pm 0,005	68,5 \pm 0,008
10 μM	89,9 \pm 0,004	113,4 \pm 0,051	116,7 \pm 0,006	84,3 \pm 0,007
100 μM	140,9 \pm 0,003	100,0 \pm 0,047	80,8 \pm 0,004	68,2 \pm 0,003



Şekil 4.5 Farklı saatlerde artan derişimlerde BPA (0-100 μM) uygulanmış SH-SY5Y hücrelerindeki % NO düzey grafiği.

Artan derişimlerde BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin Griess yöntemiyle elde edilen %NO düzeyleri değerlendirildiğinde, 8 saat süresince 100 μM BPA uygulamasının %NO düzeyini arttırdığı gözlemlenmiştir. Gözlenmiş olan bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Diğer dozlardaki BPA uygulaması hücrelerin %NO düzeylerinde azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir. Bu azalışın da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı kaydedilmiştir.

Hücrelere 24 saat süresince 10 nM, 100 nM, 1 μM ve 10 μM BPA uygulanmasıyla hücrelerdeki % NO miktarında artış gözlenmiştir. 24 saat süresince 1 nM BPA uygulaması ile SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki % NO miktarında ise azalış gözlenmiştir. Hücrelerdeki % NO değerindeki bu artışın ve azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

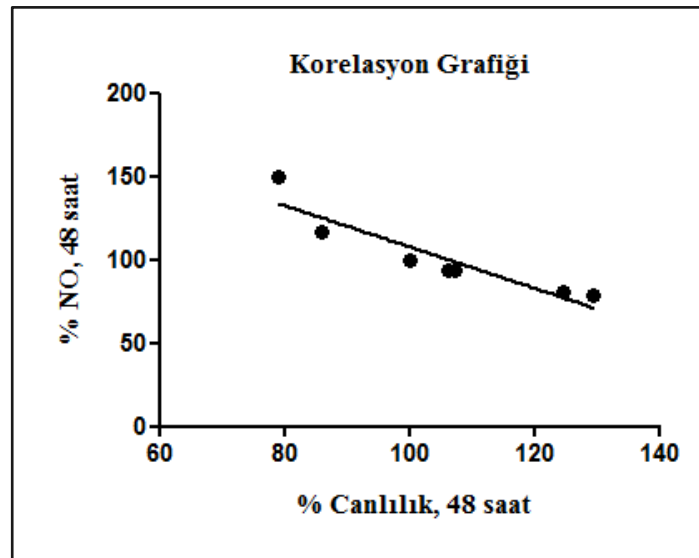
SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki % NO düzeyinde 48 saat süresince uygulanan 1 nM 100 μM BPA ile artış görülürken uygulanan diğer BPA derişimlerinin hücrelerdeki % NO düzeyinde azalışa neden olduğu görülmüştür. Hücrelerin % NO düzeyindeki bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı 2 way ANOVA testi ile belirlenmiştir.

Hücelere 72 saat boyunca artan derişimlerde (10 nM-100 µM) uygulanan BPA'nın istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte hücelerin % NO düzeyinde azalışa yol açtığı belirlenmiştir.

MTT sitotoksisite deneyi ile elde edilen % canlılık verileri ile Griess yöntemiyle ölçülen % NO düzeyleri birlikte değerlendirilmiş olup veriler Tablo 4.5'de sunulmuştur. Verilerle elde edilen korelasyon grafiği ise Şekil 4.6'de görülmektedir.

Tablo 4.5 MTT sitotoksisite deney sonuçları ve Griess yöntemiyle elde edilmiş %NO verilerinin birlikte değerlendirilmesi (*p<0,05; ***p<0,001).

Zaman BPA Derişim	8 saat		24 saat		48 saat		72 saat	
	% Canlılık	%NO	%Canlılık	%NO	% Canlılık	%NO	% Canlılık	%NO
0	100	100,0	100,00	100,0	100,0	100,0	100	100,0
1 nM	125,8***	80,2	104,0	96,2	79***	150,1	123,7***	80,3
10 nM	105,8	98,7	102,0	107,6	106,0	94,1	134,4***	73,8
100 nM	118,6***	90,0	99,2	101,0	107,1	93,3	147,5***	67,2
1 µM	110,2	96,7	100,4	104,6	129,4*	78,5	144,7***	68,5
10 µM	116,0***	89,9	98,0	113,4	85,9*	116,7	117,6***	84,3
100 µM	73,1***	140,9	102,5	100,0	124,5***	80,8	145,4***	68,2



Şekil 4.6 Artan derişimlerde BPA (0-100 µM) uygulanmış SH-SY5Y hücelerinde % canlılık sonuçları ile % NO değerleri korelasyon grafiği ($R^2=0,8549$; ***p<0,001).

Sonuçlar değerlendirildiğinde SH-SY5Y hücrelerinin % canlılık değerinin azalmasına paralel olarak %NO değerinde artış belirlenmiştir. Hücrelerdeki NO miktarındaki artış sitotoksitenin de artışına yol açmıştır. SH-SY5Y hücrelerinin % canlılık ve % NO verileri değerlendirildiğinde 8,48,72 saatlik BPA uygulaması ile % canlılık ve % NO düzeyi arasında anlamlı negatif korelasyon olduğu gözlemlenmiştir (sırasıyla ** p<0,01; *** p<0,001; *** p<0,001). BPA'nın 72 saat süresince hücrelere uygulanmasıyla canlılık yüzdesinde artış görülmüştür. Bunun sebebinin BPA'nın hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin azalmış olabileceği düşünülmüştür. Diğer bir sebep olarak BPA'nın 72 saat süresince metabolize olması sonucu etkisinin azalması olabileceği düşünülmüştür. Fluorometrik ölçümlerle (EX:280, EM:310) BPA'nın metabolize olup olmadığı anlaşılmaya çalışılmıştır. BPA'nın miktarında belirgin değişiklik görülmemiştir.

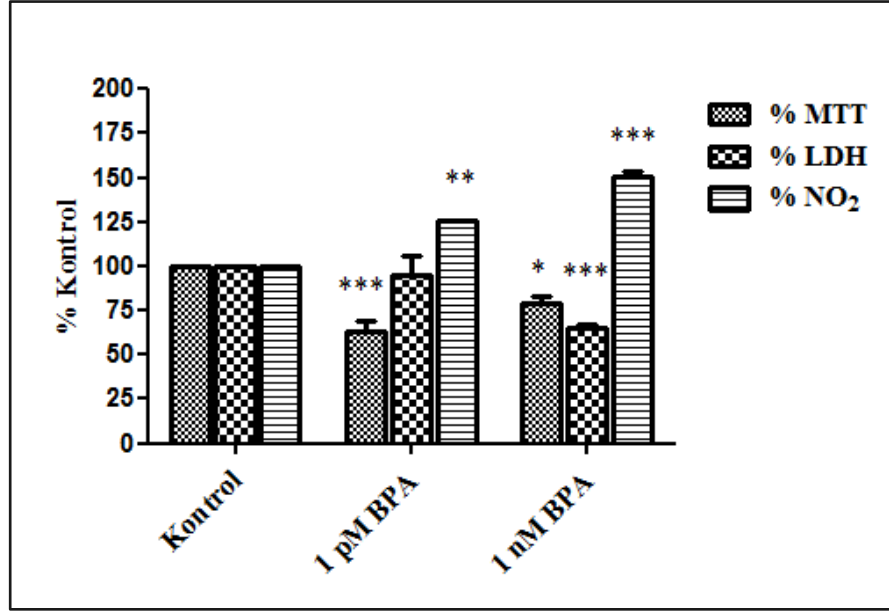
Bu sonuçların değerlendirilmesi sonucunda BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etki nanomolar düzeyde belirlenmiştir. Daha yüksek dozlarda sitotoksik etki gözlemlenmediğinden deneylere 1 nM ve 1 pM BPA dozları ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.5 Laktat Dehidrogenaz (LDH) Deneyi

Hücrelerdeki sitotoksik cevabı membran bütünlüğünün bozulması üzerinden değerlendirebilmek için Laktat Dehidrogenaz deneyi yapılmıştır. 48 saat süresince düşük doz (1 pM, 1 nM BPA) uygulaması sonucunda elde edilen % LDH verileriyle hücrelere ait olan % Mit. Redüksiyon ile % NO değerleri hesaplanıp birlikte değerlendirilmiştir. 3 deney tekrarı ile elde edilen sonuçlar Tablo 4.6'de, verilerle düzenlenen grafik ise Şekil 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.6 48 saat süresince 1 pM ve 1 nM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin % MTT, % LDH ve % NO değerleri (* p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

48 SAAT	% MTT	% LDH	%NO
Kontrol	100	100	100
1 pM BPA	62,9 *** ± 9,91	95,3 ± 18,53	126,1 ** ± 0,18
1 nM BPA	79,0* ± 6,92	64,9*** ± 3,06	150,1*** ± 6,23



Şekil 4.7 48 saat süresince düşük doz (1 pM ve 1 nM) BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin % MTT , % LDH ve % NO değerlerinin karşılaştırma grafiği (*p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001).

Şekil 4.7’de görüldüğü üzere 1 pM ve 1 nM BPA uygulaması % MTT değerini sırasıyla %62.9’e ve %79’a istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (sırasıyla *** p<0,001; *p<0,05). LDH deneyinin sonuçları incelendiğinde ise sadece 1 nM BPA uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı şekilde %65.5’e kadar düştüğü belirlenmiştir (***p<0,001). Hücrelerin %NO verilerinde ise kontrol grubuna göre 1 pM ve 1 nM BPA uygulanmasıyla belirgin ve anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür (n = 3; sırayla **p<0,01; ***p<0,001).

4.6 SH-SY5Y Hücrelerinden Elde Edilen RNA Örnekleri ile İlgili Sonuçlar

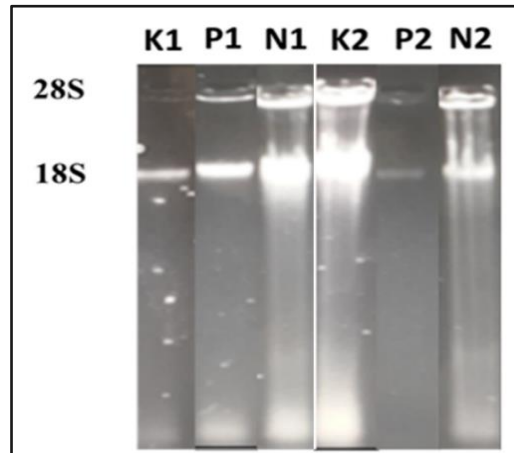
RNA miktar tayini için, her bir örnekten saflaştırılan RNA örneklerinin saflık derecesi hesaplanmıştır. A₂₆₀ değeri, seyreltme faktörüyle ve sonrasında 260 nm’de 1 absorbans değeri veren saf RNA miktarının 40 µg/mL olduğu kabul edilerek 40 ile çarpılmış ve toplam RNA miktarı hesaplanmıştır (Tablo 4.7).

Tablo 4.7 SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen RNA örneklerinin saflığı ve miktarı (K:Kontrol grubu, P: 1 pM BPA uygulanmış hücre grubu, N: 1 nM BPA uygulanmış hücre grubu).

SH-SY5Y Örnekleri	Total RNA Derişimi ($\mu\text{g/ml}$ RNA)	(A_{260}/A_{280})
K1	492	1,3
K2	576	1,7
K3	328	1,46
P1	664	1,5
P2	448	1,47
P3	348	1,47
N1	1328	1,12
N2	1208	1,31
N3	1180	1,38

4.7 SH-SY5Y Hücrelerinden Elde Edilen RNA Örneklerinin Jel Görüntüleri

SH-SY5Y hücrelerinden saflaştırılan total RNA (40 μg) örnekleri % 1'lik agaroz jeldeki yüklenmiştir. Örnekler 30 dakika süre ile 100 V'da yürütülmüş ve görüntüsü UV altında alınarak kaydedilmiş ve Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8 Hücrelerden saflaştırılan total RNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri.

Şekil 4.8’de; K1,K2 BPA uygulaması yapılmamış kontrol grubu; P1, P2 1 pM BPA uygulaması yapılmış örnek grubu; N1, N2 1 nM BPA uygulaması yapılmış örnek grubu SH-SY5Y hücrelerinden saflaştırılan RNA örneklerinin jel görüntülerini temsil etmektedir.

4.8 SH-SY5Y Hücrelerinden Saflaştırılan RNA’lardan Oluşturulmuş cDNA’lerin Miktar ve Saflık Tayini

Elde edilen cDNA’lar -20°C ’de muhafaza edilmiş olup cDNA’ların miktarı ve saflığı Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi İlaç ve Kozmetik Ar-Ge ve Kalite Kontrol Laboratuvarı bünyesinde bulunan Shimadzu Biospec Nano spektrofotometre cihazı aracılığıyla belirlenmiş ve Tablo 4.8’de sunulmuştur.

Tablo 4.8 SH-SY5Y hücrelerinden saflaştırılan RNA’lardan oluşturulmuş cDNA’lerin miktar ve saflık tayini sonuçları (K:Kontrol grubu, P: 1 pM BPA uygulanmış hücre grubu, N: 1 nM BPA uygulanmış hücre grubu).

RNA Örnekleri	cDNA $\mu\text{g/ml}$	A_{260}/A_{280}
K1	1172,5	1,77
K2	624,6	1,77
K3	657,5	1,79
P1	797,5	1,79
P2	674,2	1,79
P3	690,4	1,79
N1	756	1,81
N2	589,5	1,73
N3	776	1,8

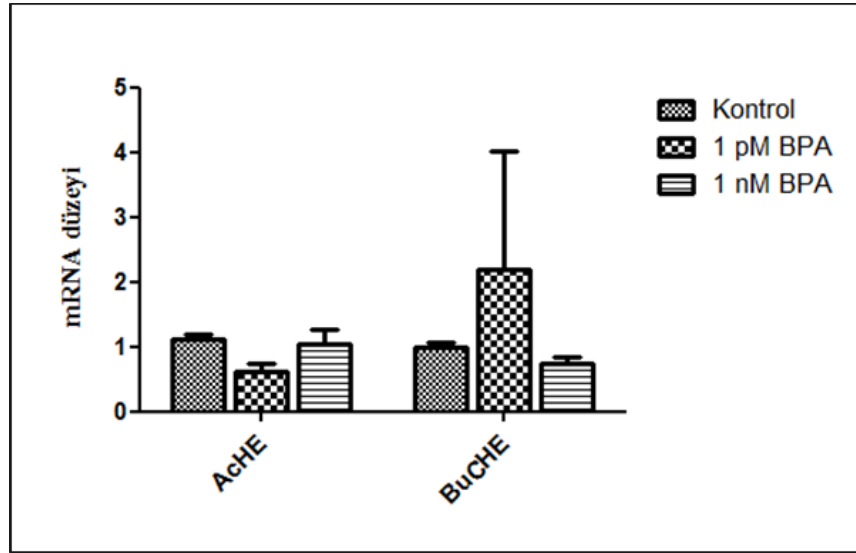
4.9 SH-SY5Y Hücrelerinde AChE ve BuChE Genlerinin Ekspresyon Düzeyi Sonuçları

Kontrol grubu ve 48 saat süresince artan dozda (1 pM, 1 nM) BPA uygulanmış olan SH-SY5Y hücrelerinde AChE ve BuChE genlerinin ekspresyon düzeylerinin

belirlenmesi amacıyla n=4 tekrar şeklinde yapılan RT-PCR işlemi sonucu elde edilmiş veriler, gen ekspresyonu sabit olduğundan kontrol geni olarak seçilen GAPDH genine göre normalize edilmiş olup Tablo 4.9’da sunulmuştur. Bu verilerle hazırlanan grafik Şekil 4.9’da görülmektedir. Bu yöntemde, mRNA’dan ters transkripsiyon ile elde edilen cDNA, florokromlu bir prob varlığında araştırılan gene özgü primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilmekte ve oluşan sinyal PCR işlemi esnasında ölçülmektedir. Bu yöntemde çeşitli örneklerden izole edilen RNA’ların tam olarak karşılaştırılabilmesi için kontrol genine (GAPDH) karşı normalizasyonu yapılmaktadır.

Tablo 4.9 48 saat süresince 1 pM ve 1 nM BPA uygulanmış olan SH-SY5Y hücrelerinde AChE ve BuChE genlerinin ekspresyon düzeyleri.

	AChE	BuChE
Kontrol	1	1
1 p M BPA	0,61 ± 0,22	2,18 ± 3,18
1 n M BPA	1,03 ± 0,47	0,73 ± 0,23



Şekil 4.9 1 pM ve 1 nM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde AChE ve BuChE genlerinin ekspresyon düzeyleri grafiği.

1 pM ve 1 nM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde AChE geninin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde 48 saat süresince 1 pM BPA’ya maruz bırakılmış

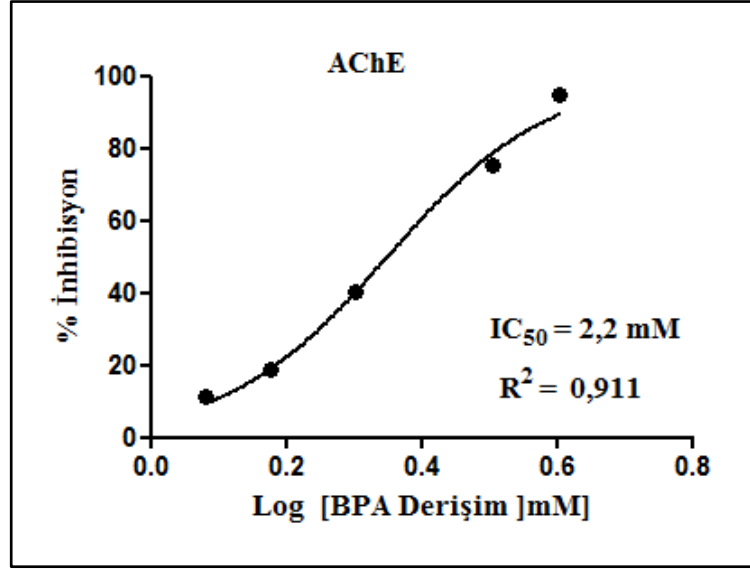
SH-SY5Y hücrelerindeki AChE gen ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla belirgin bir azalış belirlenmiştir. 1 nM düzeyde BPA uygulanmış hücrelerdeki AChE gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre az da olsa bir artış gözlenmiştir.

1 pM ve 1 nM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde BuChE genlerinin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde ise 1 pM BPA uygulamasının BuChE geni ekspresyon düzeyini kontrol grubuna kıyasla arttırdığı belirlenmiştir. SH-SY5Y hücrelerine 1 nM BPA uygulaması yapıldığında ise BuChE gen ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığı fark edilmiştir. Her iki gen çerçevesinde değerlendirme yapıldığında 1 nM BPA, BuChE gen ekspresyon düzeyinin de azalmasına yol açarken, AChE gen ekspresyon düzeyinde değişikliğe yol açmamıştır. Pikomolar düzeyde uygulanan BPA'nın SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki AChE gen ekspresyon düzeyinde azalışa yol açarken, BuChE gen ekspresyon düzeyinde ise istatistiksel anlamlı olmayan artışa sebebiyet verdiği ortaya konmuştur.

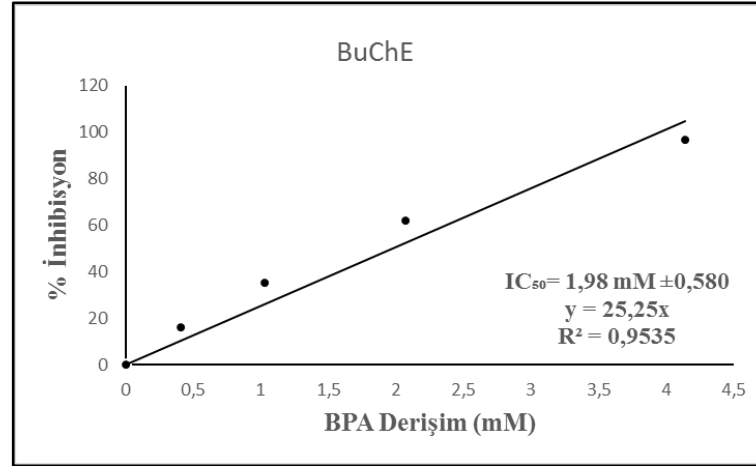
4.1BPA'nın AChE ve BuChE Enzimleri için IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Aktivite tayini çalışmaları sonucunda BPA'nın kolinesteraz enzim aktivitesi üzerinde zayıf inhibitör etkisinin olduğu Ellman yöntemiyle belirlenmiştir. AChE enzimi için BPA'nın derişimine karşı % inhibisyon grafiği Şekil 4.10'da sunulmuştur. BPA'nın BuChE enzimini inhibisyon grafiği ise Şekil 4.11'de görülmektedir.

BPA'nın AChE enzimi için IC₅₀ değeri 2,22 mM ± 0,290 (R² = 0,991) olarak BuChE enzimi için IC₅₀ değeri ise 1,98 mM ± 0,580 (R² = 0,9584) olarak Graphpad Prism 5 program analizi ile hesaplanmıştır.



Şekil 4.10 BPA'nın AChE enzimine ait inhibisyon grafiği.



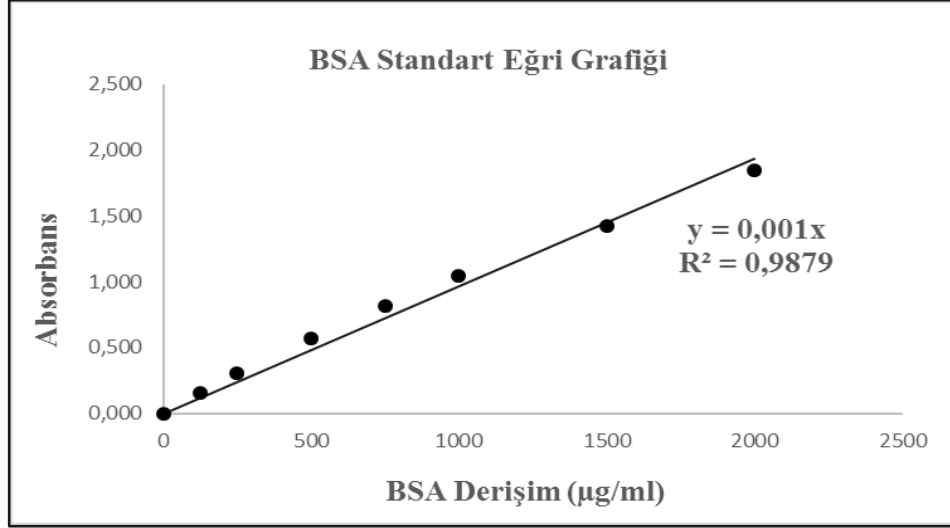
Şekil 4.11 BPA'nın BuChE enzimine ait inhibisyon grafiği.

4.2 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin Spesifik AChE Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.2.1 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücre Örneklerindeki Protein Miktarının belirlenmesi

Örneklerdeki protein derişiminin belirlenmesi için BCA tayini yapılmıştır. BCA tayini için 2mg/ml derişiminde stok sığır serum albümin (BSA) ile hazırlanan 8

farklı derişimdeki BSA solüsyonları yardımıyla elde edilen standart eğri grafiği Şekil 4.12’de sunulmuştur.



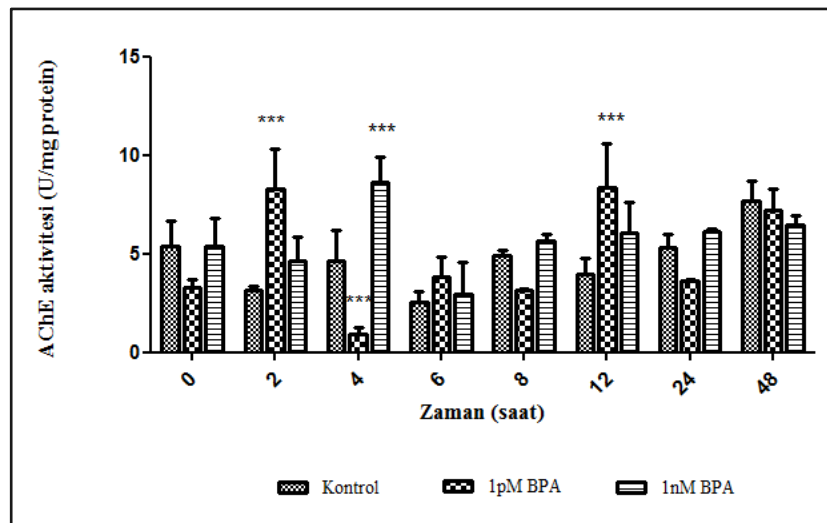
Şekil 4.12 BSA için elde edilen standart eğri grafiği.

4.2.2 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücre Örneklerindeki Spesifik AChE Aktivitelerinin Belirlenmesi

1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin spesifik AChE spesifik aktivite değerleri her örnek için n=4 tekrar şeklinde elde edilen aktivite değerlerinin, örnekteki protein miktarına oranlanmasıyla U/mg birimiyle hesaplanmış ve Tablo 4.10’de verilmiştir. Deney ortamına son derişimi 100 µM olacak şekilde isotetramonoisopropilpirofosfattetramid (iso-OMPA) eklenmiştir. Iso-OMPA selektif BuChE enzim inhibitörüdür. Deney ortamındaki iso-OMPA varlığıyla yalnızca AChE enzimine ait spesifik aktiviteyi belirlemek mümkün olabilmektedir. Deney verileriyle elde edilen düşük doz BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin spesifik AChE spesifik aktivite sonuçları grafiği ise Şekil 4.13’de sunulmuştur (n=4; ***p<0,001).

Tablo 4.10 1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin ortalama spesifik AChE aktivite verileri (U/mg protein).

Saat	Kontrol	1 pM BPA	1 nM BPA
0	5,4 ± 1,3	3,3 ± 0,5	5,4 ± 1,4
2	3,2 ± 0,2	8,3 ± 2,0 ***	4,7 ± 1,2
4	4,6 ± 1,6	0,9 ± 0,3***	8,7 ± 1,3***
6	2,5 ± 0,5	3,8 ± 1,0	3,0 ± 1,6
8	4,9 ± 0,3	3,1 ± 0,1	5,7 ± 0,3
12	4,0 ± 0,8	8,4 ± 2,2 ***	6,1 ± 1,6
24	5,3 ± 0,7	3,7 ± 0,1	6,2 ± 0,1
48	7,7 ± 1,0	7,2 ± 1,1	6,5 ± 0,5



Şekil 4.13 Düşük doz BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin spesifik AChE enzimi aktivite sonuç grafiği (U/mg protein) (**p<0,001).

Hücrelerde 2 saat boyunca 1 pM ve 1 nM BPA uygulanması sonucu gözlenen spesifik AChE aktivitesinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği saptanmıştır. Bu artış pikomolar düzeyde istatistiksel olarak anlamlı iken nanomolar düzeyde anlamlı bir değişiklik değildir (**p<0,001).

Diğer taraftan 4 saatlik 1 pM BPA uygulaması sonucu kontrol grubuna göre değerlendirilme yapıldığında spesifik AChE enzim aktivitesinin anlamlı şekilde

azaldığı ortaya çıkmaktadır (**p<0,001). 1 n M BPA uygulaması sonucunda ise spesifik AChE enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (**p<0,001).

12 saat süresince hücelere 1 pM ve 1 nM BPA uygulanmasının spesifik enzim aktivitesinde artışa sebep olduğu ve bu artışın pikomolar düzeyde istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (**p<0,001).

48 saat süresince hücelere 1 pM ve 1 nM BPA uygulaması sonucu spesifik AChE enzim aktivitesinde gözlenen azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

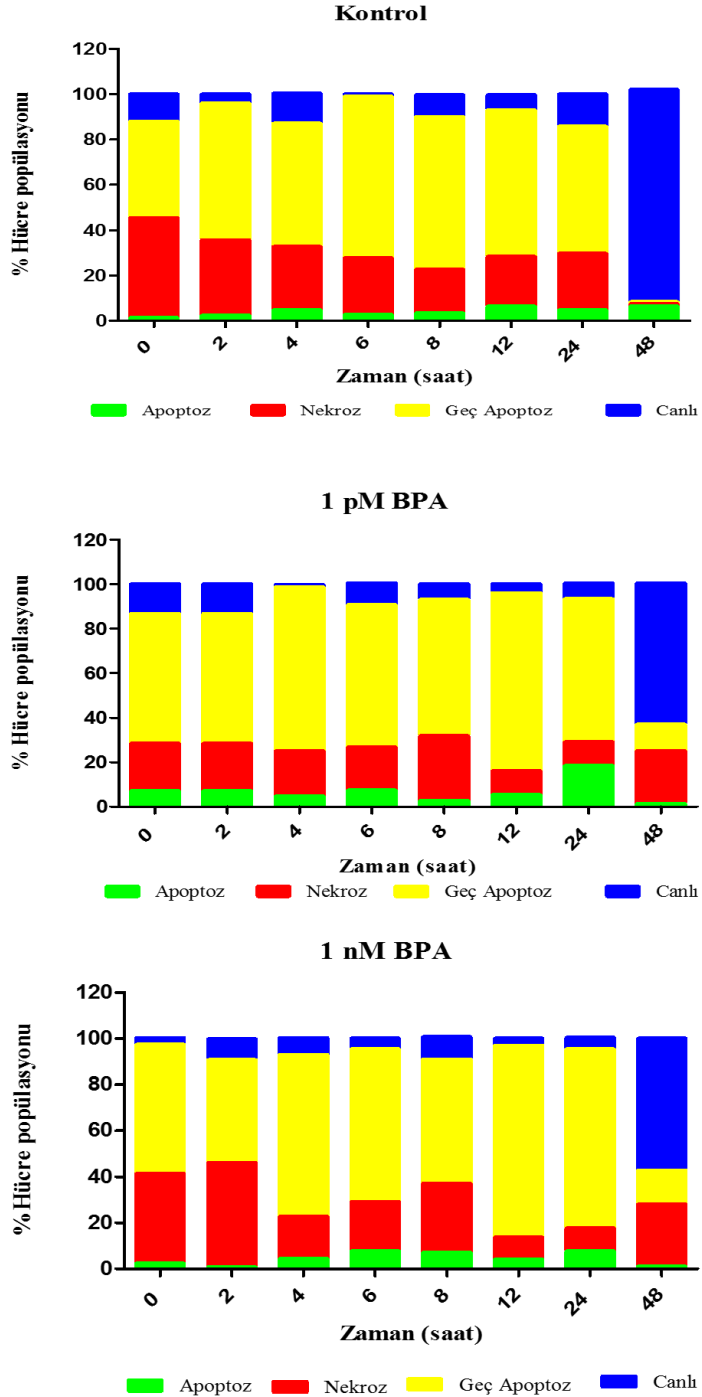
4.3 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin TALİ Görüntülü Hücre Sitometresi ile Değerlendirilmesi

1 pM ve 1 nM BPA'nın SH-SY5Y hücrelerine 0-48 saat süresince uygulanması n=3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve TALİ görüntülü hücre sitometresi ile elde edilen ve kontrol grubuna göre normalize edilen % hücre popülasyon verilerinin ortalamaları Tablo 4.11 'da sunulmuştur (**p<0,001).

Tablo 4.11 1 pM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerin TALİ görüntülü hücre sitometresi ile elde edilen apoptotik, nekrotik, geç apoptotik ve canlı % hücre popülasyon ortalama değerleri (* p<0,05; ** p<0,01; **p<0,001).

Kontrol	0 saat	2 saat	4 saat	6 saat	8 saat	12 saat	24 saat	48 saat
Apoptoz	1,3	2,3	4,7	2,7	3,3	6,3	4,7	6,3
Nekroz	44,0	33,3	28,0	25,0	19,3	22,0	25,0	1,0
Geç Apoptoz	42,7	60,3	54,3	71,3	67,3	64,7	56,0	1,0
Canlı	12,0	4,0	13,3	1,0	9,7	6,7	14,3	93,7
1 pM BPA								
Apoptoz	7,0	7,0	4,7	7,3***	2,7	5,3	18,3	1,3***
Nekroz	21,3	21,3	20,3***	19,3***	29,0	10,7	10,7	23,7***
Geç Apoptoz	58,3	58,3	73,7***	64,0***	61,3	80,0	64,3	12,0***
Canlı	13,3	13,3	1,0***	9,7***	7,0	4,0	7,0	63,3***
1 nM BPA								
Apoptoz	2,3	0,7	4,3***	7,7***	7,0	4,0*	7,7	1,0***
Nekroz	39,0	45,3	18,3***	21,3***	30,0	9,7**	10,0	27,0***
Geç Apoptoz	56,0	44,7	70,3***	66,3***	54,0	83,3	77,7	14,7***
Canlı	3,0	9,0	7,3***	4,7***	9,7	3,0**	5,0	57,3***

1 pM ve 1 nM BPA'nın 0-48 saat süresince uygulanması sonucunda TALİ görüntülü hücre sitometresiyle SH-SY5Y hücreleri değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda elde edilen verilerle hazırlanmış grafikler Şekil 4.14'de sunulmuştur.



Şekil 4.14 1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin farklı saatlerdeki apoptotik, nekrotik, geç apoptotik ve canlı % hücre popülasyon grafiği.

1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin örnek grupları ile kontrol grubunun % hücre popülasyon değerleri her saat aralığı için karşılaştırıldığında 4 saat uygulama BPA'nın geç apoptoza uğrayan % hücre popülasyonunda anlamlı bir artışa yol açtığı gözlenmiştir (**p<0,001). Ayrıca nekroza giden ve canlı % hücre popülasyonunda anlamlı bir azalışa sebep olduğu belirlenmiştir (**p<0,001).

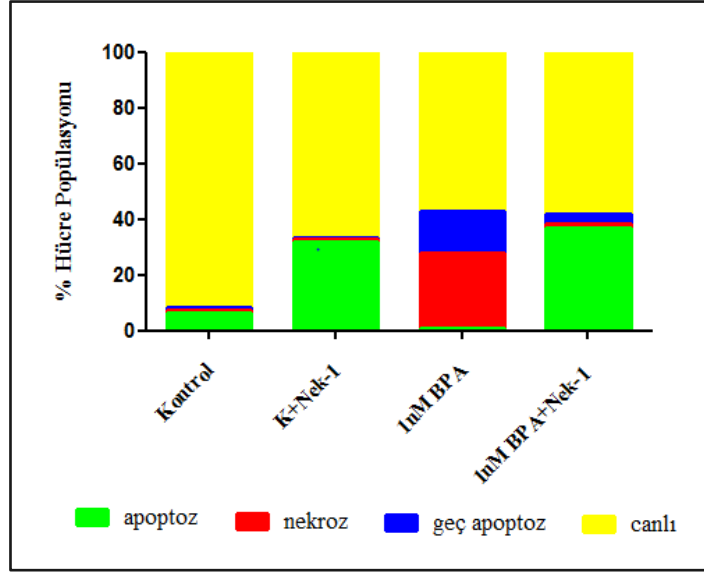
6 saat süresince 1 pM ve 1 nM BPA uygulamasının sonucunda apoptoza giden ve canlı hücre popülasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür (**p<0,001). Nekroza giden ve geç apoptoza uğrayan hücre popülasyonunda ise anlamlı azalış kaydedilmiştir (**p<0,001).

12 saat süreyle 1 nM BPA uygulamasının apoptotik, nekrotik ve canlı hücre popülasyonunda anlamlı bir azalışa (sırayla *p<0,05; **p<0,01; **p<0,01); geç apoptotik hücre popülasyonunda ise anlamlı olmayan bir artışa yol açtığı görülmüştür.

SH-SY5Y hücrelerine 48 saat boyunca 1 pM ve 1 nM BPA uygulanması sonucunda nekrotik hücre popülasyonunda artış gözlemlenmiştir. Bunun üzerine görülen nekrozun programlı olup olamayacağını anlayabilmek için 50 µM RIPK1 inhibitörü Nek-1 ve 1 nM BPA varlığında Tali hücre görüntüleme cihazı ile hücre popülasyonları belirlenmiştir. Belirlenen değerler Tablo 4.12'de gösterilmiştir.

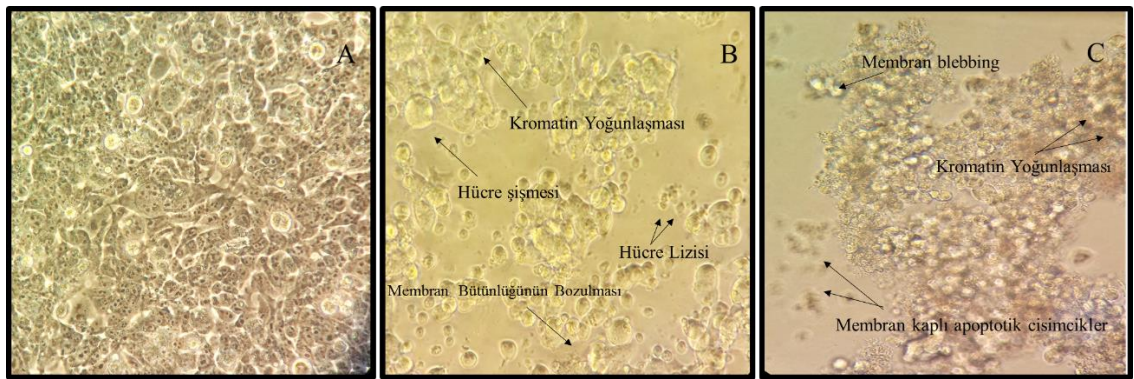
Tablo 4.12 48 saat boyunca 1 nM BPA ve Nek-1 uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin apoptotik, nekrotik, geç apoptotik ve canlı % hücre popülasyon ortalama değerleri.

% Hücre Popülasyonu			
	Kontrol +Nek-1	1 nM BPA	1 nM BPA +Nek-1
Apoptoz	21 ± 12	1 ± 4,3	37 ± 6,6
Nekroz	0 ± 0,5	27 ± 9,6	1,3 ± 2,3
Geç Apoptoz	0 ± 0,5	14,7 ± 4,6	3,7 ± 3,05
Canlı	79 ± 11	57,3 ± 6,6	58 ± 2



Şekil 4.15 48 saat boyunca 1 nM BPA ve Nek-1 uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin TALİ sitometresi ile değerlendirilme sonuçları.

Nek-1'in varlığının SHSY5Y hücrelerinde nekroptotik ölümü inhibe ederek apoptoza çevirdiği Şekil 4.15'de verilen sonuçlarda açıkça görülmektedir. 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde RIPK1 bağımlı nekroptoza yol açmakta olduğu bu verilerle açıklanır niteliktedir. 48 saat boyunca 1 nM BPA ve 50 μ M Nek-1 uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin mikroskop görüntüleri Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16 48 saat süresince BPA uygulanmamış kontrol grubu (A) 1 nM BPA uygulanmış olan (B) ve 1 nM BPA ile Nek-1 uygulanan (C) SH-SY5Y hücrelerinin mikroskop görüntüleri.

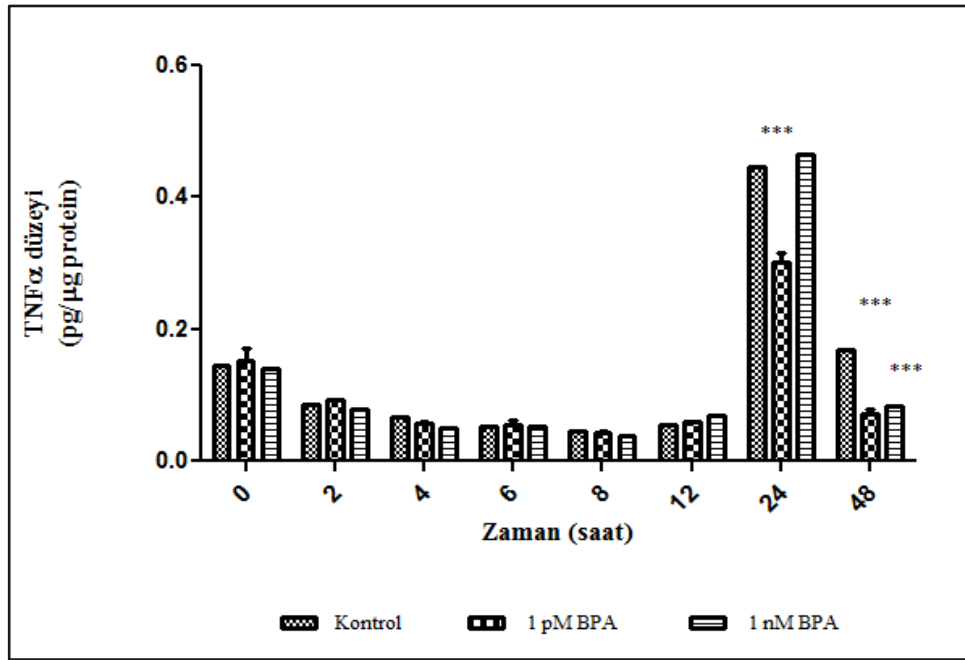
Şekil 4.16'daki B görüntüsünde görüldüğü üzere 48 saat süresince 1 nM BPA uygulanan hücre grubunda nekrozun bir göstergesi olan hücre membran bütünlüğünün bozulması, kromatin yoğunlaşması, hücresel küçülme gibi ölüm belirteçleri belirlenmiştir. 1 nM BPA ile Nek-1 uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde apoptoza özgü olan membranda blebbing oluşumu, organelleri içeren membranla kaplanmış apoptotik cisimcikler, kromatinin nükleer membran civarında toplanıp yoğunlaşması gibi ölüm belirteçleri gözlemlenmiştir.

4.4 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin TNF- α Düzeyleri

1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin TNF- α düzeyleri belirlenmesi için n=3 tekrar edilerek gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen veriler Graphpad Prism 5 program yardımıyla analiz edilmiştir. Her örnekteki TNF- α düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen TNF- α düzeyleri örnekteki protein derişimine oranlanmış ve örnekteki protein başına düşen TNF- α düzeyi pg/ μ g birimiyle hesaplanmış olup ortalama veriler Tablo 4.13'de verilmiştir. Şekil 4.17'de gösterilmiştir (n=3 , ***p<0,001).

Tablo 4.13 BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde birim protein derişimine düşen TNF- α miktarı ortalama değerleri (pg/ μ g).

TNF- α / Protein derişimi (pg/ μ g)			
Saat	Kontrol	1pM BPA	1nM BPA
0	0,14 \pm 0,010	0,15 \pm 0,017	0,14 \pm 0,008
2	0,09 \pm 0,008	0,09 \pm 0	0,08 \pm 0,008
4	0,07 \pm 0,006	0,06 \pm 0,003	0,05 \pm 0,003
6	0,05 \pm 0,001	0,05 \pm 0,007	0,05 \pm 0,007
8	0,05 \pm 0,004	0,04 \pm 0,002	0,04 \pm 0,005
12	0,06 \pm 0,003	0,06 \pm 0,001	0,07 \pm 0,004
24	0,446 \pm 0,001	0,302 \pm 0,020***	0,464 \pm 0,006
48	0,169 \pm 0,069	0,073 \pm 0,104***	0,084 \pm 0,008***



Şekil 4.17 1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin TNF- α /protein pg/ μ g düzeyleri grafiği (**p<0,001).

SH-SY5Y hücrelerinin TNF- α /protein (pg/ μ g) düzeyleri incelendiğinde 24 ve 48 saatlik 1 pM BPA uygulaması sonucu hücrelerdeki TNF- α düzeyinde azalma olduğu görülmüştür. 24 saat süresince 1 pM BPA uygulamasının hücrelerdeki TNF- α düzeyini kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı fark edilmiştir (**p<0.001). Diğer yandan 24 saat nanomolar düzeydeki BPA uygulamasının TNF- α düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

48 saat süresince düşük doz BPA' ya (1 pM, 1 nM) maruz bırakılmış hücrelerin TNF- α /protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde bir azalış belirlenmiştir (**p<0.001).

4.5 BPA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin Kaspaz-8 Düzeyleri

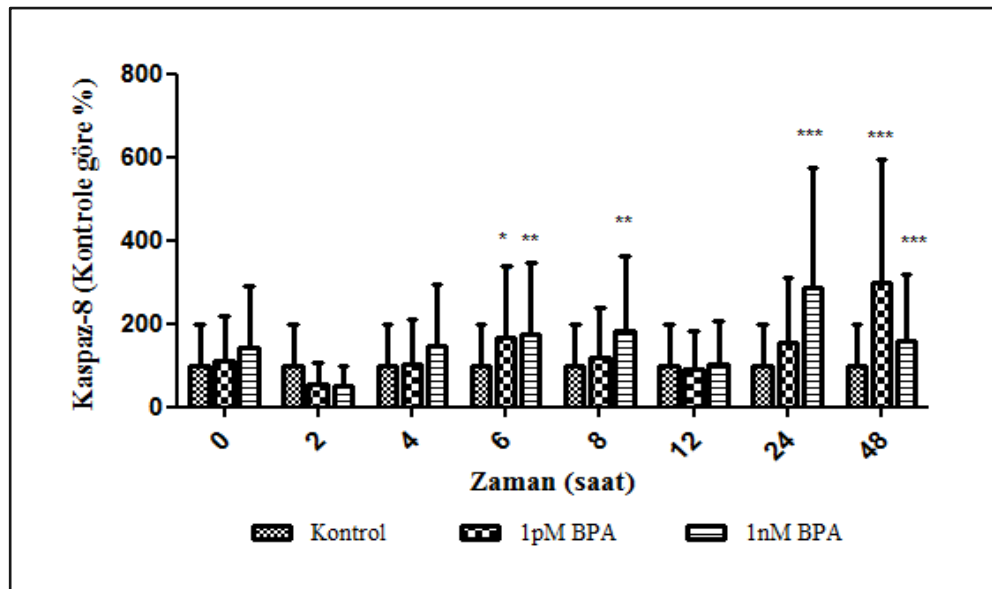
1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin kaspaz-8 düzeyleri belirlenmesi amacıyla her örnek için n=2 deney tekrarı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin düzenlenmesi ve istatistik analizi Graphpad Prism 5 program

yardımıyla yapılmıştır. 450 nm’de farklı saat dilimindeki her örnek için kaspaz-8 absorbans düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen kaspaz-8 absorbans değerleri örnekteki protein derişimine göre normalize edilerek reel Absorbans şeklinde hesaplanmış olup Tablo 4.14’de verilmiştir.

Tablo 4.14 Düşük doz BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde protein derişimine göre normalize edilen % Kontrol Absorbans ortalama değerleri.

Saat	1 pM BPA	1 nM BPA
0	109,7 ± 17,7	144,6 ± 4,5
2	53,2 ± 12,2	48,9 ± 3,4
4	104,4 ± 4,9	147,4 ± 5,2
6	168,4 ± 92,2*	173,2 ± 8,2**
8	120,2 ± 19,3	181,0 ± 13**
12	90,7 ± 15,6	103,4 ± 9,9
24	154,7 ± 31,6***	287,0 ± 279,5***
48	297,3 ± 175,9***	160,2 ± 143***

Düşük doz BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin 0 ile 48 saat aralığındaki kaspaz-8 düzeyleri Şekil 4.18’de grafiklendirilmiştir (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).



Şekil 4.18 Düşük doz BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin kaspaz-8 düzeyleri grafiği (* p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Şekil 4.18'de verilen grafik incelendiğinde SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki kaspaz-8 düzeyi 6 saat süreyle 1 pM ve 1 nM BPA uygulaması sonucunda kontrole göre sırasıyla % 168.4 ve %173.2 artış göstermiştir (sırayla* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki kaspaz-8 düzeyi 8 ve 24 saat süresince 1 nM BPA uygulaması ile sırasıyla % 181, %287 artış göstermiştir (** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

48 saat süreli BPA uygulamasında ise SH-SY5Y hücrelerindeki kaspaz-8 düzeyi, 1 pM BPA ile kontrol grubuna kıyasla anlamlı ve belirgin şekilde % 297.3 artış göstermiştir (** $p<0,001$). Diğer yandan aynı süreyle hücelere 1 nM BPA uygulanmasıyla kaspaz-8 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı %160.2'lik bir artış tespit edilmiştir (** $p<0,001$).

5. TARTIŞMA

Bisfenol A endüstride sıklıkla kullanılan ve literatürde çokça araştırılan bir endokrin bozucu maddedir. BPA östrojen benzeri etkiye sahip ve östrojen reseptörleriyle (ER α ve ER β) ile etkileşen *in vitro* ve *in-vivo* olarak agonist ve antagonist etki gösterebilen bir moleküldür (86,199). BPA nükleer östrojen reseptörlerine bağlanma ilgisinin 17- β estradiol (E2)'e kıyasla azlığından dolayı zayıf bir östrojen olarak kabul edilmektedir.

BPA halen en önemli bisfenol analogu olarak kabul edilmektedir. Bisfenol AF (BPAF), Bisfenol F (BPF) ve Bisfenol S (BPS) gibi diğer bisfenol analoglarının da endokrin bozucu özellik gösterdiği, sitotoksosite, genotoksosite, nörotoksosite, üreme toksisitesi, gibi etkilere sahip olduğu laboratuvar çalışmalarında belirtilmiştir (200).

Bununla beraber *in-vivo* hayvan çalışmalarında düşük doz BPA'nın endokrin sinyalizasyon yolları ile fetal, neonatal ve perinatal dönemde olduğu gibi erişkinlik döneminde de etkileştiği rapor edilmiştir. Ayrıca BPA sinir sistemi, immün sistem ve üreme sistemi üzerinde yaygın etkiler göstermektedir (201). BPA'nın plastik ambalajlardan besinlere geçebilmesi maruziyet riskini artırmaktadır (68). BPA'nın idrar örneklerinde, serum, amniyotik sıvı, neonatal kan, plasenta kordon kanı ve insan sütü dâhil vücut sıvılarında varlığı tespit edilmiştir (202-204). 2016'da yapılmış yeni bir çalışmada 5 μ g/kg dozda 35 günlük oral uygulama sonucunda farelerin plazmasında 1 μ g BPA / ml derişimde BPA tespit edilmiştir (205).

BPA'nın potansiyel kronik ve kaçınılmaz maruziyetinin olmasından ötürü yapılan yoğun çalışmalar sonucunda BPA'nın LOAEL'den daha düşük pikomolar dozlarda bile monotik olmayan doz bağımlı davranış gösterdiği bulunmuştur (4,206).

Bu tez çalışması çerçevesinde ilk aşamada BPA'nın nöroblastoma hücrelerindeki toksisitesini anlayabilmek için 8, 24, 48, 72 saatlik 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M şeklinde artan dozlarda BPA uygulanmasıyla sitotoksosite deneyleri yapılmıştır. Deneyler sonucunda SH-SY5Y hücrelerinin % canlılık değerinin monotik olmayan doz cevabı verdiği gözlenmiştir. Devamında hücrelerin nitrik oksit (NO) düzeylerini belirlemek için aynı saat aralıklarında ve aynı dozlarda BPA uygulanarak Griess yöntemiyle ölçüm yapılmıştır. Sitotoksosite sonuçları ve NO düzeyleri birlikte değerlendirildiğinde ise hücrelerin canlılık

yüzdesinde azalma gözlenirken NO miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilmiş sitotoksosite sonuçlarıyla hücrelerin NO düzeyleri arasında 8, 48, 72 saatlik uygulamalarda negatif korelasyon varlığı tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Düşük doz BPA (1 nM) uygulanan hücrelerde sitotoksitenin daha yüksek olduğu belirlendiğinden devam eden deneyler için 1 pM ve 1 nM BPA dozları seçilmiştir. Ayrıca 1 pM 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerde nNOS gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiş kontrol grubuna kıyaslandığında belirgin bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir.

1 pM ve 1 nM BPA uygulaması MTT redüksiyonunu sırasıyla %62.9'e ve %78.7'e istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürerek azaltmıştır (sırasıyla $p<0,001, p<0,05$). Parçalanmış hücre membranının bir işareti olan LDH deneyi sonuçları incelendiğinde sadece 1 nM BPA'nın % LDH değerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde %65.5'e kadar düşürdüğü belirlenmiştir ($p<0,001$). BPA'nın nöroblastoma hücrelerinin % canlılık değerlerindeki azaltıcı etkisini her iki deney sonucunda da görmek mümkündür.

Literatürde BPA ve AChE ilgili çalışmalarda BPA'nın monotik olmayan doz cevabı verdiği bildirilmiştir. Hayvan deney çalışmalarında düşük doz BPA (10 mg/kg, 25 mg/kg) ile artan AChE enzim aktivitesi gözlenirken daha yüksek doz BPA (50 mg/kg) ile aktivitede azalma tespit edilmiştir (207-209). Bu tez kapsamında da BPA'nın AChE ve BuChE enzimleri ile etkileştiği aktivitede azalmaya sebep olduğu belirlenmiş. Her iki enzim için de IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. BPA'nın AChE enzimi için IC_{50} değeri $2,22 \text{ mM} \pm 0,290$ olarak BuChE enzimi için ise $1,98 \text{ mM} \pm 0,580$ olarak belirlenmiştir.

1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde spesifik AChE enzim aktivitesi 0-48 saat aralığında belirlenmiştir. 4 saat süresince 1 pM BPA uygulanan hücrelerde spesifik AChE aktivitesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde 0,9'a azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$). 2 ve 12 saat süresince 1 pM BPA uygulanmasıyla spesifik AChE aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde sırayla 8,3'e ve 8,4'e arttığı gözlenmiştir ($p<0,001$). 48 saat süresince hücrelere 1 pM ve 1 nM BPA uygulaması sonucu spesifik AChE aktivitesinde gözlenen azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında SH-SY5Y hücrelerinde AChE ve BuChE genlerinin ekspresyon düzeyi belirlenmiştir. 48 saat boyunca SH-SY5Y hücrelerine 1 pM BPA uygulanması sonucunda hücrelerdeki AChE gen ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre kıyaslandığında 0,61 kat azaldığı belirlenmiştir. AChE gen ekspresyon düzeyindeki bu azalışın kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmadığı belirlenmiştir. Nöroblastoma hücrelerine 1 nM BPA uygulaması sonucunda kontrol grubuyla kıyaslama yapıldığında AChE gen ekspresyonunda belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Diğer taraftan 48 saat süresince 1 pM ve 1 nM BPA uygulanmış nöroblastoma hücrelerindeki BuChE gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde 1 pM BPA uygulamasıyla gen ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna kıyasla 2,18 kat arttığı gözlenmiştir. 1 nM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerindeki BuChE gen ekspresyonunun ise kontrol grubuna kıyasla 0,73 kat azalttığı belirlenmiştir. BuChE gen ekspresyon düzeyinde gözlenen bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Nekroptoz kaspaz bağımlı olmayan ve nekrozun düzenlenmiş hali olan yeni tanımlanmış hücre ölümü türüdür (186,210). Nekroptoz RIP1 inhibitörü Nekrostatin 1 ile inhibe edilmektedir (186). BPA'nın çeşitli hücre hatlarında apoptoz ve nekrozu indüklediği bildirilmiştir (184,185,187,211). Bu tez kapsamında üçüncü aşama deneylerde 1 pM ve 1 nM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin farklı saat aralıklarındaki (0-48 saat) % hücre popülasyonları Tali sitometresi ile apoptotik ve nekrotik açıdan değerlendirilmiştir. Tali sitometre cihazı ile elde edilen 1 pM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin % hücre popülasyon değerleri incelendiğinde apoptotik hücre popülasyonunun 6 saat süreli 1 pM BPA uygulanmasıyla kontrol grubuna göre 2,8 kat arttığı görülmüştür ($p<0,001$). Diğer yandan 48 saat süreyle 1 pM BPA uygulanmasıyla ise apoptotik % hücre popülasyonunda 0,2 kat azalma kaydedilmiştir ($p<0,001$). Nekrotik hücre popülasyon yüzdesinde ise 4 saatlik 1 pM BPA uygulamasıyla kontrol grubuna kıyasla 0,7 kat azalış ($p<0,001$), 6 saatlik uygulama sonucunda ise 0,8 kat azalış belirlenmiştir ($p<0,001$). 48 saat süreyle 1 pM BPA uygulanmasıyla nekrotik hücre popülasyon yüzdesinin kontrol grubuna göre 2,7 kat arttığı görülmüştür ($p<0,001$).

1 nM BPA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde % apoptotik hücre popülasyonu 4 saat ve 48 saatlik uygulamayla azalırken ($p<0,001$), 6 saatlik BPA uygulanmasıyla

artış göstermiştir ($p<0,001$). Nekrotik % hücre popülasyonu ise 4, 6 ve 12 saatlik BPA uygulanmasıyla azalış gösterirken (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,01$), 48 saatlik uygulama ile kontrol grubuna göre 2,7 kat arttığı belirlenmiştir ($p<0,001$).

1 pM ve 1 nM BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin 0 ile 48 saat aralığındaki kaspaz-8 düzeyleri incelendiğinde 6 saat süreyle 1 pM ve 1 nM BPA uygulaması sonucunda kontrole göre sırasıyla % 168,4 ve %173,2 artış göstermiştir (sırayla $p<0,05$; $p<0,01$). SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki kaspaz-8 düzeyi 8 ve 24 saat süresince 1 nM BPA uygulaması ile sırasıyla % 181, %287 artış göstermiştir ($p<0,01$, $p<0,001$). 48 saat süreli BPA uygulamasında ise SH-SY5Y hücrelerindeki kaspaz-8 düzeyi, 1 pM BPA ile kontrol grubuna kıyasla anlamlı ve belirgin şekilde % 297,3 artış göstermiştir ($p<0,001$). Diğer yandan aynı süreyle hücelere 1 nM BPA uygulanmasıyla kaspaz-8 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı %160,2'lik bir artış tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Asetilkolinesteraz enzim substratı asetilkolinin ve BPA'nın TNF- α düzeyini Nf- $\kappa\beta$ inaktivasyonu ile azalttığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (76,212,213). Bu verilere paralel olarak tez çalışmasının üçüncü aşama deneylerinde de düşük doz BPA'nın SH-SY5Y hücrelerindeki TNF- α düzeyine etkisi incelenmiş 24 ve 48 saat BPA uygulamasının TNF- α düzeyinde istatistiksel anlamda azalışa sebep olduğu sonucu elde edilmiştir. 24 ve 48 saat süresince 1 pM BPA uygulanmış hücrelerdeki TNF- α (pg/ μ g) düzeyinde kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($p<0,001$). 24 saatlik BPA uygulaması TNF- α (pg/ μ g) düzeyinde azalışa ve % nekrotik hücre değerinde azalışa sebep olurken apoptotik hücre yüzdesinde ise artışa sebep olmuştur. Bu veriler BPA'nın SH-SY5Y hücrelerinde canlılık üzerine ilk 24 saat süresince yaptığı etkiyi apoptotik yolla açıklamaktadır. Diğer yandan 48 saat süresince BPA'nın nöroblastoma hücrelerine uygulanışı sonucunda kaspaz-8 (ng/ μ g) düzeyinde anlamlı artış, apoptotik hücre yüzdesinde ve TNF- α (pg/ μ g) düzeyinde anlamlı bir azalış belirlenirken aynı süre sonunda nekrotik hücre yüzdesinde ise artış belirlenmiştir.

TNF Reseptör 1'in (TNFR1) ligasyonu, hücrenin hayatta kalmasına veya hücre ölümüne neden olabilir. Dolayısıyla, NF κ B aracılı gen transkripsiyonu hücre ölümü için bir kontrol noktası olarak işlev görmektedir. NF κ B aracılı gen transkripsiyon artışı

hücresinin hayatta kalmasını sağlarken, NF κ B aracılı gen transkripsiyonunun azalışı ise hücresinin ölümüne yol açmaktadır (214,215).

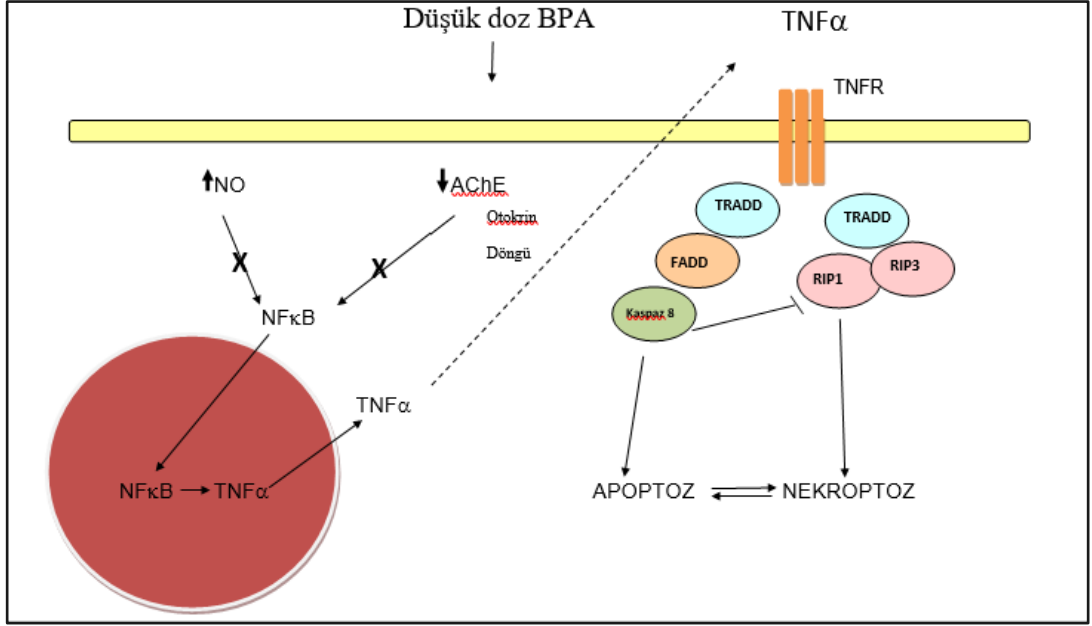
TNF hücrelerde kaspaz bağımlı apoptozu indükleyebilmektedir. Ölüm reseptörü sinyalizasyonu sırasında kaspaz aktivitesi olmadığında ise, birçok hücre tipi kaspazdan bağımsız nekrotik hücre ölüm yolağına geçebilmektedir (214,215).

Birçok araştırma grubu apoptotik mekanizmaların reaktif oksijen türleri (ROS) varlığı, yüksek NO düzeyi ve NO aracılı ATP yokluğu durumunda RIP1 ve RIP3'e bağlanmasıyla pro-nekrotik bir komplekse dönüştüğü fikrini literatüre sunmuştur (214,215).

Bu tez çalışması kapsamında BPA'nın hücre ölümü ve nöroimmünomodülasyondaki çok yönlü etkilerinin oluşmasında AChE'nin köprü görevi üstlenebileceği kanısına varılmıştır. Asetilkolinin ve azalmış olan AChE aktivitesinin TNF α üretimini NF- κ B yolağını üzerinden inhibe ettiği literatürde bildirilmiştir (212).

Tez çalışmasının sonucunda elde edilen bulgular göz önüne alındığında SH-SY5Y hücrelerine 1 pM ve 1 nM BPA uygulanması sonucunda ilk 24 saat içinde artmış olan kaspaz-8 düzeyi, apoptotik hücre yüzdesi ve AChE spesifik aktivitesi hücrelerde apoptotik ölüm mekanizmasının aktive olduğunu göstermektedir. Ancak 48 saat süresince hücrelere 1 pM ve 1 nM BPA uygulanması bulguları, özellikle de nekroptoz inhibitörü Nek-1 ile elde edilen hücre popülasyonu sonuçları; hücresinin apoptozdan yine programlı bir ölüm şekli olan nekroptozla doğru yöneldiğini ortaya koymaktadır. Hücrelerde düşük doz BPA uygulanması boyunca 24 ve 48 saatler arasında azalmış olan AChE aktivitesinin etkisiyle TNF α düzeyinde belirgin bir düşüş gözlenmektedir. SH-SY5Y hücrelerinde belirlenen NO düzeyi ise 48 saat sonunda 24 saate oranla artmaktadır. Aynı saat diliminde hücrelerde artan kaspaz-8 düzeyine rağmen hücre ölümünün nekroptoz üzerinden gerçekleşmesinin nedeni, apoptotik yolda kaspaz-8'in aşağısında görev alan kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7 gibi diğer molekül veya moleküllerin aktiflenememesi ya da NO aracılı olarak hücrede ATP düzeyinin azalması olarak yorumlanmıştır.

Bulgularımız doğrultusunda önerilen düşük doz BPA'nın SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki olası etki mekanizması aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1 Düşük doz BPA'nın SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki etki mekanizması. TNF ile ilişkili ölüm bölgesi (TRADD); Fas birleşik ölüm bölgesi (FADD); Reseptör aracılı protein1 (RIP1); Reseptör aracılı protein 3 (RIP3).

Eldeki verilerin birarada değerlendirilmesi ile SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde BPA'nın RIP-1 bağımlı nekroptozu AChE aracılığıyla aktive ettiği sonucuna varılmıştır.

6. ÖNERİLER

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen düşük doz BPA'nın SH-SY5Y hücrelerindeki sitotoksik etkisi, düşük doz BPA uygulanan hücrelerdeki NO₂ düzeyleri; nNOS, AChE, BuChE gen ekspresyon düzeyleri; spesifik AChE aktivitesi; TALİ sitometresi ile elde edilen apoptotik, nekrotik ve canlı hücre popülasyonları; TNF- α düzeyleri ve kaspaz-8 düzeyleri verileri daha sonrasında yapılacak olan deneylere yol göstermesi açısından önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında sonuç olarak BPA'nın 48 saat uygulanışıyla hücrelerde artan kaspaz-8 düzeyine rağmen hücre ölümünün nekroptoz üzerinden gerçekleşmesinin nedeni, apoptotik yolda kaspaz-8'in aşağısında görev alan kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7 gibi diğer molekül veya moleküllerin aktiflenememesi yada NO aracılı olarak hücrede ATP düzeyinin azalması olarak yorumlanmıştır.

Bu yorumdan yola çıkarak ileri aşamadaki deneyler için düşük doz BPA uygulanmış hücrelerde kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7 moleküllerinin düzeyleri belirlenmesi hücre ölümünün nekroptoz üzerinden gerçekleşmesinin nedenini açıklayabilmek açısından önemlidir.

Kaspaz-8 seviyesindeki artışa rağmen nekroptoz üzerinden hücre ölümünün gerçekleşmesine diğer bir neden olarak yorumlanan ATP yokluğu için de düşük doz BPA uygulanmış hücrelerde ATP miktarının ticari kitlerle ölçümü bize ayrıntılı bilgi sunacak ve bu tez çalışmasını ileri bir noktaya taşıyacaktır.

KAYNAKLAR

1. Leblebicioglu B, Connors J, Mariotti A. Principles of endocrinology. *Periodontol* 2000. 2013;61(1):54-68.
2. Paixao S, Klein R. Neuron-astrocyte communication and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2010;20(4):466-73.
3. Kim Aaronson LA, Gary Allen Anatomy & Physiology Texas: Openstax; 2016 [cited 2016 27.11.16]. Available from: https://cooljargon.com/ebooks/anatomy_and_physiology/m46667/index.cnxml.html.
4. Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with östrogenic activity. *Environ Health Perspect*. 2003;111(8):994-1006.
5. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1269-304.
6. Lee HR, Jeung EB, Cho MH, Kim TH, Leung PC, Choi KC. Molecular mechanism(s) of endocrine-disrupting chemicals and their potent östrogonicity in diverse cells and tissues that express östrogon receptors. *J Cell Mol Med*. 2013;17(1):1-11.
7. Marrocco J, McEwen BS. Sex in the brain: hormones and sex differences. *Dialogues Clin Neurosci*. 2016;18(4):373-83.
8. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, ve diğerleri. Östrogon receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 2007;87(3):905-31.
9. Rudraiah S, Zhang X, Wang L. Nuclear Receptors as Therapeutic Targets in Liver Disease: Are We There Yet? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2016;56:605-26.
10. Jensen EV. On the mechanism of östrogon action. *Perspect Biol Med*. 1962;6:47-59.
11. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(12):5925-30.
12. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human östrogon receptor. *FEBS Lett*. 1996;392(1):49-53.
13. Choi SM, Yoo SD, Lee BM. Toxicological characteristics of endocrine-disrupting chemicals: developmental toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2004;7(1):1-24.

14. Agency. USEP. What are endocrine disruptors? 2007 [cited 2016 27.11.16]. Available from: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>.
15. Boas M, Feldt-Rasmussen U, Main KM. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012;355(2):240-8.
16. Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Mura E, Quinn MJ, Jr., Lavoie E, Palanza P, ve diğeri. Effects of xenoöstrogens on the differentiation of behaviorally-relevant neural circuits. *Front Neuroendocrinol*. 2007;28(4):179-200.
17. Hao C-J, Cheng X-J, Xia H-F, Ma X. The endocrine disruptor diethylstilböstrol induces adipocyte differentiation and promotes obesity in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012;263(1):102-10.
18. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, ve diğeri. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*. 2007;24(2):178-98.
19. Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*. 2006;226(2-3):79-89.
20. Bloom MS, Mok-Lin E, Fujimoto VY. Bisphenol A and ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril*. 2016;106(4):857-63.
21. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev*. 2009;30(1):75-95.
22. Groff T. Bisphenol A: invisible pollution. *Current opinion in pediatrics*. 2010;22(4):524-9.
23. Hong D, Zhou J, Qin J, Li X, Yao Z, Zhang HJ, ve diğeri. Method for preparing bisphenol A. Google Patents; 2011.
24. Chevalier N, Fenichel P. Bisphenol A: Targeting metabolic tissues. *Rev Endocr Metab Disord*. 2015;16(4):299-309.
25. Dodds EC, Lawson W. Molecular Structure in Relation to Oöstrogenic Activity. Compounds without a Phenanthrene Nucleus. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 1938;125(839):222-32.
26. Kundakovic M, Champagne FA. Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain Behav Immun*. 2011;25(6):1084-93.
27. Acconcia F, Pallottini V, Marino M. Molecular Mechanisms of Action of BPA. Dose Response. 2015;13(4):1559325815610582.

28. Santangeli S, Maradonna F, Olivotto I, Piccinetti CC, Gioacchini G, Carnevali O. Effects of BPA on female reproductive function: The involvement of epigenetic mechanism. *General and Comparative Endocrinology*.
29. INSERM. Bisphénol A: Effets sur la reproduction. Rapport préliminaire. 2010 2 june. Report No.
30. EFSA EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane (Bisphenol A). *The EFSA Journal*. 2006;428:1-75.
31. (EFSA) EFSA. Toxicokinetics of Bisphenol A - Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC). 2008;759:1-10.
32. (EFSA) EFSA. Scientific opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A. *The EFSA Journal*. 2010(8):1829.
33. Vandenberg LN, Ehrlich, S., Belcher, S.M., Ben-Jonathan, N., Dolinoy, D.C., Hugo ER, Hunt, P.A., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Sali, K.S., Soto, A.M., Wang, H.-, S. vS, F.S. Low dose effects of bisphenol A. *Endocr Disruptors*. 2014;1:e26490.
34. (EFSA) EFSA. Report on the two-phase public consultation on the draft EFSA scientific opinion on bisphenol A (BPA). Parma ITALY: 2015.
35. Administration USFaD. Update on Bisphenol A (BPA) for Use in Food. 2010.
36. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, ve diğerleri. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(10):3725-40.
37. Huang YQ, Wong CK, Zheng JS, Bouwman H, Barra R, Wahlstrom B, ve diğerleri. Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ Int*. 2012;42:91-9.
38. Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, ve diğerleri. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose Response*. 2015;13(3):1559325815598308.
39. Loganathan SN, Kannan K. Occurrence of bisphenol A in indoor dust from two locations in the eastern United States and implications for human exposures. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2011;61(1):68-73.
40. Administration USFaD. Safety Assessment of BPA in Medical Products. 2009 07 .08. 2009. Report No.

41. Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, ve diğ erleri. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dental Materials*. 2011;27(8):723-47.
42. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*. 1978;38(11 Pt 1):3751-7.
43. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*. 1973;33(11):2643-52.
44. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1983;71(4):741-7.
45. SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) [cited 2016 29.11.16]. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2266.aspx?geo_country=tr#characteristics.
46. SK-N-SH (ATCC® HTB-11™) [cited 2016 29.11.2016]. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-11.aspx?geo_country=tr#characteristics.
47. Andra SS, Austin C, Yang J, Patel D, Arora M. Recent advances in simultaneous analysis of bisphenol A and its conjugates in human matrices: Exposure biomarker perspectives. *Sci Total Environ*. 2016.
48. Dickens F. Edward Charles Dodds, 13 October 1899--16 December 1973. *Biogr Mem Fellows R Soc*. 1975;21:227-67.
49. Vogel SA. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety". *Am J Public Health*. 2009;99 Suppl 3:S559-66.
50. Michalowicz J. Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;37(2):738-58.
51. Cwiek-Ludwicka K. Bisphenol A (BPA) in food contact materials - new scientific opinion from EFSA regarding public health risk. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2015;66(4):299-307.
52. Mercea P. Physicochemical Processes Involved in Migration of Bisphenol A from Polycarbonate. *Journal of Applied Polymer Science*. 2009;112:579-93.
53. Nam SH, Seo YM, Kim MG. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*. 2010;79(9):949-52.
54. Vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect*. 2005;113(8):926-33.

55. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 2006;147(6 Suppl):S56-69.
56. Vom Saal FS, Welshons WV. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environmental Research*. 2006;100(1):50-76.
57. Vandenberg LN, Ehrlich S, Belcher SM, Ben-Jonathan N, Dolinoy DC, Hugo ER, ve diğerleri. Low dose effects of bisphenol A. *Endocrine Disruptors*. 2013;1(1):e26490.
58. Rubin BS. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;127(1-2):27-34.
59. Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, Mornagui B. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environ Int*. 2014;64:83-90.
60. Negri-Cesi P. Bisphenol A Interaction With Brain Development and Functions. *Dose Response*. 2015;13(2):1559325815590394.
61. Doerge DR, Vanlandingham M, Twaddle NC, Delclos KB. Lactational transfer of bisphenol A in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett*. 2010;199(3):372-6.
62. 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.
63. Delfosse V, Grimaldi M, le Maire A, Bourguet W, Balaguer P. Nuclear receptor profiling of bisphenol-A and its halogenated analogues. *Vitamins and hormones*. 2014;94:229-51.
64. Brucker-Davis F, Ferrari P, Boda-Buccino M, Wagner-Mahler K, Pacini P, Gal J, ve diğerleri. Cord blood thyroid tests in boys born with and without cryptorchidism: correlations with birth parameters and in utero xenobiotics exposure. *Thyroid*. 2011;21(10):1133-41.
65. Romano ME, Webster GM, Vuong AM, Thomas Zoeller R, Chen A, Hoofnagle AN, ve diğerleri. Gestational urinary bisphenol A and maternal and newborn thyroid hormone concentrations: the HOME Study. *Environ Res*. 2015;138:453-60.
66. Freitas J, Cano P, Craig-Veit C, Goodson ML, David Furlow J, Murk AJ. Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay. *Toxicology in Vitro*. 2011;25(1):257-66.

67. Usman A, Ahmad M. From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Chemosphere*. 2016;158:131-42.
68. Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*. 2005;113(4):391-5.
69. Gao C, Liu L, Ma W, Zhu N, Jiang L, Ren N, ve diğerleri. Bisphenol A in Urine of Chinese Young Adults: Concentrations and Sources of Exposure. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2016;96(2):162-7.
70. Lee J, Lim K-T. Plant-originated glycoprotein (36 kDa) suppresses interleukin-4 and -10 in bisphenol A-stimulated primary cultured mouse lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*. 2010;33(4):421-9.
71. Rogers JA, Metz L, Yong VW. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol*. 2013;53(4):421-30.
72. Ge LC, Chen ZJ, Liu H, Zhang KS, Su Q, Ma XY, ve diğerleri. Signaling related with biphasic effects of bisphenol A (BPA) on Sertoli cell proliferation: a comparative proteomic analysis. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(9):2663-73.
73. Kendzioriski JA, Kendig EL, Gear RL, Belcher SM. Strain Specific Induction of Pyometra and Differences in Immune Responsiveness in Mice Exposed to 17 α -Ethinyl Estradiol or the Endocrine Disrupting Chemical Bisphenol A. *Reprod Toxicol*. 2012;34(1):22-30.
74. Liu Y, Mei C, Liu H, Wang H, Zeng G, Lin J, ve diğerleri. Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;451(4):592-8.
75. Segura JJ, Jimenez-Rubio A, Pulgar R, Olea N, Guerrero JM, Calvo JR. In vitro effect of the resin component bisphenol A on substrate adherence capacity of macrophages. *J Endod*. 1999;25(5):341-4.
76. Kim JY, Jeong HG. Down-regulation of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha expression by bisphenol A via nuclear factor-kappaB inactivation in macrophages. *Cancer letters*. 2003;196(1):69-76.
77. (EFSA) EFSA. Report on the two-phase public consultation on the draft EFSA scientific opinion on bisphenol A (BPA). EFSA Supporting Publications. 2015;12(1).
78. İşçioğlu D. Bebek Beslenmesi İçin Seçtiğimiz Ürünlerin Bpa İçermemesi Yetmez 2015 [cited 2017 10.01.2017]. Available from: <http://www.otcnews.com.tr/bebek-beslenmesi-icin-sectigimiz-urunlerin-bpa-icermemesi-yetmez/>.
79. Tata JR. One hundred years of hormones. *EMBO Rep*. 2005;6(6):490-6.

80. Cui J, Shen Y, Li R. Östrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med.* 2013;19(3):197-209.
81. Crider A, Pillai A. Östrogen Signaling as a Therapeutic Target in Neurodevelopmental Disorders. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017;360(1):48-58.
82. Simpson ER. Sources of östrogen and their importance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2003;86(3-5):225-30.
83. Deroo BJ, Korach KS. Östrogen receptors and human disease. *J Clin Invest.* 2006;116(3):561-70.
84. Cygankiewicz AI, Jacenik D, Krajewska WM. [GPER receptor - the new player in östrogen signaling]. *Postepy Biochem.* 2015;61(1):52-60.
85. Khalid AB, Krum SA. Östrogen receptors alpha and beta in bone. *Bone.* 2016;87:130-5.
86. Hiroi H, Tsutsumi O, Momoeda M, Takai Y, Osuga Y, Taketani Y. Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with östrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. *Endocr J.* 1999;46(6):773-8.
87. Wesołowska M, Pawlik P, Jagodziński PP. The clinicopathologic significance of östrogen receptors in human gastric carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2016;83:314-22.
88. Maggiolini M, Picard D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound östrogen receptor. *J Endocrinol.* 2010;204(2):105-14.
89. Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H. Medical hypothesis: xenoöstrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect.* 1993;101(5):372-7.
90. Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, ve diğeri. Bisphenol A interacts with the östrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1998;142(1-2):203-14.
91. Aloisi AM, Della Seta D, Ceccarelli I, Farabollini F. Bisphenol-A differently affects östrogen receptors- α in östrous-cycling and lactating female rats. *Neuroscience Letters.* 2001;310(1):49-52.
92. Wozniak AL, Bulayeva NN, Watson CS. Xenoöstrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane östrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect.* 2005;113(4):431-9.
93. Istvan Merchanthaler MD, Ph.D., D.Sc. and Laszlo Prokai, Ph.D., D.Sc. Central Nervous System-selective Östrogens: A Safe Östrogen Therapy 2013 [cited 2017 18.01.2017]. Available from: <http://www.cyberounds.com/cmecontent/art474.html>.

94. Acconcia F, Marino M. The Effects of 17beta-estradiol in Cancer are Mediated by Östrogen Receptor Signaling at the Plasma Membrane. *Front Physiol.* 2011;2:30.
95. Matthews J, Gustafsson JA. Östrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv.* 2003;3(5):281-92.
96. Acconcia F, Marino M. The effects of 17b-estradiol in cancer are mediated by östrogen receptor signaling at the plasma membrane. *Frontiers in Physiology.* 2011;2(30).
97. Bolli A, Bulzomi P, Galluzzo P, Acconcia F, Marino M. Bisphenol A impairs estradiol-induced protective effects against DLD-1 colon cancer cell growth. *IUBMB Life.* 2010;62(9):684-7.
98. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of östrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med.* 2006;27(4):299-402.
99. Khan D, Ahmed SA. Epigenetic Regulation of Non-Lymphoid Cells by Bisphenol A, a Model Endocrine Disrupter: Potential Implications for Immunoregulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6.
100. Jarome TJ, Thomas JS, Lubin FD. The epigenetic basis of memory formation and storage. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;128:1-27.
101. Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates östrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci.* 1999;19(7):2455-63.
102. Yang LC, Zhang QG, Zhou CF, Yang F, Zhang YD, Wang RM, ve diğerleri. Extranuclear östrogen receptors mediate the neuroprotective effects of östrogen in the rat hippocampus. *PLoS One.* 2010;5(5):e9851.
103. Scott E, Zhang QG, Wang R, Vadlamudi R, Brann D. Östrogen neuroprotection and the critical period hypothesis. *Front Neuroendocrinol.* 2012;33(1):85-104.
104. Yao J, Irwin R, Chen S, Hamilton R, Cadenas E, Brinton RD. Ovarian hormone loss induces bioenergetic deficits and mitochondrial β -amyloid. *Neurobiol Aging.* 2012;33(8):1507-21.
105. Bishop J, Simpkins JW. Estradiol enhances brain glucose uptake in ovariectomized rats. *Brain Research Bulletin.* 1995;36(3):315-20.
106. Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J. Progesterone and östrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology.* 2008;149(6):3167-75.

107. Nakamura K, Itoh K, Yaoi T, Fujiwara Y, Sugimoto T, Fushiki S. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of Bisphenol A. *J Neurosci Res.* 2006;84(6):1197-205.
108. Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T, Fushiki S. Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neurosci Lett.* 2007;420(2):100-5.
109. MacLusky NJ, Hajszan T, Leranth C. The Environmental Östrogen Bisphenol A Inhibits Estradiol-Induced Hippocampal Synaptogenesis. *Environ Health Perspect.* 2005;113(6):675-9.
110. Leranth C, Szigeti-Buck K, MacLusky NJ, Hajszan T. Bisphenol A Prevents the Synaptogenic Response to Testosterone in the Brain of Adult Male Rats. *Endocrinology.* 2008;149(3):988-94.
111. Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, Parmigiani S. Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice. *Environmental Research.* 2008;108(2):150-7.
112. Itoh K, Yaoi T, Fushiki S. Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, and brain development. *Neuropathology.* 2012;32(4):447-57.
113. You HJ, Choi CY, Jeon YJ, Chung YC, Kang SK, Hahm KS, ve diğerleri. Suppression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha expression by 4-nonylphenol in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;294(4):753-9.
114. Prast H, Tran MH, Fischer H, Philippu A. Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA. *J Neurochem.* 1998;71(1):266-73.
115. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(10):766-75.
116. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:323-50.
117. Karpuzoglu E, Ahmed SA. Östrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric Oxide.* 2006;15(3):177-86.
118. Ceccatelli S, Grandison L, Scott RE, Pfaff DW, Kow LM. Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology.* 1996;64(5):357-63.
119. Lekontseva O, Chakrabarti S, Jiang Y, Cheung CC, Davidge ST. Role of neuronal nitric-oxide synthase in östrogen-induced relaxation in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;339(2):367-75.

120. Hyman BT, Marzloff K, Wenniger JJ, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH. Relative sparing of nitric oxide synthase-containing neurons in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1992;32(6):818-20.
121. Rylett JCBaRJ. The Relationship between Choline Acetyltransferase and Nitric Oxide Synthase Isoform Expression in Alzheimer. *Journal of Alzheimers Disease & Parkinsonism*. 1970 Jan 01;2(2161-0460):1-10.
122. Naicker P, Anoopkumar-Dukie S, Grant GD, Kavanagh JJ. Anticholinergic activity in the nervous system: Consequences for visuomotor function. *Physiology & Behavior*. 2017;170:6-11.
123. Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev*. 2012;248(1):188-204.
124. Prado VF, Janickova H, Al-Onaizi MA, Prado MAM. Cholinergic circuits in cognitive flexibility. *Neuroscience*.
125. Prado MA, Reis RA, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int*. 2002;41(5):291-9.
126. Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*. 2012;76(1):116-29.
127. Dineley KT, Pandya AA, Yakel JL. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(2):96-108.
128. Soreq H. Checks and balances on cholinergic signaling in brain and body function. *Trends Neurosci*. 2015;38(7):448-58.
129. Taylor P, Radic Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1994;34:281-320.
130. Balasubramanian AS, Bhanumathy CD. Noncholinergic functions of cholinesterases. *Faseb j*. 1993;7(14):1354-8.
131. Sperling LE, Steinert G, Boutter J, Landgraf D, Hescheler J, Pollet D, ve diğerleri. Characterisation of cholinesterase expression during murine embryonic stem cell differentiation. *Chem Biol Interact*. 2008;175(1-3):156-60.
132. Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*. 1993;41(1):31-91.
133. Dave KR, Syal AR, Katyare SS. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *Z Naturforsch C*. 2000;55(1-2):100-8.

134. Çokuğraş AN. Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2003;28:54-61.
135. Kosak U, Brus B, Knez D, Sink R, Zakelj S, Trontelj J, ve diğerleri. Development of an in-vivo active reversible butyrylcholinesterase inhibitor. *Sci Rep*. 2016;6:39495.
136. Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J*. 1989;260(3):625-34.
137. Vigny M, Gisiger V, Massoulié J. "Nonspecific" cholinesterase and acetylcholinesterase in rat tissues: molecular forms, structural and catalytic properties, and significance of the two enzyme systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(6):2588-92.
138. [cited 2017 05.01.17]. Available from: [http:// www.ncbr.muni.cz](http://www.ncbr.muni.cz) .
139. Radic Z, Pickering NA, Vellom DC, Camp S, Taylor P. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*. 1993;32(45):12074-84.
140. Arpagaus M, Fedon Y, Cousin X, Chatonnet A, Berge JB, Fournier D, ve diğerleri. cDNA sequence, gene structure, and in vitro expression of ace-1, the gene encoding acetylcholinesterase of class A in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 1994;269(13):9957-65.
141. Hussein AS, Harel M, Selkirk ME. A distinct family of acetylcholinesterases is secreted by *Nippostrongylus brasiliensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2002;123(2):125-34.
142. Kaufer D, Friedman A, Seidman S, Soreq H. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*. 1998;393(6683):373-7.
143. Deutsch VR, Pick M, Perry C, Grisaru D, Hemo Y, Golan-Hadari D, ve diğerleri. The stress-associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34(+) hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. *Exp Hematol*. 2002;30(10):1153-61.
144. Laumonier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, ve diğerleri. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet*. 2004;74(3):552-7.
145. Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, ve diğerleri. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet*. 2003;34(1):27-9.
146. Genever PG, Birch MA, Brown E, Skerry TM. Osteoblast-derived acetylcholinesterase: a novel mediator of cell-matrix interactions in bone? *Bone*. 1999;24(4):297-303.

147. Paraoanu LE, Layer PG. Mouse acetylcholinesterase interacts in yeast with the extracellular matrix component laminin-1beta. *FEBS Lett.* 2004;576(1-2):161-4.
148. Layer PG, Weikert T, Alber R. Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. *Cell Tissue Res.* 1993;273(2):219-26.
149. Bataille S, Portalier P, Coulon P, Ternaux JP. Influence of acetylcholinesterase on embryonic spinal rat motoneurons growth in culture: a quantitative morphometric study. *Eur J Neurosci.* 1998;10(2):560-72.
150. Sharma KV, Koenigsberger C, Brimijoin S, Bigbee JW. Direct evidence for an adhesive function in the noncholinergic role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth. *J Neurosci Res.* 2001;63(2):165-75.
151. Sternfeld M, Ming G, Song H, Sela K, Timberg R, Poo M, ve diğeri. Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contributions of its hydrolytic capacity, core protein, and variable C termini. *J Neurosci.* 1998;18(4):1240-9.
152. Hosoi T, Nomura Y. Functional role of acetylcholine in the immune system. *Front Biosci.* 2004;9:2414-9.
153. Skok MV, Kalashnik EN, Koval LN, Tsetlin VI, Utkin YN, Changeux JP, ve diğeri. Functional nicotinic acetylcholine receptors are expressed in B lymphocyte-derived cell lines. *Mol Pharmacol.* 2003;64(4):885-9.
154. Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev.* 2009;89(1):73-120.
155. Bond CE, Zimmermann M, Greenfield SA. Upregulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptors by Acetylcholinesterase C-Terminal Peptides. *PLoS ONE.* 2009;4(3).
156. Lykhmus O, Mishra N, Koval L, Kalashnyk O, Gergalova G, Uspenska K, ve diğeri. Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain. *Front Mol Neurosci.* 2016;9:19.
157. Wang J, Fu XQ, Lei WL, Wang T, Sheng AL, Luo ZG. Nuclear factor kappaB controls acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction. *J Neurosci.* 2010;30(33):11104-13.
158. Thompson PA, Khatami M, Baglolle CJ, Sun J, Harris S, Moon EY, ve diğeri. Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk. *Carcinogenesis.* 2015;36(Suppl 1):S232-53.
159. Pohanka M. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *Int J Mol Sci.* 2014;15(6):9809-25.

160. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*.
161. Misra A, Rai S, Misra D. Functional role of apoptosis in oral diseases: An update. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2016;20(3):491-6.
162. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16(2):2942-55.
163. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology*. 2010;2010:214074.
164. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Jr., Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13659.
165. Cooper DM. The Balance between Life and Death: Defining a Role for Apoptosis in Aging. *Journal of Clinical & Experimental Pathology*. 2012.
166. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
167. Cullen SP, Martin SJ. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death Differ*. 2009;16(7):935-8.
168. Froelich CJ, Metkar SS, Raja SM. Granzyme B-mediated apoptosis - the elephant and the blind men? *Cell Death Differ*. 2004;11(4):369-71.
169. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 0000;25(34):4798-811.
170. Blohberger J, Kunz L, Einwang D, Berg U, Berg D, Ojeda SR, ve diğerleri. Readthrough acetylcholinesterase (AChE-R) and regulated necrosis: pharmacological targets for the regulation of ovarian functions? *Cell Death Dis*. 2015;6:e1685.
171. Zhang XJ, Greenberg DS. Acetylcholinesterase involvement in apoptosis. *Front Mol Neurosci*. 2012;5:40.
172. Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, Caen JP, He HY, Jin QH, ve diğerleri. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ*. 2002;9(8):790-800.
173. Park B, Rhee D-k, Pyo S. Apoptotic mechanism of Bisphenol A in human neuroblastoma. *The FASEB Journal*. 2012;26(1 Supplement):798.16-.16.
174. Oberst A. Death in the fast lane: what's next for necroptosis? *Febs j*. 2016;283(14):2616-25.

175. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2015;14:48.
176. Chen D, Yu J, Zhang L. Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1865(2):228-36.
177. de Almagro MC, Vucic D. Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;39:56-62.
178. Silke J, Rickard JA, Gerlic M. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nat Immunol*. 2015;16(7):689-97.
179. Newton K. RIPK1 and RIPK3: critical regulators of inflammation and cell death. *Trends in Cell Biology*. 2015;25(6):347-53.
180. Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):263-8.
181. Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;35:14-23.
182. Zhang YY, Liu H. Connections between various trigger factors and the RIP1/RIP3 signaling pathway involved in necroptosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(12):7069-74.
183. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med*. 2014;370(5):455-65.
184. Lee S, Suk K, Kim IK, Jang I-S, Park J-W, Johnson VJ, ve diğerleri. Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: Role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor- κ B. *Journal of Neuroscience Research*. 2008;86(13):2932-42.
185. Benachour N, Aris A. Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009;241(3):322-8.
186. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, ve diğerleri. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):107-20.
187. Tan BLL, Kassim NM, Mohd MA. Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenol A and nonylphenol. *Toxicology Letters*. 2003;143(3):261-70.
188. Salucci S, Burattini S, Battistelli M, Baldassarri V, Curzi D, Valmori A, ve diğerleri. Melatonin prevents chemical-induced haemopoietic cell death. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):6625-40.

189. Negroni A, Cucchiara S, Stronati L. Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:250762.
190. Neri M, Virzi GM, Brocca A, Garzotto F, Kim JC, Ramponi F, ve diğeri. In vitro Cytotoxicity of Bisphenol A in Monocytes Cell Line. *Blood Purif.* 2015;40(2):180-6.
191. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods.* 1986;94(1-2):57-63.
192. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 1983;64(3):313-20.
193. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm.* 2005;288(2):369-76.
194. Aranda PS, LaJoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis.* 2012;33(2):366-9.
195. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95.
196. Pohanka M, Hrabínova M, Kuca K, Simonato JP. Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. *Int J Mol Sci.* 2011;12(4):2631-40.
197. Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, ve diğeri. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal Biochem.* 2003;312(2):224-7.
198. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(11):pdb.prot087288.
199. Safe SH, Pallaroni L, Yoon K, Gaido K, Ross S, Saville B, ve diğeri. Toxicology of environmental östrogens. *Reprod Fertil Dev.* 2001;13(4):307-15.
200. Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng Z, Feng YL, Wu Y, ve diğeri. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review. *Environ Sci Technol.* 2016;50(11):5438-53.
201. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, Garcia-Arevalo M, Ripoll C, Fuentes E, ve diğeri. Bisphenol-A acts as a potent östrogen via non-classical östrogen triggered pathways. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;355(2):201-7.
202. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol.* 2007;24(2):139-77.

203. Takeuchi T, Tsutsumi O. Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;291(1):76-8.
204. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod.* 2002;17(11):2839-41.
205. Aghajanpour-Mir SM, Zabihi E, Akhavan-Niaki H, Keyhani E, Bagherizadeh I, Biglari S, ve diğerleri. The Genotoxic and Cytotoxic Effects of Bisphenol-A (BPA) in MCF-7 Cell Line and Amniocytes. *Int J Mol Cell Med.* 2016;5(1):19-29.
206. Vandenberg LN. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose Response.* 2014;12(2):259-76.
207. Aboul Ezz HS, Khadrawy YA, Mourad IM. The effect of bisphenol A on some oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity in the heart of male albino rats. *Cytotechnology.* 2015;67(1):145-55.
208. Khadrawy YA, Noor NA, Mourad IM, Ezz HS. Neurochemical impact of bisphenol A in the hippocampus and cortex of adult male albino rats. *Toxicol Ind Health.* 2016;32(9):1711-9.
209. Luo G, Wei R, Niu R, Wang C, Wang J. Pubertal exposure to Bisphenol A increases anxiety-like behavior and decreases acetylcholinesterase activity of hippocampus in adult male mice. *Food Chem Toxicol.* 2013;60:177-80.
210. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, ve diğerleri. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005;1(2):112-9.
211. Benachour N, Aris A. Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;241(3):322-8.
212. Pavlov VA, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Ochani M, Puerta M, Ochani K, ve diğerleri. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun.* 2009;23(1):41-5.
213. Byun J-A, Heo Y, Kim Y-O, Pyo M-Y. Bisphenol A-induced downregulation of murine macrophage activities in vitro and ex vivo. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2005;19(1):19-24.
214. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3448-59.

215. O'Donnell MA, Ting AT. Chronicles of a death foretold: Dual sequential cell death checkpoints in TNF signaling. *Cell Cycle*. 2010;9(6):1065-71.

ÖZGEÇMİŞ

I Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Beyza AYZGÖK

Doğum Yeri Tarihi : Konya 14.04.1987

Uyruğu: Türk

İletişim Adresi ve Telefonu : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı -1. kat 06100 Sıhhiye ANKARA Tel: +90 312 305 14 99

II Eğitimi

Lisansüstü eğitimimi 2017 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programından mezun olarak tamamladım. Lisans eğitimimi 2010 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun olarak tamamladım. Lisans eğitimi 2007-2008 eğitim öğretim yılında Erasmus öğrenci değişimi programı ile Università Studi di Sassari İtalya'da eğitim aldım. Lise eğitimimi Fethiye Kemal Mumcu Anadolu Lisesi'nde tamamladım.

III Mesleki Deneyim

2010 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezuniyetim sonrasında 1 sene serbest eczacılık deneyimim oldu. 2012 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım ve göreve devam etmekteyim.

IV Bilimsel Faaliyetler

Yayınlar

Uluslararası Bildiriler

1. B. Ayazgök, T. Tuylu Kücükkilinc, K. Ozadali-Sari, O. Unsal-Tan, A. Balkan, "Novel Benzimidazole Derivatives with Multi Functions on Cholinesterase Enzymes and Neuroprotection", JNC, 2016.
2. Ayazgök, B; Kücükkilinc, TT, "Apoptotic and Necrotic Effects of Low Dose Bisphenol A in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells", FEBS J, Sayfa 285, 2016.
3. Ayazgök B.; Kücükkilinc T., "Bisphenol A Leads to Necroptosis in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells", Ind. Env. Tox, 2016.
4. Beyza Ayazgök, Tuba Tüylü Kücükkilinc, "Low Dose Bisphenol A Alters Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Gene Expression Levels", 2015.

5. O.Ünsal Tan, K.Ozadali Sari, B. Ayazgök, T.Tuytu Kucukkilinc A. Balkan, "The Studies on Novel Benzimidazole Derivatives as Potential Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease", Sayfa 280-281, 2015.
6. Beyza Ayazgök, Tuba Tuytu Kucukkilinc, "Effects of Bisphenol A (BPA) on SHSY5Y cells: Evaluation of Nitric Oxide Related Pathways", FEBS J., Sayfa 70, 2014.
7. Ayazgök B.; Kucukkilinc T., "Inhibition of Butrylcholinesterase and Acetylcholinesterase by Bisphenol A", Clin. Chem. Lab. Med. 2014, Sayfa 1664, 2014.
8. Ayazgök, B; Salgin-Goksen, U; Kucukkilinc, T; Gokhan-Kelekci, N; Ucar, G, "Novel 2-pyrazoline Derivatives Bearing Thiazole Ring as Dual Monoamine oxidase-B and Acetylcholinesterase Inhibitors Also Inhibit Beta-amyloid Fibril", FEBS J, Sayfa 431-432, 2013.

Projeler

1. 'Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Çoklu Hedefe Yönelik Etki Göstermesi Beklenen Yeni 2-Pirazolin Ve Benzimidazol Türevlerinin Moleküler Modelleme, Sentez Ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları' isimli 114S374 numaralı TÜBİTAK 1001 projesi 2014- (Bursiyer).
2. 'ECF385 Biyokimya III Laboratuvar Ders İçeriğinin Klinik Biyokimya Yöntemleri ile Zenginleştirilerek Güncellenmesi' isimli TAY-2015-5634 nolu Araştırma Altyapı HÜBAP Projesi 2015-2016 (Araştırmacı).

Kongreler, Sempozyumlar, Seminerler

1. 2nd International Congress of Forensic Toxicology Ankara University Faculty of Pharmacy, Katılım - Bildiri Sunumu, 26- 30.05.2016 Ankara, TÜRKİYE.
2. IFCC Worldlab Istanbul 2014 22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Katılım - Bildiri Sunumu, 22- 26.06.2014 İstanbul, TÜRKİYE.
3. FEBS EMBO PARİS 2014 Federation of European Biochemical Societies Congress, Katılım - Bildiri Sunumu, 30.08.2014 - 04.09.2014 Paris, FRANSA.
4. I. Ulusal Eczacılık Eğitimi Akreditasyon Kongresi, Katılım - Bildiri Sunumu, 09-10.05.2016 Ankara, TÜRKİYE.
5. Advanced Technologies on Health Sciences, Katılım, 15-16.09. 2014, Ankara TÜRKİYE.
6. Genç Türkiye Zirvesi, Katılım 10-12.04.2015, İstanbul TÜRKİYE.
7. ODTÜ Biyokimya Konferansı Katılım 05-06.12.2015 Ankara TÜRKİYE.

8. İlaç Araştırmacıları ve Uygulayıcıları Derneği (İLARUD) 21. Yüzyılda Liderlik Becerileri Semineri Katılım 10.06.2016 Ankara TÜRKİYE.

Kurslar, Eğitimler

1. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu XIII 28-07.05.2013 Ankara TÜRKİYE.

2. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Bilimsel Makale Yazma Kursu –II 21.07.2014 Ankara TÜRKİYE.

3. Springer How to Publish a Scientific Journal Article 26-30.05.2014 Ankara TÜRKİYE.

4. Eğiticilerin Eğitimi Programı 18-19.10.2014 Ankara TÜRKİYE.

5. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Laboratuvar Güvenliği Eğitimi Programı 27.03.2016-03.04.2016 Ankara TÜRKİYE.