

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

**TİROİD HÜCRELERİNDE BİSFENOL A’NIN TOKSİK
ETKİLERİ VE SELENYUM BİLEŞİKLERİNİN
KORUYUCU ROLÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Erhan TAN

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2019

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

**TİROİD HÜCRELERİNDE BİSFENOL A’NIN TOKSİK
ETKİLERİ VE SELENYUM BİLEŞİKLERİNİN
KORUYUCU ROLÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Erhan TAN

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU**

**Ankara
2019**

ONAY SAYFASI

TİROİD HÜCRELERİNDE BİSFENOL A' NIN TOKSİK ETKİLERİ VE SELENYUM BİLEŞİKLERİNİN KORUYUCU ROLÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ

Öğrenci: Erhan TAN

Danışman: Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL

İkinci Danışman: Doç. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU

Bu tez çalışması 03.04.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN

Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL

Lokman Hekim Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Tülay ÇOBAN

Ankara Üniversitesi

Üye:

Dr. Öğr. Üyesi Kübra Gizem ÖZKEMAHLI

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi

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

16 Nisan 2019



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.

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

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

16/4/2019



Erhan TAN

ⁱ"**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**"

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sisteminde yüklenir

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

ETİK BEYAN

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



Ecz. Erhan TAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecime başlamam konusundaki desteği, eğitim sürecim ve tez çalışmalarım boyunca artırarak devam ettiren saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Belma KOÇER GÜMÜŞEL'e

Bana bu tez çalışmamda büyük sabrı, nazikliği, bilgisi ve sonsuz deneyimi ile yardım eden değerli ikinci danışmanım Doç. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU hocama,

Deney sürecimdeki bilimsel ve manevi destekleri için sevgili hocam Doç. Dr. Dilara ZEYBEK ve Bio. Eylem BAYSAL'a

Bu süreçte yanımdaki varlıklarından dolayı aldığım mutluluk ve güzel destekleri için Dr. Ecz. Aylin BALCI, Dr. Öğr. Üyesi Gizem ÖZKEMAHLI, Uzm. Ecz. Ünzile SUR, Uzm. Ecz. Anıl YİRÜN, Ecz. Asena Ayşe GENÇ, Ecz. Tülay POYRAZ, Uzm. Ecz. Tuğbagül ÇAL, Dr. Ecz. Bilge KILIÇARSLAN ve Dr. Ecz. Duygu PASLI'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince Türk Eğitim Vakfı tarafından bana verilen maddi ve manevi büyük destek için çok teşekkür eder, bütün çalışanlarına ve destekçilerine saygılarımı sunarım.

Benim bu zorlu sürecimde her zaman yanımda olan, bana olan sevgisini hiç esirgemeyen ve bana olan güven ve inancı için canım annem Sevim TAN'a tezimi armağan ediyorum.

Erhan TAN
Ankara, 2019

ÖZET

Tan, E. Tiroid Hücrelerinde Bisfenol A'nın Toksik Etkileri ve Selenyum Bileşiklerinin Koruyucu Rolünün Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019. Bisfenol A (BPA) polikarbonatların ve epoksi reçinelerinin üretiminde kullanılan bir kimyasal maddedir. İnsanlar, bu maddeye gündelik yaşamda oral, inhalasyon ve dermal yolla yaygın olarak maruz kalır. Östrojenik etkileri olduğu; endokrin bozucu bir madde olarak değerlendirildiği bildirilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda BPA'nın tiroid bezinin homeostazını ve tiroid hormon üretimini etkileyebildiği ve tiroid hormon reseptörleriyle etkileşebildiği belirlenmiştir. Tiroid, birim ağırlık başına böbrekle birlikte selenyum içeriği en yüksek olan dokudur. Selenyum başlıca diyetle alınan esansiyel bir eser elementtir. Tiroid hormon sentezinde görev alan deiyodinazların yapısında bulunur. Ayrıca, yapısında bulunduğu antioksidan selenoproteinler ile tiroid bezini oksidatif strese karşı korur. Organik ve inorganik formdaki selenyum bileşiklerinin fizyolojik dozlarda alımı, organizmada birçok kimyasalın oluşturduğu zararlı etkilere karşı koruyucu olabilir. Sunulan bu tez çalışmasında, BPA'nın insan papiller tiroid kanseri hücre hattı (B-CPAP) üzerindeki toksik etkileri ve BPA toksisitesi üzerinde selenyumun suplemantasyonunun modifiye edici etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. BPA'nın B-CPAP hücrelerinde oluşturduğu sitopatolojik değişiklikler, sitotoksite, oksidan/antioksidan parametreler ve apoptoz değerlendirilmiş; BPA ile birlikte inorganik selenyum (sodyum selenit, SS) ve organik selenyum (selenometionin, SM) uygulamasının olası koruyucu rolü belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, BPA'nın B-CPAP hücrelerinde oksidatif stres oluşumuna, hücre içi ROS düzeylerinde ve lipid peroksidasyonda artışa ve total glutatyon (GSH) düzeylerinde azalmaya yol açtığını göstermektedir. Ayrıca, BPA'nın bu hücrelerde sitopatolojik değişimlere ve apoptoza neden olduğu belirlenmiştir. Selenyum bileşiklerinin ise, bu hücrelerde BPA ile indüklenen sitopatolojik değişiklikleri, oksidan/antioksidan statü değişimlerini ve apoptozu azaltabileceği yönünde bulgular elde edilmiştir. BPA'nın B-CPAP hücrelerinde yol açtığı oksidatif stresin, bu hücrelerde BPA toksisitesi altında yatan mekanizmalardan biri olduğu sonucuna varılmıştır. İnorganik ve organik selenyum bileşiklerinin ise, tiroid hücrelerinde antioksidan işlevleriyle BPA toksisitesine karşı kısmi olarak koruyucu etkilerinin olabileceği gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Bisfenol A, selenyum, oksidatif stres, apoptoz, B-CPAP hücre hattı

Bu tez çalışması Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir. Proje no: TYL-2018-17076

ABSTRACT

Tan, E. Toxic Effects of Bisphenol A in Thyroid Cells and Evaluation of the Protective Role of Selenium Compounds, Hacettepe University Health Sciences Graduate School, Pharmaceutical Toxicology Program, Master Thesis, Ankara, 2019. Bisphenol A (BPA) is a chemical compound that is used in the production of polycarbonates and epoxy resins. Humans are widely exposed to this compound by oral, inhalation and dermal routes in daily life. It is known to have estrogenic effects and is considered to be an endocrine disruptor. In recent studies, it has been stated that BPA could affect thyroid homeostasis, thyroid hormone production and interact with thyroid hormone receptors. Thyroid along with kidney, is the highest selenium containing tissue. Selenium is an essential trace element which is primarily by diet. Selenium is present in the structure of deiodinases, which have roles in thyroid hormone synthesis. In addition, as being a part of antioxidant selenoproteins, it protects the thyroid gland against oxidative stress. When organic and inorganic selenocompounds are taken at physiological doses, they can be protect the organism against the hazardous effects of several chemicals. In this thesis, we aimed to investigate the toxic effects of BPA on human papillary thyroid cancer cell line (B-CPAP) and the modifying effects of selenium supplementation against BPA toxicity. We evaluated the cytopathological changes, cytotoxicity, oxidant/antioxidant parameters and apoptosis caused by BPA on B-CPAP cells. Moreover, the protective roles of inorganic selenium (sodium selenite, SS) and organic selenium (selenomethionine, SM) were also assessed. Data have shown that BPA caused oxidative stress, elevated intracellular ROS and lipid peroxidation levels and decreases in total glutathione (GSH) levels in B-CPAP cell line. In addition, BPA also led to cytopathological alterations and apoptosis in these cells. Our findings suggest that selenocompounds could reduce the cytopathological changes, oxidant/antioxidant status alterations and apoptosis induced by BPA. We can conclude that one of the underlying mechanisms in the toxic effects of BPA in B-CPAP cells is oxidative stress. Inorganic and organic selenocompounds can be partially protective against BPA toxicity by their antioxidant functions in thyroid cells.

Keywords: Bisphenol A, selenium, oxidative stress, apoptosis, B-CPAP cell line.

This thesis is supported by Hacettepe Scientific Research Projects Coordination Unit, Project number: TYL-2018-17076

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bisfenol A	4
2.1.1. Bisfenol A'nın Kullanım Alanları	4
2.1.2. Bisfenol A'ya Maruziyet Yolları	5
2.1.3. Bisfenol A'nın Organizmadaki Yazgısı	6
2.1.4. Bisfenol A'nın Toksisitesi	7
2.1.5. Bisfenol A ve Tiroid	10
2.2. Selenyum	12
2.2.1. Selenyumun Kaynakları	12
2.2.2. Selenyumun Organizmadaki Yazgısı	13
2.2.3. Selenoproteinler	16
2.2.4. Selenyum ve Tiroid	18
2.3. Tiroid	19
2.4. Oksidatif Stres	22
2.4.1. Serbest Radikaller	22
2.4.2. Reaktif Oksijen ve Azot Bileşikleri	22
2.4.3. Lipit Peroksidasyonu	24
2.4.4. Glutatyon	26
2.5. Apoptoz	28
2.6. Bisfenol A ve Tiroid Homeostazına İlişkin Çalışmalar	31
2.6.1. <i>In vitro</i> çalışmalar	31

2.6.2. <i>In vivo</i> çalışmalar	36
2.6.3. Epidemiyolojik çalışmalar	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	41
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	42
3.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı	43
3.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	43
3.4.1. Bisfenol A Çözeltisinin Hazırlanması	43
3.4.2. Selenometiyonin ve Sodyum Selenit Çözeltilerinin Hazırlanması	43
3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	44
3.4.4. B-CPAP Hücrelerinin Lizis İşleminde Kullanılan Çözeltiler	44
3.4.5. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	44
3.4.6. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	45
3.4.7. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler	46
3.4.8. Reaktif Oksijen Bileşikleri Tayininde Kullanılan Çözeltiler	46
3.4.9. Total Glutasyon (GSH) Tayininde Kullanılan Çözeltiler	47
3.4.10. Lipit Peroksidasyonu Tayininde Kullanılan Çözeltiler	48
3.4.11. TUNEL Tayininde Kullanılan Çözeltiler	49
3.4.12. Kaspaz 3 Tayininde Kullanılan Çözeltiler	49
3.4.13. Kaspaz 8 Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	50
3.4.14. Işık Mikroskobu İncelemelerinde Kullanılan Çözeltiler	51
3.5. Yöntemler	52
3.5.1. <i>In vitro</i> Hücre Kültürü	52
3.5.2. Çalışma Grupları	52
3.5.3. Hücrelerin Çözülmesi ve Dondurulması	53
3.5.4. Hücrelerin Pasajlanması	54
3.5.5. Hücre Sayımı İşlemi	55
3.5.6. B-CPAP Hücrelerinin Lizisi ve Fraksiyonlanması	56
3.5.7. B-CPAP Hücrelerinde 3-(4,5-Dimetiltiazol- 2- il)-2,5– Difeniltetrazolyum bromür Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi	57
3.5.8. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Ölçümü	59
3.5.9. Protein Miktarının Belirlenmesi	60
3.5.10. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Belirlenmesi	62

3.5.11. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	63
3.5.12. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi	65
3.5.13. Mikroskopik İncelemeler	66
3.5.14. TUNEL Analizi	67
3.5.15. Kaspaz 3 Düzeylerinin Ölçümü	68
3.5.16. Kaspaz 8 Aktivitesinin Belirlenmesi	70
3.5.17. İstatistiksel Değerlendirme	72
4. BULGULAR	73
4.1. Sitotoksitenin belirlenmesi	73
4.2. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü	74
4.3. Deney Gruplarında Hücre Canlılıklarının Belirlenmesi	76
4.4. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Belirlenmesi	78
4.5. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	79
4.6. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi	80
4.7. Mikroskopik Bulgular	81
4.7.1. Faz Kontrast Mikroskobu Bulguları	81
4.7.2. Işık Mikroskobu Bulguları	82
4.8. Apoptotik Analizler	84
4.8.1. TUNEL Analizi	84
4.8.2. Kaspaz 3 Düzeyleri	86
4.8.3. Kaspaz 8 Aktiviteleri	87
5. TARTIŞMA	89
5.1. Hücre Canlılığı	91
5.2. Oksidatif Stres	93
5.2.1. ROS indüksiyonu	93
5.2.2. Total Glutasyon Düzeyleri	95
5.2.3. Lipit Peroksidasyonu	97
5.3. Mikroskopik incelemeler	98
5.3.1. Işık Mikroskobu İncelemeleri	98
5.4. Apoptotik Parametreler (TUNEL, Kaspaz 3, Kaspaz 8)	99
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	104
7. KAYNAKLAR	107
8. EKLER	123
EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler	123

EK-2. Dijital Makbuz	124
EK-3. Orijinallik Raporu	125
9. ÖZGEÇMİŞ	126



SİMGELER VE KISALTMALAR

μM	Mikromolar
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ATP	Adenozin trifosfat
BCA	Bişinkonininik asit
BPAG	Bisfenol A- glukuronit
BPAS	Bisfenol A- sülfat
BSA	Sığır serum albümini
CAT	Katalaz
DHPN	N-bis-(2-hidroksipropil)nitrozamin
DI	Deiyodinaz
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
D-PBS	Dulbecco'nun fosfat tamponlu serum fizyolojik
DTNB	5,5'- ditiyo- bis-(2- nitrobenzoik) asit
EC₅₀	Medyan efektif konsantrasyon
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ER	Östrojen reseptörü
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid (Okside glutasyon)
GST	Glutasyon S-transferaz
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IC₃₀	Hücrelerin %30'unun Öldüğü İnhibitor Konsantrasyon
IC₅₀	Medyan inhibitör konsantrasyon

KI	Potasyum iyodür
LC₅₀	Medyan letal konsantrasyon
LD₅₀	Medyan letal doz
MDA	Malondialdehit
MES	2-(N-Morfolin) etansülfonik asit
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-İl)-2,5 difenil tetrazolyum bromür
NAC	N-asetil sistein
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NIS	Sodyum iyodür eştaşınımı
nM	Nanomolar
NOAEL	Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz
NOEL	Toksik olmayan doz olarak saptanan doz
pH	Hidrojenin gücü
RNS	Reaktif azot bileşikleri
ROS	Reaktif oksijen bileşikleri
ROS	Reaktif oksijen bileşikleri
RPMI	Roswell Park Memorial Instute
RT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SAM	S-adenozil metiyonin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Se	Selenyum
SeCys	Selenosistein
SelP	Selenoprotein P
SM	Selenometiyonin

SOD	Süperoksit dismutaz
SS	Sodyum selenit
T3	Triiyodotironin
T4	Tiroidsin
TBA	Tiyobarbitürik asit
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α
TPO	Tiroid peroksidaz
TR	Tiroid reseptörü
Trx	Tiyoredoksin
TrxR	Tiyoredoksin redüktaz
TSH	Tirotropin
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP çentik uç işaretleme
UV	Mor ötesi ışın

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. BPA'nın biyotransformasyonu ve itrahi.	7
2.2. Bazı selenyum bileşiklerinin kimyasal formülleri.	13
2.3. Selenyumun organizmadaki biyotransformasyonu.	15
2.4. Hücre içi ROS oluşumu ve ROS'un temizlenmesi.	25
2.5. Glutasyon.	26
3.1. B-CPAP hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü.	52
3.2. Metabolik aktivite ile canlı hücrelerde MTT'nin formazan kristallerine dönüşüm metabolizması.	58
3.3. GPx aktivite ölçümü deneyinin esası.	59
3.4. Protein standart eğrisi.	61
3.5. Glutasyon döngüsü.	63
3.6. GSSG standart eğrisi.	65
3.7. MDA – TBA kompleksi oluşumu.	66
3.8. MDA standart eğrisi.	66
3.9. Kaspaz 3 standart eğrisi.	70
4.1. B-CPAP hücre canlılığı üzerine BPA'nın (10-600 µM) etkisi.	74
4.2. B-CPAP hücre canlılığı üzerine BPA'nın (10-600 µM) etkisi.	74
4.3. Selenometiyonin uygulanan B-CPAP hücrelerinde GPx aktivitesi.	75
4.4. Sodyum selenit uygulanan B-CPAP hücrelerinde GPx aktivitesi.	76
4.5. Deney gruplarında B-CPAP hücre canlılığı.	77
4.6. Hücre içi ROS düzeyleri.	78
4.7. Total glutasyon düzeyleri.	80
4.8. Malondialdehit düzeyleri.	81
4.9. B-CPAP tiroid karsinom hücre hattına ait hücrelere BPA ve/veya selenyum bileşikleri uygulaması sonrası morfolojik değişiklikler.	82
4.10. B-CPAP tiroid karsinom hücre hattına ait hücrelere BPA ve/veya selenyum bileşikleri uygulaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri.	83
4.11. Deney gruplarında apoptotik hücre yüzdeleri.	84
4.12. Deney gruplarında apoptotik hücreler.	85

4.13.	Kaspaz 3 düzeyleri.	86
4.14.	Kaspaz 8 aktiviteleri.	88



TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Bisfenol A'nın fizikokimyasal özellikleri ve kimyasal formülü.	4
2.2. Bisfenol A'nın medyan letal dozları.	8
2.3. Tiroid bezinde eksprese edilen selenoproteinler ve onların işlevleri.	18
2.4. Reaktif oksijen ve azot bileşikleri.	23
2.5. Apoptoz ve nekroz arasındaki morfolojik ve fonksiyonel farklılıklar.	29
4.1. BPA uygulanan B-CPAP hücrelerinin canlılığı.	73
4.2. B-CPAP hücrelerinde BPA'nın IC ₃₀ ve IC ₅₀ değerleri.	73
4.3. Selenometiyonin uygulanan B-CPAP hücrelerinde GPx aktivitesi.	75
4.4. Sodyum selenit uygulanan B-CPAP hücrelerinde GPx aktivitesi.	76
4.5. Çalışma gruplarında hücre canlılığı.	77
4.6. Hücre içi ROS düzeyleri.	78
4.7. Total glutatyon düzeyleri	79
4.8. Malondialdehit düzeyleri.	80
4.9. Kaspaz 3 düzeyleri.	86
4.10. Kaspaz 8 aktiviteleri.	87

1. GİRİŞ

Bisfenol A (BPA) plastikleri sertleştirme amacıyla plastik materyale eklenen fenol yapısında bir kimyasal maddedir. Plastik monomeri olarak yemek kapları, bebek biberonları, yapıştırıcılar, boya tozları ve diş hekimliğinde dolgu maddesi olarak kullanılır (1, 2). BPA, günümüzde dünya genelinde en çok üretilen kimyasal maddelerden biridir; her yıl 6 milyar pounddan fazla üretildiği bildirilmektedir. Çevrede yaygın olarak bulunduğu bilinmekte ve başlıca maruziyetin diyet ve su ile olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, otomobil, elektronik eşya, spor malzemeleri, CD ve DVD kaplama işlerinde çalışanlarda mesleki maruziyetin de söz konusu olduğu bilinmektedir (3, 4).

Günlük yaşamda BPA'ya oral, dermal ve inhalasyon yolu gibi çeşitli yollardan yaygın şekilde maruziyet gerçekleşebilir (5). BPA endokrin bozucu olarak bilinen ve endokrin bez fonksiyonları üzerinde, üretilen hormonun sentezinden metabolizmasına ve reseptöre bağlanmasına kadar değişen farklı basamaklarda etki gösterebilen bir kimyasal maddedir (6, 7). BPA'ya maruz kalmanın kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, tiroid fonksiyonu, obezite, üreme ve gelişimsel olumsuz sağlık sorunları ile bağlantısına ilişkin çeşitli çalışmalar mevcuttur (8-15).

Endokrin bozucu kimyasal maddelerin tiroid hormon metabolizması üzerine etkileri yönünden yapılan tüm çalışmalarda kesin bir ilişki kurmak mümkün olamamıştır. Bununla birlikte, ileri sürülen bazı mekanizmalar üzerinde durulmaktadır (16). Tiroid bezine toksik etkileri olduğu belirtilen maddeler, dolaşımdaki tiroid hormon miktarlarını etkileyebilmekte ve kolloid miktarındaki azalma, hipertrofik veya hiperplastik görünüm gibi tiroid histolojisinde değişimler meydana getirebilmektedir. Çeşitli çevresel kimyasal maddelerin tiroid hormon analogu gibi davrandığı veya tiroid reseptörlerine bağlanarak tiroid hormon sinyallerini bozabildiği belirtilmektedir (17-19).

Bisfenol A maruziyetinin tiroid dokusu ve homeostazı üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmalar sınırlıdır ve sonuçlarının çelişkili olduğu gözlenmiştir. Bundan dolayı BPA maruziyeti ve tiroid fonksiyonu arasındaki ilişki daha doğrulanmamıştır. Ancak, BPA'nın tiroid reseptörlerine zayıf bağlar ile bağlanarak T3

antagonisti gibi davrandığı ve tiroid reseptörleri aracılı transkripsiyonel aktiviteyi inhibe edebildiği belirtilmiştir. Gen düzeyindeki çalışmalarda ise Nkx2.1, paired box 8 (Pax8) proteinleri ve tiroid hormon sentezinde görev alan Tpo (Tiroid peroksidaz, NIS ve tiroglobulin (TG) genlerinin transkripsiyonlarında BPA maruziyeti ile artış gözlemlendiği saptanmıştır (6, 18, 20).

Gebe sıçanlara BPA uygulaması sonucu, doğan yavruların 15. gün total T₄ seviyelerinde kontrol grubuna göre artış olduğu, ancak 35. günde bu değerlerin normale döndüğü gözlenmiştir (21). Diğer taraftan, BPA'nın tiroid hormon reseptörlerine bağlanabildiği ve tiroid hormon reseptör kaynaklı gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olabileceği gösterilmiştir (22). BPA'nın tiroid hormon reseptörlerinin transkripsiyonunu genomik olmayan bir mekanizma ile baskıladığı bildirilmiştir.

İnsanlarda BPA'nın tiroid hormonları üzerine etkisi konusunda yeteri kadar çalışma yoktur. Mevcut çalışmalar BPA maruziyeti ile tiroid hormonlarında gözlenen değişimler arasında bir ilişkiyi düşündürmektedir (11, 23).

Tiroid, birim ağırlık başına selenyum içeriği en yüksek olan dokudur. Selenyum başlıca diyetle alınan esansiyel bir eser elementtir. Aktif tiroid hormon sentezinde görev alan deiyodinazların yapısında bulunur. Ayrıca, yapısında bulunduğu antioksidan selenoproteinler ile tiroid bezini oksidatif strese karşı korur. Organik ve inorganik formdaki selenyum bileşiklerinin fizyolojik dozlarda alımı, organizmada birçok kimyasalın oluşturduğu zararlı etkilere karşı koruyucu olabilir (24-26).

Bu bilgiler ışığında planlanan bu tez çalışmasında, endokrin bozucu etkileri ile ön plana çıkan BPA'ya maruziyetin tiroid hücresinde oluşturabileceği sitotoksiste, sitopatolojik ve apoptotik değişikliklerin irdelenmesi; ayrıca bu etkilerin oluşumunda rolü olabileceği düşünülen oksidatif stres varlığının hücre içi reaktif oksijen bileşikleri (ROS) oluşumu, lipid peroksidasyonu ve total glutatyon düzeylerindeki değişikliklerin izlenmesi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Tiroid bezi için önemli bir esansiyel element olan ve antioksidan etkileri ile ön plana çıkan selenyum bileşiklerinin bu olası toksik etkiler üzerinde koruyucu rolünün

değerlendirilmesi tezin bir diğer amacını oluşturmaktadır. Elde edilecek verilerin BPA maruziyetinin tiroid bezi ve tiroid homeostazı üzerindeki etkilerinin aydınlatılmasında ve bu etkilerin ortadan kaldırılması için geliştirilecek önleyici yaklaşımların geliştirilmesinde yararlı olacağı düşünülmektedir.

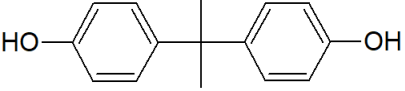


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bisfenol A

Bisfenol A (BPA) ilk defa Rus kimyager Alexandr Dianin tarafından 1891’de keşfedilmiş, daha sonra 1905 yılında Theodor Zincke tarafından sentez edilmiştir (27). Dodds ve Lawson (28) tarafından 1936 yılında yapılan bir çalışmada ovariektomi yapılmış sıçanlarda östrojenik aktivite gösterdiği saptanmıştır. BPA sentetik östrojen preparatı olarak kullanıma girmemesine rağmen 1940’lı yıllarda ticari amaçla ilk defa epoksi reçinelerinin yapımında kullanılmaya başlanmıştır ve 1957’de BPA’nın polimerleştirilmesiyle sentezlenen sert plastik olan polikarbonatların keşfiyle de birçok alanda cam ve çeliğin yerini almaya başlamıştır (29). BPA’nın fizikokimyasal özellikleri ve kimyasal formülü Tablo 2.1.’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Bisfenol A’nın fizikokimyasal özellikleri ve kimyasal formülü. (30)

Kimyasal formülü	
Kimyasal okunuşu (IUPAC)	4-[2-(4-hidroksifenil)propan-2-il]fenol
Molekül ağırlığı	228.291 g/mol
Erime noktası	152-153 °C
Kaynama noktası	250-252 °C
Çözünürlüğü	300 mg/L suda*
Özkütlesi	1.193 g/cm ³ *
Partisyon katsayısı (logP)	3.32
Ayrışma sabiti (pK _a)	9.6
Renk ve görünüm	Beyaz kar tanesi

* 25 °C’de oda sıcaklığında

2.1.1. Bisfenol A’nın Kullanım Alanları

Bisfenol A sanayide polikarbonatların ve epoksi reçinelerinin üretiminde ara ürün olarak kullanılmaktadır. Nihai ürün olarak yapışkanların, koruyucu kaplamaların, boya tozlarının, otomotiv lenslerinin, cam parlaticıların, kompakt disklerin, termal kâğıtların, optik lenslerin, kâğıt kaplamaların, alev geciktiricilerin, yapı malzemelerinin, boyaların bileşiminde, elektrik ve elektronik parçaların kaplamasında yer almaktadır (1). Gıdalarda ise BPA, polikarbonatın sert ve şeffaf yapıda olmasından dolayı plastik tabak, bardak, meşrubat şişeleri, bebek biberonu gibi birçok yiyecek

kaplarının yapımında ve epoksi reçinesi ise yiyecek ve içecek teneke ve varillerin koruyucu iç kaplamasında yer almaktadır (31). Plastik kaplarda bulunan “7” kodu, kabın BPA içeren plastikten yapılmış olabileceğini göstermektedir (32).

2.1.2. Bisfenol A’ya Maruziyet Yolları

Bisfenol A, günlük yaşamda büyük oranda maruz kalınan bir kimyasal maddedir. Oral, dermal ve inhalasyon yolu gibi çeşitli şekillerde maruziyet gerçekleşebilmektedir. BPA’nın ana maruziyet kaynakları olarak gıda ambalajları, tozlar, dental materyaller, sağlık hizmeti ekipmanları, termal kâğıtlar, çocuk oyuncakları sayılabilir (5).

Bisfenol A içeren gıda ambalaj materyallerinden gıda içerisine BPA migrasyonu gerçekleşebilmektedir. BPA’nın gıdaya migrasyonundaki temel faktör sıcaklıktır, gıdanın çeşidi ve gıdanın bileşimindeki yağ, glukoz, tuz, pH gibi birtakım faktörler BPA’nın gıdanın içeriğine migrasyonunu etkileyebilmektedir (33-37).

Bisfenol A’nın çevredeki mevcudiyeti antropojenik aktivite sonucuna bağlı olmaktadır. Atmosfere yayılımı başlıca endüstriyel aktivite sonucu görülmektedir (38). Fu ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada asyanın doğusundaki denize kıyısı olan şehirlerde ve endüstrileşmiş bölgelerde özellikle de Hindistan’ın şehirleşmiş bölgelerinde önemli ölçüde atmosferik BPA tayin edilmiştir (39).

Bisfenol A çevreye atık sularla da karışabilmektedir. Fabrikaların atık su arıtma sistemleri ile tam arıtma sağlanamadığı durumlarda sulara karışması halinde su için kirlilik oluşturmaktadır (40). Ayrıca plastik içeren katı atık depolama sahalarında meydana gelen sızıntıdaki BPA salınımı çevresel bir BPA kontaminasyonuna neden olabilmektedir (41). BPA atık su arıtma sistemlerinde meydana gelen atık su arıtma çamuru veya kontrolsüz katı atık depolama sahalarında meydana gelen sızıntı ile toprağa ulaşabilmektedir (42). BPA’nın çevrede kalıcı bir kirletici olmadığı yönünde deliller mevcuttur. Atmosferde fotooksidasyonu hızlı olmakla birlikte toprakta yarılanma ömrü 1-10 gündür. Ancak çevrede çok bulunması onu önemli bir kirletici konumuna getirmektedir (43). Bunlara ek olarak BPA nehir sularında kısa sürede (yarılanma ömrü 5 günden az) degrade olabilirken, deniz sularında bu degradasyon daha uzun sürede gerçekleşebilmektedir (44).

Diş hekimliğinde amalgam dolguların potansiyel toksisitelerinden dolayı BPA türevleri içeren reçine bazlı dental dolgular ve kompozitler diş tedavilerinde yer almaya başlamıştır. Bu malzemeler saf BPA yerine, BPA türevi maddeler içermesine rağmen diş operasyonunun ardından tükürük sıvısında BPA tespit edilebilmektedir (45).

Bisfenol A'ya dermal yolla maruziyet mümkün olabilmektedir. Biedermann ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada BPA içeren termal kâğıdın tutulması ile mürekkepli tarafa temas sonucu ortalama 1,13 µg BPA geçişi gerçekleşebileceği gösterilmiştir (46).

Bisfenol A'ya mesleki maruziyet ise başlıca plastik ve termal kâğıt endüstrisinde görülebilmektedir (47).

2.1.3. Bisfenol A'nın Organizmadaki Yazgısı

Bisfenol A'nın organizmadaki biyotransformasyonuna ilişkin insan çalışmaları etik sorunlardan ve BPA'ya tam anlamıyla maruz kalmayan bireyleri belirlemenin güç olmasından dolayı zorluk göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı BPA'nın biyotransformasyonuna ilişkin sorular hayvan modelleriyle özellikle de kemirgenlerle yapılan çalışmalarla giderilmeye çalışılmıştır (48).

Bisfenol A oral yoldan alındığında gastrointestinal kanaldan kolaylıkla emilerek absorbe olabilmektedir. Portal dolaşım ile karaciğere geldikten sonra etkin bir şekilde ilk geçiş etkisine uğrar ve neredeyse tamamen glukuronik asit konjugasyonu ile konjuge olarak BPA- glukuronit (BPAG) konjugatı meydana gelir. Hızlı gerçekleşen glukuronidasyondan dolayı, az miktarda sülfat konjugasyonu gibi diğer biyotransformasyon reaksiyonları meydana gelebildiği rapor edilmiştir (49, 50).

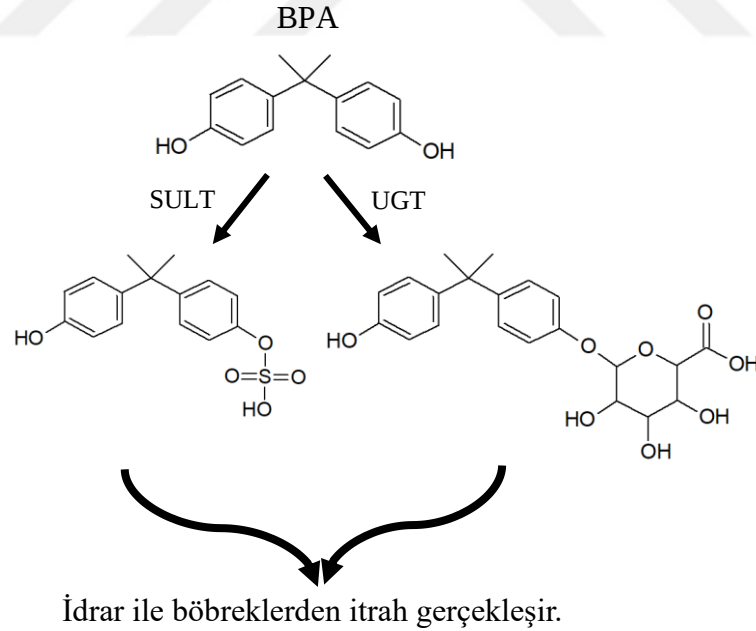
Bisfenol A- glukuronit'in yarılanma ömrü 6 saatten azdır ve hızlı bir şekilde idrardan atılır. Minör metabolit olan BPA-sülfat (BPAS) da idrardan itrah edilerek organizmadan uzaklaştırılır. Her iki konjugatın da endokrin bozucu aktivitesi olmadığı için bu yollar detoksifikasyon yolları olarak ifade edilmektedir (51).

Oral alımı takiben BPA'nın 24 saat içerisinde tamamen vücuttan itrahi gerçekleşebilmektedir (49).

Bisfenol A'nın toksikokinetiği insan ve sıçanlarda farklılık göstermektedir. Sıçanlarda BPA, BPA-glukuronit ve az miktarda BPA-sülfat şeklinde biyotransformasyona uğrar ve karaciğerden safraya itrah gerçekleşir, barsaklarda konjugatların enzimatik yıkımı sonucu BPA serbest hale geçer ve BPA sıçanlarda enterohepatik siklusa uğrar. Bundan dolayı BPA sıçanlarda muhtemel olarak kanda daha yüksek miktarlarda bulunabilir ve BPA'nın eliminasyon süresi de uzayabilmektedir. İnsanlarda ise BPAG enterohepatik siklusa uğramayarak böbreklerden itrahı gerçekleşmektedir (49, 52). BPA'nın biyotransformasyonu ve itrahı Şekil 2.1.'de gösterilmektedir.

2.1.4. Bisfenol A'nın Toksisitesi

Bisfenol A'nın akut toksisitesi oral yoldan düşük olarak değerlendirilmektedir. Tablo 2.2.'de BPA'nın medyan letal dozları verilmiştir. BPA, medyan letal doz sınıflandırılmasına göre sıçanlarda intravenöz yoldan uygulandığında “şiddetli toksik” olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca BPA göz ve solunum yolu irritanıdır. Ciltte ise irritasyona neden olmamaktadır (38, 53-55).



Şekil 2.1. BPA'nın biyotransformasyonu ve itrahı.

UGT: Uridin 5'-difosfo-glukurunozil transferaz SULT: Sülfotransferaz

Tablo 2.2. Bisfenol A'nın medyan letal dozları.

Tür	Doz	Veriliş Yolu
Sıçan	3250 mg/kg vücut ağırlığı	Oral
	5000 mg/kg vücut ağırlığı	Oral
	3300 – 4100 mg/kg vücut ağırlığı	Oral
	170 mg/m ³	İnhalasyon
	841 mg/kg vücut ağırlığı	İntra peritoneal
	35.26 mg/kg vücut ağırlığı	İntra venöz
Fare	2400 mg/kg vücut ağırlığı	Oral
	150 mg/kg vücut ağırlığı	İntra peritoneal
Tavşan	2230 mg/kg vücut ağırlığı	Dermal

Bisfenol A zayıf östrojenik aktivite gösteren bir ksenoöstrojendir. Bu nedenle endokrin bozucu olarak adlandırılmaktadır (38). Östradiolden 1000- 10000 kat daha az affinite ile östrojen reseptörü alfa (ER α) ve östrojen reseptörü beta (ER β)'ya bağlanabildiği bilinmektedir (6). Günümüzde yapılan çalışmalarla beraber BPA'nın düşük dozlarda hücrel cevapları da değiştirebildiği gösterilmiştir (6, 56-58).

Gelişme çağı genellikle endokrin bozucu kimyasallara karşı en hassas dönemlerdir. Aynı zamanda bu bileşiklere hassasiyeti artıran bazı fizyolojik dönemler (gebelik gibi) erişkinlikte olabilmektedir (59). Bundan dolayı fetüsün bazı östrojenik bileşiklere maruziyeti reproduktif organların büyüme ve gelişmesinde değişikliğe yol açabilmekte ve birçok hastalığa neden olabilmektedir (60).

Erişkinlikte artmış BPA düzeyi çeşitli hastalıklar, istenmeyen sağlık sorunları ve tıbbi durumlarla ilişkili olabilmektedir. Artan BPA maruziyeti ile beraber diyabet (61), kardiyovasküler hastalıklar (62), karaciğer enzimlerinin değişimi, kadınlarda tekrar eden düşükler ve prematüre doğum sayısında artış, *in vitro* fertilizasyon tedavisi alan kadınlarda östrojen pik seviyesinde azalma, kurtarılan oosit sayısında azalma, postmenopozal kadınlarda artmış inflamasyon ve oksidatif stres, erkeklerde azalmış semen kalitesi, artmış sperm DNA hasarı (9) ve olgunlaşmamış sperm oranında artış ve sperm motilitesinde azalma (63) ile ilişki bulunduğu raporlar mevcuttur. Ancak, BPA seviyeleri ve sağlık sorunları arasındaki ilişkinin nedenselliği tam olarak kanıtlanmamış durumdadır ve yapılan çalışmalar genellikle ilk adımı temsil etmekle beraber bu konularda daha çok veriye ihtiyaç olduğu belirtilmektedir (6).

Bisfenol A'nın organizma üzerinde advers etkilerinin anlaşılması için yapılan *in vitro* çalışmalarda deneylerin 1/5'inden fazlasında non-monotonik doz cevap eğrisi saptanmıştır. Bu konuda yapılmış araştırmaların irdelendiği bir meta analiz çalışmasında, değerlendirilen çalışmaların 1/3'ünden fazlasının uygun şekilde tasarlanmış ve birden fazla dozun denendiği araştırmalar olduğu belirtilmiş; bununla birlikte non-monotonik doz cevap eğrisine işaret eden çalışmaların göz ardı edildiği veya dikkate alınmadığı vurgulanmıştır (64).

Jenkins ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada MMTV-erbB2 transgenik farelerde 0, 2.5, 25, 250, 2500 µg BPA / L içme suyu olarak verilmiş ve farelerin meme bezinde kontrole kıyasla en düşük dozlar olan 2.5 ve 25 µg BPA/ L içme suyuna maruz kalan farelerde fare başına tümör sayısının belirgin ve anlamlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Ancak yüksek dozlar olan 250, 2500 µg BPA/ L dozlarında ise kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bu çalışma ile BPA'nın kanser gelişimi açısından *in vivo* non-monotonik doz cevap ilişkisi gösterebileceği belirtilmiştir (65).

Tyl ve ark. (2002) tarafından BPA'nın 3 kuşak reproduktif toksisitesini araştırmak amacıyla Sprague- Dawley sıçanları üzerinde yapılan bir diğer araştırmada erkek ve dişi 30 sıçana 0,001; 0,02; 0,3; 5; 50 ve 500 mg/kg vücut ağırlığı/ gün dozunda BPA verilmiştir. Her iki cinsiyette de kuşaklar boyunca düşük dozda (0,001- 500 mg/ kg/ gün) non-monotonik doz cevap eğrisinin görülmediği ve BPA'nın normal doz yanıt eğrisi gösterdiği ortaya konmuştur. Erişkin sistemik toksisite için NOAEL değeri 5 mg/ kg vücut ağırlığı/ gün ve reproduktif ve postnatal gelişim toksitesi için ise NOAEL değeri 50 mg/ kg vücut ağırlığı/ gün olarak belirlenmiştir. Bu araştırmada BPA'nın maternal toksisite göstermediği dozlarda selektif reproduktif ve gelişimsel toksisiteye neden olacak bir madde olmadığı ortaya konmuştur (66).

Bisfenol A'nın reproduktif toksisitesi için Tyl ve ark. (2008) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise CD-1 farelerde iki kuşak BPA'nın toksisitesi araştırılmıştır. Çalışmada her bir dişi ve erkek grubunda 28 fare kullanılmış ve 17-β-estradiol pozitif kontrol ve 0,003; 0,03; 0,3; 5, 50, 600 mg/kg vücut ağırlığı/ gün dozunda BPA'ya maruz bırakılmıştır. Düşük doz olan 0.003 – 5 mg/ kg vücut ağırlığı/ gün doz aralığında herhangi bir etki görülmediği ve herhangi bir parametrede non-

monotonik doz eğrisi görülmediği ortaya konmuştur. Sistemik toksisite ile reproduktif ve gelişimsel toksisite için NOEL değeri sıçanlar için elde edilen NOEL değerleri ile aynı bulunmuştur. Bu çalışmada BPA'nın selektif reproduktif ve gelişimsel toksisiteye neden olacak bir madde olmadığı ortaya konmuştur (67).

Bisfenol A tarafından oluşturulan sitotoksitenin, intraselüler enerji seviyesine bağlı olabildiği belirtilmekte ve BPA'nın ATP sentezini mitokondride azalttığı gösterilmektedir. Sonuç olarak mitokondri bileşiğinin önemli bir hedefi olarak görülmektedir (68). Khan ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada Wistar sıçanlarının karaciğerlerinde BPA maruziyetinin elektron transportunda işlev gören enzimlerin aktivitesini azalttığı, lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu, mitokondriyel süperoksit oluşumunu artırdığı, antioksidan süperoksit dismutaz aktivitesinde ve total glutatyon seviyelerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (69). Ayrıca, detoksifiye edilmemiş serbest BPA molekülünün fenoksil radikallerinin enzimatik ve non-enzimatik olarak ROS'u indüklediği çalışmalarla ortaya konmuştur (70-72). Kaur ve ark. (2018) tarafından yapılan bir araştırmada, erkek BALB/c farelerine 1 mg/ kg vücut ağırlığı/ gün BPA 4 hafta süreyle oral yoldan uygulanmış, sonucunda testiste ROS ve lipit peroksidasyonu seviyelerinin anlamlı düzeyde arttığı ve sperm konsantrasyonu ve motilitesinde anlamlı düzeyde azalma gözlemlendiği belirlenmiştir (73). BPA'nın sıçan ve farelerde ROS oluşumunun artışı ile oksidatif hasara yol açtığına ve buna bağlı olarak karaciğer, böbrek, beyin ve diğer organlara zarar verdiğine ilişkin çalışmalar mevcuttur (74-76).

Bisfenol A'nın endokrin bozucu etkilerine bağlı olarak veya bu etkilerinden bağımsız bir şekilde oksidatif stresi indüklemeleri ile kanser, reproduktif toksisite ve hastalıkların gelişimine yol açabileceği ileri sürülmektedir (72).

2.1.5. Bisfenol A ve Tiroid

Tiroid hormonlarının organizmanın normal büyüme, iskelet ve beyin gelişiminde, lipit metabolizmasının düzenlenmesinde, barsaklardan karbonhidratların emiliminde ve metabolik olarak aktif dokularda oksijen tüketiminin artmasıyla kalorijenik etkileri mevcuttur (77).

Tiroid hormonları hücrede etkilerini tiroid reseptörleri (TR) aracılığıyla gösterir. Tiroid reseptörleri steroid hormon reseptör süperfamilyasının üyelerindendir. TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2 olmak üzere çekirdekte 4 tane reseptör proteini tanımlanmıştır. TR β 1 hariç diğer bütün reseptörler yaygın bir dağılım gösterirler (78).

Bisfenol A'nın organizmada tiroid hormon sistemini bozucu yönde etki gösterebilmektedir.

Bisfenol A'nın TR antagonisti olarak transkripsiyonel inhibisyon ile sonuçlanan ko-represör olarak görev görür ve çekirdekteki tiroid reseptörlerine T3'ün bağlanmasını azaltmakta olduğu gösterilmiştir (17). BPA'nın TR'ye olan affinitesi ER'ye olan affinitesinden daha azdır, bundan dolayı tiroid hormon etkisini antagonize etmesi için BPA'nın daha yüksek konsantrasyonlarda olması gerekmektedir (6).

Farelerden elde edilen oligodentrosit prekürsör hücrelerinde T3 ile indüklenen farklılaşmayı BPA'nın bozabildiği ortaya konmuştur (79). BPA'nın ayrıca FTC-238/hTPO rekombinant transgenik insan tiroid foliküler hücre hattında tiroid peroksidaz (TPO) aktivitesini anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (80).

İnfertilite kliniğine başvurmuş 167 erkek ile yürütülen kesitsel epidemiyolojik bir çalışmada idrar BPA konsantrasyonu ile serum TSH seviyesi arasında zıt bir ilişki bulunduğu ortaya konmuştur (23). Meeker ve ark. (2011) tarafından ABD'de yapılan Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Çalışmasında (NHANES) erişkinlerde serum total T4 seviyeleri ve idrar BPA konsantrasyonu arasında zıt bir ilişki saptanmıştır. Araştırmacılar benzer şekilde, serum TSH seviyeleri ile idrar BPA konsantrasyonu arasında zıt bir ilişkinin olduğunu belirtmiş ancak veri çalışma içeriğine dahil edilmemiştir (11). Chevrier ve ark. (2013) tarafından yapılan bir diğer çalışmada (CHAMACOS) gebelerde serum total T4 seviyeleri ile idrar BPA konsantrasyonu arasında zıt bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Ayrıca erkek yenidoğanlarda da serum TSH seviyeleri ile maternal idrar BPA konsantrasyonu arasında zıt bir ilişki ortaya konmuştur. Fakat gebeliğin erken dönemleri ile karşılaştırıldığında bu durum 3. trimester gibi geç dönemde daha belirgin hale geldiği gösterilmiştir (81).

Bisfenol A'nın halojenlenmiş türevleri olan tetrabromobisfenol A ve tetraklorobisfenol A türevlerinin tiroid agonistik aktiviteye sahip oldukları ancak BPA'nın agonistik etki göstermediği tiroid hormona cevap veren sıçan hipofiz kanser hücre hattı GH3'de çalışılarak ortaya konmuştur (82).

2.2. Selenyum

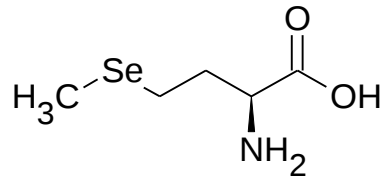
Selenyum, İsveçli kimyager Jöns Jacob Berzelius tarafından sülfürik asit üretimi sırasında meydana gelen kalıntının farkedilmesiyle keşfedilmiştir. Cevherlerdeki kalıntının ilk başta tellüryum olduğu sanılmış, 1817 yılında Berzelius yeni bir elementin varlığını keşfetmiştir. Bu element, Yunan ay tanrıçası olan *Selene*'ye ithafen selenyum olarak adlandırılmıştır (83). Selenyum, periyodik tabloda 6A grubunda bulunan metalik ve nonmetalik özelliklere sahip bir elementtir ve atom numarası 78.96'dır. Se doğada ve biyolojik sistemlerde selenat (Se^{6+}), selenit (Se^{4+}), selenid (Se^{2-}) ve elementel selenyum (Se^0) formlarında bulunur. Selenit ve selenat bileşiklerinin tuzları genellikle suda çözünür (84, 85).

Başlangıçta selenyumun yüksek derecede toksik ve karsinojenik bir element olduğu düşünülmüştür. Ancak laboratuvar çalışmaları sonucunda ve besi hayvanı üretiminde selenyumun toksik madde olmadığı sonucuna varılmış, organizma için esansiyel etkilerinin olduğu da anlaşılmıştır. Sonrasında ise selenyum esansiyel bir eser element olarak tanımlanmıştır (24).

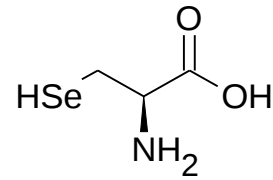
2.2.1. Selenyumun Kaynakları

Selenyum'un diyetle alınabilecek başlıca kaynakları; deniz ürünleri, et, karaciğer, böbrek gibi iç organlar, içme suyu, toprağın selenyum içeriği ve formuna bağlı olarak değişen miktarda tahıllar ve tohumlar önemli selenyum kaynakları olarak görülmektedir (26). Gıdalarla alınan başlıca selenyum formları; başta tahıllardan olmak üzere bitkisel kaynaklardan selenometiyonin (SM), yine bitkisel kaynaklı başlıca brokoli, soğan, sarımsak gibi bitkilerde bulunan Se-metilselenosistein ve γ -glutamil-Se-metilselenosistein, hayvansal gıdalardan selenosistein (SeCys) ve başlıca tuna ve uskumru gibi balıklarda bulunan selenonein ve nadiren de olsa sudan selenat olarak sıralanabilir (86). Selenyum diyetin doğal bir bileşeni olmasının yanı sıra gıda takviyesi olarak da kullanılmaktadır. SM, selenyumca zengin maya (başlıca SM

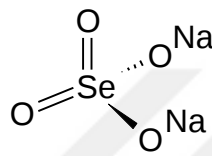
içerir), inorganik selenyum formları olan sodyum selenat ve sodyum selenit (SS) tuzları halinde gıda takviyelerinde yer alabilmektedir (87). Bazı selenyum bileşiklerinin kimyasal formülleri Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



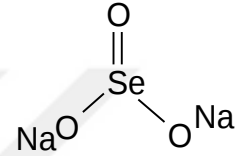
Selenometiyonin



Selenosistein



Sodyum selenat



Sodyum selenit

Şekil 2.2. Bazı selenyum bileşiklerinin kimyasal formülleri.

Birleşik Krallık (BK)'ta ortalama diyeti temsil eden gıdalarla yapılan total diyet çalışmasında başlıca selenyum kaynakları sırasıyla; kırmızı ve beyaz et, ekmek ve tahıllar, balık, süt ve süt ürünleri olarak sıralanmaktadır (86). Türkiye'de ise buğday ürünleri ülkenin başlıca gıdası konumundadır ve kuru diyetin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Ülkemizde ortalama bir kişi 400 g ekmek tüketmektedir ve bu da selenyum açısından yaklaşık 20 µg selenyum alımına karşılık gelmektedir (88).

2.2.2. Selenyumun Organizmadaki Yazgısı

Absorpsiyon:

Selenyum başlıca duodenumdan absorbe edilmektedir. SM ve metiyonin aynı aktif transport mekanizması ile absorbe olmaktadır ancak, selenosisteinin transportu hakkında çok az şey bilinmektedir. Selenat ve selenit gibi inorganik selenyum bileşikleri pasif difüzyonla absorbe olmaktadır (89). SM, selenat ve selenit formları kolaylıkla, %80'den daha yüksek oranda oral yoldan absorbe olabilmektedir. Elementel ve selenid formları ise hemen hemen insolubl olarak adlandırılır veya çok az absorbe edilir (84). İnhalasyon ve dermal yolla da absorpsiyon gerçekleşmektedir ve iş yeri maruziyeti açısından bu maruziyet yolları da önem arz etmektedir (90).

Dağılım:

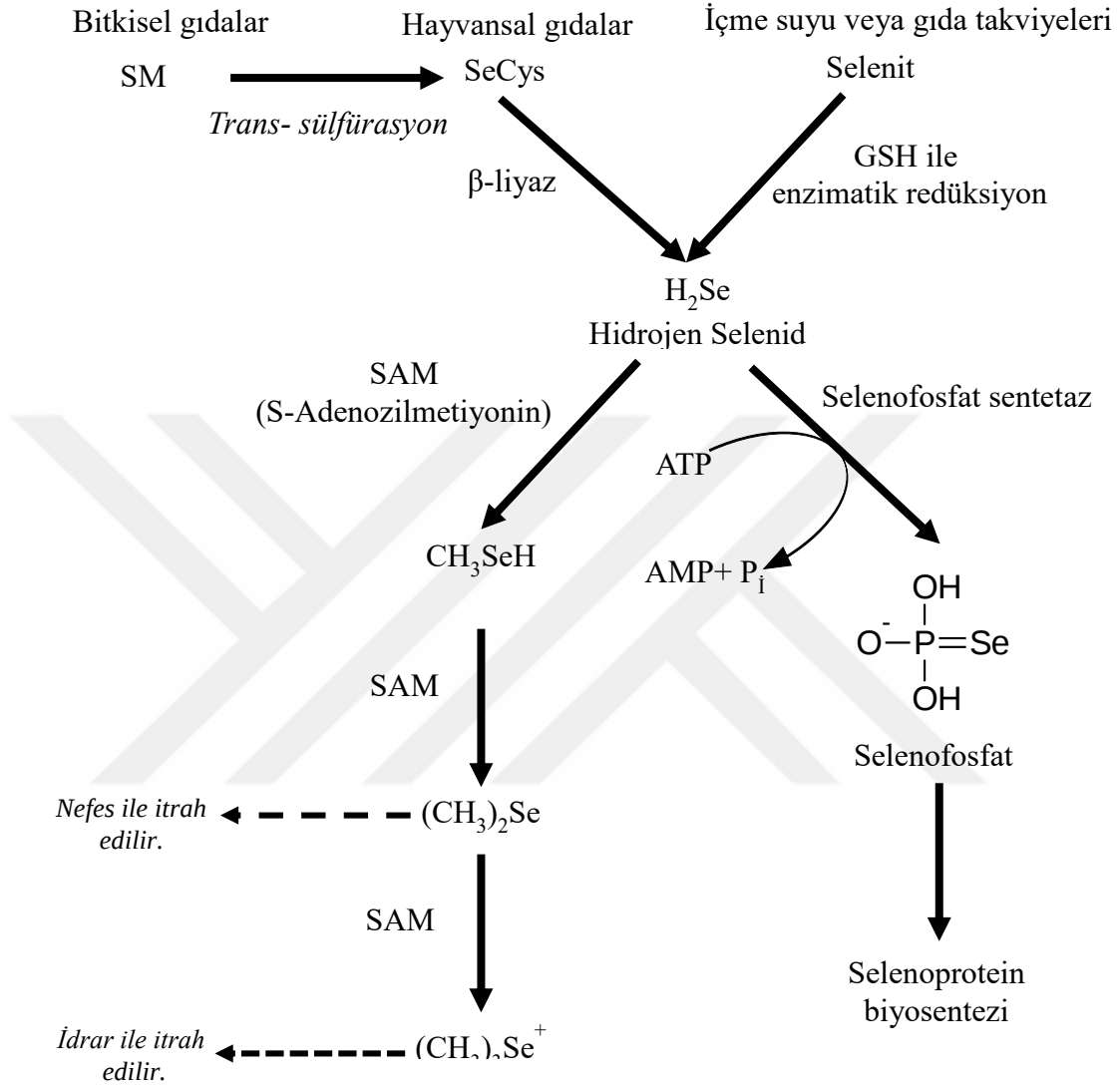
Absorpsiyon gerçekleştikten sonra başta albümin olmak üzere kandaki birçok farklı protein ile selenyum taşınmaktadır. Selenit eritrositlerde glutatyon (GSH) ve glutatyon redüktaz (GR) vasıtasıyla hidrojen selenide (H_2Se) dönüştürülür. Karaciğer ve böbrekte selenyum yüksek miktarda tutulum göstermektedir. Diğer tutulum yerleri de başlıca kas ve kan dokusu olmaktadır. Diyetle yeterli alım olmadığında kas ve karaciğerde selenyum miktarı hemen düşerken böbrekte bu durum korunabilmektedir. Bundan dolayı böbrek selenyum dengesi açısından önemli bir organ olabilir. Kas dokusu selenyum konsantrasyonu açısından nispeten az görünse de vücuttaki kas kitlesi büyüklüğü düşünüldüğünde selenyum açısından kaslar majör depo kompartmanı olarak görev yapmaktadır. Tiroit, hipofiz, testis, böbrek üstü bezleri gibi endokrin dokular diğer organlara kıyasla yüksek oranda selenyum içermektedir. Tüm organlar arasında gram doku başına selenyum içeriği en yüksek organın, insan tiroid bezi olduğu belirtilmektedir (24, 91, 92).

Dokulardaki selenyum tutulumu ile diyetle selenyum alımı arasında yakın ilişki bulunmuştur. Selenyum alımı ve tam kan selenyum seviyesi arasında pozitif ilişki saptanmıştır. Serum ve plazma selenyum seviyesi, tam kan selenyum seviyesinin %75'ini yansıtmaktadır. Bu seviyelerin geçmiş selenyum alımı ile doğrudan ilişkili olduğu görülmektedir. Tam olarak diyetle selenyum alımını ve vücut selenyum deposunu yansıtmasa da serum ve plazma selenyum seviyeleri klinik olarak organizmadaki selenyum düzeylerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (91).

Biyotransformasyon:

Memeli dokularında selenit tuzları GSH ile redüklenerek hidrojen selenid (H_2Se)'e dönüştürülür. SM, trans-sülfürasyon reaksiyonu ile SeCys'e dönüştürülür, ayrıca doğrudan non-spesifik olarak protein yapımında kullanılabilir. SeCys ise β -liyaz ile hidrojen selenid ve alanine parçalanır. Bu şekilde selenoprotein prekürsörü olan hidrojen selenid havuzu meydana getirilir. Hidrojen selenid ve ATP ile selenofosfat sentetaz aracılığıyla selenofosfatlara çevrilmesi sonucu oluşan selenofosfatlar selenoprotein sentezi için kullanılır. Hidrojen selenid, S-adenozil metiyonin (SAM) aracılığıyla metillenerek organizmada metil selenoller meydana

getirilir ve organizmadan selenyum uzaklaştırılır (93). Selenyumun organizmadaki biyotransformasyonu Şekil 2.3.'te özetlenmiştir.



Şekil 2.3. Selenyumun organizmadaki biyotransformasyonu. (93)

ATP: Adenozin trifosfat AMP: Adenozin monofosfat Pi: inorganik fosfat

Eliminasyon:

Selenyumun organizmadan itrahı başlıca idrarla olur. SM hariç SeCys, selenat ve selenitin organizmadaki fazlası idrarla atılır. Günlük selenyumun idrarla itrahı, diyetle selenyum alımı ve plazma selenyum seviyesi ile yakından ilişkilidir. Absorbe olmayan selenyum feçesle atılır (89). Selenyumun organizmada metilasyonu sonucu oluşan ürün trimetil selenid, primer konjugasyon ürünüdür ve böbrekler vasıtasıyla idrar ile itrah olan konjugattır. Feçesle itrah da mümkün olabilmektedir. Dimetil

selenid az miktarda oluşan ve maruziyet arttıkça artan bir konjugattır. Ter ve solunum yolu aracılı olarak atılımı görülebilir. Selenyumun fazla miktarda maruziyeti ile nefeste sarımsak kokusu gözlenmektedir (94).

2.2.3. Selenoproteinler

İnsan genomunda UGA kodonuna selenosistein eklenmesini belirten 25 selenoprotein geni bulunur. Selenoprotein mRNA'sında UGA kodonu ile karşılaşıldığında, selenosisteinin translasyonel yerleştirilmesi Sec-tRNA^{[Ser]Sec} ile yapılır. Bu tRNA diğer selüler tRNA ların yanında onu olağandışı yapan birkaç özelliğe sahiptir. Bu tRNA selenosistein taşımaz bunun yerine yapısında serin içerir. Enzimatik yollarla ATP ile yapısındaki serinin hidroksil grubuna, hidrojen selenit dönürlüğünde selenosistein protein yapısına dahil olur (95). Selenoprotein sentezinin yanı sıra UGA kodonu aynı zamanda stop kodonu olarak işlev görmektedir. Organizmada selenoprotein biyosentezi için bulunan selenoprotein mRNA'sında ise UGA stop kodonu olarak işlev görmemektedir. Organizmada selenoprotein biyosentezi için bulunan selenoprotein mRNA'sında ise, mRNA'nın translasyone olamayan bölgelerinde SECIS (Selenosistein yerleştiren sekans)'in bulunması UGA'nın protein yapısına selenosistein yerleştirmesini sağlamaktadır (96).

Sayısal sekans analizleri sonucunda insanın tüm genomunda selenoproteinleri şifreleyen 25 genin varlığı belirlenmiştir. Selenyum biyolojik etkisini birçok selenoprotein aracılığıyla göstermektedir. Selenoproteinlerin çoğu redoks regülasyonunda görev alır (89, 97).

Tanımlanan ilk selenoprotein memeli glutatyon peroksidaz 1 (GPx1) enzimidir (98). Günümüzde selenoproteinlerin birçok fizyolojik yollara dahil oldukları bilinse de yeni tanımlanan selenoproteinlerin birçoğunun işlevleri iyi karakterize edilememiştir (99).

Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz, peroksitleri redükler ve hücreye zarar vermesini engeller. Vitamin E, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ile birbirine bağımlı olarak çalışan bir enzimdir. Bu antioksidan moleküller/enzimler serbest radikallerin

oluşumunu engeller ve dokularda meydana gelebilecek oksidatif hasarı azaltır (100). Sitozolik glutatyon peroksidaz (GPx1), gastrointestinal glutatyon peroksidaz (GPx2), plazma glutatyon peroksidaz (GPx3), fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz (GPx4), olfaktöryal glutatyon peroksidaz (GPx6) GPx familyasının insanda bulunan selenoproteinleridir (99).

Tiyoredoksin Redüktaz

Tiyoredoksin redüktazlar (TrxR), redoks proteini olan tiyoredoksin (Trx) ve bunun yanı sıra endojen ve ekzojen bileşiklerin NADPH bağımlı redüksiyonunu katalizler. TrxR'ler aynı zamanda oksidan hasarına karşı koruyucu, hücre büyüme ve transformasyonunda, askorbatın redükte forma dönüşümünde rol oynarlar. Memelilerde sitozolik tiyoredoksin redüktaz (TrxR1), mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz (TrxR2), tiyoredoksin-glutaredoksin redüktaz (TrxR3) olmak üzere 3 tip TrxR mevcuttur (97, 101).

İyodotironin Deiyodinaz

İyodotironin deiyodinazlar (Dİ), tiroid hormon aktivasyonunda ve deaktivasyonunda önemli bir enzim ailesidir. Çok az aktif olan tiroksinin (T4) tiroid hormon reseptörlerinin (TR) ana ligandı olan triiyodotironin (T3)'e dönüşümü deiyodinazlar tarafından katalizlenir (102). T4'ün T3'e periferik dönüşümü, üretilen T3'ün %80'ine karşılık gelmektedir. Bu önemli adım tip 1 ve tip 2 Dİ'ler tarafından T4'ün dış halkanın 5' konumunun deiyodinasyonu ile gerçekleştirilerek katalizlenirken; tip 3 Dİ, T4 ve T3'ün iç halkasının 5 konumunun deiyodinasyonunu ile tiroid hormonunun çalışmasını inaktive eder (103).

Bu enzimlerin mevcudiyeti tiroid hormonunun etkisinin başlatılmasına veya durdurulmasına olanak sağlar. Ayrıca T4'ün kanda dolaşan seviyesi sabit olmasına rağmen dokuya özgü ve kronolojik şekilde aktif tiroid hormonu T3'ün intraselüler konsantrasyonunun şaşırtıcı bir şekilde akut olarak değişimini sağlamaktadır (104).

Selenoprotein P

Selenoprotein P (SelP) plazmadaki total selenyumun yaklaşık %50'sini oluşturan, plazmaya sekrete olan ve eksprese edilen bir selenoproteindir (99). SelP

glikoprotein yapıda olup, 10 Selenosistein kalıntısı içermektedir. (105). Mevcut deliller SelP'nin özellikle beyin ve testis gibi periferik dokulara selenyum transportunda ve dokuların selenyum bakımından sınırlı koşullar altında işlevlerinin korunmasında önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (99). Selenyum transportunun yanı sıra oksidan hasarına karşı savunmada hizmet ettiği de ortaya konmuştur (105, 106).

Selenyum alımı azaldığında, SelP sentezinin GPx sentezinden daha önce azaldığı gösterilmiştir. SelP, plazma veya selüler GPx aktivitesi kadar hassas olduğundan, insanlarda selenyum seviyesinin biyolojik belirteci olarak SelP'nin daha önem arz ettiği belirtilmektedir (100, 107) .

Selenyumun yetişkinler için günlük diyetle önerilen miktarı 55 µg'dır (108). Selenyum formuna bağlı olarak değişebilen bu değer, GPx'ın aktivitesinin maksimum olduğu, organizmaya yeterli geleceği değer olarak görülmüştür. Ancak, 2005 yılında Xia Y ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada bu miktarda SelP'nin ekspresyonunun maksimum olması için daha yüksek miktarda plazma selenyum seviyelerine ihtiyaç olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre selenyum için öngörülen RDA (Önerilen günlük alım düzeyi) değerinin daha yüksek olarak değiştirilmesi gerektiği ve bu konuda revizyon gerekliliği ortaya konmuştur (109).

2.2.4. Selenyum ve Tiroid

Normal insan tiroid bezinde selenyum içeriğinin yüksek olması nedeniyle selenoproteinlerin çoğunun tiroisitlerde ve tiroid bezinde ekspresyonunun gerçekleşmesi şaşırtıcı değildir (110). Tiroid bezinde eksprese edilen selenoproteinler ve onların işlevleri Tablo 2.3.'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Tiroid bezinde eksprese edilen selenoproteinler ve onların işlevleri.

Selenoprotein	İşlevleri
Glutasyon Peroksidaz	GPx izozimleri, redükleyici kosubstrat olarak glutasyonu kullanarak peroksitlerin degradasyonunu katalizlerler (111).
Sitozolik GPx	Oksidatif hasar ve hasarın sonuçlarına karşı hücreyi korur (112).
Ekstraselüler GPx	Ekstraselüler ve intraselüler H ₂ O ₂ 'nin detoksifikasyonunda ve tiroid hormonlarının sentezinin regülasyonunda görev alır (113, 114).

Tablo 2.3. (Devam) Tiroid bezinde eksprese edilen selenoproteinler ve onların işlevleri.

Fosfolipit GPx	Fosfolipit hidroperoksitleri redükleyerek membran lipitlerini korur, hücre sağ kalımı kontrolünde ve apoptoz düzenleyici olarak görev alır (115).
İyodotironin deiyodinaz	Aktif tiroid hormonu T3 ve inaktif tiroid hormonu reverse T3 oluşumunu katalizler (116).
Tip 1 Dİ	Tiroid bezinde aktif T3 oluşumunu katalizler ve sistemik T3 oluşumunu sağlar (86, 117).
Tip 2 Dİ	T4'ün T3'e dönüşümünü katalizler ve lokal T3 oluşumunu sağlar. (118).
Tiyoredoksin redüktaz	Tirositleri peroksit hasarına karşı korunmasını sağlar ve tirositlerde yüksek oranda eksprese edilir (119).
TrxR1	Transkripsiyonel faktörlerin aktivitelerinde, hücre proliferasyonunun ve apoptozun kontrolünde görev alır (86). Hücresel seviyede başlıca antioksidanlardandır (112).
TrxR2	Hücre proliferasyonunun regüle eder (112).
Selenoprotein 15	Endoplazmik retikulumda bulunur ve protein katlanmalarında şaperon işlevi gören selenoproteindir (92, 120) .

Yukarıda da özetlendiği üzere, birçok selenoenzim (glutasyon peroksidazlar ve tiyoredoksin redüktazlar) tiroositleri oksidatif hasara karşı, güçlü antioksidan özellikleriyle korumaktadırlar (121). Ancak, tiroid bezinde, iyot ve selenyum yetersizliğinde H_2O_2 seviyeleri artabilmekte ve antioksidan savunmalar yetersiz kalabilmektedir. Bunun sonucu olarak da doku harabiyeti, hipotroidizm, nodül transformasyonu, guatr ve hatta malign transformasyonlar gerçekleşebilmektedir (111, 122). Düşük ve yüksek iyot alımına bağlı olarak tiroositlerde oksidatif yük artış gösterebilmektedir (123). Selenyum, çinko, bakır, iyot, vitamin C, vitamin E gibi mikrobesein öğeleri tiroid bezinin antioksidan savunmasında önem arz etmektedirler (92). Özetle Se eksikliği tiroid hormonu sentezinin azalmasına, tiroositlerin oksidatif hasara açık olmasına ve tiroid homeostazisinin bozulmasına neden olabilmektedir (116).

2.3. Tiroid

Tiroid anatomik olarak vücutta trakeanın anteriorunda, larinksin inferiorunda yer alan kelebek şeklinde bir endokrin organdır. İstmus olarak adlandırılan medyal bölge, kanat şeklindeki sol ve sağ loblarla çevrilidir. Tiroid loblarının her biri içerisinde, başlıca arka yüzeylerinde paratiroid bezleri gömülü haldedir. Tiroid bezinin dokusu çoğunlukla tiroid foliküllerinden oluşmaktadır. Foliküller, kolloid adı verilen

proteince zengin yoğun bir sıvı ile doldurulmuş merkezi bir boşluktan oluşan ekstraselüler reaksiyon odacıklarıdır. Epitelyal foliküler hücreler tarafından çevrili kolloid, tiroid hormonu üretiminin merkezidir. Kolloid içerisinde yüksek konsantrasyonda reaktif oksijen bulunur ve hormon üretimi için gerekli olan iyodun organifikasyonu için bu ortam gereklilik arz eder (111, 124). Tiroid hormon biyosentezi ekstraselüler alanda gerçekleşmektedir. Tiroid hormon sentezi 4 aşamada özetlenebilir;

1. İnorganik iyot, tiroid foliküler hücrelerine kandan yüksek verimle, aktif sodyum iyodür pompası ile alınarak konsantre edilir. Hücre içerisinde konsantre edilen iyodür foliküler hücrelerin membranında bulunan apikal yüzeyindeki tiroid peroksidaz enzimi ile serbest iyota okside edilir. Daha sonra kolloid içindeki tiroglobulin molekülünün bir parçası olan tirozin kalıntılarının karbon 3 pozisyonuna iyot katımı ilk ürün monoiyodotirozin (MIT) meydana gelir. MIT'in karbon 5 pozisyonuna yeniden iyot katımı ile diiyodotirozin (DIT) sentezlenir.
2. İki DIT molekülü daha sonra, dış halkayı oluşturan molekülden alanin yan zincirinin çıkarılmasıyla T4 oluşturmak için oksidatif kondenzasyona uğrar. MIT ve DIT'in eter bağı ile kondenzasyon sonucu aynı zamanda T3 ve rT3 sentezlenir. rT3'ün önemli biyolojik aktivitesi yoktur ve çok az miktarda <%1 sentez edilir. T4 ve T3 ise aktif hormonlardır ve yaklaşık sırasıyla günde 80 µg ve 4 µg kana sekrete edilirler.
3. İyodun organifikasyonu ve kondenzasyon reaksiyonları sırasında, tirozil kalıntıları tiroisitlerin apikal yüzeyinde tiroglobulin moleküllerine kovalent olarak bağlı kalır. Tiroglobulinler sürekli olarak foliküler tiroisitlerden veziküller halinde salgılanan glikoproteinlerdir. Tiroid hormonları, salgılanana kadar kolloid içerisinde bu halde depolanmış halde kalır.
4. Tiroid stimüle edici hormon (tirotropin veya TSH)'un etkisiyle kolloid içerisinde bulunan tiroglobulin-hormon kompleksi foliküler hücreler içerisine endositoz ile absorbe edilir. Proteazlar aracılı hidroliz gerçekleştikten sonra

serbest T3 ve T4 hormonları foliküler hücrelerin bazolateral yüzeylerinden yerel kapillerler aracılığıyla basit difüzyon ile kan dolaşımına verilir.

T3 ve T4'ün plazmada 1:40 oranında ve yaklaşık %99'u plazma proteinlerine bağlı haldedir. Tiroid hormonlarını bağlayan plazma proteinleri; albümin, transtiretin ve tiroksin bağlayıcı globulindir. T3'ün plazma proteinlerine T4'den daha az bağlanması ve tiroid hormon reseptörlerine (TR) daha etkin bağlanmasından dolayı T3 hem daha hızlı etki gösterir hem de T4'e kıyasla yaklaşık 3 ila 5 kat daha potenttir.

Deiyodinazlar, karaciğer, böbrek gibi perifer dokularda T4'ün T3'e dönüşümünün sürdürülmesinden sorumludurlar. Deiyodinasyon ile sadece tiroid hormonlarının katabolizması sağlanmaz aynı zamanda lokal T3 oluşumunu sağlar.

Tiroid hormonlarının salımının kontrolünde hipofizden salınan TSH rol oynar. TSH, foliküler hücrelerdeki bazolateral membran reseptörlerini uyararak; tiroid hormon sentezini ve hücrenin iyot alımının artmasını sağlar.

Tiroid hormonları vücutta yaygın etki gösterirler. Tiroid hormonları, vücudun hemen hemen tüm dokularında bazal metabolizma hızını (BMR) (oksijen tüketiminin bir ölçüsü) artırır. Kalorijenezde (ısı üretimi) yer alan spesifik proteinlerin sentezini uyarırlar ve ayrıca protein, karbonhidrat ve yağ metabolizmasını etkilerler.

Tiroid hormonları, beyin, testisler, ön hipofiz ve dalak dışındaki tüm dokularda oksijen tüketimini artırarak vücutta ısı artışına neden olur. Bu durum özellikle soğuk bir ortamda termoregülasyon sürecinde önem arz eder. Glikojenoliz, glukoneojenez ve kas, karaciğer ve yağ hücrelerinde glukozun utilizasyonunu artırarak direkt veya katekolaminlere dokuların hassasiyetlerini artırarak indirekt yoldan karbonhidrat metabolizmasını artırır. Yağ metabolizmasını da lipolizi ve yağ asiti oksidasyonunu artırarak hızlandırır. Proteinlerin yeniden sentezleri ve yıkımını artırarak protein metabolizmasını artırıcı yönde etkiye sahiptirler. Santral sinir sisteminin gelişiminde, kemik büyümesi ve olgunlaşmasında esansiyel rolü vardır. Fizyolojik miktarlarda tiroid hormonu ayrıca sinir sistemi, kardiyovasküler ve gastrointestinal sistem fonksiyonlarının düzgün çalışmasında ve ayrıca diş, cilt ve saç foliküllerinin düzenli gelişimi için de gereklidir (125-127).

2.4. Oksidatif Stres

2.4.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller dış orbitallerinde eşleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir ve paramanyetik özelliğe sahiplerdir. Moleküler orbitallerini tamamlamak için kolaylıkla elektron alabilir ve verebilirler. Aşırı derece reaktif özelliğe sahiplerdir ve stabil değildirler. Bu bileşikler kolaylıkla radikal olmayan bileşiklerle reaksiyon vererek başka radikallerin oluşmasına neden olurlar. Yeni oluşan radikal de başka bir molekülle etkileşebilir ve böylece devam eden bir zincir reaksiyon gerçekleşmesine neden olur (128, 129).

Organizmada az veya orta seviyelerde reaktif azot bileşikleri (RNS) ve reaktif oksijen bileşikleri (ROS) insan sağlığı için önemli roller oynayabilmektedir. Örneğin, nötrofiller ve makrofajlar gibi fagositik hücrelerin aktive olmuş hallerinde yoğun bir şekilde ROS oluşumu gerçekleşir. Bu hücrelerin sahip olduğu oksidazlar sayesinde de çevresel patojenlere karşı hidrojen peroksit, hipokloröz asit, süperoksit anyonu gibi radikaller üretimini gerçekleştirir ve depolarlar. Herhangi bir patojen organizmaya girdiğinde patojeni oksidatif patlamaya uğratmak için bunları salgırlar (130, 131). Ayrıca, tiroid bezinde tiroid hormon sentezi için hidrojen peroksit kullanılmaktadır (132). Bir reaktif azot türü olan NO'nun organizmada nörotransmitter, ikincil haberci ve inflamatuvar belirteci olarak işlevleri vardır. Kan akışının regülasyonu, kan basıncı ayarlanması, platelet agregasyonunun inhibisyonu gibi önemli fizyolojik rolleri mevcuttur (133). Organizmadaki bu önemli görevlerinin yanı sıra, daha yüksek konsantrasyonlarda, serbest radikaller; proteinler, lipitler, nükleik asitler gibi önemli biyomolekülleri olumsuz yönde etkileyebilmektedir (134).

2.4.2. Reaktif Oksijen ve Azot Bileşikleri

Reaktif oksijen bileşikleri (ROS) aerobik organizmalarda normal metabolizma sırasında yan ürün olarak oluşmaktadır. ROS geniş bir terimdir ve hem oksijen radikallerini hem de radikal olmayan oksijen bileşiklerini içermektedir. Reaktif azot bileşikleri (RNS) de radikal nitrik oksit (NO^{*}), nitrik dioksiti (NO₂^{*}) ve radikal olmayan nitroz asit (HNO₂) gibi bileşikleri içeren benzer ortak bir terimdir (Tablo

2.4.). Reaktif azot bileşikleri yoğun olarak oksijen içerdiklerinden dolayı tanım olarak ROS kapsamında sınıflandırılabilir (135-137).

Tablo 2.4. Reaktif oksijen ve azot bileşikleri. (136)

Radikal olanlar	Radikal olmayanlar	Radikal olanlar	Radikal olmayanlar
Süperoksit, $O_2^{\bullet -}$	Hidrojen Peroksit, H_2O_2	Nitrik Oksit, $NO^{\bullet}$	Nitröz asit, HNO_2
Hidroperoksil, $HO_2^{\bullet}$	Singlet Oksijen, 1O_2	Nitrik Dioksit, $NO_2^{\bullet}$	Nitrözonyum katyonu, NO^+
Hidroksil, $OH^{\bullet}$	Ozon, O_3	Nitrat radikali, $NO_3^{\bullet}$	Nitroksil anyonu, $NO^{\bullet -}$
Peroksil, $ROO^{\bullet}$	Hipokloröz asit, $HOCl$		Peroksinitrit, $ONOO^{\bullet -}$
Alkoksil, $RO^{\bullet}$	Peroksinitrit, $ONOO^{\bullet -}$		Diazot tetraoksit, N_2O_4 Dinitrojen trioksit, N_2O_3

R; alkil grubunu temsil etmektedir.

Reaktif oksijen bileşikleri, endojen veya ekzojen kaynaklardan üretilebilir. Endojen ROS oluşumu; mitokondri, peroksizomlar ve oksijen tüketiminin yüksek olduğu endoplazmik retikulum gibi farklı hücrel organlarda meydana gelmektedir (134).

Birçok ksenobiyotik organizmaya girdiğinde biyotransformasyona uğramaktadır. Bu süreçte meydana gelen oksidasyon reaksiyonlarında ROS oluşumu gözlemlenebilir. Mikrozomal sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz enzim sisteminin, karaciğer hücresindeki ROS'un başlıca üreticilerinden biri olduğu ortaya konmuştur (138). Ekzojen kaynaklı ROS oluşumuna bir örnek olarak; bir herbisit olan paraquatın alveolar epitel hücrelerde NADPH'dan elektron alması sonucu radikal anyonu meydana gelmesi ve aerobik koşullarda oluşan bu radikalın oksijene elektron transferi sonucu süperoksit anyonu meydana getirmesi ile görülen akciğer toksisitesi gösterilebilir (139).

Serbest radikal üretimi (ROS / RNS) ile antioksidan savunma arasında bir dengesizlik durumunda serbest radikaller daha yüksek konsantrasyonlarda olduğunda organizmada oksidatif stres meydana gelmektedir (134). Oksidatif stres terimi ilk defa 1985'te Helmut Sies tarafından " Prooksidan- antioksidan dengesinin prooksidanların lehine kayması sonucu dengenin bozulması " olarak tanımlanmış olsa da daha sonra 2007'de güncellenerek " Moleküler hasara ve/ veya redoks sinyalinin ve kontrolünün

bozulmasına neden olan oksidanların lehine gelişen, oksidan ve antioksidan dengesinin bozulması” olarak tanımlanmıştır (140).

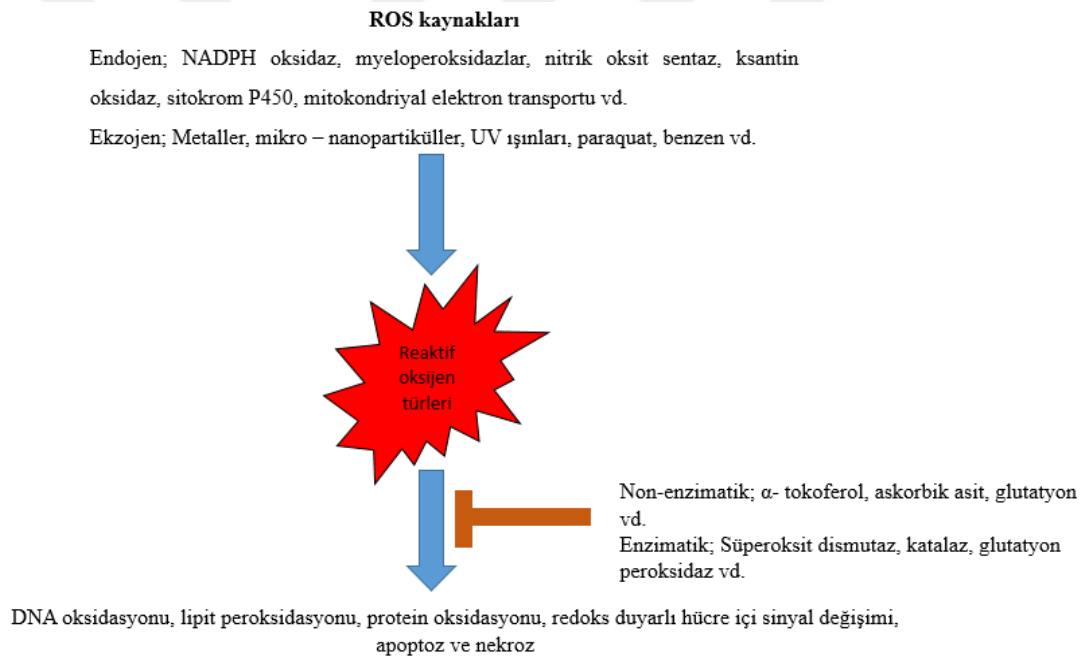
Reaktif oksijen bileşikleri için bu kararlı durum seviyesinin kontrolü sadece üretimleriyle değil aynı zamanda detoksifikasyon sistemleri ile de sağlanır. Canlı organizmalar, ROS'u ortadan kaldırmak veya olumsuz etkilerini en aza indirmek için çalışan çok düzeyli ve karmaşık antioksidan sisteme sahiptir. Gıda veya takviye ürünlerin bileşenleri olan bazıları küçük molekül ağırlıklı antioksidanlar olarak bilinir ve C vitamini (askorbik asit), E vitamini (α -tokoferol), antosiyanidinler, polifenoller bunlara örnek olarak verilebilir. Glutasyon ise bunun dışındadır ve canlı organizmalar tarafından sentezlenerek, ROS ile doğrudan etkileşerek veya ROS'u detoksifiye eden enzimlere kofaktör olarak hizmet ederek antioksidan işlev görür. Yüksek molekül ağırlıklı antioksidanlar veya primer antioksidanlar olarak ise SOD, CAT ve GPx örnek olarak verilebilir (141, 142).

Oksidatif stres hücrelerde redoks duyarlı prosesleri etkileyebilmektedir. Birçok genin transkripsiyonunu, protein kinazların aktivasyonu, intraselüler Ca^{2+} konsantrasyonu artışı gibi süreçleri tetikleyebilmektedir. Ancak ROS tarafından oluşan şiddetli saldırı daha geniş ve onarılamaz hücre hasarına yol açabilir ve sonuçta nekroz veya apoptoz yoluyla hücre ölümü meydana gelebilir. ROS hücrede çoklu doymamış yağ asit zincirlerine saldırarak lipid peroksidasyonu oluşumuna, proteinlerin prolin, lizin, arjinin, treonin aminoasitlerinin yan zincirlerinde oksidasyona neden olarak protein karbonillerin meydana gelmesine ve DNA oksidasyonuna neden olarak mutasyon ve aberasyonların oluşmasına neden olabilmektedir (143, 144). Hücre içi ROS oluşumu ve ROS'un temizlenmesi Şekil 2.4.'te gösterilmiştir.

2.4.3. Lipit Peroksidasyonu

Hücre içinde ROS'un lipidleri hedef aldığı bilinmektedir. Membran lipidleri hedef olduğunda lipid peroksidasyonu gerçekleşir. Membranlarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen çekilmesi sonucunda karbon merkezli lipid radikali meydana gelir, ortamdaki oksijenin katılımı ile de lipid peroksil radikalleri oluşumu gerçekleşir. Bu reaksiyon zinciri lipid yıkım ürünleri oluşana kadar sürer. Lipit alkoller, aldehytleri ve malondialdehit gibi küçük fragmentler meydana gelir.

Lipit radikalleri başka lipitleri ve biyomolekülleri etkiler. Membran yapı bütünlüğü ve fonksiyonunun bozulması plazma ve organel membran permabilitesini artırarak hücrel homeostazın bozulmasına neden olabilir. Organellerin ve hücre dışı membranının bozulması sonucu hücrel homeostazis bozulur. Her ne kadar lipid peroksidasyonu, bazı bileşikler için hücrel hasarın önemli bir parçası olsa da, tüm toksik tepkilerin altında yatan genel bir mekanizma değildir. Lipit peroksidasyonu sonucu, malondialdehit (MDA), 4- hidroksinonenal, propanal, hekzanal gibi birçok aldehit meydana gelir. MDA, 4- hidroksi nonenal başta olmak üzere birçok lipid peroksidasyonu ürünlerinin toksik bileşikler olduğu bilinmektedir. MDA, tiyobarbitürik asitle kolay reaksiyon vermesi açısından dolayı çokça kullanılan, oksidatif stresin belirlenmesi için popüler ve güvenilir bir belirteçlerden biridir.

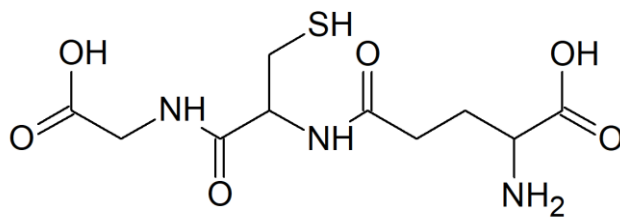


Şekil 2.4. Hücre içi ROS oluşumu ve ROS'un temizlenmesi. (143, 145-147)

En önemli antioksidanlardan biri olan vitamin E, lipitte çözünür ve hidrofobik bir kuyruğa sahip olduğundan, lipid zarlarının içinde birikme eğilimindedir. Burada elektron donörü işlevi görerek radikal zincir tepkimesinin yayılmasını durdurabilir, çünkü lipid peroksil radikalleri ile yaklaşık dört kat daha hızlı tepki reaksiyona girerek komşu yağ asidi yan zincirlerine reaksiyonun yayılmasını engeller (139, 148-150).

2.4.4. Glutatyon

Glutatyon (GSH; γ -L-glutamil-L-sisteinilglisin), tripeptit yapısında memeli hücrelerinde 12 mM'ye kadar konsantrasyonlarda bulunan hücresel tiyoldür (Şekil 2.5.). Antioksidan olarak önemli fonksiyonlara sahiptir, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu için bir reaksiyon ortağıdır, izomerizasyon reaksiyonlarında bir kofaktördür ve sisteinin bir depolama ve taşınma şeklidir. Ek olarak, glutatyon hücre çoğalması için esastır ve proteinlerin sülfhidril gruplarının redükte formda kalmasını sağlayarak hücrenin redoks potansiyelini korur (151).



Şekil 2.5. Glutatyon.

Glutatyon tiyol/ disülfid redoks potansiyelinin korunmasında hücresel tiyol olarak redoks tamponu işlevi gören bileşiktir. Birtakım temel özelliklere sahiptir:

1. Antioksidan akvitiesinden sorumlu sülfhidril grubu içermektedir.
2. Glutamat ve sistein birbirine γ -karboksil grubu ile bağlandığı için proteazlara karşı direnç gösterir.
3. Birçok dokuda yüksek konsantrasyonlarda (milimolar düzeyde) bulunur (143, 152).

Glutatyon peroksidaz, hücrede temel antioksidan olan tiyol türevli GSH oksidasyonu ile hücrede H_2O_2 'nin suya detoksifikasyonunun gerçekleştirilmesini sağlar (153). Glutatyon transferaz, kosubstrat olarak GSH'ı kullanarak elektrofilik ajanların detoksifikasyonlarını gerçekleştiren önemli bir enzimdir. Bu sayede daha az toksik ve çözünürlüğü yüksek bileşik elde edilir (154). GSH hücrelerde üretilen, küçük molekül ağırlıklı en önemli antioksidan olmakla birlikte, diyetle alınan ve önem arz eden vitamin C ve vitamin E gibi küçük antioksidanlar da vardır; onlarla birlikte çalışarak antioksidan işlev görür. Okside vitamin C'nin redükte hale gelmesini

sağlayan bileşiklerden biri de GSH'dır; bu sayede hücrede redükte halde vitamin C ve E seviyelerinin korunmasını sağlar (155). GSH organizmada peroksitlerin redüksiyonunun yanı sıra disüflitler için ana indirgeyici ajandır ve majör tiyol modifiye edici olarak işlev görür. GSH ve GSSG'nin bu rollerine enzimatik olmayan veya glutaredoksinler (Grx) aracılık eder. Proteinlerin disüflit yapılarının redüksiyonu endoplazmik retikulumda GSH aracılı gerçekleşir. Bunların yanı sıra GSH'nin hücre içinde önemli antioksidan olmasını sağlayan bir diğer husus da elektrofilik ajanlarla reaksiyon vererek toksisitelerini azaltması ve daha çözünür hale getirerek uzaklaştırılmasını sağlamasıdır (156). Hücrede ROS/ RNS eliminasyonuna yardımcı olarak DNA, lipidlerin ve protein gibi biyomoleküllerin oksidasyona karşı korunmasını sağlar (157, 158). GSH, ligantlar arasında ve membrandan metal iyonu taşınmasında ayrıca yapısındaki sistein ile metal homeostazında önemli rol oynamaktadır (157). Hücresel GSH seviyesi ve apoptotik sinyal oluşumu arasında bir ilişki olduğu gösterilmiş ve hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yolda plazma membran taşıyıcıların aktivasyonu ile GSH kaybı birbiri ile ilişkilendirilmiştir. Hücre içi GSH kaybı, farklı apoptotik uyarılara cevap olarak hücre ölümünün ilerlemesinde meydana gelmektedir. Ayrıca, mitojenle aktive olan protein kinazın (MAPK) oksidatif stresi indükleyen farklı uyarılarla aktivasyonunun hücresel apoptozu tetiklediği bilinmektedir. GSH'nin MAPK ile ilişkili apoptotik yolların redoks mekanizmalarına katılımı tam olarak anlaşılamamıştır, bununla birlikte GSH, hücre içi redoks homeostazının kilit bir belirleyicisi ve majör bir antioksidan olduğundan dolayı, hücresel GSH'nin bir MAPK yolu modülatörü olduğu düşünülebilir (159-161).

GSSG'nin GSH'a çevrilmesi hücrede NADPH bağımlı olarak GR ve TrxR sistemi tarafından yapılır. GSH / GSSG çifti, subselüler yapılardan organizma seviyesine kadar uygun redoks koşullarını koruyan GSH sisteminin redoks tamponudur görüşü bulunmakla birlikte, biyolojik sistemlerde GSH / GSSG dengesi bulunmamaktadır ve GSH kullanımından sonra hızla rejenerasyonu gerçekleşmektedir (156, 162).

GSH eksikliği veya GSH / glutatyon disüflit oranındaki bir azalma, oksidatif strese duyarlılığın artmasıyla kendini gösterir ve ortaya çıkan hasarın kanser, parkinson hastalığı ve alzheimer hastalığı gibi birçok hastalığın patojenezinde rol

oynadığı düşünülmektedir. Etanol, sigara, bazı ilaçlar (siklofosfamid, parasetamol gibi), stres, yaşlanma süreci gibi faktörler organizmada GSH seviyelerinde azalmaya neden olabilmektedir (163).

Özetle GSH, organizmayı oksidatif hasara karşı korumak üzere çalışan enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşenidir.

2.5. Apoptoz

Apoptoz, belirgin morfolojik özelliklere sahip enerji bağımlı olarak gerçekleşen biyokimyasal bir mekanizmadır. Apoptoz normal gelişme ve yaşlanma sırasında ve organizmadaki dokularda hücre popülasyonlarının sayılarını korumak için meydana gelir. Ayrıca, savunma mekanizmasında örneğin, immün reaksiyonlarda veya hücrelerin hastalık yapıcı, zararlı ajanlara maruziyetinde de meydana gelir. Apoptoz, doku gelişimi ve homeostazı için önemli, evrimsel olarak korunmuş bir fizyolojik hücre ölümü şeklidir. Belirgin özellikleri; nükleer yoğunlaşma, hücre büzülmesi ve kabarcık oluşumu (blebing) ve etkilenen dokunun inflamatuvar tepkilerinin olmaması gibi belirgin morfolojik değişikliklerdir (164, 165).

Apoptozda hücrenin yuvarlaklaşması, psödopodların büzülüp geri çekilmesi, hücresel hacmin küçülmesi (piknozis), kromatin kondenzasyonu, nükleer fragmentasyon (karyoreksis) meydana gelir. Sitoplazmik organellerde çok az veya hiç hasar yoktur. Hücre yüzeyinde blebing meydana gelir ve sürecin sonuna kadar membran bütün halindedir ve sonuç olarak meydana gelen apoptotik cisimler yerleşik fagositler tarafından ortadan kaldırılırlar. Nekrozda ise kromatin yoğunlaşması olmadan, hücre şişmesi ve plazma zarı yırtılması ve organel yapı kaybı meydana gelir. Hücresel içeriğin ve proinflamatuvar moleküllerin salınımına neden olan ölen hücre çevresinde bir iltihaplanmanın indüklenmesiyle karakterize edilir (Tablo 2.5.) (166-168).

Tablo 2.5. Apoptoz ve nekroz arasındaki morfolojik ve fonksiyonel farklılıklar. (169)

Apoptoz	Nekroz
Aktif bir süreçtir.	Pasif bir süreçtir.
Hücre küçülür, nükleer kondenzasyon meydana gelir.	Hücre şişer.
Membran sağlamdır.	Membran yırtılır.
İnflamasyon yoktur.	İnflamasyon meydana gelir.
Evrimsel süreçte korunmuş bir yoldur.	Toksik maddeye özel biyokimyasal mekanizma mevcuttur.

Memeli hücrelerinde ekstrinsik veya ölüm reseptörü aracılı ve mitokondriyal apoptotik yollar olmak üzere iki ana apoptoz yolağı mevcuttur. Ekstrinsik yolda hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri tarafından tetiklenen bir dizi reaksiyon sonucu apoptoz meydana gelirken, intrinsik yolda mitokondri ve hücre içi ölüm sinyallerinin tetiklenmesi sonucu meydana gelir. Apoptoz, kaspaz adı verilen bir proteaz familyası aracılı olarak gerçekleştirilir. Sistein proteazların bir üyesi olan kaspazlar, apoptoza neden olan sinyal kaskadında önemli rol oynarlar. Apoptotik sinyale maruziyet sonucu sürekli hücrede bulunan kaspazların zimojen formları proteolitik olarak yıkılır ve aktif hale gelir. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 ve 9 gibi) özel adaptör veya iskele proteinleri üzerinde dimerleşmeleriyle aktivasyonları tetiklenir. Uygulayıcı kaspazlar olan kaspaz 3, 6 ve 7 selüler substratlarına saldırabilmeleri için zimojen formları başlatıcı kaspazlar tarafından proteolitik olarak yıkılarak aktif hale getirilirler (170-172).

Ekstrinsik yolak TNF süperfamiliyası ligandları tarafından tetiklenir. TNF- α ve onun prototiplerinden olan FasL, ölüm reseptörü Fas 1, 2, 3, 4'e bağlanır ve hücre içinde adaptör protein FADD, intraselüler domain eşleşir ve ölüm başlatıcı sinyal kompleksi (ÖBSK) meydana gelir. ÖBSK tarafından kaspaz 8'in aktivasyonu gerçekleşir. Kaspaz-8 ekstrinsik yolla meydana gelen hücre ölümünde esastır ve aktif kaspaz 8 ayrıca bir Bcl-2 familyası üyesi olan Bid'in de parçalanmasını sağlayabilir. Bid'in yıkılması sonucu oluşan t-Bid mitokondriden sitokrom c salınımını artırıcı özelliğe sahiptir. Bu nedenle kaspaz 8 mitokondriyal yolağın da aktivasyonunu sağlayabilmektedir (173-175).

İntrinsik yolda mitokondri anahtar rol oynamaktadır. Apoptotik uyarı altında mitokondriyal membran geçirgenliği değişir ve sitokrom c başta olmak üzere

apoptotik faktörlerin sitozole salınımı gerçekleşir. Sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'e bağlanarak Apaf-1 dATP hidrolizi ile beraber heptamerik kuarternar yapıya kavuşur. Apoptozom adı verilen bu kompleks prokaspaz 9'un aktive olmasını sağlar. Kaspaz 9 intrinsik yolağın başlatıcısıdır. Kaspaz 9'un da kaspaz 3'ü ve kaspaz 7'yi aktive etmesiyle apoptozun uygulanması gerçekleşir. Sitotoksik ilaçlar, stres sinyali, DNA hasarı gibi etkenler intrinsik yolağı tetikleyebilmektedir (176-178).

Hücrede apoptozun kontrolünde bcl-2 ve onun familyasına ait proteinler olan Bcl-x_L, Bcl-w, A1, and Mcl-1 hücrenin yaşamının devam etmesini sağlayarak anti-apoptotik olarak işlev görürler. BH3 proteinleri (örn. bid), bax, bak gibi hücrel proteinler de apoptotik yolağın başlamasında apoptotik proteinlerin salınımı sağlayarak görev alırlar (170).

Apoptotik yollardaki disregülasyonun; kanser, nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer gibi), kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve otoimmün hastalıkların patojenezinde rol alabildiği gösterilmiştir (171, 179).

Aşırı oksidatif stres, nekroz veya apoptozla hücreyi öldürebilmektedir. Hücre içi kaspaz aktivasyonun son safhasından önce, hücrenin redoks durumunun aşırı oksidan çevrenin meydana gelmesi ve N-asetil sisteinin apoptozu engellemesi bu kanıyı desteklemektedir. Aynı şekilde GSH'ın hücreleri oksidatif hasardan korumasının yanı sıra anti-apoptotik etkisi mevcuttur. Deneysel çalışmalar, azalmış GSH seviyeleri ile proliferasyonun inhibisyonu ve apoptozun stimülasyonu arasında ilişki olduğunu ortaya koymaktadır (180, 181).

Artan kanıtlar oksidatif stres ve apoptozun yakından bağlantılı fizyolojik olaylar olduğunu ve bazı kronik hastalıkların patofizyolojisinde yer aldığını göstermektedir (180).

Apoptozun belirlenmesinde yöntem olarak; morfolojik görüntüleme yöntemleri (Işık, floresan, faz kontrast, elektron mikroskoplarıyla), immünohistokimyasal (TUNEL, anneksin V, kaspaz 3, M30) yöntemler, biyokimyasal yöntemler (akım sitometrisi, agaroz jel elektroforezi, *Western blotting*), immünolojik

(ELISA, florometrik) yöntemler ve moleküler biyoloji yöntemleri kullanılmaktadır (182).

2.6. Bisfenol A ve Tiroid Homeostazına İlişkin Çalışmalar

Bisfenol A'nın tiroid homeostazisi üzerinde olumsuz etkisine ilişkin literatürde az sayıda çalışma olduğu görülmüştür. Çalışmalarda BPA'nın tiroid üzerine istenmeyen etkileri çeşitli mekanizmalar üzerinden değerlendirilmiştir. Çalışmalar üç ayrı ana başlık altında yer verilerek özetlenmiştir.

2.6.1. *In vitro* çalışmalar

Wu ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, BPA, triklosan, triklokarban ve 2,2',4,4'-tetrabromodifenil eter'in sıçan foliküler tiroid FRTL-5 hücrelerinde hücrenin iyot alımı, tiroid hormon sentezi ile ilişkili genlerin (*Scl5a5*, *Tpo*, *Tg*, *Pax8*, *Foxe1*, *Nkx2-1*) ekspresyonları ve mikrozomal TPO aktivitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. MTT canlılık testinde 0,03 – 300 µM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saat BPA maruziyeti gerçekleştirilmiştir. BPA'nın 30 µM altındaki dozlarda anlamlı olarak canlılığı azaltmadığı gözlenmiş ve IC₃₀ konsantrasyonu olarak 100 µM belirlenmiştir. Sodyum iyodür eştaşınımı (NIS) üzerine olan etkisi ise 1, 24 ve 48 saatlik üç zaman diliminde incelenmiştir ve her üç inkübasyon süresinde de 10 µM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre içine iyot alımını azalttığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Kinetik çalışmalar ile de iyot alımının non-kompetitif inhibisyon ile engellendiği gösterilmiştir. Tiroid hormon sentezi ile ilişkili 3 genin (*Scl5a5*, *Tpo*, *Tg*) ekspresyonlarındaki değişimler RT-PCR ile değerlendirilmiştir ve 6, 24, 48 saat BPA maruziyeti sonucunda sadece 100 µM BPA konsantrasyonunda *Scl5a5* ve *Tpo* gen ekspresyonlarının anlamlı ölçüde azaldığı, *Tg* gen ekspresyonunun ise doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). 6 saatlik maruziyette ise bu değişimler gözlenmemiştir. *Scl5a5*, *Tpo*, *Tg*'in transkripsiyonel ekspresyonunun regülasyonunda görevli olan Pax8, Foxe1, Nkx2-1 transkripsiyon faktörlerinin ise gen ekspresyonlarında sadece 100 µM BPA konsantrasyonunda *Foxe1* ve *Pax8*'in transkripsiyonunda anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Sıçan foliküler tiroid mikrozomlarındaki TPO aktivitesi üzerine BPA'nın etkisi olmadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, BPA'nın yüksek konsantrasyonlarda tiroid hücrelerine iyot alımını bozması ve tiroid hormon sentezi ile ilişkili gen ekspresyonlarında değişime neden olmasına rağmen,

insanlardaki kan seviyelerinin nM düzeylerde olması nedeniyle bu mekanizmaların başlıca tiroid bozucu mekanizma olamayacağını ileri sürmüşlerdir (183).

Porreca ve ark. (2016) tarafından FRTL-5 sıçan foliküler tiroid hücresinde yapılmış başka bir çalışmada ise düşük doz BPA (10^{-9} M)'nın toksikogenomik sonuçları incelenmiştir. Öncelikle BPA'nın 1 ve 3 günlük maruziyeti sonucunda sırasıyla 4 ($p<0,01$) ve 1.5 kat ($p<0,05$) ROS artışına neden olduğu belirlenmiş, ancak uzun dönem olan 7 günlük BPA maruziyetinde ise kontrole kıyasla ROS artışı anlamlı bulunmamıştır. TUNEL deneyi sonuçlarında ise 24, 48, 72, 96, 120 saatlik düşük doz BPA maruziyetinin apoptotik hücre oranlarında kontrole kıyasla fark oluşturmadığı bildirilmiştir. Aynı şekilde UV-C uygulaması da yapılmış sadece 24 saatlik UV-C maruziyeti sonucu apoptotik hücre oranı anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0,05$). UV-C ile beraberinde BPA uygulanması sonucunda ise 120 saate kadar apoptotik hücre oranında anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Farklı zamanlarda Comet yöntemi ile kuyruk yoğunluğu ölçümleri yapılmış; 6, 48, 96 saatlik düşük doz BPA uygulaması sonucunda hasarlı DNA içeriği açısından kontrole fark gözlenmemiştir. Ancak 6, 48, 96 saatlik UV-C uygulaması sonucu sadece 6 saatlik UV-C uygulaması yapılan grupta anlamlı olarak kuyruk yoğunluğu artışı gözlenmiştir ($p<0,01$). Aynı zamanlarda düşük doz BPA'ya maruz kalmış ve UV-C radyasyona maruz bırakılmış hücrelerde ise kontrole kıyasla önemli ölçüde hasarlı DNA içeriği bulunduğu ortaya konmuştur. Bunlara ek olarak yapılan p21 mRNA seviyeleri ölçümünde 24, 48, 72, 96, 120 saatlik inkübasyonlarda UV-C radyasyonunun p21 mRNA seviyelerinde yavaş, sabit artışı ($p<0,001$) ve azalarak kontrol seviyelerine dönüşü gözlemlenmiştir. Ancak, düşük doz BPA'ya maruz kalmış ve UV-C radyasyona maruz bırakılmış hücrelerde ise p21 artışı kontrole kıyasla gözlemlenmemiştir. Bu bilgiler ışığında BPA'ya maruz kalan hücrelerin, UV-C maruziyetinden sonra DNA hasarını etkin bir şekilde tamir edemedikleri; BPA'ya uzun süre maruz kalmanın doğrudan bir genotoksik aktivite göstermediği ancak DNA onarımında yer alan mekanizmalar üzerine etki ederek genotoksik etkiyi tetikleyen diğer bileşiğin etkisini arttırdığı düşünülmüştür. Bununla birlikte, DNA hasar cevabı ve nükleotid eksizyon tamirini de kapsayan COP9 sinyalizasyonu içerisindeki Cops4, Cops6, Cops5, Cops8, Ddb1 ve Atf4, Ddit3 ve Tp53 genlerin mRNA seviyeleri qRT-PCR ile 7, 14, 21 ve 28 gün BPA maruziyeti sonunda ölçülmüştür. Çalışılan bütün genlerde 7 gün ve daha sonrasında, düşük doz BPA

maruziyeti sonucunda inhibisyon gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu sonuç ile 7 günden daha uzun süre düşük doz BPA maruziyetinin DNA onarımı üzerinde transkripsiyonu stabilize edebileceği sonucuna varmışlardır. Bu çalışma ile BPA'nın çevresel dozuna maruz kalmanın tirosit transkriptomunu zamana bağlı bir şekilde önemli ölçüde bozabildiği gösterilmiştir (184).

Zheng ve ark. (2017) tarafından B-CPAP insan foliküler tiroid karsinoma hücresinin kullanıldığı bir diğer çalışmada, BPA ile indüklenen proliferasyonun üzerine Icarrin'in koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Hücre sayım kiti-8, WST-8 kullanılarak hücre canlılığı, hücre akım sitometrisi apoptotik hücre oranları, Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi aktivite tayin kiti kullanılarak tayin edilmiştir. Anti-apoptotik bir protein olan bcl-2 ve hücre içi DNA çift zincir hasar onarım proteini olan γ -H2AX ekspresyonu ise Western blot yöntemiyle ölçülmüştür. 48 saat 3×10^{-7} M BPA maruziyeti sonucu hücrenin proliferasyon artışı kontrole kıyasla anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur ($p<0,05$). BPA ve kontrol grubunun absorbansları ise sırasıyla $1,089 \pm 0,053$ ve $0,935 \pm 0,010$ 'dur. 72 saat boyunca düşük doz BPA maruziyeti sonucu B-CPAP hücrelerinin proliferasyonu, 48 saate benzer bir eğilim göstermiştir. Ancak 24 saat maruziyet sonucunda kontrol ile düşük doz BPA'ya maruz kalan grup arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. SOD aktivitesi ölçümü sonucunda düşük doz BPA'ya maruz kalan grupta kontrole kıyasla enzim aktivitesi anlamlı olarak daha düşük gözlenmiştir ($p<0,01$). Bcl-2 ve γ -H2AX ekspresyonu düşük doz BPA'ya maruz kalan grupta kontrole kıyasla anlamlı artış göstermiştir ($p<0,01$). Bu çalışma; düşük doz BPA maruziyetinin B-CPAP foliküler tiroid karsinoma hücrelerinin proliferasyonunu artırabildiğini ve apoptozu inhibe ettiğini ortaya koymuştur (185).

Silva ve ark. (2018) tarafından yapılan BPA maruziyetinin hem in vivo hem de in vitro olarak tirositlerde hidrojen peroksit üretimi üzerindeki etkisi ile tiroid hormon sentezi üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada; PCCL3 sıçan foliküler tiroid hücresi ve dişi Wistar sıçanları kullanılmıştır. Çalışmanın in vitro kısmında hücreler 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M BPA'ya 24 saat maruz bırakılmıştır. Hücre canlılığı MTT yöntemiyle test edilmiştir. 10^{-9} M düşük doz BPA uygulanan hücrelerde kontrole kıyasla hücre canlılığının azalmadığı, 10^{-7} M diğer düşük doz uygulanan hücrelerde hücre canlılığının anlamlı ölçüde arttığı ($p<0,05$), 10^{-3} M yüksek doz BPA'ya maruz

kalan hücrelerde ise hücre canlılığının anlamlı ölçüde azaldığı ve bu dozun toksik konsantrasyon olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). BPA'nın hücre canlılığını artırabilme veya hücre ölümünü azaltabilme potansiyeline sahip olabileceği belirtilmiştir. Çalışmada en düşük doz olan 10^{-9} M BPA'nın hücre canlılığını etkilemediği ve insan serumunda bulunan BPA konsantrasyonu aralığında olduğu için deneylerde kullanılan doz olarak seçildiği ifade edilmiştir. Sodyum iyodür eştaşınımını sağlayan Nis mRNA seviyeleri qRT-PCR ile ölçülmüş ve 10^{-9} M BPA'ya maruz kalan hücrelerde kontrole kıyasla anlamlı olarak Nis mRNA seviyelerinde azalma görülmüştür ($p<0,05$). Kalsiyum bağımlı oksidazlar olan ve tiroid hormon sentezi için gerekli hidrojen peroksit üretimini sağlayan enzimler olan dual oksidaz 1 ve 2'nin (DUOX1 ve DUOX2) ve enzimlerin tam aktivite göstermesi için gerekli olgunlaşma faktörleri olan DUOXA1 ve DUOXA2'nin sırasıyla Duox1, Duox2, Duoxa1 ve Duoxa2 mRNA seviyeleri qRT-PCR ile ölçülmüştür. Sadece kontrole kıyasla Duox2 mRNA seviyelerinde anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Ekstraselüler hidrojen peroksit üretimi, peroksit/peroksidaz deney kiti ile çalışılmış ve kalsiyum bağımlı hücre dışı hidrojen peroksit üretimi düşük doz BPA'ya maruz kalan hücrelerde kontrole kıyasla belirgin şekilde artmıştır ($p<0,05$). Hidrojen peroksit bir reaktif oksijen bileşiği olduğundan dolayı tiroid hücrelerine zarar verebilme potansiyeli olduğu için bu kısma dikkat çekilmiştir. Düşük doz BPA maruziyetinin Tpo ve Nis mRNA seviyeleri etkisi üzerinde oksidatif stresin rolünü ortaya koymak için hücrelere N-asetil sistein (NAC) uygulanmıştır. BPA maruziyeti ile azalan Nis ve Tpo mRNA seviyelerinde azalma gösterilmiştir ($p<0,05$), Ancak BPA ile beraberinde NAC uygulaması sonucunda Tpo ve Nis mRNA seviyelerinde BPA ile meydana gelen azalmanın önlenemediği gösterilmiştir. Sonuç olarak; BPA'nın Nis ve Tpo ekspresyonu üzerindeki inhibe edici etkisinin oksidatif stresin artması ile ilişkilendirilebileceği rapor edilmiştir. Çalışmadaki in vivo kısmında ise erişkin dişi Wistar sıçanlar, BPA için belirlenen NOAEL değer olan 50 mg/ kg vücut ağırlığı/ gün değerinden daha düşük 40 mg/ kg vücut ağırlığı/ gün dozunda 15 günlük BPA'ya maruz bırakılmıştır. Çalışma için sıçanlarda histopatolojik analizler, tiroid iyot alımı, TPO aktivitesi, serum T3 ve T4 seviyeleri, tiroid dokusunda hidrojen peroksit üretimi değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda tiroid ağırlıklarının BPA maruziyeti sonucunda değişmediği, ancak histolojik analizler sonucunda BPA'ya maruz kalan grupta birçok hipoaktif foliküller

olduğu gözlenmiştir. Radyoaktif iyot alımı ve TPO aktivitesinin değerlendirilmesi sonucunda ise BPA maruziyetinin kontrole kıyasla tiroidin iyodür alımını anlamlı derecede düşürdüğü ($p<0,01$), aynı zamanda TPO aktivitesinde de anlamlı derecede düşüşe neden olduğu gösterilmiştir ($p<0,001$). Hidrojen peroksit üretimi artışı da değerlendirilmiş ve BPA maruziyeti sonucunda kalsiyum bağımlı hidrojen peroksit üretiminin kontrole kıyasla anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir ($p<0,05$). Araştırmacılar, tiroid bezinde TPO aktivitesi azaldığı için meydana gelen hidrojen peroksit artışının oksidatif strese neden olabileceği şeklinde bu sonucu yorumlamışlardır. Ayrıca serum T3, T4 ve sıçanların hipofiz dokusundaki β -Tsh mRNA seviyelerinin ölçümleri yapılmıştır. İlginç şekilde BPA'ya maruz kalan sıçanların serumlarında T4 seviyelerinde anlamlı artış görülürken ($p<0,05$), T3 seviyelerinde ise anlamlı fark bulunmamıştır. Artan serum T4'e uyumlu olarak, BPA'ya maruz kalan sıçanların hipofizinde β -Tsh mRNA seviyelerinde önemli bir azalma bulunmuştur ($p<0,05$). Araştırmacılar çalışmanın sonucunda tirositlerin endokrin bozucu kimyasal olan BPA'ya maruz kalmasının hem in vivo hem de in vitro olarak ROS üretimini artırabildiğini göstermiştir. Ayrıca BPA'nın, tiroid hormon sentezi için iki önemli adım olan tirositlere iyot alımını ve iyodun organifikasyonunu sağlayan TPO aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Bu etkilerin ise oksidatif stresin tirositlerde artması ile ilişkilendirilebileceğini anti- oksidan NAC'ın Tpo ve Nis mRNA seviyelerindeki düşüşe karşı meydana getirdiği koruyucu etkiden dolayı olduğu belirtilmiştir. BPA'ya maruz kalmanın tirositlerde ROS üretiminde artmaya neden olacağı ve tirositlerde redoks dengesinin bozulması sonucunda oksidatif hasara yol açabileceği; buna bağlı olarak BPA maruziyetinin tiroid hastalıkları açısından predispozan bir faktör olabileceği vurgulanmıştır (186).

Gentilcore ve ark. (2013) tarafından yapılan başka bir çalışmada BPA'nın foliküler tiroid hücresi üzerinde etkisi incelenmiştir. Çalışmada model organizma olarak in vitro FRTL-5 sıçan foliküler tiroid hücresi kullanılmıştır. Tiroid spesifik genler ve transkripsiyon faktörleri üzerinde BPA'nın etkisi araştırılmıştır. 10^{-9} – 10^{-4} M konsantrasyon aralığında 24 ve 72 saatlik BPA maruziyetinin FRTL-5 hücrelerinin canlılığını kontrole kıyasla etkilemediğini bulunmuş ve bu konsantrasyon aralığında BPA'nın non-toksik olduğunu belirtmişlerdir. 10^{-9} – 10^{-4} M BPA konsantrasyon aralığında tiroid hormon sentezi ile ilişkili genler olan *TSHr*, *Nis*, *Tpo* ve *Tg*

ekspresyonlarına 24 ve 72 saat maruziyet sonucunda bu genlerin ekspresyonlarına BPA'nın etkisi incelenmiş ve *Tpo* ekspresyonlarında görülen inhibisyon hariç diğer genlerin ekspresyonlarında anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Yine aynı şekilde tiroid transkripsiyon faktörleri olan Pax8, Nkx2-1, Foxe1 mRNA seviyelerinde meydana gelen değişim incelenmiş ve 24 saatlik 10^{-9} – 10^{-4} M BPA maruziyeti sonucunda genlerin ekspresyonlarında artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Ancak ilginç şekilde 24 saatlik maruziyette U biçiminde doz cevap eğrisi görülmüştür. 72 saatlik maruziyette ise sadece Pax8 ve Foxe1'in ekspresyonlarında artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Sonuç olarak araştırmacılar tiroid foliküler hücre gen ekspresyonunu, özellikle tiroid hormonları sentezinde yer alan enzimleri kodlayan genleri etkilediği sonucuna varmışlardır. Bu etkinin ise başlıca gen ekspresyonlarını düzenleyici görev gören transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarındaki artıştan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (187).

2.6.2. *In vivo* çalışmalar

Zoeller ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada gebelik ve laktasyon döneminde Sprague- Dawley sıçanlarında 0, 1, 10, and 50 mg/kg BPA vücut ağırlığı/gün dozlarında gebelik ve laktasyon döneminde dişi sıçanlara uygulanmıştır. Dişi sıçanlardan elde edilen yavrulardan 4, 8, 15 ve 35. günlerde disseksiyon ile beyin ve kan örnekleri alınmıştır. Kandaki T4 seviyeleri ölçüldüğünde sadece 15. gündeki erkek ve dişi yavrularda uygulanan tüm dozlarda serum T4 seviyelerinin kontrole kıyasla anlamlı ölçüde arttığı ($p>0,01$) ancak, 15. gün disseksiyonuna uğrayan erkek yavrularda serum TSH seviyeleri açısından gruplar arasında farklılık olmadığı bildirilmiştir. 15. günün sıçan beyin gelişimi açısından önemli olmasından dolayı dişi ve erkek yavrularda korteks ve hipokampusta RC3/neurogranin ekspresyonlarına bakılmıştır. Uygulanan tüm dozlarda hipokampusta RC3/neurogranin ekspresyonu kontrollere kıyasla BPA'ya maruz kalan tüm hayvanlarda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,01$). Sonuç olarak BPA'nın TR β antagonisti olduğu ve çok daha az etkin bir şekilde TR α antagonisti olduğu sonucuna varmışlardır. Hipofizde bulunan TR β aracılı inhibisyon ile hipofizin feed-back mekanizmasını engelleyerek daha çok T4 seviyelerinde artışa neden olduğu belirtilmiş; hipokampusta artan T4'e cevaben RC3/ neurogranin ekspresyonlarında TR α aracılı olarak BPA daha az etkin antagonist

olduğu için artış görüldüğü şeklinde açıklanmıştır. Özetle, bu çalışma ile BPA'nın östrojenik etkisinden bağımsız olarak selektif tiroid hormon antagonisti olduğu gösterilmiştir (21).

Zhang ve ark. (2017) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, BPA'nın tiroid karsinogenezi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla model organizma olarak F344 dişi Fischer sıçanları kullanılmıştır. Sıçanlara tek doz 2800 mg/kg N-bis-(2-hidroksipropil)nitrozamin (DHPN) verilen ve verilmeyen iki başlıca grup olarak ayrılmış ve 1000 µg/kg Potasyum iyodür (KI) diyetinde ayrıca 250 ve 1000 µg/kg BPA uygulanmıştır. Kontrol grupları ile birlikte 12 grup oluşturulmuştur. 64 hafta BPA maruziyeti gerçekleştirilmiş ve DHPN + KI + düşük doz 250 µg/kg BPA uygulanan grupta anlamlı en yüksek papiller tiroid tümör insidansı (%50) bulunduğu rapor edilmiştir. DHPN + KI + 1000 µg/kg BPA maruziyeti sonucunda ise fokal hiperplazinin (%100) yoğun rastlandığı ve bunların da prekanseröz olduğu rapor edilmiştir. Sonuç olarak, düşük doz BPA'nın aşırı iyot ve DHPN maruziyeti sonucunda tiroid karsinoma duyarlılığını artırabildiği, ancak DHPN uygulanmayan gruplarda iyot veya BPA'nın tiroid karsinoma üzerinde bir artışa yol açmadığı gösterilmiştir. BPA'nın DHPN ve KI ile tiroid karsinogenezi artırdığı ve toksikolojik olarak non-lineer doz yanıt eğrisi görüldüğü ortaya konmuştur (188).

Chan ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada BPA, tetrabromobisfenol A ve 2,2',4,4'-tetrabromodifenil eter'in tiroid, hipotalamus hipofiz ve tiroid aksında gen ekspresyonları üzerindeki etkilerini incelemek için *Danio rerio*, zebra balığı larva ve embriyoları kullanılmıştır. Öncelikle medyan letal (LC₅₀) ve efektif (EC₅₀) konsantrasyonlar belirlenmiş ve subletal konsantrasyonlarda ilgilenilen genlerin ekspresyonlarına bakılmıştır. BPA'nın LC₅₀ ve EC₅₀ değerleri sırasıyla 8.04 mg/L ve 5.25 mg/L olarak tayin edilmiş ve BPA'nın NIS, TG, TPO, TRα, TRβ, TSHβ, and TTR mRNA seviyelerinden sadece larvalardaki TSHβ ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Araştırmacılar sonucu zebra balığında BPA'nın antitiroid özelliğine kıyasla östrojenik özelliklerinin daha baskın olduğu şeklinde yorumlamışlardır (189).

Tan ve ark. (2003) tarafından BPA ve nonilfenol'ün subakut toksik etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, 48 juvenil erkek Sprague-Dawley sıçanlarına 29-30 gün 100 mg/kg BPA, nonilfenol ve kombine maruziyet uygulanmıştır. Maruziyet

sonunda sıçanların dokuları hematoksinin ve eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda histopatolojik değişimler incelenmiştir. Sadece BPA'ya maruz kalan grupta tiroid ağırlığı kontrole kıyasla anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0,01$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BPA ve nonilfenol'e maruz kalan gruplarının hiçbirinde tiroid ve paratiroid kesitinde herhangi bir anormallik veya değişiklik gözlenmemiştir. BPA'nın sıçanlarda belirgin testis ve böbrek dejenerasyonuna yol açtığı gözlenmiş, ayrıca ilginç şekilde nonilfenol ve BPA'nın kombine uygulanması, toksik etkilerden organizmanın daha az etkilenmesine neden olmuştur (190).

Heimeier ve ark. (2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise T3 bağımlı omurgalı gelişimi üzerinde BPA'nın etkisi moleküler ve morfolojik olarak incelenmiştir. Çalışmada model organizma olarak premetamorfik *Xenopus laevis* yavruları kullanılmıştır. Hayvanlara; 2 nm T3, 1 ve 10 μ M BPA kombinasyonlar şeklinde, metamorfoz morfolojisi için uzun dönem 21 gün ve histolojik incelemeler ve mRNA ekspresyonlarında meydana gelen değişim için kısa dönem 4 gün maruziyet gerçekleştirilmiştir. Kontrole kıyasla ise BPA uygulamasının her iki dozda da yavrunun gelişiminde anlamlı değişime yol açmadığı gözlenmiştir. Ancak, T3 ve BPA'ya kombine maruz kalan yavrularda sadece T3'e maruz kalan gruba kıyasla metamorfozda önemli ölçüde gecikme gözlenmiştir. Ve bu etkinin doza bağlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca BPA'nın T3 varlığında promoter genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu inhibe ettiği ancak T3 yokluğunda transkripsiyonel etkinin çok az olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$). Histolojik incelemelerde de barsaklardaki T3'e cevaben gelişen remodeling üzerinde T3 maruziyeti sonucu meydana gelen kas dokusunda ve bağ doku tabakalarında artmış kalınlığın, BPA ile beraberinde T3 maruziyeti sonucunda çok az morfolojik değişim ile inhibe edildiği ortaya konmuştur. Sonuç olarak, BPA'nın omurgalı gelişimi üzerinde T3 aracılı olarak ligandın transkripsiyonel aktivitesini ve T3 ile indüklenen metamorfozu baskıladığı, Bu nedenle de BPA'nın metamorfozu inhibe edici etkisinin T3 aracılı gerçekleştiği ve gelişmekte olan yavrular üzerinde BPA'nın majör etkisinin östrojenik yollardan ziyade T3 yolları üzerinde gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır (191).

2.6.3. Epidemiyolojik çalışmalar

Wang ve ark. (2013) tarafından Çin’de yapılan kesitsel çalışmada 40 yaş ve üstü orta yaş ve yaşlı 3394 bireyin idrar BPA, serum tiroid hormonları ve TPO, Tg antikoru ölçümü yapılmış ve Çin popülasyonunda idrar BPA düzeyleri ve tiroid fonksiyonu arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığı gösterilmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda hem erkek hem de kadınlarda, artan idrar BPA maruziyetine bağlı olarak serum serbest T3 seviyesinin aşamalı olarak arttığı ve serum TSH seviyesinin aşamalı olarak azaldığı ortaya konmuştur ($p < 0,01$). Serum serbest T4, tiroglobulin ve tiroid peroksidaz antikoru arasında ise BPA maruziyetine bağlı olarak açık bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca çalışmada artmış BPA maruziyetinin artmış tiroid fonksiyonu (hipertiroidi veya subklinik hipertiroidi) ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. BPA’nın tiroid fonksiyonu üzerine olan etkisinin otoimmüniteden kaynaklanmayabileceğini ve doza bağlı olarak TR üzerinde T3 ile stimüle edilen transkripsiyonel aktivitenin baskılanmasına neden olabileceği ve bunun da sadece organizma üzerinde BPA’nın tiroid hormon yetersizliği veya fazlalığı tablosunu taklit edebileceği, herhangi bir etki veya hastalık tablosu oluşturmayacağı belirtilmiştir (192).

Brucker-Davis ve ark. (2011) tarafından çevresel kontaminantlara in utero maruziyetin kriptorşidik erkeklerin tiroid fonksiyonları üzerine etkisinin incelendiği prospektif çalışmada maternal süt ve yenidoğan kordon kanında çeşitli çevresel kirlenici kimyasalların ölçümleri ile yenidoğanlarda serum TSH ve serbest T3, T4 ölçümleri yapılmıştır. Çalışmada maternal sütte BPA ölçümü ise yapılmamıştır. 60 kriptorşidik erkek ile bunlarla eşleştirilen 76 kontrol arasında tiroid fonksiyonları açısından herhangi bir fark bulunmamıştır. Bundan dolayı kontrol grubundaki yeni doğanların koryon kanları incelendiğinde; yenidoğanların koryon kanlarındaki BPA konsantrasyonları ile serum TSH arasında negatif bir ilişki adına için küçük bir eğilim bulunmuştur ($p = 0.077$). Bu çalışma gelişme süresince BPA maruziyetinin tiroid fonksiyonlarında azaltıcı eğilim gösterebileceğini ortaya koymaktadır (193).

Wang ve ark. (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise Çin’de epoksi reçinesi üretimi yapan fabrikaların işçilerinde idrar total BPA konsantrasyonu ve işçilerin laboratuvar parametreleri incelenmiştir. Yapılan kesitsel çalışmada BPA’ya mesleki maruziyetin sağlık üzerine olumsuz etkileri değerlendirilmiştir. 28 işçiyi

kapsayan çalışmada işçilerden idrar ve kan numuneleri toplanmış; idrarda total BPA, mikroalbümin, serumda ise glutamik oksaloasetik transaminaz (GOT), γ - glutamil transferaz (GGT), alkalen fosfataz (ALP), laktat dehidrojenaz (LDH), total T3 ve T4, serbest T3 ve T4, TSH ve C- reaktif protein düzeylerine bakılmıştır. İşçilerde ortalama BPA düzeyi 5,56 – 1934,85 ng/ml aralığında, ortalama 55,73 ng/ml bulunmuştur. Paketleme/kırma birimlerinde çalışan işçilere kıyasla besleme operatörlerinde anlamlı ölçüde daha yüksek BPA düzeyleri saptanmıştır ($p<0,01$). İşçiler total idrar BPA konsantrasyonlarına göre yüzdeliklere kabaca üç eşit gruba ayrıldıktan sonra en yüksek idrar total BPA düzeylerine sahip işçilerde, diğer iki gruba göre anlamlı olarak yüksek serbest T3 seviyeleri saptanmıştır ($p<0,01$). Daha sonra yapılan analizlerde serum serbest T3 seviyeleri ile logaritmik idrar total BPA konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon saptanmıştır ($p=0,002$). Serum TSH seviyelerinde azalma görülse de istatistiksel anlamlı bulunmamıştır. Çalışma sonucunda BPA'ya yüksek mesleki maruziyetin, insan tiroidi üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceğini belirtmişlerdir (194).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3-(4,5-Dimetiltiyazol- 2- il) – 2,5 – Difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma-Aldrich
Bisfenol A	Sigma Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Duchefa Biochemical
Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (DPBS)	Biowest
Etanol	JT Baker
Florometrik Hücre içi Reaktif Oksijen Bileşikleri (ROS) kiti	Sigma Aldrich
Fötal Sığır Serum (FBS)	Biowest
Glutasyon kiti	Cayman Chemical
Glutasyon Peroksidaz kiti	Cayman Chemical
Kaspaz-3 Deney kiti	MyBioSource
Kaspaz-8 Deney kiti	Abcam
L-Glutamin Çözeltisi	Biowest
Penisilin- Streptomisin karışımı	Biowest
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Çözeltisi	Biowest
Selenometiyonin (SM)	USP
Sodyum Selenit (SS)	Sigma Aldrich
Tiyobarbitürik asit- reaktif maddeleri (TBARS) kiti	Cayman Chemical
Tripsin EDTA çözeltisi	Sigma
TUNEL deney kiti	Roche

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

96 kuyu içeren plak	Grenier Bio-One, Nest
Biyolojik güvenlik kabini	Holten Lamin Air Model 1,2
Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Distile su cihazı	MES mp Minipure, mes08/Termo Scientific
Enjektör filtresi (0,22 Mikron por açıklığı)	Merck
Hassas terazi	Mettler Toledo, XS105
Hücre kültür flasks (25, 75 cm ²)	Corning, Isolab
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments, Funvion Line
İnvert mikroskop	Leica
Kryo tüp	Grenier Bio-One
Laboratuvar Tipi Kırık Buz Yapma Cihazı	Scotsman AF100
Lamel	Isolab
Neubauer Lami	Marienfeld
Otoklav	Nüve NC40M
Otomatik Pipet (1-10 µl, 10- 100 µl, 20- 200 µl, 100- 1000 µl, 1 – 5 ml)	Eppendorf, Isolab
Otomatik Pipet uçları (1,10 µl, 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl, 1 – 5 ml)	Eppendorf, True- Line
Santrifüj Cihazı	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
Spektrofotometre	Molecular Devices, SprektraMax M2

Steril Santrifüj Tüpleri	Grenier Bio-One
Steril Serolojik Pipetler(5, 10, 25 ml)	Grenier Bio-One
Su banyosu	Memmert, Edelstaht
	Rostfrei
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio
	VTX-3000L

3.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

Çalışmada insan tiroid kanseri (B-CPAP) hücre hattı kullanılmıştır. İnsan papiller tiroid kanseri hücre hattı Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DMSZ® ACC273)'den satın alınmıştır.

3.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Bisfenol A Çözeltilisinin Hazırlanması

BPA (29 mg) hassas terazide tartılmıştır. 100 µl DMSO'da çözüldükten sonra, bu çözeltiden 20 µl alınmış ve 5 ml besi yerinde çözülerek ara stok hazırlanmıştır. Besi yeri ile ara stok çözeltisi seyreltilerek hücrelere uygulanacak BPA çözeltisi hazırlanmıştır. Nihai olarak elde edilen 10 - 600 µM aralığındaki BPA çözeltileri hücrelere uygulanmıştır. BPA çözeltileri %0,1 DMSO'dan daha düşük konsantrasyonlarda DMSO içermektedir. Her deney öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.

3.4.2. Selenometiyonin ve Sodyum Selenit Çözeltilerinin Hazırlanması

Sodyum Selenit Çözeltisi:

Sodyum selenit (Na_2SeO_3) (8,6 mg) hassas terazide tartılmış ve 5 ml besi yerinde çözülerek 10000 µM ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok çözeltisi besi yeri ile seyreltilerek 10, 20, 30, 40, 50 nM sodyum selenit çözeltileri uygun doz belirlenmesi amacıyla denenmiştir. GPx aktivite ölçümü yöntemi kullanılarak uygun sodyum selenit dozu belirlenmiştir. Her deney öncesi çözelti taze olarak hazırlanmıştır.

Selenometiyonin Çözeltisi:

Selenometiyonin ($C_5H_{11}NO_2Se$) (9,8 mg) hassas terazide tartılmış ve 5 ml besi yerinde çözülerek 10000 μM ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok çözeltisi besi yeri ile seyreltilerek 2,5; 5; 10; 20; 30; 35 μM selenometiyonin çözeltileri uygun doz belirlenmesi amacıyla denenmiştir. GPx aktivite ölçümü yöntemi kullanılarak uygun selenometiyonin dozu belirlenmiştir. Her deney öncesi çözelti taze olarak hazırlanmıştır.

3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Hücrelerin çoğalmasını sağlamak için kullanılan besi yeri karışımı, 500 ml RPMI, 56 ml FBS(%10), 5 ml (%1) penisilin streptomisin ve 5 ml L-glutamin eklenerek hazırlanmıştır. +4 °C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.4.4. B-CPAP Hücrelerinin Lizis İşleminde Kullanılan Çözeltiler

Lizis Tampon Çözeltisi:

CellLytic™ MT Memeli dokusu lizis/ekstraksiyon reaktifi kullanılmıştır. Proteinler ile minimal girişime neden olan düşük konsantrasyonlarda deterjan, bisin ve 150 mM NaCl içerir. +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Proteaz inhibitörü:

Aprotinin, bestatin, E-64, löpeptin, pepstatin A içerir. Bu proteaz inhibitörleri serin, sistein, aspartik proteaz ve aminopeptidazları inhibe eder. -20 °C’de derin dondurucuda saklanır.

Proteaz İnhibitör Kokteyli:

100 ml Lizis Tamponu çözeltisi içerisine 1 ml Proteaz inhibitörü eklenerek hazırlanmıştır.

3.4.5. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Dimetil Sülfoksit:

Dimetil sülfoksit (C_2H_6OS) yoğunluğu 1,1 g/ml olan uçucu bir sıvıdır. Oda sıcaklığında amber renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

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

0,5 mg/ml konsantrasyonda 3-(4,5- Dimetiltiyazol- 2- il) – 2,5 – Difeniltetrazolyum bromür (MTT) çözeltisi hazırlamak için 15 mg MTT hassas terazide tartıldıktan sonra, 30 ml besi yerinde çözülmesi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan MTT çözeltisi ışıktan korunarak saklanmıştır, 24 saat dayanıklıdır.

3.4.6. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu:

Kit içerisinde 3 ml deney tamponu (10X) bulunmaktadır. 27 ml su ile seyreltilerek nihai çözelti hazırlanmıştır. Nihai çözelti 5 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) tamponudur. +4 °C’de buzdolabında saklandığında 6 ay dayanıklıdır.

Örnek Tamponu:

Kit içerisinde 2 ml örnek tamponu (10X) bulunmaktadır. 2 ml örnek tamponu 18 ml su ile seyreltilerek 5 mM EDTA ve 1 mg/ml BSA içeren içeren 50 mM Tris-HCl, (pH 7,6) nihai örnek tamponu hazırlanmıştır. GPx kontrol çözeltisini ve GPx örneklerini seyreltmek için kullanılır. +4 °C’de buzdolabında saklandığında 1 aya kadar dayanıklıdır.

Glutasyon Peroksidaz Kontrolü:

Kit içerisinde 50 µl sıgır eritrosit GPx’i bulunmaktadır. Enzimin 10 µl’si başka bir vial e aktarılmış ve 490 µl nihai örnek tamponu ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş enzim dakikada ortalama 0,051 absorbans birimi azalmaya neden olur ve 4 saat içinde kullanılmalıdır. Enzim -20 °C’de saklanmalıdır.

Ko – Substrat Karışımı:

Kit liyofilize toz halde Glutasyon redüktaz, Glutasyon, NADPH içermektedir. Her bir vial 6 ml deiyonize su ile çözülmüştür. Sulandırılarak hazır hale gelen reaktif 25 °C’de deney süresince bekletilir. +4 °C’de 2 gün dayanıklıdır.

Kümen Hidroperoksit:

Kit içerisinde 2,5 ml kümen hidroperoksit bulunmaktadır. Kit içerisinde verildiği gibi kullanıma hazır bir reaktiftir. -20°C’de saklanmalıdır.

3.4.7. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

QuantiPro Tamponu QA:

Reaktif QA 0,2 M NaOH içerisinde sodyum tartarat, sodyum karbonat ve sodyum bikarbonattan oluşan 250 ml’lik bir çözeltilidir (pH 11,25). Protein tayin kiti içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

QuantiPro Bişinkoninik Asit QB:

Reaktif QB, %4’lük 250 ml (pH 8,5) bişinkoninik asit (BCA) çözeltisidir. Protein tayin kiti içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Bakır (II) Sülfat Çözeltisi:

% 4’lük 12 ml bakır (II) sülfat pentahidrat çözeltisidir. Protein tayin kiti içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Protein Stok ve Standart Çözeltileri:

1 ml’lik ampullerde 0,15 M NaCl içerisinde 1 mg/ml sığır serum albümini (BSA), koruyucu olarak da %0,05 oranda sodyum azid içeren çözelti bulunmaktadır. Bu çözelti stok protein çözeltisi olarak kullanılmaktadır. Stok protein çözeltisi distile su ile seyreltilerek 0 µg/ml (kör), 0,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda protein standart çözeltileri hazırlanmıştır.

3.4.8. Reaktif Oksijen Bileşikleri Tayininde Kullanılan Çözeltiler

ROS tayin reaktifi:

Kit içersinde 1 vial ROS tayin reaktifi bulunmaktadır. Kit içerisindeki bulunan DMSO ile seyreltilerek hazırlanmıştır. -20 °C’de 1 ay dayanıklıdır.

Dimetil Sülfoksit:

Kit içerisinde 0,1 ml DMSO bulunmaktadır. Kullanıma hazır haldedir.

Deney Tamponu:

Kit içerisinde 20 ml deney tamponu bulunmaktadır. Kullanıma hazır haldedir ve kitin son kullanma tarihine kadar -20 °C’de dayanıklıdır.

Master Reaksiyon Karışımı:

20 µl ROS tayin reaktifi ve 10 ml deney tamponu içeren karışım çözeltisidir. Taze hazırlanmıştır. 2 saat içerisinde kullanılması önerilmektedir.

3.4.9. Total Glutasyon (GSH) Tayininde Kullanılan Çözeltiler

2-(N-Morfolin) Etansülfonik Asit Tamponu (2X):

2-(N-Morfolin) etansülfonik asit (MES), 0,1 M fosfat, 2mM EDTA (pH 6,0) içermektedir. 60 ml MES tamponu (2X), 60 ml deiyonize su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Okside Glutasyon Stok ve Standart Çözeltileri:

Kitte MES tamponu içerisinde 2 ml 25 µM okside glutasyon (GSSG) bulunmaktadır. Kullanıma hazır haldedir. 0-4 °C’de buzdolabında saklandığında 1 yıl dayanıklıdır. GSSG standart çözeltileri; sırasıyla 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 µl GSSG stok çözeltisinden alınarak, sırasıyla 500, 495, 490, 480, 460, 380, 340 µl 1X MES tampon çözeltisi ile seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Sonuç olarak 0 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM, 6 µM, 8 µM konsantrasyonlarda GSSG standart çözeltileri hazırlanmıştır.

Ko-Faktör Karışımı:

Kit içerisinde liyofilize toz halinde NADP⁺ ve glukoz-6-fosfat içermektedir. Kullanmadan önce kuru toz 0,5 ml deiyonize suda çözülür. 0-4 °C’de buzdolabında saklandığında 2 hafta dayanıklıdır.

Enzim Karışımı:

Kit içerisinde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve glutasyon redüktaz enzimleri tampon çözelti içerisinde (0,2 ml) bulunmaktadır. Hazırlanan 1X MES tampon çözeltisinden 2 ml eklenerek seyreltilmiştir. 0-4 °C’de buzdolabında saklandığında 2 hafta dayanıklıdır.

5,5'- ditiyo- bis-2- nitrobenzoik asit Çözeltisi:

Kit içerisinde liyofilize toz halde 5,5'- ditiyo- bis-(2- nitrobenzoik) asit (DTNB, Ellman reaktifi) bulunmaktadır. Kullanmadan önce vial içerisindeki liyofilize toz 0,5 ml distile su ile çözülmüştür. Sulandırılmış reaktif çözeltisi 10 dakika içerisinde kullanılmalıdır.

3.4.10. Lipit Peroksidasyonu Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Tiyobarbitürik Asit Çözeltisi:

Kit içerisinde 2 g tiyobarbitürik asit (TBA) bulunmaktadır. Renk reaktifini hazırlamak için kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Asetik Asit Çözeltisi:

Kit içerisindeki bir vialde 20 ml konsantre asetik asit bulunmaktadır. 40 ml asetik asit 160 ml deniyonize su ile seyreltilir ve renk reaktifi hazırlamak için kullanılmıştır. Seyreltilerek hazırlanan nihai asetik asit çözeltisi oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

Sodyum Hidroksit:

Kit içerisinde bulunan 20 ml sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi (10X), 180 ml deiyonize su ile seyreltilerek hazırlanan nihai çözelti, renk reaktifi hazırlamak için kullanılır.

Malondialdehit Stok ve Standart Çözeltileri:

Kit içerisinde kullanıma hazır halde 500 μ M malondialdehit (MDA) stok çözeltisi içermektedir. 250 μ l MDA stok çözeltisi 750 μ l distile su ile seyreltilerek 125 μ M ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ara stok çözeltisinin seyrelterek 0 μ M (kör), 0,625 μ M, 1,25 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M konsantrasyonlarında MDA standart çözeltileri hazırlanmıştır.

Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi:

Kit içerisinde kullanıma hazır halde sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi bulunmaktadır.

Renk Reaktifi:

Tiyobarbitürik asitin (530 mg), daha önceden hazırlanmış olan seyreltilmiş asetik asit çözeltisinde (50 ml) ve seyreltilmiş sodyum hidroksit çözeltisi (50 ml) içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır. Çözelti 24 saat dayanıklıdır.

3.4.11. TUNEL Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Enzim Çözeltisi:

Kit içerisinde terminal deoksinükleotidil transferaz buzağı timusundan elde edilen çözelti bulunmaktadır. -20 °C’de saklanır.

Label Çözeltisi:

Reaksiyon tamponunda hazırlanmış nükleotit karışımı içeren çözeltidir. -20 °C’de saklanır.

TUNEL Reaksiyon Çözeltisi:

50 µl enzim çözeltisi ve 450 µl label çözeltisi karıştırılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Deney sırasında taze hazırlanmalıdır ve buz içerisinde tutulmalıdır.

3.4.12. Kaspaz 3 Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Tamponu:

Kit içerisinde 30 ml yıkama tamponu, 750 ml’ye deiyonize su ile seyreltilerek hazır hale getirilmiştir.

Standart Çözeltileri:

Kit içerisinde 20 ng/ml konsantrasyonda kaspaz 3 antikor çözeltisi bulunmaktadır. Standart dilüsyon çözeltileri kullanılarak 0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 ng/ml konsantrasyonlarda standart antikor çözeltileri hazırlanmıştır.

Primer Antikor Dilüsyon Çözeltisi:

Kit içerisinde kullanıma hazır halde primer antikor dilüsyon çözeltisi bulunmaktadır. +4 °C’de muhafaza edilmektedir.

Primer Antikor Çözeltisi:

Biotin işaretli antikor yüzde bir oranında primer antikor dilüsyon çözeltisi seyreltilerek hazırlanarak kullanılmıştır.

Sekonder Antikor Dilüsyon Çözeltisi:

Kit içerisinde kullanıma hazır halde primer antikor dilüsyon çözeltisi bulunmaktadır. +4 °C’de muhafaza edilmektedir.

Sekonder Antikor Çözeltisi:

HRP- Streptavidin konjuge antikor yüzde bir oranında primer antikor dilüsyon çözeltisi seyreltilerek hazırlanarak kullanılmıştır.

TMB Substrat Çözeltisi:

Kit içerisinde kullanıma hazır halde TMB substrat çözeltisi bulunmaktadır. +4 °C’de muhafaza edilmektedir.

Durdurma Çözeltisi:

Kit içerisinde kullanıma hazır halde durdurma çözeltisi bulunmaktadır. +4 °C’de muhafaza edilmektedir.

3.4.13. Kaspaz 8 Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu:

Kit içerisinde 30 ml yıkama tamponu kullanıma hazır halde yer almaktadır. Kullanılmadan önce oda sıcaklığında bekletilir. -20 °C’de derin dondurucuda muhafaza edilmektedir.

Kaspaz 8 Substratı (200X):

Kullanılmadan önce kaspaz 8 substratının oda sıcaklığında erimesi sağlanır. Yapılacak her bir deney sayısı kadar gereken substrat tüplere bölündükten sonra -20 °C’de derin dondurucuda muhafaza edilmektedir. Tekrarlı dondur çöz işleminden kaçınılmalıdır.

Deney Yükleme Solüsyonu:

50 µl kaspaz 8 substratı, 10 ml deney tamponunda pipetle iyice karıştırılarak hazırlanır. Deney için daha az miktarda hazırlanması durumunda kaspaz 8 substratı 1:200 oranında deney tamponu ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.4.14. Işık Mikroskobu İncelemelerinde Kullanılan Çözeltiler

0,1 M Fosfat Tamponu:

Hazırlanılan 20 ml Na_2HPO_4 çözeltisi ile 80 ml NaH_2PO_4 çözeltisi karıştırılır ve 1:1 oranında 100 ml distile su ile seyreltilir. Çözeltinin pH'si 7,42'ye ayarlandıktan sonra tampon çözelti olarak fiksasyon sonrasında yıkama işlemleri için kullanılır. Çözelti +4 °C'de 4 ay dayanıklıdır.

Dörtlü Plastik Karışım Çözeltisi:

20 ml paraldehit, 22 ml DMSA, 1,1 ml BDMA, 0,5 ml DBP 60 °C'ye ısıtılmış beher içinde sıra ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

Metilen Mavisi Çözeltisi:

1 g metilen mavisi ve 1 g NaBH_4 tartıldıktan sonra 100 ml deiyonize suda çözülerek %1, a/ h metilen mavisi çözeltisi hazırlanmıştır.

Azur II Çözeltisi:

1 g Azur II tartıldıktan sonra 100 ml deniyonize suda çözülerek %1, a/ h azur II çözeltisi hazırlanmıştır.

Metilen Mavisi – Azur II çözeltisi:

Hazırlanılan metilen mavisi ve azur II çözeltileri 1:1 oranında karıştırılarak 100 ml çözelti hazırlanmıştır.

%2,5'lik Glutaraldehit Çözeltisi:

Ticari olarak hazır halde temin edilen % 25 glutaraldehit aköz çözeltisi, 1/10 oranında seyreltilerek 100 ml %2.5'lik glutaraldehit çözeltisi hazırlanmıştır.

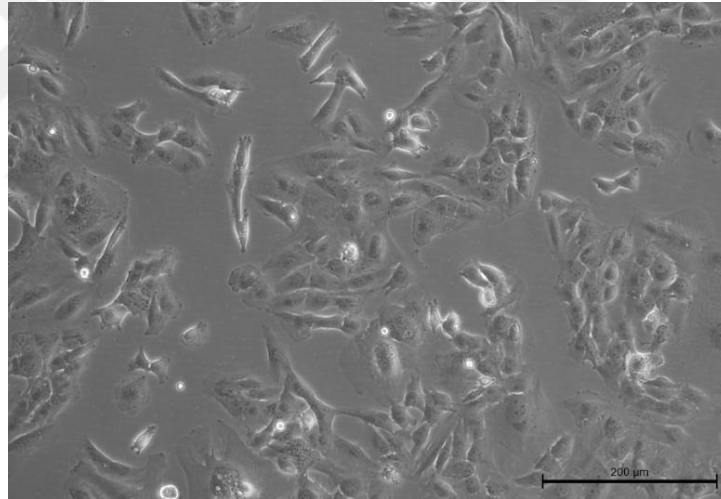
%2'lik Agar Çözeltisi:

12.5 ml distile su içerisine, 0.25 g agar konularak bir erlende hazırlanmıştır. Erlen su banyosunda iyice ısıtılmıştır. Agar, şeffaf olarak su içerisinde dağılıncaya kadar kaynar suda tutulmuş ve ardından etüve konulmuştur.

3.5. Yöntemler

3.5.1. *In vitro* Hücre Kültürü

Çalışmada insan papiller tiroid kanseri hücre hattı (B-CPAP) kullanılmıştır (Şekil 3.5.). Hücreler; %1 Penisilin – Streptomisin, 2 mM L- Glutamin ve % 10 FBS içeren RPMI 1640 besiyerinde, 75 ve 25 cm² kültür flasklarında, 37 °C'de % 100 nemli %5 CO₂'li ortam koşullarında kültür edilmiştir. Hücrelerin uygun aralıklarla besi yeri değişimi yapılmış ve hücreler kültür flasklarında yeterli yoğunluğa gelince pasajlanarak çoğaltımları sağlanmıştır.



Şekil 3.1. B-CPAP hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü.

3.5.2. Çalışma Grupları

- 1. Kontrol grubu:** Bir uygulama yapılmamış hücre hatları
- 2. BPA grubu:** Sitotoksisite deneyleri sonucu BPA için bulunan IC₃₀ dozu olan 302 µM BPA uygulanan hücre hatları
- 3. Selenometiyonin grubu:** 30 µM Selenometiyonin (SM) uygulanan hücre hatları

4. **Sodyum selenit grubu:** 20 nM Sodyum selenit (SS) uygulanan hücre hatları
5. **BPA + SM grubu:** Sitotoksisite deneyleri sonucu bulunan IC₃₀ dozu BPA ve 30 µM selenometiyonin uygulanan hücre hatları
6. **BPA + SS grubu:** Sitotoksisite deneyleri sonucu bulunan 302 µM BPA ve 20 nM SS uygulanan hücre hatları

3.5.3. Hücrelerin Çözülmesi ve Dondurulması

Hücrelerin Çözülmesi:

1. Derin dondurucuda (-80 °C) kryo tüp içerisinde bulunan hücreler çıkarılmıştır ve buzun üzerine alınmıştır.
2. Su banyosunda (37 °C) kryo tüp ısıtılarak hücrelerin çözülmesi sağlanmıştır.
3. Kryo tüp içerisinde bulunan hücre süspansiyonu steril 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne alınmıştır.
4. Tüp içerisine osmotik şoktan kaçınmak için yavaşça taze besi yeri ilavesi yapılmıştır.
5. Hücreleri DMSO'lu ortamdan uzaklaştırmak için 1000 devir/dakika, 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonrasında DMSO içeren süpernatant pipetle çekilerek atılır ve pellete taze besi yeri ilave edilmiştir.
7. Pellet içerisindeki hücreler taze besi yeri içerisinde pipetaj yapılarak süspande edilmiş ve yeni kültür flaskına transfer edilmiştir.
8. İnvert mikroskopta hücreler kontrol edilmiştir..
9. Kültür flaskları içerisindeki hücreler 37 °C'de % 100 nemli %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir.

Hücrelerin Dondurulması:

1. Mikroskop altında hücrelerin kültür flaskı içerisinde yeterli yoğunluğa geldikleri görüldüğünde daha sonraki testler için kullanılmak üzere dondurulup, donmuş hücreler -80 °C’de derin dondurucuda saklanmıştır.
2. Dondurma işlemi öncesinde gerekli olan dondurma çözeltisi, %70 RPMI, %20 FBS ve %10 DMSO oranlarında 1 ml çözelti hazırlanmıştır.
3. Kültür flaskları inkübatörden alınır ve besi yeri bir pipet yardımıyla çekilmiştir.
4. D-PBS ile yıkama yapılarak kültür flaskı içerisinde kalan besi yerleri uzaklaştırılmıştır.
5. Kültür flaskı içerisine 3 ml Tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilir ve hücreler 3-5 dakika inkübatörde tutulmuştur.
6. Hücrelerin tutundukları yerden kalktıkları mikroskopta gözlendikten sonra kültür flaskı üzerine 5 ml besi yeri ilave edilmiştir.
7. Süspende hale gelen hücreler ve besi yeri ortamı steril santrifüj tüpüne aktarılması ardından 1200 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir.
8. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant kısmı atılmıştır.
9. Daha sonra pellet 1 ml daha önce hazırlanan dondurma çözeltisi içerisinde yavaşça pipetaj yapılarak dağıtılmıştır.
10. Hazırlanan hücre süspansiyonu, etiketinde hücre bilgilerini içeren bir kryo tüp içerisine alınmıştır.
11. Kryo tüp 24 saat +4 °C’de bekletilmiştir.
12. 24 saatin sonunda kryo tüp saklamak için -80 °C’ye konulmuştur.

3.5.4. Hücrelerin Pasajlanması

1. Kültür flaskı içerisinde hücrelerin durumu her gün gözlenmiştir.

2. Hücrelerin kültür flaskı içerisinde yeterli yoğunluğa ulaşmaları halinde hücreler bölünebilecek duruma gelmişlerdir.
3. Kültür flaskı içerisindeki besi yeri pipet yardımıyla çekilmiştir.
4. Flaska tutunmuş haldeki hücreler 3 ml D-PBS ile 2 defa yıkanmıştır.
5. Yıkama işleminden sonra hücrelerin kalkmasını sağlamak için flaska 3 ml Tripsin-EDTA karışımı ilave edilerek 3-5 dakika inkübatörde tutulmuştur.
6. Hücrelerin tutunduğu yerden kalktığı ışık mikroskopunda görüldükten sonra 5 ml besi yeri flaska eklenmiştir.
7. Süspande halde olan hücreler ve besi yeri ortamı steril santrifüj tüpüne aktarılmıştır, ardından 1200 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir.
8. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant kısmı atılmıştır. Daha sonra pellet yeterli miktarda besi yerinde homojen dağılacak şekilde süspande edilmiştir.
9. Besi yeri içerisindeki hücreler kültür flasklarına ekilmiştir.
10. Daha sonra kültür flaskları üzerine hücre tipi, tarih, pasaj sayısı, kullanılan besi yeri gibi bilgileri yazıldıktan sonra inkübasyon için 37 °C'de % 100 nemli %5 CO₂'li etüv içerisine konulmuştur.

3.5.5. Hücre Sayımı İşlemi

Canlı hücrelerin Tripan Mavisi ile sayılması işlemidir. Negatif yüklü Tripan mavisi canlı hücrelerin içine giremezken, ölü hücreler boya ile boyanmaktadır. Hücrelerin boyaya gerekenden daha uzun süre maruziyet etmemesine dikkat edilerek de olası yanlış hücre sayımı gibi hatalardan kaçınılmıştır.

Hücre Sayımı İşlemi Basamakları:

1. Kültür flaskına tutunmuş hücreler ışık mikroskobu altında hücre yoğunluğu yönünden incelenmiş ve daha sonra besi yeri ortamı uzaklaştırılmıştır.
2. Flaska tutunmuş haldeki hücreler 3 ml D-PBS ile 2 defa yıkanmıştır.

3. Yıkama işleminden sonra hücrelerin kalkmasını sağlamak için flaska 3 ml Tripsin-EDTA karışımı ilave edilerek 3-5 dakika inkübatörde tutulmuştur.
4. Hücrelerin tutunduğu yerden kalktığı ışık mikroskobunda görüldükten sonra 5 ml besi yeri flaska eklenmiştir.
5. Süspande halde olan hücreler ve besi yeri ortamı steril santrifüj tüpüne aktarılmıştır, ardından 1200 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant kısmı atılmıştır. Daha sonra pellet 10 ml besi yerinde homojen dağılacak şekilde süspande edilmiştir.
7. Hücre süspansiyonundan 50 µl steril bir eppendorf tüpe alınmıştır. Ardından üzerine 50 µl tripan mavisi (%0,4) çözeltisi eklenerek, pipet yardımıyla süspande edilmiştir.
8. Boya çözeltisi ile seyreltilerek hazırlanan hücre süspansiyonu Neubauer hücre sayım lamı üzerine, lamın her iki tarafına da 10 µl hücre süspansiyonu olacak şekilde lam ile lamelin arasından enjekte edilerek sayım işlemine hazırlanmıştır. Lamın üstte 4 altta 4 olmak üzere toplamda 8 ayrı karesi içindeki hücreler, karelerin kenar kısmındaki çizgilere değen hücreler hariç, ışık mikroskobunda sayılmıştır. İşlem sonrasında sayılmış hücre sayısının ortalaması alınmıştır. Daha sonra ml'deki canlı hücre sayısına aşağıdaki formül ile geçilmiştir (Formül 3.1.).

$$ml'deki toplam hücre sayısı = \frac{\text{Sayılan toplam hücre sayısı}}{8} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10\,000/ml \quad (3.1.)$$

9. Canlı hücre konsantrasyonu hesabından sonra besi yeri ile gerekli seyreltmeler yapılarak 96 kuyucuklu plaklara hücreler ekilmiştir.
10. Plaklara ekilen hücreler gece boyu inkübasyona bırakılarak, hücrelerin tutunması ve çoğalması sağlanmıştır.

3.5.6. B-CPAP Hücrelerinin Lizisi ve Fraksiyonlanması

1. Yeterli yoğunlukta hücreye sahip olan kültür flaskalarına test maddeleri uygulanarak, etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda

kültür flaskalarına tripsin-EDTA eklenerek hücreler tutundukları yerlerden kaldırılmıştır. Tripsin-EDTA eklenmesinin ardından hücrelere besi yeri eklenmiştir.

2. Taze hazırlanan proteaz inhibitör kokteyli içeren lizis tampon çözeltisi ile hücreler lize edilmiştir.
3. Kontrol, BPA, SS, SM, BPA+SM, BPA+SS'den oluşan her bir hücre grubuna 800 µl lizis tamponu eklenmiştir. Hazırlanan lizat ikiye ayrılarak eppendorf tüplerine alınmıştır. İlk grup için 3500 devir/dakika hızda, ikinci grup için 13000 devir/dakika hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda tüplerdeki süpernatantlar toplanarak -80 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.5.7. B-CPAP Hücrelerinde 3-(4,5-Dimetiltiyazol- 2- il)-2,5– Difeniltetrazolyum bromür Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

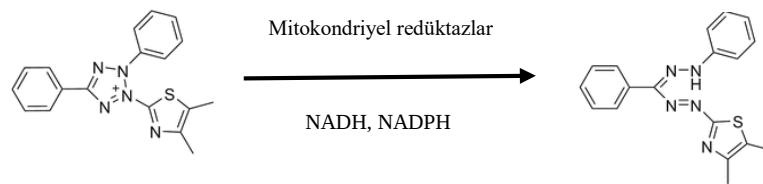
3-(4,5-Dimetiltiyazol- 2- il)-2,5– Difeniltetrazolyum bromür (MTT) maddesi kullanılarak gerçekleştirilen, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı olan hücre büyümesi ve canlılığının spektrofotometrik bir metodla ölçülmesi esasına dayalı bir testtir. Canlı hücrelerde metabolik aktivite ile tetrazolyum halkası açıldığı için canlı hücrelerin tanımlandığı bir testtir.

Yöntemde esas olarak, proliferasyona uğrayan hücrelerde artan dehidrogenaz aktivitesi ile sarı renkli tetrazolyum tuzu, mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Formazan kristallerinin dimetil sülfoksitli ortamda çözülmesi ile de oluşan rengin şiddetinin kolorimetrik olarak spektrofotometrede 570 nm'de ölçülmesi esasına dayanır (195).

Yöntemin Uygulanışı:

1. Hücreler belirli sayıda kuyucuklara ekildikten sonra, besi yerinde 24 saat inkübasyona bırakılarak tutunmaları sağlanmıştır.
2. Steril ortamda biyolojik güvenlik kabininde besi yerleri uzaklaştırılmıştır.

3. Hücrelere besi yeri içerisinde hazırlanmış, 10 – 600 μM konsantrasyon aralığında BPA çözeltisi uygulanmıştır. Çalışma gruplarında hücre canlılığının belirlenmesi için SS, SM ve BPA çözeltileri 20 nM, 30 μM ve 302 μM konsantrasyonlarda hücrelere uygulanmıştır. SS ve SM konsantrasyonları, GPx1 aktivitesi ölçümü yapılarak maksimum GPx1 aktivitesini sağlayan konsantrasyon olarak belirlenmiştir.
4. Kontrol grubu olarak ise hücrelere sadece besi yeri uygulanmıştır.
5. 24 saat inkübasyon süresi sonunda BPA ve Selenyum bileşiklerine maruz kalan kuyucuklardaki çözeltiler uzaklaştırılır ve her bir kuyucuğa daha önceden hazırlanan 0,5 mg/ml MTT çözeltisinden 100 μl eklenir.
6. 3 saat etüv içerisinde inkübasyona bırakılmıştır.
7. İnkübasyon süresi sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırılır. Hücre içerisinde oluşan formazan kristallerini hücre dışı ortama çıkarılması ve çözülmesi için 150 μl DMSO ilave edilmiş ve çalkalayıcıda 5 – 10 dk çalkalanmıştır.
8. 96'lı plaktaki kuyucukların absorbansları 570 nm'de ölçülmüştür.
9. MTT çözeltisi ışığa hassas bir madde olduğundan dolayı deney karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.
10. Kontrol grubunun absorbans değerlerinin ortalaması, %100 canlılık olarak kabul edilmiştir. Karşılaştırılmalı olarak IC_{30} ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.
11. Bu çalışma 4 kez tekrarlanarak, elde edilen sonuçların ortalamaları hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Metabolik aktivite ile canlı hücrelerde MTT'nin formazan kristallerine dönüşüm metabolizması.

Hücre Canlılığının Hesabı:

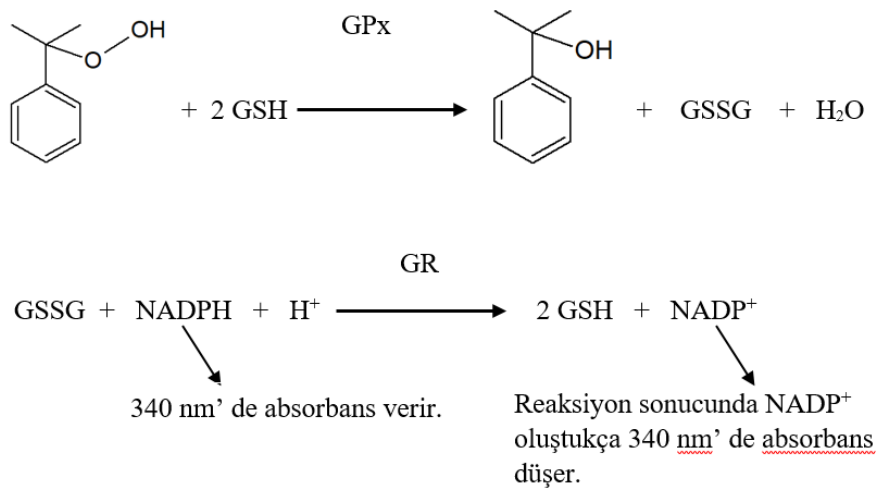
Kontrol grubundaki hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edilmiş, diğer hücre gruplarının canlılığı kontrole kıyasla % canlılık olarak hesaplanmıştır (Formül 3.2.)

$$\%Canlılık = 100 \times \frac{\text{Çalışma gruplarının absorbens değeri ortalaması}}{\text{Kontrol grubunun absorbens değeri ortalaması}} \quad (3.2.)$$

3.5.8. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Ölçümü

Yöntemin Esası:

Uygulanan bu yöntemde kümen hidroperoksinin GPx1 vasıtasıyla ortamdaki glutasyonun kullanılması ile redüklenmesi, okside glutasyonların oluşumu ve bu okside glutasyonun ortamdaki Glutasyon redüktaz ve NADPH vasıtasıyla serbest glutatyon'a dönüşümü sırasında ortamdaki NADPH'ın oksidasyonu sonucu 340 nm'de NADPH'a bağlı absorbens değerinin azalması ölçülmektedir. Ortamda GPx aktivitesi sınırlı olduğu zaman bu absorbanstaki azalma doğrudan GPx aktivitesi ile oransaldır (Şekil 3.7.) (196).



Şekil 3.3. GPx aktivite ölçümü deneyinin esası.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Enzimatik olmayan kuyucuklara (3 kuyucuk) 120 µl deney tamponu ve 50 µl ko-substrat karışımı eklenmiştir.
2. Pozitif kontrol kuyucuklarına (3 kuyucuk) 100 µl deney tamponu, 50 µl ko-substrat karışımı ve 20 µl dilüe edilmiş GPx kontrolü eklenmiştir.

3. Örnek kuyucuklarına 100 µl deney tamponu 50 µl ko-substrat karışımı ve kontrol B-CPAP hücre lizatı, BPA, SS, SM, BPA+SM, BPA+SS maruziyet gruplarının B-CPAP hücre lizatlarından ve 20 µl eklemiştir.
4. Kullanılan bütün kuyucuklara 20 µl kümen hidroperoksit eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. 96 kuyucuklu plak birkaç saniye çalkalanarak reaktifin karışımı sağlanmıştır.
5. En az 5 zaman noktası elde etmek koşulu ile 340 nm’de dakikada bir kez ve 5 dakika boyunca absorbans azalması spektrofotometrede ölçülmüştür.

Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Hesaplanması:

Glutasyon Peroksidaz 1 aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Formül 3.3.).

$$GPx \text{ aktivitesi (nmol / ml / dakika)} = \left(\frac{\Delta A_{340}}{\epsilon_{340}} \right) \times \text{Dilüsyon faktörü} \quad (3.3.)$$

ΔA_{340} = Absorbans değişimi

ϵ_{340} : 0,00373 µM⁻¹ NADPH spesifik ekstinksiyon katsayısı

Dilüsyon faktörü: Örnek hacminin, kuyucuklardaki nihai hacme oranı

3.5.9. Protein Miktarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Alkali ortamda Cu²⁺ - protein kompleksi oluşumu ardından Cu²⁺’nin Cu¹⁺’e indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Bu redüksiyon işlemi başlıca protein molekülü içerisinde bulunan sistein, tirozin, triptofan amino asitlerince gerçekleştirilir. İndirgenen bakır miktarı mevcut protein ile orantılıdır. Redüksiyon sonucu oluşan Cu¹⁺ ile BCA alkali ortamda mavi-mor renkli BCA-Cu¹⁺ kompleksini meydana getirirler. Oluşan rengin şiddeti protein miktarıyla orantılıdır ve spektrofotomekrık olarak ölçülmektedir (197).

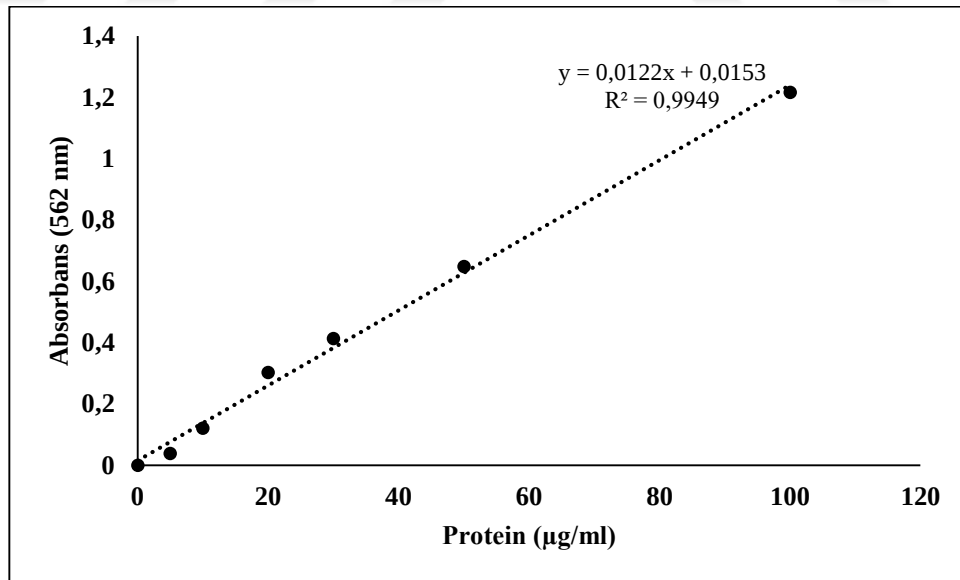
Yöntemin Uygulanışı:

1. Hücre lizatları 1/100 oranında deiyonize su ile seyreltilmiştir.

2. Kuyucuklara sığır serum albümini ile hazırlanan protein standart çözeltileri, kontrol B-CPAP hücre lizatı, BPA, SS, SM, BPA+SM, BPA+SS maruziyet gruplarının B-CPAP hücre lizatlarından 150 µl eklenmiştir.
3. 7 ml QA tampon çözeltisi, 7 ml QB tampon çözeltisi ve 280 µl bakır (II) sülfat çözeltisinden oluşan çalışma çözeltisi, her bir kuyucuğa 150 µl eklenmiştir.
4. Plak, çalkalayıcıda 5 dakika çalkalandıktan sonra etüvde 37 °C’de 2 saat inkübe edilmiştir.
5. Plaktaki kuyucukların absorbans değerleri 562 nm’de spektrofotometrede ölçülmüştür.

Protein Miktarının Hesaplanması:

Protein standartlarının konsantrasyonları ve deney sonucundaki elde edilen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri elde edilmiş; bu eğri kullanılarak örneklerdeki protein miktarı hesaplanmıştır. Daha sonra dilüsyon faktörü ile çarpılarak gruptaki protein miktarları belirlenmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Protein standart eğrisi.

3.5.10. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Floresan olmayan bir prob olan 5- ve 6- klorometil-2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (CM-H₂DCFDA)'ın canlı hücreler tarafından yeşil floresans veren 2',7'-diklorofloresein (CM-DCF) 'e dönüştürülmesi ve oluşan floresans yoğunluğun ölçülmesi ($\lambda_{\text{eksitasyon}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisyon}} = 675 \text{ nm}$) esasına dayanmaktadır. Florometrik Hücre içi ROS kiti ile hücrelerde 1 saatlik inkübasyon sonucu hücrelerde meydana gelen hücre içi reaktif oksijen bileşikleri (özellikle hidroksil OH[•] ve süperoksit O₂^{•-} radikalleri) düzeyinin tespiti için hassas ve tek aşamalı florometrik bir analiz mümkün olmaktadır. Reaktif oksijen bileşikleri sitoplazma içerisinde bulunan florojenik bir sensörle reaksiyon gerçekleştirerek, ortamda bulunan reaktif oksijen bileşikleri ile orantılı miktarda florometrik ürün meydana gelmesini sağlar (198).

Yöntemin Uygulanışı:

1. Kit içerisindeki bütün reaktifler önce oda sıcaklığına getirilmiştir.
2. ROS tayin reaktifi 40 µl DMSO ile çözülerek 500X nihai ROS tayin reaktifi hazırlanmıştır.
3. 96 kuyucuklu siyah hücre kültür plağına, 90 µl besi yeri içerisine hücreler ekilmiştir.
4. Daha sonra hücrelere uygulanacak olan SM, SS, BPA, BPA+ SS, BPA+ SM test maddelerinin 10 katı (10X) konsantrasyonlarında besi yeri içerisinde çözeltiler hazırlanmıştır.
5. Hazırlanan 10X test maddesi içeren çözeltileri her kuyucuktaki hücreler üzerine 10 µl eklenmiştir. Kontrol grubu hücrelerinin kuyucuklarına ise sadece 10 µl besi yeri eklenmiştir.
6. Hücre kültür plağı 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletilmiştir.

7. Hazırlanan 500X ROS tayin reaktifinden 20 µl alınarak 10 ml deney tamponu içerisinde çözülerek master reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.
8. Plaktaki her bir kuyucuk içerisine 100 µl master reaksiyon karışımı eklenmiştir.
9. Hücre kültür plağı 30 dakika – 1 saat aralığında 37 °C’de inkübatörde bekletilmiştir.
10. Ardından kuyucukların floresansı ($\lambda_{\text{eksitasyon}}=640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisyon}}=675 \text{ nm}$) ölçülmüştür.

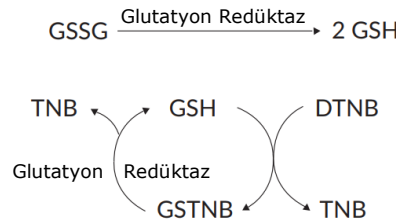
ROS Düzeylerinin Hesaplanması:

Kontrol hücrelerinin ürettiği hücre içi ROS miktarı %100 olarak kabul edilerek, diğer hücrelerin ürettiği ROS miktarı kontrole kıyasla % ROS olarak hesaplanmıştır.

3.5.11. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Yöntem, DTNB’nin GR ile katalizlenen reaksiyon sonucunda, sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asite (TNB) dönüşmesinin sonucu olarak meydana gelen sarı rengin şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Okside glutasyonun (GSSG) GR ile redüklenmesi sonucu oluşan serbest glutasyon (GSH) DTNB ile disülfür GSTNB oluşturur. GR, GSH’yi serbestleştirmek için oluşan disülfür GSTNB indirgenir ve TNB üretilir (Şekil 3.8.). Oluşan TNB absorbansı 414 nm’de spektrofotometrede ölçülür (199). Örnekteki GSH düzeyi karşılaştırılmalı olarak bu yöntemle belirlenebilmektedir.



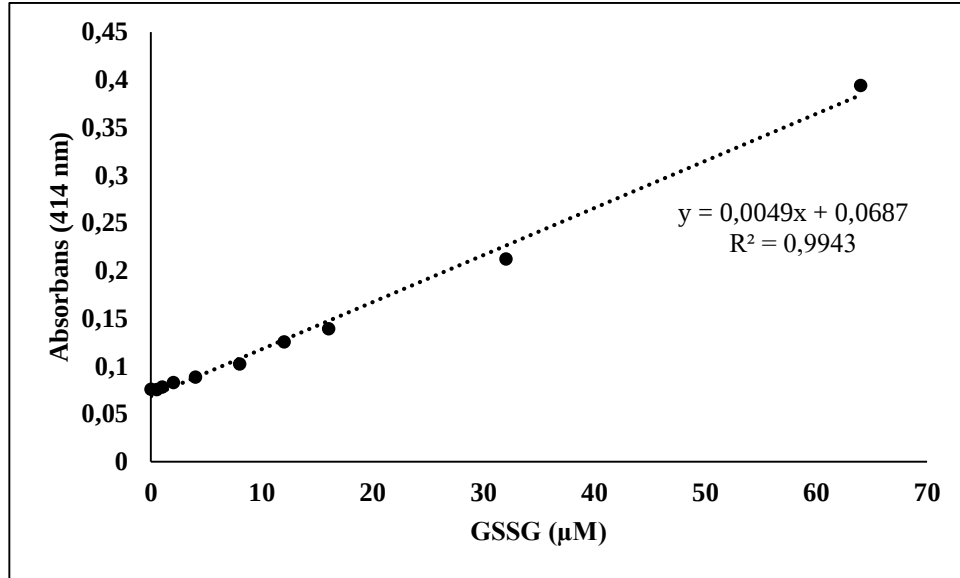
Şekil 3.5. Glutasyon döngüsü.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Kuyucuklara 50 µl hazırlanan GSSG standart çözeltileri eklenmiştir.
2. Kuyucuklara kontrol B-CPAP hücre lizatı, BPA, SS, SM, BPA+SM, BPA+SS maruziyet gruplarının B-CPAP hücre lizatlarından 50 µl eklenmiştir.
3. 20 ml'lik bir vialde içerisine 11,25 ml MES tamponu, 0,45 ml kofaktör karışımı, 2,1 ml enzim karışımı, 2,3 ml distile su ve 0,45 ml DTNB eklenmiş ve karıştırılarak deney kokteyli hazırlanmıştır.
4. Kuyucukların her birine taze olarak hazırlanmış deney kokteylinden 150 µl eklenmiştir.
5. Ardından hücre kültür plağı çalkalayıcıda ışıktan korunarak 25 dakika inkübe edilmiştir.
6. Plaktaki kuyucukların absorbans değerleri 414 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür.

Total Glutasyon Düzeylerinin Hesaplanması:

Standart çözelti (GSSG) konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri ile oluşturulan standart eğrisi kullanılarak örneklerdeki total GSH konsantrasyonları hesaplanmıştır(Şekil 3.6.). Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.6. GSSG standart eğrisi.

3.5.12. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

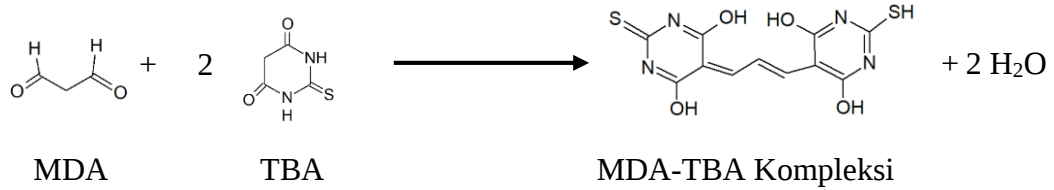
Yöntemin Esası:

Malondialdehit, lipit peroksidasyonu sonucu doğal olarak meydana gelen bir üründür. Hücre içinde oksidatif stres sonucu meydana gelen lipit peroksitlerin stabiliteleri düşüktür ve lipit peroksitler MDA gibi reaktif karbonil grupları içeren bir seri kompleks bileşikler oluşturmak üzere dekompoze olurlar. Yöntemin çalışması ise, MDA ve tiyobarbitürik asit (TBA) 90- 100 °C sıcaklıkta ve asidik ortamda reaksiyonu ile oluşan MDA- TBA kompleksinin renk şiddetinin kolorimetrik olarak 530- 540 nm’de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.9.) (200).

Yöntemin Uygulanışı:

1. Hazırlanmış MDA standart çözeltileri ve hücre lizatları 5 ml’lik cam tüplere 100 μl eklenmiştir. Ardından her tüpe 100 μl sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi eklenerek hızlıca karıştırılmıştır.
2. Her cam tüpe 4 ml hazırlanmış renk reaktifi eklenerek karıştırılmıştır.
3. Cam tüpler su banyosunda 100 °C’de bir saat boyunca bekletilmiştir. Bir saat sonunda cam tüpler kaynayan sudan hızla alınarak buzda 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

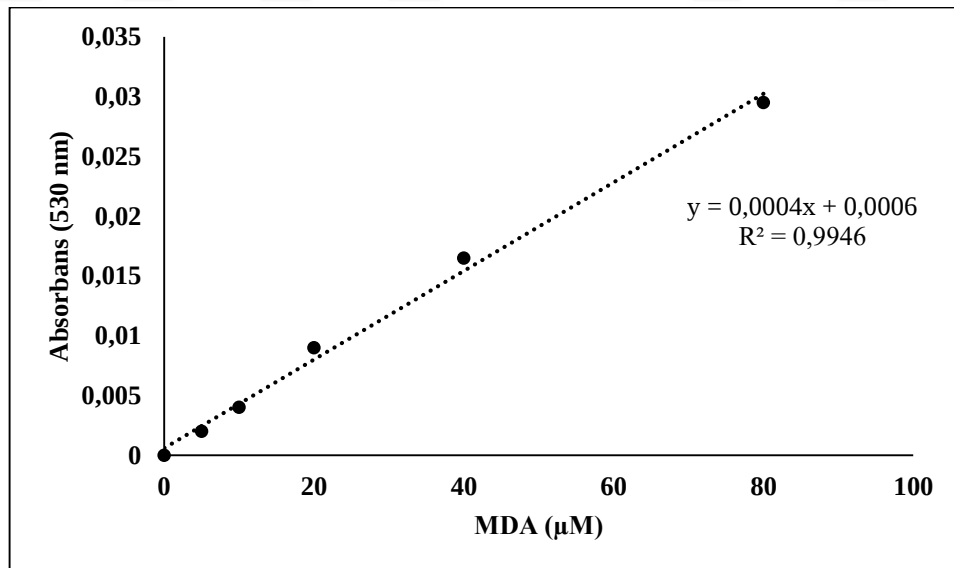
4. Cam tüpler santrifüjde 3500 devir/dakika, 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
5. Cam tüplerin her birinden 150 µl alınarak 96 kuyucuklu plak içerisine eklenmiştir.
6. Plaktaki kuyucukların absorbans değerleri 530 nm’de ölçülmüştür.



Şekil 3.7. MDA – TBA kompleksi oluşumu.

Malondialdehit Düzeylerinin Hesaplanması:

Standartların ve örneklerin absorbans değerlerinin ortalaması hesaplanmıştır. Standartlardaki MDA konsantrasyonuna karşı absorbans değerleri için standart eğri elde edilmiştir. MDA düzeyleri µM cinsinden hesaplanmıştır. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. MDA standart eğrisi.

3.5.13. Mikroskopik İncelemeler

Kontrol, BPA, SM, SS ve BPA ile birlikte SS veya SM uygulanan hücre grupları kültür flaskı içerisinde 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra hücrelerin faz

kontrast mikroskobunda görüntüleri alınarak morfolojik değişimleri değerlendirilmiştir. Görüntüleme için Leica DFC280 mikroskop kullanılmıştır. Işık mikroskobu incelemesi için hücreler glutaraldehit çözeltisinde fikse edildikten sonra Azur II ve metilen mavisi ile inkübe edilmiş, hücrelerin boyanması gerçekleştirilmiştir. Işık mikroskobunda morfolojik değişimler değerlendirilmiştir.

3.5.14. TUNEL Analizi

Kontrol grubu ile BPA, sodyum selenit ve selenometiyonin uygulanan gruplardaki apoptotik hücreler, *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* kiti kullanılarak TUNEL (terminal deoksinnükleotidil transferaz dUTP çentik uç işaretleme) yöntemi ile belirlenmiştir.

TUNEL Analizinin Yapılışı:

1. 50 000 hücre/kuyu olmak üzere 12 kuyu içeren lamlara ekimi yapılmıştır.
2. 24 saat boyunca hücreler tutunması için inkübe edilmiştir.
3. Tutunan hücreler üzerine test maddeleri ve kontrol grubu için besi yeri uygulanmıştır.
4. 24 saat boyunca test maddeleri ve besi yeri maruziyeti için inkübasyonda bekletilmiştir.
5. Hücreler %4'lük paraformaldehit çözeltisi ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
6. Inkübasyon işleminden sonra 3 kez 5'er dakika süre ile D-PBS çözeltisi ile yıkama işlemi yapılmıştır.
7. Permeabilizasyon çözeltisi (%0,1 Triton X-100) ile 5 dakika buz üzerinde inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
8. Hücreler 3 kez 5'er dakika D-PBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra işaretleme basamağına geçilmiştir. Reaksiyon karışım çözeltisi, 450 µl label çözeltisi ve 50 µl enzim çözeltisi karıştırılarak hazırlanmış ve tüm kuyulara 100 µl

reaksiyon karışımı (negatif kontrol olarak 100 µl label çözeltisi konulur) ilave edilmiştir. 37 °C’de nemli inkübatörde 1 saat inkübasyon gerçekleştirilir.

9. İnkübasyon işleminin ardından hücreler 3 kez 5’er dakika D-PBS çözeltisi ile yıkanmıştır.
10. Yıkama işleminin ardından hücrelerin çekirdek boyanmasının gerçekleşmesi amacıyla hücreler DAPI (3,3’- Diaminobenzidin) ile 1 dakika muamele edilmiştir. Hemen sonrasında distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
11. Yıkamanın ardından hücreler floresans gömme ortamı içerisine kapatılmış ve DFC7000T dijital kamera (Leica; Wetzlar, Almanya) ile bağlı floresans mikroskopta (Leica DM6B) hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır.

Değerlendirme İşlemi:

Her bir çalışma grubu için 5 alanda 40X’lik bir büyütme ile TUNEL pozitif olarak değerlendirilen apoptotik hücreler sayılmıştır. Apoptotik hücre sayıları % olarak gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.15. Kaspaz 3 Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası:

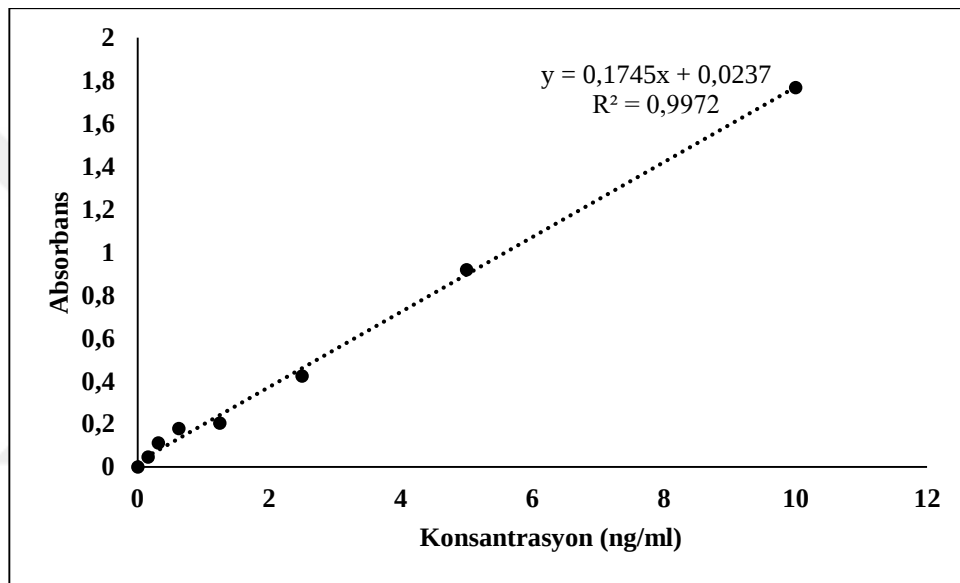
Kitin içerisinde kaspaz 3 monoklonal antikor ile kaplanmış plak bulunmaktadır. Tayin edici antikor olarak biotin işaretli poliklonal antikor kullanılmaktadır. Standartlar ve örneklerin antikor kaplı plakta inkübasyonu sonucu antikorlarla kaplanma gerçekleştirilir. Kaplı antikorun tayini biotin işaretli poliklonal antikor ile yapılır. Yıkama işleminden sonra HRP- konjuge streptavidin ile konjugasyon gerçekleştirilir. Yine yapılan yıkama işlemi sonrasında renklendirmek için TMB substrat kullanılır. Oluşan mavi renk asidik ortam sağlanarak durdurma çözeltisi ile sarıya dönüştürülür. Oluşan rengin şiddeti 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan rengin şiddeti örneklerdeki test edilen faktör ile pozitif korelasyon göstermektedir.

Yöntemin uygulanışı:

1. Hazırlanan kaspaz 3 standart çözeltileri ve B-CPAP hücre lizatları kuyucuklara eklenmiştir.
2. İşlem sonrası 37 °C etüvde 90 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
3. İnkübasyon sonrasında plak içerikleri boşaltılmış ve kuyucuklar 2 defa yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
4. Biyotin işaretli primer antikor, primer antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilerek hazırlanmıştır.
5. Hazırlanan çözelti her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. Ardından 1 saat 37 °C etüvde inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
6. İnkübasyon sonrası plak içerikleri boşaltılmış ve kuyucuklar 3 defa yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
7. HRP- Streptavidin konjugat sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilerek hazırlanmıştır.
8. Hazırlanan çözelti her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. Ardından 30 dakika 37 °C etüvde inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
9. İnkübasyon sonrası plak içerikleri boşaltılmış ve kuyucuklar 5 defa yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
10. Ardından her bir kuyucuğa 90 µl TMB substrat ilavesi yapılır. TMB substrat ilavesinden sonra plak bir folyo ile kapatılır ve 20 dakika 37 °C'de etüvde inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
11. Sürenin sonunda her bir kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi ilave edilir. Rengin sarıya dönmesinin ardından hemen oluşan rengin şiddeti 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür.

Kaspaz 3 Düzeylerinin Hesaplanması:

Kaspaz 3 düzeylerinin hesaplanmasında Molecular Devices - Softmax® programından yararlanılmıştır. Standartların, örneklerin ve kontrol gruplarının programda tanımlanmasının ardından onların absorbans değerleri girilmiştir. Program içerisinde bulunan lineer doğrusal grafik yöntemi kullanılarak konsantrasyona karşı standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir (Şekil 3.9.). Standart eğriden yararlanılarak örnek ve kontroldeki kaspaz 3 düzeyleri hesaplanmıştır. Sonuçlar ng/ml cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.9. Kaspaz 3 standart eğrisi.

3.5.16. Kaspaz 8 Aktivitesinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Kitin içerisinde başlatıcı kaspazlardan kaspaz 8'in aktivitesinin belirlenmesinde kullanılabilen florojenik indikatör olan IETD-R110 substratı bulunmaktadır. Sistein proteaz olan kaspaz 8 aktivitesiyle substratın yıkımı sonucu meydana gelen florofor R110'un (yeşil floresans) salınması sonucu oluşan floresan yoğunluğun ($\lambda_{\text{eksitasyon}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisyon}} = 525 \text{ nm}$) ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Yöntemin uygulanışı:

1. 20 000 hücre/ 90 μl / kuyu olmak üzere hücreler 96 kuyucuklu siyah plak içerisine ekimi gerçekleştirilmiştir.

2. Kör için kuyucuklara hücre ekimi yapılmadan sadece 90 µl besi yeri ekimi yapılmıştır.
3. Hücrelerin tutunması için gece boyu 37 °C, %5 CO₂ 'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır.
4. Daha sonra hücrelere uygulanacak olan SM, SS, BPA, BPA+ SS, BPA+ SM test maddelerinin 10 katı (10X) konsantrasyonlarında DPBS içerisinde çözeltileri hazırlanmıştır.
5. Hazırlanan 10X test maddesi içeren çözeltileri her kuyucuktaki hücreler üzerine 10 µl eklenmiştir. Kontrol grubu hücreleri ve kör için kuyucuklara sadece 10 µl DPBS eklenmiştir.
6. Siyah 96'lı plak içerisindeki hücreler apoptozun indüksiyonu için 4 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ 'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır.
7. Kit içerisindeki bütün reaktifler önce oda sıcaklığına getirilmiştir.
8. Apoptoz indüksiyonu sağlandıktan sonra 25 µl kaspaz 8 substratı, 5 ml deney tamponunda çözülerek deney yükleme solüsyonu hazırlanmıştır.
9. Her bir kuyucuğa 100 µl deney yükleme solüsyonu eklenmiştir.
10. 1 saat boyunca plak ışıktan korunacak şekilde oda sıcaklığında bekletilmiştir.
11. Ardından kuyucukların floresansı ($\lambda_{\text{eksitasyon}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisyon}} = 525 \text{ nm}$) ölçülmüştür.

Kaspaz 8 Aktivitesinin Hesaplanması:

Kör okumanın floresans değeri diğer yapılan tüm okumalardan çıkarılmıştır. Örneklerin kaspaz aktivitesi; örneklerin floresansı ile kontrolün floresansı oranlanarak meydana gelen artışın veya azalışın kontrole göre oransal olarak değişimi ile ifade edilmiştir.

3.5.17. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi SPSS 17.0 (Chicago, IL) programı kullanılmıştır. Tüm gruplardan elde edilen sonuçların karşılaştırılması Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapılmış ve gruplar arasındaki fark Student t testi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiş, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Sitotoksitenin belirlenmesi

B-CPAP hücreleri BPA'ya 10- 600 μ M konsantrasyon aralığında 24 saat maruz bırakılarak BPA'nın MTT yöntemiyle hücre canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. Deney üç farklı zamanda, iki tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı test maddesi BPA'ya maruziyetin gerçekleşmediği kontrol hücrelerine göre % canlılık olarak belirlenmiştir. Deney sonucunda hücre canlılığında %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon (medyan inhibitör konsantrasyon, IC_{50}) ve %30 inhibisyona neden olan konsantrasyon (IC_{30}) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.1. ; Tablo 4.2. ; Şekil 4.1. ; Şekil 4.2.)

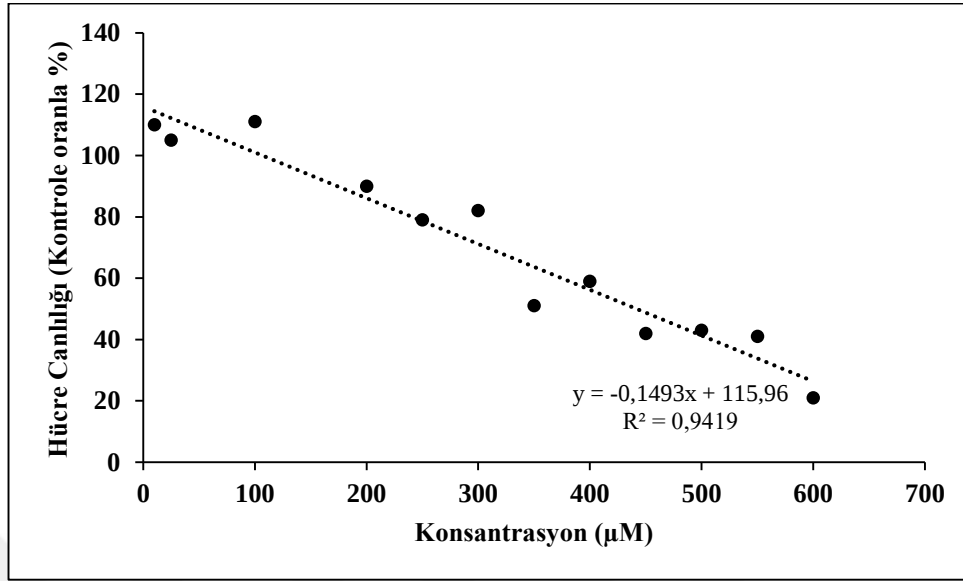
Tablo 4.1. BPA uygulanan B-CPAP hücrelerinin canlılığı.

Uygulanan BPA konsantrasyonları (μ M)	Hücre Canlılığı (%)
10 μ M	110,43
25 μ M	105,41
100 μ M	111,25
200 μ M	90,29
250 μ M	79,49
300 μ M	81,59
350 μ M	50,79
400 μ M	59,38
450 μ M	41,80
500 μ M	42,78
550 μ M	41,35
600 μ M	20,52

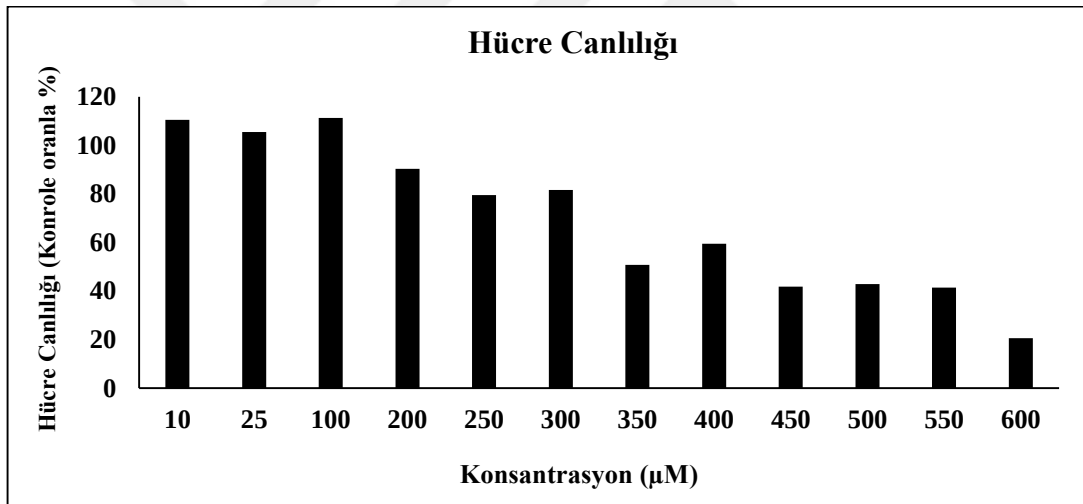
Sonuçlar üç farklı zamanda ve gün içi iki tekrarla yapılan çalışmaların ortalama değeri olup; üç farklı günde yapılan değerlerden elde edilen ortalama hücre canlılığı verilmiştir.

Tablo 4.2. B-CPAP hücrelerinde BPA'nın IC_{30} ve IC_{50} değerleri.

	BPA (μ M)
IC_{30}	302
IC_{50}	436



Şekil 4.1. B-CPAP hücre canlılığı üzerine BPA'nın (10-600 µM) etkisi.



Şekil 4.2. B-CPAP hücre canlılığı üzerine BPA'nın (10-600 µM) etkisi.

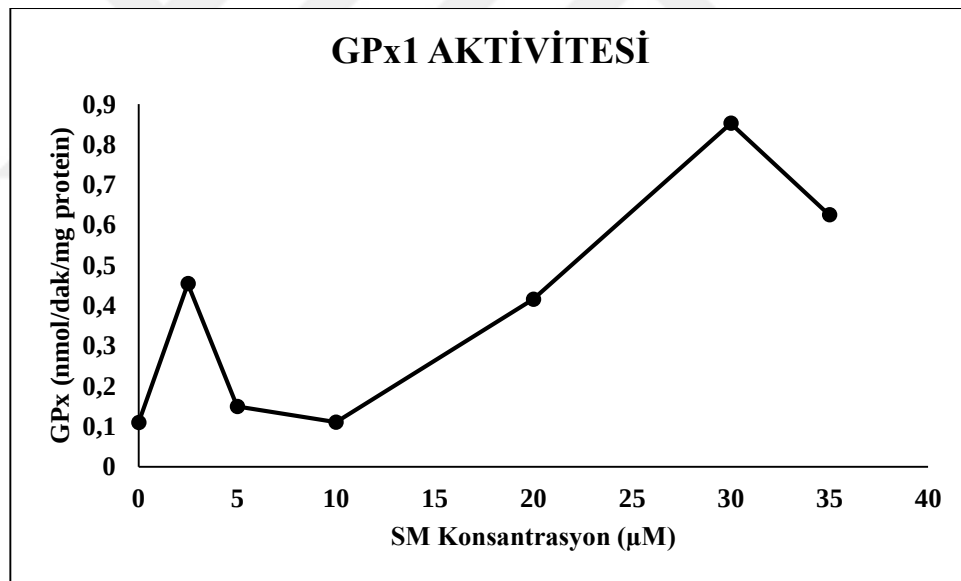
4.2. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü

Hücrelere uygulanacak SM ve SS dozlarının belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda SM ve SS uygulanan B-CPAP hücrelerinde GPx1 aktivitesi ölçülmüş ve maksimum GPx1 aktivitesine yol açan SM ve SS konsantrasyonları belirlenmiştir. (Şekil 4.3. ; Şekil 4.4. ; Tablo 4.3. ; Tablo 4.4.) B-CPAP hücrelerinde 24 saat inkübasyon sonucu maksimum GPx1 aktivitesi sağlayan SM konsantrasyonu 30 µM ve SS konsantrasyonu ise 20 nM olarak belirlenmiştir. BPA toksisitesine karşı SM ve SS'in koruyucu etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda hücrelere,

maksimum GPx aktivitesi görülen bu dozlarda SM ve SS 24 saat öncesinden uygulanmıştır.

Tablo 4.3. Selenometiyonin uygulanan B-CPAP hücrelerinde GPx aktivitesi.

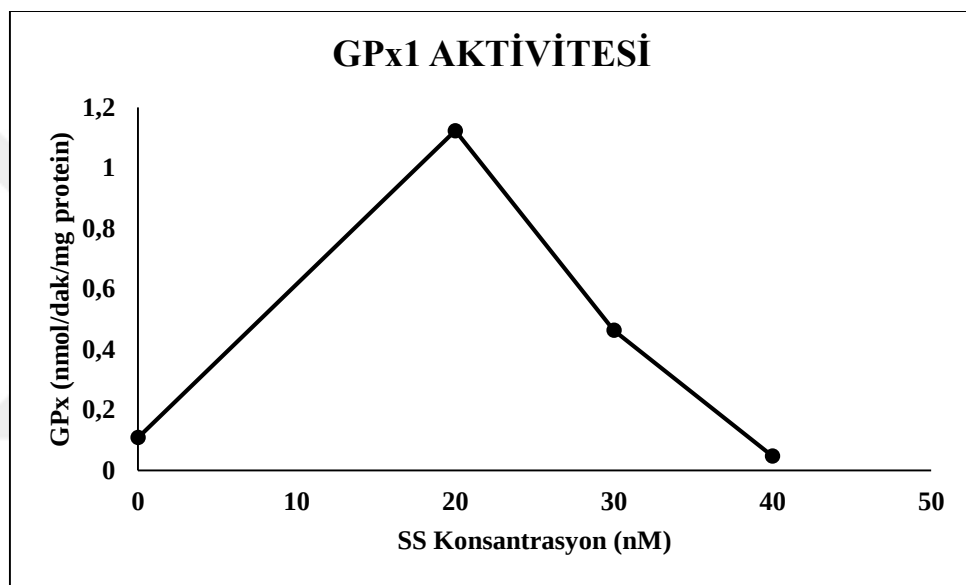
Selenometiyonin konsantrasyonu (μM)	GPx 1 aktivitesi (nmol/dak/mg protein)
0	0,109246
2,5	0,454262
5	0,14932
10	0,110608
20	0,415823
30	0,852606
35	0,625



Şekil 4.3. Selenometiyonin uygulanan B-CPAP hücrelerinde GPx aktivitesi.

Tablo 4.4. Sodyum selenit uygulanan B-CPAP hücrelerinde GPx aktivitesi.

Sodyum selenit konsantrasyonu (nM)	GPx 1 aktivitesi (nmol/dak/mg protein)
0	0,109246
20	1,122849
30	0,463213
40	0,047898

**Şekil 4.4.** Sodyum selenit uygulanan B-CPAP hücrelerinde GPx aktivitesi.

4.3. Deney Gruplarında Hücre Canlılıklarının Belirlenmesi

B-CPAP hücrelerine IC₃₀ konsantrasyonu olarak tayin edilen 302 μ M BPA, maksimum GPx aktivitesi görülen konsantrasyonlarda 20 nM SS, 30 μ M SM uygulanmıştır. Selenyum bileşikleri ve BPA kombine maruziyeti için hücreler 24 saat öncesinde selenyum bileşikleri ile inkübe edilmiştir. Daha sonra çalışma gruplarında; selenyum bileşikleri, BPA ve kombine maruziyetin hücre canlılığı üzerine etkisi MTT yöntemiyle incelenmiştir. Deney gruplarının hücre canlılıkları, selenyum bileşikleri ve BPA uygulanmayan kontrol hücrelerine göre % canlılık olarak belirlenmiştir. Kontrole oranla çalışma gruplarında hücre canlılıkları Tablo 4.5. ve Şekil 4.5.'de verilmiştir. SM uygulanan grupta kontrol grubuna oranla anlamlı bir artış gözlenmezken, SS uygulanan grupta hücre canlılığı %36,81 oranında ve istatistiksel olarak anlamlı

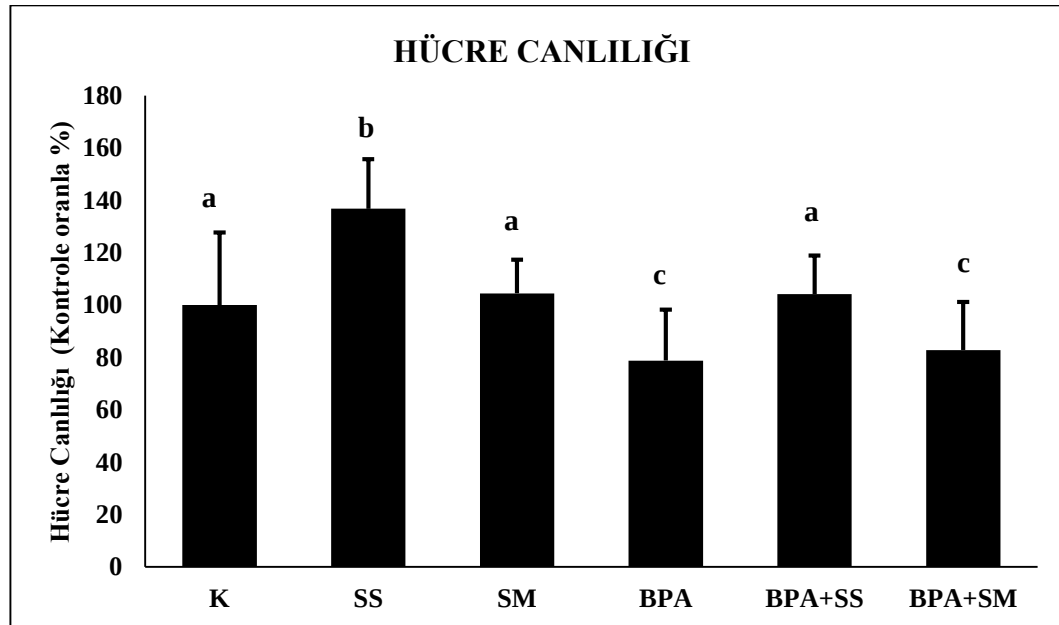
düzeyde artış göstermiştir ($p<0,05$). BPA uygulaması ile hücre canlılığı %78,73 bulunmuş ve kontrol grubuna oranla hücre canlılığındaki bu azalmanın önemli düzeyde ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir. BPA ile birlikte SS uygulanması ile koruyucu bir etki gözlenmiş ve hücre canlılığının kontrol grubu düzeyine gelmesi (%104) sağlanmıştır. BPA+SM gruplarında ise hücre canlılığında tek başına BPA grubuna oranla bir artış (%4,42) görülmekle birlikte, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir.

Tablo 4.5. Çalışma gruplarında hücre canlılığı.

Çalışma Grupları	Hücre Canlılığı (%)
Kontrol	100 ^a
SS	136,81 ^b
SM	104,42 ^a
BPA	78,73 ^c
BPA+SS	104,12 ^a
BPA+SM	82,79 ^c

Sonuçlar üç farklı zamanda ve gün içi iki tekrarlı yapılan çalışmaların ortalama değeri olup; üç farklı günde yapılan değerlerden elde edilen ortalama hücre canlılığı verilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.5. Deney gruplarında B-CPAP hücre canlılığı.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

4.4. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Belirlenmesi

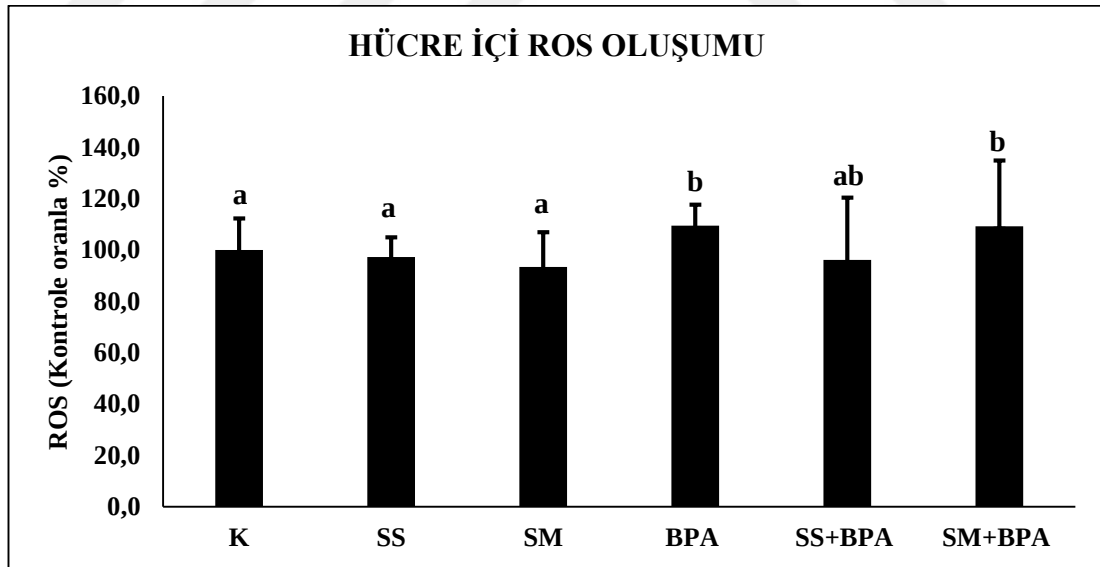
Çalışma gruplarında belirlenen hücre içi ROS kontrole kıyasla % ROS olarak hesaplanmıştır. Hücre içi ROS düzeyleri Tablo 4.6. ve Şekil 4.6'da verilmiştir. BPA ve BPA+SM gruplarında kontrole kıyasla sırasıyla %9,3 ve %9,5 oranında ve anlamlı düzeyde hücre içi ROS artışı gözlenmiştir ($p<0,05$). BPA+SS ve BPA+SM gruplarında ROS düzeylerinin BPA grubuna oranla farklı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.6. Hücre içi ROS düzeyleri.

Çalışma Grupları	ROS oluşumu (kontrole göre %)
SS	$97,2 \pm 7,7^a$
SM	$93,4 \pm 13,6^a$
BPA	$109,5 \pm 8,2^b$
BPA+SS	$96,1 \pm 24,3^{ab}$
BPA+SM	$109,3 \pm 25,6^b$

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.6. Hücre içi ROS düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

4.5. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

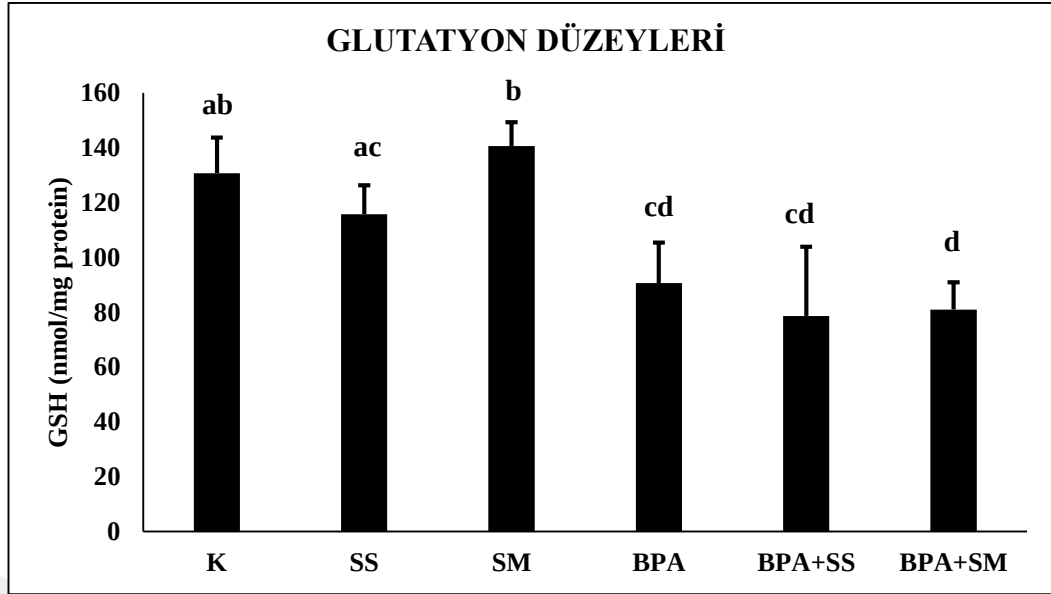
Çalışma gruplarına ait total GSH düzeyleri Tablo 4.7. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir. BPA grubuna ait total GSH düzeylerinin kontrol grubuna oranla %30,6 oranında ve anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$). Ancak, SS ve SM ile herhangi bir koruyucu etki gözlenmemiş; BPA+SS ve BPA+ SM grubunda total GSH düzeylerinde kontrol grubuna oranla sırasıyla %38 ve %39.8 azalma belirlenmiştir. BPA+SS ve BPA+SM gruplarında BPA grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.7. Total glutasyon düzeyleri.

Çalışma Grupları	Glutasyon Düzeyleri (nmol/mg protein)
Kontrol	130,74 $\pm$ 12,9 ^{ab}
SS	115,81 $\pm$ 10,5 ^{ac}
SM	140,63 $\pm$ 8,77 ^b
BPA	90,646 $\pm$ 14,7 ^{cd}
BPA+SS	78,629 $\pm$ 25,2 ^{cd}
BPA+SM	81,001 $\pm$ 9,99 ^d

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^{a, b, c, d} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.7. Total glutatyon düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

a, b, c, d Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.6. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

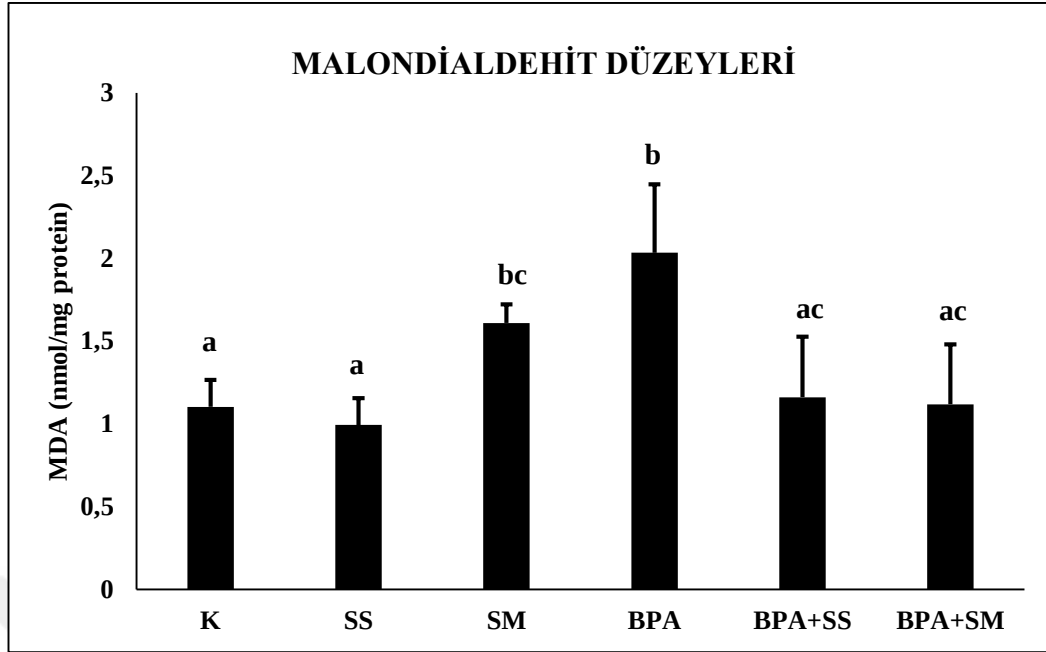
Çalışma gruplarına ait MDA düzeyleri Tablo 4.8. ve Şekil 4.8.'de verilmiştir. Kontrole kıyasla MDA düzeylerinde SM ve BPA gruplarında sırasıyla 1.5 ve 1.8 kat anlamlı düzeyde artış saptanmıştır ($p < 0,05$). BPA+SS ve BPA+SM gruplarında, BPA grubuna oranla MDA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.8. Malondialdehit düzeyleri.

Çalışma Grupları	Malondialdehit düzeyleri (nmol/mg protein)
Kontrol	1,10 $\pm$ 0,1 ^a
SS	0,99 $\pm$ 0,1 ^a
SM	1,61 $\pm$ 0,1 ^{bc}
BPA	2,03 $\pm$ 0,4 ^b
BPA+SS	1,16 $\pm$ 0,3 ^{ac}
BPA+SM	1,11 $\pm$ 0,3 ^{ac}

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

a, b, c Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.8. Malondialdehit düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

a, b, c Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

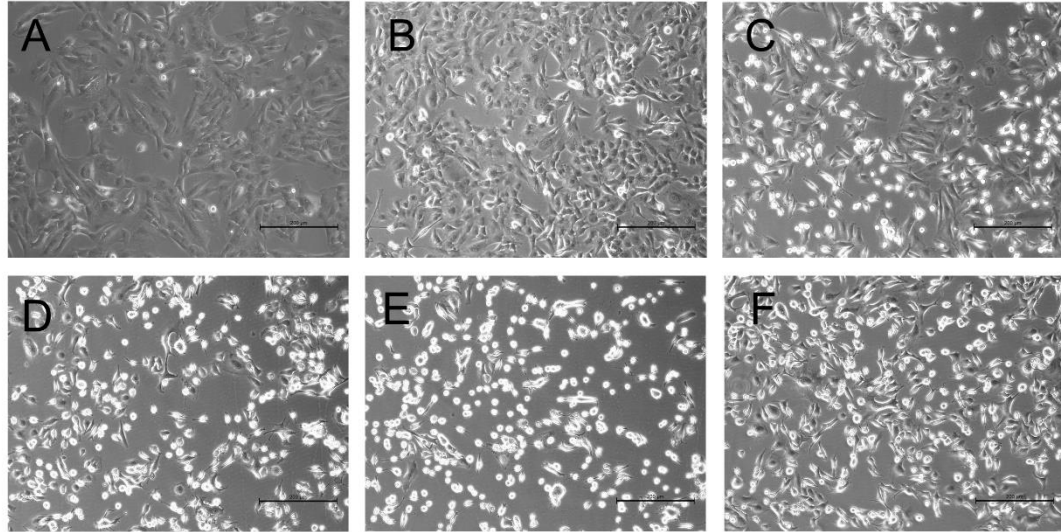
4.7. Mikroskopik Bulgular

4.7.1. Faz Kontrast Mikroskobu Bulguları

Faz kontrast mikroskop altında incelenen kontrol grubunda, B-CPAP tiroid karsinoma hücre hattına ait hücreler tutunan ve monolayer halinde üreyen iğsi hücreler olarak izlenmiştir. SS uygulaması sonrası iğsi hücrelerin arttığı gözlenmiştir. SM uygulanan hücrelerin kontrol grubuna benzer görünümde olduğu belirlenmiştir. BPA uygulanan grupta tutunan iğsi hücrelerin azaldığı, flask yüzeyi ile bağlantılarını koparmış yuvarlak hücrelerin arttığı izlenmiştir. Bu grupta tutunan iğsi hücrelerin kontrol grubundaki hücrelere göre daha küçük, dar sitoplazmalı ve sitoplazmadan uzanan ince uzun uzantılarının olduğu gözlenmiştir. İnce uzun sitoplazmik uzantıları ile komşu hücreler ile bağlantı yapmaya çalışan hücrelerin yanı sıra çevresinde parlak refle veren çok sayıda hücrenin flask yüzeyinden bağlantısını koparıp ayrılmış yuvarlak hücreler olduğu saptanmıştır.

BPA+SS veya BPA+SM uygulanan gruplarda BPA'dakine benzer şekilde çevresinde parlak refle veren flask yüzeyinden bağlantısını koparmış yuvarlak

B-CPAP hücreleri ve ince sitoplazmik uzantılı iğsi B-CPAP hücreleri izlenmiştir. Bu gruplarda BPA'ya göre daha fazla hücre bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. B-CPAP tiroid karsinom hücre hattına ait hücelere BPA ve/veya selenyum bileşikleri uygulaması sonrası morfolojik değişiklikler.

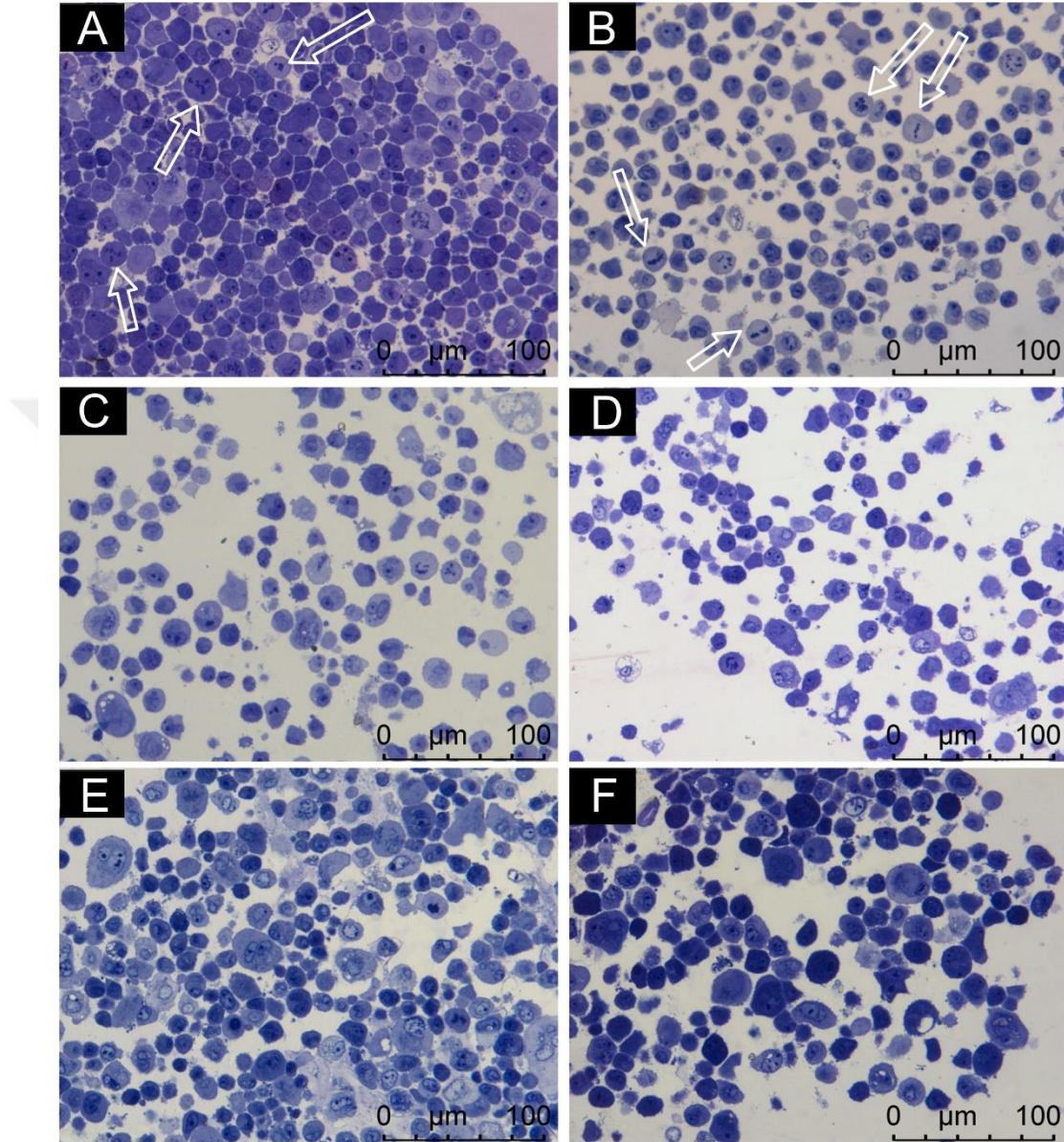
Sodyum selenit uygulanan grupta tutunan B-CPAP hücre sayısı artmıştır. BPA uygulanan grupta tutunan hücre sayısı belirgin olarak azalmıştır. BPA+SS veya BPA+SM uygulanan gruplarda BPA'ya göre daha fazla hücre izlenmiştir. A- Kontrol, B- SS, C- SM, D- BPA, E- BPA+ SS, F- BPA+ SM X10.

4.7.2. Işık Mikroskobu Bulguları

Kontrol grubuna ait örneklerin ışık mikroskopta incelemesinde B-CPAP hücrelerinin ökromatik çekirdek ile belirgin çekirdekçikleri izlenmiştir. Çekirdek sitoplazma oranı çekirdek yönünde artmış olduğu gözlenmiştir. İncelenen kesitlerde birkaç tane mitotik şekil gözlenmiştir. (Şekil 4.10.A). SS ve SM uygulanan grupların kontrol grubuna benzer görünüme sahip olduğu belirlenmiş ve bu gruplarda da mitotik figürler gözlenmiştir (Şekil 4.10.B. , Şekil 4.10.C.). SS grubunda daha fazla mitotik şekil saptanmıştır.

Bisfenol A uygulanan grupta hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir. Çift çekirdekli hücrelerin yanısıra dejenere olmuş nekrotik hücreler ve hücre artıkları izlenmiştir (Şekil 4.10.D). BPA+SS uygulanan grupta çift çekirdekli büyük sitoplazmalı (sitoplazmik bölünmeyi tamamlayamamış) B-CPAP hücrelerinin yanısıra sitoplazmasında vakuoller içeren hücreler ayrıca nekrotik hücreler ve kondanse

çekirdekli apoptotik hücreler gözlenmiştir (Şekil 4.10.E). BPA+SM uygulanan grupta kondanse çekirdekli hücreler ve dejenere hücreler izlenmiştir (4.10.F.).



Şekil 4.10. B-CPAP tiroid karsinom hücre hattına ait hücelere BPA ve/veya selenyum bileşikleri uygulaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri.

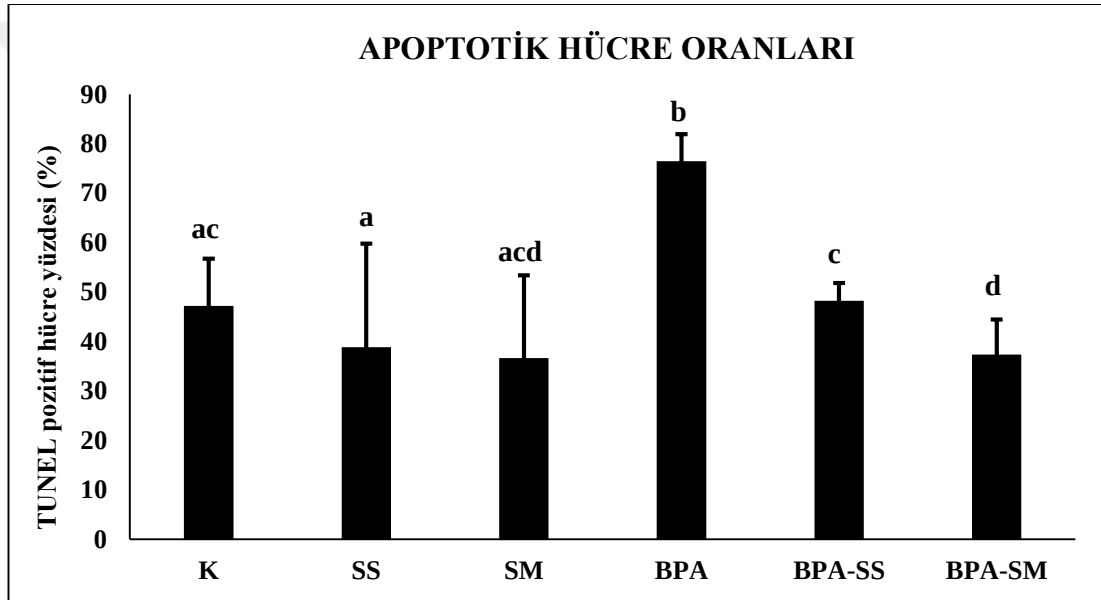
Kontrol ve sodyum selenit uygulanan grupta mitotik figürler (ok).

BPA uygulanan grupta dejenere hücreler izlenmektedir. BPA+SS uygulanan grupta çift çekirdekli büyük sitoplazmalı B-CPAP hücreleri yanısıra sitoplazmasında vakuoller içeren hücreler ayrıca nekrotik hücreler ve kondanse çekirdekli apoptotik hücreler gözlenmektedir. BPA+SM uygulanan grupta kondanse çekirdekli hücreler ve dejenere hücreler izlenmektedir. A- Kontrol, B- Sodyum selenit, C- Selenomethionin, D- BPA , E- BPA+ Sodyum selenit F- BPA+ Selenomethionin uygulaması X10.

4.8. Apoptotik Analizler

4.8.1. TUNEL Analizi

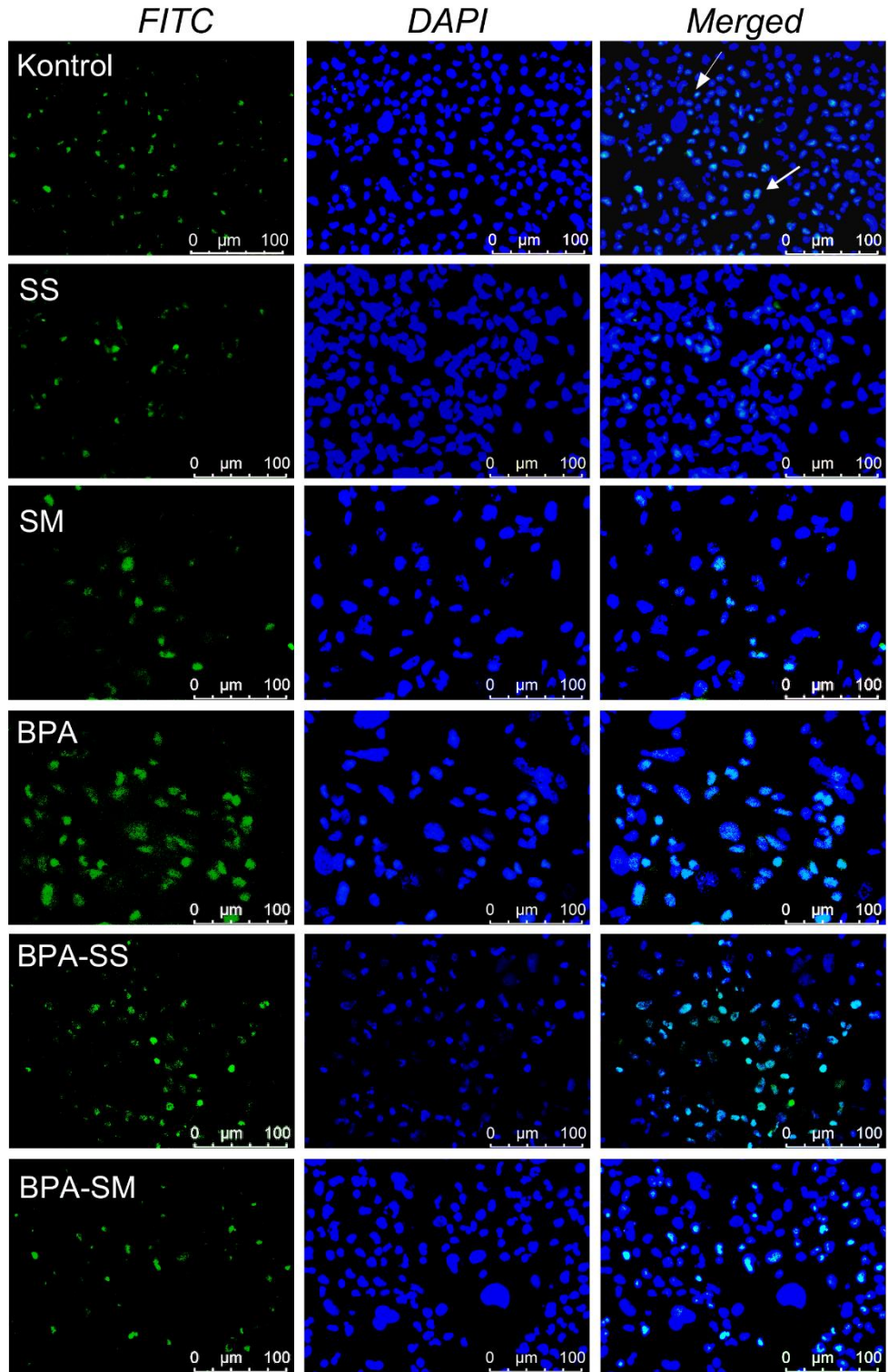
Apoptotik hücreleri belirlemek için yapılan TUNEL analizinde kontrol grubuna ait B-CPAP hücrelerinde ortalama %47,2 TUNEL pozitif hücre saptanmıştır. SS ve SM gruplarında TUNEL pozitif hücre sayısı %38,8 ve %36,6'dır. BPA uygulanan grupta %76,5 iken, SS+BPA ve SM+BPA gruplarında sırasıyla ortalama %48,2; ve %37,3 TUNEL pozitif hücre saptanmıştır. BPA grubunda kontrole kıyasla TUNEL pozitif hücre sayısı yaklaşık 1.6 kat fazladır ($p<0,05$). BPA ile birlikte SS ve SM uygulanması koruyucu bir etki gözlenmiştir. (Şekil 4.11. ; Şekil 4.12.).



Şekil 4.11. Deney gruplarında apoptotik hücre yüzdeleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

a, b, c, d Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.12. Deney gruplarında apoptotik hücreler.

Kontrol grubu ve deney gruplarına ait B-CPAP hücrelerinde DAPI ile çekirdekler mavi, TUNEL pozitif hücreler FITC ile yeşil izlenmektedir. (X400)

4.8.2. Kaspaz 3 Düzeyleri

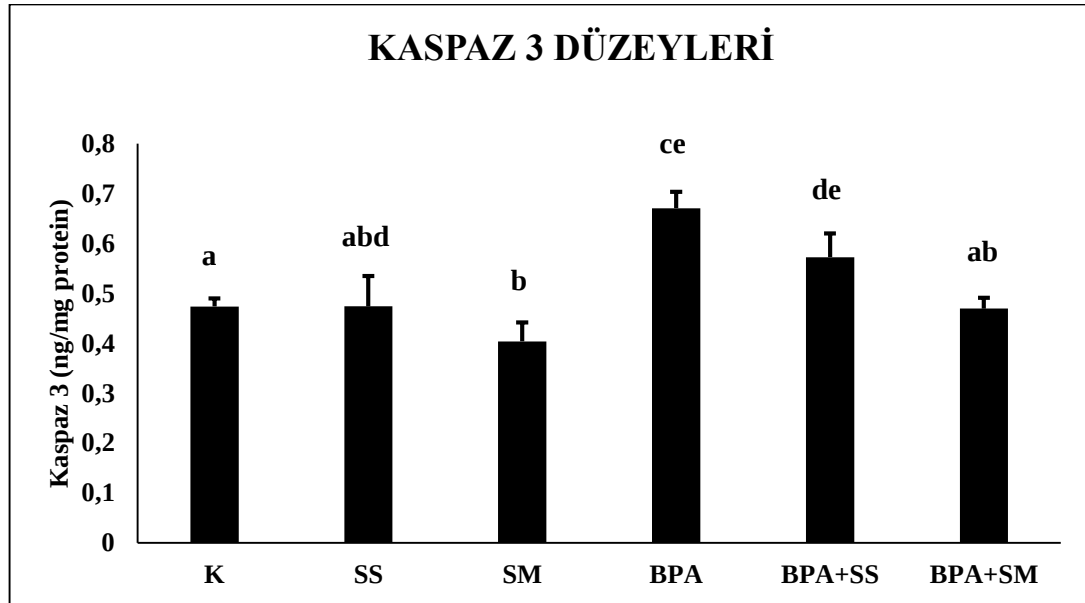
Kaspaz 3 düzeylerinin belirlenmesi için yapılan deneylerin sonuçları Tablo 4.9. ve Şekil 4. 13.'de gösterilmiştir. BPA grubundaki kaspaz 3 düzeylerinin kontrol grubuna oranla 1,4 kat yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). BPA+SS gruplarında BPA grubuna göre bir fark saptanmazken, BPA+SM grubunda anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.9. Kaspaz 3 düzeyleri.

Çalışma Grupları	Kaspaz 3 Düzeyleri (ng/ mg protein)
Kontrol	0,473±0,016 ^a
SS	0,473±0,061 ^{abd}
SM	0,403±0,038 ^b
BPA	0,670±0,033 ^{ce}
BPA+SS	0,572±0,047 ^{de}
BPA+SM	0,469±0,021 ^{ab}

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

a, b, c, d, e Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.13. Kaspaz 3 düzeyleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

a, b, c, d, e Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

4.8.3. Kaspaz 8 Aktiviteleri

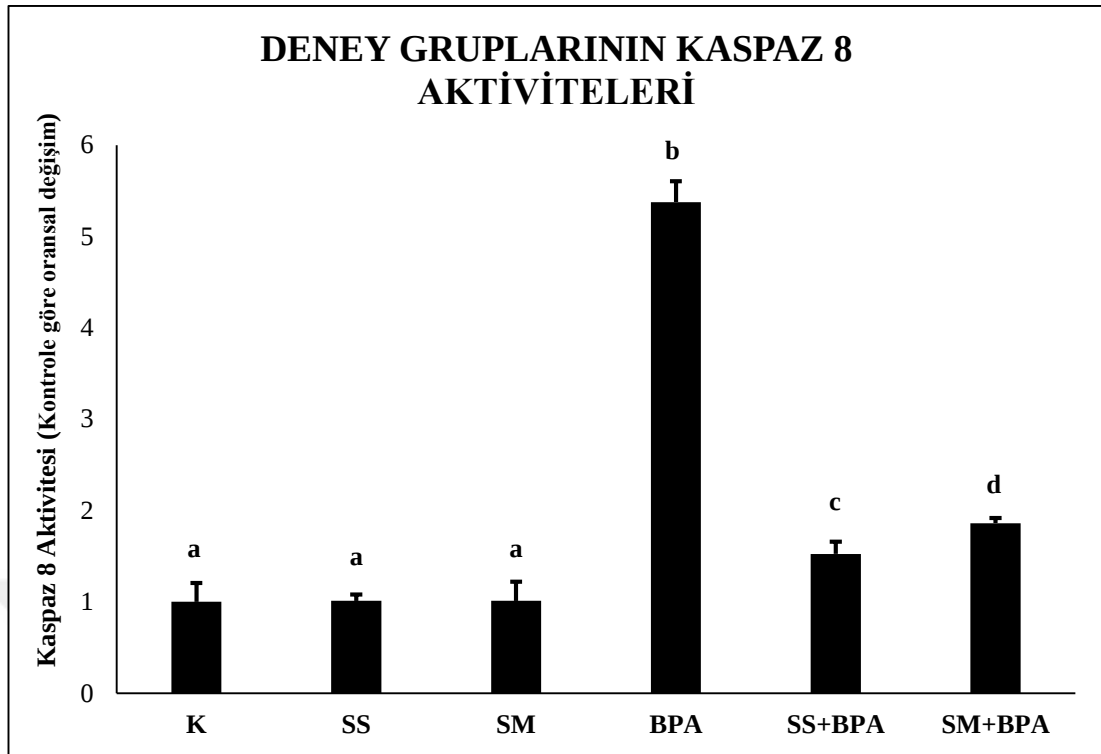
Kaspaz 8 aktivitelerinin belirlenmesi için yapılan deneyin sonuçları Tablo 4.10. ve Şekil 4.14.'de verilmiştir. Çalışma gruplarındaki kaspaz 8 aktivitesi kontrol grubuna oranla katları şeklinde ifade edilmiştir. BPA grubunda kontrole oranla 5,4 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuştur ($p<0,05$). BPA ile birlikte hem SS hem de SM uygulamasının, kaspaz 8 aktivitesinde BPA'nın neden olduğu artışı önlediği ve koruyucu bir rol oynadığı gözlenmiştir.

Tablo 4.10. Kaspaz 8 Aktiviteleri.

Çalışma Grupları	Kaspaz 8 Aktivitesi (Kontrole göre oransal değişim)
SS	1,01±0,06 ^a
SM	1,01±0,2 ^a
BPA	5,38±0,22 ^b
BPA+SS	1,52±0,13 ^c
BPA+SM	1,86±0,05 ^d

Kaspaz 8 aktivitesinin belirlenmesinde kontrol hücrelerinde kaspaz 8 aktivitesi 1 olarak kabul edilmiş ve diğer grupların kaspaz 8 aktiviteleri kontrole göre kat artışı şeklinde hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^{a, b, c, d} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.14. Kaspaz 8 Aktivitesi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

a, b, c, d Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

Kaspaz 8 aktivitesinin belirlenmesinde kontrol hücrelerinde kaspaz 8 aktivitesi 1 olarak kabul edilmiş ve diğer grupların kaspaz 8 aktiviteleri kontrole göre kat artışı şeklinde hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

Bisfenol A, östrojenik aktivite gösterildiği bilinen sentetik bir kimyasal maddedir. Östrojenik aktivite göstermesine rağmen sentetik östrojen preparatlarının içerisinde yer almamıştır. Daha sonra ticari amaçla üretilen epoksi reçinelerinin ve polikarbonat plastiklerin üretimiyle kullanıma girmiştir (28, 29). Plastizer olarak bu yaygın kullanımı BPA'yı dünya genelinde en yaygın üretilen ve kullanılan sentetik bileşiklerden biri haline gelmiştir (201).

Bisfenol A'ya günlük yaşamda büyük oranda maruz kalılabilmektedir (5). Genel popülasyonun BPA'ya maruziyeti ağırlıklı olarak gıda ve su ile gerçekleşir. Gıda ve su kontaminasyonu nedeniyle BPA biyolojik örneklerde de (özellikle idrar ve kan) yaygın olarak bulunur. BPA ve metabolitlerinin idrarla atılmalarının değerlendirildiği çalışmaların sonuçları, ABD'de 0,16 µg/kg vücut ağırlığı/ gün; Japonya'da ise 0,04-0,08 µg/kg vücut ağırlığı/gün BPA maruziyeti gerçekleştiği sonucunu vermektedir (202). Üç aylık yenidoğanlarda BPA maruziyetinin 0,2 µg/kg vücut ağırlığı/gün, 6-12 aylık bebeklerde ise 13 µg/kg vücut ağırlığı/gün BPA alımı gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Yenidoğan ve bebeklerde erişkinlere göre daha yüksek maruziyetin olmasının nedenleri arasında bu yaş gruplarının özellikle oral yolla plastik oyuncaklara maruziyeti, vücut ağırlığına göre daha yüksek gıda ve su tüketimleri ve daha sık solumaları sayılabilir (2, 203).

Birçok kaynaktan gerçekleşen maruziyet sonucunda, biyolojik sıvılarda artan BPA maruziyeti günümüzde çeşitli hastalıklar, sağlık sorunları ve patolojik durumlar ile ilişkilendirilmektedir. Bunlara örnek olarak obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kadın ve erkek infertilitesi, erken ergenlik, meme ve prostat kanseri gibi endokrin sisteme bağlı gelişen kanserler ve polikistik over sendromu (PKOS) dahil olmak üzere çeşitli hastalık ve durumlar verilebilir (5, 61, 62).

Tiroid birçok endokrin bozucunun etkilerine karşı hassas bir organdır. BPA'nın birçok organ ve sistem üzerinde etkisinin yanısıra, tiroid üzerinde de endokrin bozucu olarak davranabildiği ve TR antagonisti olduğu gösterilmiştir. Organizmanın fiziksel ve kognitif fonksiyonları için tiroid bezinin normal çalışması önemlidir. BPA'ya başta bebek ve çocuklar olmak üzere toplum genelinin yaygın maruziyeti düşünüldüğünde

BPA'nın tiroid üzerindeki etkilerinin yeteri kadar araştırılmadığı ve BPA'nın olası tiroid toksisitesi üzerinde literatürde çok az çalışma olduğu görülmüştür (7, 17, 204).

Selenyum esansiyel bir eser elementtir. Selenyum düzeylerinin düşük olması, farklı kanser tipleri ve kalp hastalığı gibi çeşitli hastalıkların riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Artmış ROS ve RNS sonucu meydana gelen oksidatif ve nitrözatif strese karşı organizmanın korunmasında antioksidan selenoproteinlerin önemli rolleri olduğu bilinmektedir (97, 99, 101, 111-114, 205). Tiroid bezi, gram doku başına en yüksek selenyum içeriğine sahip bir organdır ve selenoproteinlerin birçoğunun tiroisitlerde eksprese olduğu bilinmektedir. Bu selenoproteinlerden GPx ve TrxR tiroisitleri oksidatif hasara karşı önemli ölçüde koruyan antioksidan enzimlerdir (24, 110, 121).

Selenyumun esansiyel bir element olmasının yanı sıra toksik bir eser element olduğu da bilinmektedir. Belirli dozlarda selenyum hücre büyümesini ve hücre proliferasyonunu artırabilir; ancak bazı durumlarda ise apoptoz ve/veya nekrozu indükleyebilir. Selenyumun hücre canlılığı üzerindeki etkileri spesifik kimyasal formu ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilir. Yüksek selenyumun düzeylerinin protein tiyol gruplarının oksidasyonuna, çapraz bağlanmasına ve sonuçta hücre ölümüne yol açan ROS oluşumunu tetikleyebildiği bilinmektedir. Bazı selenyum bileşiklerinin tiyol gruplarının oksidasyonu ve süperoksit oluşumuna yol açarak oksidatif stresi indükleyebileceği, mitokondriyal işlev kaybına yol açabileceği, sitokrom c gibi bazı proapoptotik proteinlerin mitokondriden sitozole salınımını başlatabileceği ve takiben apoptoz oluşturabileceğine dair sonuçlar elde edilmiştir (206).

Sunulan bu tez çalışması kapsamında endokrin bozucu özelliği bilinen BPA'nın B-CPAP hücre hattına olası toksik etkileri ve selenyum bileşikleri SM ve SS'in BPA toksisitesine karşı olası koruyucu etkinliği kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. B-CPAP hücrelerine uygulanan selenyum bileşiklerinin dozu selenyum bağımlı bir antioksidan bir enzim olan GPx'in maksimum aktivite gösterdiği konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda BPA'nın sitotoksik etkileri incelenmiş; oluşan ROS IC₃₀ ve IC₅₀ dozlarında değerlendirilmiş, meydana gelen sitopatolojik değişiklikler ışıık

mikroskobu ve faz kontrast mikroskobu ile belirlenmiş; TUNEL yöntemi ile kaspaz 3 ve 8 aktivite/düzeyleriyle apoptotik değişiklikler değerlendirilmiş ve oksidan/antioksidan parametreler ölçülmüştür; tüm sonuçlar gruplar arası karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

5.1. Hücre Canlılığı

Bisfenol A'nın tiroid hücre canlılığı üzerine etkisi ile ilgili literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmalar incelendiğinde farklı tiroid hücre hatlarının kullanıldığı, farklı dozların seçildiği ve farklı inkübasyon sürelerinde çalışmaların yürütüldüğü görülmektedir. B-CPAP hücre hattında ise sınırlı çalışma bulunmaktadır.

Zheng ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada BPA'nın B-CPAP hücre canlılığı üzerine etkisi WST-8 kiti kullanılarak incelenmiş ve 48 saat 300 nM (düşük doz) BPA maruziyetinin %116 oranında, anlamlı ölçüde hücre canlılığını artırdığı gösterilmiştir ($p<0,05$). Aynı konsantrasyonda BPA'ya 72 saat maruziyet de 48 saate benzer bir eğilim göstermiş ancak, 24 saat maruziyet sonucunda kontrol ile anlamlı bir fark bulunmamıştır (185). Sunulan tez çalışmasında ise, B-CPAP hücre hattında 24 saat BPA maruziyeti gerçekleştirilmiş ve en düşük doz olarak test edilen 10 μ M BPA konsantrasyonunda %110 oranında anlamlı ölçüde hücre canlılığı artışı görülmüştür ($p<0,05$). Bu sonuçlar düşük doz BPA'nın hücre canlılığını artırabildiğini göstermektedir.

Wu ve ark. (2016) tarafından yapılan bir diğer çalışmada 24 saat 0,03-300 μ M konsantrasyon aralığında sıçan foliküler tiroid hücre hattında (FRTL-5) BPA maruziyeti gerçekleştirilmiş; BPA'nın 30 μ M'ın altındaki dozlarda 24 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığını azaltmadığı ve IC_{30} konsantrasyonunun 100 μ M olduğu belirlenmiştir (183). Sunulan tez çalışmasında ise B-CPAP hücre hattında BPA'nın 100 μ M ve altı konsantrasyonlarda hücre canlılığını azaltmadığı gözlenmiş olup, IC_{30} konsantrasyonu 302 μ M olarak belirlenmiştir. Silva ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada sıçan foliküler tiroid hücre hattında (PCCL3) hücreler 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M BPA'ya 24 saat maruz bırakılmış ve hücre canlılığı MTT yöntemiyle belirlenmiştir. 10^{-9} M düşük doz BPA uygulanan hücrelerde kontrole kıyasla hücre canlılığının azalmadığı, 10^{-7} M diğer düşük doz uygulanan hücrelerde hücre

canlılığının anlamlı ölçüde arttığı ($p<0,05$), 10^{-3} M yüksek doz BPA'ya maruz kalan hücrelerde ise hücre canlılığının anlamlı ölçüde azaldığı ve bu dozun toksik konsantrasyon olduğu belirtilmiştir ($p<0,001$) (186). Sunulan tez çalışmasında ise, B-CPAP hücrelerine 10-600 μ M konsantrasyon aralığında BPA uygulanmış ve 10, 25, 100 μ M konsantrasyonlarda hücre canlılığında artış belirlenmiş ve uygulanan diğer konsantrasyonlarda (200-600 μ M) ise hücre canlılığında azalma gerçekleştiği görülmüştür. Gentilcore ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, FRTL-5 sıçan foliküler tiroid hücrelerine 10^{-9} – 10^{-4} M konsantrasyon aralığında 24 ve 72 saatlik BPA maruziyeti sonucunda hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirilmiş ve bu konsantrasyon aralıklarında hücre canlılığının azalmadığı ve bu doz aralığında BPA'nın non-toksik olduğunu belirlenmiştir. Bu araştırmacılar sitotoksik bir etki göstermeyen dozlarda BPA'nın tiroid homeostazında rol oynayan gen ekspresyonları üzerinde etkili olabileceğini göstermişlerdir (187).

Tez kapsamında kullanılan selenyum bileşiklerinin (SS ve SM) tiroid hücre canlılığı üzerine etkisi ile ilgili literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmalar incelendiğinde farklı tiroid hücre hatlarında çalışıldığı, uygulanan doz aralıklarının farklı olduğu ve inkübasyon sürelerinin farklılık gösterdiği görülmektedir. Nettore ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, FRTL-5 sıçan foliküler tiroid hücre hattında 100- 500 nM konsantrasyon aralığında ve 24-96 saat inkübasyon sürelerinde maruziyet ile SS'nin hücre üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla selenyumca fakir besiyerinde bulunan hücrelere 100 nM SS uygulanmış ve kontrole kıyasla toplam hücre sayısı ve morfolojisi değişimi incelenmiştir. Sonuç olarak, SS'nin toplam hücre sayısını artırdığı ($p<0,05$) ve hücre büyümesini stimüle ettiği gösterilmiştir. Aynı inkübasyon sürelerinde 500 nM SS uygulanan hücrelerde ise; hücre canlılığı artışı selenyumca fakir besiyerinde üreyen kontrole kıyasla anlamlı ölçüde farklı bulunmamıştır ($p>0,05$) (207). Sunulan tez çalışmasında maksimum GPx aktivitesini sağlayan SS konsantrasyonunda (20 nM), kontrole oranla %36,8 oranında hücre canlılığı artmıştır ($p<0,05$).

Kato ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada SM; WRO, ARO, NPA, FRO tiroid hücre hatlarına 50, 100, 150 μ M konsantrasyonlarda uygulanmış ve tüm konsantrasyonlarda SM maruziyeti sonucu toplam hücre sayılarında azalmaya neden

olduğu belirtilmiştir. Çalışmada 150 μ M maksimum sitostatik doz ile 24, 48, 72 saatlik SM maruziyetinin tüm hücre hatlarında toplam hücre sayılarında anlamlı derecede azalmaya neden olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$) (208). Sunulan tez çalışmasında maksimum GPx aktivitesini sağlayan ve sitostatik olmadığı belirlenen SM konsantrasyonunda (30 μ M), kontrol hücrelere göre SM grubunda %4,4 oranında hücre canlılığı artmıştır ($p>0,05$). Elde ettiğimiz sonuçlar ve Kato ve ark. (2009)'nın sonuçları karşılaştırıldığında; yüksek, supranutrisyonel konsantrasyonlarda SM'in sitostatik etki gösterebildiği, ancak düşük konsantrasyonlarda aynı etkinin görülmediği sonucuna varılabilir.

Bisfenol A ve selenyum bileşiklerine birlikte maruziyetin hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin belirlendiği herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamış olup, sunulan tez çalışmasında MTT yöntemiyle selenyum bileşikler olan SM ve SS ile 24 saat pre-inkübasyon gerçekleştirilmiş hücrelerde, BPA'nın hücre canlılığı üzerine olan etkisi incelenmiştir. IC₃₀ konsantrasyonda BPA maruziyeti sonucunda SS ile pre-inkübe edilmiş hücrelerde, hücre canlılığında kontrole oranla anlamlı artış bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak, aynı durum SM ile pre-inkübe edilmiş ve BPA uygulanan hücrelerde belirlenememiş ve bu hücrelerin canlılığı kontrole kıyasla anlamlı ölçüde az bulunmuştur ($p<0,05$). Bu durumda, SS'in BPA'nın oluşturduğu sitotoksik etkiye karşı SM'e göre daha iyi bir koruyucu olduğu söylenebilir.

5.2. Oksidatif Stres

5.2.1. ROS indüksiyonu

Bisfenol A'nın indüklediği intraselüler ROS üretimi, floresan probalar kullanılarak çok sayıda hücre tipinde ve dozlarla incelenmiştir (71, 184, 209, 210). Diklorodihidrofloresin diasetat (DCFDA) ve benzer floresan probalar, hücre BPA'ya maruz kaldıktan sonra hücre içi peroksit ve süperoksit oluşumunu dolaylı ölçmede sıkça tercih edilirler. Ancak, bu probalar spesifik olarak oluşan radikal türünün belirlenmesinde kullanılamazlar. BPA gibi endokrin bozucularla yapılan çalışmalarda, ROS düzeylerindeki değişimler, hücre tipine ve hücrelerdeki hormon reseptörlerinin durumuna bağlı olarak önemli ölçüde değişebilmektedir (72) .

Porreca ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada FRTL-5 sıçan foliküler tiroid hücrelerinde düşük doz (10^{-9} M) BPA'nın 1 ve 3 gün maruziyet sonrasında kontrole göre sırasıyla 4 ($p<0,01$) ve 1,5 kat ($p<0,05$) ROS artışına neden olduğu; ancak 7 günlük BPA maruziyetinde ise kontrole kıyasla ROS artışının anlamlı olmadığı belirlenmiştir (184). Silva ve ark. (2018) tarafından yapılan bir araştırmada PCCL3 sıçan foliküler tiroid hücrelerinde düşük doz 10^{-9} M BPA'nın 24 saat hücrelere maruziyeti sonucunda *Amplex Red* metoduyla yapılan kalsiyum bağımlı hidrojen peroksit üretiminde kontrole kıyasla anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (186). Sunulan tez çalışmasında kullanılan kitin özelliğine bağlı olarak 302 μ M BPA'nın B-CPAP hücrelerine 1 saat uygulanması sonrasında kontrole kıyasla %10'luk istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,05$).

Selenyumun koruyucu etkisinin, selenoproteinlerin katalitik domainin aktif bölgesinde bulunan selenosisteinin antioksidan işlevi ile gerçekleşebildiği belirtilmektedir. Antioksidan selenoproteinler, hücre içi redoks durumunu ve bunun sonucunda hücre içindeki normal fizyolojik süreçleri koruyabilmektedirler. Normal selenyum düzeylerinin, aşırı ROS ve RNS üretimine karşı önemli derecede koruyucu olabileceği birçok çalışma ile gösterilmiştir (205). Ancak, tam aksine selenyumun suprafizyolojik dozlarda hücre içi ROS oluşumunu artabildiği; hücrenin yaşamsal olarak elzem proteinlerinin tiyol gruplarında çapraz bağlanabildiği ve sonuçta apoptotik hücre ölümüne neden olabildiği bilinmektedir. Sonuç olarak, selenyum farklı dozlarda organizmada hem prooksidan hem de antioksidan etki gösterebilmektedir (211). Nitekim, Shen ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada 10 μ M SS'in HepG2 hücre hattında ROS oluşumunu anlamlı derecede artırdığı, hücrede GSH depleksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$) (212). Suzuki ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, A-549 hücre hattında 50 μ M SM ve 2,5 μ M SS'in 48 saat maruziyeti sonucunda kontrole kıyasla ROS seviyelerinde artış gözlenmiştir. 3 mM N-asetil sistein ile kombine uygulamalarda ise SS ve SM maruziyeti sonucu meydana gelen ROS seviyelerinde anlamlı azalma görülmüştür ($p<0,05$) (213). Sunulan tez çalışmasında SS ve SM maruziyetin sonucunda sırasıyla %2,75 ve %6,6 oranlarında meydana gelen ROS seviyelerindeki azalma kontrolden farklı bulunmamıştır ($p>0,05$). Ayrıca, SS ve SM ile 24 saat pre-inkübe edilmiş hücrelerde BPA maruziyeti sonucunda meydana gelen ROS düzeylerindeki azalma,

BPA grubuna oranla farklı bulunmamıştır ($p>0,05$). SS ve SM'in intraselüler ROS seviyeleri açısından koruculuğu uygulanan doz ve inkübasyon süresinde gözlenmemiştir.

5.2.2. Total Glutasyon Düzeyleri

Glutasyon, hücrelerde en yüksek miktarda bulunan düşük molekül ağırlıklı bir tiyol bileşiğidir. GSH, hücreleri oksidatif hasardan ve elektrofilik özelliğe sahip ksenobiyotiklerden korur; aynı zamanda redoks homeostazının korunmasında kritik rol oynar (155). Organizmada GSH düzeylerinde meydana gelen değişimler hücredeki redoks dengesinin bozulmasıyla sonuçlanabilir. Biyolojik sistemlerde oksidatif stresin belirteci olarak GSH/GSSG oranı kullanılabilir (215).

Ge ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada TM4 fare Sertoli hücrelerinde 10 nM ve 10 μ M BPA'nın 24 saatlik maruziyeti değerlendirilmiştir. 10 nM BPA uygulamasından sonra GSH düzeylerinde anlamlı ölçüde artış gözlenirken, 10 μ M BPA maruziyetinden sonra GSH düzeylerinde anlamlı ölçüde azalma gözlenmiştir ($p<0,05$) (215). Xin ve ark. (2014) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise 25, 50, 100 μ M konsantrasyonlarda 24 saatlik BPA maruziyeti sonrasında INS-1 hücrelerinde GSH düzeylerinin tüm konsantrasyonlarda anlamlı ölçüde azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$) (209). BPA maruziyeti ile tiroid dokusu veya tiroid hücrelerinde GSH düzeylerindeki değişikliğin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, BPA grubunda total GSH düzeylerinde kontrole kıyasla %30,6 düzeyinde ve istatistik olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu değişiklik BPA maruziyetinin tiroid hücrelerinde GSH deplesyonuna yol açtığını göstermekte ve olası bir oksidatif stres varlığını da desteklemektedir.

Tiroid dokusunda selenyum bileşiklerinin uygulanması sonucu GSH düzeylerindeki değişikliklerin incelendiği in vivo bazı çalışmalar bulunmakla birlikte, in vitro olarak tiroid hücre hatlarındaki değişikliklerin irdelendiği herhangi bir çalışma saptanamamıştır. Bununla birlikte farklı hücre hatlarında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Zhong ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada LNCaP hücre hatları kullanılmış, hücrelere kısa dönem (24 saat) ve uzun dönem (6 ay boyunca) 0,5, 1,5; 2; 2,5 μ M konsantrasyonlarda SS uygulanmıştır. 0,5 ve 1 μ M konsantrasyonlarda

SS uygulaması ile 24 saat sonunda GSH düzeylerinde anlamlı artış gözlenirken, 2 ve 2.5 μ M konsantrasyonlarda SS maruziyeti ile GSH düzeyleri azalmıştır ($p<0,05$). Uzun dönem SS uygulaması ile 0,5 ve 1,5 μ M konsantrasyonlarda GSH seviyelerinde azalma gözlenirken, 2 ve 2,5 μ M konsantrasyonlarda artış gözlenmiştir ($p<0,05$). GSSG düzeylerinde ise 24 saat SS maruziyeti sonucunda 1,5, 2 ve 2,5 μ M konsantrasyonlarda anlamlı artış gözlenirken, uzun dönem maruziyet sonucunda doz arttıkça GSSG düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Çalışmanın sonunda akut ve kronik SS uygulamasının GSH düzeylerinde farklı değişimlere yol açabileceği belirtilmiştir (216). Shen ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada HepG2 hücrelerine 24 saat boyunca 10 μ M SS uygulanmıştır ve GSH düzeylerinde anlamlı ölçüde azalma görüldüğü belirtilmiştir ($p<0,05$) (217). Shen ve ark. (1999) tarafından yapılan başka bir çalışmada yine HepG2 hücrelerine 1-25 μ M aralığında SS; 12, 24, 48 saat uygulanmıştır. Zaman ve doza bağlı olarak artan şekilde GSH düzeylerinde anlamlı derecede azalma belirlenmiştir ($p<0,05$). 24 ve 48 saat SS maruziyeti sonucunda ise, GSSG düzeylerinde anlamlı ölçüde azalma gözlenmiştir ($p<0,05$) (212). Çalışmamızda kontrole kıyasla SS uygulanan hücrelerde GSH düzeylerinde %11 oranında azalma gözlenmiş; ancak bu azalma anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Selenometiyonin ve metiyonin aynı aktif transport mekanizmasıyla duodenumdan absorbe olmaktadır (89). Metiyonin, GSH sentezine transsülfürasyon yolu ile katılabilmektedir. Transsülfürasyon yolu, GSH sentezi için metiyoninin kullanımına olanak sağlamaktadır. Transsülfürasyon ile gerekli olan sistein, metiyoninden sentezlenerek GSH sentezine katılır. Karaciğer, metiyoninin GSH prekürsörü etkin bir şekilde kullanılmasını sağlamakta olan en yüksek transsülfürasyon aktivitesine sahip organdır (218). Sunulan tez çalışmasında, SM grubunda kontrole oranla GSH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte %8 oranında artış görülmesi, intrasellüler GSH sentezinde SM metiyonine benzer şekilde işlev gördüğü için gerçekleşmiş olabilir ($p>0,05$).

Çalışmamızda SS ve SM ile pre-inkübe edilmiş hücrelerde BPA maruziyeti sonucunda GSH düzeylerinde, kontrole kıyasla anlamlı ölçüde azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). BPA grubuna göre ise, BPA+SS ve BPA+SM kombine gruplarda sırasıyla %13 ve %11 oranında azalma gözlenmiştir. Ancak, bu azalma anlamlı değildir

($p>0,05$). BPA maruziyetine sonucu gelişen GSH düzeylerinde azalmanın selenyum bileşikleriyle hücrelerin muamelesi sonucu artan GPx aktivitesine bağlı olarak bir detoksifikasyon işlevinin artışı nedeniyle ortaya çıktığı düşünülebilir. Literatürde tiroid hücrelerinde BPA ile birlikte SS, SM maruziyeti sonrasında GSH düzeylerinin ölçüldüğü herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Başka hücre hatlarında ise sınırlı çalışma bulunmaktadır (212,216,217).

5.2.3. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu genel olarak serbest radikaller gibi oksidanların karbon karbon çift bağı içeren lipitlere ve özellikle çoklu doymamış yağ asitlerine saldırımları ile başlayan bir süreçtir. Lipit peroksidasyonu sonucunda lipit peroksitler, sekonder veya son ürünler olan MDA, 4-hidroksinonenal ve hekzenal gibi birçok aldehit meydana gelir. Lipit peroksidasyonunun aşırı gerçekleşmesi durumunda, meydana gelen oksidatif hasar hücrenin onarım kapasitesini aşar ve hücrede apoptoz ve nekroz indüklenebilir. MDA, lipit peroksidasyonunun en bilinen ürünlerinden biridir ve hücre membran hasarının belirteci olarak kullanılmaktadır (150, 219, 220) Literatürde BPA, SS ve SM maruziyeti sonucunda lipit peroksidasyonunun değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Leem ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada mezenşimal kemik kök hücrelerinde (hBMC) 18 saat boyunca 100 μ M ve 250 μ M BPA maruziyeti sonucunda MDA düzeylerinde doza bağlı artış gözlenmiş ve 250 μ M BPA uygulanan grupta MDA düzeylerinde yaklaşık 12 kat anlamlı ölçüde artış olduğu bulunmuştur (221). Moon ve ark. (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, HepG2 hücrelerinin 100 nM BPA'ya maruziyeti sonucunda 2. 6. ve 12. saatlerde MDA düzeylerinde artış meydana getirdiği gözlenmiştir (222). Çalışmamızda kontrole kıyasla BPA grubunda MDA düzeylerinde 1,8 kat anlamlı ölçüde artış bulunmuştur. BPA maruziyetinin hücre membran hasarına yol açarak hücre homeostazını bozabileceği düşünülebilir.

Farklı hücre hatlarında SS ve SM pre-inkübasyonunun oksidatif strese karşı koruyucu rolünün değerlendirildiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (25). Bu çalışmalarda farklı kimyasal maddeler ile indüklenen lipit peroksidasyona karşı koruyucu etkisi de gösterilmiştir. Bununla birlikte, tiroid hücre hatlarında BPA ile

indüklenen lipid peroksidasyona karşı selenyum bileşiklerinin koruyucu rolünün incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sunulan tez çalışmasında, BPA maruziyeti ile artan lipid peroksidasyonda gerek SS gerekse SM uygulamasının etkiyi azaltıcı rolü gösterilmiştir. Kontrole kıyasla, BPA+SS ve BPA+SM kombine gruplarda MDA düzeylerinde kontrole kıyasla farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). BPA+SS ve BPA+SM gruplarında MDA düzeyleri, BPA grubuna kıyasla sırasıyla %43 ve %45 oranlarında anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). Bu sonuçlar, BPA ile indüklenen oksidatif stres varlığına işaret etmekte; selenyum bileşiklerinin antioksidan etkisine bağlı olarak BPA toksisitesini azaltabileceğini ve özellikle hücre membranının hasarına karşı koruyucu olabileceğini göstermektedir.

5.3. Mikroskopik incelemeler

5.3.1. Işık Mikroskobu İncelemeleri

Çalışma kapsamında değerlendirilen kontrol grubu B-CPAP hücrelerinde ökromatik çekirdek ile belirgin çekirdekçikleri izlenmiştir. Çekirdek sitoplazma oranı çekirdek yönünde artmış olduğu gözlenmiştir. Alınan kesitlerde yapılan incelemelerde birkaç mitotik figür belirlenmiştir. SS ve SM gruplarındaki hücrelerde kontrole benzer görünüm kaydedilmiş ve bu gruplarda da, SS grubunda daha fazla olmak üzere mitotik figürler görülmüştür.

BPA uygulanan B-CPAP hücrelerinde yapılan ışık mikroskobu incelemelerinde hücre sayısının azaldığı gözlenmiş; aynı zamanda çift çekirdekli hücrelerin yanı sıra dejenere olmuş nekrotik hücreler ve hücre artıkları izlenmiştir. BPA+SS uygulanan hücrelerde çift çekirdekli büyük sitoplazmalı; sitoplazmik bölünmeyi tamamlayamamış hücrelerin yanı sıra sitoplazmada vakuoller içeren, ayrıca nekrotik hücreler ve kondanse çekirdekli apoptotik hücreler gözlenmiştir. BPA+SM uygulanan hücrelerde ise, kondanse çekirdekli hücreler ve dejenere hücreler izlenmiştir. Selenyum uygulamasının BPA'nın hücrelerdeki olası toksik etkisine karşı hücrede meydana gelen dejenerasyonu ve yapısal değişikliklere karşı koruyucu etki gösterdiği ifade edilebilir.

Literatürde tiroid hücrelerinde BPA maruziyeti sonucu yapılmış sitopatolojik incelemeler içeren çalışma bulunmamasına karşın, tiroid dokusunda yapılmış

histopatolojik incelemeler içeren çalışmalar sınırlı sayıdadır. Silva ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada, Wistar sıçanların 40 mg/kg vücut ağırlığı/gün oral 15 günlük BPA maruziyeti sonucunda tiroid ağırlıklarının kontrole oranla bir değişiklik göstermediği belirlenmiş; ancak histopatolojik incelemelerde BPA'ya maruz kalan grubun tiroid dokusunda birçok hipoaktif folikülün olduğu gözlenmiştir (186). Tan ve ark. (2003) tarafından yapılan bir diğer çalışmada 48 juvenil erkek Sprague-Dawley sıçan 29-30 gün boyunca 100 mg/kg vücut ağırlığı/gün oral yoldan BPA'ya maruz bırakılmıştır. Uygulama süresinin sonunda yapılan histopatolojik incelemelerde kontrol grubuna kıyasla BPA ya maruz kalan grupta tiroid kesitlerinde herhangi bir anomali veya değişiklik gözlenmemiştir. Ancak, BPA'ya maruz kalan grupta kontrole kıyasla tiroid ağırlıklarında anlamlı artış bulunmuştur ($p<0,01$) (190). BPA'nın tiroid hücre ve dokusu üzerine etkisiyle ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

5.4. Apoptotik Parametreler (TUNEL, Kaspaz 3, Kaspaz 8)

TUNEL metodu, DNA zincir kırıklarını enzimatik olarak işaretlenmesini sağlayarak endonüklaz yıkım ürünlerini analiz etmek için kullanılmaktadır. Terminal transferaz DNA zincirlerinin 3' ucunda dUTP ile işaretlenmesini sağlar. İşaretlenmiş dUTP, çeşitli probalar sayesinde ışık, floresan mikroskop veya akım sitometrisi kullanılarak apoptotik hücrenin tayin edilmesine olanak sağlar. Tek bir hücrenin floresan mikroskop ile tayinine olanak sağlayacak kadar hassas bir yöntemdir. Bu yöntem, DNA onarım ve gen transkripsiyon sürecinde olan hücrelerde ve nekrotik hücrelerde hatalı pozitif sonuca neden olabileceğinden beraberinde başka bir test ile apoptozu değerlendirmek gerekebilir (165).

Kaspazlar çekirdek, golgi cisimciği, endoplazmik retikulum, mitokondri, hücre bağlantıları ve hücre iskeletini içeren hücresel yapıları proteolitik olarak parçalamak için apoptoz sürecinde etkin bir biçimde yer alan sistein proteazlardır. Normal hücrelerde zimojen formda (pro-kaspaz olarak) bulunurlar; ancak hücre apoptik sinyale cevaben hızlı bir şekilde aktif proteazlara dönüştürülürler (223).

Tiroid hücrelerinde BPA'nın apoptotik etkinliği üzerine bilimsel literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (184, 185). Zheng ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada B-CPAP hücrelerinde düşük doz (300 nM) BPA maruziyeti

sonucunda Annexin V yöntemiyle akım sitometrisi kullanılarak apoptoz değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda apoptotik hücre oranı %22,4 iken, BPA'ya maruz kalan hücrelerde bu oran %19,3 olarak bulunmuştur ve sonuçta BPA'nın anlamlı düzeyde apoptotik hücre oranını azalttığı belirlenmiştir ($p<0,05$) (185). Porreca ve ark. (2016) tarafından yapılan başka bir diğer çalışmada ise TUNEL analizinde FTRL-5 foliküler tiroid hücrelerinde 24, 48, 72, 96 ve 120 saatlik 10^{-9} M BPA uygulaması sonucunda kontrole oranla apoptotik hücre yüzdelерinde fark görülmemiştir ($p>0,05$). Hücrelere ayrıca UV-C uygulaması da yapılmış, sadece 24 saat inkübasyonu sonrasında meydana gelen UV-C maruziyeti sonunda kontrole kıyasla apoptotik hücre yüzdesinde anlamlı olarak artış görülmüştür ($p<0,05$). Yine aynı dozlarda ve inkübasyon sürelerinde BPA maruziyeti sonunda hücrelere UV-C maruziyeti gerçekleştirilmiştir. BPA maruziyeti sonunda meydana gelen UV-C uygulaması sonucunda ise, 120 saate kadar olan tüm inkübasyon sürelerinde UV-C ve BPA'ya kombine bir şekilde maruz kalmış grupta apoptotik hücre yüzdelерinde kontrole kıyasla anlamlı ölçüde artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (184). Sunulan tez çalışmasında yapılan TUNEL analizinde ise kontrol grubuna ait hücrelerde ortalama %47,2 apoptotik hücre yüzdesi saptanmıştır. BPA grubunda ise kontrole kıyasla 1,6 kat fazla (%76,5 oranında) anlamlı ölçüde yüksek apoptotik hücre yüzdesi saptanmıştır ($p<0,05$). Çalışmalar karşılaştırıldığında, sitotoksik konsantrasyonlarda BPA'nın apoptozu tetikleyebileceği ancak düşük dozda ise bu etkinin görülemeyeceğini söylenebilir. Nitekim, sunulan tez çalışmasında yapılan MTT testinde düşük doz BPA'nın hücre canlılığını artırdığı gözlenmiştir.

Tiroid, birim kütle başına en yüksek selenyum içeriğine sahip organdır. Bununla birlikte tiroid bezinde tiroid hormon biyosentezi sürecinde, foliküler hücreler tarafından üretilen aşırı hidrojen peroksit ve diğer ROS hasarına karşı hücreleri korunmasında TrxR ve GPx gibi hücrenin redoks kontrolünü sağlayan ve antioksidan savunmada rol alan selenoproteinler burada önemli rol oynarlar (110). Selenyumun nutrisyonel dozlarda hücre yaşam döngüsünü modüle ettiği, ancak yetersizliğinde ise hücre yaşamının ve hücre yaşam siklusunun olumsuz etkilendiğine dair kanıtlar bulunmaktadır (224-226). Tiroid hücrelerinde selenyum bileşiklerinin apoptotik yolları üzerine etkisi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (207,227). Selenyum bileşiklerinin yüksek konsantrasyonlarda ROS oluşumunu artırdığı ve

apoptozu indüklediği ile ilgili çalışmalar mevcuttur (212,213,228). Demelash ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada domuz tiroid dokusundan alınan primer hücrelerde hidrojen peroksitin tiroid hücre ölümü üzerine etkisi incelenmiştir. GPx aktivitesinin normal düzeylerde görüldüğü selenit konsantrasyonlarının 10-100 nM aralığında olduğu belirlenmiştir. Hidrojen peroksit ile indüklenen kaspaz 3 aktivasyonuna karşı, farklı serum ve selenit konsantrasyonlarının hidrojen peroksit ile indüklenen kaspaz 3 aktivasyonuna karşı koruyucu rolü değerlendirilmiştir. Hücreler beş gün süre ile selenyum içermeyen; %5 veya %0,5 serum içeren medyumlarda ve 10 ve 100 nM selenit içeren %0,5 serum içeren medyumlarda büyütülmüştür. Hücreler beş günün sonunda 8 saat boyunca 0-400 μ M aralığında hidrojen peroksit maruz bırakılmıştır. Hidrojen peroksitin düşük serum içeren medyumdaki hücrelerde doza bağımlı olarak kaspaz 3 aktivitesini arttığı gözlenmiştir. Ancak, düşük serum içeriğine (%0,5) rağmen 10 ve 100 nM selenyum ile suplemante edilmiş medyumlardaki hücrelerde hidrojen peroksit ile doz bağımlı olarak indüklenen kaspaz 3 aktivitesinde düşüşler meydana geldiği gözlenmiştir (227). Nettore ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada ise, sıçan foliküler tiroid FRTL-5 hücrelerinde selenitin apoptotik sinyal ve mekanizmalar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Hücreler 100 nM sodyum selenit içeren medyum içerisinde 12, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. 100 nM selenite 24 saat maruz kalan hücrelerde p53, 48 saat maruz kalan hücrelerde ise Bim proapoptotik genlerinin mRNA ekspresyonlarında azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$). 48 ve 72 saat sonunda hücrelerde NF-kB ve 72 saat sonunda Bcl-2 antiapoptotik genlerin mRNA ekspresyonlarında artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Ayrıca hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca 500 nM selenit ile pre-inkübe edilmiş ve 24 saat sonunda 2 μ g/ml tunikamisin içeren veya içermeyen gruplar oluşturulmuştur. Tunikamisin ile kontrole kıyasla artan kaspaz 3/7 aktivitesinde artışlar belirlenmiştir ($p < 0,05$). Tunikamisin ile birlikte 96 saat 500 nM selenit ile yapılan pre-inkübasyon sonucunda ise, sadece tunikamisin uygulanan hücrelere göre kaspaz3/7 aktivitesinde anlamlı ölçüde azalma gösterilmiştir ($p < 0,05$) (207). Erkekoğlu ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, AS52 hücreleri 10 nM SS ve 10 μ M SM ile 24 saat pre-inkübe edilmesi sonrasında hücreler 24 saat 25 μ M 3,5-dimetilaminofenole (DMAP) maruz bırakılmıştır. Sadece SS ve SM uygulanan hücrelerde kaspaz 3 ve 8 aktivitesi kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Sadece DMAP uygulanan hücrelerde ise kontrole kıyasla anlamlı ölçüde yüksek

kaspaz 3 ve 8 aktivitesi görülmüştür ($p<0,05$). 24 saat SM veya SS ile pre-inkübasyona bırakılan hücrelerde ise, DMAP uygulanmasından sonra kaspaz 3 ve 8 aktivitesi kontrol düzeylerinde bulunmuştur (25).

Zhou ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada LLC-PK1 hücreleri 5,10, 20 μM selenit ve 500 μM N-asetil sistein ile yarım saat pre-inkübe edilmiştir. Daha sonra 20 μM kadmiyum (Cd) ile 12 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir ve kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri değerlendirilmiştir. Sadece Cd'ye maruz kalan grupla karşılaştırıldığında, selenit uygulanan gruplarda, kaspaz 3 ve 9 aktivitelerinde doz bağımlı ve anlamlı ölçüde azalma gözlenmiştir ($p<0,01$). Kadmiyum maruziyeti sonucunda kaspaz 3 ve 9 aktivitelerinde anlamlı ölçüde artış gözlenmiştir. En yüksek doz (20 μM) selenite maruz kalan grupta maksimum etki saptanmıştır. N-asetil sistein pre-inkübasyonu ile de kaspaz 3 ve 9 aktivitelerinde anlamlı ölçüde azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu çalışma ile Cd maruziyeti sonucu oluşan oksidatif stresin kaspaz aktivasyonuna yol açabileceği ve selenyum bileşiklerinin de antioksidan özelliğiyle Cd ile ilişkili kaspaz aktivasyonunu baskılayıcı özelliğe sahip olabileceği ortaya konmuştur (229).

Miranda ve ark. (2011) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, sığırdan elde edilen meme epitel hücrelerinde 100 μM hidrojen peroksit ile indüklenen apoptoz üzerine selenometiyoninin (10-50 nM) etkinliği incelenmiştir. 24, 48 ve 72 saat süresince hidrojen peroksit maruz kalan grupta zamana bağlı apoptotik hücrelerde artış gözlenmiştir. Kombine SM ve hidrojen peroksit içeren medyumlarda ise TUNEL pozitif hücrelerde, uygulama yapılan tüm zamanlarda anlamlı azalma gözlenmiştir ve SM'in maksimum etkinliği 24 saatte gözlenmiştir. Sonuçta, SM'in primer sığır meme epitelyal hücresinde hidrojen peroksitle indüklenen oksidatif stres kaynaklı apoptoza karşı koruyucu etki gösterdiği ifade edilmiştir (230).

Tiroid hücrelerinde BPA'nın indüklediği apoptotik değişikliklerde selenyum bileşiklerinin etkisinin değerlendirildiği bir çalışma bulunamamıştır.

Sunulan tez çalışmasında kaspaz 3 düzeyleri ölçümü sonucunda kontrol grubuna kıyasla BPA grubunda 1,4 kat anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,05$). BPA+SS ve BPA+SM gruplarında selenyum bileşikleriyle yapılan pre-inkübasyon sonucunda

BPA grubuna göre kaspaz 3 düzeylerinde azalma gözlenmiştir. BPA+SM grubunda bu azalma anlamlı olarak bulunmuş ($p<0,05$) ve kaspaz 3 düzeylerinin kontrol seviyelerine düştüğü gözlenmiştir. Kaspaz 8 aktivitesi ise BPA'ya maruz kalan hücrelerde kontrole oranla 5,4 kat artmıştır. Hücrelerin SS ve SM ile pre-inkübe edilmesi ardından BPA'ya maruz kalmaları kaspaz 8 aktivitesinde anlamlı ölçüde azalma sağlamıştır ($p<0,05$). Sonuçta, SS ve SM pre-inkübasyonunun apoptoz üzerindeki etkilerine bakılacak olursa, kontrole oranla anlamlı değişiklik meydana getirmediği ve kullanılan dozların toksik olmadığı söylenebilir. Çalışma içerisindeki TUNEL, kaspaz 3 ve 8 bulguları birbiriyle ve literatürle uyumlu bulunmuştur. Foliküler tiroid hücrelerinde, nutrisyonel dozlarda selenyum bileşiklerinin hücre ölümü ve apoptozu modüle ettiği söylenebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında B-CPAP hücre hattında BPA'nın neden olabileceği olası toksik etkiler ve aynı zamanda selenyum bileşiklerinin (SM ve SS) oluşan toksik etkilere karşı olası korucu rolü değerlendirilmiştir. Değerlendirme kapsamında sitotoksisite, oksidatif stres, antioksidan statüdeki değişiklikler, hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler ve apoptoz yer almaktadır.

1. Hücre canlılığının belirlenmesi için MTT yöntemiyle BPA'nın IC₃₀ ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. B-CPAP hücre hattında BPA için 436 µM IC₅₀ değeri, 302 µM IC₃₀ değeri bulunmuştur. Düşük doz maruziyetini yansıtmak amacıyla çalışma gruplarında BPA için belirlenen IC₃₀ değeri olan 302 µM konsantrasyonda çalışılmıştır.

2. Hücrelere uygulanacak SM ve SS konsantrasyonlarını belirlemek için B-CPAP hücre hattında GPx aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Hücrelerde SM için 30 µM, SS için 20 nM konsantrasyonlarda maksimum GPx aktivitesi gözlenmiştir. Nutrisyonel selenyum alımını yansıtabilecek bu dozlarda bileşikler koruyucu amaçla test edilmiştir.

3. Oluşturulan deney gruplarında hücre canlılığının belirlenmesi için MTT yöntemi uygulanmıştır, BPA grubuna kıyasla BPA+SS grubunda hücre canlılığı anlamlı artış göstermiş ($p<0,05$) ve kontrol düzeylerine ulaşmıştır. BPA+SM grubunda ise hücre canlılığı BPA grubuna göre anlamlı artış göstermemiştir.

4. Hücre içi ROS düzeyleri BPA ve BPA+SM grubunda kontrole kıyasla sırasıyla %9,5 ve %9,3 oranında anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). BPA ile SS veya SM uygulaması hücre içi ROS düzeyinde anlamlı bir değişime yol açmamıştır ($p>0,05$). Selenyum bileşiklerinin inkübasyon süresinin arttırılması ile etki gözlenebilir.

5. Total GSH düzeylerinde, BPA maruziyeti ile anlamlı ölçüde azalma gözlenmiş; ancak SM ve SS bileşiklerinin koruyucu bir etkisi saptanamamıştır. Selenyum bileşikleri maruziyeti ile beraberinde görülen bu azalmanın artan GPx aktivitesine bağlı detoksifikasyon amaçlı geliştiği düşünülmektedir.

6. Malondialdehit düzeylerinin BPA grubunda kontrole kıyasla sırasıyla 1.8 kat anlamlı ölçüde arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). BPA grubunda gerek SS gerekse SM pre-inkübasyonu ile BPA grubuna kıyasla MDA düzeylerinde anlamlı azalma gözlenmiştir ($p<0,05$) ve kontrol düzeylerine ulaşmıştır. Bu durumda BPA ile artan lipit peroksidasyonunun selenyum bileşiklerinin antioksidan etki göstererek azalttığı söylenebilir.

7. Işık mikroskobu incelemeleri sonucunda, BPA uygulanan grupta yapılan daha az sayıda ve dejenere olmuş nekrotik hücreler ve hücre artıkları gözlenmiştir. BPA+SS ve BPA+SM gruplarındaki hücrelerde yapılan faz kontrast mikroskop incelemelerinde BPA grubuna göre daha fazla sayıda hücre bulunduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar MTT deneyi sonuçlarıyla uyum arz etmektedir.

8. Apoptotik hücreleri tayin etmek için yapılan TUNEL analizi sonucunda, BPA grubunda kontrole kıyasla 1.6 kat fazla anlamlı derecede yüksek TUNEL pozitif hücre saptanmıştır ($p<0,05$). BPA grubuna kıyasla BPA+SM ve BPA+SS gruplarında anlamlı derecede az TUNEL pozitif hücre saptanmıştır ($p<0,05$). Bu durumda BPA ile indüklenen apoptozun selenyum bileşiklerinin azalttığı görülmektedir. SS ve SM gruplarında kontrolden daha az TUNEL pozitif hücre saptanmıştır. Hücrede selenyum ile beraberinde artan antioksidan aktivitenin hücrenin sağkalımında önemli olduğu düşünülmektedir.

9. Apoptotik aktivitenin değerlendirilmesi için yapılan kaspaz 3 düzeylerinin belirlenmesi ve kaspaz 8 aktivitesinin ölçümüne ilişkin, BPA grubunda kaspaz 3 düzeylerinde 1.4 kat ve kaspaz 8 aktivitesinde 5.4 kat artış gözlenmiştir ($p<0,05$). SM grubunda kontrole kıyasla kaspaz 3 düzeylerinde ve kaspaz 8 aktivitesinde azalma gözlenmiştir ancak sadece kaspaz 3 düzeylerinde meydana gelen azalma anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). SS grubunda ise kontrole kıyasla kaspaz 3 düzeylerinde ve kaspaz 8 aktivitesinde fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). BPA grubuna kıyasla BPA+SS ve BPA+SM gruplarının kaspaz 3 düzeylerinde ve kaspaz 8 aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Sonuçlarla ilgili olarak BPA'nın hem intrinsik yolağı hem de ekstrinsik yolağın uyarılmasını sağlayarak apoptozu indüklediği söylenilebilir. Buradaki bulgular TUNEL analiziyle uyum arz etmektedir. Bu sonuçlar ile SS ve SM uygulamasının hücrede antioksidan aktiviteyi artırarak, BPA'nın muhtemel olarak

hücrede oksidatif stresi artırması sonucu geliştiği düşünülen apoptozu inhibe edebildiği ortaya konmuştur.

Sonuç olarak elde edilen bulgular, çevresel, mesleki ve gündelik yaşamda çokça maruz kalınan bir endokrin bozucu olan BPA'nın B-CPAP hücrelerinde oksidatif stres oluşumuna, hücre içi ROS düzeylerinde ve lipid peroksidasyonda artışa ve total GSH düzeylerinde azalmaya yol açtığını göstermektedir. Ayrıca, BPA'nın bu hücrelerde sitopatolojik değişimlere ve apoptoza neden olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, selenyum bileşiklerinin BPA ile oluşan oksidan/antioksidan hasara karşı muhtemelen temas süresinin kısalığına bağlı olarak kısmi bir koruma sağladığı; BPA ile indüklenen sitopatolojik değişiklikleri ve apoptozu azaltabileceği, görülmüştür. BPA'nın B-CPAP hücrelerinde yol açtığı oksidatif stresin, bu hücrelerde BPA toksisitesi altında yatan mekanizmalardan biri olduğu sonucuna varılmıştır. İnorganik ve organik selenyum bileşiklerinin ise, tiroid hücrelerinde antioksidan işlevleriyle BPA toksisitesine karşı kısmi olarak koruyucu etkilerinin olabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*. 1998;36(10):2149-73.
2. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE. *EFSA Journal*. 2007;5(1):428.
3. Rubin BS, Soto AM. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;304(1-2):55-62.
4. Rubin BS, Sonnenschein C, Vandenberg LN, Maffini MV, Soto AM. Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocrine Reviews*. 2009;30(1):75-95.
5. Konieczna A, Rutkowska A, Rachon D. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*. 2015;66(1):5-11.
6. Rubin BS. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;127(1):27-34.
7. Calsolaro V, Pasqualetti G, Niccolai F, Caraccio N, Monzani F. Thyroid Disrupting Chemicals. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(12):2583.
8. Itoh H, Iwasaki M, Hanaoka T, Sasaki H, Tanaka T, Tsugane S. Urinary bisphenol-A concentration in infertile Japanese women and its association with endometriosis: A cross-sectional study. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 2007;12(6):258-64.
9. Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL, Wright DL, Calafat AM, Trisini AT, et al. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reproductive Toxicology*. 2010;30(4):532-9.
10. Teppala S, Shankar A. Relationship between Urinary Bisphenol A Levels and Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(12):3822-6.
11. Meeker JD, Ferguson KK. Relationship between Urinary Phthalate and Bisphenol A Concentrations and Serum Thyroid Measures in U.S. Adults and Adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Environmental health perspectives*. 2011;119(10):1396-402.
12. Ehrlich S, Hauser R, Williams PL, Missmer SA, Flaws JA, Calafat AM, et al. Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Human Reproduction*. 2012;27(12):3583-92.
13. Trasande L, Attina TM, Blustein J. Association Between Urinary Bisphenol A Concentration and Obesity Prevalence in Children and AdolescentsUrinary Bisphenol A Levels and Childhood Obesity. *JAMA*. 2012;308(11):1113-21.

14. Bae S, Kim JH, Lim Y-H, Park HY, Hong Y-C. Associations of Bisphenol A Exposure With Heart Rate Variability and Blood Pressure. *Hypertension*. 2012;60(3):786-93.
15. Caserta D, Bordi G, Ciardo F, Marci R, La Rocca C, Tait S, et al. The influence of endocrine disruptors in a selected population of infertile women. *Gynecological Endocrinology*. 2013;29(5):444-7.
16. Tabb MM, Blumberg B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2006;20(3):475-82.
17. Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(11):5185-90.
18. Rochester JR. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*. 2013;42:132-55.
19. Zhai W, Huang Z, Chen L, Feng C, Li B, Li T. Thyroid Endocrine Disruption in Zebrafish Larvae after Exposure to Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate (MEHP). *PLOS ONE*. 2014;9(3):e92465.
20. Lee S, Kim C, Youn H, Choi K. Thyroid hormone disrupting potentials of bisphenol A and its analogues - in vitro comparison study employing rat pituitary (GH3) and thyroid follicular (FRTL-5) cells. *Toxicology in Vitro*. 2017;40:297-304.
21. Parris C, Bansal R, Zoeller RT. Bisphenol-A, an Environmental Contaminant that Acts as a Thyroid Hormone Receptor Antagonist in Vitro, Increases Serum Thyroxine, and Alters RC3/Neurogranin Expression in the Developing Rat Brain. *Endocrinology*. 2005;146(2):607-12.
22. Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, et al. Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicological Sciences*. 2005;84(2):249-59.
23. Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environmental science & technology*. 2010;44(4):1458-63.
24. Köhrle J. The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie*. 1999;81(5):527-33.
25. Erkekoglu P, Chao M-W, Ye W, Ge J, Trudel LJ, Skipper PL, et al. Cytoplasmic and nuclear toxicity of 3,5-dimethylaminophenol and potential protection by selenocompounds. *Food and Chemical Toxicology*. 2014;72:98-110.
26. Pazirandeh S, Burns D L, Griffin I J, Overview of dietary trace minerals [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 31.12.2018] Erişim adresi: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-dietary-trace-minerals#H49>
27. Allard P. Chapter 27 - Bisphenol A. In: Gupta RC, editor. *Biomarkers in Toxicology*. Boston: Academic Press; 2014. p. 459-74.
28. Dodds EC, Lawson W. Synthetic estrogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature*. 1936;137:996.

29. Vogel SA. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety". American journal of public health. 2009;99 Suppl 3:S559-66.
30. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6623[Internet] [Erişim Tarihi 12.11.2018]. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623>
31. European Food Safety Authority (EFSA), Bisphenol A [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 14.11.2018]. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol>
32. U.S. Food and Drug Administration (FDA), Questions and Answers on Bisphenol A (BPA) Use in Food Contact Applications [Internet] 2018 [Erişim Tarihi 14.11.2018]. <https://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm355155.html>
33. Munguia-Lopez EM, Soto-Valdez H. Effect of heat processing and storage time on migration of bisphenol A (BPA) and bisphenol A-diglycidyl ether (BADGE) to aqueous food simulant from Mexican can coatings. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001;49(8):3666-71.
34. Kawamura Y, Inoue K, Nakazawa H, Yamada T, Maitani T. Cause of bisphenol A migration from cans for drinks and assessment of improved cans. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. 2001;42(1):13-7.
35. Takao Y, Lee HC, Kohra S, Arizono K. Release of Bisphenol A from Food Can Lining upon Heating. Journal of Health Science. 2002;48(4):331-4.
36. Thomson BM, Grounds PR. Bisphenol A in canned foods in New Zealand: An exposure assessment. Food Additives & Contaminants. 2005;22(1):65-72.
37. Maragou NC, Makri A, Lampi EN, Thomaidis NS, Koupparis MA. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. Food Additives & Contaminants: Part A. 2008;25(3):373-83.
38. Michałowicz J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2014;37(2):738-58.
39. Fu P, Kawamura K. Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. Environmental Pollution. 2010;158(10):3138-43.
40. Kang J-H, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. Toxicology. 2006;226(2):79-89.
41. Yamamoto T, Yasuhara A, Shiraishi H, Nakasugi O. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. Chemosphere. 2001;42(4):415-8.
42. Fent G, Hein WJ, Moendel MJ, Kubiak R. Fate of 14C-bisphenol A in soils. Chemosphere. 2003;51(8):735-46.
43. Huang YQ, Wong CKC, Zheng JS, Bouwman H, Barra R, Wahlström B, et al. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. Environment International. 2012;42:91-9.
44. Kang J-H, Kondo F. Bisphenol A degradation in seawater is different from that in river water. Chemosphere. 2005;60(9):1288-92.

45. Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ. Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*. 2010;126(4):760-8.
46. Biedermann S, Tschudin P, Grob K. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;398(1):571-6.
47. Ribeiro E, Ladeira C, Viegas S. Occupational Exposure to Bisphenol A (BPA): A Reality That Still Needs to Be Unveiled. *Toxics*. 2017;5(3).
48. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*. 2007;24(2):139-77.
49. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration. *Chemical Research in Toxicology*. 2002;15(10):1281-7.
50. Ye X, Kuklenyik Z, Needham LL, Calafat AM. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005;383(4):638-44.
51. EFSA. Toxicokinetics of Bisphenol A - Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC). *EFSA Journal*. 2008;6(7):759.
52. Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter JM, Jr. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2000;54(1):3-18.
53. OECD Existing Chemicals Database, SIDS Initial Assessment Profile “Bisphenol-A” [Internet]. 2002 [Erişim Tarihi 23.11.2018]. Erişim adresi: https://hpcvchemicals.oecd.org/ui/SIDS_Details.aspx?id=0cc2a528-418f-4f99-a5f1-3feb4198a640
54. Vural, N. Toksikoloji. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları; 2005
55. Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, Gray Jr LE, Hayward SW, Lees PSJ, et al. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 2008;83(3):157-395.
56. Sheng ZG, Tang Y, Liu YX, Yuan Y, Zhao BQ, Chao XJ, et al. Low concentrations of bisphenol a suppress thyroid hormone receptor transcription through a nongenomic mechanism. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012;259(1):133-42.
57. Sui Y, Ai N, Park SH, Rios-Pilier J, Perkins JT, Welsh WJ, et al. Bisphenol A and its analogues activate human pregnane X receptor. *Environmental health perspectives*. 2012;120(3):399-405.

58. Xu L-C, Sun H, Chen J-F, Bian Q, Qian J, Song L, et al. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology*. 2005;216(2):197-203.
59. Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental health perspectives*. 1996;104 Suppl 4(Suppl 4):715-40.
60. Naciff JM, Jump ML, Torontali SM, Carr GJ, Tiesman JP, Overmann GJ, et al. Gene expression profile induced by 17alpha-ethynyl estradiol, bisphenol A, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2002;68(1):184-99.
61. Duan Y, Yao Y, Wang B, Han L, Wang L, Sun H, et al. Association of urinary concentrations of bisphenols with type 2 diabetes mellitus: A case-control study. *Environmental Pollution*. 2018;243:1719-26.
62. Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS. Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Heart Disease: Evidence from NHANES 2003/06. *PLOS ONE*. 2010;5(1):e8673.
63. Radwan M, Wielgomas B, Dziewirska E, Radwan P, Kaluzny P, Klimowska A, et al. Urinary Bisphenol A Levels and Male Fertility. *American journal of men's health*. 2018;12(6):2144-51.
64. Vandenberg LN. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2014;12(2):259-76.
65. Jenkins S, Wang J, Eltoum I, Desmond R, Lamartiniere CA. Chronic oral exposure to bisphenol A results in a nonmonotonic dose response in mammary carcinogenesis and metastasis in MMTV-erbB2 mice. *Environmental health perspectives*. 2011;119(11):1604-9.
66. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2002;68(1):121-46.
67. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Sloan CS, Castillo NP, Veselica MM, et al. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2008;104(2):362-84.
68. Nakagawa Y, Tayama S. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Archives of toxicology*. 2000;74(2):99-105.
69. Khan S, Beigh S, Chaudhari BP, Sharma S, Aliul Hasan Abdi S, Ahmad S, et al. Mitochondrial dysfunction induced by Bisphenol A is a factor of its hepatotoxicity in rats. *Environmental Toxicology*. 2016;31(12):1922-34.

70. Yoshida M, Ono H, Mori Y, Chuda Y, Onishi K. Oxidation of Bisphenol A and Related Compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2001;65(6):1444-6.
71. Babu S, Uppu S, Claville MO, Uppu RM. Prooxidant actions of bisphenol A (BPA) phenoxyl radicals: implications to BPA-related oxidative stress and toxicity. *Toxicology mechanisms and methods*. 2013;23(4):273-80.
72. Gassman NR. Induction of oxidative stress by bisphenol A and its pleiotropic effects. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2017;58(2):60-71.
73. Kaur S, Saluja M, Bansal MP. Bisphenol A induced oxidative stress and apoptosis in mice testes: Modulation by selenium. *Andrologia*. 2018;50(3).
74. Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*. 2003;188(2-3):117-24.
75. Kabuto H, Hasuike S, Minagawa N, Shishibori T. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environmental research*. 2003;93(1):31-5.
76. Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life sciences*. 2004;74(24):2931-40.
77. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. *The Thyroid Gland. Ganong's Review of Medical Physiology*, 25e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2016.
78. Clifton-Bligh R, Delbridge L. Chapter 1 - Thyroid Physiology. In: Clark OH, Duh Q-Y, Kebebew E, editors. *Textbook of Endocrine Surgery (Second Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2005. p. 3-8.
79. Seiwa C, Nakahara J, Komiyama T, Katsu Y, Iguchi T, Asou H. Bisphenol A Exerts Thyroid-Hormone-Like Effects on Mouse Oligodendrocyte Precursor Cells. *Neuroendocrinology*. 2004;80(1):21-30.
80. Song M, Kim Y-J, Song M-K, Choi H-S, Park Y-K, Ryu J-C. Identification of Classifiers for Increase or Decrease of Thyroid Peroxidase Activity in the FTC-238/hTPO Recombinant Cell Line. *Environmental Science & Technology*. 2011;45(18):7906-14.
81. Chevrier J, Gunier RB, Bradman A, Holland NT, Calafat AM, Eskenazi B, et al. Maternal Urinary Bisphenol A during Pregnancy and Maternal and Neonatal Thyroid Function in the CHAMACOS Study. *Environmental health perspectives*. 2013;121(1):138-44.
82. Kitamura S, Jinno N, Ohta S, Kuroki H, Fujimoto N. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;293(1):554-9.
83. Boyd R. Selenium stories. *Nature Chemistry*. 2011;3:570.
84. Curtis K. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Eighth Edition. New York: McGraw-Hill Professional; 2013.

85. Alexander J. Chapter 52 - Selenium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, editors. Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition). San Diego: Academic Press; 2015. p. 1175-208.
86. Rayman MP. Selenium and human health. *The Lancet*. 2012;379(9822):1256-68.
87. National Institute of Health (NIH), Selenium Fact Sheet for Health Professionals [İnternet] 2018 [Erişim Tarihi 31.12.2018] . Erişim adresi: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/#en1>
88. Köksal O. National Nutrient-Health and Food Consumption Survey of Turkey, Ankara: Hacettepe University; 1990.
89. Thomson CD. SELENIUM | Physiology. In: Caballero B, editor. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition). Oxford: Academic Press; 2003. p. 5117-24.
90. Selenium and its inorganic compounds [MAK Value Documentation, 2011]. The MAK-Collection for Occupational Health and Safety.
91. Reilly C. Selenium in Food and Health. 2th ed. Boston, USA: Springer US; 2006.
92. Köhrle J, Jakob F, Contempré B, Dumont JE. Selenium, the Thyroid, and the Endocrine System. *Endocrine Reviews*. 2005;26(7):944-84.
93. Brigelius-Flohe R, Sies H. Diversity of selenium functions in health and disease. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2016.
94. Calello D P. Selenium, Nelson SL, Lewin NA, Howland A, Hoffman RS, Goldfrank LR, Flomenbaum NE. Goldfrank's Toxicologic Emergencies. 9th ed. New York: McGraw-Hill Company; 2011.
95. Vindry C, Ohlmann T, Chavatte L. Translation regulation of mammalian selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2018;1862(11):2480-92.
96. Kryukov GV, Gladyshev VN. [8] - Mammalian Selenoprotein Gene Signature: Identification and Functional Analysis of Selenoprotein Genes Using Bioinformatics Methods. In: Sies H, Packer L, editors. *Methods in Enzymology*. 347: Academic Press; 2002. p. 84-100.
97. Wu M, Porres JM, Cheng WH. Chapter 18 - Selenium, Selenoproteins, and Age-Related Disorders. In: Watson RR, Preedy VR, editors. *Bioactive Food as Dietary Interventions for the Aging Population*. San Diego: Academic Press; 2013. p. 227-39.
98. Flohe L, Günzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Letters*. 1973;32(1):132-4.
99. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiological reviews*. 2014;94(3):739-77.
100. Holben DH, Smith AM. The Diverse Role of Selenium within Selenoproteins: A Review. *Journal of the American Dietetic Association*. 1999;99(7):836-43.

- 101.** Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *The Biochemical journal*. 2000;346 Pt 1(Pt 1):1-8.
- 102.** Dentice M, Salvatore D. Local impact of thyroid hormone inactivation. 2011;209(3):273.
- 103.** Maia AL, Goemann IM, Meyer ELS, Wajner SM. Type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. 2011;209(3):283
- 104.** Marsili A, Zavacki AM, Harney JW, Larsen PR. Physiological role and regulation of iodothyronine deiodinases: a 2011 update. *Journal of endocrinological investigation*. 2011;34(5):395-407.
- 105.** Ma S, Hill KE, Caprioli RM, Burk RF. Mass spectrometric characterization of full-length rat selenoprotein P and three isoforms shortened at the C terminus. Evidence that three UGA codons in the mRNA open reading frame have alternative functions of specifying selenocysteine insertion or translation termination. *J Biol Chem*. 2002;277(15):12749-54.
- 106.** Burk RF, Hill KE, Awad JA, Morrow JD, Kato T, Cockell KA, et al. Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: Assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology*. 1995;21(2):561-9.
- 107.** Persson-Moschos M, Huang W, Srikumar TS, Åkesson B, Lindeberg S. Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status. *Analyst*. 1995;120(3):833-6.
- 108.** Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: The National Academies Press; 2000. p.529.
- 109.** Xia Y, Hill KE, Byrne DW, Xu J, Burk RF. Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81(4):829-34.
- 110.** Köhrle J, Gärtner R. Selenium and thyroid. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;23(6):815-27.
- 111.** Schomburg L. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*. 2011;8:160.
- 112.** Duntas LH, Benavente S. Selenium: an element for life. *Endocrine*. 2015;48(3):756-75.
- 113.** Schmutzler C, Mentrup B, Schomburg L, Hoang-Vu C, Herzog V, Köhrle J. Selenoproteins of the thyroid gland: expression, localization and possible function of glutathione peroxidase 3. *Biological chemistry*. 2007;388(10):1053-9.
- 114.** Drutel A, Archambeaud F, Caron P. Selenium and the thyroid gland: more good news for clinicians. *Clinical Endocrinology*. 2013;78(2):155-64.
- 115.** Conrad M, Schneider M, Seiler A, Bornkamm GW. Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Biological chemistry*. 2007;388(10):1019-25.

- 116.** Ventura M, Melo M, Carrilho F. Selenium and Thyroid Disease: From Pathophysiology to Treatment. *International journal of endocrinology*. 2017;2017:1297658-.
- 117.** Köhrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2000;57(13):1853-63.
- 118.** Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Kamiya Y, Morimura T, Ogiwara T, et al. Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland. *Endocrinology*. 2001;142(7):2961-7.
- 119.** Schweizer U, Chiu J, Köhrle J. Peroxides and peroxide-degrading enzymes in the thyroid. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2008;10(9):1577-92.
- 120.** Korotkov KV, Kumaraswamy E, Zhou Y, Hatfield DL, Gladyshev VN. Association between the 15-kDa selenoprotein and UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem*. 2001;276(18):15330-6.
- 121.** Duntas LH. The Role of Selenium in Thyroid Autoimmunity and Cancer. *Thyroid*. 2006;16(5):455-60.
- 122.** Krohn K, Maier J, Paschke R. Mechanisms of Disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*. 2007;3:713.
- 123.** Poncin S, Gérard A-C, Boucquey M, Senou M, Calderon PB, Knoop B, et al. Oxidative Stress in the Thyroid Gland: From Harmlessness to Hazard Depending on the Iodine Content. *Endocrinology*. 2008;149(1):424-33.
- 124.** Betts JG, DeSaix P, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Kruse DH, et al. *Anatomy & Physiology*. Texas: Rice University; 2013.
- 125.** Bartke A, Constanti A. *Basic Endocrinology: For Students of Pharmacy and Allied Health*. London: Routledge; 1998.
- 126.** Despopoulos A, Silbernagl S. *Color Atlas of Physiology*. 5th edition. Stuttgart: Thieme; 2003.
- 127.** Barrett KE, Barman SM, Brooks HL, Yuan JXJ. *The Thyroid Gland. Ganong's Review of Medical Physiology*. 26th edition. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2019.
- 128.** Floyd RA. 46 - Production of Free Radicals. In: Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjö BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. San Diego: Academic Press; 1997. p. 165-9.
- 129.** Togo H. 1 - What are Free Radicals? In: Togo H, editor. *Advanced Free Radical Reactions for Organic Synthesis*. Amsterdam: Elsevier Science; 2004. p. 1-37.
- 130.** Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*. 2002;82(1):47-95.

131. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:13.
132. Ohye H, Sugawara M. Dual oxidase, hydrogen peroxide and thyroid diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 2010;235(4):424-33.
133. Gielis JF, Lin JY, Wingler K, Van Schil PEY, Schmidt HH, Moens AL. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;50(7):765-76.
134. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2015;30(1):11-26.
135. Dhawan V. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations. In: Saha GK, Jindal SK, Biswal S, Barnes PJ, Pawankar R, Studies on Respiratory Disorders. New York: Humana Press; 2014.
136. del Río LA. ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(10):2827-37.
137. Li R, Jia Z, Trush MA. Defining ROS in Biology and Medicine. *Reactive oxygen species (Apex, NC)*. 2016;1(1):9-21.
138. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:44.
139. Timbrell JA. Principles of Biochemical Toxicology. 4. Baskı. London: Informa Healthcare; 2009.
140. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 2015;4:180-3.
141. Fernández-Mejía C. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants*. 2013;209.
142. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*. 2014;224:164-75.
143. Boelsterli UA. Mechanistic Toxicology: the Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets. London: CRC Press; 2002.
144. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2011;25(3):287-99.
145. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18(10):872-9.
146. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2016;1863(12):2977-92.
147. Mittler R. ROS Are Good. *Trends in Plant Science*. 2017;22(1):11-9.

- 148.** Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;338(1):668-76.
- 149.** Başaran N, Baydar T, Bucurgat Ündeğer Ü, Giray Koçer B, Gürbay A, Özgüneş H, Şahin G. *Farmasötik Toksikoloji İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi*; 2013.
- 150.** Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014;2014:31.
- 151.** Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*. 2000;62(6):649-71.
- 152.** Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(9):916-21.
- 153.** Quintana-Cabrera R, Bolaños JP. Chapter Seven - Glutathione and γ -Glutamylcysteine in Hydrogen Peroxide Detoxification. In: Cadenas E, Packer L, editors. *Methods in Enzymology*. 527: Academic Press; 2013. p. 129-44.
- 154.** Dourado DFAR, Fernandes PA, Mannervik B, Ramos MJ. Glutathione Transferase: New Model for Glutathione Activation. *Chemistry – A European Journal*. 2008;14(31):9591-8.
- 155.** Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009;30(1):1-12.
- 156.** Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2013;1830(5):3217-66.
- 157.** Lushchak VI. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*. 2012;2012:26.
- 158.** Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(3):3145-75.
- 159.** Cazanave S, Berson A, Haouzi D, Vadrot N, Fau D, Grodet A, et al. High hepatic glutathione stores alleviate Fas-induced apoptosis in mice. *Journal of Hepatology*. 2007;46(5):858-68.
- 160.** Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases AU - Franco, R. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2007;113(4-5):234-58.
- 161.** Circu ML, Aw TY. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2012;1823(10):1767-77.
- 162.** Flohé L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2013;1830(5):3139-42.
- 163.** Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological chemistry*. 2009;390(3):191-214.

- 164.** Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Letters*. 1996;378(2):107-10.
- 165.** Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495-516.
- 166.** Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. 2004;16(6):663-9.
- 167.** Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. 2009;16(1):3-11.
- 168.** Green DR, Llamby F. *Cell Death Signaling*. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2015;7(12).
- 169.** McConkey DJ. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters*. 1998;99(3):157-68.
- 170.** Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & development*. 2003;17(20):2481-95.
- 171.** Kütük Ö, Başağa R. *Apoptotic Pathways in Mitochondria*. Preedy VR. *Apoptosis*. Boca Raton: CRC Press; 2010.
- 172.** Stoyanovsky DA, Billiar TR. CHAPTER 12 - Cellular non-heme iron modulates apoptosis and caspase 3 activity. In: Van Faassen E, Fyodorovich Vanin A, editors. *Radicals for Life*. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 253-68.
- 173.** Kawadler H, Yang X. Lymphocyte life and death: The caspase-8 connection AU - Tang, Jun. *Cancer Biology & Therapy*. 2005;4(7):700-2.
- 174.** Jiang M, Stanke J, Lahti JM. Chapter 4 - The Connections Between Neural Crest Development and Neuroblastoma. In: Dyer MA, editor. *Current Topics in Developmental Biology*. 94: Academic Press; 2011. p. 77-127.
- 175.** McArthur K, Kile BT. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends in Cell Biology*. 2018;28(6):475-93.
- 176.** Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008;27:6194.
- 177.** Cosentino K, García-Sáez AJ. Mitochondrial alterations in apoptosis. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2014;181:62-75.
- 178.** Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*. 2017;135:111-25.
- 179.** Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging*. 2012;4(5):330-49.
- 180.** Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 2000;7(3):153-63.
- 181.** Todorova VK, Harms SA, Kaufmann Y, Luo S, Luo KQ, Babb K, et al. Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis-related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;88(3):247-56.

- 182.** Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2011;20(3):145-58.
- 183.** Wu Y, Beland FA, Fang J-L. Effect of triclosan, triclocarban, 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether, and bisphenol A on the iodide uptake, thyroid peroxidase activity, and expression of genes involved in thyroid hormone synthesis. *Toxicology in Vitro*. 2016;32:310-9.
- 184.** Porreca I, Ulloa Severino L, D'Angelo F, Cuomo D, Ceccarelli M, Altucci L, et al. "Stockpile" of Slight Transcriptomic Changes Determines the Indirect Genotoxicity of Low-Dose BPA in Thyroid Cells. *PLOS ONE*. 2016;11(3):e0151618.
- 185.** Zheng CM, Liu XZ, Li QL, Wang JF, Tan Z, Ge MH. [The bisphenol A-enhanced activity of thyroid carcinoma cell line B-CPAP is inhibited by Icarrin]. *Zhonghua er bi yan hou tou jing wai ke za zhi* = Chinese journal of otorhinolaryngology head and neck surgery. 2017;52(6):458-62.
- 186.** Silva MMd, Xavier LLF, Gonçalves CFL, Santos-Silva AP, Paiva-Melo FD, Freitas MLd, et al. Bisphenol A increases hydrogen peroxide generation by thyrocytes both in vivo and in vitro. 2018;7(11):1196.
- 187.** Gentilcore D, Porreca I, Rizzo F, Ganbaatar E, Carchia E, Mallardo M, et al. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. *Toxicology*. 2013;304:21-31.
- 188.** Zhang J, Zhang X, Li Y, Zhou Z, Wu C, Liu Z, et al. Low dose of Bisphenol A enhance the susceptibility of thyroid carcinoma stimulated by DHPN and iodine excess in F344 rats. *Oncotarget*. 2017;8(41):69874-87.
- 189.** Chan WK, Chan KM. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryo–larvae following waterborne exposure to BDE-47, TBBPA and BPA. *Aquatic Toxicology*. 2012;108:106-11.
- 190.** 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.
- 191.** Das B, Heimeier RA, Shi Y-B, Buchholz DR. The Xenoestrogen Bisphenol A Inhibits Postembryonic Vertebrate Development by Antagonizing Gene Regulation by Thyroid Hormone. *Endocrinology*. 2009;150(6):2964-73.
- 192.** Wang T, Lu J, Xu M, Xu Y, Li M, Liu Y, et al. Urinary bisphenol A concentration and thyroid function in Chinese adults. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2013;24(2):295-302.
- 193.** Brucker-Davis F, Ferrari P, Boda-Buccino M, Wagner-Mahler K, Pacini P, Gal J, et al. 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.
- 194.** Wang F, Hua J, Chen M, Xia Y, Zhang Q, Zhao R, et al. High urinary bisphenol A concentrations in workers and possible laboratory abnormalities. *Occupational and Environmental Medicine*. 2012;69(9):679-84.

- 195.** Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol.* 1998;79:179-83.
- 196.** Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols.* 2010;5(1):51-66.
- 197.** Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1994;32:5-8.
- 198.** Testa MP, Alvarado O, Wournell A, Lee J, Guilford FT, Henriksen SH, et al. Screening assay for oxidative stress in a feline astrocyte cell line, G355-5. *Journal of visualized experiments: JoVE.* 2011(53):e2841.
- 199.** Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols.* 2007;1:3159.
- 200.** Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine.* 1990;9(6):515-40.
- 201.** Jalal N, Surendranath AR, Pathak JL, Yu S, Chung CY. Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicology reports.* 2017;5:76-84.
- 202.** World Health Organization (WHO). Bisphenol A (BPA)-Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) [Internet]. 2009 [Erişim Tarihi 13.3.2019]. Erişim adresi: https://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_en.pdf
- 203.** Hong Y-P, Yang Y-J. Low-Dose Exposure to Bisphenol A in Early Life. Erkekoğlu P, Koçer-Gümüşel B, editörler. *Bisphenol A Exposure and Health Risks.* London: IntechOpen Limited; 2017.
- 204.** Pearce EN, Braverman LE. Environmental pollutants and the thyroid. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism.* 2009;23(6):801-13.
- 205.** Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental health and preventive medicine.* 2008;13(2):102-8.
- 206.** Kim IY, Kim TS, Chung YW, Jeong D. Selenium-induced apoptosis. In: Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN, editors. *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health.* Boston, MA: Springer US; 2006. p. 379-85.
- 207.** Nettore IC, De Nisco E, Desiderio S, Passaro C, Maione L, Negri M, et al. Selenium supplementation modulates apoptotic processes in thyroid follicular cells. *BioFactors.* 2017;43(3):415-23.
- 208.** Kato MA, Finley DJ, Lubitz CC, Zhu B, Moo T-A, Loeven MR, et al. Selenium Decreases Thyroid Cancer Cell Growth by Increasing Expression of GADD153 and GADD34. *Nutrition and cancer.* 2009;62(1):66-73.

209. Xin F, Jiang L, Liu X, Geng C, Wang W, Zhong L, et al. Bisphenol A induces oxidative stress-associated DNA damage in INS-1 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2014;769:29-33.
210. Pfeifer D, Chung YM, Hu MCT. Effects of Low-Dose Bisphenol A on DNA Damage and Proliferation of Breast Cells: The Role of c-Myc. *Environmental health perspectives*. 2015;123(12):1271-9.
211. Batta A. Selenium: The biological role and antioxidant activity [Poster]. 10th Pharmacovigilance Congress; September 2017; Charlotte, USA
212. Shen H-M, Yang C-F, Ong C-N. Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *International journal of cancer*. 1999;81(5):820-8.
213. Shen H-M, Yang C-F, Liu J, Ong C-N. Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;28(7):1115-24.
214. Suzuki M, Endo M, Shinohara F, Echigo S, Rikiishi H. Rapamycin suppresses ROS-dependent apoptosis caused by selenomethionine in A549 lung carcinoma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2011;67(5):1129-36.
215. Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(1-2):60-76.
216. Ge L-C, Chen Z-J, Liu H, Zhang K-S, Su Q, Ma X-Y, et al. Signaling related with biphasic effects of bisphenol A (BPA) on Sertoli cell proliferation: A comparative proteomic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2014;1840(9):2663-73.
217. Zhong W, Oberley TD. Redox-mediated Effects of Selenium on Apoptosis and Cell Cycle in the LNCaP Human Prostate Cancer Cell Line. *Cancer Res*. 2001;61(19):7071-8.
218. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(5):3143-53.
219. Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Química Nova*. 2009;32:169-74.
220. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA*. 2015;6(3):331-6.
221. Leem Y-H, Oh S, Kang H-J, Kim J-H, Yoon J, Chang J-S. BPA-toxicity via superoxide anion overload and a deficit in β -catenin signaling in human bone mesenchymal stem cells. *Environmental toxicology*. 2017;32(1):344-52.
222. Moon MK, Kim MJ, Jung IK, Koo YD, Ann HY, Lee KJ, et al. Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *Journal of Korean medical science*. 2012;27(6):644-52.

223. Lie PPY, Cheng CY, Mruk DD. Chapter five - The Biology of the Desmosome-Like Junction: A Versatile Anchoring Junction and Signal Transducer in the Seminiferous Epithelium. In: Jeon KW, editor. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 286: Academic Press; 2011. p. 223-69.
224. McKeehan WL, Hamilton WG, Ham RG. Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976;73(6):2023-7.
225. Zeng H. Selenite and selenomethionine promote HL-60 cell cycle progression. *J Nutr*. 2002;132(4):674-9.
226. Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki E. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J Biol Chem*. 2003;278(41):39428-34.
227. Demelash A, Karlsson JO, Nilsson M, Bjorkman U. Selenium has a protective role in caspase-3-dependent apoptosis induced by H₂O₂ in primary cultured pig thyrocytes. *European journal of endocrinology*. 2004;150(6):841-9.
228. Xiang N, Zhao R, Zhong W. Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2009;63(2):351-62.
229. Zhou Y-j, Zhang S-p, Liu C-w, Cai Y-q. The protection of selenium on ROS mediated-apoptosis by mitochondria dysfunction in cadmium-induced LLC-PK1 cells. *Toxicology in Vitro*. 2009;23(2):288-94.
230. Miranda SG, Purdie NG, Osborne VR, Coomber BL, Cant JP. Selenomethionine increases proliferation and reduces apoptosis in bovine mammary epithelial cells under oxidative stress. *Journal of Dairy Science*. 2011;94(1):165-73.

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler

Tez Çalışması ile İlgili Poster Bildirileri

1. **Erhan Tan**, Eylem Baysal, N. Dilara Zeybek, Gizem Özkemahlı, Ünzile Sur, Pınar Erkekoğlu, Belma Koçer Gümüşel. Tiroid Adenokarsinoma Hücrelerinde Bisfenol A'nın Hücre Yapısı Ve Apoptoz Üzerine Etkileri. 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 24-26 Nisan 2019, Edirne, Türkiye.



EK-2. Dijital Makbuz



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author:	Erhan Tan
Assignment title:	Tez deneme
Submission title:	ERHAN TAN TEZ
File name:	TEZ_TURN_T_N.docx
File size:	4.6M
Page count:	113
Word count:	22,669
Character count:	157,487
Submission date:	05-May-2019 11:59PM (UTC+0300)
Submission ID:	1125232507

TEZ
ERHAN TAN TEZ

TEZİN İLK BÖLÜMÜNE GİRİŞİMİZ, ÇOK YAKIN
OLARAK BİRİNCİ BÖLÜMÜNE GİRİŞİMİZ
KARŞIYLAŞTIK. BİRİNCİ BÖLÜMÜNE GİRİŞİMİZ

ERHAN TAN

TEZİN İLK BÖLÜMÜNE GİRİŞİMİZ
OLARAK BİRİNCİ BÖLÜMÜNE GİRİŞİMİZ

ERHAN TAN
TEZ

Copyright 2019 Turnitin. All rights reserved.

EK-3. Orijinallik Raporu

ERHAN TAN TEZ			
ORIGINALITY REPORT			
4%	3%	2%	1%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	katalog.hacettepe.edu.tr Internet Source	1%	
2	turktox.org.tr Internet Source	<1%	
3	Submitted to Erciyes Üniversitesi Student Paper	<1%	
4	ivekkongre.com Internet Source	<1%	
5	library.cu.edu.tr Internet Source	<1%	
6	Anıl YİRÜN, Pınar ERKEKOĞLU, Belma KOÇER GÜMÜŞEL. "The Neuroendocrine and Neurodevelopmental Effects of Endocrine Disrupting Chemicals", Türkiye Klinikleri Journal of Neurology, 2018 Publication	<1%	
7	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	<1%	

9. ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Erhan TAN

Doğum Yeri ve Tarihi: Merkez/NİĞDE 31.01.1992

Uyruğu: T.C.

İletişim Adresi ve Telefonu: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Sıhhiye/ ANKARA, 544 780 80 92

II- Eğitim Bilgileri

2017- : Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans

2011-2016: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Lisans

2006-2010: Niğde Atatürk Lisesi

1999-2006: Niğde İnönü İlköğretim Okulu

III- Mesleki Deneyimi

IV- Bilimsel Faaliyetleri

Yayınları: -

Aldığı Burslar: Türk Eğitim Vakfı, Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu

Projeler: Tiroid Hücrelerinde Bisfenol A'nın Toksik Etkileri ve Selenyum Bileşiklerinin Koruyucu Rolünün Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi, Lisansüstü Tez Projesi, Araştırmacı; Proje No: TYL-2018-17076