



TC
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



ENDOKRİN BOZUCULARIN STEROİDOJENEZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN HORMON ANALİZLERİ İLE BELİRLENMESİ

Doktora Tezi

Zeynep AĞLAMİŞ

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

İzmir
2021

TC.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**ENDOKRİN BOZUCULARIN STEROİDOJENEZ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN HORMON ANALİZLERİ
İLE BELİRLENMESİ**

Zeynep AĞLAMİŞ

Danışman
Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
Farmasötik Toksikoloji Doktora Programı

İzmir
2021

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

İmza

Başkan Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN

(Danışman)

.....

Üye: Prof. Dr. Hilmi ORHAN

.....

Üye: Prof. Dr. Sait SOFUOĞLU

.....

Üye: Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS

.....

Üye: Prof. Dr. Aylin GÜRBAY

.....

Üye: Doç. Dr. Özlem ATLI

.....

Doktora Tezinin kabul edildięi tarih: 12.08.2021

Önsöz

Lisans eğitimim sonrasında toksikolojiye olan ilgim doktora eğitimimi yapmak için Farmasötik Toksikoloji alanını seçmeme neden oldu. Ardından araştırmalarım sonrasında Prof. Dr. Hande GÜNER-ORHAN'ın danışmanlığında doktora eğitimime başladım. Danışman hocamın meme kanseriyle ilgi olan çalışmalarını incelemeye başladım ve devam eden süreçte kendisinin yol göstermesiyle “endokrin bozucuların steroidojenez üzerine etkilerinin hormon analizleri ile belirlenmesi” isimli tez konumun seçimine karar kıldık. Doktora eğitimim boyunca sıklıkla tekrarlanan Paracelsus'un “ilacı zehirden ayıran dozudur” sözü toksikolojik bakış açısıyla birçok şeyin önemli bir ilaç haline dönüştürülebileceğini öğretti. Bu öğretiyi doktora tezim boyuncada bu bakış açımın gelişmesine yardımcı oldu.

Yaşadığımız en büyük sıkıntı doktora sürecindeki bütçe ile ilgili olan problemdi. Bu kadar kısıtlı bütçelerle ve özverili çalışmalarla çok güzel sonuçların çıktığına şahit oldum. Bu süreçte benim için en önemli olan bilimsel yeterlilik ve özverili çalışmanın, kısıtlı imkânlar içerisinde olursa bile, bir şeylerin başarılabileceğini öğrenmiş olmamdır.

Bana gerek akademik gerekse hayata bakış açımı kattığı bu çalışmamın burada kalmaması ve devamının gelmesi dileğiyle.

İzmir, 2021

Zeynep AĞLAMIŞ

Özet

Endokrin Bozucuların Steroidojenez Üzerine Etkilerinin Hormon Analizleri ile Belirlenmesi

Endokrin bozucular (EB), sağlıklı organizmada veya gelecek nesillerinde advers sağlık etkilerine, endokrin fonksiyonlarda değişikliklere sebep olan ekzojen maddeler olarak tanımlanmaktadır. EB hormon reseptörleri ile etkileşerek agonist ya da antagonist etki gösterebileceği gibi steroid hormonların biyosentez ve metabolizma yollarında yer alan enzimlerle etkileşerek fizyolojik hormon düzeylerini değiştirmek yoluyla da etkilerini gösterebilmektedir. Bu tez çalışmasında endokrin bozucuların cinsiyet hormonlarının sentez yolağı olan steroidojenez üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla OECD TG-456 test kılavuzunda belirtilen valide *in vitro* bir yöntemin laboratuvarımızda uygulanması ve deneyin sonucunda östradiol (E2) ve testosteron (T) düzeylerinin belirlenmesi amacıyla ELİSA ve LC MS/MS yöntemlerinin kullanılması, her iki analiz yöntemi ile elde edilen verilerin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Yöntemde pozitif kontrol olarak (enzim indükleyici etki) OECD kılavuzunda belirtildiği gibi forskolin, negatif kontrol olarak (enzim inhibitörü etki) prokloraz, steroidojenez döngüsünde E2 ve T üzerine etkisi bilinen referans maddelerden ketakonazol, letrozol ve genistein kullanılarak yöntem(ler)in kısmi validasyonları yapılmış ve ölçüm performansları karşılaştırılmıştır. Her iki yöntem arasında fark olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Takiben hormon bağımlı meme kanseri tedavisinde aromataz enzim inhibitörü olarak kullanılması önerilecek, yeni sentezlenmiş ilaç etkin madde adayları olan 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (4-klorofenil) hidrazon (M6) ve 2-metilindol-3-karboksialdehit fenil hidrazon (M20) ile bunların model bileşiğı olan melatoninin tüm steroidojenez yolağı üzerindeki etkileri de H295R steroidojenez yöntemi uygulanması sonrasında hormon analizleri her iki yöntemle yapılarak araştırılmıştır. Sonuç olarak uygulanan iki yöntem avantaj ve dezavantajları açısından değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler; H295R; Steroidojenez; Endokrin bozucular; ELISA; LC MS/MS

Abstract

Determination of the effects of Endocrine disrupturs on Steroidogenesis by Hormone Analysis

Endocrine disruptors (EB) are defined as exogenous substances that cause adverse health effects and changes in endocrine functions in healthy organisms or in their future generations. EB can act as an agonist or antagonist by interacting with hormone receptors, or it can also exert its effects by changing physiological hormone levels by interacting with enzymes involved in the biosynthesis and metabolism pathways of steroid hormones. In this thesis study, in order to investigate the effects of endocrine disruptors on steroidogenesis, which is the synthesis pathway of sex hormones, a validated in vitro method specified in the OECD TG-456 test guide was applied in our laboratory and ELISA and LC MS/MS were used to determine estradiol (E2) and testosterone (T) levels as a result of the experiment. It is aimed to use the methods of analysis and to compare the data obtained by both analysis methods. Partial validation of the method(s) was made using forskolin as a positive control (enzyme inducing effect) as stated in the OECD guideline, prochlorase as a negative control (enzyme inhibitory effect), ketoconazole, letrozole and genistein, which are reference substances with known efficacy on E2 and T in the steroidogenesis cycle. measurement performances were compared. Whether there is a difference between the two methods was evaluated statistically. Subsequently, 2-Methyl-1-H-indole-3-carboxyaldehyde (4-chlorophenyl) hydrazone (M6) and 2-methylindole-3-carboxyaldehyde, which are newly synthesized drug active substance candidates, will be recommended to be used as an aromatase enzyme inhibitor in the treatment of hormone-dependent breast cancer. The effects of phenyl hydrazone (M20) and their model compound, melatonin, on the entire steroidogenesis pathway were also investigated after the application of the H295R steroidogenesis method, by performing hormone analyzes with both methods. As a result, the two methods applied were evaluated in terms of advantages and disadvantages.

Keywords; H295R; Steroidogenesis; Endocrine disruptors; ELISA; LC MS/MS

İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	IV
İçindekiler	V
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini	XI
Kısaltma Listesi	XXI
Giriş.....	1
Genel Bilgiler	3
2.1. Endokrin Sistem	3
2.2. Steroidojenez	5
2.2.1. Steroidojenez Yolağındaki Önemli Enzimler	7
2.2.1.1. CYP17 Enzimi	7
2.2.1.2. CYP 19 Enzimi	7
2.2.2. Cinsiyet Hormonları	8
2.2.3. Hormon Reseptörleri	9
2.2.3.1. Östrojen Reseptörü (ER).....	9
2.2.3.2. Androjen Reseptör (AR)	10
2.3. Hormonal Kontrol.....	10
2.3.1. Üreme Eksenleri.....	10
2.4. Endokrin Fonksiyonun Değişimi	12
2.4.1. Endokrin Toksikoloji ve Hormonların Rolü	12
2.4.2. Endokrin Bozucular (EB).....	13
2.5. Endokrin Bozucuların Tayin Yöntemleri	14
2.5.1. <i>In Vitro</i> Analizler	14
2.5.1.1. H295R Steroidojenez Assay	14
2.5.1.2. Hormon Reseptör Bağlama Deneyleri	15
2.5.2. <i>In Vivo</i> Yöntemler	16
2.5.2.1. Hersberger Analizi.....	16
2.5.2.2. Ütorotrofik Analiz.....	17
2.6. Melatonin ve Analoglarının Meme Kanserinde Olası Antiöstrojenik Etkileri.....	17

2.6.1. Selektif Östrojen Reseptör Modölatörleri (SERM)	18
2.6.2. Selektif Östrojen Enzim Modölasyonu (SEEM)	19
2.7. Melatonin	19
Gereç ve Yöntem	21
3.1.2. Kullanılan Gereçler	22
3.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	23
3.2.1. H295R Hücre Kültüründe Kullanılan Besi Ortamı ve Çözeltilerin Hazırlanması	23
3.2.1.1. Besi Ortamı	23
3.2.1.2. Stok Östradiol ve Testosteron Standartının Hazırlanması	23
3.2.1.3. Stok Prokloraz Hazırlanması	23
3.2.1.4. Stok Forskolin Hazırlanması	23
3.2.1.5. Stok Melatonin Hazırlanması	23
3.2.1.6. Stok Ketakonazol ve Genistein Hazırlanması	23
3.2.1.7. Stok Test Maddelerinin Hazırlanması	24
3.2.2. ELİSA Test Kiti Çözeltilerinin Hazırlanması	24
3.2.2.1. ELİSA Tampon Çözeltisi	24
3.2.2.2. Yıkama Tampon Çözeltisi	24
3.2.2.3. ELİSA AChE Tracer	24
3.2.2.4. Östradiol ELİSA Antiserum	24
3.2.3. Standart Hazırlanması	24
3.2.3.1. LC MS/MS Standartlarının Hazırlanması	24
3.2.3.2. ELİSA Standartlarının Hazırlanması	25
3.2.3.2.1. ELISA Östradiol Standartlarının Hazırlanması	25
3.2.3.2.2. ELISA Testosteron Standartlarının Hazırlanması	26
3.1.3. Referans Bileşikler ve Test Edilen Melatonin Analogları	27
3.1.4. Test Bileşikleri (M Maddeleri)	28
3.3. Analiz Yöntemleri	29
3.3.1. H295R Steroidojenez Deneyi	29
3.3.1.1. H295R Hücre Hattı Çalışma Prensipleri	29
3.3.1.2. Hücrelerin İdamesi ve Pasajlanması	30
3.3.1.3. Hücre Sayımı ve Mikroplakaya Hücre Ekimi	30
3.3.1.4. Hücre Canlılığının MTT Yöntemi ile Belirlenmesi	31
3.3.1.5. Hormon (Östradiol ve Testosteron) Düzeylerinin Ölçülmesi	32

3.3.1.5.1. LC MS/MS Yöntemi ile Hormon Düzeylerinin Ölçülmesi.....	32
3.3.1.5.1.1. Çalışma Prensibi	32
3.3.1.5.1.2. LC MS/MS parametreleri	34
3.3.1.5.2. ELISA Yöntemi ile Hormon Düzeylerinin Ölçülmesi	38
3.3.1.5.2.1. Çalışma Prensibi	38
3.3.1.5.2.2. Deneyin Yapılışı.....	39
3.4. Uygulanan Deney ve Yöntemlerin Validasyon Çalışmaları.....	40
3.4.1. H295R Hücre Kültürü Kısmi Validasyonu	40
3.4.2. Analitik Metod Validasyonu	41
3.4.2.1. Seçicilik	41
3.4.2.2. Doğrusallık (Linearite)	41
3.4.2.3. Duyarlılık	42
3.4.2.4. Doğruluk (Accuracy)	42
3.4.2.4.1 Kesinlik (Precision)	42
3.4.2.4.2 Geri Kazanım	42
3.4.3.1. LC MS/MS Metodunun Validasyonu.....	43
3.4.3.2. ELISA Metodunun Kısmi Validasyonu	43
3.5. Test Maddelerinin Steroidojenez Üzerine Etkisinin Araştırılması	43
3.6. İstatistiksel Analiz	43
Bulgular.....	45
4.1. Metod Validasyon Çalışması Bulguları.....	45
4.1.1. H295R Steroidojenez Yönteminin Kısmi Validasyonu.....	45
4.1.2. LC MS/MS Yöntemine Ait Validasyon Bulguları.....	45
4.1.2.1. Seçicilik	45
4.1.2.2. Doğrusallık (Linearite)	47
4.1.2.3. Analitik Ölçüm Limitleri	48
4.1.2.4. Tekrarlanabilirlik (Precision)	50
4.1.2.4.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik Çalışması.....	50
4.1.2.4.2. Günlerarası Tekrarlanabilirlik Çalışması	50
4.1.2.5. Gerikazanım (Recovery).....	52
4.1.3. ELISA ile Hormon Analiz Yönteminin Kısmi Validasyonu	52
4.2. Referans Maddelerin Testosteron ve Östradiol Üzerine Etkilerinin LC MS/MS Yöntemi ile Araştırılması.....	54

4.3. Test Maddelerin Testosteron ve Östradiol Üzerine Etkilerinin LC MS/MS Yöntemi İle Araştırılması.....	63
4.3.1. Melatonin	63
4.3.2. 2-Metil-1-H-İndol-3-Karboksialdehit(4-Klorofenil) Hidrazon (M6)	65
4.3.3. 2-Metilindol-3-Karboksialdehit Fenil Hidrazon (M20).....	67
4.4 Referans Maddelerin Testosteron ve Östradiol Üzerine Etkilerinin ELISA Yöntemi ile Araştırılması	69
4.5. Test Maddelerin Testosteron ve Östradiol Üzerine Etkinliklerinin ELISA Yöntemi ile Araştırılması	72
4.5.1 Melatonin	72
4.5.2. 2-Metil-1-H-İndol-3-Karboksialdehit (4-klorofenil) Hidrazon (M6)	74
4.5.3. 2-Metilindol-3-Karboksialdehit Fenil Hidrazon (M20).....	76
4.6. LC MS/MS VE ELİSA Yöntemi ile Ölçülen E2 ve T Düzeylerinin Karşılaştırması	78
4.6.1. Referans Bileşikler ile Yapılan Çalışma Verilerinin Karşılaştırılması.....	78
4.6.2. Test Maddeleri ile Yapılan İki Farklı Hormon Ölçüm Yöntemi Verilerinin Karşılaştırılması	81
Tartışma	88
Sonuç ve Öneriler.....	102
Kayaklar	104
Teşekkür	124
Özgeçmiş	125

Tablolar Dizini

Tablo 1.	Kullanılan kimyasal maddeler.....	21
Tablo 2.	Kullanılan gereçler	22
Tablo 3.	Metoda ait LC MS/MS parametreleri.....	36
Tablo 4.	Metodda kullanılan cihaz gradient akışı.....	37
Tablo 5.	ELİSA test kiti protokolü	40
Tablo 6.	Yeterlilik testinde kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	40
Tablo 7.	OECD TG-456 test klavuzu yeterlilik testi değerlendirilmesinde kullanılan performans kriterleri.....	41
Tablo 8.	H295R Hücre Kültürü Kısmi Validasyonu Sonuçları.....	45
Tablo 9.	E2 ve T ait H295R besiyerisinde hazırlanan standart kalibrasyon çözeltilerinin LC MS/MS'e enjeksiyonu ile elde edilen kalibrasyon doğrusu formülleri ($y=ax+b$) ve alıkonma zamanları ve belirleme katsayıları (R^2).	48
Tablo 10.	LC MS/MS validasyonu sonucu elde edilen T ve E2'ye ait LOD ve LOQ değerleri.....	50
Tablo 11.	Östradiol için günüçi ve günlerarası tekrarlanabilirlik verileri	51
Tablo 12.	Testosteron için günüçi ve günlerarası tekrarlanabilirlik verileri	51
Tablo 13.	Geri kazanım çalışmaları sonuçları	52
Tablo 14.	ELİSA yönteminin “gün içi ve günler arası” tekrarlanabilirliğinin referans bileşikler olan Forskolin ve Prokloraz varlığında östradiol düzeylerinin ölçülmesi ile değerlendirilmesi	54
Tablo 15.	ELİSA yönteminin “gün içi ve günler arası” tekrarlanabilirliğinin referans bileşikler olan Forskolin ve Prokloraz varlığında testosteron düzeylerinin ölçülmesi ile değerlendirilmesi	54
Tablo 16.	E2 verilerine ait LC MS/MS ve ELISA verilerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	86
Tablo 17.	T verilerine ait LC MS/MS ve ELISA verilerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	87
Tablo 18.	Endokrin Bozucuların Test edilip Belirlenmesi için Kavramsal Çerçeve (OECD 2012)	89

Tablo 19. Immunoassay ve LC MS/MS yöntemlerinin avantajlarının karşılaştırılması	92
Tablo 20. Immunoassay ve LC MS/MS yöntemlerinin dezavantajlarının karşılaştırılması	92



Şekiller Dizini

Şekil 1.	İnsan vücudunda endokrin sistemin genel görünümü, organlar tarafından üretilen veya bunları etkileyen hormonlar	5
Şekil 2.	Steroidojenez yolağındaki enzimler	6
Şekil 3.	Hipotalamik-pituiter-gonadal (HPG) eksenin gösterilmesi.....	11
Şekil 4.	Fötüs (a) ve yetişkin (b) insana ait korteksin farklı zonal bölgelerini gösteren adrenal bezin histolojik yapısı (Monticone et al., 2012).....	12
Şekil 5.	LC MS/MS standartlarının hazırlanma prosedürü	25
Şekil 6.	ELISA test kiti Östradiol standartlarının hazırlanma prosedürü	26
Şekil 7.	ELISA test kiti Testosteron standartlarının hazırlanma prosedürü	26
Şekil 8.	MTT deney tasarımı	31
Şekil 9.	LC MS/MS Çalışma Prensibi.....	33
Şekil 10.	LC MS//MS ve ELİSA yöntemlerine ait tüm basamakların özeti	34
Şekil 11.	Östradiole ait MS/MS parçalanma ürünleri	37
Şekil 12.	Testosterona ait MS/MS parçalanma ürünleri.....	38
Şekil 13.	Elisa Test Kiti Çalışma Prensibi.....	39
Şekil 14.	H295R besiyeri içine E2 (1 ng/ml) eklenerek hazırlanmış örneğe ait kromatogram	46
Şekil 15.	H295R besiyeri içine T (1 ng/ml) standartı eklenerek hazırlanmış örneğe ait kromatogram.....	46
Şekil 16.	Östradiole ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi.....	47
Şekil 17.	Testosterona ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklem	48
Şekil 18.	LOD ve LOQ hesabında kullanılan E2 kromatogramı.....	49
Şekil 19.	LOD ve LOQ hesabında kullanılan T kromatogramı.....	49
Şekil 20.	ELISA yöntemi ile elde edilen östradiole ait kalibrasyon doğrusu.....	53
Şekil 21.	ELISA yöntemi ile elde edilen testosterona ait kalibrasyon doğrusu	53
Şekil 22.	Forskolin'in E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen sayısal değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme DMSO kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001	55

- Şekil 23. Forskolin'in T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen sayısal değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme DMSO kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.00155
- Şekil 24. Prokloraz'ın E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Prokloraz gruplarında hücreler uygulanan prokloraz konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.....56
- Şekil 25. Proklorazın T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Prokloraz gruplarında hücreler uygulanan farklı konsantrasyonlarda prokloraz ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.....57
- Şekil 26. H295R hücrelerinde Forskolin ve Prokloraz'ın hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0.1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01,57
- Şekil 27. Letrazolün E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Letrazol gruplarında hücreler uygulanan letrazol konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.....58

- Şekil 28. Letrazolün T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Letrazol gruplarında hücreler uygulanan letrazol konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001..... 59
- Şekil 29. H295R hücrelerinde letrazolün hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, 59
- Şekil 30. Ketokonazolün E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Ketokonazol gruplarında hücreler uygulanan ketokonazol konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001..... 60
- Şekil 31. Ketokonazolün T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Ketokonazol gruplarında hücreler uygulanan ketokonazol konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001..... 61
- Şekil 32. Genisteinin E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Genistein gruplarında hücreler uygulanan genistein konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001..... 62

- Şekil 33. Genisteinin T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Genistein gruplarında hücreler farklı konsantrasyonlarda uygulanan genistein ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001.....62
- Şekil 34. Melatoninin E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Melatonin gruplarında hücreler uygulanan melatonin konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001.....63
- Şekil 35. Melatoninin T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Melatonin gruplarında hücreler uygulanan melatonin konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001.....64
- Şekil 36. H295R hücrelerinde melatoninin hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01,64
- Şekil 37. M6nın E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. M6nın gruplarında hücreler uygulanan M6 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.00165

- Şekil 38. M6nın T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. M6nın gruplarında hücreler uygulanan M6 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001 66
- Şekil 39. H295R hücrelerinde M6nın hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0.1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, 66
- Şekil 40. M20nin E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. M20nin gruplarında hücreler uygulanan M20 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001 67
- Şekil 41. M20nin T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. M20nin gruplarında hücreler uygulanan M20 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001 68
- Şekil 42. H295R hücrelerinde M20nin hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01 68
- Şekil 43. Forskolin'in E2 üzerine olan etkisine ait ELİSA sonuç grafiği Barlar üzerindeki değerler ELİSA'dan elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme DMSO kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001 69

- Şekil 44. Forskolin'in T üzerine olan etkisine ait ELİSA sonuç grafiği Barlar üzerindeki değerler ELİSA'dan elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme DMSO kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001..... 70
- Şekil 45. Prokloraz'ın E2 üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. Prokloraz gruplarında hücreler uygulanan prokloraz konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001..... 71
- Şekil 46. Prokloraz'ın T üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. Prokloraz gruplarında hücreler uygulanan prokloraz konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001..... 71
- Şekil 47. H295R hücrelerinde Forskolin ve Prokloraz'ın hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, 72
- Şekil 48. Melatoninin E2 üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. Melatonin gruplarında hücreler uygulanan melatonin konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001..... 73

- Şekil 49. Melatoninin T üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. Melatonin gruplarında hücreler uygulanan melatonin konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001..... 73
- Şekil 50. H295R hücrelerinde melatoninin hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, 74
- Şekil 51. M6nın E2 üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. M6nın gruplarında hücreler uygulanan M6 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001 75
- Şekil 52. M6nın T üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. M6nın gruplarında hücreler uygulanan M6 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001..... 75
- Şekil 53. H295R hücrelerinde M6nın hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, 76

Şekil 54.	M20nin E2 üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. M20 gruplarında hücreler uygulanan M20 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme DMSO kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.....	77
Şekil 55.	M20nin T üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. M20 gruplarında hücreler uygulanan M20 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme DMSO kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.....	77
Şekil 56.	H295R hücrelerinde M20nin hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01	78
Şekil 57.	Forskolin'in E2 üzerine etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.....	79
Şekil 58.	Forskolin'in T üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001	79
Şekil 59.	Prokloraz'ın E2 üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001	80

Şekil 60.	Prokloraz'ın T üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001	81
Şekil 61.	Melatoninin E2 üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001	82
Şekil 62.	Melatoninin T üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001	83
Şekil 63.	M6'nın E2 üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001	84
Şekil 64.	M6'nın T üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001	84
Şekil 65.	M20'nin E2 üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001	85

- Şekil 66. M20'nin T üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 86
- Şekil 67. Steroidojenez yolağında prokloraz, ketokanozol ve genisteinin etkilediği enzimler ve etki şekilleri 96



Kısaltma Listesi

Pb	Kurşun
Cd	Kadmiyum
E2	17- β Östradiol
T	Testosteron
StAR	Akut düzenleyici protein
CYP19A1	Aromataz enzimi
3 β -HSD	3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz
AR	Androjen Reseptör
ER	Östrojen Reseptörü
GR	Glukokortikoid Reseptörü
MR	Mineralokortikoid Reseptörü
TR	Tiroid Reseptörü
EB	Endokrin bozucular
LH	Luteinize edici hormon
StAR	Steroidojenik akut düzenleyici protein
3 β -HSD	3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz
DHEA	Dihidroepiandrosteron
MPW	Maskulizasyon programlama penceresi
DHT	Dihidrottestosteron
HPA	Hipotalamus-hipofiz-adrenal
HPG	Hipotalamus-hipofiz-gonadal
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GnRH	Gonodotropin salıverici hormon
IPCS	Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı
UNEP	Birleşmiş Milletler Çevre Programı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
REACH	Kimyasalların kaydı değerlendirilmesi İzni ve Kısıtlaması
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
EPA	Amerika Çevre Koruma Ajansı
EDSP	Endokrin Bozucu Tarama Programı
H295R	İnsan adrenokortikokarsinom hücre hattı
PR	Progesteron

IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya birliği
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi
LOD	Gözlenebilme Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
MDL	Minimum Tespit Edilebilir Limit
NOEC	Etki gözlenmeyen konsantrasyon
LOEC	En düşük gözlemlenen etki konsantrasyonu
AChE	Asetilkolinesteraz
TA	Total Aktivite
SIM	Seçilen İyon İzleme
MRM	Çoklu Reaksiyon İzleme
NIEHS	Ulusal Çevre Sağlığı Bilimleri Enstitüsü
SERM	Selektif Östrojen Reseptör Modulatorleri
SEEM	Selektif Östrojen Enzim Modulatorleri
ADH	Antidiüretik hormon
T3	Triiyodotironin
T4	Tetrayodotironin
HPM	Plasental mikrozom
MLT	Melatonin
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
MS	Kütle Spektrometrisi
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
APCI	Atmosferik Basıncı Kimyasal İyonizasyon
SC	Solvent Kontrol
RIA	Radio Immunoassay
CRH	Kortikotropin Salıverici Hormon
ACTH	Adrenokortikotropin Hormon
GTP	G Proteini

Giriş

Endokrin bozucular (EB), hormonların oluşturduğu yanıtların benzerini oluşturan, hücrelerdeki hormon reseptörlerini bloke ederek hormonların olağan şekilde etki etmelerini önleyen, hücrelerde normal dışı reaksiyonlara neden olan maddeler olarak tanımlanır (Kavlock et al. 1996).

Endokrin bozuculara maruziyetin kaynakları çok çeşitlidir. Steroid hormonlar, sentetik steroidler, poliklorlubifeniller, polibromlubifeniller, dioksin, alkilfenol, organotin gibi endüstriyel kimyasal maddeler, pestisitler, farmasötikler, fitoöstrojenler gibi sentetik ya da doğal birçok bileşik EB olarak bilinmektedir (Diamanti-Kandarakis et al. 2009).

EB'lar farklı dokularda bulunan reseptörlerle etkileşime girerek östrojen reseptör agonist/ antagonist etki) gösterebilmesinin yanı sıra steroid hormonların biyosentezi ve metabolizma yollarında yer alan enzimlerle etkileşerek hormon seviyelerinde azalma ya da artışa sebep olarak da etkilerini gösterebilmektedir. EB bu mekanizmalar aracılığıyla istenmeyen etkilere sebep olabildiği gibi bazı hormonlarla ilişkili hastalıkların tedavisi amacı ile yeni ilaç geliştirilirken zaman zaman bu basamaklar ilaç hedefi olarak da kullanılabilir.

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasının ilk amacı endokrin bozucuların etki mekanizmalarından biri olan hormon düzeyleri üzerine etkinin belirlenebilmesi için hassas ve valide bir yöntemin laboratuvarımızda uygulanmasıdır. Bu amaçla steroid yapılı üreme hormonlarının sentezlendiği steroidojenez yolağındaki enzimler üzerine etkinin belirlenmesine olanak sağlayan H295R Steroidojenez yönteminin uygulanması ve sonlanım olarak yolakta oluşan östradiol ve testosteronun yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-tandem MS ve ELISA yöntemleri ile ölçülmesi ve yöntemlerin hassasiyetlerinin karşılaştırılması planlanmaktadır. Öncelikle hormon ölçümü amacıyla kullanılan her iki yöntemin kısmi validasyonları yapılmıştır. Sonrasında H295R Steroidojenez yönteminin OECD TG-456 test kılavuzuna uygun olarak kısmi validasyonu, LC-MS/MS yöntemi ile hormon düzeyleri belirlenerek yapılmış ve referans bileşikler kullanılarak yöntemin kalite kontrolü gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasının ikinci amacı endokrin bozucu bir etki mekanizması olarak kimyasalların hormon yapım ve metabolizmasının üzerine etki potansiyelinin belirlenmesi amacıyla kullanılan OECD TG 456 Steroidojenez

yönteminin ilaç etkin madde adaylarının gerek meme kanseri tedavisinde olduğu gibi farmasötik etkilerinin gerekse farklı amaçla geliştirilen bir etkin madde adayının olası endokrin advers etkisinin belirlenmesi amacıyla ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarının erken evrelerinde kullanılma başarısının araştırılmasıdır. Bu amaçla meme kanserinde koruyucu etkisi olduğu bilinen endojen hormon melatonin, ve iki yeni indol türevi melatonin analogu (M6 ve M20) H295R Steroidojen Deneyinde test edilmiş ve östradiol ve testosteron düzeyleri üzerine olası etkileri hormonların LC MS/MS ve ELISA yöntemiyle ölçülmesi ile araştırılmıştır. Eş zamanlı olarak yapılan MTT analiziyle maddelerin hücre canlılıkları üzerine etkileri de değerlendirilmiştir.



Genel Bilgiler

2.1. Endokrin Sistem

İnsan vücudu hücreler, dokular ve organlardan oluşmuştur. Bunlar arasında iletişimi sağlamak için karmaşık mekanizmalar vardır ve sinir sistemi ve bağışıklık sistemi ile birlikte endokrin sistem de bu iletişimi sağlayan sistemlerdir. Sinirsel iletim hızlı ve aralıklı iken endokrin sistemde iletişim daha yavaş ve yaygındır.

Endokrin sistem Şekil 1’de (Bergman et al., 2012) görüldüğü gibi çok sayıda bezden oluşur. Endokrin bezler hormon sentezleyen ve salgılayan organlardır, ürettikleri aktif bileşikler kan dolaşımı yoluyla birçok başka doku ve /veya organa taşınır ve burada uygun hücre içi ve hücreler arası iletişimi kolaylaştırmak için biyolojik etki uygular (Silverthorn, 2004). Vücuttaki gelişimsel ve üreme süreçleri için önemli olan üç hormon grubu vardır. Bunlar androjenler, östrojenler ve progestojenlerdir. Bu üç önemli hormon grubu yanısıra glukokortikoidler, gonadotropinler, mineralokortikoidler ve tiroid hormonları gibi üreme süreçlerinde rol alan diğer hormon grupları da vardır. Hormonların biyolojik bir yanıtı başlatabilmesi için, yüksek özgüllük ve yüksek affinite ile kovalan olmayan bağlanma yoluyla spesifik membran ve/veya nükleer reseptörlerle etkileşime girmeleri gerekir (Williams, 1962; Baynes, 2002).

Endokrin sistemin ana bileşenleri hipofiz bezi, tiroid ve adrenal bez ile dişilerde overler ve erkeklerde testislerdir.

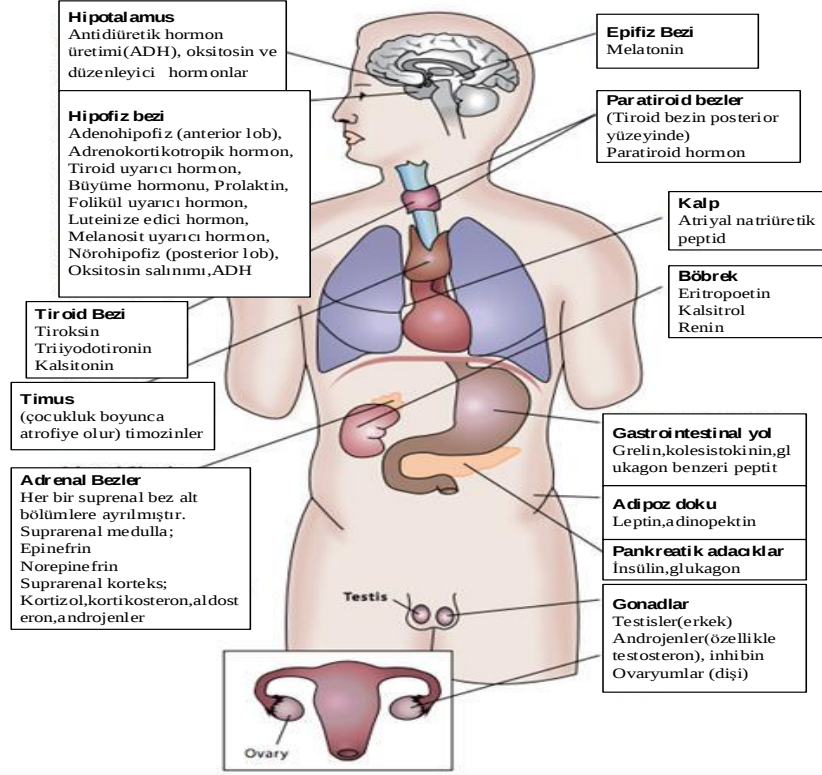
Hipofiz bezi bezelye büyüklüğünde bir yapı olmakla birlikte, beynin tabanında, kafatasının sfenoid kemiği tarafından korunduğu burun boşluğunun hemen arkasında bulunur (Ganapathy ve Tadi, 2020). İki ana bölgesi vardır: İlk kısım, hipofiz bezinin posterior (arka kısım) kısmı olup, hipotalamusun nöronları (sinir hücreleri) tarafından üretilen antidiüretik hormon (ADH) ve oksitosin adı verilen iki nöropeptid hormonun depolanmasından ve salgılanmasından sorumludur. ADH, vücutta sıvı dengesinin ve kan basıncının düzenlenmesine yardımcı olurken, oksitosinin ise en önemli görevi doğumun başlatılmasına yardımcı olmaktadır. İkinci kısım anterior bölge (ön kısım) olup, embriyonik ağız boşluğunun çatısındaki epitel dokulardan gelişir ve kafatasına doğru şişkin bir şekilde arka hipofiz ile kaynaşır. Cilt pigmentasyonunu düzenlemeye yardımcı olan melanosit uyarıcı hormon ve somatotropin (büyüme hormonu) hormonun üretiminden sorumludur. Aynı zamanda

ön hipofiz endokrin bezlerden hormon salınımını kontrol eden birkaç uyarıcı hormonu da üretir. Örneğin adrenokortikotropik hormon, adrenal korteksten kortizolün salınımını düzenler.

Tiroid, iki loblu bir organ olup gırtlığın hemen altında yer alır (Practice, 2021). Tiroid iki tip ana endokrin hücreden oluşur: Foliküler hücreler, vücudun metabolizmasını düzenleyen triiyodotironin (T3) ve tetraiyodotironin (T4) olarak bilinen hormonları üretir. Parafoliküler hücreler, kan-kalsiyum konsantrasyonunu düzenlemeye yardımcı olan kalsitonin hormonunun üretiminden sorumludur.

Adrenal bezler her iki böbreğin üst kısmına yerleşmiş, iki katmandan (korteks ve medulla) oluşan endokrin sistem bileşenleridir. Adrenal bezin ağırlığının %80-90'ını adrenal korteks oluştururken, adrenal korteks dıştan içe doğru zona glomerulosa, zona fasikulata ve zona retikularis olmak üzere 3 bölgeden oluşur. Zona glomerulosa korteks'in %15'ini oluşturur ve mineralokortikoidlerin (aldosteron) sentezlenmesini sağlayan ovoid hücrelerden oluşur (Antonini, Stecchini, and Ramalho 2019). Aldosteron, intravasküler hacim ve elektrolit dengesinin korunmasında rol oynar (Lefèvre et al., 2015; Miller and Auchus, 2011; Xing et al., 2015). Zona fasikulata, korteksin %75'ini oluşturur. Glukokortikoidleri (kortizol) sentezleyen radyal kordlar ve demetler şeklinde bulunan büyük hücrelerden oluşur. Kortizol, glikoz homeostazında ve enerji depolarının mobilizasyonunda rol alır (Lefèvre et al., 2015; Miller and Auchus, 2011; Xing et al., 2015). Zona retikularis ise medulla ile temasta olup, korteksin yaklaşık olarak %10'unu oluşturur ve androjen üretiminden sorumludur (Lefèvre et al., 2015; Miller and Auchus, 2011; Xing et al., 2015).

Overler, kadınlarda yumurta üretiminden sorumlu birincil üreme organlarıdır. Olgun overler oldukça düzensiz ve badem şeklinde olup genel olarak 3-5 cm uzunluğunda ve 5-8 g ağırlığındadır, fakat ilerleyen dönemlerde küçülme eğilimi gösterirler (Wallace and Kelsey, 2004). Overler östrojen ve progesteron hormonunun üretiminden sorumludur. Testisler, erkeklerde spermatozoa üretiminden sorumlu birincil üreme organlarıdır. Oval şekilli olup yetişkin erkeklerde tipik olarak 4,5-5,1 cm uzunluğunda ve 15-19 g ağırlığındadırlar (Silber, 2018). Testisler, erkek cinsiyet hormonu olan testosteron üretiminden sorumludurlar.

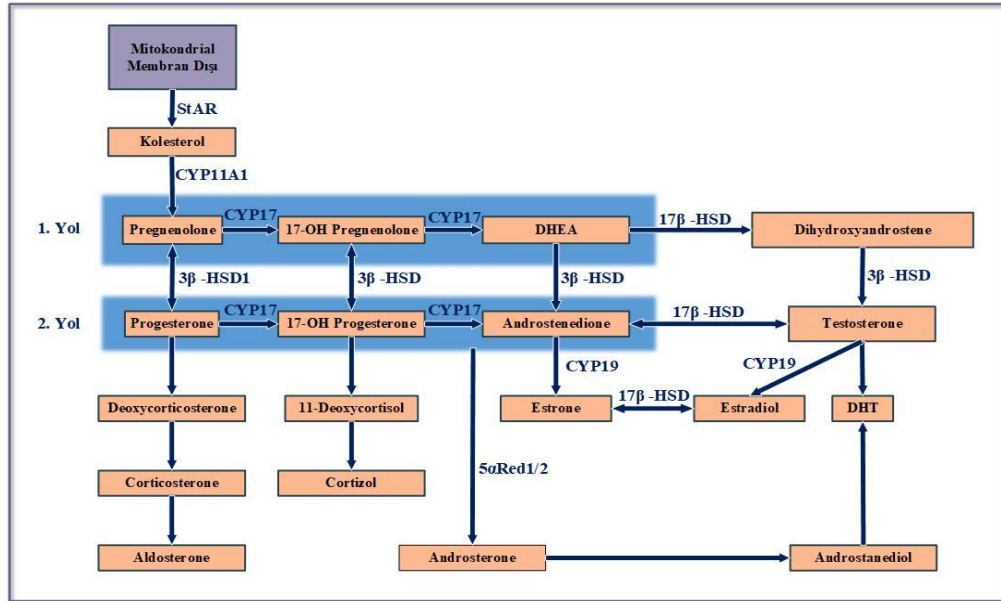


Şekil 1. İnsan vücudunda endokrin sistemin genel görünümü, organlar tarafından üretilen veya bunları etkileyen hormonlar (Bergman et al., 2012)

2.2. Steroidojenez

Hormonlar lipidler veya proteinler gibi iki kaynaktan elde edilebilirler. Lipit türevi hormonlar arasında androjenler ve östrojenler gibi steroid hormonlar yer alır (Baynes, 2002). Steroid hormonların oluşum süreci “steroidojenez” olarak adlandırılır ve diğer hormonların aksine bu süreç adrenal ve gonadlarda gerçekleşir (Miller, 2002; Soucy and Luu-The, 2000). Steroidojenik yolda Şekil 2’de gösterildiği gibi birden fazla enzim rol oynar. *De novo* steroid hormon sentezi, steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) aracılığı ile mitokondrinin iç zarına taşınması sonucu hücre içi kolesterol konsantrasyonunun artışıyla başlamaktadır. Sonrasında oluşan kolesterol sitokrom P450 11A1 (CYP11A1) tarafından pregnolona dönüştürülür. Bundan sonra iki farklı yol izlenebilir; kolesterolün CYP11A1 tarafından pregnolona dönüşümüyle başlayan ilk yol ve pregnelonun 3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz (3 β -HSD) ile progesterona dönüşümü sonucu progesteronla başlayan ikinci yoldur. Memeli türleri arasında steroidojenez için tercih edilen yolda farklılıklar olabilir (Lee-Robichaud et al., 1995; Scott et al.,

2009). İnsan vücudunda pregnenolon ile başlayan yol adrenal steroidojenez için baskın yol olmasına rağmen progesteron ile başlayan yol tercih edilen testiküler steroidojenik yoldur (Sanderson, 2006; Vihko and Ruokonen, 1974). CYP17'nin iki yolda etkisiyle pregnenolon ve progesteron sırasıyla 17 hidroksipregnenolona (17-OH-pregnenolone) ve 17 hidroksiprogesterona ve ardından da sırasıyla dihidroepiandrosterone (DHEA) ve androstenediona dönüştürülür. Adrenalden DHEA sistemik dolaşıma salınır, yumurtalıklar ve testisler gibi periferik dokulara taşınır. Buradan da sırasıyla 3 β -HSD veya 17 β -HSD aracılığıyla androstenedione veya dihidroksandrostene'e dönüştürülür. Sonuç olarak bu prekürsörler erkek cinsiyet hormonu testosterona (T) dönüştürülür. Bu adımdan sonra ağırlıklı olarak yumurtalıklarda ve diğer dokularda androjenlerin aromataz enzimi aracılığı ile östrojenlere dönüşümü olan kadın cinsiyet hormonu üretimindeki son adım gerçekleşir.



Şekil 2. Steroidojenez yolağındaki enzimler

2.2.1. Steroidojenez Yolağındaki Önemli Enzimler

2.2.1.1. CYP17 Enzimi

P450 17 (CYP17) ya da 17 hidroksilaz/17,20-liyaz olarak da bilinen enzim steroidojenik yolakta DHEA üretiminden sorumludur. DHEA ve onun sülfatlanmış formu olan DHEA-S, adrenarştan başlayarak insan vücudunda dolaşımda en çok bulunan endojen androjen ve östrojen öncülleri olduğundan bu durum CYP17 enzimini steroidojenez yolağında önemli kılmaktadır. (Auchus, 2004; Kroboth et al., 1999). CYP17 enzimi seks steroid biyosentezinin kontrolünün yanı sıra kortikoid biyosentezinin kontrolünde de anahtar bir enzimdir.(Soucy and Luu-The 2000) Genetik olarak CYP17 eksikliğinde vücutta yüksek seviyelerde glukokortikoid ve mineralokortikoidlerin bulunmasına yol açabilir. Tam tersi durumda artan CYP17 enzim aktivitesi ise fazla miktarda DHEA üretimine neden olur. Polikistik over sendromunda olduğu gibi dolaşımda androjen miktarının artışına ve sonuç olarak da dışının erkekleşmesine yol açar (Miller 2002; Wickenheisser et al. 2000). Steroidojenik dokularda CYP17 geninin ekspresyonu olabilir ancak CYP17 aktivitesinin yanı sıra DHEA üretiminde serebral kortekste ölçülmüştür (Psc, 1986; Zwain and Yen, 1999).

2.2.1.2. CYP 19 Enzimi

Sitokrom P450 enzim ailesinin bir üyesi olan CYP19 aynı zamanda “aromataz” enzimi olarak da bilinir. Androjenlerin steroid halkasının aromatisasyonu ile östrojen oluşumunu sağlar ve bundan dolayı “östrojen sentetaz” olarak da adlandırılır (Simpson, 2002). Androjenler ve östrojenler arasındaki oranı belirler ve bu nedenle cinsel gelişimde anahtar rol oynar. CYP19A1 geni sadece endokrin bezlerde değil, bunun yanı sıra adipoz doku, plasenta ve beyin gibi dokularda da mevcuttur (Simpson, 2002). CYP19 enzim ekspresyonu türe, dokuya ve promotora göre değişiklik göstermektedir (Simpson, 2004; Simpson et al., 2002). Farklı CYP19 promotorlarının kullanımı, farklı sinyal transdüksiyon yollarıyla bağlantılı olup sağlıklı ve tümörojenik dokular arasında da farklılıklar göstermektedir (Kamat et al., 2002). Enzim kompleksi iki elementten oluşur; biri CYP450 monooksijenaz ve diğeri onun redoks ortağı NADPH CYP450 redüktazdır (Amarneh et al., 1993; Sanderson, 2006). CYP19 aktivitesinin artması, östrojene bağımlı meme tümörleri geliştirme

riskine neden olan yüksek östrojen seviyelerine sebep olur. Tam tersi durumda ise azalan CYP19 aktivitesi premenopozal kadınlarda adet döngüsünü bozabilecek ve postmenopozal kadınlarda ise artmış kemik demineralizasyonuna yol açabilecek düşük östrojen seviyelerine yol açar.

2.2.2. Cinsiyet Hormonları

İnsan yaşamında çeşitli aşamalarda belirli organlar ve ürettikleri hormonlar, gelişimi sağlamada ve/veya işleyişi sürdürmede önemli bir rol oynar. Steroidojenez sonucunda üretilen progesteron, T ve E2 cinsel gelişim ve işleyiş için çok önemlidir (Silverthorn, 2004). Bu kadar önemli role sahip olmaları nedeniyle üreme gelişim aşamalarının bölümlerini kapsayan hem *in vitro* toksikolojik analizlerde hem de *in vivo* üreme toksisite çalışmalarında en çok ölçülen hormonlardır (Hecker et al., 2006). Progesteron üretimi sadece kadınlarda mevcut değildir ancak genellikle seks steroidi olarak kabul edilir. Progesteron yumurtalıklar tarafından üretilmesinin yanı sıra corpus luteum tarafından da üretilir ve adet döngüsünün düzenlenmesinde rol oynar (King and Brucker, 2010; Silverthorn, 2004). Erkek cinsiyet hormonu olan T, erkeklerde cinsel gelişim ve cinsel işlevler için gerekli olan bir hormondur (Silverthorn, 2004). T yetişkin erkeklerde canlı spermatidlerin üretimi gibi spermatogenez sürecinde ana belirleyici olarak önemli bir rol oynar. T leydig hücrelerinin LH tarafından uyarılması sonucu oluşur. Sertoli hücrelerine salınmasından sonra nükleer androjen reseptörüne bağlanıp aktive ederek spermatogenezin ilerlemesini sağlamış olur.

Östradiol (E2), kadın vücudundaki üreme süreçleri için önemli bir role sahip olması açısından erkek seks steroidi olan Tun dişilerdeki karşılığıdır. Dişi üreme organlarının gelişimini düzenlemesinin yanı sıra dişilerde adet döngüsünün sağlanması ve buna bağlı olarak doğurganlık açısından çok önemlidir (Silverthorn, 2004). Gelişim esnasında, östrojenler plasentada yer alan aktif aromataz enzimleri tarafından fazla miktarda üretilir (Katinka et al., 2004; Ishimoto and Jaffe, 2011; Kroboth et al., 1999). Bu üç hormona ek olarak CYP17 enzim aktivitesi sonucu oluşan hormon olan DHEA, cinsel gelişim ve hormonal homeostazın sürdürülmesi gibi çok önemli role sahiptir. Bunun başlıca sebebi periferdeki hedef dokulardaki aktif steroidlerin sentezi ve etkileridir (Kühn-Velten, 2000; Labrie et al., 2001). Hem erkeklerde hem de kadınlarda androjenler ve östrojenler öncüsü olarak hareket ettiği

için anahtar bir rol oynar (Labrie, 2010). Özellikle plasenta ve fetal testislerdeki maskulizasyon programlama penceresi boyunca, T ve E2 prekürsörü olarak DHEA önemlidir (Katinka et al., 2004; Ishimoto and Jaffe, 2011; Kroboth et al., 1999; Scott et al., 2009).

2.2.3. Hormon Reseptörleri

Hedef hücreleri yardımıyla eksprese edilen membran ve/veya nükleer hormon reseptörlerinin aktivasyonu aracılığıyla hormonlar etkilerini gösterirler. Hormonun kendine uygun liganda bağlanmasıyla reseptör proteini aktive olur ve sinyal iletimi başlar. Vücutta başlayan bu biyokimyasal tepki hormonun hücresel etki mekanizması olarak tanımlanır (Silverthorn 2004). Her hormana ait spesifik bir reseptör vardır. Erkeklerde ana hormon reseptörü androjen reseptörü (AR) iken kadında östrojen reseptörü (ER)'dür. Ek olarak diğer reseptörler ise; glukokortikod reseptörü (GR), mineralokortikoid reseptörleri (MR), gonadotropinlerde FSH ve LH reseptörleri ve tirod reseptörü (TR)'dür. Bunun yanı sıra birkaç hormon sadece kendi spesifik reseptörlerine bağlanmakla kalmayıp bunun yanı sıra diğer hormon reseptörlerini de aktive edebilir. Buna en iyi örneklerden biri çoğunlukla diğer hormonlara olan yapısal benzerliğiyle AR ve GR'e (zayıf olarak) bağlanan progesterondur (Bovee et al., 2007, 2011). Her hormonun farklı reseptörler için sahip olduğu bağlanma affinitesi o hormonun reseptöre bağlanmasının ardından gelen etkinin boyutunu tanımlar. Tez çalışmamız kapsamında E2 ve T düzeyleri incelendiğinden androjen ve östrojen reseptörlerini inceleyecek olursak.

2.2.3.1. Östrojen Reseptörü (ER)

ER'ler ligandla düzenlenen transkripsiyonel süper ailesine aittir. ER birden fazla alt tipe sahiptir: ER α , ER β ve ER γ . ER α tanımlanan ilk reseptör olmasına ek olarak meme kanserinin tanı ve tedavisinde belirteç olarak kullanılır (Katinka et al., 2004; Green et al., 1986). ER β 1990'ların ortasında bulunmuştur (Mosselman et al., 1996) ve meme kanseri ile olan ilişkisi de dahil olmak üzere hakkında daha az bilgiye sahip olunan alt tiptir. Her iki ER'de epididimis, tiroid, adrenal, kemik ve beyin belirli bölgeleri gibi farklı dokularda eksprese edilir (Matthews and Gustafsson, 2003). ER α uterus, karaciğer, böbrek ve kalpte baskınken, ER β yumurtalıklar, prostat, akciğer, gastrointestinal sistem, mesane, hematopoietik ve merkezi sinir sisteminde baskın olarak bulunur (Eyster, 2016). Birçok organ ve sistemin gelişimine işlevinin

düzenlenmesinde östrojen sinyali kritik bir öneme sahiptir. Bu sebeple östrojen sinyalinde oluşan anomaliler sadece meme, endometriyal ve yumurtalık kanserleri gibi hormon-bağımlı kanser türleriyle alakalı olmayıp, osteoporoz, depresyon ve yeme bozuklukları benzeri hastalıklarla da ilişkili olduğu bildirilmektedir (Nilsson et al., 2001).

2.2.3.2. Androjen Reseptör (AR)

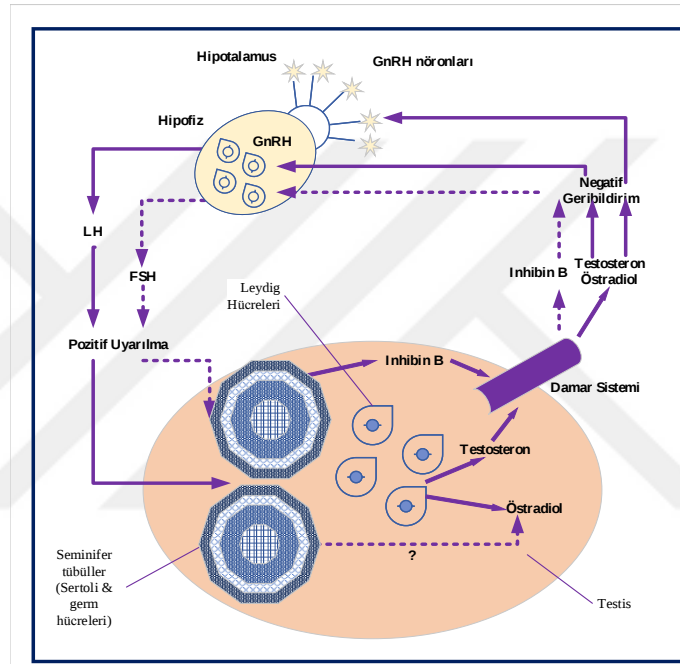
AR sertoli hücrelerinde spermatogenezin devamını sağlayan nükleer bir reseptördür (Wang et al., 2009). AR, sitoplazmada T ve DHT gibi bir androjenin bağlanmasıyla aktive edilebilir. AR aktivasyon sonrası sitoplazmadan çekirdeğe gider. İlk AR yanıt saniyeler içinde gerçekleşerek birkaç saat içinde pik seviyeye ulaşır (Pihlajamaa et al., 2015). AR'in alt tipine bağlı olarak meme kanserindeki rolü değişir. Yapılan birkaç çalışmada ER α pozitif meme kanserine sahip hastalarda artmış AR ekspresyonu belirlenmiştir ve muhtemelen AR aracılı proliferasyon inhibisyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Peters et al., 2009; Wang and Yang, 2015).

2.3. Hormonal Kontrol

2.3.1. Üreme Eksenleri

“Üreme eksenii” ya da “üreme aksı” olarak adlandırılan üremeyi düzenleyen yollar beyin tarafından düzenlenir. Hormon üretimi hipotalamustan ve ön hipofizden trofik hormonların salgılanmasıyla başlar. Adrenal ve gonadal seks steroidlerinin salgılanmasına neden olan kısım ise adenohipofizdir. Bu eksenler daha spesifik olarak hipotalamik-pituiter-adrenal (HPA) ve hipotalamik-pituiter-gonadal (HPG) eksen olarak adlandırılır (Şekil 3). Androjen ve östrojen üretimi her iki cinsiyette de benzer yollarla olur. Erkeklerde baskın olan androjen üretimi kadınlar da östrojenlerdir (Silverthorn, 2004). Hipotalamus, hipofiz tarafından folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinizan hormonun (LH) salgılanmasına yol açan gonodotropin hormonunun (GnRH) üretimini sağlar. Gonodotropinler sırasıyla adrenaller ve gonadlar üzerine trofik olarak etki oluşturur. LH seks steroidlerini oluşturmak amacıyla endokrin hücreleri ve adrenal bezleri uyarır (Nishii et al., 2012; Rao et al., 2004). FSH seks steroidlerinin üretiminde rol oynamanın yanı sıra gametogenezin başlamasında ve sürdürülmesinde de rol oynar. Ovaryum ve testis FSH salgılanması üzerine aktivasyon ya da inhibisyonuna doğrudan neden olan peptid yapılı aktivinleri

ve inhibinleri salgılar. Ayrıca aktivinler, spermatogenez, oosit olgunlaşması ve ayrıca embriyonik sinir sisteminin gelişiminde uyarır. Aktivinler ve inhibinlerin ekstra üretildiği yerler adrenaller benzeri nongonadal dokulardır (Silverthorn 2004; Hofland and de Jong, 2012; Vanttinen et al., 2003). Peptid hormonlar ve seks steroid seviyeleri hipofizden FSH ve LH salgılanmasını hemde hipotalamik GnRH salgılamasını etkiler. Hormonal denge, organizmada homeostazı sağlamak için uygun geribildirim (feedback) mekanizmalarıyla kontrol edilir.

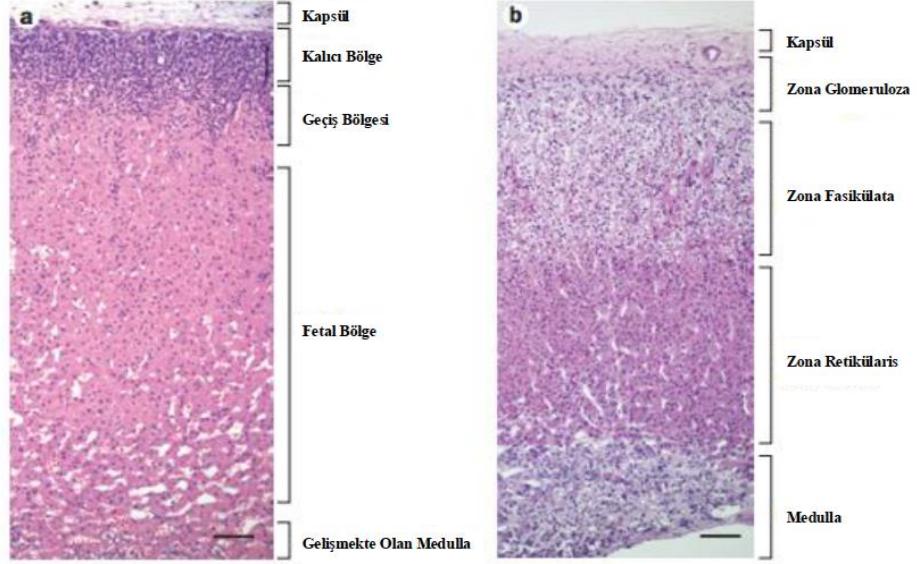


Şekil 3. Hipotalamik-pituiter-gonadal (HPG) eksenin gösterilmesi

2.3.2. Adrenal Bez

Şekil 4’te gösterildiği gibi adrenal bez dışta korteks iç kısımda medulla olmak üzere fonksiyonel iki ana bölümden oluşur. Yetişkin adrenal korteks üç farklı zonal kısımdan oluşur; en dışta zona glomerulosa, ortada zona fasikulata içte zona retikularis. Üç tabakalı korteksde hormonlar üretilir. Her zonal bölgede farklı hormonlar oluşur ve Şekil 2 de gösterilen steroidojenik yol, tüm bu spesifik hormon tiplerinin oluşumunun temelidir. Zona glomerulosada mineralokortikoidlerden aldosteron sentezlenir. Mineralokortikoidler, kan basıncıda dâhil olmak üzere tuz ve su dengesinin kontrolünden sorumludur. Zona fasikülata, glukojenezde yer alan

kortizol başta olmak üzere glukokortikoidlerin temel üreticisi olarak görev görür. Zona retikülaris, androstenedion ve DHEA hormonlarının sentezlendiği yerdir. Fötusta ise steroidojenezin gerçekleştiği ayrı bir fetal zon yer alır (Monticone et al., 2012).



Şekil 4. Fötus (a) ve yetişkin (b) insana ait korteksin farklı zonal bölgelerini gösteren adrenal bezin histolojik yapısı (Monticone et al., 2012)

2.4. Endokrin Fonksiyonun Değişimi

2.4.1. Endokrin Toksikoloji ve Hormonların Rolü

Hormon seviyeleri vücutta homeostazda kalabilmek için vücut tarafından izlenmekte ve düzenlenmektedir. Hormon aktivitesi azaltılması gerektiğinde bunun sağlanması için feedback mekanizmaları uyarılır. Hormonlar oldukça etkili moleküllerdir ve 10^{-9} nanomolar ile 10^{-12} pikomolar aralığında etki gösterme yeteneğine sahiptir (Silverthorn 2004). Hormonların klasik toksikolojik bir şekilde yanıt vermesi gerekli değildir. Burada kural olarak, belirli bir bileşiğin maruziyet seviyesi ne kadar yüksek olursa beklenecek advers etki de daha fazla olacaktır. Bu endojen bileşikler eşik değere ulaşırsa ya da bu eşik değer aşılsa tanımlanamayan etkiler oluşabilir. Paracelsus'un dediği gibi ‘‘Her madde zehirdir, zehirle ilacı birbirinden ayıran

dozudur.” Fakat hormonlar söz konusu olduğunda bu durum tamamen geçerli değildir. Burada beklenilecek etkinin doğası için hormonun seviyesi önem arz eder. Daha yüksek seviyeler mutlaka daha fazla advers etki anlamına gelmemekle birlikte bazı durumlarda daha düşük doz seviyelerinde normalde görüldenden daha farklı etkiler anlamına da gelir. Diğer taraftan düşük seviyeler ise daima daha az etki veya etkisizliğe yol açmaz. Bu olağanüstü duruma hormesiz denir. Toksikoloji alanında, bir toksinin düşük dozu sitimüle edici etkiye neden olabileceği anlamına gelirken yüksek bir doz genellikle bifazik doz-yanıt ile karakterize olan inhibe edici etkiyi sağlar (Lee and Jacobs, 2015). Ayrıca doz-yanıt ilişkisinin gösterildiği U ve J şekilli eğriler mevcuttur (Lee and Jacobs, 2015). Hormesiz, non-monotonik (tek düze olmayan) bir doz-yanıt ilişkisinin özel bir şeklidir (Lee and Jacobs, 2015). Açıklamanın başka yolu da, hem daha düşük hem de daha yüksek hormon seviyelerinin toksisiteye neden olabileceği bununda non-monotonic yanıtlara neden olabileceği anlamına gelir. Bir bileşiğin dozunun yanı sıra, hormon konsantrasyonlarındaki değişim zamanı da advers etkiler için önem taşımaktadır. Ergenlik döneminde hormon seviyelerinin ritmi cinsiyet organlarının normal fonksiyonu ve daha fazla gelişimini sağlar. Hormonal seviyelerdeki değişiklikler kardiyovasküler hastalıklar, maligniteler ve metabolik bozukluklar gibi çeşitli advers etkilere neden olabilir (Ikeda et al., 2012; Williams and Lin, 2013).

2.4.2. Endokrin Bozucular (EB)

Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı (IPCS), Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından oluşturulan ortak görüşe göre endokrin bozucular “endokrin sistemin işlev(ler)ini değiştiren ve sonuç olarak sağlam bir organizmada ve/veya onun gelecek nesillerinde veya (alt) popülasyonlarında advers sağlık etkilerine neden olan madde veya karışımlar” olarak tanımlanmaktadır (Damstra et al., 2002). B plastikleştiriciler, farmasötikler, pestisitler ve fitoöstrojenler gibi maddelerin oluşturduğu uzun bir listeden oluşmasının yanı sıra bu listeye her gün yeni bazı kimyasallar da girmektedir. Potensiyel EB’a günlük yaşantımızda sıklıkla maruz kalabilmekteyiz. İnsan vücudundaki birden fazla organda ve ayrıca kanda EB’ın ölçülebilir seviyeleri bulunabilir (Jensen and Leffers 2008; Law et al. 2006). EB’lar birkaç mekanizmayla hareket edebilir. Yapılan birkaç çalışma EB’ların *in vitro* ve *in vivo* steroidojenezi

etkileyebildiğini göstermiştir (Cantón et al., 2005; Kitamura et al., 2005; Van der Ven et al., 2008). EB'ların etki mekanizmaları;

- Hormon reseptörleriyle etkileşerek, (agonistik/antagonist etki)
- Hormon yapım-yıkımını bozarak,
- Steroidojenik enzimleri doğrudan katalitik etkileşim yoluyla indükleyerek ya da inhibe ederek,
- Hormon reseptör ekspresyonunu üzerine etki ederek,

gösterebilirler. Bu sebepten, endokrin toksik maddeler olarak rol alan bu maddelerin risk değerlendirmesi son derece önemlidir.

2.5. Endokrin Bozucuların Tayin Yöntemleri

2.5.1. *In Vitro* Analizler

Son on yıldan fazla uzun zamanda toksisite test stratejilerinde hayvanların kullanımı birçok tartışmaya neden olmuş ve kimyasal maddelerin toksisite taramaları için alternatif modellerin geliştirilmesi üzerinde yoğun olarak çalışılmıştır. REACH mevzuatı, her kimyasal bileşiğin taranması için çok sayıda hayvan gerektiğinden yüksek öngörme kapasitesi ve tekrarlanabilirliğe sahip hızlı *in vitro* testleri talep etmiştir (European Commission, 2014). Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD)'nin yapmış olduğu çok sayıda çalışmadan oluşan verilerine göre üreme ve gelişimsel test, iki nesil üreme çalışması da dâhil olmak üzere en çok hayvan toksisite testlerinin kullanıldığı görülmektedir (Katinka et al., 2004; Hojo et al., 2006). Potansiyel EB'ların artan listesi göz önünde bulundurulduğunda alternatif *in vitro* tarama testlerine daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. *In vitro* analizlerin geliştirilmesi birçok araştırma grubu tarafından desteklenirken bazı hükümet organları tarafından bu analizlerin geliştirilmesi tepkilere neden olmuştur. Örneğin Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) 2018 yılından bu yana devam eden Endokrin Bozucu Tarama Programını (EDSP)'ni başlatmıştır (EPA, 2011b). EB tarama analizlerinin geliştirilmesinde çok ilerleme kaydedilmiş olmasına rağmen halen bu analizlerin standardizasyonu ve doğrulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

2.5.1.1. H295R Steroidojenez Assay

İnsan adrenokortikokarsinom hücre hattı (H295R), kimyasalların steroidojenez üzerindeki etkilerinin araştırılmasında sıklıkla kullanılan bir hücre hattıdır (Hecker et al., 2011; Sanderson et al., 2000).

OECD kılavuzlarına göre valide edilen bu testin ana endpointleri E2, progesteron ve T seviyelerinin ölçümleridir. Ayrıca, bu test enzim aktivitesi üzerindeki etkilerin ve steroidojenik enzimlerin gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesine olanak sağlar. CYP19 aktivitesi ve/veya gen ekspresyonu değerlendirilirken, tümorojenik dokuya karşılık olarak sağlıklı olanlarda CYP19 ekspresyonunun farklı promotör bölgelerde daha önce geldiği göz önünde bulundurulmalıdır. CYP19 aktivitesinin inhibisyonuna spesifik, insan plasental mikrozomları (HPM) adı verilen ek bir test mevcuttur. Bu test EPA'nın Tier 1 EDSP testine de dâhildir. Son zamanlarda, bu steroidojenik H295R hücre hattı üzerindeki etkiler, tam bir steroid profilinin değerlendirilmesine olanak sağlanmıştır (Rijk et al., 2012; Rosenmai et al., 2014). H295R hücre hattı, yetişkin dişi adrenalinden orijin alır fakat zonal olarak farklılaşmamış insan fetal adrenal hücrelerinin fizyolojik özelliklerini gösterir (Hecker et al., 2006). H295R hücreleri aynı zamanda yetişkin adrenokortikal steroid hormonları üretme yeteneğine de sahip olduğu gösterilmiştir (Hecker et al., 2006). H295R steroidojenez testi EDSP ve OECD sistemleri tarafından valide edilmiştir (Hecker et al., 2006). Geçtiğimiz yıllarda birçok araştırma grubu tarafından H295R steroidojenez testi kullanılmıştır ve halen kimyasalların steroidojenez üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi açısından altın bir standart olarak kabul görmektedir (Rijk et al., 2012; Rosenmai et al., 2014; Sanderson et al., 2002; Wang et al., 2014).

2.5.1.2. Hormon Reseptör Bağlama Deneyleri

Androjen (AR), östrojen (ER), glukokortikoid (GR), mineralokortikoid (MR), progesteron (PR) ve tiroid hormonu (TR) reseptörleri gibi birkaç hormon reseptörü için spesifik *in vitro* reseptör transaktivasyon analizleri mevcuttur. Ayrıca, *in vivo* Hersberger analizi androjen benzeri etkileri değerlendirmek için, androjen-aktif bileşiklere maruz kalan olgunlaşmamış veya kısırlaştırılmış sıçanların AR'e bağlı dokularında ağırlık değişiklikleri etkisine dayanan testtir (Owens et al., 2006). Bununla birlikte, lusiferaz bazlı hücre deneylerinin yanı sıra floresan maya raportör biyoassayler gibi bir çok *in vitro* alternatifler geliştirilmiştir (Ahn et al., 2008; Bovee

et al., 2007, 2011). Lusiferaz analizleri, ateşböceğinin lusiferaz raportör geni ile birleştirilmiş bir hormona duyarlı faktör ile trasfekte edilmiş hücrelerden oluşur ve örneğin AR veya ER üzerindeki etkilerin tespiti için çeşitli varyantları da mevcuttur (Ahn et al., 2008). Maya bazlı analizler bir raportör ile birleşiminde seçilen hormon reseptörünü dengeli bir şekilde belli eden rekombinant mayalardan oluşur. Reseptörün ilgili hormona maruz kalması gerçekleşince yeşil floresan protein ile zenginleştirilmiş maya raportör protein olarak açığa çıkar (Bovee et al., 2007, 2011). Günümüzde, her iki analiz türü EB'ların hormon reseptörlerini aktive edebilme şeklinin arkasında yatan etki mekanizmasını daha iyi anlamak için sıklıkla kullanılmaktadır ve böylece hormon reseptörü üzerindeki agonistik ve antagonistik etki değerlendirilebilmektedir.

2.5.2. In Vivo Yöntemler

Ütotrofik analiz ve Hershberger analizi endokrin bozucuların taranmasında kullanılan ve referans yöntem olarak kabul edilen *in vivo* yöntemlerdir.

2.5.2.1. Hershberger Analizi

Hershberger analizi, androjenik ve antiandrojenik aktiviteye sahip maddeleri tanımlamayı amaçlayan bir tarama testidir. Androjen agonisti, antagonist ve 5 α -redüktaz inhibitörlerini belirlemek için mekanistik bir *in vivo* test olarak kullanılmaktadır (EPA, 2011a). Bu analiz, kısırlaştırılmış puberta öncesi dönemdeki erkek kemiricilerdeki beş androjen bağımlı dokunun ağırlığında oluşan değişimin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu androjen bağımlı dokuları, ventral prostat, seminal, levator ani-bulbokavernoz kası, Cowper bezi ve glans penisten oluşur. Potansiyel androjenik aktivite taranmasında test maddeleri en az iki veya daha fazla dozda oral gavaj veya deri altı olarak 10 gün süreyle hayvanlara enjekte edilir. Hayvanlara son dozun uygulanmasından 24 saat sonra nekropsi yapılmaktadır. Kullanılan çözücü kontrol grubu ile test maddeleri grubunun karşılaştırılmasında iki veya daha fazla hedef organın ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşuyor olması test maddelerinin potansiyel androjenik aktivite için, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşuyor olması ise test maddelerinin potansiyel antiandrojenik aktivite için pozitif sonuç verdiği anlamına gelmektedir (EPA, 2011a).

2.5.2.2. Ütorotrofik Analiz

Ütorotrofik analiz, bir test kimyasalının östrojen agonistleri (örn., 17 β -estradiol) ile tutarlı biyolojik aktivite oluşturma yeteneğini değerlendiren bir *in vivo* tarama testidir (U S Environmental Protection Agency, 2011).

Bu testte endojen östrojen seviyesi düşük olan (ovaryumları alınmış veya olgunlaşmamış) dişi kemiriciler kullanılmaktadır (Reel et al., 1996). Kimyasal maddenin, 17 β -östradiol gibi doğal östrojenlerin biyolojik aktivitesine benzer etki oluşturma yeteneğini değerlendirmektedir (U S Environmental Protection Agency 2011). Östrojenik aktivitenin değerlendirilmesinde östrojenik uyarım ile uterus ağırlığındaki artış gösterge olarak kullanılmaktadır (Reel et al. 1996). Analizde kullanılacak her gruba bir doz test maddesi uygulanacak şekilde en az iki gruptan oluşan deney hayvanı kullanılmaktadır. Test maddeleri, tercihen deri altı enjeksiyonla alternatif olarak da oral gavaj yoluyla günlük olarak uygulanmaktadır (U S Environmental Protection Agency, 2011). Çoğu oluşturulan protokolda test maddesi hayvanlara günlük olmak üzere üç veya dört gün süreyle uygulanmaktadır (Reel et al. 1996; U S Environmental Protection Agency 2011). Son uygulamanın yapılmasından 24 saat sonrası, hayvanlar nekropsiyle uterusları çıkartılmakta, yaş/kuru ağırlığı ölçülmekte ve uterus ağırlığındaki artış kontrol grubu ile karşılaştırılması yapılır. Böylelikle maddenin olası östrojenik potansiyeli belirlenebilmektedir (Reel et al., 1996; U S Environmental Protection Agency, 2011).

2.6. Melatonin ve Analoglarının Meme Kanserinde Olası Antiöstrojenik Etkileri

EB kimyasallar reseptör düzeyinde etkileşerek östrojen reseptör agonisti ya da antagonisti etki aracılığı ile endokrin bozucu etki gösterebildikleri gibi, steroid hormonların biyosentezi ve metabolizması ile etkileşip fizyolojik hormon düzeylerinin azalmasına/artmasına neden olarak da etkilerini gösterebilirler (Charles 2004; Whitehead and Rice 2006). Bu iki mekanizma meme kanserinin oluşum mekanizmalarından olup bu mekanizmalardan yararlanılarak meme kanseri gibi hormon bağımlı kanserlerin tedavisinde de yararlanılmaktadır. Farklı dokulardaki farklı östrojen reseptörleri ile etkileşerek etki gösteren bileşikler SERM olarak adlandırılırken etkilerini lokal östrojen sentezini ya da metabolizmasını değiştirerek gösteren bileşikler ise SEEM olarak adlandırılmaktadır (Basly and Lavier, 2005).

2.6.1. Selektif Östrojen Reseptör Modölatörleri (SERM)

Östrojen reseptör sisteminin ve hücre içi östrojen reseptörleri ile doğrudan etkileşime giren bileşiklerin anlaşılması için birçok çalışma yapılmıştır (McDonnell, 1998). Önceleri bu bileşikler basitçe östrojen agonistleri veya antagonistleri olarak sınıflandırılmıştır. Yapılan klinik öncesi ve klinik çalışmaların bazıları, bu sınıflandırmayı yeniden yapmak ve seçici östrojen reseptör modölatörleri (SERM'ler) olarak adlandırılan yeni bir bileşik sınıfını tanıtmayı sağlamıştır (Buelke-Sam, Bryant, and Francis, 1998). SERM'ler çeşitli östrojen hedef dokuları üzerinde seçici agonist veya antagonist etkiler gösterir. Östrojenlerin steroid yapısından yoksun olmalarına rağmen östrojen reseptörüne bağlanmalarına izin veren üçüncül bir yapıya sahip olan çeşitli kimyasal bileşiklerdir. Bu ilaç sınıfında bulunanların bazıları uzun zamandır var olmasına rağmen, insanlarda dokuya özgüllükleri ancak son zamanlarda fark edilmiştir. Genistein gibi bazı fitoöstrojenlerin de SERM benzeri özelliklere sahip olduğu görülmektedir (Goldstein et al., 2000).

SERM'ler, birbirleriyle ilişkili olan üç farklı etki mekanizmasına sahiptir ; (Riggs and Hartmann, 2003).

- Hedef dokudaki ER ekspresyonundaki farklılık,
- Ligandın bağlanması noktasında ER konformasyonundaki farklılık,
- Koregölatör proteinlerin ekspresyonu ve ER'ne bağlanmasındaki farklılık.

ER'ler, bir dizi amino asitten oluşan ligand bağlanma alanları içerir, meme ve uterus gibi üreme dokularında östrojenin etkisine aracılık eden genlerin aktivasyonu için bu ligand bağlanma alanları temel rol oynadığı belirtilmektedir (Beardsworth and Purdie, 1998). SERM'ler bu ligand bağlanma alanlarını inhibe ederek transkripsiyonun kısmen inaktif olmasına ve böylece tümör hücresi oranının azalmasına neden olmaktadır (Robertson, 2002).

SERM'ler post menopozal dönemde sıklıkla rastlanan, östrojen yetersizliği ile oluşan osteoporoz gibi hastalıkların tedavisinde veya bu hastalıklardan korunma amacıyla kullanılabilir (Riggs and Hartmann, 2003). Ayrıca, selektif östrojen antagonist yaklaşımları nedeniyle meme kanseri gibi verildiği dokuda östrojen agonist aktivitenin istenmediği hastalıklardan korunmak ve tedavisi amacıyla da kullanılabilirler (Riggs and Hartmann, 2003).

2.6.2. Selektif Östrojen Enzim Modülasyonu (SEEM)

Menopoz öncesi kadınlarda östrojen sentezi başlıca overlerde gerçekleşirken menopoz sonrasında periferik dokularda (yağ, kas, ya da tümör dokusunda) androjenlerin enzimatik yolla östrojenlere dönüştürülmesi ile üretilirler (Miller 1990). Bu enzimatik yolda CYP19A (aromataz) enzimi androjenlerin (testosteron ve androstendion) östrojenlere dönüşümünü katalize etmektedir. Östrojenler steroidojenez yolağında oluşan son basamak üründür. Bu yolaktaki herhangi bir basamakta oluşan inhibisyon östrojen düzeyinin azalmasına neden olmaktadır. Özellikle steroidojenezde son basamağın spesifik olarak inhibe edilmesi östrojen düzeylerinin baskılanmasına neden olmaktadır (C. Jordan ve Furr, 2006). Aromataz enzimi östrojen sentezinde büyük öneme sahip olduğu için bu enzimi inhibe eden ajanların araştırılmasına ve bunların hormon bağımlı olan tümörlerde kullanımının artmasına neden olmuştur.

2.7. Melatonin

Melatonin (MLT), indol halkası taşıyan ve pineal bezden salgılanan bir hormon olarak bilinmektedir. Melatonin sentezi pineal bez dışında retina, timüs, kemik iliği, deri ve gastrointestinal kanalda da gerçekleşmektedir.

Melatoninin başlıca etkisi fizyolojik olarak sirkadyen ritmin düzenlenmesi (Reiter, 1993), diğeri ise başta meme kanseri olmak üzere farklı tümör tiplerinde onkostatik etkisidir. (Cos et al., 2008; Sánchez-Barceló et al., 2005)

Literatüre göre melatoninin meme kanseri üzerine etkisi farklı olası mekanizmalarla açıklanmıştır (Sánchez et al., 2005; Fraschini et al., 1998; Karbownik et al., 2001; Leon- Blanco et al., 2003; D. Mediavilla et al., 2010; Reiter, 1980).

- Nöro endokrin- reproduktif eksen ile etkileşime girerek tümörün büyümesinde yer alan bazı hormonların sentezinin azalmasıyla,
- Melatoninin antioksidan etkilerinin bir sonucu olarak,
- Epitelial meme kanseri hücrelerinde oluşturduğu antiöstrojenik etkinin sonucu olarak,
- İmmün savunmayı güçlendirici etkisiyle,
- Tümör hücresinde telomerez aktivitesini inhibe etmesiyle,
- Sirkadiyen ritmin düzenlenmesiyle,

- Metastazı önleyerek.

Bu tez kapsamında melatoninin yukarıda sayılan mekanizmalardan yalnızca östrojen sinyal yolağındaki etkileri üzerinde durulacaktır. Östrojen sinyal yolağındaki etkisi üç farklı yolla olmaktadır. Bunlar, östrojenlerin gonadal sentezinin modülasyonu, Selektif östrojen reseptör modölatörü (SERM) ve Selektif östrojen modülasyonu (SEEM) dur.

Daha önceden grubumuz tarafından melatonin analogu olan 2-metil indol (M) bileşiklerinden, 2-Metil-H-indol-3-karboksialdehit(4-Klorofenil) hidrazon (*M6*) ve 2 Metilindol-3-karboksialdehit fenil hidrazon (*M20*) bileşiklerinin antioksidan etkileri, ER antagonist etkisi, araştırılmış, M6nın güçlü aromataz inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur (Gurer-Orhan et al., 2016).

Gereç ve Yöntem

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal maddeler Tablo 1’de belirtilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal	Firma
Thiazolyl Blue Tetrazolium bromide	Sigma M2128
Diethyl ether	Merck 1.00921.5000
Phosphate Buffered Saline	Sigma P4417
Trysin EDTA % 0,25	Gibco 25200-056
Nu Serum	Corning 355100
DMEM/F-12	Gibco 11320-074
ITS-Premix	Corning 354352
İnsülin-Transferrin-Selenium	Gibco 41400-045
Pencilin-Streptomisin	Gibco 15140-122
Water for HPLC	VWR 23595.328
Methanol hypergrade for LC MS/MS	Merck 10953935 820
Ethyl acetate	Riedel-de Haen 27227
Hexane	Sigma 208752
17 β Östradiol	Sigma E8875
Testosteron	Sigma 86500
Östradiol Elisa Kit	Cayman 501890
Testosteron Elisa Kit	Cayman 582701
Forskolin	Cayman 11018
Prokloraz	Cayman 24051
NCI H295	ATCC NVG-CRL-2128
Genistein	Sigma G6649
Ketokonazol	Fisher Bioreagents 65277-42-1

3.1.2. Kullanılan Gereçler

Tez çalışması kapsamında kullanılan gereçler Tablo 2’de belirtilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan gereçler

Makine ve Teçhizat	Firma adı ve Modeli
Buzdolabı	Ariston hotpoint
İnkübatör	Nuaire nu-5510e
Laminar akımlı kabin	Shinsaeng scbn 1013/1300
Mikroskop	Olympus cxx41
Hemositometre	Marienfeld 0640110
Otomatik mikropipet (0.5-10µ)	Brand ve Eppendorf
Otomatik mikropipet (10-100µl)	Brand ve Eppendorf
Otomatik mikropipet (100-1000µl)	Brand ve Eppendorf
8 kanallı otomatik mikropipet	Brand Transferpette S
Spektrofotometre	Thermo Scientific Varioskan Flash plaka okuyucu
Su banyosu	Wisabath wb-22
Terazi	Sartorius BI610 ve GP1200P
Terazi	Denver Instrument
Vorteks	IKA MS3 basic
Santrifüj	Nüve NF200
Santrifüj	Hettich Rotofix 32A
Santrifüj Tüpü 15 ml	Isolab S.078.02.007.050
Santrifüj Tüpü 50 ml	Isolab S.078.02.008.050
Santrifüj Tüpü 2 ml	Isolab S.078.03.003.500
Pipet ucu (200 µl)	Isolab I.005.01.002.901
Pipet ucu (10 µl)	Isolab I.005.01.001.901
Pipet ucu (1000 µl)	Isolab I.005.01.003.500
Orbital Shaker	Boeco OS-20
24 kuyucuklu Steril Plaka	SPL 30024
Vial	Isolab I.095.01.001
Insert 0,3ml	Isolab I.097.05.109
Vial Kapak	Isolab I.096.01.001
LC MS/MS	Shimadzu 8040
Azot Uçurucu	Caliper Turbo Vap LV
C18 kolon	InertSustain C18 (3 µm, 2,1x100 mm)

3.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. H295R Hücre Kültüründe Kullanılan Besi Ortamı ve Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1.1. Besi Ortamı

Amerikan Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (ATCC CRL-128) satın alınan H295R hücre hattının sürdürülebilmesi için kullanılan besi ortamı; DMEM: Ham's F-12 içerisine %2,5 oranında Nu serum, %1 ITS+ premix ve %1 pen-strep eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan besi ortamı karışımında 37 °C, %5 CO₂ içeren nemli ortamda sürdürülmüştür.

3.2.1.2. Stok Östradiol ve Testosteron Standartının Hazırlanması

5 x10⁸ pg/ml ana stok hazırlayabilmek için 0,5 mg östradiol standartından tartılmış ve 1 ml methanol eklenmiştir.

5 x10⁸ pg/ml ana stok hazırlayabilmek için 0,5 mg testosteron standartından tartılmış ve 1 ml methanol eklenmiştir.

3.2.1.3. Stok Prokloraz Hazırlanması

3mM ana stok hazırlayabilmek için Prokloraz 5,65 mg tartılmıştır. Hacim 500 µl olacak şekilde DMSO ile tamamlanmıştır.

3.2.1.4. Stok Forskolin Hazırlanması

10mM ana stok hazırlayabilmek için Forskolin 2,05 mg tartılmıştır. Hacim 500 µl olacak şekilde DMSO ile tamamlanmıştır.

3.2.1.5. Stok Melatonin Hazırlanması

33 x10⁵ pg/ml ana stok hazırlayabilmek için Melatonin 3,3 mg tartılmıştır. Hacim 1000 µl olacak şekilde DMSO ile tamamlanmıştır.

3.2.1.6. Stok Ketakonazol ve Genistein Hazırlanması

10 mM Ketakonazol ve Genistein hazırlamak için Ketakonazol 5,31 mg, Genistein 2,70 mg tartılmış ve her biri 1 ml DMSO'da çözülmüştür.

3.2.1.7. Stok Test Maddelerinin Hazırlanması

2,86 mg M6 ve 2,51 mg M20 tartılarak 100µl DMSO içinde çözülerek 10^{-5} M'lık stok çözeltiler hazırlanmıştır.

3.2.2. ELİSA Test Kiti Çözeltilerinin Hazırlanması

3.2.2.1. ELİSA Tampon Çözeltisi

Kit içeriğindeki tampon flakonuna 90 ml saf su eklenerek 10 kat seyreltilmiş ve iyice çalkalanıp tamamen çözülmüştür.

3.2.2.2. Yıkama Tampon Çözeltisi

Kit içeriğindeki 5 ml flakon yıkama tamponu toplam hacim 2 litre olacak şekilde ultra saf su eklenerek 400 kat seyreltilir ve 1 ml polisorbata 20 eklenir.

3.2.2.3. ELİSA AChE Tracer

Elisa kit içeriği içerisinde bulunan Östradiol/Testosteron AChE Tracer'ı 6 ml Elisa Buffer ile sulandırılmıştır

3.2.2.4. Östradiol ELİSA Antiserum

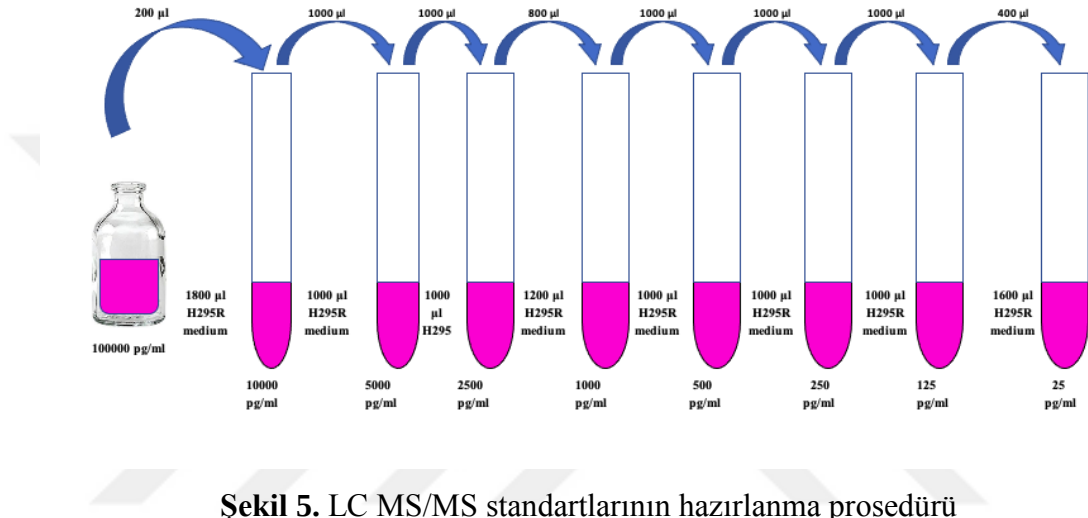
Elisa kit içeriği içerisinde bulunan Östradiol/Testosteron ELİSA Antiserum 6 ml Elisa Buffer ile sulandırılmıştır.

3.2.3. Standart Hazırlanması

3.2.3.1. LC MS/MS Standartlarının Hazırlanması

Hem E2 hem de T 5×10^8 pg/ml'lık ana stok çözeltisi 1/100 oranında (10 µl standart +990µl metanol) seyreltilerek 5×10^6 pg/ml'lik ilk ara stok çözelti hazırlanıp, hazırlanan bu ara stok çözeltide 1/50 oranında seyreltilerek 1×10^5 pg/ml'lik stok karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışım 1/10 oranında (200 µl +1800 µl H295R besi ortamı) seyreltilerek 10000 pg/ml'lik son kalibrasyon noktası hazırlanmıştır. Bu son kalibrasyon noktasından 1/2 oranında besi ortamı ile seyretmeler yapılarak 5000, 2500, 1000, 500, 250, 125 ve 25 pg/ml konsantrasyonlarında 7 kalibrasyon noktası daha hazırlanmıştır. 4. kalibrasyon noktası için 1/2.5, 8. Kalibrasyon noktası için ise 1/5 oranında seyretmeler yapılmıştır (Şekil 5). Hazırlanan her standart çözeltiden

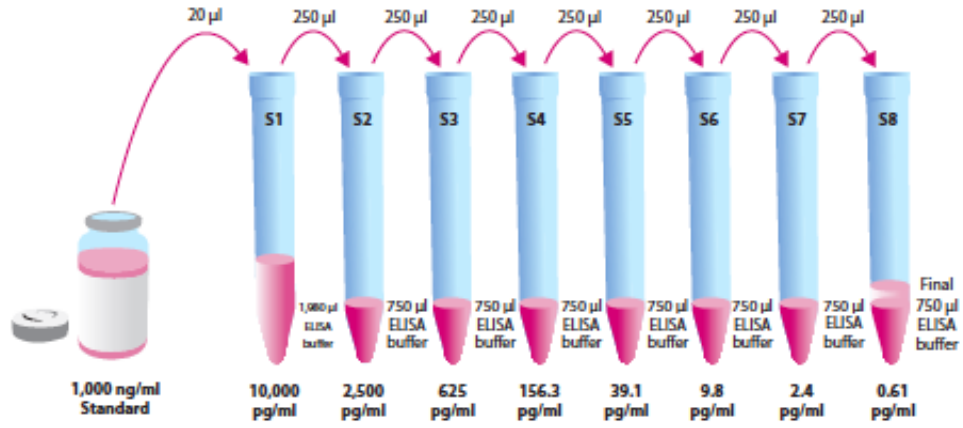
250 µl cam tüpe alınır ve üzerine 1250 µl dietileter eklenip, 25 sn vortekslenmiş, ardından 1 dakika 153 xg de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazdan 1ml enjektör yardımıyla falkon tüpe aktarılmıştır. Falkon tüpe aktarılan örnek azot gazı altında 40 °C’de uçurulmuştur. Solventi uzaklaştırılmış örnek 100 µl hareketli faz karışımı (%25’lik %5 amonyum hidroksit içeren metanol) eklenerek vorteks ile çözdürölüp viyale alınmış ve LC MS/MS ile analiz edilmiştir.



3.2.3.2. ELİSA Standartlarının Hazırlanması

3.2.3.2.1. ELISA Östradiol Standartlarının Hazırlanması

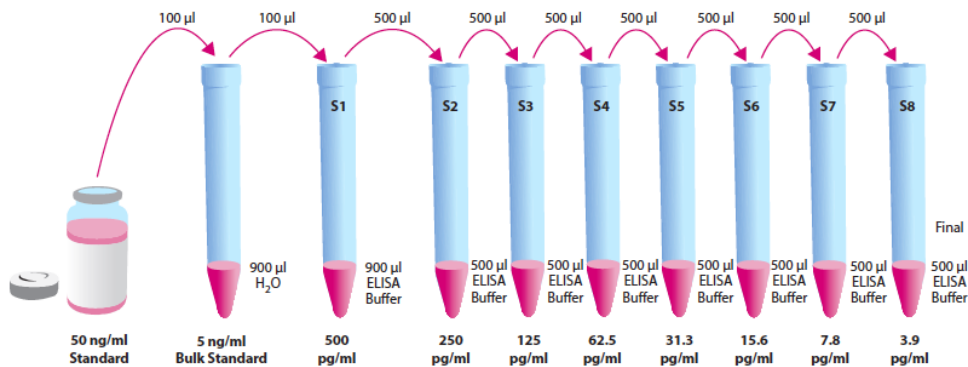
ELISA östradiol standartlarının hazırlanması için Cayman Elisa östradiol kitindeki protokol kullanılmıştır. Protokole göre 1000 ng/ml’lik kit içerisindeki ana stoktan 20 µl alınıp 1000 µl Elisa tampon 10000 pg/ml’lik ilk kalibrasyon noktası hazırlanmıştır. Hazırlanan bu ilk kalibrasyon noktasından alınan 250 µl’nin üzerine 750 µl Elisa tampon çözeltisi eklenerek 2500 pg/ml’lik ikinci kalibrasyon noktası, ardından seri dilüsyonlar yapılarak 625, 156.3, 39.1, 9.8, 2.4, 0.61 pg/ml kalibrasyon noktaları hazırlanmıştır. Hazırlanan kalibrasyon standartlarının hazırlanış şekli Şekil 6’da östradiol kit kalibrasyon standartı hazırlanışı gösterilmiştir.



Şekil 6. ELISA test kiti Östradiol standartlarının hazırlanma prosedürü

3.2.3.2.2. ELISA Testosteron Standartlarının Hazırlanması

ELISA testosteron standartlarının hazırlanması için Cayman testosteron kitindeki protokol kullanılmıştır. Protokole göre 50 ng/ml’lik kit içerisindeki ana stoktan 100 µl alınıp 900 µl su eklenerek 5 ng/ml’lik ara stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu ara stoktan 100 µl alınıp 900 µl Elisa tampon çözeltisi eklenerek 500 pg/ml’lik ilk kalibrasyon noktası hazırlanmıştır. Hazırlanan bu ilk kalibrasyon noktasından alınan 500 µl’nin üzerine 900 µl Elisa tampon çözeltisi eklenerek 250 pg/ml’lik ikinci kalibrasyon noktası, ardından seri dilüsyonlar yapılarak 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9 pg/ml kalibrasyon noktaları hazırlanmıştır. Hazırlanan kalibrasyon standartlarının hazırlanış şekli Şekil 7 testosteron kit kalibrasyon standartı hazırlanışı gösterilmiştir.



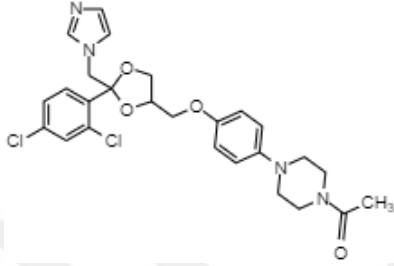
Şekil 7. ELISA test kiti Testosteron standartlarının hazırlanma prosedürü

3.2.4. Referans Bileşikler ve Test Edilen Melatonin Analogları

3.2.4.1. Referans Bileşikler

Ketakonazol

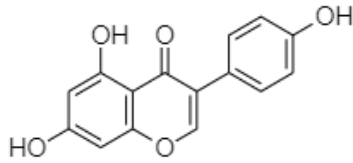
1-[4-[4-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazin-1-yl]ethanone



Molekül ağırlığı: 531.43 g·mol⁻¹

Genistein

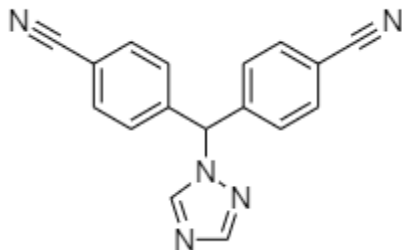
5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one



Molekül ağırlığı: 270.240 g·mol⁻¹

Letrozol

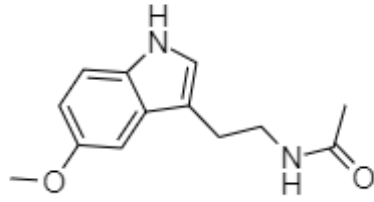
4,4'-((1H-1,2,4-triazol-1-yl)methylene)dibenzonitrile



Molekül ağırlığı: 285,303 g/mol

Melatonin

N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]

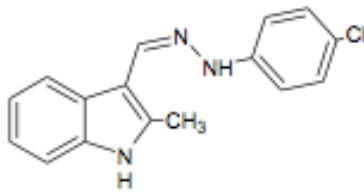


Molekül ağırlığı: 232,28 g/mol

3.2.4.2. Test Bileşikleri (M Maddeleri)

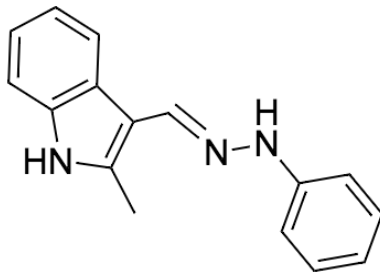
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sibel Süzen tarafından sentezlenen melatonin analoglarından M maddelerinden M20 ve M6 kullanılmıştır.

2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit(4-klorofenil) hidrazon (M6)



Molekül ağırlığı: 286 g/mol

2-metilindol-3-karboksialdehit fenil hidrazon (M20)



Molekül ağırlığı: 251 g/mol

3.3. Analiz Yöntemleri

Tez çalışması kapsamında endokrin bozucuların steroidojenez üzerine etkilerinin belirlenmesi için OECD tarafından önerilmiş ve valide edilmiş H295R Steroidojenez yöntemi OECD TG-456 test kılavuzunda belirtildiği şekilde kullanılmıştır.

OECD TG-456 test kılavuzunda her laboratuvar minimum test limitleri (MDL) dahil olmak üzere performans kriterlerini karşıladığı sürece H295R hücreleri tarafından üretilen T ve E2 düzeylerinin belirlenmesi için kendi seçtiği bir hormon ölçüm sistemini kullanabilir denilmiş ve LC MS/MS, ELİSA, RIA gibi hormon analizlerinde kullanılabilecek teknikler önerilmiştir. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında yüksek hassasiyete sahip olduğu bilinen LC MS/MS ve ELİSA teknikleri kullanılarak östradiol ve testosteron düzeylerinin ölçülmesi ve her iki yöntemin başarısının kıyaslanması amaçlanmıştır.

3.3.1. H295R Steroidojenez Deneyi

3.3.1.1. H295R Hücre Hattı Çalışma Prensipleri

Steroidojenez deneyinin amacı steroid yapılı seks hormonlarının sentezini etkileyen kimyasal maddeleri tespit edebilmektir. Bundan dolayı OECD TG-456 test kılavuzunda testte değerlendirme amacıyla son nokta olarak (endpoint) steroidojenez sonucunda sentezlenen iki temel cinsiyet hormonu olan T ve E2'nin düzeylerinin ölçülmesi anlatılır. Deney, steroidojenez yolunun enzimlerini inhibe eden veya indükleyen kimyasalları tespit edebilmektedir. H295R steroidojenez deneyi genellikle 24 kuyucuklu plakalarda standart hücre kültürü koşulları altında gerçekleştirilir. Alternatif olarak 48 kuyucuklu plakalar da kullanılabilir. 48 kuyucuklu plakalar kullanılırsa yapılan analizlerde, 0,5 mL'lik son kuyucuk hacmi ve kuyucuk başına 100,000 - 150,000 hücre ile analiz yürütülmelidir. Aynı zamanda test, OECD TG-456 test kılavuzunda belirtilen kalite ve performans kriterlerini karşılamalıdır. Hücre ekiminden 24 saat sonra test maddeleri triplike olarak altı konsantrasyonda test kuyucuklarına eklenir. Hücreler test maddeleri ile 48 saat inkübe edilir. Hormon üretiminde indükleyici veya inhibitör etkinliğe sahip olduğu bilinen negatif ve pozitif kontrol test maddeleri sabit bir konsantrasyonda kullanılır. İnkubasyon süresinin sonunda kuyucuklardan besi ortamı uzaklaştırılır. Her kuyucuktaki hücre canlılığına bakılır. Kuyucuklardaki hormon konsantrasyonları,

hormon ölçüm kitleri ve / veya sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS) gibi enstrümantal analizler gibi çeşitli yöntemler kullanılarak ölçülebilir. Veriler, solvent kontrolüne ve en düşük gözlemlenen etki konsantrasyonuna (LOEC) göre kat değişimi olarak ifade edilir. Test negatifse, test edilen en yüksek konsantrasyon, etki gözlenmeyen konsantrasyon (NOEC) olarak raporlanır. Bir kimyasalın steroidojenezi etkileme yeteneğine ilişkin sonuçlar, üç bağımsız test çalışmasına dayanmalıdır. İlk test çalışmasında, çözünürlük veya sitotoksikite sorunları ile karşılaşılırsa veya kimyasalın aktivitesi test edilen konsantrasyon aralığının dışında görünüyorsa, 2. ve 3. çalışmalar için ilk deneyde elde edilen sonuçlara göre konsantrasyonların ayarlanması ve buna bağlı olarak çalışma aralığının belirlenmesinin uygun olacağı bildirilmiştir.

3.3.1.2. Hücrelerin İdamesi ve Pasajlanması

ATCC CRL-128 satın alınan H295R hücreleri; %2,5 Nu-Serum, %1 ITS+ premix ile fenol kırmızısı içermeyen DMEM:Ham's F-12 Nutrient (1:1) karışımında 37 °C, %5 CO₂ içeren nemli ortamda sürdürülmüştür.

Pasaj protokolünün ilk basamağında besi ortamı flasktan uzaklaştırıldıktan sonra hücreler bir kez soğuk PBS ile yıkanmıştır. Bu yıkama işlemiyle ortamda bulunan ölü hücreler ve kalan besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Takiben eklenen 2 ml tripsin-EDTA çözeltisi ile yüzeyden uzaklaştırılan hücrelere tripsinin aktivitesini durdurmak için 6 ml besi ortamı eklenmiştir. Elde edilen bu hücre süspansiyonu steril bir tüpe alınarak 153 xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atılıp, hücre peleti 3 ml besi ortamı eklenerek hücreler süspande edilmiş ve hemositometrede sayım sonrası uygun sayı/oranda hücre taze besi ortamı içeren flaska aktarılmıştır.

OECD TG-456 test kılavuzunda, bazal hormon üretiminin hücrelerin pasajlanması ile değiştiği belirtildiğinden, analizlerin tümü kılavuzda önerildiği gibi pasaj 5 ve pasaj 10 arasında gerçekleştirilmiştir (OECD, 2011).

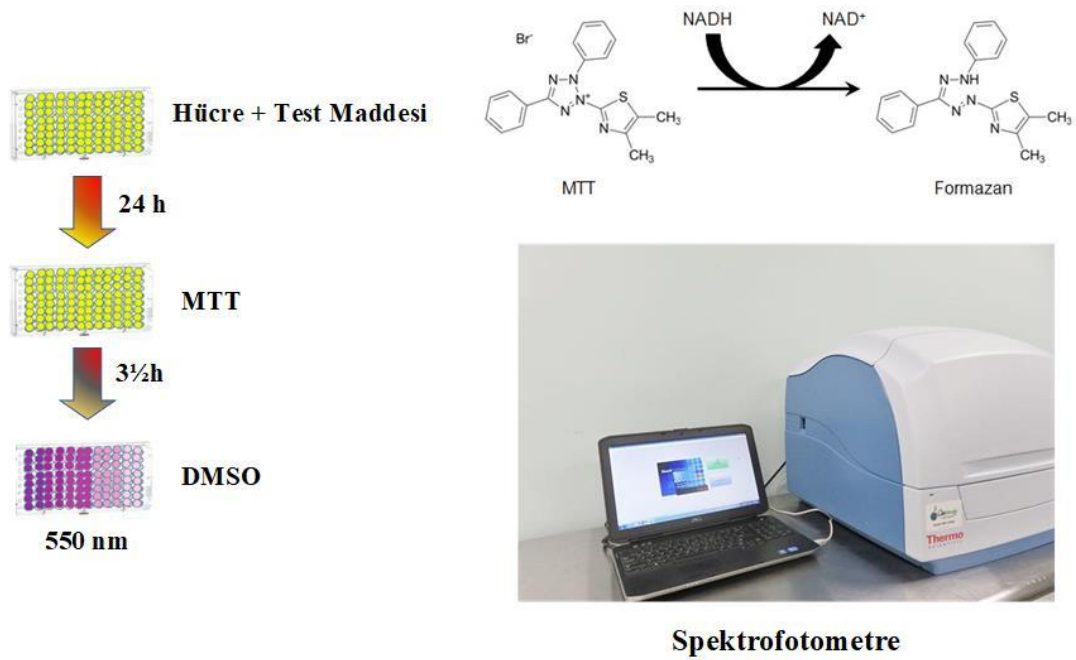
3.3.1.3. Hücre Sayımı ve Mikroplakaya Hücre Ekimi

Yukarıda anlatıldığı şekilde taze besi ortamında süspande edilen hücreler hemositometrede mikroskop altında sayıldıktan sonra 24 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğunda 300.000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonundan gerekli miktar alınarak kuyucuklara ekim yapılmıştır.

3.3.1.4. Hücre Canlılığının MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

Hücre canlılığının değerlendirilmesinde; suda çözünebilen tetrazolyum tuzu olan, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromit (MTT) kullanılmıştır. MTT, canlı hücrede mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzimi ile mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Analiz sonlandırıldıktan sonra kuyucuklar 37 °C'deki PBS ile bir kez yıkanarak besi ortamı içerisindeki proteinler ve ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrasında 270 µl hormon içermeyen besi ortamı ve 30 µl MTT kuyucuklara eklenmiş ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak OECD TG-456 test klavuzunda belirtildiği gibi % 70 metanol kullanılmıştır. Sürenin sonunda ortam uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 900 µl DMSO eklenmiş ve oluşan mor renkli formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmış ve oluşan renk şiddeti 550 nm'de ölçülmüştür (Mosmann, 1983). Şekil 8'de deneyin tüm basamakları şematize edilmiştir. Kuyucuklardaki % canlılık klavuzda belirtilen aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

% Canlılık = (Kuyucuktaki absorbens değeri – Metanol kuyucuğundaki absorbens değerleri ortalaması) / (DMSO kuyucuğundaki absorbens değerleri ortalaması - Metanol kuyucuğundaki absorbens değerleri ortalaması)



Şekil 8. MTT deney tasarımı

3.3.1.5. Hormon (Östradiol ve Testosteron) Düzeylerinin Ölçülmesi

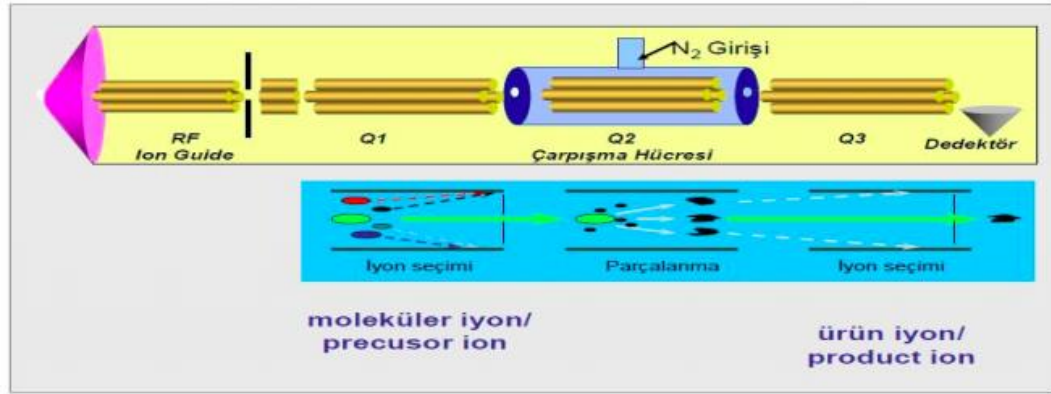
H295R hücreleri belirli sürelerde referans bileşikler ve/veya test maddeleri ile inkübe edilmelerini takiben hücre besisi ortamındaki E2 ve T düzeyleri iki farklı yöntem ile ölçülmüştür: LC/MS-MS ve ELISA. Yöntemlere ait tüm basamakların özeti Şekil 10'da verilmiştir.

3.3.1.5.1. LC MS/MS Yöntemi ile Hormon Düzeylerinin Ölçülmesi

3.3.1.5.1.1. Çalışma Prensipleri

Sıvı kromatografi /tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS), yüksek basınçlı sıvı kromatografisinin (HPLC) fiziksel ayırma yeteneği ile kütle spektrometrisinin (MS) kütle analizi yeteneklerini birleştiren bir analitik kimya tekniğidir. Ana amacı analiz etmek istediğimiz test maddesinin karışımdaki diğer bileşenlerden ayrımı, tanımlanması ve miktar tayinidir. Sıvı kromatografisi, bir karışım içerisindeki bileşikleri birbirinden ayırmak ve maddeleri saflaştırmak için kullanılan bir yöntemdir ve asıl amaç hedeflenen numunenin ayrımı ve miktar tayinidir. Bu yöntem, çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanırken, kütle spektrometreleri ise manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partiküllerin kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt edilerek ölçülmesi esasına dayanarak çalışan cihazlardır. LC MS/MS cihazı temelde kütle dedektörü iyon kaynağı, kütle analizörü ve iyon dedektör sistemi olmak üzere 3 ana kısımdan oluşur. İyon kaynağı; analizi yapılacak numunenin iyonlaştırılarak cihaza gönderildiği kısımdır. Numunenin özelliklerine göre ESI (Electrospray Ionization) veya APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) iyonizasyon tekniklerinden biri seçilebilir. Kütle analizörü; kuadropoller sayesinde iyon kaynağından gelen iyonlar, değişen elektromanyetik bir alana tabi tutularak m/z (kütle/yük) oranlarına göre ayrılırlar. Kuadropollerde iki çeşit çalışma modu vardır. İlkinde, bileşiklerin konsantrasyonlarının düşük olduğu durumlarda kantitasyon kuadropolün SIM (selected ion monitoring) modu kullanılarak gerçekleştirilir. İkinci kuadropol çalışma modu ise LC MS/MS cihazlarında kantitatif analizlerde en çok tercih edilen MRM (multiple reaction monitoring) modu olup kimyasal girişimlerin elimine edilmesi sayesinde hassasiyet ve seçicilik artırılır. LC ünitesinde ayrımı sağlanan analitler iyonlaştırıldıktan sonra MS/MS ünitesine gönderilirler. MS/MS ünitesine gelen

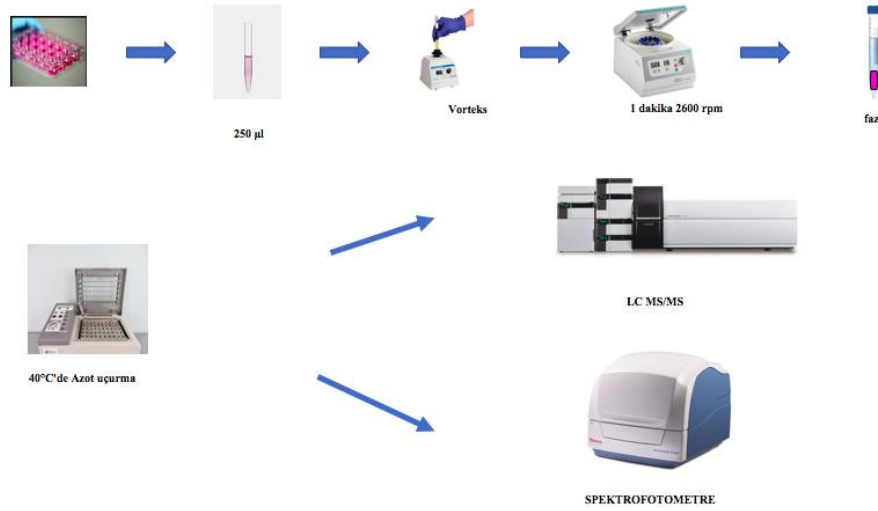
iyonlar ilk kuadropolden kütle/yük (m/z) oranlarında ayrıştırılarak girişim hücreesine (collision cell) gönderilirler. Burada yüksek saflıkta azot gazı ile çarpıştırılan moleküller parçalanarak ikinci kuadropole doğru yönlenirler. İkinci kuadropol ünitesindeki bu ikincil iyonlar da kütle/yük (m/z) oranlarında ayrıştırılarak kütleli olarak tayin edilmiş olurlar. İkinci kuadropolde parçalanma sonucu oluşan iyonlara göre teşhis ve miktar tayini yapılmaktadır. Şekil 9'da kısaca bu çalışma prensibi gösterilmiştir. Aynı m/z oranına sahip pek çok molekül varken aynı parçalanma iyonlarına sahip olan moleküllerin doğada bulunma oranı 1/10000'dir. Bu nedenle MS/MS tekniği, çevre ve biyolojik kaynaklı karmaşık olan analiz örneklerinde yaygın olarak bulunan biyokimyasal, organik ve inorganik bileşikleri hassas bir şekilde analiz etmek için tercih edilir.



Şekil 9. LC MS/MS Çalışma Prensibi

3.3.1.5.1.2. Deneyin Yapılışı

Hücre kültürü uygulama basamağından sonra toplanan besi yeri örnekleri (250 μ l) cam tüplere alınmış, üzerine 1250 μ l dietileter eklenerek vortekslenmiştir. 1 dakika 153 xg de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazdan 1000 μ l enjektör yardımıyla falkon tüpe aktarılmış, azot gazı altında 40 °C'de kuruluğa kadar uçurulmuştur. Solventi uzaklaştırılmış örnek 100 μ l hareketli faz karışımı (%25'lik %5 amonyum hidroksit içeren metanol) eklenmiş, vortekslenerek çözdürüldükten sonra LC MS/MS ile analiz edilmiştir. Yöntemlere ait tüm basamakların özeti Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. LC MS//MS ve ELİSA yöntemlerine ait tüm basamakların özeti

3.3.1.5.1.3. LC MS/MS parametreleri

Ahmed ve ark (2018) makalesinde yer alan metot ile optimizasyon çalışmaları yapılarak ideal parametreler araştırılmıştır (Ahmed et al., 2018).

Uygun mobil fazı elde edebilmek amacıyla makalede belirtildiği gibi iyonlaştırmayı arttırıcı amonyum hidroksit'in iyonlaştırmayı arttırıcı etkisinden faydalanılmış ve optimum kromatografik koşulların belirlenmesi için sabit faz olarak InertSustain marka C18 (3 µm, 2,1x100 mm) özellikte analitik kolon, Mobil faz A %25'lik %0,05 amonyum hidroksit içeren su ve Mobil faz B %25'lik % 5 amonyum hidroksit içeren metanolden oluşan hareketli faz bileşimi kullanılmıştır.

LC-MS/MS yöntemi ile metabolitlerin analizinde ESI iyon kaynağı kullanılarak pozitif ve negatif iyonizasyon modlarında yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlayan MRM kullanılmıştır.

MS/MS yönteminin optimizasyonunda kullanılmak üzere her bir metabolit için (T ve E2) stok çözeltisinden metanol ile seyreltilerek son derişimleri 1 µg/mL (1 ppm) olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltiler LC-MS/MS sistemine kolon kullanılmadan 0,3 mL/dk akış hızında %25'lik %0,05 amonyum hidroksit içeren su ve %25'lik %5 amonyum hidroksit içeren metanolden

oluşan hareketli faz kullanılarak ayrı ayrı enjekte edilmiştir. MRM koşullarının optimizasyonu için sırasıyla aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. Hazırlanan E2 ve T standart çözeltileri sırasıyla pozitif ve negatif polarizasyona ayarlanan MS sisteminde analiz edilerek uygun iyonizasyon modu ve metabolitlere ait öncü (precursor) iyonlar belirlenmiştir.
2. Fragment (product) iyonların belirlenmesi amacıyla aynı çözeltiler cihazda seçilen iyonizasyon modunda MS sistemine tekrar enjekte edilmiş ve düşük, orta ve yüksek çarpışma (collision) enerjileri (10, 20 ve 30 eV) cihaz şartlarına eklenmiş ve sonrasında parçalanma ürünleri incelenmiştir. Kütle spektrumundaki elde edilen en yüksek şiddet (intensity) ve m/z değerine sahip iyon optimum fragment iyon olarak belirlenmiştir.
3. Elde edilen öncü ve fragment iyon bilgisi kullanılarak LC-MS/MS sisteminde bulunan LabSolutions yazılımı yardımı ile E2 ve T'a ait optimum çarpışma enerjisi ve kuadropol voltajları (Q1 ve Q3) belirlenmiştir.
4. Son işlem basamağı olarak m/z iyon sinyalinin elde edilmesinde ölçüm hassasiyeti açısından önemli bir parametre olan bekleme süresi (dwell time) optimize edilmiştir. Farklı bekleme sürelerinde (50, 70, 100 ve 200 ms) analizler yapılmış sonuçlar incelenerek optimum süre belirlenmiştir.

Yapılan MS/MS tarama sonucuna göre literatür ile uyumlu olarak molekül ağırlığı 272,39 g/mol olan E2 için (-) iyon modunda precursor iyon 271.1 (m/z), product iyon değerleri ise 145.10 (m/z), 182.9 (m/z) ve 269.10 (m/z) bulunurken molekül ağırlığı 288.42 g/mol olan T için (+) iyon modunda precursor iyon 289.3 (m/z) product iyon değerleri ise 97.0 (m/z) ve 109.0 (m/z) olarak tespit edilmiştir.

Gerçekleştirdiğimiz tüm deneme çalışmaları sonucunda kromotogramlarda en yüksek intensiteye sahip pikleri elde ettiğimiz metodumuzu oluşturan LC MS/MS parametreleri Tablo 3'te verilmiştir. Kullanılan yönteme ait cihaz gradient akışı Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 3. Metoda ait LC MS/MS parametreleri

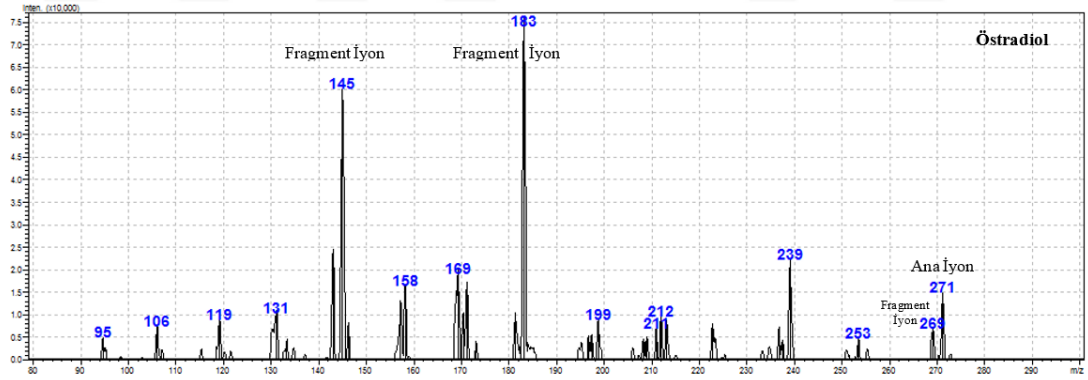
İyonizasyon Modu	Elektro Sprey İyonizasyon
Nebulizing gaz Flow	3 L/dk
DL Temperature	250 °C
Östradiol Q1 Mass	271,10→145,10
Östradiol Q3 Mass	271,10→269,10 ve 271,10→182,90
Testosteron Q1 Mass	289,30→97,00
Testosteron Q3 Mass	289,30→109,00
Östradiol Collision Energy (CE)	40.0 - 31,0 – 42.0
Testosteron Collision Energy (CE)	-11.0 ve -15.0
Kolon Temperature (TEM)	40 °C
Heat Block Temperature	400 °C
Ionisation Source	Turbo Sprey
Collision Gas	N ₂ (Azot)
Dwell Time	100.0
Pompa Modu	Binary Flow
Total Akış	0,3 ml/dk
Enjeksiyon volume	10 µl
Analiz süresi	11 dk
Kolon	InertSustain C18 (3 µm, 2,1x100 mm)
Mobil Faz A	%25'lik % 0,05 amonyum hidroksit içeren su
Mobil Faz B	%25'lik % 5 amonyum hidroksit içeren metanol

Tablo 4. Metodda kullanılan cihaz gradient akışı

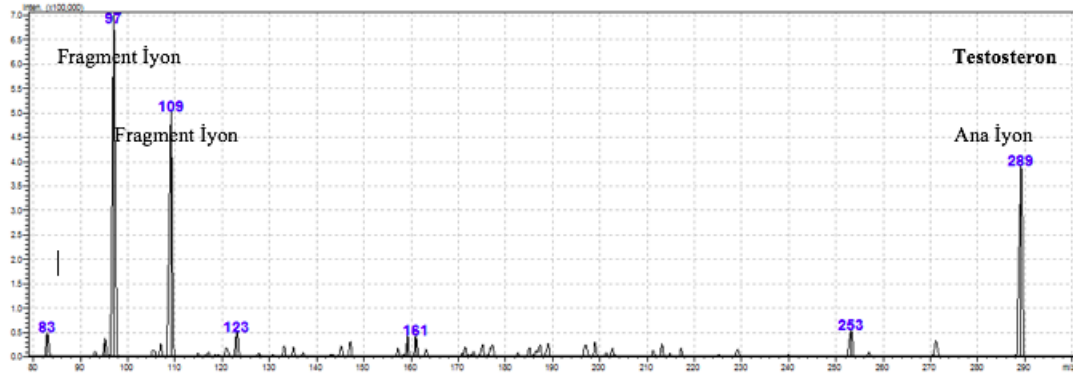
Zaman (dk)	Mobil faz A	Mobil faz B
1,0	50	50
3,0	50	50
4,0	10	90
7,0	10	90
9,0	50	50
11,0	50	50

Analiz yönteminin geliştirilmesi sırasında kromatografik ayırımı ve kütle ölçümlerini etkileyen parametreler sistematik olarak incelenmiş ve yukarıda anlatıldığı gibi optimize edilmiştir.

Çalışmada hedeflenen E2 ve T için MS/MS parçalanma modellerine ait kütle spektrumları Şekil 12 ve Şekil 13’de sunulmuştur.



Şekil 11. Östradiole ait MS/MS parçalanma ürünleri



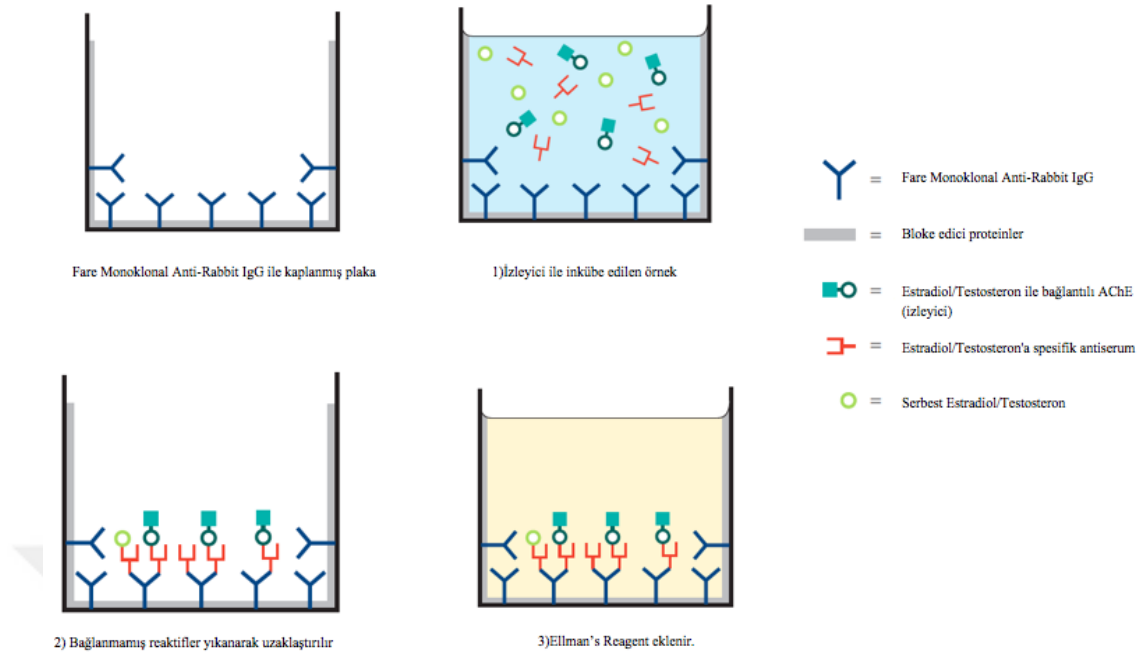
Şekil 12. Testosterona ait MS/MS parçalanma ürünleri

Analiz yönteminin geliştirilmesi sırasında kromatografik ayırımı ve kütle ölçümlerini etkileyen parametreler sistematik olarak incelenmiş ve optimize edilmiştir.

3.3.1.5.2. ELISA Yöntemi ile Hormon Düzeylerinin Ölçülmesi

3.3.1.5.2.1. Çalışma Prensibi

Bu analiz, sınırlı miktarda bulunan testosteron/östradiol antiserumu için testosteron/östradiol ve testosteron/östradiol -asetilkolinesteraz (AChE) konjugatı arasındaki rekabete dayanmaktadır. Testosteron/östradiol izleyici konsantrasyonu sabit tutulurken testosteron/östradiol konsantrasyonu değiştiğinden, testosteron/östradiol Antiserumuna bağlanabilen testosteron/östradiol izleyici miktarı kuyudaki testosteron/östradiol konsantrasyonu ile ters orantılı olacaktır. Bu antiserum-testosteron/östradiol kompleksi, kuyuya önceden bağlanmış olan fare monoklonal anti-tavşan IgG'sine (mouse monoclonal anti-Rabbit IgG) bağlanır. Plaka, bağlanmamış reaktifleri uzaklaştırmak için yıkanır ve ardından kuyucuğa Ellman Reaktifi (AChE substratı içerir) eklenir. Bu enzimatik reaksiyonun ürünü belirgin bir sarı renge sahiptir ve testosteron için 412 nm dalga boyunda, östradiol kitinde ise 414 nm dalga boyunda güçlü bir şekilde absorbans oluşturur. Spektrofotometrik olarak belirlenen bu rengin yoğunluğu, kuyuya bağlanan testosteron/östradiol izleyici miktarı ile orantılıdır ve bu, inkübasyon sırasında kuyucukta bulunan serbest testosteron/östradiol miktarı ile ters orantılıdır. Test kitine ait çalışma prensibi Şekil 13'de özetlenmiştir.



Şekil 13. Elisa Test Kiti Çalışma Prensibi

3.3.1.5.2.2. Deneyin Yapılışı

H295R hücreleri 24 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra 24 saat, 37 °C, %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında hücre canlılığının değerlendirilmesi için ilgili test maddeleri eklenmiş ve 48 saat inkübe edilmiştir. Test maddeleri ile inkübasyon sonrası kuyucuklardan uzaklaştırılan besiyeri analizi yapılmak üzere toplanmıştır. Alınan 250 µl örnek bir ependorfa aktarılmış, üzerine 1250 µl dietil eter eklenip vorteksle iyice karıştırılmıştır. Faz ayrımını sağlamak için santrifüj edildikten sonra üst fazdan 1000 µl tüpe alınarak azot altında kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kurutulan örnek üzerine 0.5 ml ELİSA tamponu eklenerek çözdürülmüş ve takiben protokole uygun olarak Tablo 5’de belirtilen kit bileşenleri plakaya eklenmiştir. Sonrasında her plaka plastik filmle kapatılıp orbital çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında iki saat karıştırılarak inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda kuyucuklar boşaltılıp yıkama tamponuyla beş kez yıkanmıştır. Takiben her kuyuya 200 µl Ellman Reaktifi, TA (total activity) kuyularına ise 5 µl izleyici eklenmiştir. Plakaların üzeri alüminyum folyo ile örtülerek karanlık bir ortamda orbital çalkalayıcıda 60-90 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi

sonunda testesteron için 412 nm dalga boyunda, östradiol kitinde ise 414 nm dalga boyunda spektrofotometrede değerlendirilmiştir.

Tablo 5. ELİSA test kiti protokolü

KUYUCUK	ELİSA TAMPON	STANDART/ÖRNEK	İZLEYİCİ	ANTİ SERUM
Blk	-	-		-
TA	-	-	5 µl	-
NSB	100 µl	-	50 µl	-
B ₀	50 µl	-	50 µl	50 µl
Std/Örnek	-	50 µl	50 µl	50 µl

Kör (Blk; Blank), Total aktivite (TA;Total aktiviti), Sepesifik olmayan bağlanma (NSB; Non-spesifik binding, Maksimum bağlanma (B₀; Maximum binding), Standart (Std)

3.4. Uygulanan Deney ve Yöntemlerin Validasyon Çalışmaları

3.4.1. H295R Hücre Kültürü Kısmi Validasyonu

Belirlenen test maddelerinin analizine başlamadan önce H295R hücre hattına ait yeterlilik testi yürütülerek testin başarılı bir şekilde yürütülmesi için gerekli olan uygun hücre kültürü ve test koşullarını sağlama ve sürdürme yeteneğine sahip olduğu OECD TG-456 test klavuzuna göre uygulanmıştır.

Bu amaçla kılavuzda belirtilen maddelerden DMSO solvent kontrol (SC), inhibitor etki için prokloraz, indüksiyon etki için forskolin seçilmiştir. Tüm kimyasallar için ayrı plakalar ve her kimyasalın herbir dozu için üç paralel olarak çalışılmıştır. Yeterlilik için kullanılan kimyasallar yapılan her çalışmada kontrol amaçlı plakaya eklenmişlerdir. Yeterlilik testinde kullanılan kimyasalların konsantrasyonları Tablo 6’da ve performans kriterleri Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 6. Yeterlilik testinde kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

Yeterlilik Kimyasalları	Test Konsantrasyonları (µM)
Forskolin	0.1, 0.3, 1, 3, 10
Prokloraz	0.03, 0.1, 0.3, 1

Tablo 7. OECD TG-456 test klavuzu yeterlilik testi değerlendirmesinde kullanılan performans kriterleri

	T	E2
SC'deki Hormon Üretimi	≥ 5 Kat MDL	$\geq 2,5$ Kat MDL
İndüksiyon (10 μM Forskolin)	$\geq 1,5$ Kat SC	$\geq 7,5$ Kat SC
İnhibisyon (1 μM Prokloraz)	$\leq 0,5$ Kat SC	$\leq 0,5$ Kat SC

MDL: Minimum tespit edilebilir limit SC: Solvent kontrol

3.4.2. Analitik Metod Validasyonu

3.4.2.1. Seçicilik

H295R besiyeriuna T ve E2 standartı eklenmiş olup (spike) daha sonra analiz protokolünde belirlenen ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Analiz protokolünde belirtien eter ile ekstraksiyon sonrası elde edilen elüat azotta solventi uçurularak, sonrasında mobil faz B'de analiz prosedüründe belirtilen miktarda çözdürülmüştür. Viyale alınan örnek LC MS/MS'e injekte edilmiştir. Ayrıca analizde kullanılan hareketli faz çözeltisi de bu amaçla analiz edilmiş ve E2 ve T'a ait MRM koşullarında herhangi bir girişim gözlenmemiştir.

E2 ve T standart çözeltilerinin tekrarlı analizleri sonucu elde edilen kromatogramlar tüm analizlerde kullanılmak üzere geliştirilen LC-MS/MS yönteminin seçiciliğini belirlemek için incelenmiştir (Şekil 14 ve Şekil 15). Her iki hormon standartına özgün alıkonma zamanında sadece tek pik görülmüş ve herhangi başka bir hormona ait pikin başka bir hormona ait m/z değerinde görölmediği saptanmıştır.

3.4.2.2. Doğrusallık (Linearite)

Yapılan ön çalışmalara göre başlangıç noktası belirlenen ve buna bağlı olarak hazırlanan kalibrasyon noktalarını oluşturacak 25-125-250-500-1000 -2500-5000 ve 10000 pg/ml konsantrasyondaki standartlar üçer defa LC MS/MS sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre oluşan kalibrasyon eğrisine ait grafiğın

korelasyon katsayısı 0,95-1.00 aralığında olmalıdır. Elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait analiz sonuçları Tablo 9’da, yöntemin doğrusallığının kontrolü için oluşturulan grafikler ise Şekil 16 ve Şekil 17’de sunulmuştur.

3.4.2.3. Duyarlılık

E2 ve T’a ait gözlenebilme sınırı (LOD-Limit of Detection) ve tayin sınırı (LOQ-Limit of Quantitation)’nın hesaplanması için E2 ve T ait pikin 0,5 dakika öncesi ve 0,5 dakika sonrası kromatogram kesitinin zemin sinyalleri yükseklik ortalaması alınmış, elde edilen değerlerin 3 katı LOD ve 10 katı ise LOQ değeri olarak hesaplanmıştır. Elde edilen değerler Tablo 10’da verilmiştir.

3.4.2.4. Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk parametresi iki ana bileşenden oluşmakta olup bunlar gerçeklik ve kesinliktir. Gerçeklik hesaplaması için geri kazanımdan yararlanılmıştır.

3.4.2.4.1 Kesinlik (Precision)

Kesinlik çalışmasında E2 ve T’un her biri için doğrusallık aralığına giren iki farklı derişimdeki çözeltiler altı farklı seri hazırlanarak aynı günde (gün içi kesinlik) ve altı farklı günde (günler arası kesinlik) analiz edilmiştir. Elde edilen veriler kalibrasyon eğrileri kullanılarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve yüzde varyasyon katsayısı hesaplanmış Tablo 11 ve Tablo 12’de verilmiştir.

3.4.2.4.2 Geri Kazanım

Analizlerde her basamakta madde kaybının derecesini belirlemek için iki farklı konsantrasyonda (0,025 ve 0,10 ng/ml) hazırlanan E2 ve T standart çözeltileri doğrudan ve H295R besiyeri içinde olmak üzere üç paralel olarak olarak LC MS/MS yönteminin tüm prosedürü uygulanmıştır. Daha sonra saf standartla elde edilen analiz sonuçları %100 kabul edilerek H295 besiyeri içinde hazırlanmış standartın analiz sonuçlarıyla karşılaştırarak yöntemin verimi hesaplanmıştır.

Çalışma sonucu elde edilen veriler aşağıdaki formüle göre hesaplanarak elde edilen veriler Tablo 13’de verilmiştir.

% Geri Kazanım: $\{(Standart\ eklenmiş\ besiyeridan\ ekstre\ edilmiş\ miktar) - (Standart\ eklenmemiş\ besiyeridan\ ekstre\ edilmiş\ miktar) / (Ekstre\ edilmeksizin\ doğrudan\ ölçülmüş\ miktar)\}$

3.4.3.1. LC MS/MS Metodunun Validasyonu

Optimize edilen LC-MS/MS yöntemi ICH'nın biyoanalitik yöntem validasyon kılavuzuna göre valide edilmiştir (Conference et al., 2005). Bu amaçla E2 ve T, geliştirilen yöntemin seçiciliği, doğrusallığı, duyarlılığı, kesinliği, doğruluğu, geri kazanımı parametreleri açısından incelenmiştir.

3.4.3.2. ELISA Metodunun Kısmi Validasyonu

ELISA ölçüm yönteminin kısmi validasyonu için yöntemin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. OECD TG-456 test klavuzunda belirtilen H295R hücre kültürü üzerine inhibe etkinliğe sahip olan prokloraz ve indüksiyon etkinliğine sahip olan forskolin ile yapılan çalışma verileri yöntemin validasyonu için kullanılmış ve yöntemin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik verisi Tablo 14 ve Tablo 15'de verilmiştir. Yönteme ait linearite verileri Şekil 20 ve Şekil 21'de verilmiştir.

3.5. Test Maddelerinin Steroidojenez Üzerine Etkisinin Araştırılması

Yeni sentezlenen indol türevi melatonin analogları M6 ve M20'nin steroidojenez yolağı üzerindeki olası indükleyici ya da inhibe edici etkileri H295R hücrelerinin maddelerin artan konsantrasyonları (0,004-3,3µM) ile inkübe edilmelerini takiben inkübasyon ortamlarındaki besiyerılarda T ve E2 düzeylerinin hem LC-MS/MS, hem de ELISA metodu ile ölçülmesi ile araştırılmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

OECD TG-456 test kılavuzunda belirtilen istatistik analiz yöntemlerine göre istatistik analizler gerçekleştirilmiştir. Araştırmada elde edilen veriler SPSS 25,0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Veriler değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotları kullanılmıştır.

İstatistiksel analizlere başlamadan önce normallik ve varyans homojenliği varsayımları değerlendirilmiştir. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini test etmek için Kolmogorov Smirnov testi uygulanmıştır. Normal dağılım gösteren

verilerin iki kategoriden fazla değişkenlere göre farkları tek yönlü varyans analizi ve fark olan grubun kontrol grubu ile farklılığını tespit etmek için Dunnett t testi uygulanmıştır. Normal dağılım göstermeyen verilerin iki farklı yöntemle göre ölçüm değerleri arasındaki farkı test etmek için Wilcoxon analizi uygulanmıştır. Farklar $p \leq 0,05$ olduğu için anlamlı kabul edilmiştir.

LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerinin karşılaştırılması için yapılan bağımsız örnekler t testi sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığına bakılmıştır. ($p \leq 0,05$)



Bulgular

4.1. Metod Validasyon Çalışması Bulguları

4.1.1. H295R Steroidojenez Yönteminin Kısmi Validasyonu

Bölüm 3.4.'de ayrıntılı olarak belirtildiği gibi analizler yapılmıştır. Tablo 6'da OECD TG-456 test kılavuzu yeterlilik testi değerlendirmesinde kullanılan performans kriterleri verilmiştir. Laboratuvarımızda metodun uygulanması sonucu elde edilen T ve E2 düzeylerinin solvent kontrol verileri Tablo 8'de gösterilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 7'e göre değerlendirilmiş olup yöntemin başarılı bir şekilde çalıştığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 8. H295R Hücre Kültürü Kısmi Validasyonu Sonuçları

	T	E2
SC'deki hormon üretimi	≥ 16 kat MDL (≥ 5 kat MDL)	$\geq 46,2$ kat MDL ($\geq 2,5$ kat MDL)
İndüksiyon (10 μM Forskolin)	$\geq 1,5$ kat SC ($\geq 1,5$ kat SC)	$\geq 11,6$ kat SC ($\geq 7,5$ kat SC)
İnhibisyon (1 μM Prokloraz)	$0,2$ kat $\leq$ SC ($\leq 0,5$ kat SC)	0 kat $\leq$ SC ($\leq 0,5$ kat SC)

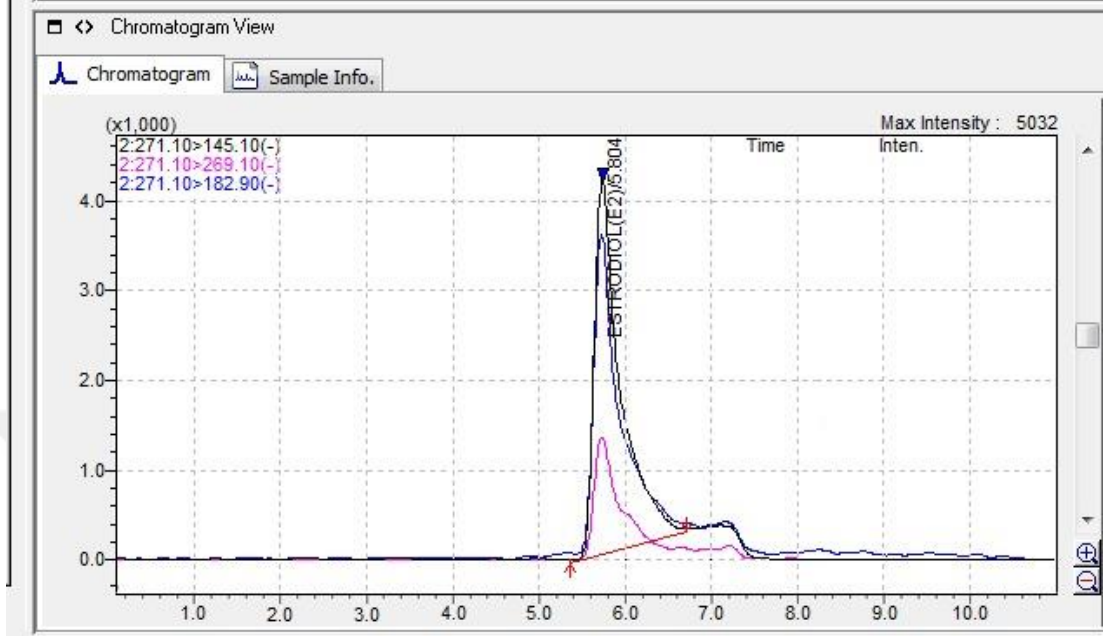
Parantez içindeki değerler OECD 496 Test kılavuzunda yer alan kalite kontrol düzeylerini ifade etmektedir. SC: Solvent kontrol MDL: Minimum ölçüm limiti.

4.1.2. LC MS/MS Yöntemine Ait Validasyon Bulguları

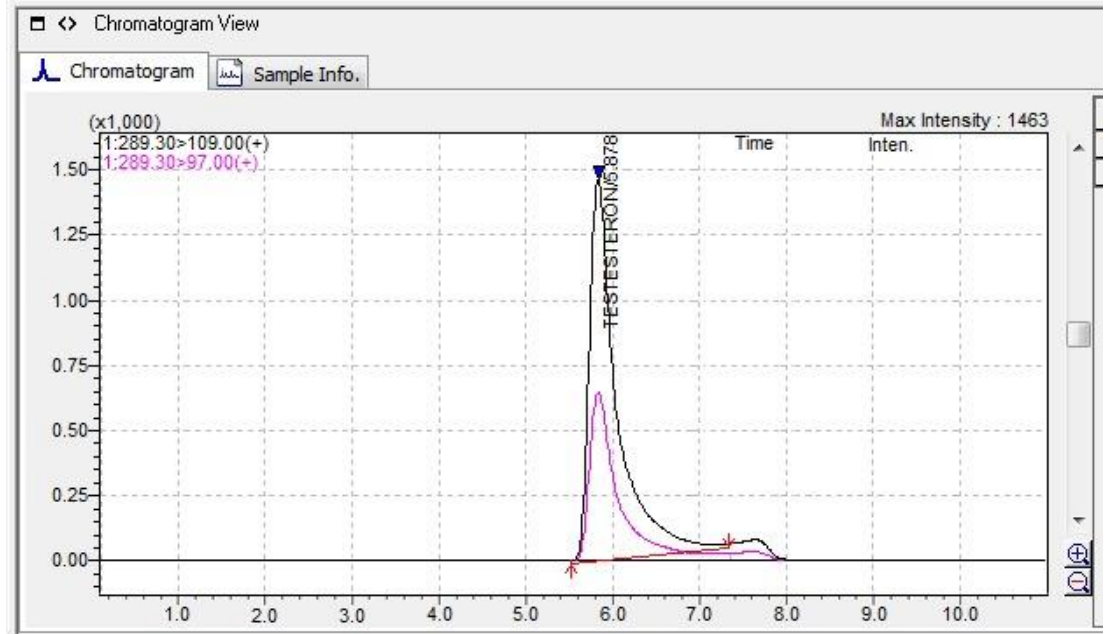
4.1.2.1. Seçicilik

Bölüm 3.4.2.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan H295R besiyeriuna eklenmiş T ve E2 standartı optimize edilen metot ile çalışıldığında kromatografilerde sadece hormonlara ait birer pik gözlenmiştir; bu nedenle yöntemin seçici olduğu kabul

edilmiştir. Bu çalışmada uygulanan H295R besiyeriuna T ve E2 standartı eklenerek hazırlanan örneklere ait kromatogram görüntüleri Şekil 14 ve Şekil 15’de verilmiştir.



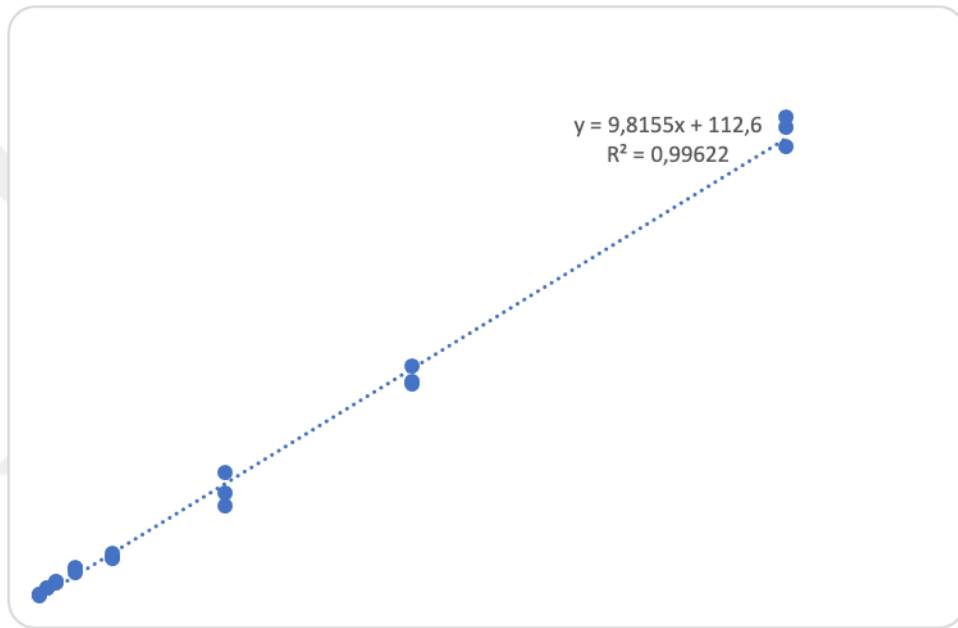
Şekil 14. H295R besiyeri içine E2 (1 ng/ml) eklenerek hazırlanmış örneğe ait kromatogram



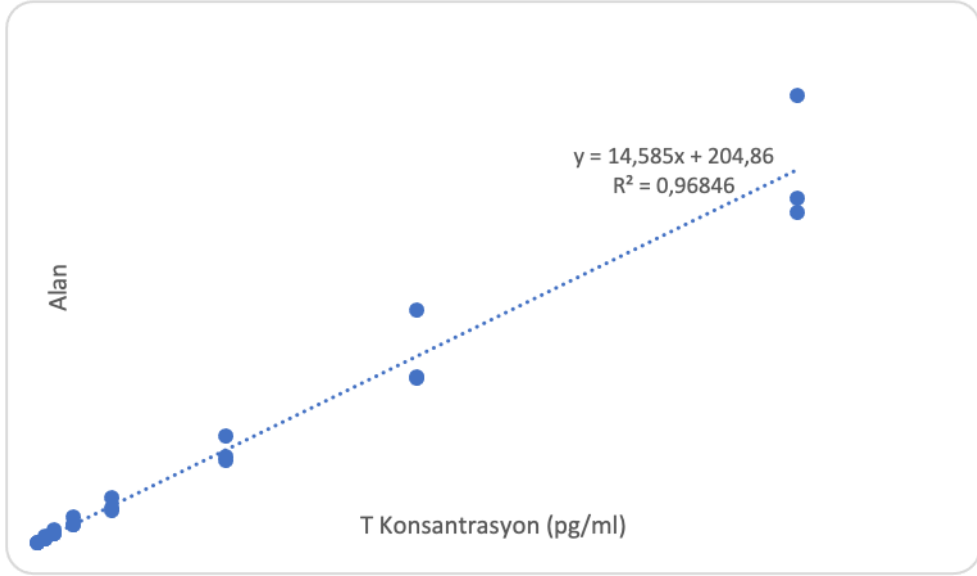
Şekil 15. H295R besiyeri içine T (1 ng/ml) standartı eklenerek hazırlanmış örneğe ait kromatogram

4.1.2.2. Doğrusallık (Linearite)

Doğrusallığı belirlemek amacıyla, H295R besiyeri içinde T ve E2 ait 5×10^8 pg/ml'lik stok çözeltileri seri dilüsyonla 25-125-250-500-1000 -2500-5000 ve 10000 pg/ml olacak şekilde seyreltilmiştir. Hazırlanmış olan kalibrasyon çözeltileri LC MS/MS yöntemiyle okutulmuş, konsantrasyon-sinyal yoğunluğuna göre kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Bu amaçla. E2 ve T'a ait kalibrasyon doğruları, doğru denklemleri ve belirleme katsayıları (R^2) hesaplanarak verilmiştir (Şekil 16, Şekil 17, Tablo 9).



Şekil 16. Östradiol a ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi



Şekil 17. Testosterona ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklem

Tablo 9. E2 ve T ait H295R besiyeriunda hazırlanan standart kalibrasyon çözeltilerinin LC MS/MS'e enjeksiyonu ile elde edilen kalibrasyon doğrusu formülleri ($y=ax+b$) ve alıkonma zamanları ve belirleme katsayıları (R^2).

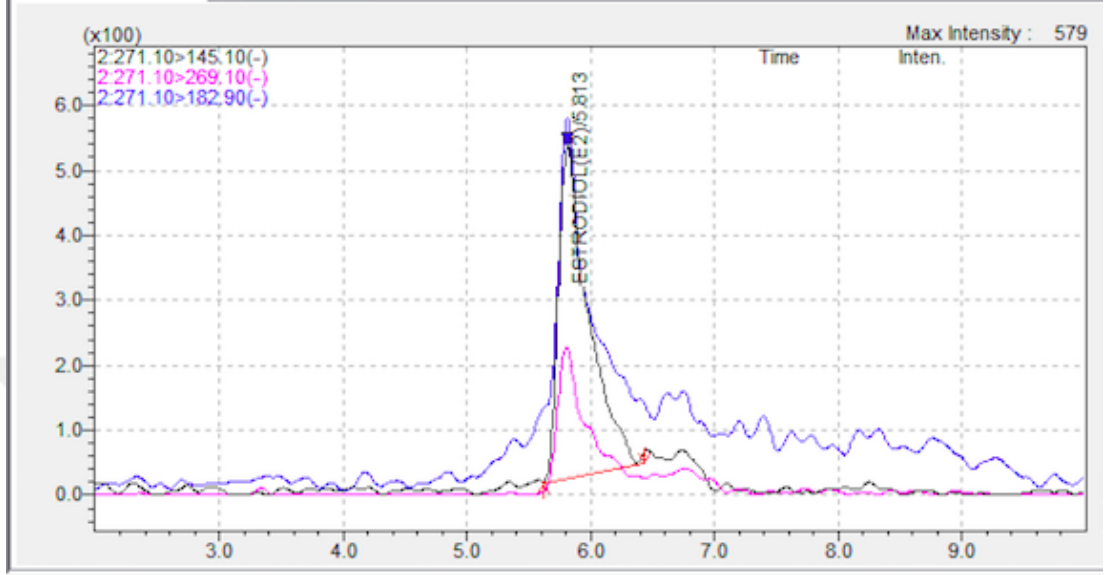
	Doğru Formülü ($y=ax+b$)	Belirleme katsayısı (R^2)
Testosteron	14,58x + 204,86	0,968
Östradiol	9,81x + 112,60	0,996

Analizlerin geçerliliği konusunda belirleme katsayısının $\geq 0,95$ olmasının kabul edilebilir olduğu göz önüne alındığında uygulanan metodun kabul edilebilir doğrusallığa sahip olduğu görülmüştür.

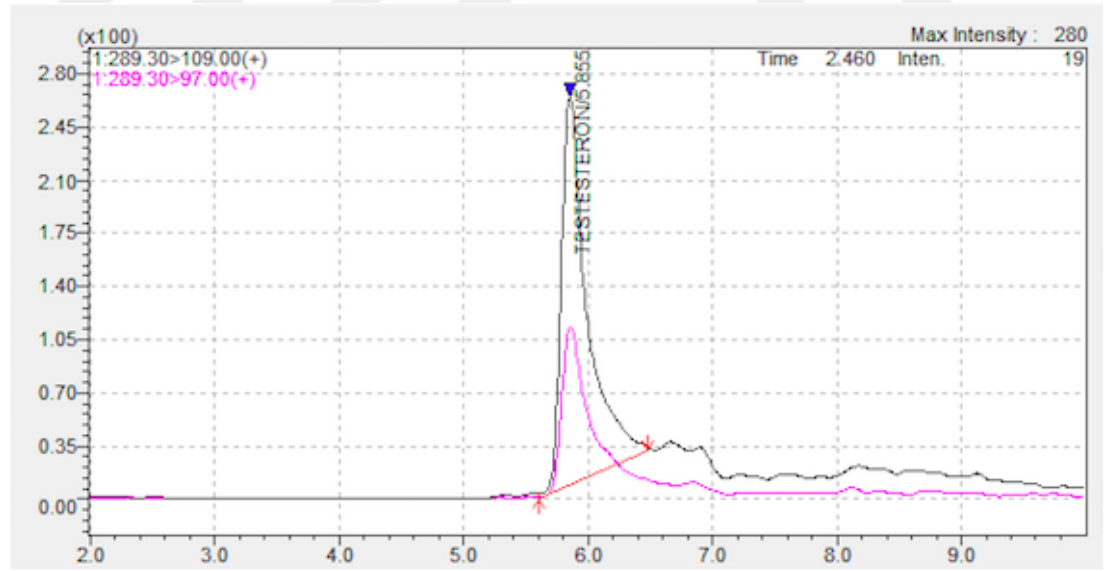
4.1.2.3. Analitik Ölçüm Limitleri

LOD ve LOQ değerlerini belirleyebilmek için 0,025 ng/ml'ye kadar metanol ile seri dilüsyon yapıldı ve H295R besiyeriuna eklenerek ön işlem basamaklarından geçirilerek hazırlanan örnek LC MS/MS cihazına verilmiştir. T ve E2'ye ait kromatogram pikinin 0,5 dk öncesi ve 0,5 dk sonrası alınan kromatogram kesitinin zemin sinyali (S/N) yükseklik ortalamalarının LOD için 3 katı, LOQ için ise 10 katı olacak şekilde hesaplanmıştır. E2 ve T, LOD ve LOQ hesabında kullanılan kromatogramlar Şekil 18 ve Şekil 19'da ve LOD ve LOQ değerleri Tablo 10'da

verilmiştir. LOD ve LOQ'ya ait değer, T ve E2'ye ait kromatogram pikinin 0,5 dk öncesi ve 0,5 dk sonrası alınan kromatogram kesitinin zemin sinyali (S/N) yükseklik ortalamalarının LOD için 3 ve LOQ için 10 katı olacak şekilde hesaplanmıştır.



Şekil 18. LOD ve LOQ hesabında kullanılan E2 kromatogramı



Şekil 19. LOD ve LOQ hesabında kullanılan T kromatogramı

Tablo 10. LC MS/MS validasyonu sonucu elde edilen T ve E2'ye ait LOD ve LOQ değerleri

Hormon	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Testosteron	0,001	0,005
Östradiol	0,004	0,015

4.1.2.4. Tekrarlanabilirlik (Precision)

4.1.2.4.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik Çalışması

Bu çalışmada düşük konsantrasyon 0,025 ng/ml, yüksek konsantrasyon 0,1 ng/mL'lik T ve E2 standartları H295R besiyeriuna eklenerek ön işlem basamaklarından geçirilmiştir. Ön işlem sonrası hazırlanan örnek 6 farklı bağımsız çalışma olarak gün içinde LC MS/MS cihazında okutulmuştur. Elde edilen veriler Tablo 11 ve Tablo 12'de verilmiştir.

4.1.2.4.2. Günlerarası Tekrarlanabilirlik Çalışması

Bu çalışmada düşük konsantrasyon 0,025 ng/ml, yüksek konsantrasyon 0,1 ng/mL'lik T ve E2 standartları H295R besiyeriuna eklenerek ön işlem basamaklarından geçirilmiştir. Ön işlem sonrası hazırlanan örnek 6 farklı günde 6 farklı bağımsız çalışma olarak gün içinde LC MS/MS cihazında okutulmuştur. Elde edilen veriler Tablo 11 ve Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 11. Östradiol için günüçi ve günlerarası tekrarlanabilirlik verileri

Gün İçi Tekrarlanabilirlik (n=6)	Ortalama (ng/ml)	Standart Sapma	% VK	Günlerarası Tekrarlanabilirlik (6 farklı gün n=6)	Ortalama (ng/ml)	Standart Sapma	% VK
Düşük Konsantrasyon (0,025 ng/ml)	0,0252	0,00098	3,91	Düşük Konsantrasyon (0,025 ng/ml)	0,0260	0,0015	5,96
Yüksek Konsantrasyon (0,10 ng/ml)	0,106	0,00136	1,28	Yüksek Konsantrasyon (0,10 ng/ml)	0,107	0,0021	2,04

Tablo 12. Testosteron için günüçi ve günlerarası tekrarlanabilirlik verileri

Gün İçi Tekrarlanabilirlik (n=6)	Ortalama (ng/ml)	Standart Sapma	% VK	Günlerarası Tekrarlanabilirlik (6 farklı gün n=6)	Ortalama (ng/ml)	Standart Sapma	% VK
Düşük Konsantrasyon (0,025 ng/ml)	0,0242	0,0011	6,94	Düşük Konsantrasyon (0,025 ng/ml)	0,0237	0,0012	5,12
Yüksek Konsantrasyon (0,10 ng/ml)	0,105	0,0024	2,30	Yüksek Konsantrasyon (0,10 ng/ml)	0,103	0,0024	2,33

4.1.2.5. Gerikazanım (Recovery)

Bölüm 3.4.2.4.2’de anlatıldığı gibi hazırlanan örnekler verilen formülde hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Tablo 13’de verilmiştir.

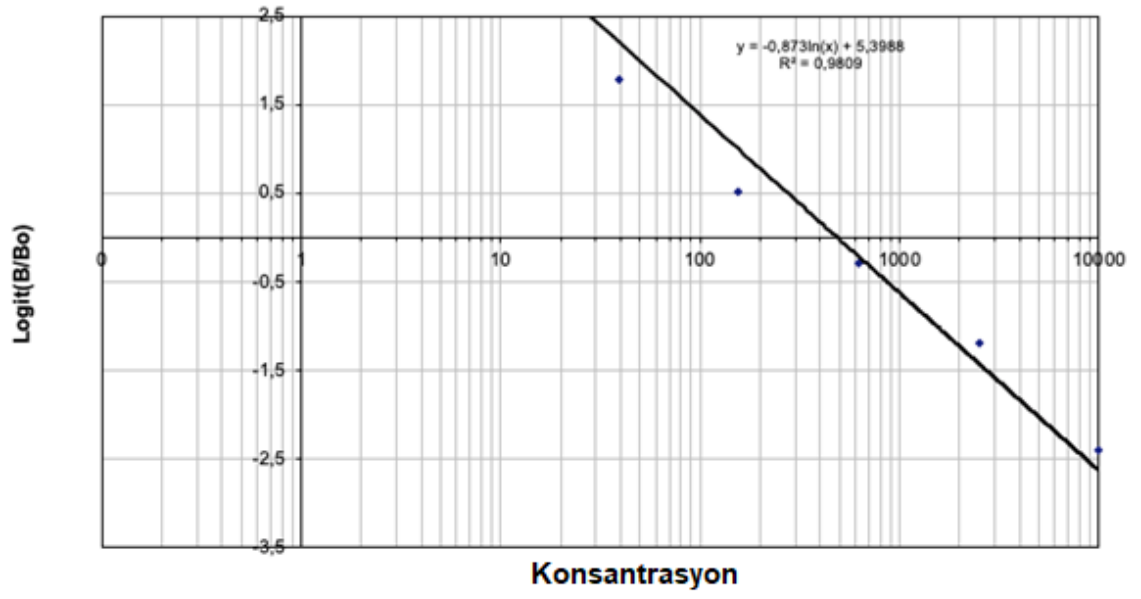
Tablo 13. Geri kazanım çalışmaları sonuçları

	Geri Kazanım(%)
E2 (0,025 ng/ml)	74,44
E2 (0,10 ng/ml)	88,80
T (0,025 ng/ml)	77,27
T (0,10 ng/ml)	80,46

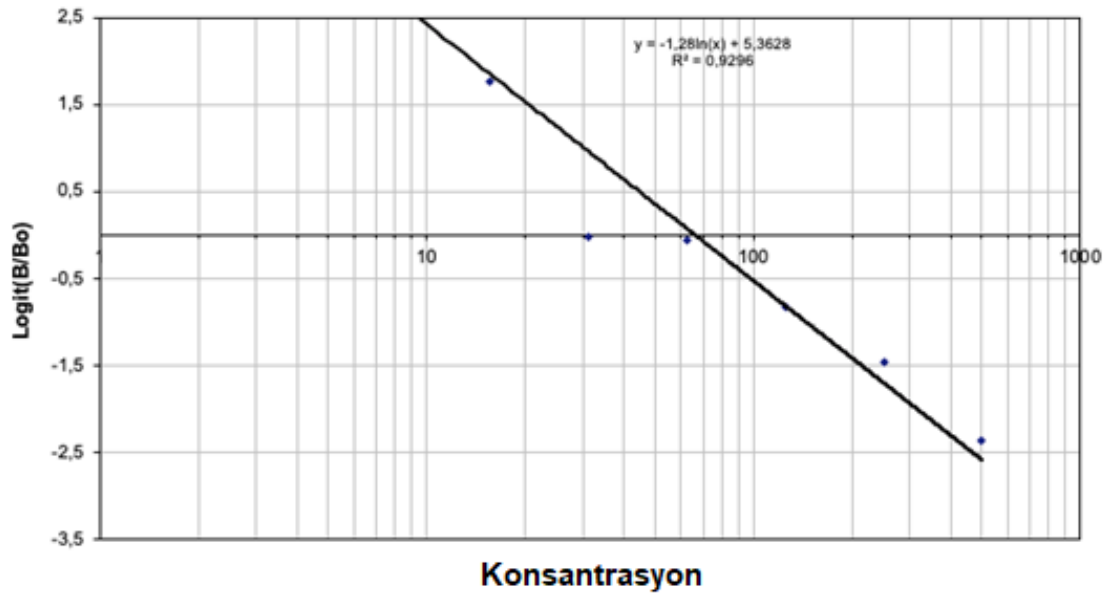
4.1.3. ELISA ile Hormon Analiz Yönteminin Kısmi Validasyonu

Doğrusallığı belirlemek amacıyla, Bölüm 3.2.3.2.1 ve Bölüm 3.2.3.2.2 de belirtildiği gibi E2 ve T standartları hazırlanmış ve spektrofotometrede okutulmuştur. Elde edilen verilere göre kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 20 ve Şekil 21).

Gün içi tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi için aynı gün içinde 3 farklı kuyucuktaki forskolin ve proklorazin T ve E2 üzerine etkisi, analizler arası tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi için ise 2 farklı günde aynı maddelerin T ve E2 üzerine olan etkisi ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. ELISA yöntemine ait günüçi ve günlerarası ortalama, standart sapma değerleri ve % varyasyon katsayısı hesaplanmıştır (Tablo 14 ve Tablo 15). Elde edilen sonuçlara göre yöntemin başarılı bir şekilde çalıştığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 20. ELISA yöntemi ile elde edilen östradiole ait kalibrasyon doğrusu



Şekil 21. ELISA yöntemi ile elde edilen testosterona ait kalibrasyon doğrusu

Tablo 14. ELİSA yönteminin “gün içi ve günler arası” tekrarlanabilirliğinin referans bileşikler olan Forskolin ve Prokloraz varlığında östradiol düzeylerinin ölçülmesi ile değerlendirilmesi

Gün içi Tekrarlanabilirlik (n=3)	Ortalama (nM)	Standart Sapma	%VK
Forskolin (10µM)	10,10	0,91	9,01
Prokloraz (1 µM)	1,27	0,02	1,63

Günler arası Tekrarlanabilirlik (n=6)	Ortalama (nM)	Standart Sapma	%VK
Forskolin (10µM)	9,75	0,60	6,15
Prokloraz (1 µM)	1,63	0,51	0,31

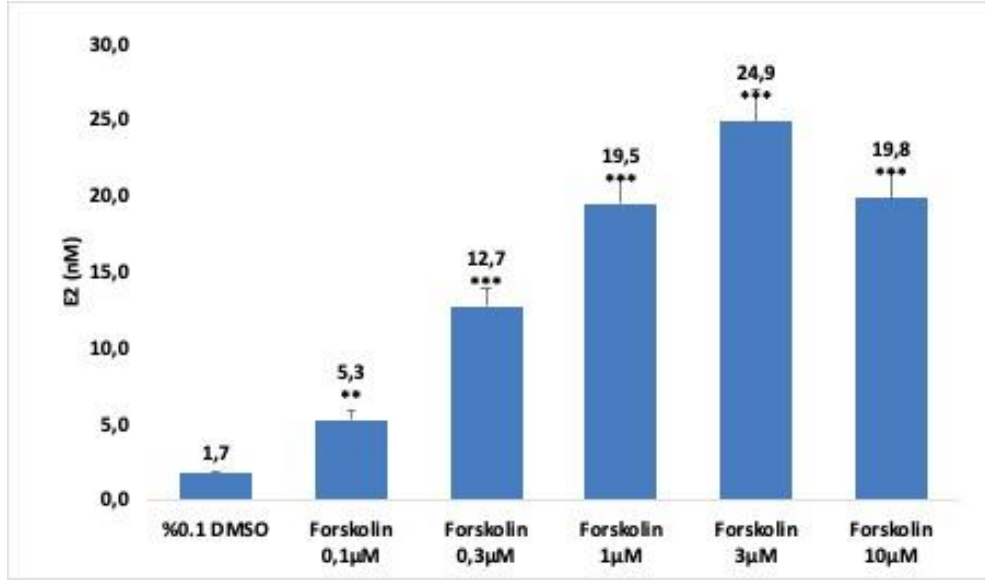
Tablo 15. ELİSA yönteminin “gün içi ve günler arası” tekrarlanabilirliğinin referans bileşikler olan Forskolin ve Prokloraz varlığında testosteron düzeylerinin ölçülmesi ile değerlendirilmesi

Gün içi Tekrarlanabilirlik (n=3)	Ortalama (nM)	Standart Sapma	%VK
Forskolin (10µM)	3,21	0,23	7,41
Prokloraz (1 µM)	0,86	0,06	7,73

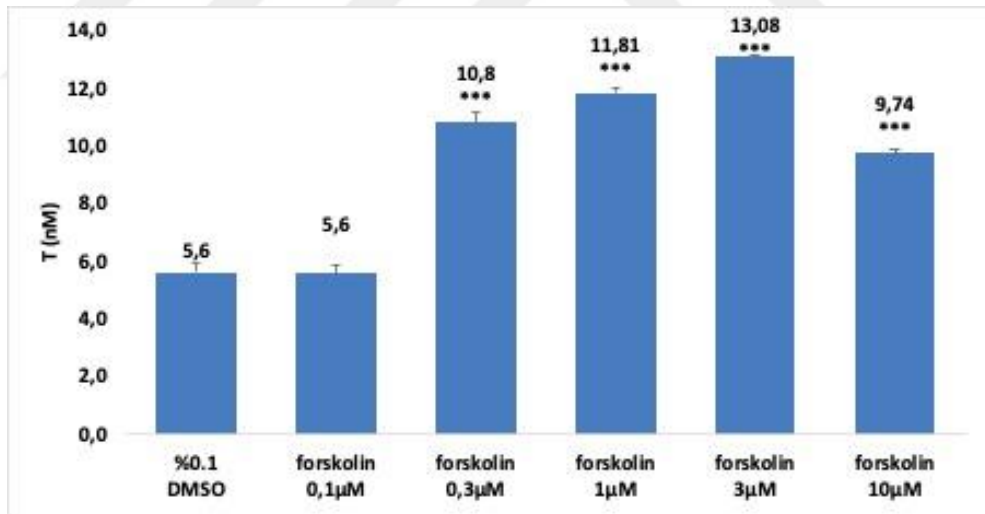
Günler arası Tekrarlanabilirlik (n=6)	Ortalama (nM)	Standart Sapma	%VK
Forskolin (10µM)	3,25	0,20	6,39
Prokloraz (1 µM)	0,74	0,05	7,04

4.2. Referans Maddelerin Testosteron ve Östradiol Üzerine Etkilerinin LC MS/MS Yöntemi ile Araştırılması

H295R hücreleri **forskolinin** 0,1µM, 0,3µM, 1µM, 3µM, 10µM konsantrasyonları ile inkübe edilmiş ve besiyeri içindeki E2 düzeyleri %0.1 DMSO kontrolünde belirlenen E2 düzeyleri ile kıyaslanmıştır. Sonuç olarak forskolinin artan konsantrasyonlarında E2 miktarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir. Bununla birlikte kullanılan en yüksek konsantrasyon olan 10 µM’da E2 düzeylerinde artışın sürmediği ve hatta düşüş olduğu belirlenmiştir (Şekil 22). Besiyeri içindeki T düzeyleri % 0,1 DMSO kontrolünde belirlenen T düzeyleri ile kıyaslandığında forskolinin konsantrasyona bağlı olarak T miktarını arttırdığı görülmüştür (Şekil 22). OECD TG-456 kılavuzunda belirtildiği gibi hücre canlılığı açısından incelendiğinde forskolin ile inkübe edilen hücrelerde, hiçbir konsantrasyonda, %80’in altında canlılık gözlenmemiştir (Şekil 26).



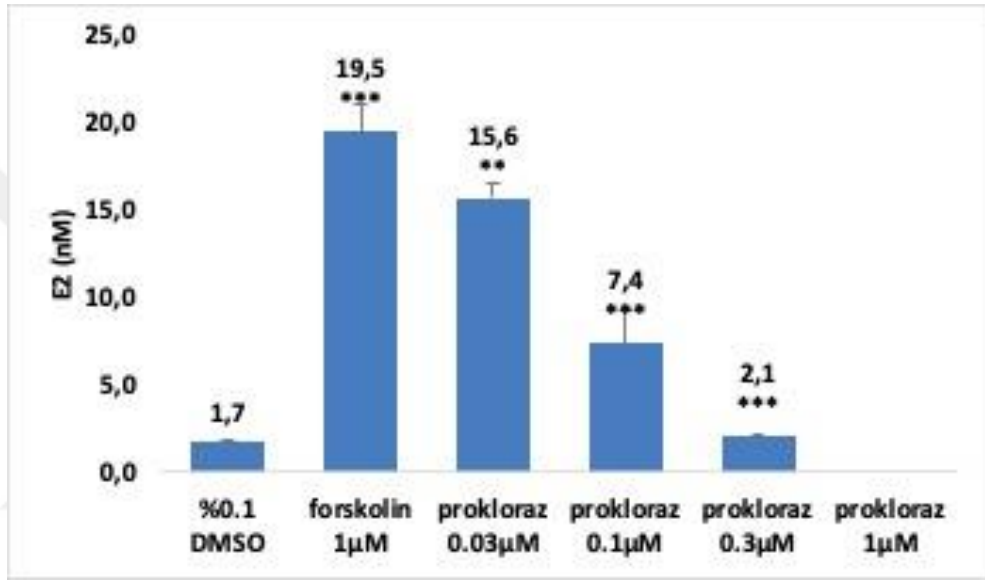
Şekil 22. Forskolin'in E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen sayısal değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme DMSO kontrol grubuna göre yapılmıştır.* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$



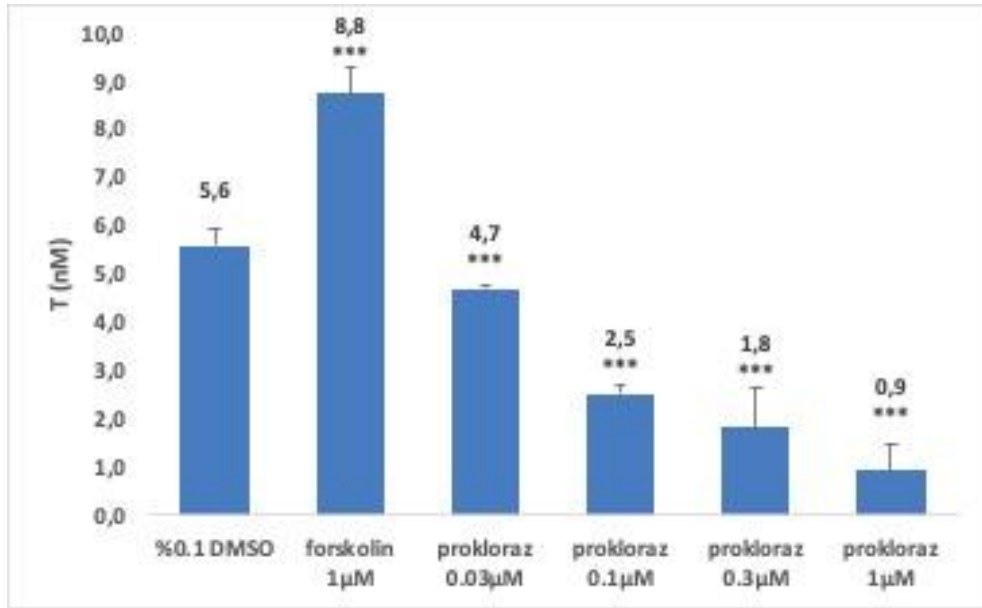
Şekil 23. Forskolin'in T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen sayısal değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme DMSO kontrol grubuna göre yapılmıştır.* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

Prokloraz 0.03-1µM konsantrasyon aralığında uygulanan proklorazın MTT analizi sonucunda hücre canlılığı üzerine etkileri incelenmiş olup %0.1 DMSO kontrolüne

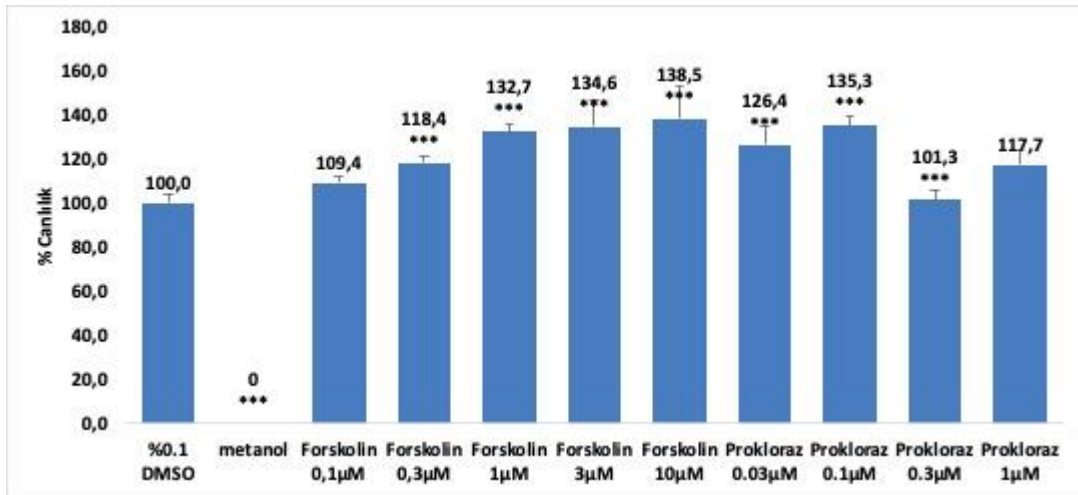
kıyasla hücre canlılığında artışa neden olduğu görülmüştür (Şekil 26). Şekil 24 ve Şekil 25'te gösterildiği üzere 0.03-1 μM konsantrasyon aralığında prokloraza maruz bırakılan hücrelerde aynı zamanda prestimülasyon amaçlı 1 μM forskolin kullanılmıştır. Maruziyet sonrası elde edilen E2 ve T düzeyleri 1 μM forskolinin kontrol amaçlı kullanıldığı E2 düzeyleri ile kıyaslanmıştır. Hücre canlılığında görülen artışa rağmen, proklorazın konsantrasyona bağımlı olarak E2 ve T miktarında azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir.



Şekil 24. Prokloraz'ın E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Prokloraz gruplarında hücreler uygulanan prokloraz konsantrasyonları ile birlikte 1 μM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz için forskolin 1 μM kontrol grubuna göre yapılmıştır.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

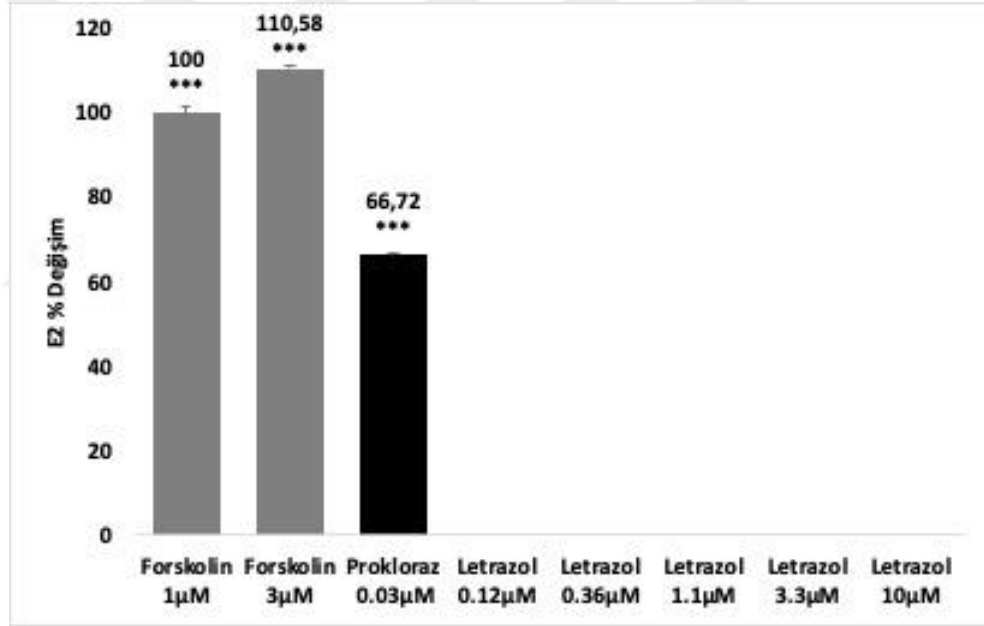


Şekil 25. Proklorazın T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Prokloraz gruplarında hücreler uygulanan farklı konsantrasyonlarda prokloraz ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

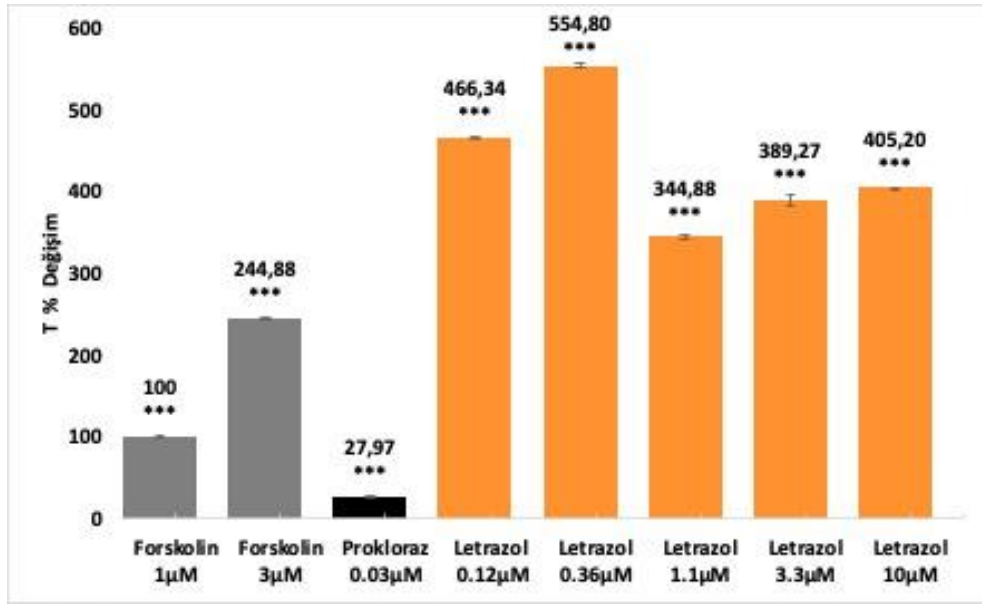


Şekil 26. H295R hücrelerinde Forskolin ve Prokloraz'ın hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0.1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01

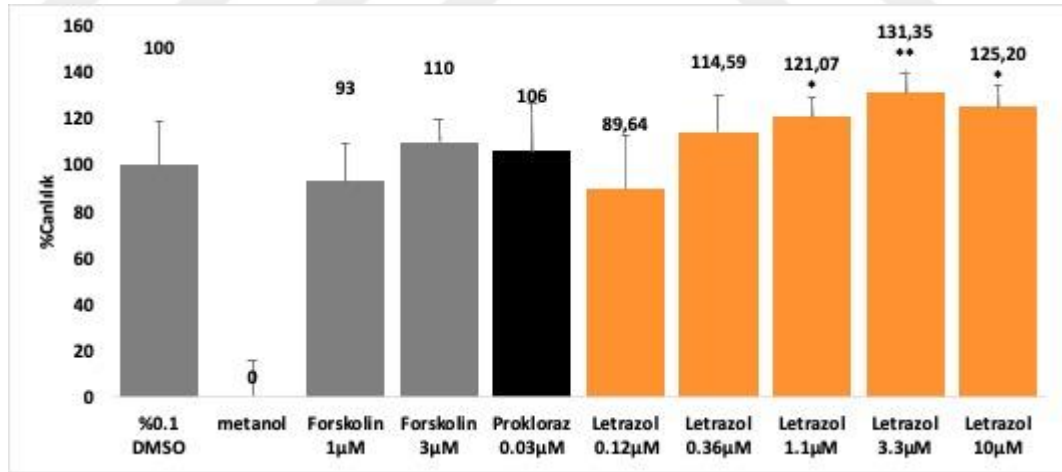
Güçlü aromataz inhibitörü olarak bilinen **Letrazol** 0,12-10 μ M aralığında 5 farklı konsantrasyonda uygulanmış olup, 1 μ M forskolin ile stimüle edilmiş H295R hücrelerinde E2 ve T üretimi üzerine olan etkisi LC MS/MS yöntemi ile değerlendirilmiştir (Şekil 27 ve Şekil 28). Letrazol OECD TG-456 kılavuzunda belirtildiği gibi uygulanan hiçbir konsantrasyonda hücre canlılığını %80'nin altına düşürmediği için tüm T ve E2 verileri değerlendirilmeye alınmıştır (Şekil 29). Letrazol, uygulanan tüm konsantrasyonlarda E2 düzeylerini ölçülebilirlik sınırlarının altına düşürmüştür; E2 piki görülememiştir. Letrazolün uygulanan tüm konsantrasyonlarında, pozitif kontrol olan forskolinin 3 μ M konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında T düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 27. Letrazolün E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Letrazol gruplarında hücreler uygulanan letrazol konsantrasyonları ile birlikte 1 μ M forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 μ M kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



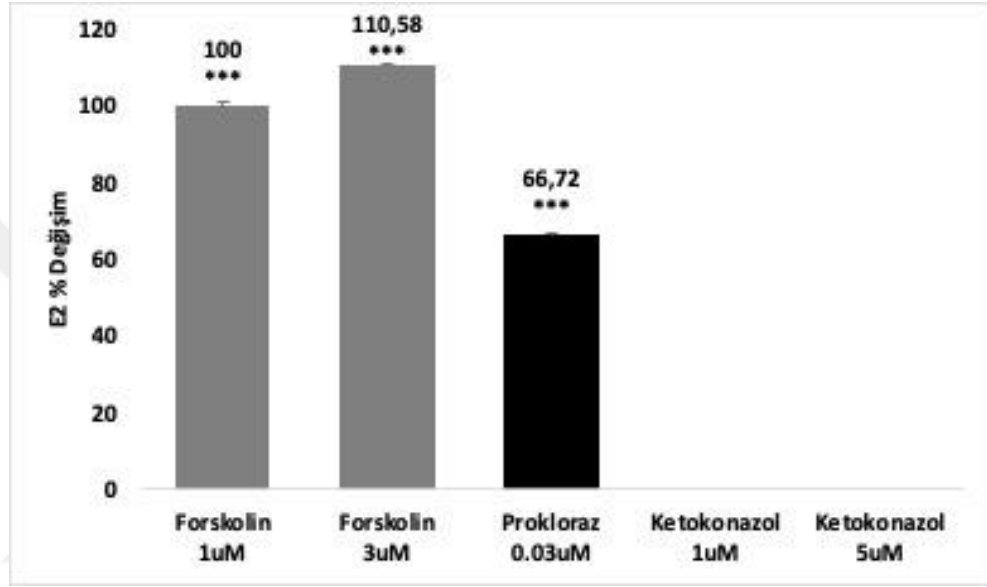
Şekil 28. Letrazolün T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Letrazol gruplarında hücreler uygulanan letrazol konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



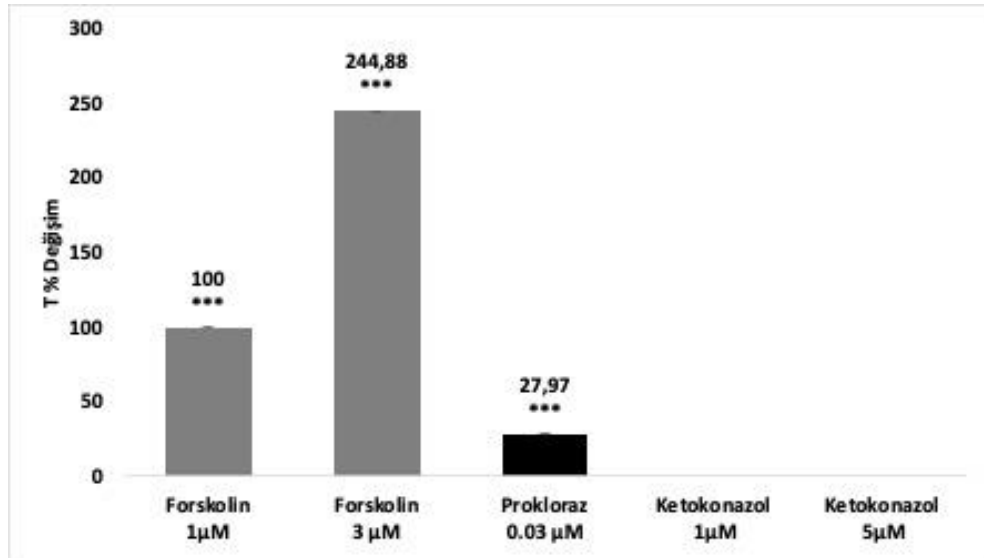
Şekil 29. H295R hücrelerinde letrazolün hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01

Ketokonazolün (1 ve 5 µM konsantrasyonda) 1 µM forskolin ile stimüle edilmiş H295R hücrelerinde T ve E2 sentezi üzerine etkileri LC MS/MS yönteminde

hormonların ölçülmesi ile değerlendirilmiştir (Şekil 30 ve Şekil 31). Ketakonazol ile inkübe edilen hücrelerde T ve E2'e ait herhangi bir pik elde edilememiştir. Ketakonazol ile inkübe edilen hücrelerde MTT analizi yapılmamıştır ancak literatürde çok sayıda çalışma aynı hücrelerde canlılık üzerine hiçbir olumsuz etkisi olmadığını bildirmektedir (Hecker et al., 2018; Jumhawan et al., 2017; Nielsen et al., 2012; Sanderson et al., 2002)

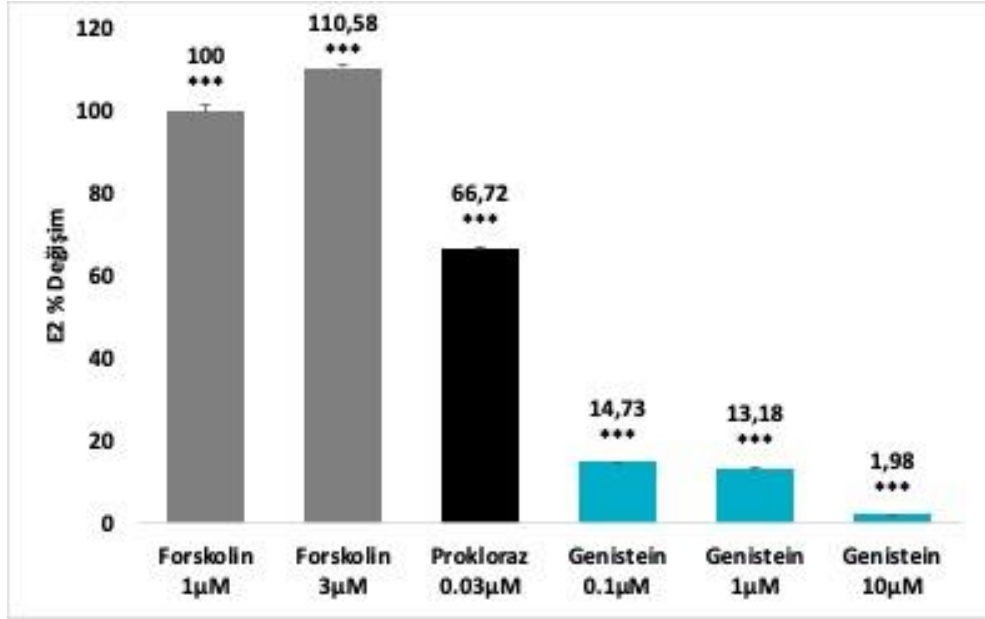


Şekil 30. Ketokonazolün E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Ketokonazol gruplarında hücreler uygulanan ketokonazol konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001

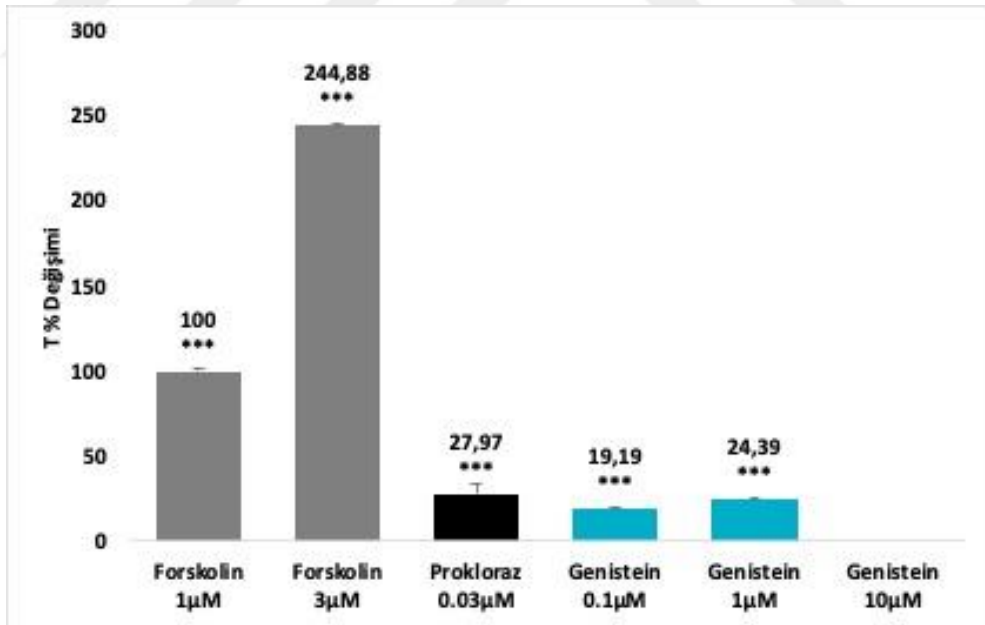


Şekil 31. Ketokonazolün T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Ketokonazol gruplarında hücreler uygulanan ketokonazol konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001

Genisteinin, 0.1-10 µM konsantrasyon aralığında 1 µM forskolin ile stimüle edilmiş H295R hücrelerinde T ve E2 sentezi üzerine etkileri LC MS/MS yönteminde hormonların ölçülmesi ile değerlendirilmiştir (Şekil 32 ve Şekil 33). Elde edilen veriler pozitif kontrol olan forskolinin 3 µM konsantrasyonuyla karşılaştırıldığında E2 ve T değişimi genisteinin artan konsantrasyonuyla istatistiksel olarak anlamlı ve sabit bir düşüş göstermiştir (Şekil 32 ve Şekil 33). Genistein ile inkübe edilen hücrelerde MTT analizi yapılmamıştır ancak literatür verileri aynı hücrelerde canlılık üzerine hiçbir olumsuz etkisi olmadığını göstermektedir (Hecker et al., 2018; Mesiano et al., 1999; Nielsen et al., 2012; Ohlsson et al., 2010; Sanderson et al., 2002, 2004).



Şekil 32. Genisteinin E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Genistein gruplarında hücreler uygulanan genistein konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

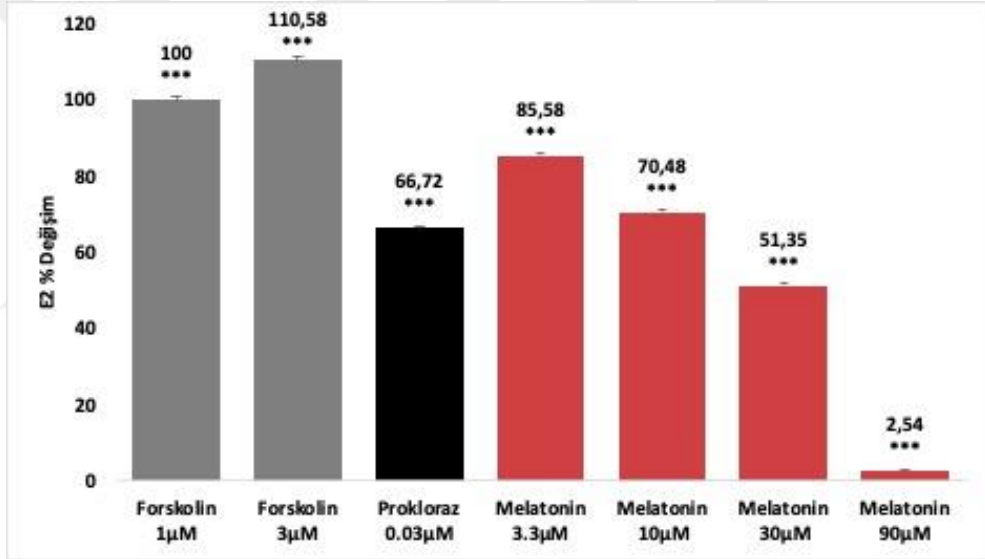


Şekil 33. Genisteinin T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Genistein gruplarında hücreler farklı konsantrasyonlarda uygulanan genistein ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

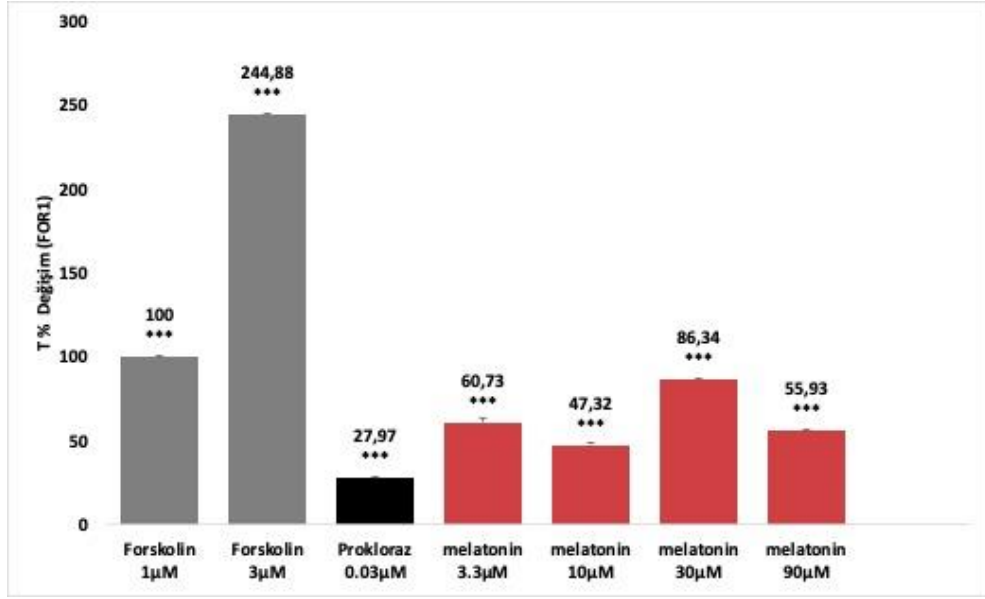
4.3. Test Maddelerin Testosteron ve Östradiol Üzerine Etkilerinin LC MS/MS Yöntemi İle Araştırılması

4.3.1. Melatonin

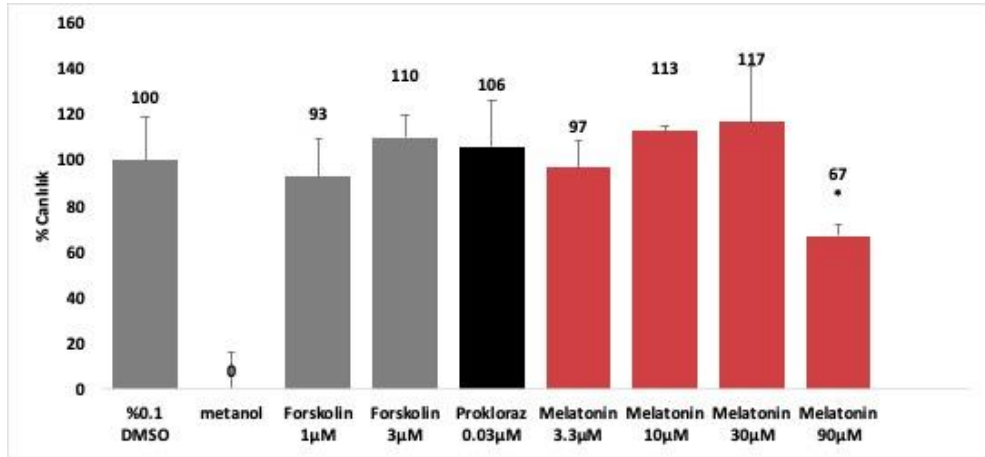
Melatonin, 3.3-90 μM konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. %0.1'lik DMSO'nun kontrol olarak kullanıldığı MTT analizinde melatonin 90 μM lık konsantrasyon haricinde diğer konsantrasyonlarında hücre canlılığında %80'nin altında değer elde edilmemiştir (Şekil 36). Şekil 34 ve Şekil 35'de görüldüğü üzere uygulanan melatonin konsantrasyonları pozitif kontrol olan forskolinin 3 μM konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında E2 ve T değerlerinde düşüşe sebep olduğu görülmüştür.



Şekil 34. Melatoninin E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Melatonin gruplarında hücreler uygulanan melatonin konsantrasyonları ile birlikte 1 μM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 μM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



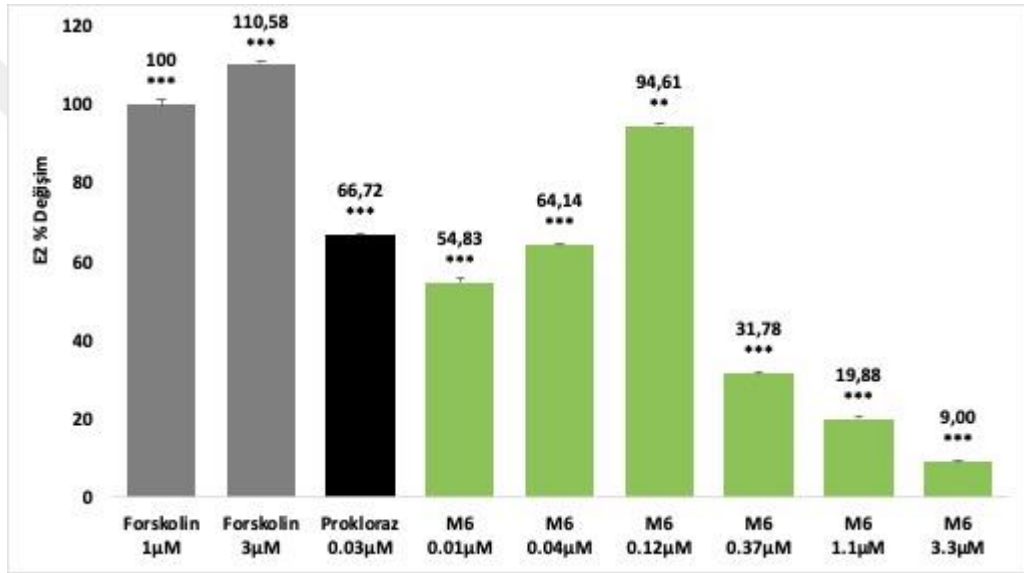
Şekil 35. Melatoninin T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. Melatonin gruplarında hücreler uygulanan melatonin konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



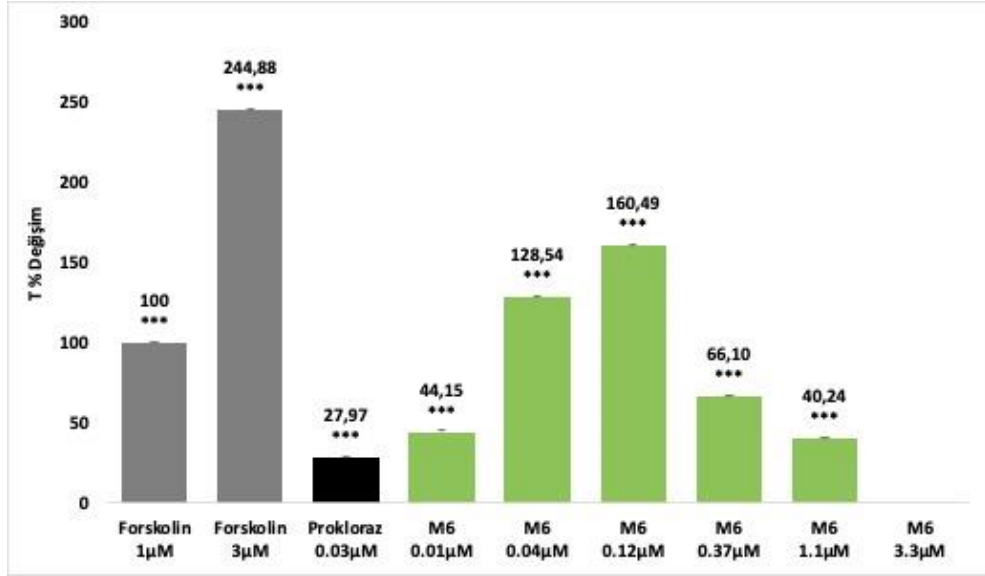
Şekil 36. H295R hücrelerinde melatoninin hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler %0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .

4.3.2. 2-Metil-1-H-Indol-3-Karboksialdehit(4-Klorofenil) Hidrazon (M6)

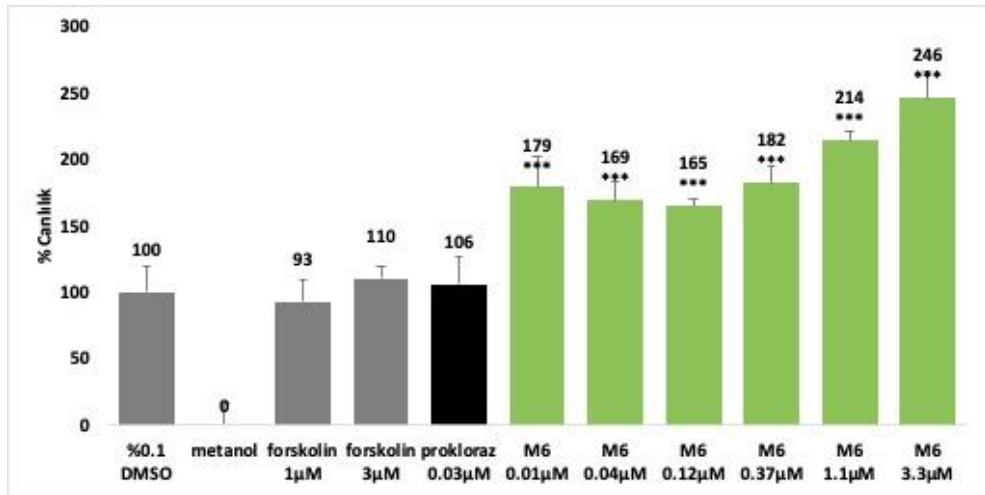
İndol grubu melatonin analogu olan M6, 0.01-3.3 μ M konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. % 0.1'lik DMSO'nun kontrol olarak kullanıldığı MTT analiz sonucuna göre M6'nın uygulanan tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığında artışa sebep olduğu görülmüştür (Şekil 39). Hücre canlılığındaki artışa rağmen M6 pozitif kontrol olan forskolinin 3 μ M konsantrasyonuyla karşılaştırıldığında bifazik bir şekilde inhibisyona neden olarak E2 ve T de azalmaya neden olduğu görülmüştür (Şekil 37 ve Şekil 38).



Şekil 37. M6'nın E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. M6'nın gruplarında hücreler uygulanan M6 konsantrasyonları ile birlikte 1 μ M forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 μ M kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



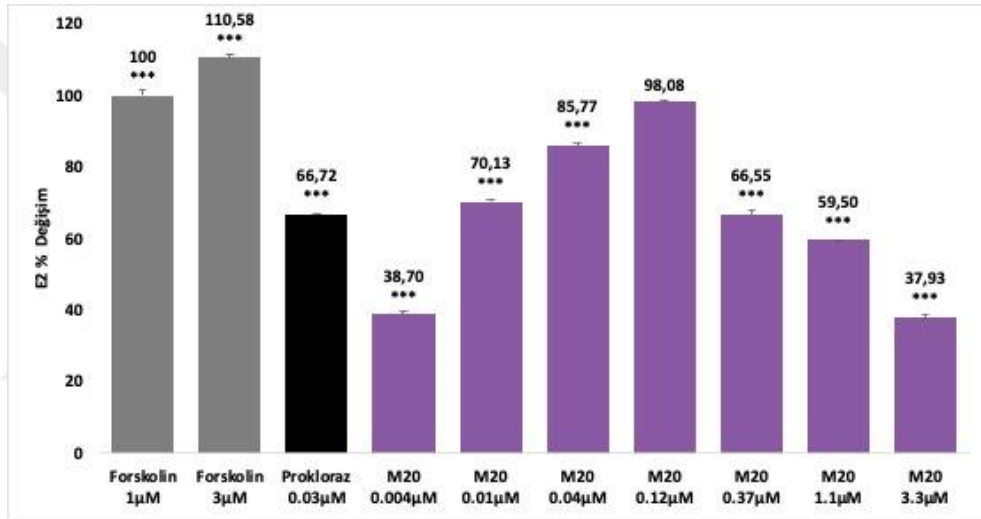
Şekil 38. M6nın T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. M6nın gruplarında hücreler uygulanan M6 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



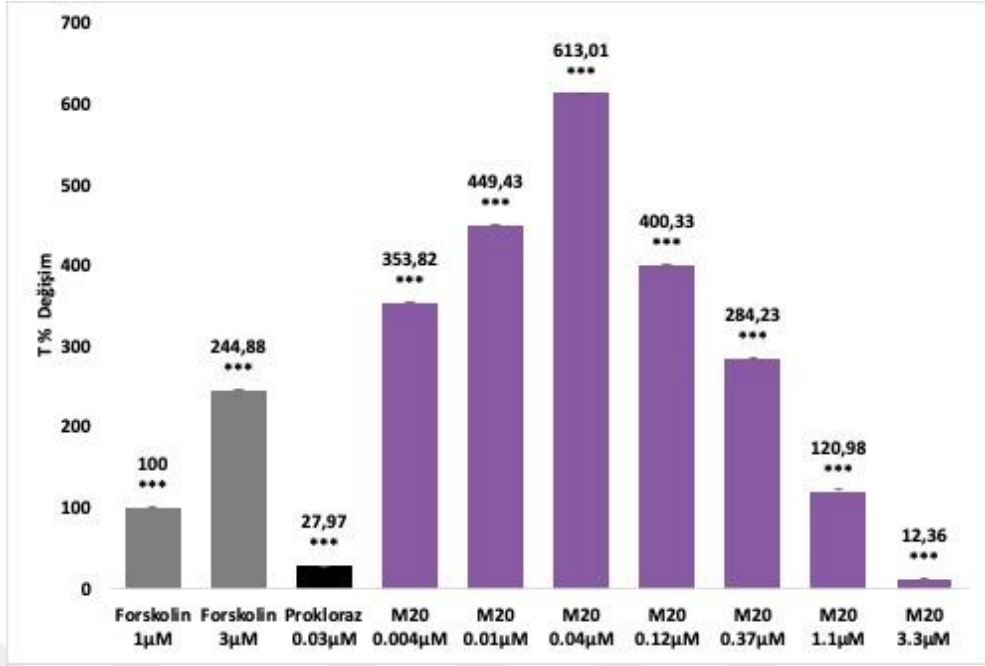
Şekil 39. H295R hücrelerinde M6nın hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler %0.1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .

4.3.3. 2-Metilindol-3-Karboksialdehit Fenil Hidrazon (M20)

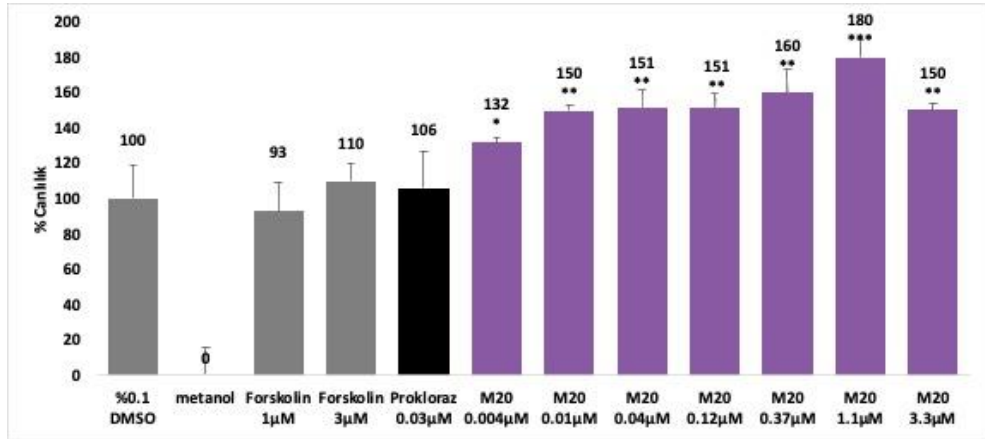
İndol grubu melatonin analogu olan M20, 0.004-3.3 μ M konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. %0.1'lik DMSO'nun kontrol olarak kullanıldığı MTT analiz sonucuna göre M6'nın uygulanan tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığında artışa sebep olduğu görülmüştür (Şekil 42). Hücre canlılığında artışa sebep olmasına rağmen pozitif kontrol olan forskolinin 3 μ M'lık konsantrasyonuyla yapılan karşılaştırmada bifazik bir şekilde E2 de azalışa neden olduğu görülmüştür (Şekil 40). M20'nin 0.004-0.37 konsantrasyonu arasında T artışına, 1.1 ve 3.3 μ M konsantrasyonlarında ise T da azalmaya neden olduğu görülmüştür (Şekil 41).



Şekil 40. M20nin E2 üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. M20nin gruplarında hücreler uygulanan M20 konsantrasyonları ile birlikte 1 μ M forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 μ M kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



Şekil 41. M20nin T üzerine etkisinin LC MS/MS tekniği ile belirlenmesi. M20nin gruplarında hücreler uygulanan M20 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler LC MS/MS'den elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

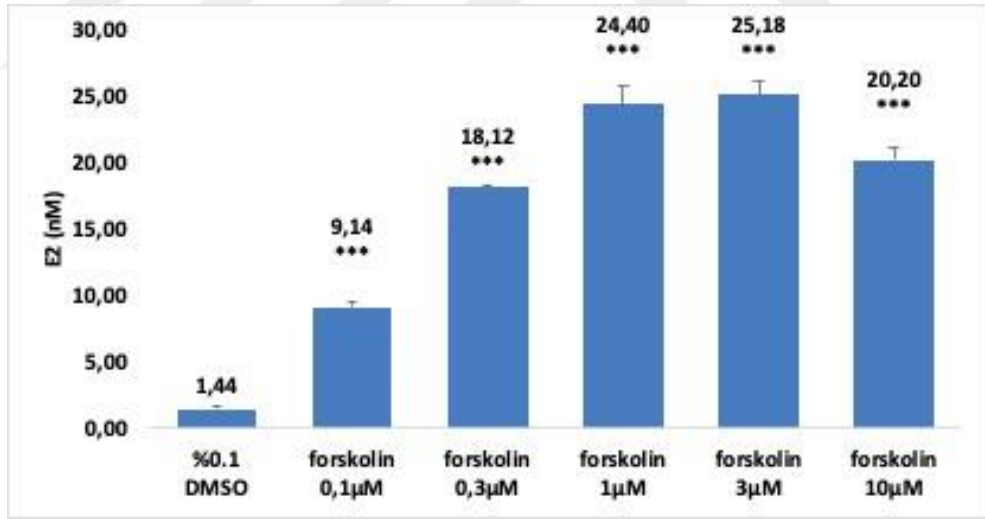


Şekil 42. H295R hücrelerinde M20nin hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler %0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01

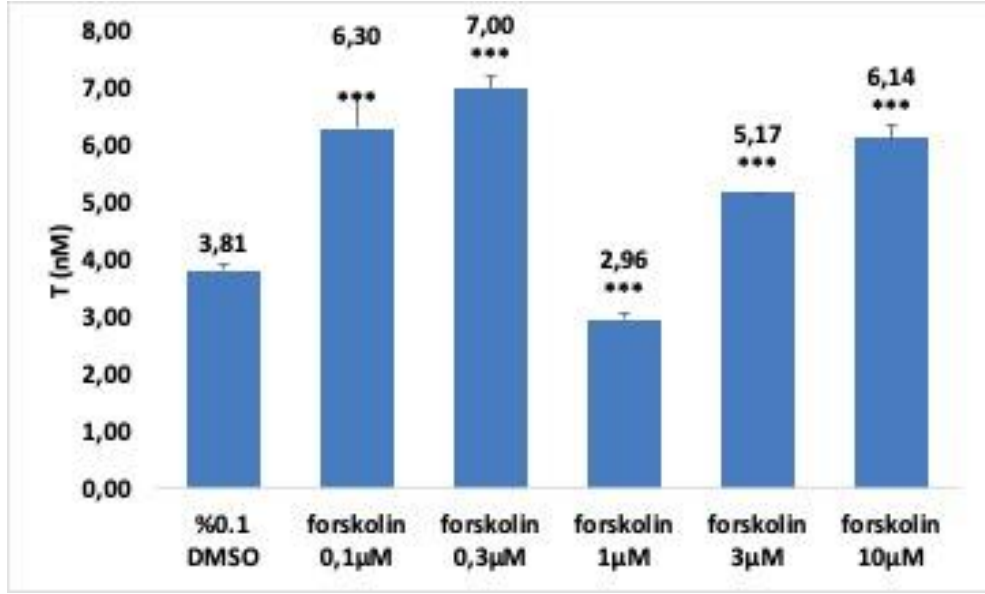
4.4 Referans Maddelerin Testosteron ve Östradiol Üzerine Etkilerinin ELISA

Yöntemi ile Araştırılması

H295R hücreleri **forskolinin** 0,1 μ M-10 μ M aralığındaki konsantrasyonları ile inkübe edilmiş ve besiyeri içindeki E2 düzeyleri %0,1 DMSO kontrolünde belirlenen E2 düzeyleri ile kıyaslanmıştır. Sonuç olarak forskolinin artan konsantrasyonları ile E2 miktarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir. Forskolinin uygulanan 10 μ M konsantrasyonunda E2 düzeylerindeki artışı sürdürmediği ve hatta düşüşe neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 43). Besiyeri içindeki T düzeyleri %0,1 DMSO kontrolünde belirlenen T düzeyleri ile kıyaslandığında forskolinin konsantrasyona bağlı olarak T miktarını arttırdığı görülmüştür (Şekil 44). Yalnızca forskolinin 1 μ M'lık konsantrasyonunda T miktarını azalttığı görülmüştür. OECD TG-456 kılavuzunda belirtildiği gibi hücre canlılığı açısından incelendiğinde forskolin ile inkübe edilen hücrelerde, hiçbir konsantrasyonda, %80'in altında canlılık gözlenmemiştir (Şekil 47).

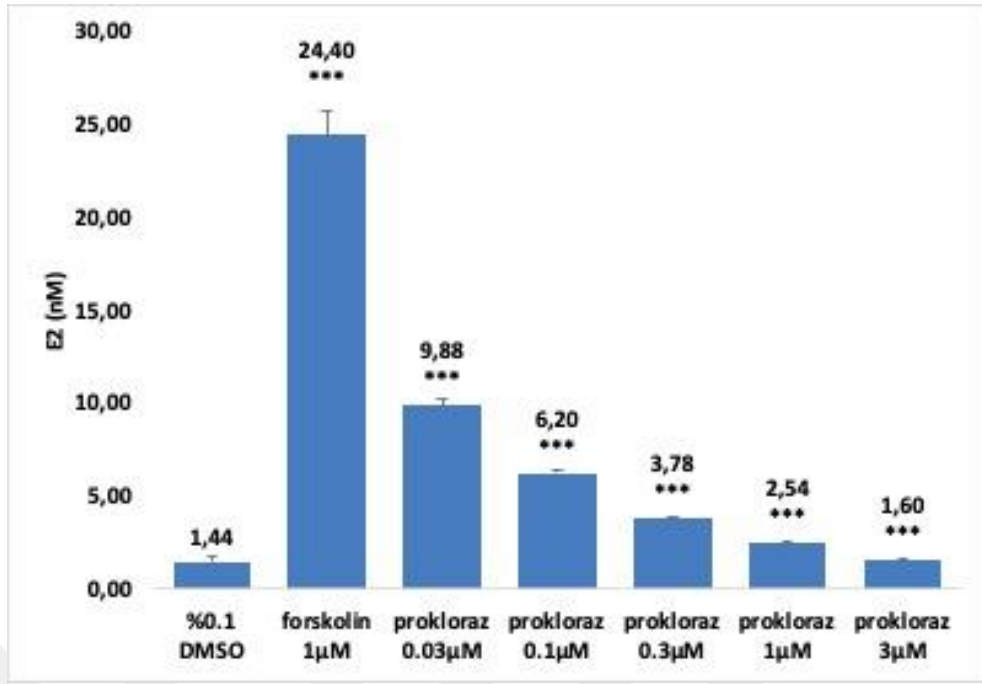


Şekil 43. Forskolin'in E2 üzerine olan etkisine ait ELİSA sonuç grafiği Barlar üzerindeki değerler ELİSA'dan elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme DMSO kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

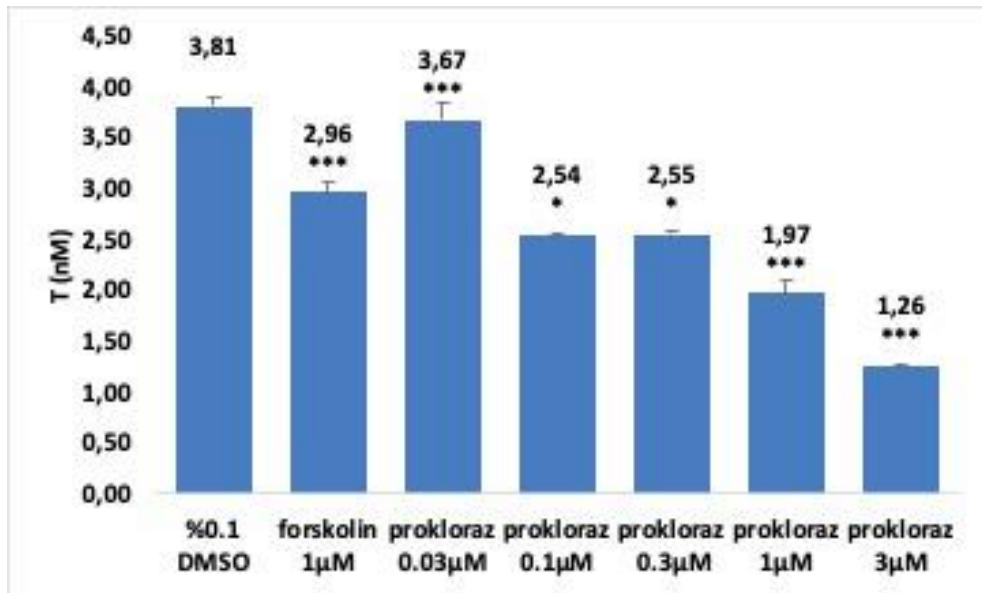


Şekil 44. Forskolin'in T üzerine olan etkisine ait ELİSA sonuç grafiği Barlar üzerindeki değerler ELİSA'dan elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme DMSO kontrol grubuna göre yapılmıştır.* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

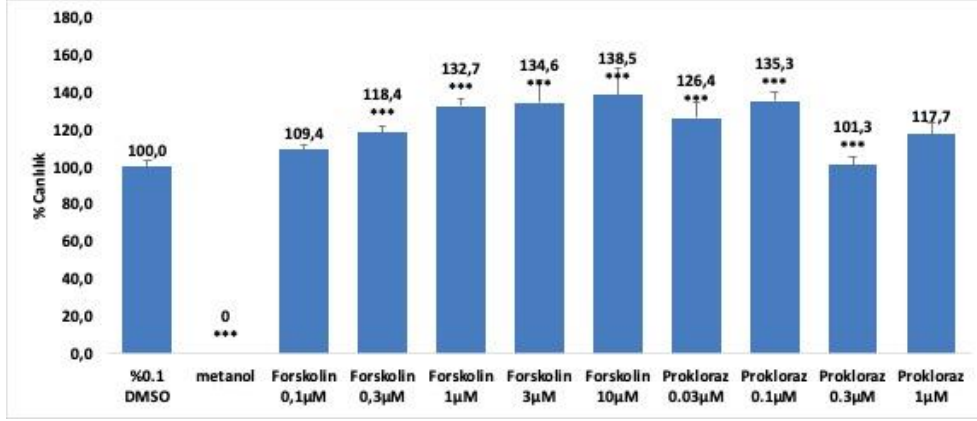
Prokloraz 0.03µM-1µM aralığında uygulanmıştır. %0.1 DMSO'nun kontrol olarak kullanıldığı MTT analizinde proklorazın uygulanan tüm konsantrasyonlarının hücre canlılığında artışa neden olduğu görülmüştür (Şekil 47). 0.03-1 µM konsantrasyon aralığında prokloraza maruz bırakılan hücrelerde aynı zamanda presitimülasyon amaçlı 1 µM forskolin kullanılmıştır. Maruziyet sonrası elde edilen E2 ve T düzeyleri 1 µM forskolinin kontrol amaçlı kullanıldığı E2 düzeyleri ile kıyaslanmıştır. Hücre canlılığında görülen artışa rağmen, proklorazın konsantrasyona bağımlı olarak E2 ve T miktarında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 45 ve Şekil 46). Sadece proklorazın 0.03 µM'lık konsantrasyonu T miktarında azalmaya neden olmamıştır.



Şekil 45. Prokloraz'ın E2 üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. Prokloraz gruplarında hücreler uygulanan prokloraz konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001



Şekil 46. Prokloraz'ın T üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. Prokloraz gruplarında hücreler uygulanan prokloraz konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .***p<0.001

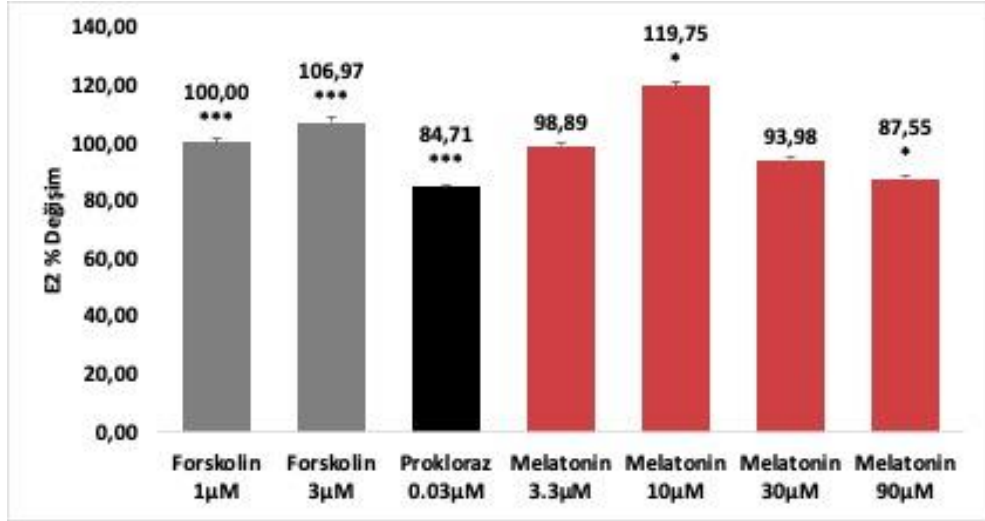


Şekil 47. H295R hücrelerinde Forskolin ve Prokloraz'ın hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

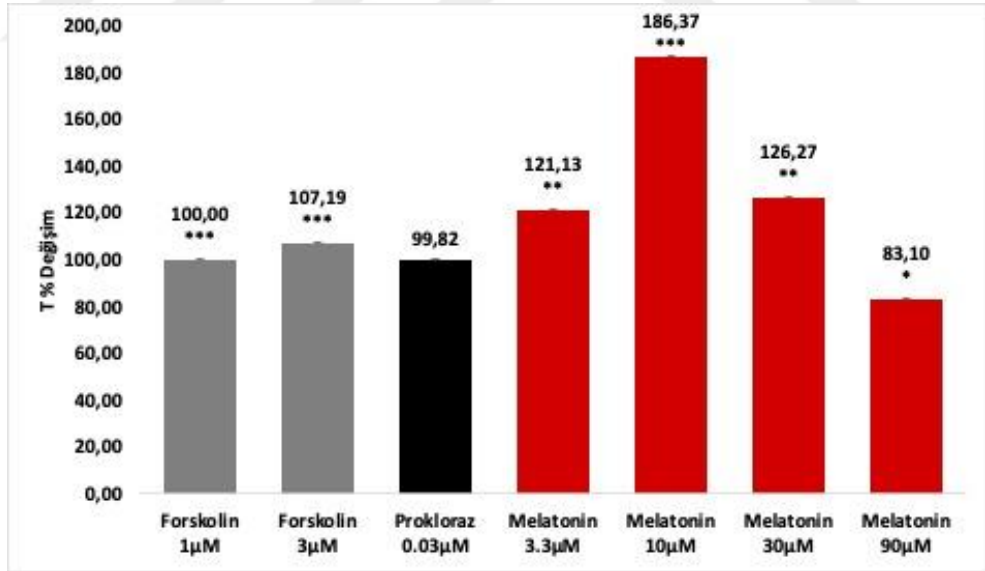
4.5. Test Maddelerin Testosteron ve Östradiol Üzerine Etkinliklerinin ELISA Yöntemi ile Araştırılması

4.5.1 Melatonin

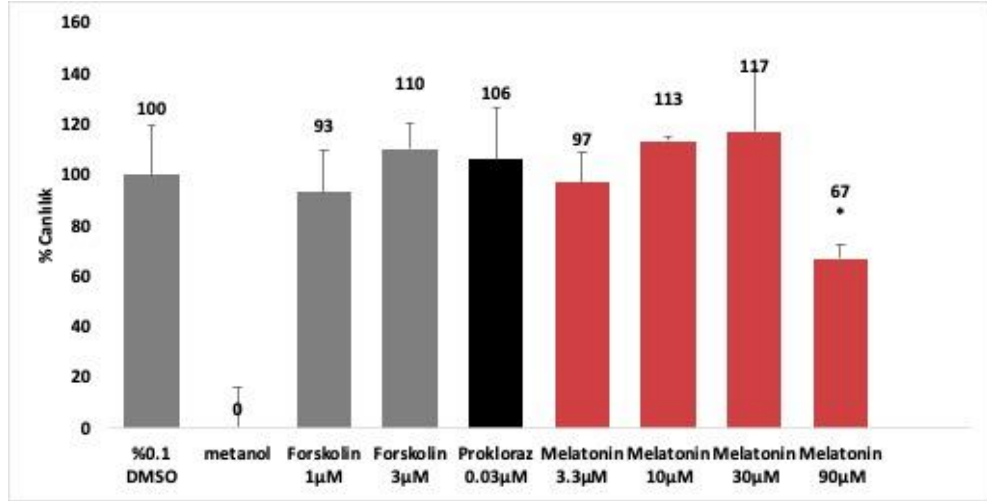
H295R hücrelerindeki T ve E2 üzerine olan değişimini ELISA yöntemiyle ölçmek için **melatonin** 3,3-90 µM aralığındaki konsantrasyonlarda, uygulanmıştır. % 0.1'lik DMSO nun kontrol olarak kullanıldığı MTT analizinde melatoninin 90 µMlık konsantrasyonu haricinde uygulanan diğer konsantrasyonlarda hücre canlılığında %80'nin altında değer elde edilmemiştir (Şekil 50). Melatoninin tüm konsantrasyonları pozitif kontrol olan forskolinin 3 µM konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında; melatoninin 10 µMlık konsantrasyonu haricinde E2 değerlerinde düşüşe sebep olduğu, T değerlerinde ise, 90 µMlık konsantrasyonu haricinde artışa neden olduğu görülmüştür (Şekil 48 ve Şekil 49).



Şekil 48. Melatoninin E2 üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. Melatonin gruplarında hücreler uygulanan melatonin konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



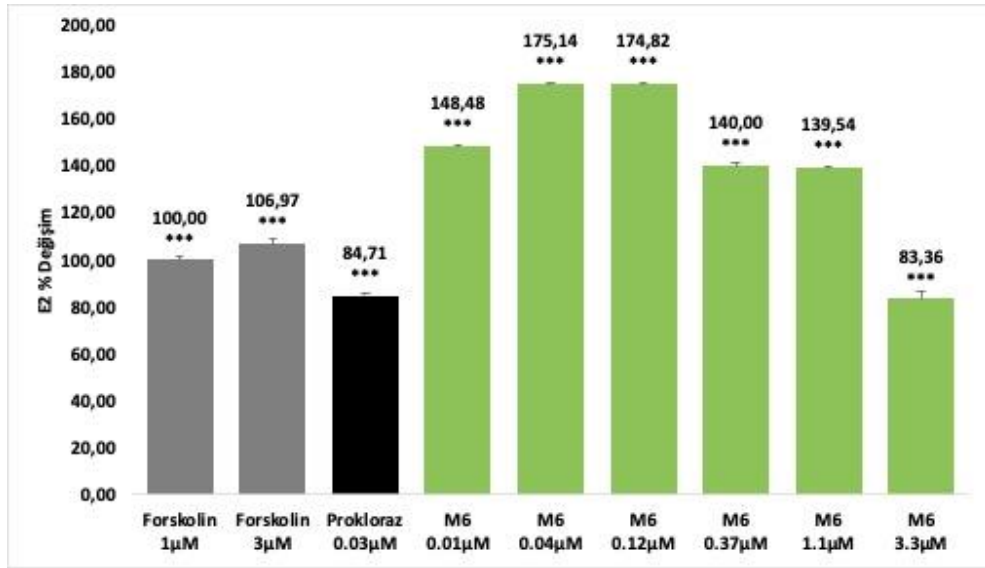
Şekil 49. Melatoninin T üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. Melatonin gruplarında hücreler uygulanan melatonin konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



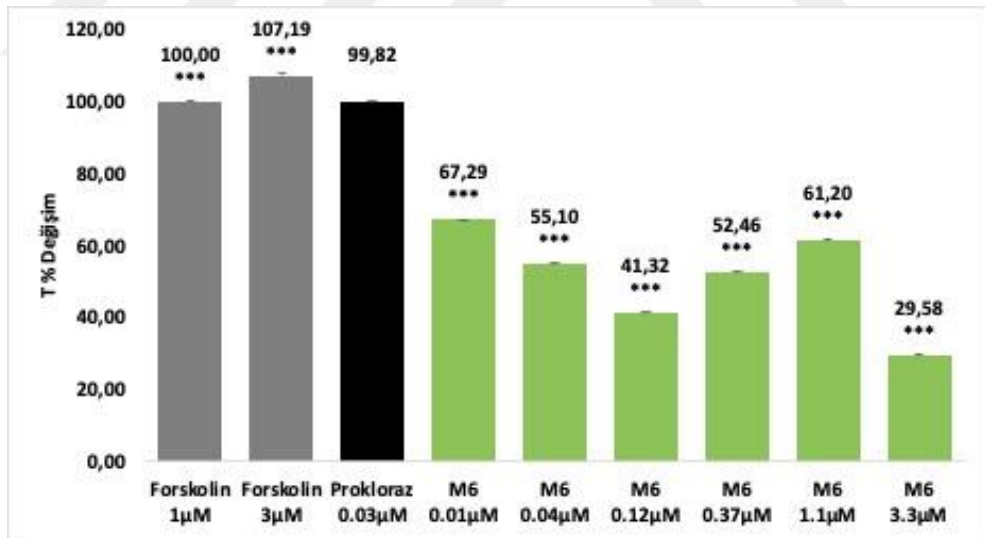
Şekil 50. H295R hücrelerinde melatoninin hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .

4.5.2. 2-Metil-1-H-İndol-3-Karboksialdehit (4-klorofenil) Hidrazon (M6)

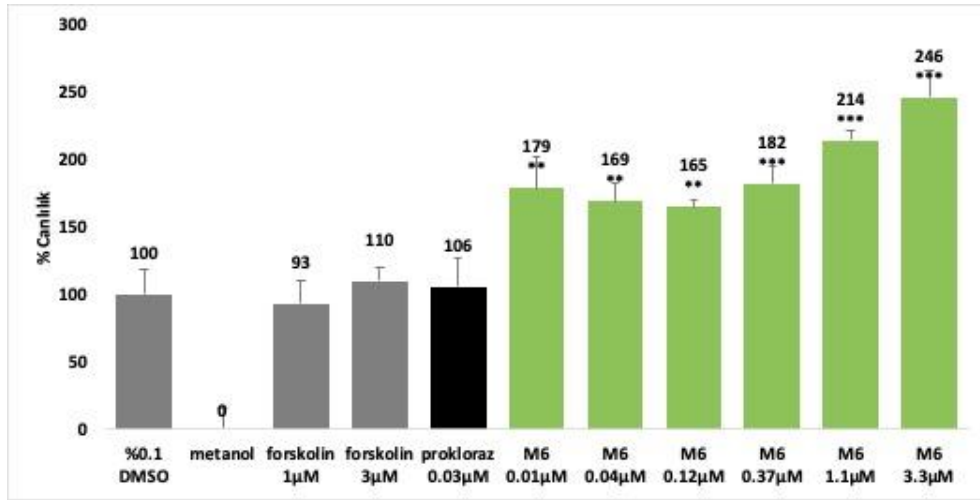
M6, 0.01-3.3 µM konsantrasyon aralığında H295R hücre kültüründe, T ve E2 hormonlarındaki değişimin ELISA yöntemiyle ölçülmesi için uygulanmıştır. %0.1'lik DMSO kontrolün kullanıldığı MTT analizinde tüm konsantrasyonların hücre canlılığını arttırdığı görülmüştür (Şekil 53). M6'nın uygulanan tüm konsantrasyonları pozitif kontrol forskolin 3 µMla karşılaştırıldığında bifazik bir şekilde E2 de artışa neden olurken, T de ise azalmaya neden olduğu görülmüştür. (Şekil 51 ve Şekil 52).



Şekil 51. M6nın E2 üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. M6nın gruplarında hücreler uygulanan M6 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



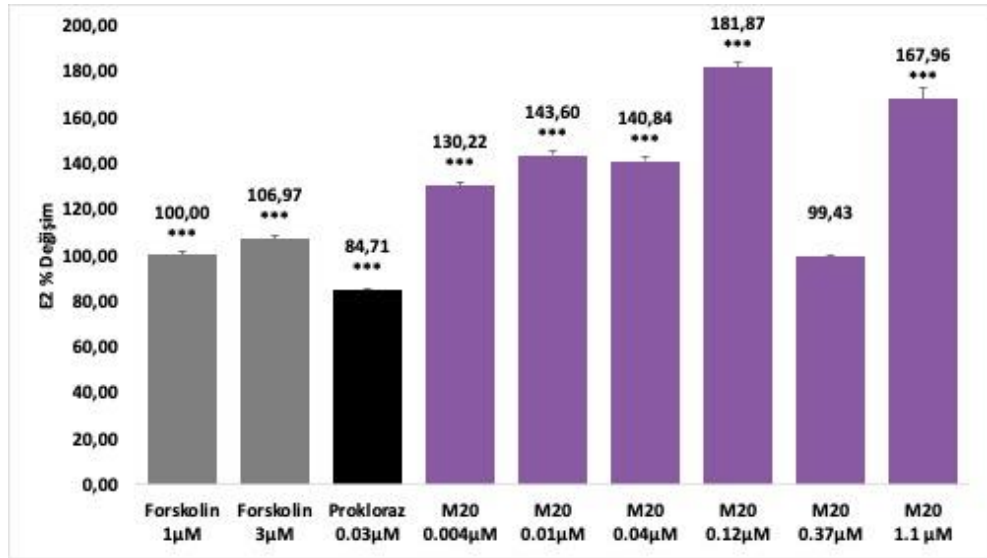
Şekil 52. M6nın T üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. M6nın gruplarında hücreler uygulanan M6 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme forskolin için DMSO, prokloraz ve test maddesi için forskolin 1 µM kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



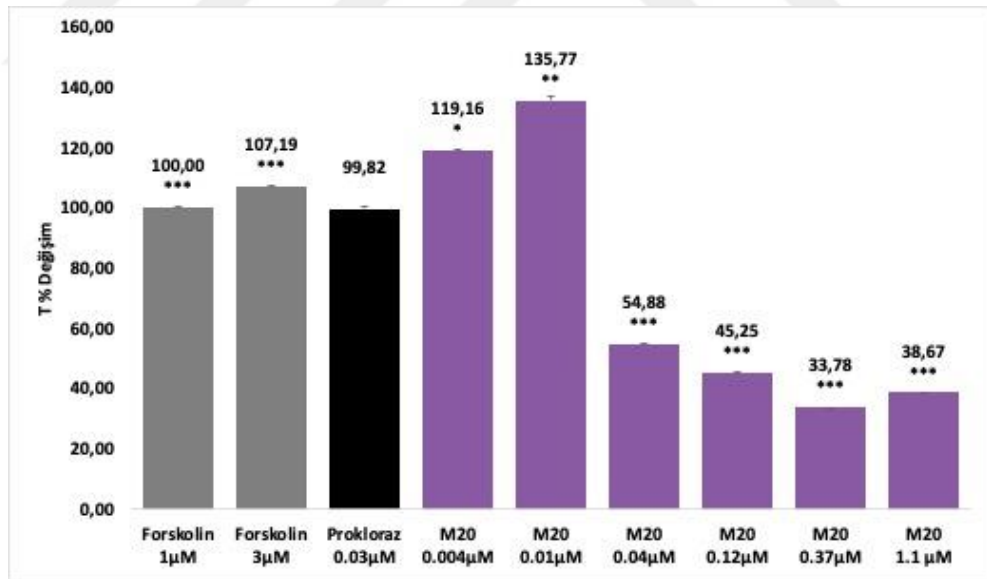
Şekil 53. H295R hücrelerinde M6nın hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler %0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, .

4.5.3. 2-Metilindol-3-Karboksialdehit Fenil Hidrazon (M20)

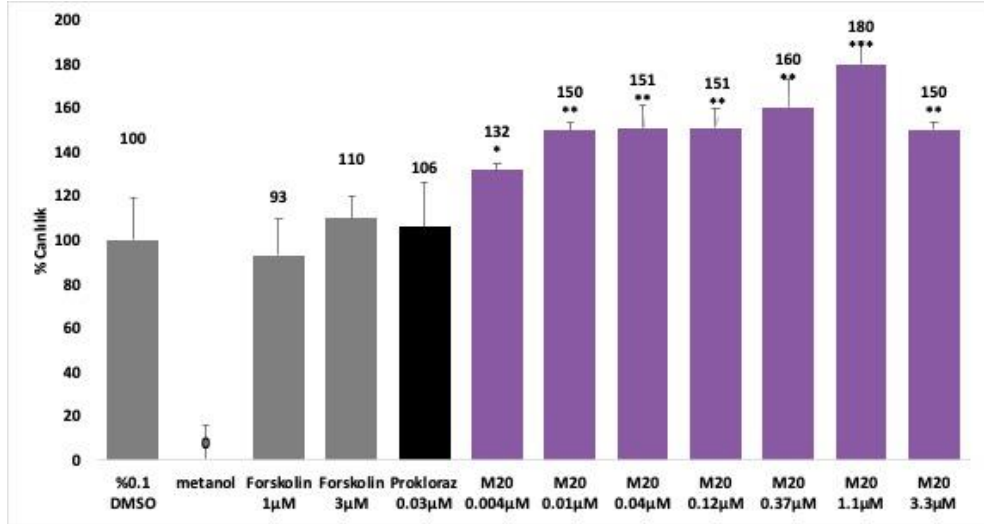
M20, 0.004-3.3 µM konsantrasyon aralığında H295R hücrelerinde T ve E2 değişimini ELISA yöntemiyle ölçmek amaçlı uygulanmıştır. %0.1'lik DMSO'nun kontrol olarak kullanıldığı MTT analizinde uygulanan tüm konsantrasyonların hücre canlılığında artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 56). T ve E2 değerleri pozitif kontrol forskolin 3 µM ile karşılaştırıldığında M20'nin 0,37 µM'lık konsantrasyonu hariç E2 de artışa neden olmuşken, 0.004 ve 0.01 konsantrasyonu hariç T da azalışa neden olduğu görülmüştür (Şekil 54 ve Şekil 55).



Şekil 54. M20nin E2 üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. M20 gruplarında hücreler uygulanan M20 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme DMSO kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



Şekil 55. M20nin T üzerine etkisinin ELISA tekniği ile belirlenmesi. M20 gruplarında hücreler uygulanan M20 konsantrasyonları ile birlikte 1µM forskoline de maruz bırakılmıştır. Barlar üzerindeki değerler ELISA'dan elde edilen değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme DMSO kontrol grubuna göre yapılmıştır.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



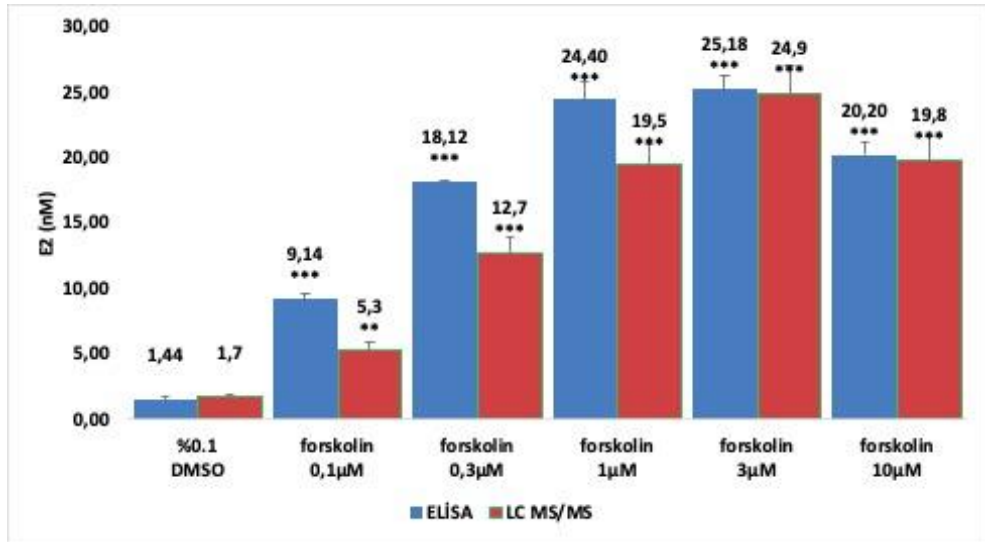
Şekil 56. H295R hücrelerinde M20nin hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler % 0,1 DMSO kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

4.6. LC MS/MS VE ELİSA Yöntemi ile Ölçülen E2 ve T Düzeylerinin Karşılaştırması

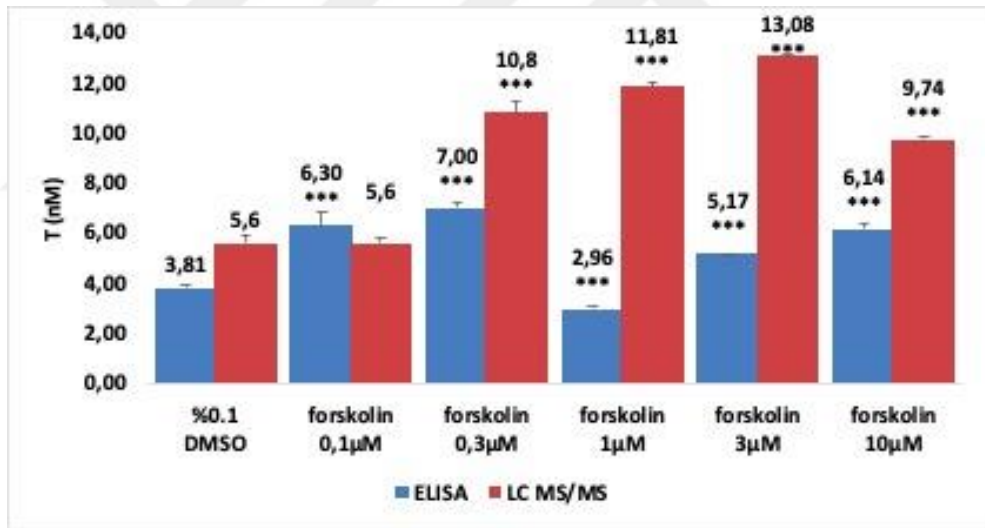
4.6.1. Referans Bileşikler ile Yapılan Çalışma Verilerinin Karşılaştırılması

Forskolinin steroidojenez yolağındaki indüksiyon yapıcı etkisi östradiol düzeyleri ölçülerek belirlenmiş ve forskolinin 0,1-3 µM aralığında artan konsantrasyonları ile gözlenen östradiol düzeylerindeki artışın her iki yöntemde de benzer bir patern gösterdiği, 10 µM forskolinin ise her iki yöntemle de östradiol düzeylerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 57). Artış ve azalma eğilimi her iki yöntemde benzer olmakla birlikte ELISA yöntemi ile daha yüksek değerler ölçüldüğü gözlenmiştir.

Forskolinin testosteron düzeyleri üzerine etkileri her iki yöntemle araştırıldığında ise bu kez LC-MS/MS yöntemi ile daha yüksek değerler ölçüldüğü gözlenmiştir (Şekil 58).



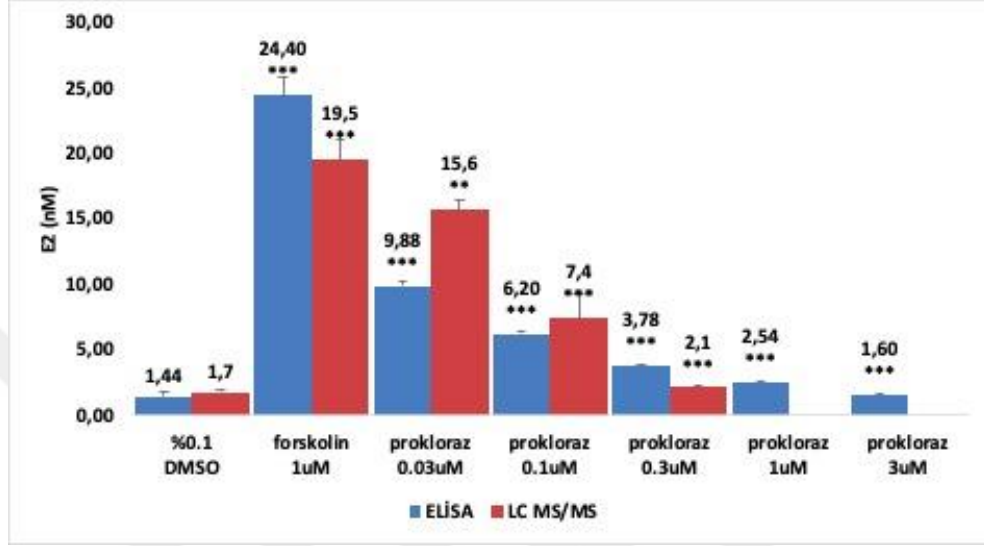
Şekil 57. Forskolin'in E2 üzerine etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



Şekil 58. Forskolin'in T üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

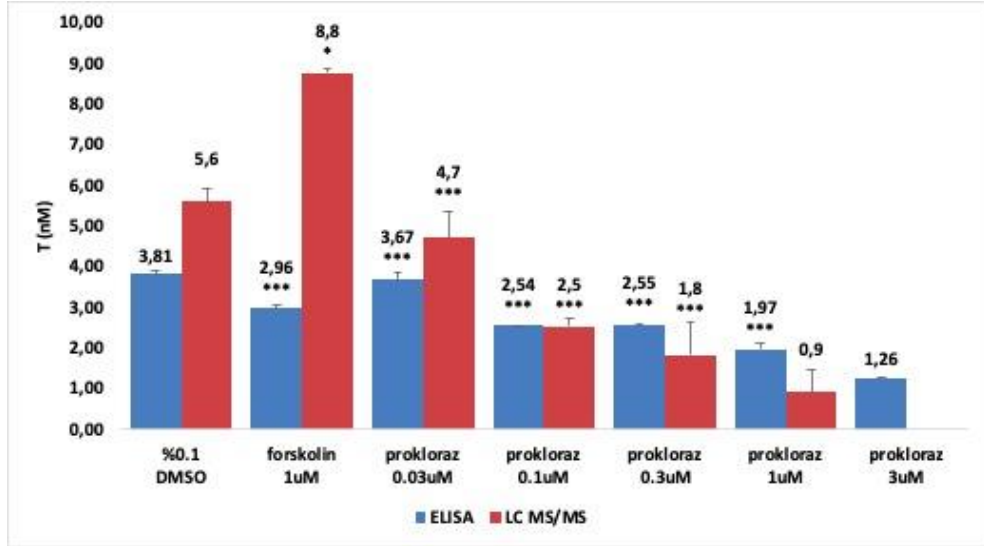
Proklorazın, 1 µM forskolin ile indüklenmiş steroidojenez yolağı üzerindeki inhibisyon yapıcı etkisi östradiol düzeyleri ölçülerek araştırılmış ve proklorazın artan konsantrasyonları ile doza bağımlı bir şekilde östradiol düzeylerini düşürdüğü her iki yöntemle de belirlenmiştir. Bununla birlikte özellikle proklorazın yüksek

konsantrasyonları (1 ve 3 μM) ile azalan östradiol düzeyleri LC-MS/MS ile tesbit edilemezken (deteksiyon limitlerinin altında değerler olduğu için), ELISA yöntemi ile tüm konsantrasyonlardaki östradiol düzeyleri kantitatif olarak belirlenebilmiştir (Şekil 59).



Şekil 59. Prokloraz'ın E2 üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

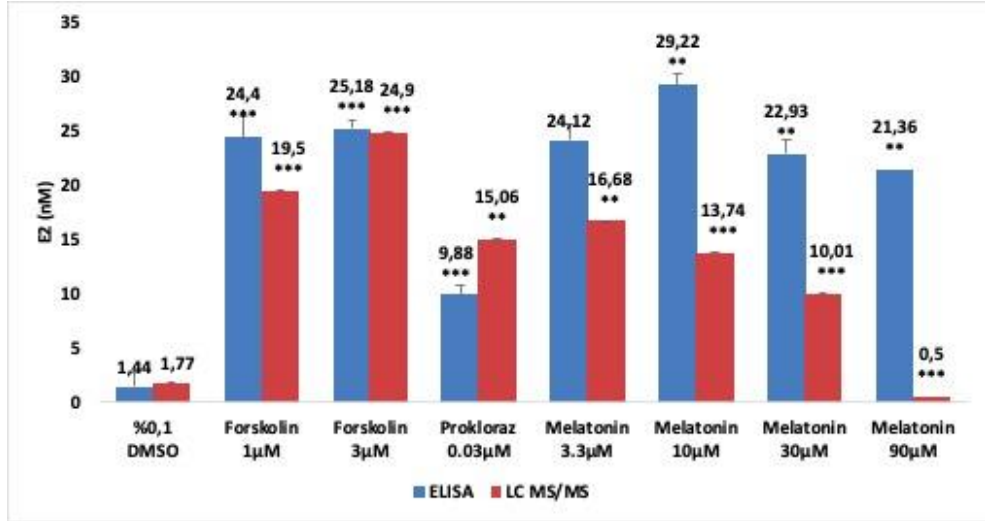
Proklorazın testosteron düzeyleri üzerine etkileri 1 μM forskolin ile indüklenmiş steroidojenez yolağında her iki yöntemle araştırıldığında bu kez forskolin ve proklorazın düşük konsantrasyonunda LC-MS/MS yöntemi ile daha yüksek değerler ölçüldüğü gözlenmiştir. Proklorazın en yüksek konsantrasyonunda ise LC-MS/MS yöntemi ile testosteron düzeyinin yöntemin hassasiyet limitlerinin altında kaldığı için belirlenemediği gözlenmiştir (Şekil 60).



Şekil 60. Prokloraz'ın T üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

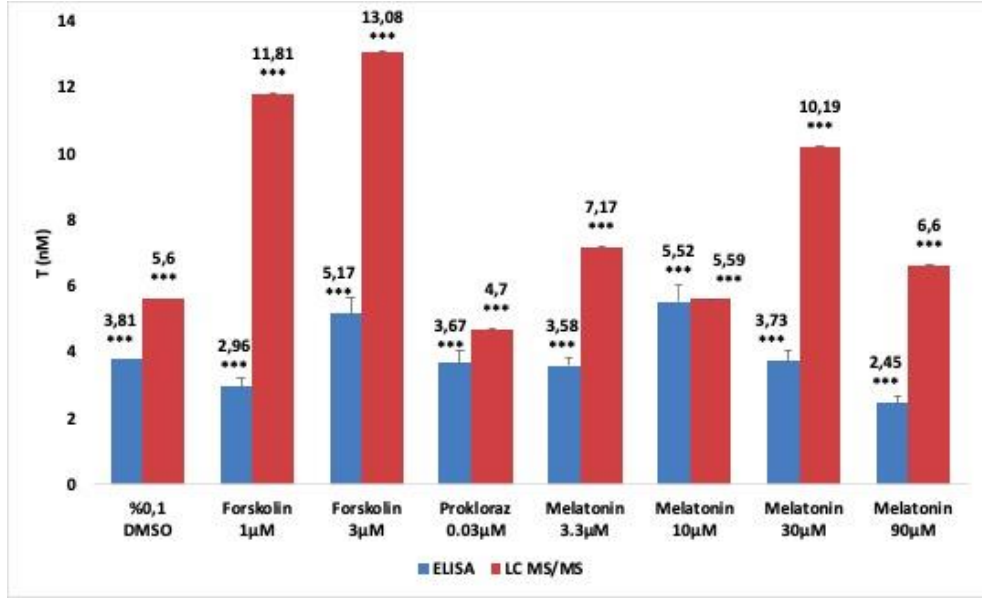
4.6.2. Test Maddeleri ile Yapılan İki Farklı Hormon Ölçüm Yöntemi Verilerinin Karşılaştırılması

Melatoninin östradiol düzeyleri üzerine etkileri 1 μ M forskolin ile indüklenmiş steroidojenez yolağında her iki yöntemle araştırıldığında melatoninin artan konsantrasyonlarda LC-MS/MS yöntemi ile östradiol düzeylerini azalttığı gözlenmiştir (Şekil 61).



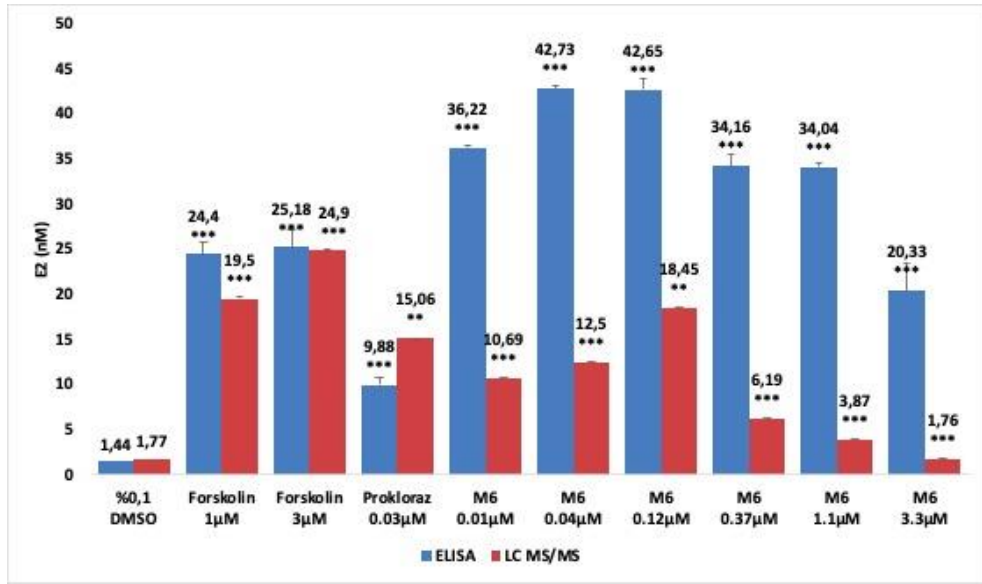
Şekil 61. Melatoninin E2 üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Melatoninin testosteron düzeyleri üzerine etkileri 1 µM forskolin ile indüklenmiş steroidojenez yolağında LC-MS/MS yöntemi ile araştırıldığında bu hormon düzeylerinin test edilen tüm konsantrasyonlarda azaldığı gözlenmiştir (Şekil 62). ELISA yöntemi ile elde edilen verilerde ise melatonin hormon düzeyi üzerine bifazik etki gösterdiği görülmüştür. 10 µM'in üzerindeki konsantrasyonlarında testosteron düzeylerini doza bağımlı bir şekilde azalttığı saptanmıştır (Şekil 62). İki yöntemden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında LC MS/MS yöntemi ile daha yüksek değerler elde edilmiştir.



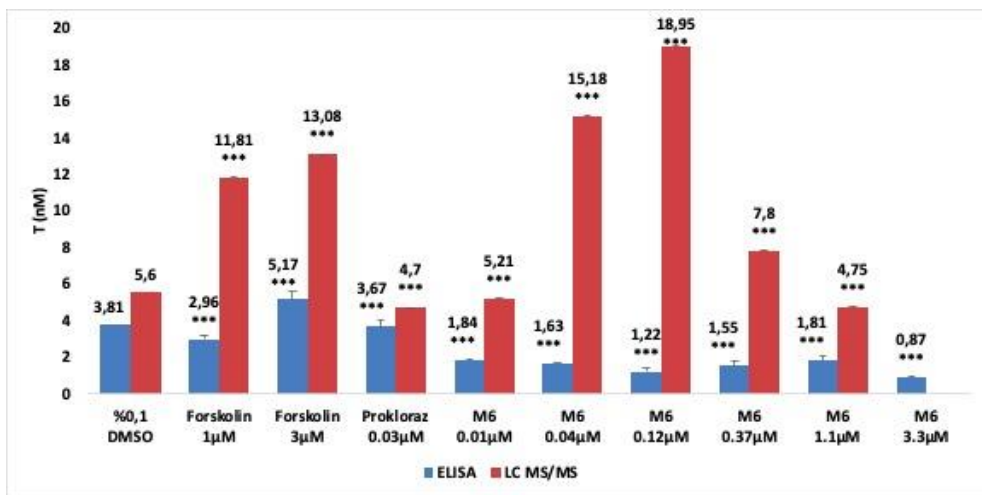
Şekil 62. Melatoninin T üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

M6 bileşiğinin östradiol düzeyleri üzerine etkileri 1 µM forskolin ile indüklenmiş steroidojenez yolağında LC-MS/MS yöntemi ile araştırıldığında bu bileşiğin östradiol düzeyleri üzerine bifazik etkili olduğu, yani düşük konsantrasyonlarda hormon düzeyini artırırken yüksek konsantrasyonlarında ise östradiol düzeylerini azalttığı gözlenmiştir (Şekil 63). ELISA yöntemi ile yapılan analiz sonucunda test edilen tüm konsantrasyonlarda östradiol düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır (Şekil 63). İki yöntem karşılaştırıldığında, ELISA yönteminde daha yüksek değerler elde edilmiştir.



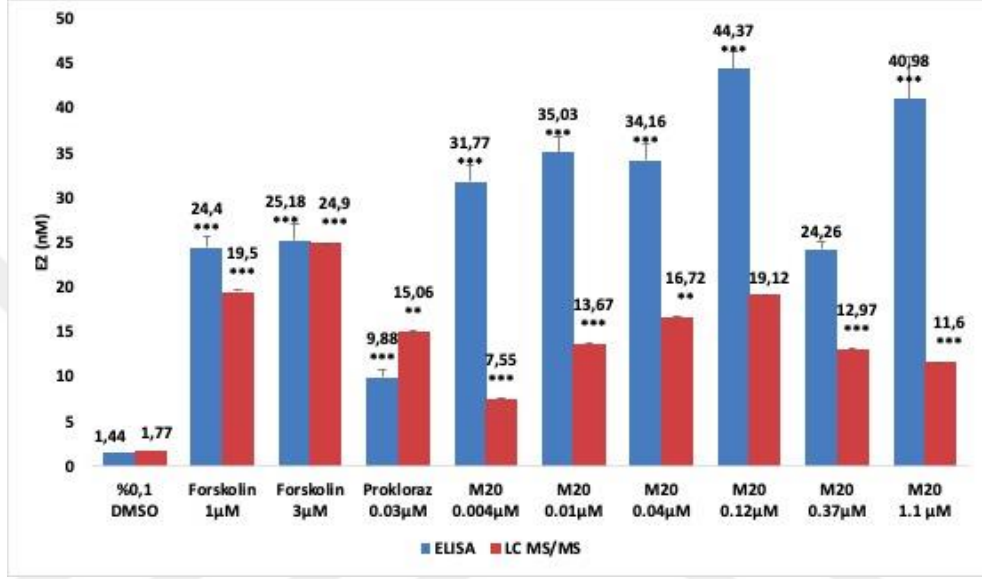
Şekil 63. M6'nın E2 üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

M6 bileşiğinin testosteron düzeyleri üzerine etkileri 1 µM forskolin ile indüklenmiş steroidojenez yolağında LC-MS/MS yöntemi ile araştırıldığında bu hormon düzeylerinin test edilen tüm konsantrasyonlarda bifazik olarak değiştiği gözlenmiştir (Şekil 64). ELISA yönteminde ise bu bileşiğin test edilen tüm konsantrasyonlarda testosteron düzeylerini azalttığı saptanmıştır (Şekil 64).



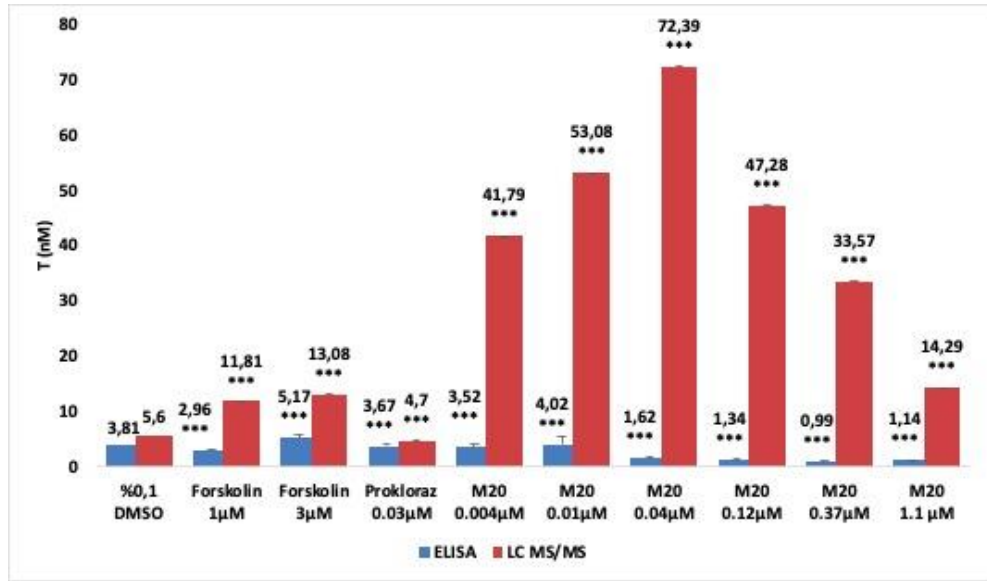
Şekil 64. M6'nın T üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

M20 bileşiğinin östradiol düzeyleri üzerine etkileri 1 μ M forskolin ile indüklenmiş steroidojenez yolağında LC-MS/MS yöntemi ile araştırıldığında bu bileşiğin östradiol hormon düzeylerini bifazik olarak değiştirdiği gözlenmiştir (Şekil 65). ELISA yönteminde ise M20 bileşiğinin hormon düzeylerini arttırdığı saptanmıştır. Her iki yöntem karşılaştırıldığında ise ELISA yöntemi ile daha yüksek değerler elde edilmiştir (Şekil 65).



Şekil 65. M20'nin E2 üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

M20 bileşiğinin testosteron düzeyleri üzerine etkileri 1 μ M forskolin ile indüklenmiş steroidojenez yolağında LC-MS/MS yöntemi ile araştırıldığında bu bileşiğin testosteron düzeylerini bifazik olarak değiştirdiği görülmüştür (Şekil 66). 0,004 – 0,04 μ M konsantrasyonlarında hormon düzeyinde artışa, 0.12 – 1.1 μ M konsantrasyonlarında östradiol düzeylerinde azalmaya yol açmıştır. ELISA yönteminde de benzer olarak bu bileşiğin bifazik etkili olduğu gözlenmiştir. 0,004 – 0,01 μ M konsantrasyonlarında testosteron düzeylerinde artışa, 0,04 – 1,1 μ M konsantrasyonlarında ise azalmaya yol açmıştır (Şekil 66).



Şekil 66. M20'nin T üzerine olan etkisine ait ELİSA ve LC MS/MS sonuç karşılaştırma grafiği. Barlar üzerindeki değerler her iki yöntemden elde edilen değerleri ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme her yöntemin kendi kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

4.6.3. LC MS/MS ve ELISA ile Yapılan Çalışma Verilerinin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması

Tablo 16. E2 verilerine ait LC MS/MS ve ELISA verilerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

E2	ORTALAMA	STANDART SAPMA	t	p
ELISA	17,52	7,91	11,425	0
LC MS/MS	6,71	3,87		

LC MS/MS ve ELISA yöntemleriyle yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen E2 verileri SPSS'te karşılaştırılmıştır. SPSS'e bağımsız örneklerin girişi yapıldıktan sonra t testine tabi tutulmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak (p<0,05) dikkate alınarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. ELISA değerlerinin ortalaması 17,52 ± 7,91 olarak, LC MS/MS değerlerinin ortalaması 6,71 ± 3,87 olarak bulunmuş ve

ELISA yöntemiyle elde edilen değerlerin LC MS/MS yöntemiyle elde edilen değerlerden anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Tablo 17. T verilerine ait LC MS/MS ve ELISA verilerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

T	ORTALAMA	STANDART SAPMA	t	p
ELISA	2,44	1,37	0,678	0,510
LC MS/MS	2,24	2,42		

LC MS/MS ve ELISA yöntemleriyle yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen T verileri SPSS'te karşılaştırılmıştır. SPSS'e bağımsız örneklerin girişi yapıldıktan sonra t testine tabi tutulmuş, t testi sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0,05$). Elisa değerlerinin testesteron ortalaması $2,44\pm1,37$ olarak, Ms değerlerinin ortalaması $2,24\pm2,42$ olarak bulunmuştur.

Tartışma

EBlar; endokrin sistem fonksiyonlarının bozulmasına neden olarak organizmada ve organizmanın gelecek nesillerinde olumsuz sağlık etkileri oluşturan ekzojen madde ve madde karışımları olarak tanımlanmaktadır (Kortenkamp et al., 2011; Solecki et al., 2017).

Çevresel kirleticilerin endokrin sisteme olan etkileri 1930’lu yıllardan bu yana bilinmesine rağmen (Nature Publishing Group, 1938), çevresel bir endişe olarak kabul edilmeleri 1990’lı yılların başlarında olmuştur (Crain and Guillette, 1998). Bu çevresel sorunun ele alınması ve endokrin bozucu olma olasılığı olan bileşiklerin taranması için EPA tarafından test programları ve bu maddelerin regülasyonu için çeşitli yönergeler oluşturulmuştur. EPA tarafından oluşturulan Endokrin Bozucu Tarama Sistemi (EDSP; Endocrine Disruptor Screening Program pestisitler, plastikleştiriciler gibi çevresel kirleticilerin östrojen, androjen ve tiroid hormon sistemi üzerine olan etkilerini incelemek için oluşturulmuş iki aşamalı bir test sürecidir. (US EPA Erişim adresi: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-edsp-policies-and-procedures>). İlk aşama olan “Tier 1” ön tarama testlerinden oluşup, östrojen, androjen ve tiroid hormon sistemleri ile etkileşime girme kabiliyeti olan maddelerin hızlı ve düşük maliyetle tanımlanması için kullanılır. Steroidojenez deneyi de “Tier 1” içerisinde yer alan ve steroid yapılı hormon sentez basamaklarının hepsini kapsayan H295R hücrelerinde iki ana biyogösterge olarak E2 ve T düzeylerinin belirlenmesi ile karar verilen bir yöntem olarak yer almaktadır (EPA, 2011b).

Bununla birlikte, endokrin bozucuların tanımlanması için OECD tarafından da “Endokrin Bozucuların Test edilip Belirlenmesi için Kavramsal Çerçeve” (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters) adı altında bir tarama programı oluşturulmuştur (OECD, 2012).

Tablo 18. Endokrin Bozucuların Test edilip Belirlenmesi için Kavramsal Çerçeve (OECD, 2012)

1.Basamak Mevcut veriler ve test dışı bilgiler	Fiziksel ve kimyasal yaklaşımlar, reaksiyona girme kabiliyeti, uçuculuk, biyolojik bozunabilirlik Standardize ve standardize olmayan testlerden elde edilen tüm mevcut (eko)toksikolojik veriler Çapraz okuma (read across), kimyasal katagoriler, QSAR ve diğer in silico öngörülleri, ADME model öngörülleri
2.Basamak Seçilmiş endokrin mekanizmalar/yolaklar hakkında bilgi vere in vitro yöntemler (memeli ve memeli olmayanlar için yöntemler)	ER ve AR reseptör bağlanma affinitesi Östrojen reseptör transaktivasyonu (OECD TG455-OECD TG457) Androjen veya tiroid transaktivasyonu İn vitro steroidojenez (OECD TG 456) MCF-7 hücre proliferasyon yöntemleri (ER antagonist/agonist) Diğer uygun yöntemler
3.Basamak Seçilmiş endokrin mekanizmalar/yolaklar hakkında veri sağlayan in vivo yöntemler¹	Memelilerde toksisite Uterotrofik Yöntem (OECD TG 440) Hershberger Yöntemi (OECD TG 441) Memeli olmayanlarda toksisite Kurbağa embriyo tiroid işaretleme yöntemi (TG mevcut ise) Amfibi metamorfoz yöntemi(OECD TG 231) Balık üreme tarama yöntemi (OECD TG 229) Balık tarama yöntemi (OECD TG 230) Androjenize dişi dikenlibalık tarama (GD 140)
4.Basamak Endokrin ilişkili son noktalardaki advers etkiler hakkında veri sağlayan in vivo yöntemler²	Memelilerde toksisite Tekrarlayan doz 28 gün çalışması (OECD TG 407) Tekrarlayan doz 90 gün çalışması (OECD TG 408) Tek jenerasyon üreme toksikoloji çalışması (OECD TG 415) Erkek pubertal yöntemi (GD 150,)³ Dişi pubertal yöntemi (GD 150)³ Sağlam yetişkin erkek endokrin tarama yöntemi (GD 150) Prenatal gelişimsel toksisite çalışması (OECD TG 414) Kronik toksisite ve karsinojenite testi (OECD TG 451-3) Üreme tarama testi (OECD TG 421 eğer artmışsa) Kombine 28-gün/üreme tarama testi (OECD TG 422 eğer artmışsa) Gelişimsel nörotoksisite (OECD TG 426) Memeli olmayanlarda toksisite Balık cinsiyet gelişimsel testi (OECD TG 234) Balık Üreme Kısmi Ömrü Testi (TG mevcut ise) Amfibi Larva Büyüme Ve Gelişme Testi (TG mevcut ise) Kuş üreme testi (OECD TG 206) Yumuşakça Kısmi Yaşam Deneyleri (TG mevcut ise) ⁴ Chironomid Toksisite testi (TG 218-219) ⁴ Daphnia Üreme testi (Erkeklerde indüksiyon ile) (OECD TG 211) ⁴ Yer solucanı üreme testi (OECD TG 222) ⁴ Enchytraeid üreme testi (OECD TG 220) ⁴ Sedimentli Su Lumbriculus Toksisite Testi (OECD TG

	225) Toprakta yırtıcı mite üreme testi(OECD TG 226) ⁴ Toprakta Collembolan üreme testi (TG OECD 232) ⁴
5.Basamak Organizmanın yaşamının daha geniş dönemlerinde endokrin ilgili noktalarda advers etkiler hakkında kapsamlı veri sağlayan in vivo yöntemler ²	Memelilerde toksisite Uzatılmış 1 jenerasyon üreme toksisite çalışması (OECD TG 443) ⁵ 2 jenerasyon üreme toksisite çalışması (Güncellenmiş OECD TG 416) Memeli olmayanlarda toksisite FLCTT (Balık yaşam döngüsü toksisite testi) (TG mevcut ise) Medaka Multijenerasyon testi (MMGT) (TG mevcut ise) Kuşlarda 2 jenerasyon üreme toksisitesi testi (TG mevcut ise) Mysid yaşam döngüsü toksisite testi (TG mevcut ise) ⁴ Copepod üreme ve gelişim testi (TG mevcut ise) ⁴ Sediment su Chironomid yaşam döngüsü toksisite testi (OECD TG 233) ⁴ Yumuşakçalar tüm yaşam döngüsü deneyleri testi (TG mevcut ise) ⁴ Daphnia Multijenerasyon testi (TG mevcut ise) ⁴

¹ Bazı yöntemler advers etkiler hakkında bazı kanıtlar sağlayabilmektedir.

² Etkiler birden fazla mekanizmaya duyarlı olabilir ve belki de endokrin bozucu olmayan mekanizmalar nedeniyle oluşabilmektedir.

³ Protokol kullanımına bağlı olarak, bir maddenin bu testlerde bir hormon sistemi ile etkileşime girmesi insan veya ekolojik sistemde advers etkilere neden olacağı anlamına gelmemektedir.

⁴ Günümüzde mevcut omurgasız deneyler bazı endokrin bozuculara ve endokrin bozucu olmayan kimyasallara yanıt verebilen sadece bazı apikal sonlanımları içermektedir. Bunlar 4. basamaktaki kısmi yaşam döngüsü testleri ve 5. basamaktaki tam veya çoklu yaşam döngüsü testleridir.

⁵ Uzatılmış 1 jenerasyon üreme toksisitesi çalışması (OECD TG 443), çocuklarda ve F1 yetişkinlerde, 2001 yılında adapte edilen 2-jenerasyon testinde (OECD TG 416) yer almayan, pek çok endokrin ilişkili parametreyi değerlendirmeyi sağladığı için endokrin hasarı belirlemede tercih edilmektedir.

Tablo 18’de görüldüğü gibi 5 basamaklı bir test yaklaşımı öneren bu programda ikinci basamakta önerilen testler arasında “*in vitro* steroidojenez (OECD TG-456)” olarak isimlendirilen hücre kültürü-temelli yöntem yer almaktadır. H295R hücre hattının kullanıldığı bu hücre-temelli *in vitro* yöntem endokrin bozucuların steroidojenez üzerine etkilerinin hormon analizleri ile belirlenmesi amacıyla kullanılır. H295R bir insan adenokarsinom hücre hattıdır, steroid yapılı cinsiyet hormonlarının üretimi de dâhil olmak üzere steroidogenez yolağındaki tüm hormon ve enzimler hakkında bilgi edinmemizi sağlayan *in vitro* bir modeldir (Hecker et al., 2006, 2007; Hilscherova et al., 2004; Sanderson et al., 2000). Bu hücre hattının kullanılmasının birçok avantajı vardır (OECD 2011);

- Sadece cinsiyet hormonlarının değil steroidojenez yolağındaki glukokortikoid ve mineralokortikoidler de dâhil tüm hormonların artış ve azalışlarının ölçülmesine olanak sağlar.
- EB etkiye sahip kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisinin/sitoksitesinin doğrudan belirlenmesine olanak sağlar. Böylece, hormon düzeylerinde görülen değişikliğin kimyasalların sitotoksik etkilerine mi yoksa steroidojenik yollarla etkileşimine mi bağlı olduğunun ayırt edilmesine olanak sağlar. Bu yönüyle farklı duyarlılık ve işlevlere sahip çok sayıda hücre tipinden oluşan doku eksplant sistemlerinden üstündür.
- Deney hayvanlarının kullanılmasına gerek olmaması,
- Bu hücre hattının ticari olarak temin edilebilir olması.

Bu kadar kullanım kolaylığı ve avantajlarının yanısıra bu hücre hattının dezavantajları da mevcuttur;

- Metabolik kapasitesinin bilinmemesi sebebiyle metabolik olarak aktive edilmesi gereken maddelerin gözden kaçması ihtimali bulunmaktadır.
- Adrenal dokudan türetilen H295R, cinsiyet hormonlarının yanısıra glukokortikoid ve mineralokortikoidleri üretebilen enzimlere de sahiptir. Bu nedenle glukokortikoid ve mineralokortikoidlerin üretimi üzerindeki etkiler T ve E2 seviyelerini de etkileyebilir.
- DHT'nin ölçümü yapılamadığı için 5α -redüktazı inhibe eden maddelerin saptanması mümkün olmaz. Bu amaçla kısa süreli in vivo endokrin bozucu etki tarama testi olan Hersberger testi kullanılabilir.
- H295R hücre hattı hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen (HPG) üzerine etkileri olan ve bu şekilde steroidojenezi engelleyen maddelerin tespitinde kullanılamaz.

Bu tez çalışması kapsamında OECD TG-456 numaralı test kılavuzunda belirtilen H295R steroidojenez deneyi uygulanarak söz konusu kılavuzda önerilen ölçüm yöntemlerinden ikisi aracılığı ile E2 ve T miktarının ölçülmesi ile endokrin bozucuların steroidojenez üzerine etkilerinin belirlenmesi deneyi uygulanmıştır. OECD TG-456 numaralı test kılavuzunda H295R hücre hattının kullanımı için gerekli şartlar en ince detayına kadar belirtilmiş olmakla birlikte deneyin sonunda hormon düzeylerinin belirlenmesi için bir yöntem zorunluluğu getirilmemiştir; ELISA, Radio immunoassay (RIA), LC-MS/MS yöntemlerinden herhangi birisinin

kullanılabileceği belirtilmiştir (OECD, 2011). OECD TG-456 test kılavuzu ve EPA OPPTS 890.50’de belirtilen test yöntemlerden olan RIA ve ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay) H295R hücre kültürü de dâhil birçok farklı hücrede steroid hormonların düzeylerini ölçmek için kullanılmıştır (Dadehbeigi et al., 2008; Frank. and Shu, 1977). Bu yöntemler sıklıkla kullanılmasına rağmen, radyoaktif güvenlik, her bir hormon için ayrı antikor ve ayrı analiz gerektirmesi (ve bunun da maliyeti artırması) ve seçicilik açısından zayıf olması gibi dezavantajları vardır (Wang et al., 2004; Zhao et al., 2004). Bu yöntemlerin haricinde OECD TG-456’da belirtilen yöntemlerden biri de LC MS/MS yöntemidir. Literatürde, LC MS/MS yönteminin düşük molekül ağırlığına sahip analitler için immunolojik testlere kıyasla daha üstün analitik özgüllük sunduğu belirtilmiştir (Grebe and Singh 2011). Zhang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ELISA ve LC MS/MS yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 19 ve Tablo 20’de gösterildiği gibi karşılaştırılmıştır (Zhang et al. 2016).

Tablo 19. Immunoassay ve LC MS/MS yöntemlerinin avantajlarının karşılaştırılması (Zhang et al., 2016)

	Immunoassay	LC MS/MS
Hızlı geridönüş	✓	---
Özgüllük	---	✓
Hassasiyet	✓	✓
Örnek hazırlama kolaylığı	✓	✓
Yeni test geliştirme kolaylığı	---	✓
Yüksek verim	---	✓

Tablo 20. Immunoassay ve LC MS/MS yöntemlerinin dezavantajlarının karşılaştırılması (Zhang et al., 2016)

Immunoassay	LC MS/MS
Analitik seçicilik yönünden zayıftır	Daha pahalı enstürmantasyon
Tek seferde birden fazla analit test etmek için uygun değildir	Bakım ve idamesi daha maliyetlidir
Kalifiye personel gerektirmemesi nedeniyle insan hatasına açık	İyon supresyonu/Matriks etkisi söz konusu olabilir
Yeni testler geliştirmek için esnek değil	

Bu tez çalışmasında endokrin bozucuların steroidojenez üzerine etkilerinin OECD TG-456’de önerilen *in vitro* yöntem sonucunda yapılacak hormon analizleri ile belirlenmesi amacıyla ELİSA ve LC MS/MS yöntemleri kullanılmış, her iki analiz yöntemi ile elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Yöntemde pozitif kontrol olarak (enzim indükleyici etki) OECD kılavuzunda belirtildiği gibi forskolin, negatif kontrol olarak (enzim inhibitörü etki) prokloraz, steroidojenez döngüsünde E2 ve T üzerine etkisi bilinen referans maddelerden ketakonozol, letrozol ve genistein kullanılarak yöntem(ler)in kısmi validasyonları yapılmış ve ölçüm performansları karşılaştırılmıştır. Her iki yöntem arasında fark olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Takiben hormon bağımlı meme kanseri tedavisinde aromataz enzim inhibitörü olarak kullanılması önerilecek, yeni sentezlenmiş ilaç etkin madde adayları olan 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (4-klorofenil) hidrazon (M6) ve 2-metilindol-3-karboksialdehit fenil hidrazon (M20) ile bunların model bileşiği olan melatoninin tüm steroidojenez yolağı üzerindeki etkileri de H295R steroidojenez yöntemi uygulanması sonrasında hormon analizleri her iki yöntemle yapılarak araştırılmıştır. Sonuç olarak uygulanan iki yöntem avantaj ve dezavantajları açısından değerlendirilmiştir.

Steroidojenez deneyine başlamadan önce yöntemin değerlendirilmesinde kullanılacak hormonların (T ve E2) ölçümü için LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerinin kısmi validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla LC-MS/MS yöntemi için seçiciliği (Şekil 14 ve Şekil 15), linearitesi (Şekil 16 ve Şekil 17), LOD ve LOQsu (Şekil 18 ve Şekil 19), günüçi ve günlerarası tekrarlanabilirliği (Tablo 11 ve Tablo 12), ELISA yöntemi için ise kısmi validasyon verileri (Tablo 14 ve Tablo 15) değerlendirilerek hassasiyet sınırları belirlenmiştir.

Öncelikle OECD TG-456 kılavuzunda yer aldığı şekilde kullandığımız H295R hücre hattının sağlıklı çalışıp çalışmadığı belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak H295R hücre hattında bazal T ve E2 üretimi belirlenmiş ve veriler eşik konsantrasyonlar açısından OECD TG-456’ya göre değerlendirilmiştir. OECD TG-456’ya göre H295R hücrelerinde T için bazal üretim ≥ 5 kat MDL; E2 için ise $\geq 2,5$ kat MDL şartını sağlamalıdır (OECD, 2011). OECD tarafından laboratuvarlar arasında yaptırılan validasyon çalışmalarındaki verilere göre T için bazal üretim 2,17-22,79 nM ve %VK 20-40 arasındayken E2 için bazal üretim 0,04-0,45 nM ve %VK 9-40 arasında verilmiştir (Hecker et al., 2006). Bu tez çalışmasında da T için bazal üretim aralığı

0,71-5,6 nM (%VK 0,12-7,10) ve E2 için bazal üretim aralığı 0,17-6,96 nM (%VK 0,52-10,32) olarak bulunmuştur. Tez çalışmasında belirlenen H295R hücrelerinin bazal hormon üretim değerlerinin Hecker ve ark.'nın raporunda (Hecker, 2016) belirtilen laboratuvarlar arası çalışmada bildirilen aralıklar içerisinde olduğu belirlenmiştir. Dolayısı ile elimizdeki hücre hattının laboratuvarımız şartlarında sağlıklı olarak sürdürülebildiğine ve steroidojenez yöntemi için kullanılmasının uygun olacağına karar verilmiştir.

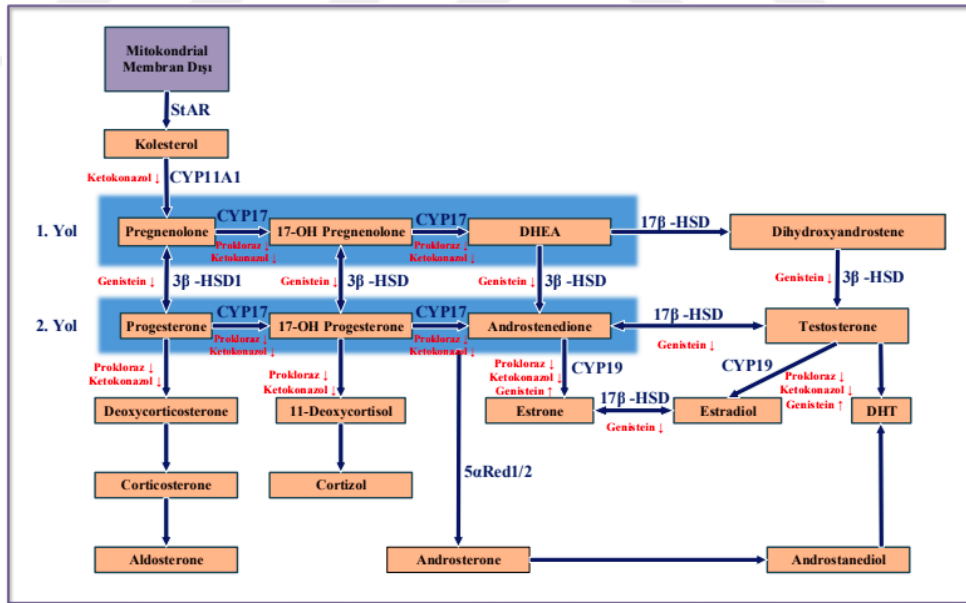
Test maddeleriyle analize başlamadan önce, H295R hücre hattında OECD TG-456 kılavuzunda belirtilen kalite kontrol deneyleri de gerçekleştirilmiştir. Kılavuza göre indüksiyon (pozitif kontrol) amaçlı kullanılan 10µM forskolinin T için $\geq 1,5$ Kat SC, E2 için $\geq 7,5$ Kat SC olması, inhibisyon (negatif kontrol) amaçlı kullanılan 1µM proklorazın ise T için $\leq 0,5$ kat SC, E2 için $\leq 0,5$ kat SC şartlarını sağlaması gerekiyordu. Kalite kontrol çalışmamızda plakalara eklediğimiz 10µM forskolin'in T için yanıtı 1,5 kat SC, E2 için 11,6 kat SC iken plakalara eklenen 1µM prokloraz'ın T için yanıtı 0,2 kat SC, E2 için SC'e eşit olarak bulunmuş ve gerekli şartları sağladığı belirlenmiştir. Kılavuzda bildirilen kalite kontrol çalışmaları sonucunda da elimizdeki hücre hattının çalışmaya uygun olduğu belirlenerek çalışmalar sürdürülmüştür.

Forskolin, OECD test kılavuzu ve literatürde belirtildiği üzere cAMP ikincil haberci sistemi yoluyla adenilat siklaz aktivatörü olarak kullanılmasının yanı sıra T ve E2 üretimi üzerine güçlü indüksiyon yapıcı etkisi olduğu bilinen bir ilaçtır (Hecker, 2016). Normal şartlar altında fizyolojik olarak adrenal kortekste kolesterolden pregnenolona dönüşümle steroidojenez sürecinin başlayabilmesi için ilk olarak hipotalamusun uyarılması gerekir. Hipotalamusun uyarılması sonrası hipotalamustaki spesifik nöronlardan salgılanan kortikotropin salıverici hormonun (CRH) sentezi ve salıverilmesiyle hipofiz ön lobundan adrenokortikotropin hormon (ACTH) salgılanması başlar. Steroid hormonları sentezleyen hücrelerde ACTH, gonodotropinler ve anjiyotensin kendilerine özgü membranal reseptör olan G protein kenetli reseptöre bağlanır ve böylece G proteini (GTP) aktive olur. G proteinin aktivasyonu sonucu aktive olan adenilat siklaz ATPyi cAMPye çevirir. Oluşan cAMP gelen sinyali sitoplazmaya yayar ve protein kinaz A aktivasyonu başlar. Protein kinaz A aktivasyonu sonrası diğer proteinleri fosforile etmesi sonucu kolesterolden pregnenolon dönüşümü başlar (Kayaalp, 2002). Adrenal kortekste

cAMP yolağı aktivasyonu için gerekli olan ACTH basamağı H295R hücrelerinde olmadığı için cAMP yolağının aktivasyonu gerekmektedir ve bu amaçla kullanılan kimyasallardan biri de forskolindir (Hecker, 2016). Forskolin cAMP aktivasyonunun yanısıra (Seamon et al., 1981), dolaylı olarak aromataz aktivitesini de arttırmaktadır (Higley et al., 2010). Forskolinin cAMP yolağını aktive ederek genel bir steroidojenez indükleyici etkisi olduğu söylenmektedir (Hilscherova et al., 2004). Forskolin aromataz aktivitesini doğrudan etkilemediği için, hücredeki 48 saatlik inkubasyon sonrası artan aromataz aktivitesinin aromataz proteini ile doğrudan etkileşimi ile değil hücre içi artan cAMP'den kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Higley et al., 2010; Sanderson et al., 2002). Bu tez çalışması kapsamında forskolinin söz konusu etkisinin kullandığımız hücre hattında doza bağımlılığının araştırılması amacıyla 0,1-10µM aralığında artan konsantrasyonlarda forskolin H295R hücrelerine uygulanmıştır. İnkübasyon sonrasında hormon düzeyleri hem LC-MS/MS hem de ELISA metotları ile ölçüldüğünde, E2 miktarında, forskolin konsantrasyonuna bağlı olarak artış görülmüştür (Şekil 22 ve Şekil 43). Aynı durum T için de geçerli olmakla birlikte T düzeylerinde (Şekil 23 ve Şekil 44) başlangıç konsantrasyonlarında gözlenen artış 0,3µM ve üzerindeki forskolin konsantrasyonlarında düşüş şeklinde görülmüştür. Bu düşüşün aromataz üzerindeki daha güçlü indüksiyon nedeniyle artmış aromataz aktivitesi sonucu T'un E2'e dönüşümündeki artışa bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu durum aynı konsantrasyonlarda forskolin inkübasyonu sonucu elde edilen E2 grafiğindeki (Şekil 22 ve Şekil 43) artışla da doğrulanmıştır. Denediğimiz en yüksek konsantrasyon olan 10 µM forskolinin E2de düşüş, T'da yükselişe neden olmuş gibi görünmesi aromataz kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Forskolin literatürde birçok çalışmada belirtildiği gibi (Hecker and Giesy, 2008; Hecker 2016; Higley et al., 2010) bu tez çalışmasında da E2 ve T üretimi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir indüksiyon yapmıştır. Forskolinin indüksiyon yapıcı etkisinin E2'de T'a nazaran daha fazla olması Higley ve ark. (Higley et al., 2010) makalesinde belirtildiği gibi dolaylı aromataz aktivitesindeki artış kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca (Karmaus, 2016) makalesinde pre-stimulasyon amaçlı forskolin 10µM kullanılmasına rağmen tez kapsamında forskolin'in 1µM konsantrasyonu pre-stimulasyon amaçlı H295R hücrelerinde kullanılmıştır.

Bir imidozol türevi fungusit olan, steroidojenez çalışmalarında mikrozomal P450 enzimleri üzerine genel inhibitör etkinliği bilinen prokloraz E2 ve T üretimi üzerine

güçlü inhibitör etkinliği bilinerek kullanılan referans bir kimyasal maddedir (Hecker, 2016). Proklorazın, steroidojenez yolağında yer alan CYP17A1'in hidroksilaz aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ederek androjen üretimi üzerine inhibitör etki gösterdiği bildirilmektedir (Blystone et al., 2007). Proklorazın CYP17A1'i inhibe etmesi sonucu balık, kurbağalar ve kemirgenler dâhil tüm türlerde *in vivo* anti-androjenik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Ankley and Gray, 2013; Vinggaard et al., 2005). Bu tez çalışmasında uyguladığımız 0,03-1µM aralığında prokloraz, T ve E2 miktarlarında kademeli olarak ve literatürle (Hecker et al., 2006; Hecker and Giesy, 2008; Karmaus et al., 2016; Nielsen et al., 2012) uyumlu olarak inhibisyona neden olmuştur. Proklorazın T üretiminde konsantrasyona bağlı olarak azalmaya neden olması proklorazın Şekil 2 steroidojenez yolağında T öncesindeki basamaklardan bir veya daha fazla steroidojenik enzimi inhibe ederek inhibitör etkisini oluşturduğu düşünülmüştür. Nielsen ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada steroidojenez yolağında olası etkili olduğu basamaklar Şekil 67'de gösterilmiştir (Nielsen et al., 2012).



Şekil 67. Steroidojenez yolağında prokloraz, ketokanozol ve genisteinin etkilediği enzimler ve etki şekilleri (Nielsen et al., 2012)

Aromataz enzimi Şekil 2'de gösterildiği gibi steroidojenez yolağında östrojen biyosentezindeki son basamağı katalize eden enzimdir. Yani aromataz steroidal C-19

androjenlerin C-18 östrojenlere dönüştürülmesinde hız sınırlayıcı basamağı katalize eder (Fishman and Raju, 1981; Ryan, 1959). Aromataz esas olarak yumurtalıkta eksprese edilmesinin yanısıra merkezi ve perifer dokularda, yağ, kas, karaciğer ve memede de eksprese edilir (Longcope et al., 1978; Miller, 1991). Yaş ilerledikçe yumurtalıklarda östrojen üretiminin azalmasıyla (Couzinet et al. 2001) birlikte menopoz sonrası kadınlarda adrenal bez tarafından üretilen androstenodionun periferik aromatzasyonu endojen östrojenin ana kaynağı haline gelir (Matsumine et al., 1986; Schweikert et al., 1976). Üçüncü nesil olarak tanımlanan aromataz inhibitörleri diğer steroidojenik basamaklar üzerinde etki yapmaksızın E2 üretimini güçlü bir şekilde bloke eder. Üçüncü nesil güçlü aromataz inhibitörlerinden letrozol bu bilindik etkisinden yararlanılmak üzere referans madde olarak tez çalışmasında 0,12-10 μM konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Şekil 27’de gösterildiği üzere letrozolün güçlü aromataz inhibisyonu yapıcı etkisi E2 üretiminde doğrudan görülmektedir. Higley ve ark.’ın makalesinde (Higley et al., 2010) hormon ölçümleri ELISA yöntemi kullanılarak yapılmıştır ve $\geq 0,001\mu\text{M}$ letrozol konsantrasyonlarında E2 düzeyleri solvent kontrol seviyelerinden önemli derecede daha düşük bulunmuştur. Bu tez çalışmasında letrozolün LC MS/MS ile test edilen en düşük konsantrasyonu olan 0,12 μM ’dan itibaren E2 miktarı görülememiştir (Şekil 27). Gözlenen bu etkinin sitotoksosite kaynaklı olmadığı Şekil 29’daki letrozolün H295R hücrelerindeki % canlılık grafiğinden anlaşılmaktadır. Letrozol Şekil 28’de gösterildiği üzere T miktarında önemli artışa neden olmuştur ve bu artışın aromataz inhibisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu veriler göz önüne alındığında çalışmamızda gözlenen T verilerinin Higley ve arkadaşları tarafından bildirilen veriler ile (Higley et al., 2010) uyumlu olduğu görülmüştür.

Antifungal bir madde olduğu bilinen ketokonazol, CYP17, CYP21 ve CYP11B1/B2 de dâhil olmak üzere steroidojenez yolağında çok sayıda sitokrom P450 enziminin inhibisyonuna neden olduğu bilinmektedir (Hakki et al., 2011; Hecker et al., 2011; Macikova et al., 2014; Nielsen et al., 2012; Van der Pas et al., 2012; Rijk et al., 2012; Zareba et al., 2007). Ketokonazolün CYP 17,20 liyaz (desmolaz) aktivitesi üzerine olan inhibitör etkisinin aromataz üzerine olan etkisinden daha büyük olduğu Britain ve ark. (Britain et al., 1991) çalışmasında gösterilmiştir. Sonuç olarak (Villeneuve et al., 2007) çalışmasında da gösterildiği üzere kanıtlar ketokonazolün bir aromataz inhibitörü olduğundan daha güçlü steroidojenez döngüsünde yolağın aromataz

öncesindeki basamaklarını katalize eden enzimlerin (up stream) inhibitörü olduğu yönündedir. Şekil 67 de yolak üzerinde etkili olduğu yerler özetlenmiştir (Nielsen et al., 2012). Tez çalışmasında 1 ve 5 μM 'lık ketokonazol kullanıldığında E2 ve T üretimini tamamen inhibe ettiği görülmüştür. Ketokonazol'un 0,1 μM 'dan daha yüksek dozlarının dihidrotestosteron, kortizol ve aldosteron gibi steroidojenez yolağının yukarısında bulunan steroid düzeylerini tamamen düşürdüğü (Jumhawan et al., 2017) 'in yapmış olduğu çalışmada gösterilmiştir. Jumhan ve ark.'nın çalışmasında ketokonazol'un 1 μM 'lık konsantrasyonun CYP17 enzimi üzerinde oluşturduğu inhibisyonla 17 α -hidroksipregnenolon, 17 α -hidroksiprogesteron ve androstenedion seviyelerindeki %90'luk belirgin azalma görülmüşken, ketokonazol'un 1 μM ve daha yüksek konsantrasyonlarında CYP21 ve CYP11B1/B2'yi inhibe etmesi sonucu 11 deoksikortikosteron, kortikosteron ve 11-deoksikortizol dâhil olmak üzere glukokortikoid ve mineralokortikoidlerin seviyelerinde önemli azalış görülmüştür. Aynı zamanda kolesterolün pregnenolona dönüşümünü katalize eden CYP11A'ya karşıda inhibisyona neden olarak tüm steroidojenezi baskılaması gösterilmiştir (Jumhawan et al., 2017). Bu etkisi nedeni ile ketokonazol, adrenal kortikosteroid inhibisyonu için çoğunlukla kullanılan adrenal bloke edici bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Nielsen et al., 2012). Literatürde yer alan çok sayıda çalışma (Hecker et al., 2006; Higley et al., 2010; Karmaus et al., 2016; Munkboel et al., 2019; Nielsen et al., 2012; Villeneuve et al., 2007) ile uyumlu olarak uyguladığımız ketokonazol konsantrasyonunun E2 ve T düzeyini inhibe etmesinin nedeninin steroidojenez döngüsünün yukarı basamaklarının inhibisyonundan kaynaklı olduğu düşünülmüştür.

Soya fasülyesinde daidzein ve genistein izoflovanlarını ve bunların glikozit yapıları bulunmaktadır (Franke et al., 1995, 1998; Franke and Custer, 1994; Taylor et al., 2009). Bu izoflovanlar zayıf östrojenik aktiviteye sahip oldukları için fitoöstrojenler olarak adlandırılır (Kuiper et al., 1997; Setchell and Cassidy, 1999). Genistein bir tirozin kinaz inhibitörü olarak bilinmektedir (Akiyama et al., 1987). Mesiano ve ark.'larının primer kültürlenmiş fetal ve postnatal adrenokortikal hücrelerinde genistein kullanarak tirozin kinaz aktivitesini değiştirmeden CYP21 aktivitesini inhibe ettiği ve böylece kortizol sentezinin baskılandığı, dehidroepiandrosteron (DHEA) üretimini stimüle ettiği gösterilmiştir (Mesiano et al., 1999). Literatürde yer alan bazı çalışmalarda (Nielsen et al., 2012; Ohno et al., 2002) genisteine

maruziyetin kortizol üretimini doza bağlı bir şekilde ve anlamlı biçimde azalttığı gösterilmiştir. Ohno ve ark.'larının çalışmasında görüldüğü üzere genisteinin 3 β -HSD aktivitesini önemli ölçüde azalttığı ve CYP21 aktivitesini de inhibe ettiği gösterilmiştir (Ohno et al., 2002). Genisteinin aynı zamanda H295R hücrelerinde güçlü ve etkili aromataz indüksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Ohlsson ve ark. ve Sanderson ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmada H295R hücreleri 0,01-10 μ M arası konsantrasyonlar genisteine maruz bırakılmıştır (Ohlsson et al., 2010; Sanderson et al., 2002, 2004). Sonuç olarak kortizol, T, aldosteron ve E2 seviyelerine bakılmıştır. Bu steroidlerin hepsinde konsantrasyona bağımlı olarak azalma görülmüştür. Yolak üzerinde genisteinin etki ettiği yerler Şekil 67 de gösterilmiştir (Nielsen et al., 2012). Şekil 32 ve Şekil 33'de görüldüğü üzere tez çalışmamızda genisteinin 0,1-10 μ M arası 3 konsantrasyonu H295R hücresine uygulanmış olup E2 konsantrasyonunun genistein konsantrasyonunun dozuna bağlı olarak azaldığı, T konsantrasyonunun yine genistein konsantrasyonunun dozuna bağlı olarak azalmasına rağmen 1 μ M'lık genistein konsantrasyonun oluşturduğu T üretimi üzerine etkiyle 0,1 μ M'lık ilk genistein konsantrasyonun oluşturduğu T üretimi arasında az bir fark vardır. Bununda hücre kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Tez çalışmasında uygulanan genisteinin H295R hücre kültüründe E2 ve T üzerine oluşturduğu etki literatürle karşılaştırıldığında azalan E2 ve T konsantrasyonlarının literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.

Epifiz bezinden salgılanan melatoninin, östrojene duyarlı meme kanserlerinde yapılan çalışmalarda meme kanserinin büyüme ve gelişimini azalttığı bildirilmiştir (D. Mediavilla et al., 2011; Rosli et al., 2017; Cos et al., 2000). Hayvan modelleri kullanılarak yapılan *in vivo* çalışma ve insan meme kanseri hücre hatları kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalarından elde edilen verilere dayanılarak melatoninin östrojen sinyal yolu ile etkileşime girerek onkostatik etkilerini gösterdiği bildirilmiştir (Cos et al., 2008; Cos et al., 2000; Rosli et al., 2017). Melatonin östrojen kaynaklı meme kanserlerinde onkostatik etkisini östrojen sinyal yollarına farklı mekanizmalar ile gösterdiği bildirilmektedir (Cos et al., 2006; Sánchez-Barceló et al., 2003). Bu etki mekanizmalarından biri, melatoninin seçici östrojen enzim modülatörü gibi davranması olup bu mekanizma melatoninin periferik dokularda E2 biyosentezinde yer alan aromatazin hem eksprese edilmesinde hem de aktivitesinin düzenlenmesine dayanmaktadır. (Cos et al., 2008; Gonzalez et al., 2008). MT1 melatonin reseptörü

ve aromataz ekspresyonunun olduğu meme kanseri hücrelerinde, melatonin aromataz enzimini inhibe eder (Ram et al., 1998, 2002; Sciences and Francisco, 1993). Tez çalışmasında melatonin 3,3-90 μ M konsantrasyon aralığında test edilmiştir. Aromataz inhibisyonu doza bağlı olarak Şekil 34’de E2 konsantrasyonundaki düşüşle gösterilmiştir. Hara ve ark. ve Rahman ve ark.’larının yapmış oldukları çalışmalarda forskolin kullanılarak indüklenen H295R hücrelerinde uygulanan melatoninin anlamlı bir şekilde kortizolu inhibe ettiği gösterilmiştir (Hara et al., 2015; Rahman et al., 2008). Tez çalışmasında uygulanan melatoninin T miktarı üzerindeki azalan etkisinin, hücrede oluşan sitotoksosite kaynaklı değil yolkta T öncesi basamaklarda meydana gelen bir inhibisyonndan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Seçilen test maddeleri ve referans maddelerin mevcut yöntemlerle çalışma sonuçları literatürle uyumlu olarak steroidojenik yolları profilendirme olanağı sağladığını göstermiştir.

OECD ve EPA tarafından endokrin bozucu bileşiklerin taranmasında kullanılmak üzere, *in vivo* testlere alternatif olarak önerilen ve valide edilmiş H295R Steroidojenez deneyinin laboratuvarımızda bilinen referans bileşikler ile kısmi validasyonunun yapılması ve hassasiyet ve tekrarlanabilirlik gibi kriterler açısından başarılı bir yöntem olarak kullanılabilir olduğunun belirlenmesi sonrasında yöntemin ilaç etkin madde adaylarının gerek endokrin ilişkili advers etki, gerekse endokrin ilişkili farmakolojik etkilerinin taranmasında da kullanılabilirliği tez çalışması kapsamında araştırılmıştır. Bu amaçla grubumuzun daha önce yapmış olduğu bir başka doktora tez çalışmasında (Özcan Sezer, 2016) bir hücre-temelli (cell-based) ve bir hücreden ari (cell free) iki farklı *in vitro* test ile aromataz enzimi üzerine güçlü etkisi olduğu bulunan iki indol türevi melatonin analogunun (M6 ve M20) (Ozcan Sezer et al., 2019) steroidojenez yolağının tümü üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ozcan-Sezer ve ark.’nın çalışmasında M6 maddesinin gerek tek doz hızlı tarama, gerekse doz-yanıt araştırma çalışmasında güçlü bir aromataz inhibitörü olduğu ($IC_{50}=8,7.10^{-6}$ M), M20’nin ise tek doz tarama çalışmasında güçlü inhibitör etkili görünürken doz-yanıt ilişkisine bakıldığında doza bağımlı anlamlı bir inhibisyona neden olmadığı görülmüştür. Bu tez çalışmasında, yukarıda belirtilen *in vitro* rekombinant enzimin kullanıldığı çalışmaya kıyasla, H295R hücrelerinde yapılan ve aromataz enzimi üzerine etkinin göstergesi olarak ölçülen E2/T düzeylerindeki değişim, maddelerin daha düşük bir konsantrasyon aralığında

gerçekleştirilmiştir. Dolayısı ile verileri birebir karşılaştırmak mümkün olmamakla birlikte bu tez çalışmasında LC MS/MS ile yapılan hormon ölçümlerinde M6'nın östradiol düzeylerini doza bağımlı olarak anlamlı bir biçimde azalttığı; testosteron düzeyleri üzerinde ise etkinin bifazik bir doğası olduğu, düşük konsantrasyonlarda (0,04 ve 0,12 μ M) T düzeyini artırırken artan konsantrasyonlarda inhibitör etki göstererek T düzeyini azalttığı görülmüştür. H295R hücrelerindeki LC MS/MS ile ölçülen E2/T oranı hesaplandığında 0,01-1,1 μ M konsantrasyon aralığında oranın doza bağımlı olarak azaldığı, dolayısı ile M6 bileşiğinin aromataz enzimi üzerinde doza-bağımlı bir inhibitör bir etkisi olduğu belirlenmiştir. M20 bileşiği ise T düzeylerinde belirgin bir biçimde bifazik doğaya sahip bir artışa neden olmuş; östradiol düzeylerinde de bifazik olarak genel bir azalmaya neden olmuştur.

Tez çalışması kapsamında LC-MS/MS analizleri daha fazla tekrarlanabilmişken ELİSA ile yapılan ölçümler, bütçe kısıtlılığı nedeni ile tekrarlanamamıştır. Genel olarak, özellikle yeni sentezlenen etkin madde adayları ile yapılan çalışmalarda, ELİSA yönteminin östradiol düzeylerini, LC MS/MS yönteminin ise testosteron düzeylerini daha yüksek okuma eğiliminde olduğu tesbit edilmiş ve eldeki ELİSA verilerinin, yayımlanmadan önce mutlaka yeni bütçe kaynağı temin edilerek tekrarlanmasına karar verilmiştir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında uygulanan, H295R hücrelerinde yapılan hormon analizlerinin, rekombinant enzim ile yapılan çalışmalara kıyasla steroidojenez yolağındaki tüm enzimler üzerindeki etkiyi değerlendirebilmeye olanak sağlaması avantajı olduğu ve hücre temelli bir *in vitro* yöntem olduğu için fizyolojik duruma daha yakın (düşük) konsantrasyonlarda ölçüme olanak verdiği söylenebilir. Aynı inkübasyonda maddelerin sitotoksosite potansiyelinin de değerlendirilebiliyor olması zaman ve maliyet açısından avantaj sağlamaktadır ve yöntemin güçlü yanı olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç ve Öneriler

Endokrin bozucu etkilere sahip kimyasal maddeler, endokrin sistem fonksiyonlarında değişikliğe bunun sonucu olarak da birçok hastalıklara sebep olmaktadır. Bu tip istenmeyen etkilerin önlenmesi için ilk basamak olan endokrin bozucu kimyasalların belirlenmesi ve sıkı güvenlik değerlendirilmesine tabi tutulması için test yaklaşımları ve yasal düzenlemeler bulunmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında endokrin bozucu maddelerin olası bir etki mekanizması olarak hormon sentez ve metabolizması üzerine etkilerin araştırılmasına olanak veren, EPA ve OECD tarafından valide edilerek önerilen *in vitro* hücre-temelli bir yöntemin uygulanması amaçlanmıştır. H295R Steroidojenez yönteminde yolağın son ürünleri olan E2 ve T'un LC MS/MS analizi ile ölçülmesi, yöntemin laboratuvarımızda kısmi validasyonunun yapılması ve hormonların ölçümü için önerilen başka bir yöntem olan ELISA yöntemi ile ölçülen hormon düzeylerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. H295R Steroidojenez yöntemi tekrarlanabilir sonuçlar vermesi, deney hayvanı kullanılmaması ve steroidojenez yolağındaki tüm steroid yapılı hormonların üretimini tarama olanağı vermesi gibi avantajları nedeni ile *in vitro* tarama testleri arasında da tercih edilen *in vivo* çalışmalara alternatif *in vitro* bir testtir. LC MS/MS ve ELISA yönteminin her ikisi de endokrin bozucu kimyasalları saptamak için uygulanan hormon ölçümüne bağlı tarama çalışmalarında avantaj ve dezavantajlar içermektedir. LC-MS/MS yönteminin daha yüksek spesifisite ile T ve E2 düzeylerini daha doğru olarak belirlediği; bununla birlikte ölçülebilirlik limitlerinin yüksek olması nedeni ile bazı güçlü inhibitör maddelerin yolaktaki etkilerini kantitatif olarak değerlendirmede başarısız kaldıkları belirlenmiştir. Bununla birlikte hormon analizi hangi yöntemle yapılırsa yapılsın H295R Steroidojenez Yönteminin cinsiyet hormon sentezi üzerinde inhibisyon ya da indüksiyon şeklinde etkileri olan maddeleri belirlemek amacıyla kullanılabileceği görülmüştür. Literatürde çoğunlukla çevresel kirleticilerin söz konusu endokrin bozucu etkilerini tarama amacıyla önerilen ve kullanılan bu yöntemin, tez çalışmamız kapsamında, antioksidan amaçla kullanılması önerilebilecek indol türevi melatonin analoglarının olası advers etkilerinin belirlenmesi amacıyla da ilaç endüstrisinde ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarının erken evrelerinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Ayrıca aynı melatonin analoglarının, ana bileşenleri olan melatonin gibi aromataz inhibitörü etkileri nedeniyle hormon-bağımlı (ER pozitif) meme kanserlerinde tedavi edici etkilerinin

hızlı bir şekilde taranması ve olası hit/öncü moleküllerin belirlenmesi amacıyla da kullanılabilirliği araştırılmıştır. Yöntemin ilaç farmakolojik ve toksikolojik etki taramalarında da başarı ile kullanılabileceği de bu tez çalışması kapsamında önerilmiş ve bu anlamda yöntemin başarı ile kullanılabilir olduğu ortaya konmuştur.



Kayaklar

- Ahmed, Kareem Eldin Mohammed, Håvard G. Frøysa, Odd André Karlsen, Jørn V. Sagen, Gunnar Mellgren, Steven Verhaegen, Erik Ropstad, Anders Goksøyr, and Ralf Kellmann. 2018. "LC-MS/MS Based Profiling and Dynamic Modelling of the Steroidogenesis Pathway in Adrenocarcinoma H295R Cells." *Toxicology in Vitro* 52(December 2017):332–41. doi: 10.1016/j.tiv.2018.07.002.
- Ahn, Ki Chang, Bin Zhao, Jiangang Chen, Gennady Cherednichenko, Enio Sanmarti, Michael S. Denison, Bill Lasley, Isaac N. Pessah, Dietmar Kültz, Daniel P. Y. Chang, Shirley J. Gee, and Bruce D. Hammock. 2008. "In Vitro Biologic Activities of the Antimicrobials Triclocarban, Its Analogs, and Triclosan in Bioassay Screens: Receptor-Based Bioassay Screens." *Environmental Health Perspectives* 116(9):1203–10. doi: 10.1289/ehp.11200.
- Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, and Y. Fukami. 1987. "Genistein, a Specific Inhibitor of Tyrosine-Specific Protein Kinases." *Journal of Biological Chemistry* 262(12):5592–95. doi: 10.1016/s0021-9258(18)45614-1.
- Amarneh, Bilal, C. Jo Corbin, Julian A. Peterson, Evan R. Simpson, and Sandra Graham-Lorence. 1993. "Functional Domains of Human Aromatase Cytochrome P450 Characterized by Linear Alignment and Site-Directed Mutagenesis." *Molecular Endocrinology* 7(12):1617–24. doi: 10.1210/mend.7.12.8145767.
- Ankley, Gerald T., and L. Earl Gray. 2013. "Cross-Species Conservation of Endocrine Pathways: A Critical Analysis of Tier 1 Fish and Rat Screening Assays with 12 Model Chemicals." *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(5):1084–87. doi: 10.1002/etc.2151.
- Antonini, Sonir R., Monica F. Stecchini, and Fernando S. Ramalho. 2019. *Development and Function of the Adrenal Cortex and Medulla in the Fetus and Neonate*. Elsevier Inc.
- Auchus, Richard J. 2004. "Overview of Dehydroepiandrosterone Biosynthesis." *Seminars in Reproductive Medicine* 22(4):281–88. doi: 10.1055/s-2004-861545.

- Basly, Jean Philippe, and Marie Chantal Canivenc Lavier. 2005. "Dietary Phytoestrogens: Potential Selective Estrogen Enzyme Modulators?" *Planta Medica* 71(4):287–94. doi: 10.1055/s-2005-864092.
- Beardsworth, S. A., and D. W. Purdie. 1998. "Selective Oestrogen Receptor Modulators." *Menopause International* 4(1):30–32. doi: 10.1177/136218079800400109.
- Bergman, Åke, Jerrold Heindel, Susan Jobling, Karen Kidd, and R. Thomas Zoeller. 2012. *State-of-the-Science of Endocrine Disrupting Chemicals, 2012*. Vol. 211.
- Blystone, Chad R., Christy S. Lambright, Kembra L. Howdeshell, Johnathan Furr, Robin M. Sternberg, Brian C. Butterworth, Elizabeth J. Durhan, Elizabeth A. Makynen, Gerald T. Ankley, Vickie S. Wilson, Gerald A. LeBlanc, and L. Earl Gray. 2007. "Sensitivity of Fetal Rat Testicular Steroidogenesis to Maternal Prochloraz Exposure and the Underlying Mechanism of Inhibition." *Toxicological Sciences* 97(2):512–19. doi: 10.1093/toxsci/kfm055.
- Bovee, Toine F. H., Richard J. R. Helsdingen, Astrid R. M. Hamers, Bram A. Brouwer, and Michel W. F. Nielen. 2011. "Recombinant Cell Bioassays for the Detection of (Glucocorticosteroids and Endocrine-Disrupting Potencies of Several Environmental PCB Contaminants." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401(3):873–82. doi: 10.1007/s00216-011-5162-5.
- Bovee, Toine F. H., Richard J. R. Helsdingen, Astrid R. M. Hamers, Majorie B. M. Van Duursen, Michel W. F. Nielen, and Ron L. A. P. Hoogenboom. 2007. "A New Highly Specific and Robust Yeast Androgen Bioassay for the Detection of Agonists and Antagonists." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389(5):1549–58. doi: 10.1007/s00216-007-1559-6.
- Britain, Great, Pergamon Press, Medizinische Klinik Ii, Klinikum Grol, and M. After. 1991. "Effect of Ketoconazole on Human Ovarian C₁₇,20-Desmolase and Aromatase." 38(2):213–18.
- Buelke-Sam, Judy, Henry U. Bryant, and Paul C. Francis. 1998. "The Selective Estrogen Receptor Modulator, Raloxifene: An Overview of Nonclinical Pharmacology and Reproductive and Developmental Testing." *Reproductive Toxicology* 12(3):217–21. doi: 10.1016/S0890-6238(98)00003-3.

- Cantón, Rocío F., J. Thomas Sanderson, Robert J. Letcher, Åke Bergman, and Martin van den Berg. 2005. "Inhibition and Induction of Aromatase (CYP19) Activity by Brominated Flame Retardants in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells." *Toxicological Sciences* 88(2):447–55. doi: 10.1093/toxsci/kfi325.
- Charles, Grantley D. 2004. "In Vitro Models in Endocrine Disruptor Screening." *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 45(4):494–501. doi: 10.1093/ilar.45.4.494.
- Conference, International, O. N. Harmonisation, O. F. Technical, Requirements For, Registration Of, Pharmaceuticals For, and Alidation Of. 2005. "ICH HARMONISED T RIPARTITE G UIDELINE V ALIDATION OF A NALYTICAL P ROCEDURES :." 1994(November 1996).
- Cos, S., A. Gonzalez, C. Martinez-Campa, M. Mediavilla, C. Alonso-Gonzalez, and E. Sanchez-Barcelo. 2008. "Melatonin as a Selective Estrogen Enzyme Modulator." *Current Cancer Drug Targets* 8(8):691–702. doi: 10.2174/156800908786733469.
- Cos, S., and Emilio J. Sánchez-Barceló. 2000. "Melatonin, Experimental Basis for a Possible Application in Breast Cancer Prevention and Treatment." *Histology and Histopathology* 15(2):637–47.
- Cos, Samuel, Alicia González, Carlos Martínez-Campa, Maria Dolores Mediavilla, Carolina Alonso-González, and Emilio J. Sánchez-Barceló. 2006. "Estrogen-Signaling Pathway: A Link between Breast Cancer and Melatonin Oncostatic Actions." *Cancer Detection and Prevention* 30(2):118–28. doi: 10.1016/j.cdp.2006.03.002.
- Cos, Samuel, and Emilio J. Sánchez-Barceló. 2000. "Melatonin and Mammary Pathological Growth." *Frontiers in Neuroendocrinology* 21(2):133–70. doi: 10.1006/frne.1999.0194.
- Couzinet, Beatrice, Geri Meduri, Maria G. Lecce, Jacques Young, Sylvie Brailly, Hugues Loosfelt, Edwin Milgrom, and Gilbert Schaison. 2001. "The Postmenopausal Ovary Is Not a Major Androgen-Producing Gland." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(10):5060–66. doi: 10.1210/jcem.86.10.7900.
- Crain, D. A., and L. J. Guillette. 1998. "Reptiles as Models of Contaminant-Induced Endocrine Disruption." *Animal Reproduction Science* 53(1–4):77–86. doi: 10.1016/S0378-4320(98)00128-6.

- D. Mediavilla, M., E. J. Sanchez-Barcelo, D. X. Tan, L. Manchester, and R. J. Reiter. 2011. "Basic Mechanisms Involved in the Anti-Cancer Effects of Melatonin." *Current Medicinal Chemistry* 17(36):4462–81. doi: 10.2174/092986710794183015.
- Dadehbeigi, Nazanin, Seyed Nasser Ostad, Mohammad Ali Faramarzi, and Mohammad Hossein Ghahremani. 2008. "Sex Hormones Affect the Production of Recombinant Factor IX in CHO and HEK-293 Cell Lines." *Biotechnology Letters* 30(11):1909–12. doi: 10.1007/s10529-008-9774-6.
- Damstra, Terri, Sue Barlow, Aake Bergman, Robert Kavlock, and Glen Van Der Kraak. 2002. "Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors." *WHOpublication No. WHO/PCS/EDC/02.2* 180.
- Diamanti-Kandarakis, Evanthia, Jean Pierre Bourguignon, Linda C. Giudice, Russ Hauser, Gail S. Prins, Ana M. Soto, R. Thomas Zoeller, and Andrea C. Gore. 2009. "Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement." *Endocrine Reviews* 30(4):293–342. doi: 10.1210/er.2009-0002.
- EPA. 2011a. "Hershberger Assay OCSPP Guideline 890.1400." *Standard Evaluation Procedure* (October):1–16.
- EPA. 2011b. "Standard Evaluation Procedure (SEP) ENDOCRINE DISRUPTOR SCREENING PROGRAM Standard Evaluation Procedure Steroidogenesis (Human Cell Line-H295R) OCSPP 890.1550." (July).
- Eyster, Kathleen M. 2016. "The Estrogen Receptors: An Overview from Different Perspectives." *Methods in Molecular Biology* 1366(4):1–10. doi: 10.1007/978-1-4939-3127-9_1.
- Fishman, J., and M. S. Raju. 1981. "Mechanism of Estrogen Biosynthesis. Stereochemistry of C-1 Hydrogen Elimination in the Aromatization of 2 β -Hydroxy-19-Oxoandrostenedione." *Journal of Biological Chemistry* 256(9):4472–77. doi: 10.1016/s0021-9258(19)69459-7.
- Franke, Adrian A., and Laurie J. Custer. 1994. "High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Isoflavonoids and Coumestrol from Human Urine." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 662(1):47–60. doi: 10.1016/0378-4347(94)00390-4.

- Franke, Adrian A., Laurie J. Custer, Carmencita M. Cerna, and Kavitha Narala. 1995. "Rapid HPLC Analysis of Dietary Phytoestrogens from Legumes and from Human Urine." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 208(1):18–26. doi: 10.3181/00379727-208-43826.
- Franke, Adrian A., Laurie J. Custer, Weiqun Wang, and Chen Yang Shi. 1998. "HPLC Analysis of Isoflavonoids and Other Phenolic Agents from Foods and from Human Fluids." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 217(3):263–73. doi: 10.3181/00379727-217-44231.
- Fraschini, F., Demartini, G., Esposti, D., Scaglione, F. 1998. Melatonin involvement in immunity and cancer. *Neurosignals*, 7(1), 61-72.
- Goldstein, Steven R., Suresh Siddhanti, Angelina V. Ciaccia, and Leo Plouffe. 2000. "A Pharmacological Review of Selective Oestrogen Receptor Modulators." *Human Reproduction Update* 6(3):212–24. doi: 10.1093/humupd/6.3.212.
- Gonzalez, A., S. Cos, C. Martinez-Campa, C. Alonso-Gonzalez, S. Sanchez-Mateos, M. D. Mediavilla, and E. J. Sanchez-Barcelo. 2008. "Selective Estrogen Enzyme Modulator Actions of Melatonin in Human Breast Cancer Cells." *Journal of Pineal Research* 45(1):86–92. doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00559.x.
- Grebe, Stefan K. G., and Ravinder J. Singh. 2011. "LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to from Here?" *Clinical Biochemist Reviews* 32(1):5–31.
- Green, Stephen, Philippe Walter, Vijay Kumar, Andrée Krust, Jean Marc Bornert, Patrick Argos, and Pierre Chambon. 1986. "Human Oestrogen Receptor CDNA: Sequence, Expression and Homology to v-Erb-A." *Nature* 320(6058):134–39. doi: 10.1038/320134a0.
- Gurer-Orhan, Hande, Cigdem Karaaslan, Senem Ozcan, Omidreza Firuzi, Marjan Tavakkoli, Luciano Saso, and Sibel Suzen. 2016. "Novel Indole-Based Melatonin Analogues: Evaluation of Antioxidant Activity and Protective Effect against Amyloid β -Induced Damage." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 24(8):1658–64. doi: 10.1016/j.bmc.2016.02.039.
- H., Frank, and Shu. 1977. "No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title." *Apj* 1–37.

- Hakki, Tarek, Katja Hübel, Herbert Waldmann, and Rita Bernhardt. 2011. "The Development of a Whole-Cell Based Besiyeri Throughput Screening System for the Discovery of Human Aldosterone Synthase (CYP11B2) Inhibitors: Old Drugs Disclose New Applications for the Therapy of Congestive Heart Failure, Myocardial Fibrosis and Hyperte." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 125(1–2):120–28. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.12.011.
- Hara, Takayuki, Fumio Otsuka, Naoko Tsukamoto-Yamauchi, Kenichi Inagaki, Takeshi Hosoya, Eri Nakamura, Tomohiro Terasaka, Motoshi Komatsubara, and Hirofumi Makino. 2015. "Mutual Effects of Melatonin and Activin on Induction of Aldosterone Production by Human Adrenocortical Cells." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 152:8–15. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.04.012.
- Hecker, Markus. 2016. "ENTRIX Report." (March 2008).
- Hecker, Markus, and John P. Giesy. 2008. "Novel Trends in Endocrine Disruptor Testing: The H295R Steroidogenesis Assay for Identification of Inducers and Inhibitors of Hormone Production." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390(1):287–91. doi: 10.1007/s00216-007-1657-5.
- Hecker, Markus, Henner Hollert, Ralph Cooper, Anne-Marie Vinggaard, Yumi Akahori, Margaret Murphy, Christine Nellemann, Eric Higley, John Newsted, John Laskey, Angela Buckalew, Stefanie Grund, Sibylle Maletz, John Giesy, and Gary Timm. 2018. "Erratum to: The OECD Validation Program of the H295R Steroidogenesis Assay: Phase 3. Final Inter-Laboratory Validation Study." *Environ Sci Pollut Res* 25:15265–67. doi: 10.1007/s11356-010-0396-x.
- Hecker, Markus, Henner Hollert, Ralph Cooper, Anne Marie Vinggaard, Yumi Akahori, Margaret Murphy, Christine Nellemann, Eric Higley, John Newsted, John Laskey, Angela Buckalew, Stefanie Grund, Sibylle Maletz, John Giesy, and Gary Timm. 2011. "The OECD Validation Program of the H295R Steroidogenesis Assay: Phase 3. Final Inter-Laboratory Validation Study." *Environmental Science and Pollution Research* 18(3):503–15. doi: 10.1007/s11356-010-0396-x.

- Hecker, Markus, Henner Hollert, Ralph Cooper, Anne Marie Vinggaard, Yumi Akahori, Margaret Murphy, Christine Nellemann, Eric Higley, John Newsted, Rudolph Wu, Paul Lam, John Laskey, Angela Buckalew, Stefanie Grund, Makoto Nakai, Gary Timm, and John Giesy. 2007. "The OECD Validation Program of the H295R Steroidogenesis Assay for the Identification of in Vitro Inhibitors and Inducers of Testosterone and Estradiol Production. Phase 2: Inter-Laboratory Pre-Validation Studies." *Environmental Science and Pollution Research* 14(1 SPEC. ISS.):23–30. doi: 10.1065/espr2007.03.402.
- Hecker, Markus, John L. Newsted, Margaret B. Murphy, Eric B. Higley, Paul D. Jones, Rudolf Wu, and John P. Giesy. 2006. "Human Adrenocarcinoma (H295R) Cells for Rapid in Vitro Determination of Effects on Steroidogenesis: Hormone Production." *Toxicology and Applied Pharmacology* 217(1):114–24. doi: 10.1016/j.taap.2006.07.007.
- Higley, Eric B., John L. Newsted, Xiaowei Zhang, John P. Giesy, and Markus Hecker. 2010. "Assessment of Chemical Effects on Aromatase Activity Using the H295R Cell Line." *Environmental Science and Pollution Research* 17(5):1137–48. doi: 10.1007/s11356-009-0285-3.
- Higley, Eric B., John L. Newsted, Xiaowei Zhang, John P. Giesy, Markus Hecker, Eric B. Higley, : X Zhang, John P. Giesy, : M Hecker, John L. Newsted, and Markus Hecker. 2010. "Assessment of Chemical Effects on Aromatase Activity Using the H295R Cell Line." *Environmental Science and Pollution Research* 17(5):1137–48. doi: 10.1007/s11356-009-0285-3.
- Hilscherova, Klara, Paul D. Jones, Tannia Gracia, John L. Newsted, Xiaowei Zhang, J. T. Sanderson, Richard M. K. Yu, Rudolf S. S. Wu, and John P. Giesy. 2004. "Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR." *Toxicological Sciences* 81(1):78–89. doi: 10.1093/toxsci/kfh191.
- Hofland, Johannes, and Frank H. de Jong. 2012. "Inhibins and Activins: Their Roles in the Adrenal Gland and the Development of Adrenocortical Tumors." *Molecular and Cellular Endocrinology* 359(1–2):92–100. doi: 10.1016/j.mce.2011.06.005.

- Hojo, Hitoshi, Hiroaki Aoyama, Ken L. Takahashi, Naoko Shimizu, Masayuki Araki, Yoshio Takizawa, Koji Sakasai, Maki Kuwahara, Machiko Saka, and Shoji Teramoto. 2006. "Two-Generation Reproduction Toxicity Study in Rats with 1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl)Ethane (p,p'-DDT)." *Congenital Anomalies* 46(2):105–14. doi: 10.1111/j.1741-4520.2006.00110.x.
- Ikeda, Yasumasa, Ken Ichi Aihara, Sumiko Yoshida, Masashi Akaike, and Toshio Matsumoto. 2012. "Effects of Androgens on Cardiovascular Remodeling." *Journal of Endocrinology* 214(1):1–10. doi: 10.1530/JOE-12-0126.
- Ishimoto, Hitoshi, and Robert B. Jaffe. 2011. "Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit." *Endocrine Reviews* 32(3):317–55. doi: 10.1210/er.2010-0001.
- Jensen, Allan Astrup, and Henrik Leffers. 2008. "Emerging Endocrine Disrupters : Perfluoroalkylated Substances." 161–69. doi: 10.1111/j.1365-2605.2008.00870.x.
- Journal, European, and Clinical Investigation. 2000. "Intracrinology and the Local Enzymatic Control of Hormone Distribution and Metabolism : Dehydroepiandrosterone Does Not Just Act as a Prohormone for Androgens and Estrogens." 30:34–38.
- Jumhawan, Udi, Toshiyuki Yamashita, Kazuya Ishida, Eiichiro Fukusaki, and Takeshi Bamba. 2017. "Simultaneous Profiling of 17 Steroid Hormones for the Evaluation of Endocrine-Disrupting Chemicals in H295R Cells." *Bioanalysis* 9(1):67–79. doi: 10.4155/bio-2016-0149.
- Kamat, Amrita, Margaret M. Hinshelwood, Barbara A. Murry, and Carole R. Mendelson. 2002. "Mechanisms in Tissue-Specific Regulation of Estrogen Biosynthesis in Humans." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13(3):122–28. doi: 10.1016/S1043-2760(02)00567-2.
- Karbownik, M., Lewinski, A., Reiter, R. J. 2001. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(8), 735-753.
- Karmaus, Agnes L., Colleen M. Toole, Dayne L. Filer, Kenneth C. Lewis, and Matthew T. Martin. 2016. "High-Throughput Screening of Chemical Effects on Steroidogenesis Using H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells." *Toxicological Sciences* 150(2):323–32. doi: 10.1093/toxsci/kfw002.

- Katinka van der Jagt, Sharon Munn, Jens Tørsløv, Jack de Bruijn, 2004. "Alternative Approaches Can Reduce The Use Of Test, European Commission Directorate General Jrc Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection Animals Under Reach."
- Kavlock, Robert J., George P. Daston, Chris DeRosa, Penny Fenner-Crisp, L. Earl Gray, Steve Kaattari, George Lucier, Michael Luster, Michael J. Mac, Carol Maczka, Ron Miller, Jack Moore, Rosalind Rolland, Geoffrey Scott, Daniel M. Sheehan, Thomas Sinks, and Hugh A. Tilson. 1996. "Research Needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disrupters: A Report of the U.S. EPA-Sponsored Workshop." *Environmental Health Perspectives* 104(SUPPL. 4):715–40. doi: 10.1289/ehp.96104s4715.
- Kayaalp, S. .. 2002. "Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji." *İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi* 1884.
- King, T. L., Brucker, M. C. 2010. Pharmacology Health.
- Kitamura, Shigeyuki, Tomoharu Suzuki, Seigo Sanoh, Ryuki Kohta, Norimasa Jinno, Kazumi Sugihara, Shin'ichi Yoshihara, Nariaki Fujimoto, Hiromitsu Watanabe, and Shigeru Ohta. 2005. "Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds." *Toxicological Sciences* 84(2):249–59. doi: 10.1093/toxsci/kfi074.
- Kortenkamp, Andreas, Olwenn Martin, Michael Faust, Richard Evans, Rebecca Mckinlay, Frances Orton, and Erika Rosivatz. 2011. "State of the Art Assessment of Endocrine Disrupters." *Project Contract Number 070307/2009/550687/SER/D3 (070307):1–135.*
- Kroboth, Patricia D., Firoozeh S. Salek, Amy L. Pittenger, Tanya J. Fabian, and Reginald F. Frye. 1999. "DHEA and DHEA-S: A Review." *Journal of Clinical Pharmacology* 39(4):327–48. doi: 10.1177/00912709922007903.
- Kühn-Velten, W. N. 2000. "Intracrinology and the Local Enzymatic Control of Hormone Distribution and Metabolism: Dehydroepiandrosterone Does Not Just Act as a Prohormone for Androgens and Estrogens." *European Journal of Clinical Investigation, Supplement* 30(3):34–38. doi: 10.1046/j.1365-2362.2000.0300s3034.x.

- Kuiper, George G. J. M., Bo Carlsson, Kaj Grandien, Eva Enmark, Johan Häggblad, Stefan Nilsson, and Jan Åke Gustafsson. 1997. "Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors and α and β ." *Endocrinology* 138(3):863–70. doi: 10.1210/endo.138.3.4979.
- Labrie, Fernand, Claude Labrie, and Jacques Simard. 2001. "DHEA and Its Transformation into Androgens and Estrogens in Peripheral Target Tissues : Intracrinology." 212:185–212. doi: 10.1006/frne.2001.0216.
- Labrie, F. 2010. DHEA, important source of sex steroids in men and even more in women. *Progress in brain research*, 182, 97-148.
- Law, Robin J., Colin R. Allchin, Jacob De Boer, Adrian Covaci, Dorte Herzke, Peter Lepom, Steven Morris, Jacek Tronczynski, and Cynthia A. De Wit. 2006. "Levels and Trends of Brominated Flame Retardants in the European Environment." 64:187–208. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.12.007.
- Lee-Robichaud, P., J. N. Wright, M. E. Akhtar, and M. Akhtar. 1995. "Modulation of the Activity of Human 17 α -Hydroxylase-17,20-Lyase (CYP17) by Cytochrome B5: Endocrinological and Mechanistic Implications." *Biochemical Journal* 308(3):901–8. doi: 10.1042/bj3080901.
- Lee, Duk Hee, and David R. Jacobs. 2015. "Hormesis and Public Health: Can Glutathione Depletion and Mitochondrial Dysfunction Due to Very Low-Dose Chronic Exposure to Persistent Organic Pollutants Be Mitigated?" *Journal of Epidemiology and Community Health* 69(3):294–300. doi: 10.1136/jech-2014-203861.
- Lefèvre, Lucile, Jérôme Bertherat, and Bruno Ragazzon. 2015. "Adrenocortical Growth and Cancer." *Comprehensive Physiology* 5(1):293–326. doi: 10.1002/cphy.c140010.
- Leon-Blanco, M. M., Guerrero, J. M., Reiter, R. J., Calvo, J. R. Pozo, D. 2003. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *Journal of pineal research*, 35(3), 204-211.
- Longcope, Christopher, J. Howard Pratt, Stephen H. Schneider, and S. Edwin Fineberg. 1978. "Aromatization of Androgens by Muscle and Adipose Tissue in Vivo." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 46(1):146–52. doi: 10.1210/jcem-46-1-146.

- Macikova, Petra, Ksenia J. Groh, Adrian A. Ammann, Kristin Schirmer, and Marc J. F. Suter. 2014. "Endocrine Disrupting Compounds Affecting Corticosteroid Signaling Pathways in Czech and Swiss Waters: Potential Impact on Fish." *Environmental Science and Technology* 48(21):12902–11. doi: 10.1021/es502711c.
- Matsumine, Hiroto, Kumiko Hirato, Takumi Yanaihara, Taro Tamada, and Mitsuo Yoshida. 1986. "Aromatization by Skeletal Muscle." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 63(3):717–20. doi: 10.1210/jcem-63-3-717.
- Matthews, Jason, and Jan Ake Gustafsson. 2003. "Estrogen Signaling: A Subtle Balance between ER Alpha and ER Beta." *Molecular Interventions* 3(5):281–92. doi: 10.1124/mi.3.5.281.
- McDonnell, D. P. 1998. "Definition of the Molecular Mechanism of Action of Tissue-Selective Oestrogen-Receptor Modulators." *Biochemical Society Transactions* 26(1):54–60. doi: 10.1042/bst0260054.
- Mesiano, Sam, Steven L. Katz, Janet Y. Lee, and Robert B. Jaffe. 1999. "Phytoestrogens Alter Adrenocortical Function: Genistein and Daidzein Suppress Glucocorticoid and Stimulate Androgen Production by Cultured Adrenal Cortical Cells." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84(7):2443–48. doi: 10.1210/jc.84.7.2443.
- Miller, W. R. 1990. "Endocrine Treatment for Breast Cancers: Biological Rationale and Current Progress." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 37(4):467–80. doi: 10.1016/0960-0760(90)90390-7.
- Miller, W. R. 1991. "Aromatase Activity in Breast Tissue." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 39(5 PART 2):783–90. doi: 10.1016/0960-0760(91)90026-2.
- Miller, Walter L. 2002. "Androgen Biosynthesis from Cholesterol to DHEA." *Molecular and Cellular Endocrinology* 198(1–2):7–14. doi: 10.1016/S0303-7207(02)00363-5.
- Miller, Walter L., and Richard J. Auchus. 2011. "The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders." *Endocrine Reviews* 32(1):81–151. doi: 10.1210/er.2010-0013.
- Monticone, Silvia, Richard J. Auchus, and William E. Rainey. 2012. "Adrenal Disorders in Pregnancy." *Nature Reviews Endocrinology* 8(11):668–78. doi: 10.1038/nrendo.2012.155.

- Mosselman, Sietse, Jan Polman, and Rein Dijkema. 1996. "ER β : Identification and Characterization of a Novel Human Estrogen Receptor." *FEBS Letters* 392(1):49–53. doi: 10.1016/0014-5793(96)00782-X.
- Munkboel, Cecilie Hurup, Tobias Bangsgaard Rasmussen, Camilla Elgaard, Maja Luna Kingo Olesen, Andreas Christopher Kretschmann, and Bjarne Styrishave. 2019. "The Classic Azole Antifungal Drugs Are Highly Potent Endocrine Disruptors in Vitro Inhibiting Steroidogenic CYP Enzymes at Concentrations Lower than Therapeutic Cmax." *Toxicology* 425(July):152247. doi: 10.1016/j.tox.2019.152247.
- Nature Publishing Group, 1938. Estrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds, February 5, 1938, Vol. 141, No: 3562.
- Nielsen, Frederik Knud, Cecilie Hurup Hansen, Jennifer Anna Fey, Martin Hansen, Naja Wessel Jacobsen, Bent Halling-Sørensen, Erland Björklund, and Bjarne Styrishave. 2012. "H295R Cells as a Model for Steroidogenic Disruption: A Broader Perspective Using Simultaneous Chemical Analysis of 7 Key Steroid Hormones." *Toxicology in Vitro* 26(2):343–50. doi: 10.1016/j.tiv.2011.12.008.
- Nilsson, S., S. Mäkelä, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner, and J. Å. Gustafsson. 2001. "Mechanisms of Estrogen Action." *Physiological Reviews* 81(4):1535–65. doi: 10.1152/physrev.2001.81.4.1535.
- Nishii, Masahiro, Masashi Nomura, Yoshitaka Sekine, Hidekazu Koike, Hiroshi Matsui, Yasuhiro Shibata, Kazuto Ito, Tetsunari Oyama, and Kazuhiro Suzuki. 2012. "Luteinizing Hormone (LH)-Releasing Hormone Agonist Reduces Serum Adrenal Androgen Levels in Prostate Cancer Patients: Implications for the Effect of LH on the Adrenal Glands." *Journal of Andrology* 33(6):1233–38. doi: 10.2164/jandrol.112.016493.
- OECD. 2011. "Test No. 456: H295R Steroidogenesis Assay." *Organisation for Economic Co-Operation and Development Publishing* (July):1–10.
- OECD. 2012. "OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors (as Revised in 2012)." *OECD Series on Testing and Assessment* 150(August):1–5.

- Ohlsson, Åsa, Erik Ullerås, Nina Cedergreen, and Agneta Oskarsson. 2010. "Mixture Effects of Dietary Flavonoids on Steroid Hormone Synthesis in the Human Adrenocortical H295R Cell Line." *Food and Chemical Toxicology* 48(11):3194–3200. doi: 10.1016/j.fct.2010.08.021.
- Ohno, Shuji, Satoshi Shinoda, Satoshi Toyoshima, Hiroyuki Nakazawa, Tsunehisa Makino, and Shizuo Nakajin. 2002. "Effects of Flavonoid Phytochemicals on Cortisol Production and on Activities of Steroidogenic Enzymes in Human Adrenocortical H295R Cells." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80(3):355–63. doi: 10.1016/S0960-0760(02)00021-3.
- Owens, J. William, Errol Zeiger, Michael Walker, John Ashby, Lesley Onyon, and L. Earl Gray. 2006. "The OECD Program to Validate the Rat Hershberger Bioassay to Screen Compound for in Vivo Androgen and Antiandrogen Responses. Phase 1: Use of a Potent Agonist and a Potent Antagonist to Test the Standardized Protocol." *Environmental Health Perspectives* 114(8):1259–65. doi: 10.1289/ehp.8751.
- Ozcan-Sezer, S., E. Ince, A. Akdemir, Ö. Ö. Ceylan, S. Suzen, and H. Gurer-Orhan. 2019. "Aromatase Inhibition by 2-Methyl Indole Hydrazone Derivatives Evaluated via Molecular Docking and in Vitro Activity Studies." *Xenobiotica* 49(5). doi: 10.1080/00498254.2018.1482029.
- Özcan Sezer, Senem, 2016, Yeni Sentezlenen Melatonin Analoglarının Aromataz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 153s.
- Page, Stephanie T. 2011. "Physiologic Role and Regulation of Intratesticular Sex Steroids." doi: 10.1097/MED.0b013e328345d50e.
- Van der Pas, R., L. J. Hofland, J. Hofland, A. E. Taylor, W. Arlt, J. Steenbergen, P. M. Van Koetsveld, W. W. De Herder, F. H. De Jong, and R. A. Feelder. 2012. "Fluconazole Inhibits Human Adrenocortical Steroidogenesis in Vitro." *Journal of Endocrinology* 215(3):403–12. doi: 10.1530/JOE-12-0310.
- Peters, Amelia A., Grant Buchanan, Carmela Ricciardelli, Tina Bianco-Miotto, Margaret M. Centenera, Jonathan M. Harris, Shalini Jindal, Davendra Segara, Li Jia, Nicole L. Moore, Susan M. Henshall, Stephen N. Birrell, Gerhard A. Coetzee, Robert L. Sutherland, Lisa M. Butler, and Wayne D. Tilley. 2009. "Androgen Receptor Inhibits Estrogen Receptor- α Activity and Is Prognostic in Breast Cancer." *Cancer Research* 69(15):6131–40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0452.

- Pihlajamaa, Päivi, Biswajyoti Sahu, and Olli A. Jänne. 2015. "Determinants of Receptor- and Tissue-Specific Actions in Androgen Signaling." *Endocrine Reviews* 36(4):357–84. doi: 10.1210/er.2015-1034.
- Practice, Clinical. 2021. "Endocrine System 1: Overview of the Endocrine System and Hormones." 117(5):38–42.
- Psc, Stereoidogenic Enzymes. 1986. "RAIMO VOUTILAINENf AND WALTER L. MILLER." 63(5).
- Rahman, Shadab A., Alexandra Kollara, Theodore J. Brown, and Robert F. Casper. 2008. "Selectively Filtering Short Wavelengths Attenuates the Disruptive Effects of Nocturnal Light on Endocrine and Molecular Circadian Phase Markers in Rats." *Endocrinology* 149(12):6125–35. doi: 10.1210/en.2007-1742.
- Ram, P. T., J. Dai, L. Yuan, C. Dong, T. L. Kiefer, L. Lai, and S. M. Hill. 2002. "Involvement of the Mtl Melatonin Receptor in Human Breast Cancer." *Cancer Letters* 179(2):141–50. doi: 10.1016/S0304-3835(01)00873-4.
- Ram, P. T., T. Kiefer, M. Silverman, Y. Song, G. M. Brown, and S. M. Hill. 1998. "Estrogen Receptor Transactivation in MCF-7 Breast Cancer Cells by Melatonin and Growth Factors." *Molecular and Cellular Endocrinology* 141(1–2):53–64. doi: 10.1016/S0303-7207(98)00095-1.
- Rao, Ch V., X. L. Zhou, and Z. M. Lei. 2004. "Functional Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptors in Human Adrenal Cortical H295R Cells." *Biology of Reproduction* 71(2):579–87. doi: 10.1095/biolreprod.104.027300.
- Reel, Jerry R., James C. Lamb IV, and Barbara H. Neal. 1996. "Survey and Assessment of Mammalian Estrogen Biological Assays for Hazard Characterization." *Fundamental and Applied Toxicology* 34(2):288–305. doi: 10.1006/faat.1996.0198.
- Reiter, R. J. 1980. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine reviews*, 1(2), 109-131.
- Reiter, R. J. 1993. "The Melatonin Rhythm: Both a Clock and a Calendar." *Experientia* 49(8):654–64. doi: 10.1007/BF01923947.
- Riggs, B. Lawrence, and Lynn C. Hartmann. 2003. "030213 Selective Estrogen-Receptor Modulators — Mechanisms of Action." *The New England Journal of Medicine* 348(12):618–30.

- Rijk, Jeroen C. W., Ad A. C. M. Peijnenburg, Marco H. Blokland, Arjen Lommen, Ron L. A. P. Hoogenboom, and Toine F. H. Bovee. 2012. "Screening for Modulatory Effects on Steroidogenesis Using the Human H295R Adrenocortical Cell Line: A Metabolomics Approach." *Chemical Research in Toxicology* 25(8):1720–31. doi: 10.1021/tx3001779.
- Robertson, John F. 2002. "Estrogen Receptor Downregulators: New Antihormonal Therapy for Advanced Breast Cancer." *Clinical Therapeutics* 24(SUPPL. A). doi: 10.1016/S0149-2918(02)85032-9.
- Rosenmai, Anna Kjerstine, Marianne Dybdahl, Mikael Pedersen, Barbara Medea Alice van Vugt-Lussenburg, Eva Bay Wedebye, Camilla Taxvig, and Anne Marie Vinggaard. 2014. "Are Structural Analogues to Bisphenol a Safe Alternatives?" *Toxicological Sciences* 139(1):35–47. doi: 10.1093/toxsci/kfu030.
- Rosli, Nur Shafawati, Azhar Abdul Rahman, Azlan Abdul Aziz, Shaharum Shamsuddin, and Nurul Sabihah Zakaria. 2017. "Effects of the Gold Nanoparticles (AuNPs) on the Proliferation and Morphological Characteristics of Human Breast Cancer Cells (MCF-7) in Culture." *Solid State Phenomena* 268 SSP:254–58. doi: 10.4028/www.scientific.net/SSP.268.254.
- Ryan, K. J. 1959. "Biological Aromatization of Steroids." *The Journal of Biological Chemistry* 234(2):268–72. doi: 10.1016/s0021-9258(18)70286-x.
- Sánchez-Barceló, E. J., S. Cos, R. Fernández, and M. D. Mediavilla. 2003. "Melatonin and Mammary Cancer: A Short Review." *Endocrine-Related Cancer* 10(2):153–59. doi: 10.1677/erc.0.0100153.
- Sánchez-Barceló, Emilio J., Samuel Cos, Dolores Mediavilla, Carlos Martínez-Campa, Alicia González, and Carolina Alonso-González. 2005. "Melatonin-Estrogen Interactions in Breast Cancer." *Journal of Pineal Research* 38(4):217–22. doi: 10.1111/j.1600-079X.2004.00207.x.
- Sanderson, J. Thomas. 2006. "The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals." *Toxicological Sciences* 94(1):3–21. doi: 10.1093/toxsci/kfl051.

- Sanderson, J. Thomas, Joke Boerma, Gideon W. A. Lansbergen, and Martin Van Den Berg. 2002. "Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Various Classes of Pesticides in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* 182(1):44–54. doi: 10.1006/taap.2002.9420.
- Sanderson, J. Thomas, Joost Hordijk, Michael S. Denison, Mark F. Springsteel, Michael H. Nantz, and Martin van den Berg. 2004. "Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Natural and Synthetic Flavonoid Compounds in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells." *Toxicological Sciences* 82(1):70–79. doi: 10.1093/toxsci/kfh257.
- Sanderson, J. Thomas, Willem Seinen, John P. Giesy, and Martin D. Van Den Berg. 2000. "2-Chloro-s-Triazine Herbicides Induce Aromatase (CYP19) Activity in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells: A Novel Mechanism for Estrogenicity?" *Toxicological Sciences* 54(1):121–27. doi: 10.1093/toxsci/54.1.121.
- Schweikert, Hans U., Leon Milewich, and Jean D. Wilson. 1976. "Aromatization of Androstenedione by Cultured Human Fibroblasts." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 43(4):785–95. doi: 10.1210/jcem-43-4-785.
- Sciences, Reproductive, and San Francisco. 1993. "AROMATASE G E N E IS A M P L I F I E D I N M C F - 7 H U M A N BREAST CANCER CELLS Aromatase , a Cytochrome P-450 , Catalyzes the Formation of Aromatic C18 Estrogenic Steroids from C19 Androgens . This Enzyme Has Received Considerable Attention Because Of." 46(2):147–53.
- Scott, Hayley M., J. Ian Mason, and Richard M. Sharpe. 2009. "Steroidogenesis in the Fetal Testis and Its Susceptibility to Disruption by Exogenous Compounds." *Endocrine Reviews* 30(7):883–925. doi: 10.1210/er.2009-0016.
- Seamon, K. B., W. Padgett, and J. W. Daly. 1981. "Forskolin: Unique Diterpene Activator of Adenylate Cyclase in Membranes and in Intact Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(6 I):3363–67. doi: 10.1073/pnas.78.6.3363.
- Setchell, Kenneth D. R., and Aedin Cassidy. 1999. "Symposium on Phytochemicals: Biochemistry and Physiology Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health 1." *J. Nutr* 129(March):758–67.

- Silverthorne, C. 2004. The Impact of Organizational Culture and Person-Organization Fit on Organizational Commitment and Job Satisfaction in Taiwan. *Leadership & Organization Development Journal*, 25, 592-599.
<http://dx.doi.org/10.1108/01437730410561477>
- Simpson, Evan R. 2002. "Aromatization of Androgens in Women: Current Concepts and Findings." *Fertility and Sterility* 77(SUPPL. 4):6. doi: 10.1016/s0015-0282(02)02984-9.
- Simpson, Evan R. 2004. "Aromatase: Biologic Relevance of Tissue-Specific Expression." *Seminars in Reproductive Medicine* 22(1):11–23. doi: 10.1055/s-2004-823023.
- Simpson, Evan R., Colin Clyne, Gary Rubin, Chin Boon Wah, Kirsten Robertson, Kara Britt, Caroline Speed, and Margaret Jones. 2002. "Aromatase - A Brief Overview." *Annual Review of Physiology* 64:93–127. doi: 10.1146/annurev.physiol.64.081601.142703.
- Solecki, Roland, Andreas Kortenkamp, Åke Bergman, Ibrahim Chahoud, Gisela H. Degen, Daniel Dietrich, Helmut Greim, Helen Håkansson, Ulla Hass, Trine Husoy, Miriam Jacobs, Susan Jobling, Alberto Mantovani, Philip Marx-Stoelting, Aldert Piersma, Vera Ritz, Remy Slama, Ralf Stahlmann, Martin van den Berg, R. Thomas Zoeller, and Alan R. Boobis. 2017. "Scientific Principles for the Identification of Endocrine-Disrupting Chemicals: A Consensus Statement." *Archives of Toxicology* 91(2):1001–6. doi: 10.1007/s00204-016-1866-9.
- Soucy, Penny, and Van Luu-The. 2000. "Conversion of Pregnenolone to DHEA by Human 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase (P450c17). Evidence That DHEA Is Produced from the Released Intermediate, 17 α -Hydroxypregnenolone." *European Journal of Biochemistry* 267(11):3243–47. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01349.x.
- Taylor, Publisher, K. R. Price, and G. R. Fenwick. 2009. "Food Additives and Contaminants Naturally Occurring Oestrogens in Foods — A Review." (October 2012):37–41.
- U S Environmental Protection Agency. 2011. "Uterotrophic Assay OCSPP Guideline 890 . 1600 Standard Evaluation Procedure U . S . Environmental Protection Agency." (September):1–19.

- Vänttinen, T., J. Liu, T. Kuulasmaa, P. Kivinen, and R. Voutilainen. 2003. "Expression of Activin/Inhibin Signaling Components in the Human Adrenal Gland and the Effects of Activins and Inhibins on Adrenocortical Steroidogenesis and Apoptosis." *Journal of Endocrinology* 178(3):479–89. doi: 10.1677/joe.0.1780479.
- Van der Ven, Leo T. M., Ton Van de Kuil, Aart Verhoef, Cynthia M. Verwer, Hellmuth Lilienthal, Pim E. G. Leonards, Ute M. D. Schauer, Rocío F. Cantón, Sabina Litens, Frank H. De Jong, Theo J. Visser, Wolfgang Dekant, Natalia Stern, Helen Håkansson, Wout Slob, Martin Van den Berg, Josephus G. Vos, and Aldert H. Piersma. 2008. "Endocrine Effects of Tetrabromobisphenol-A (TBBPA) in Wistar Rats as Tested in a One-Generation Reproduction Study and a Subacute Toxicity Study." *Toxicology* 245(1–2):76–89. doi: 10.1016/j.tox.2007.12.009.
- Vihko, R., and A. Ruokonen. 1974. "Regulation of Steroidogenesis in Testis." *Journal of Steroid Biochemistry* 5(8):843–48. doi: 10.1016/0022-4731(74)90075-2.
- Villeneuve, Daniel L., Gerald T. Ankley, Elizabeth A. Makynen, Lindsey S. Blake, Katie J. Greene, Eric B. Higley, John L. Newsted, John P. Giesy, and Markus Hecker. 2007. "Comparison of Fathead Minnow Ovary Explant and H295R Cell-Based Steroidogenesis Assays for Identifying Endocrine-Active Chemicals." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68(1):20–32. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.03.001.
- Vinggaard, Anne Marie, Sofie Christiansen, Peter Laier, Mette Erecius Poulsen, Vibeke Breinholt, Kirsten Jarfelt, Helene Jacobsen, Majken Dalgaard, Christine Nellemann, and Ulla Hass. 2005. "Perinatal Exposure to the Fungicide Prochloraz Feminizes the Male Rat Offspring." *Toxicological Sciences* 85(2):886–97. doi: 10.1093/toxsci/kfi150.
- Wallace, W. Hamish, and Thomas W. Kelsey. 2004. "Ovarian Reserve and Reproductive Age May Be Determined from Measurement of Ovarian Volume by Transvaginal Sonography." *Human Reproduction* 19(7):1612–17. doi: 10.1093/humrep/deh285.

- Wang, Christina, Don H. Catlin, Laurence M. Demers, Borislav Starcevic, and Ronald S. Swerdloff. 2004. "Measurement of Total Serum Testosterone in Adult Men: Comparison of Current Laboratory Methods Versus Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89(2):534–43. doi: 10.1210/jc.2003-031287.
- Wang, Ruey Sheng, Shuyuan Yeh, Chii Ruey Tzeng, and Chawnshang Chang. 2009. "Androgen Receptor Roles in Spermatogenesis and Fertility: Lessons from Testicular Cell-Specific Androgen Receptor Knockout Mice." *Endocrine Reviews* 30(2):119–32. doi: 10.1210/er.2008-0025.
- Wang, Si, Jeroen C. W. Rijk, Harrie T. Besselink, René Houtman, Ad A. C. M. Peijnenburg, Abraham Brouwer, Ivonne M. C. M. Rietjens, and Toine F. H. Bovee. 2014. "Extending an in Vitro Panel for Estrogenicity Testing: The Added Value of Bioassays for Measuring Antiandrogenic Activities and Effects on Steroidogenesis." *Toxicological Sciences* 141(1):78–89. doi: 10.1093/toxsci/kfu103.
- Wang, Yadong, and Haiyan Yang. 2015. "RE: Androgen Receptor Expression and Outcomes in Early Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of the National Cancer Institute* 107(10):1–11. doi: 10.1093/jnci/djv241.
- Whitehead, Saffron A., and Suman Rice. 2006. "Endocrine-Disrupting Chemicals as Modulators of Sex Steroid Synthesis." *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 20(1):45–61. doi: 10.1016/j.beem.2005.09.003.
- Wickenheisser, Jessica K., Patrick G. Quinn, Velen L. Nelson, Richard S. Legro, Jerome F. Strauss, and Jan M. Mcallister. 2000. "Differential Activity of the Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene Promoters in Normal and Polycystic Ovary Syndrome Theca Cells." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85(6):2304–11. doi: 10.1210/jc.85.6.2304.
- Williams, Cecilia, and Chin Yo Lin. 2013. "Oestrogen Receptors in Breast Cancer: Basic Mechanisms and Clinical Implications." *Ecancermedicalscience* 7(1):1–13. doi: 10.3332/ecancer.2013.370.

- Xing, Yewei, Antonio M. Lerario, William Rainey, and Gary D. Hammer. 2015. "Development of Adrenal Cortex Zonation." *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 44(2):243–74. doi: 10.1016/j.ecl.2015.02.001.
- Zareba, Grazyna, Elsa Cernichiari, Rieko Hojo, Scott Mc Nitt, Bernard Weiss, Moiz M. Mumtaz, Dennis E. Jones, Thomas W. Clarkson, and Dennis. 2007. "Thimerosal Distribution and Metabolism in Neonatal Mice." *Journal of Applied Toxicology* 27(July):511–18. doi: 10.1002/jat.
- Zhang, Yan Victoria, Bin Wei, Yu Zhu, Yanhua Zhang, and Martin H. Bluth. 2016. "Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: An Emerging Technology in the Toxicology Laboratory." *Clinics in Laboratory Medicine* 36(4):635–61. doi: 10.1016/j.cll.2016.07.001.
- Zhao, Ming, Sharyn D. Baker, Xiaohua Yan, Yiyu Zhao, William W. Wright, Barry R. Zirkin, and Jonathan P. Jarow. 2004. "Simultaneous Determination of Steroid Composition of Human Testicular Fluid Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry." *Steroids* 69(11–12):721–26. doi: 10.1016/j.steroids.2004.05.020.
- Zwain, Ismail H., and Samuel S. C. Yen. 1999. "Dehydroepiandrosterone: Biosynthesis and Metabolism in the Brain." *Endocrinology* 140(2):880–87. doi: 10.1210/endo.140.2.6528.

Teşekkür

Öncelikle tez danışmanım olmayı kabul edip beni onurlandıran, bu tez çalışmasının hazırlanma sürecinin her safhasında sadece akademik katkısıyla değil, her konuda büyük emeği geçen ve desteğini yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN'a harcadığı zaman ve tüm emekler için teşekkür ederim. Hayatım boyunca kendisini tanıdığım ve tezime danışmanlık yaptığı için onur duyacağım. Ve kıymetli zamanını ayırıp görüş ve önerilerini paylaşan tez izleme komitesi hocam Prof. Dr. Hilmi ORHAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarımın her safhasında yanımda olup yardımını ve desteğini esirgemeyen yol arkadaşım Nina Entezari'ye çok teşekkür ederim. İzmir Gıda Kontrol Laboratuvar müdürlüğünde görev yapan mesai arkadaşlarıma vermiş oldukları destekleri için çok teşekkür ederim. Eğitim hayatımın her safhasında yanımda olup benim ben olmamı sağlayan anne ve babama, bilgisayarla ilgili her takıldığım noktada uzakta olmasına rağmen bir o kadar yakınında desteğini hissettiğim canım kardeşim Serdar AĞLAMIŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu zorlu süreçte inancımı her kaybettiğimde bana inandığını ve güvendiğini söyleyerek cesaretlendiren ve yardımlarını esirgemeyen görünmez kahramana şükranlarımı sunarım. Pozitif enerjim demene rağmen negatif enerji olduğum vakitlerde pozitif enerjim olan kuzenim Seda ÇELİK AKLİMAN'a çok teşekkür ederim. Vaktinden ve ilgisinden zaman çaldığım ama buna rağmen engin hoşgörü ve özverisi ile beni her daim cesaretlendiren ve bu zorlu sürecin gizli mimarı canım kızım yaşam kaynağım Z.Melisa CEYLAN'a ithaf ederim.

Bu tez çalışması 14-ECZ-018 nolu E.Ü. Bilimsel Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

İzmir, 2021

Zeynep AĞLAMIŞ

Özgeçmiş

İlkokulu Dumlupınar İlkokulu, ortaokulu Mezre Ortaokulu ve Lise öğrenimini 1997 yılında Elazığ Lisesinde tamamladım ve aynı yıl Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinde lisans eğitime başladım. Lisans eğitimimi 2003 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun olarak tamamladım. 2010 yılında Ege Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji A.B.D doktora eğitimime başladım. 2007 yılından beri Tarım Bakanlığı'nda Veteriner Hekim ünvanıyla görev yapmaktayım.

