

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

**ENDOKRİN BOZUCU KİMYASAL MADDELERE
KOMBİNE MARUZİYETİN ETKİLERİNİN HEPG2
HÜCRE HATTINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Kübra Gizem ÖZKEMAHLI

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2018

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

**ENDOKRİN BOZUCU KİMYASAL MADDELERE
KOMBİNE MARUZİYETİN ETKİLERİNİN HEPG2
HÜCRE HATTINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Kübra Gizem ÖZKEMAHLI

Farmasötik Toksikoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Belma KOÇER GÜMÜŞEL

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU

ANKARA

2018

**ENDOKRİN BOZUCU KİMYASAL MADDELERE KOMBİNE
MARUZİYETİN ETKİLERİNİN HEPG2 HÜCRE HATTINDA
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Kübra Gizem ÖZKEMAHLI

Danışman: Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL

İkinci Danışman: Doç. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU

Bu tez çalışması 11.04.2018 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Tülay ÇOBAN

Ankara Üniversitesi

Üye:

Doç. Dr. Gonca ÇAKMAK

Gazi Üniversitesi

Üye:

Doç. Dr. Sevtap AYDIN

Hacettepe Üniversitesi

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

24 Nisan 2018

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

- ✓ **Tezimin/Raporumun 11.04.2048 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

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

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

- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**


(İmza)

Kübra Gizem ÖZKEMAHLI

ETİK BEYAN

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



Ecz. Kübra Gizem ÖZKEMAHLI

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında bana her zaman destek olduğu için başta değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Belma Gümüşel'e,

Bilgi ve deneyimlerini sonsuz sabır göstererek benimle paylaşan ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Ü. Pınar Erkekoğlu'na,

Deneylerim sırasında bilimsel birikimleri ile yanımda olan Sayın Doç. Dr. N. Dilara Zeybek, Uzm. Bio. Nilgün Yersal'a ve Doç. Dr. Ayşe Ercan'a,

Her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Dr. Ecz. Aylin Balcı'ya,

Hayatımın her anında koşulsuz şartsız sevgi ve destekleriyle yanımda oldukları ve bana güç verdikleri için Annem, Kardeşim ve Eşime,

Doktora eğitimi almamı yürekten isteyen ve beni her zaman destekleyen, doktoramı ithaf ettiğim Babama,

Teşekkür ederim.

ÖZET

ÖZKEMAHLI, K.G. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelere Kombine Maruziyetin Etkilerinin Hepg2 Hücre Hattında Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018.

Endokrin bozucular, hormonları taklit ederek veya engelleyerek vücudun normal işleyişini bozan sentetik veya doğal kimyasal maddelerdir. Büyüme, stres yanıtı, cinsiyet gelişimi, üreme yeteneği, insülin yapımı ve kullanımı ve metabolik hız gibi birçok temel süreci ve özelliği etkiledikleri düşünülmektedir. Bisfenol A (BPA) plastikleri, epoksi reçineleri ve polikarbonatları sertleştirmek için kullanılan bir plastizerdir. Ftalatlar ise özellikle polivinil klorür içeren plastiklere esneklik vermek için kullanılan yumuşatıcı plastizerlerdir. En yaygın kullanılan ftalat türevi di-(2-etilhekzil) ftalat (DEHP)'tir. DEHP'in ana metaboliti olan mono-(2-etilhekzil) ftalat (MEHP)'tir ve ana bileşikten daha toksiktir. Bu maddelerin endokrin bozucu etkilerinin olduğuna dair literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Diğer taraftan, hem BPA'nın, hem de ftalatların peroksizom proliferatörleri oldukları ve kemiricilerde bu mekanizma ile hepatokarsinogeneze yol açtıkları belirtilmektedir. İnsanlar bu kimyasal maddelere fetal dönem dahil tüm hayatları boyunca farklı yollardan maruz kalmaktadır. Ayrıca, günlük hayatta bu kimyasal maddelere maruziyet tek tek değil, bir arada, kombine olarak gerçekleşmektedir. Literatürde bu maddelerin endokrin bozucu etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur; ancak bu maddelerin kombine etkilerini gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen bu tez kapsamında, HepG2 hücre hattında BPA ve/veya MEHP'in toksik etkileri araştırılmıştır. Tez kapsamında bu plastizerlere ayrı ayrı ya da bir arada maruziyet sonucu oluşabilecek sitotoksik etkiler, sitopatolojik ve apoptotik değişiklikler incelenmiş; maruziyet ile oluşabilecek istenmeyen etkilerin altında yatan mekanizmalardan biri olarak oksidatif stres, oksidan/antioksidan statü değişiklikleri ve endoplazmik retikulum (ER) stresi detaylı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, özellikle kombine BPA ve MEHP uygulamasının oksidatif streste önemli artışlara neden olduğu, ER stres markör protein ekspresyonlarında önemli artışlar görüldüğü ve daha belirgin apoptoz olduğu izlenmiştir. Kombine maruziyetin birçok farklı mekanizmayla hücre içi homeostazı bozduğu söylenebilir. Özellikle ER stresi konusunda elde edilen sonuçlar, tekli ve kombine maruziyetlerin neden olduğu toksisitenin altında yatan mekanizmalardan birinin hem sitoplazmik, hem de nükleer hücre fraksiyonlarında ER markör proteinlerinde değişimler olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, özellikle kombine maruziyet ile birincil olarak apoptozun tetiklendiği, ayrıca nekrotik ve otofajik hücre ölümünün de gözlenebileceği belirlenmiştir. Sonuç olarak, endokrin bozucu maddelere bir arada maruziyetin daha ciddi toksikolojik sonuçlar doğurabileceği gözlenmiştir ve bu verilerin endokrin bozucularla ilgili olarak literatüre önemli derecede katkı yapacağı ifade edilebilir.

Anahtar kelimeler: Endokrin bozucular, Bisfenol A, Ftalat, Oksidatif stres, Endoplazmik retikulum stresi, Sitotoksikite, Apoptoz, HepG2 hücre hattı

Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir. Proje no: TSA-2017-12882

ABSTRACT

OZKEMAHLI, K.G. Evaluation of the Effects of Combined Exposure to Endocrine Disruptor Chemical Substances in HepG2 Cell Line. Hacettepe University Health Sciences Institute, Pharmaceutical Toxicology Program, PhD Thesis, Ankara, 2018.

Endocrine disruptors are synthetic or natural substances that disrupt the normal functioning of the body by mimicking or blocking hormones. They are suggested to affect many basic periods and characteristics like growth, stress response, sexual development, reproduction ability, insulin production and utility. Bisphenol A (BPA) is a plasticizer used for the hardening plastics, epoxy resins and polycarbonates. Phthalates are softening plasticizers that give flexibility to polyvinyl chloride containing plastics. The most widely used phthalate derivative is di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). Its main metabolite is mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) and it is more toxic than the parent compound. There are several studies in literature on their endocrine disrupting properties. On the other hand, it has been denoted that both BPA and phthalates are peroxisome proliferators and they cause hepatocarcinogenesis in rodents. Humans are exposed to these chemicals by different routes through their whole life starting from fetal period. In addition, exposure to these chemicals actualize not by one by one, by in a combination in everyday life. There are studies in literature on the endocrine disrupting effects; however there are very limited number of studies showing their combined effects. In light of this information, the toxic effects of BPA and/or MEHP are investigated in HepG2 cell line. In this thesis, cytotoxic properties as well as cytopathological and apoptotic changes were studied when cells were exposed to these plasticizers separately or in combination; oxidative stress, oxidant/antioxidant status alterations and endoplasmic reticulum (ER) stress were evaluated as possible underlying mechanisms for their unwanted effects after exposure. The results showed that particularly combined exposure to BPA and MEHP caused substantial increases in oxidative stress, ER stress marker protein expressions and also caused significant apoptosis. It can be suggested that combined exposure disrupts intracellular homeostasis by many different mechanisms. The results of ER stress studies indicate that one of the toxicity mechanisms underlying both single and combined exposures is the alterations of ER marker proteins in both cytoplasmic and nuclear cellular fractions. Moreover, combined exposure triggers apoptosis as well as necrotic and autophagic cell death. As a result, combined exposure to endocrine disrupting chemicals can cause serious toxicological outcomes and the data obtained herein can contribute significantly to the literature on endocrine disruptors.

Keywords: endocrine disruptors, bisphenol A, phthalates, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, cytotoxicity, apoptosis, HepG2 cell line

**This thesis is supported by Hacettepe University Scientific Projects Coordination Unit.
Project no: TSA-2017-12882**

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler	4
2.1.1. Ftalatlar	9
2.1.2. Bisfenol A	14
2.2. Oksidatif Stres	18
2.2.1. Oksidatif Stresin Biyogöstergeleri	20
2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi	24
2.4. Oksidatif Stres ve Endoplazmik Retikulum Stresi İlişkisi	28
2.5. Konu ile İlgili Çalışmalar	29
2.5.1. Bisfenol A ile İlgili Çalışmalar	29
2.5.2. Ftalat ile İlgili Çalışmalar	32
2.5.3. Kombine Maruziyet ile İlgili Çalışmalar	38
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	40
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	40
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	42
3.3. Kullanılan Hücre Hattı	43
3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	43
3.4.1. BPA ve MEHP Çözeltilerinin Hazırlanması	43
3.4.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	44

3.4.3. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	44
3.4.4. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	44
3.4.5. Glutasyon Peroksidaz 1 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	45
3.4.6. Süperoksit Dismutaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	46
3.4.7. Katalaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	47
3.4.8. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler	48
3.4.9. Glutasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	49
3.4.10. Lipid Peroksidasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	50
3.4.11. Protein Karbonil Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	51
3.4.12. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	52
3.4.13. DNA Baz Hasarı Tespitinde Kullanılan Çözeltiler	52
3.4.14. Western Blotting Analizinde Kullanılan Çözeltiler	53
3.4.15. Işık Mikroskobu İncelemelerinde Kullanılan Çözeltiler	55
3.4.16. TUNEL Tayininde Kullanılan Çözeltiler	56
3.4.17. Kaspaz 3 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	57
3.4.18. Kaspaz 8 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	57
3.5. Deneysel İşlemler ve Yöntemler	58
3.5.1. Hücre Kültürü	58
3.5.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	59
3.5.3. Uygun Hücre Sayılarının Belirlenmesi	59
3.5.4. HepG2 Hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolyum Bromür Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi	60
3.5.5. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi	62
3.5.6. HepG2 Hücrelerinin Lizisi ve Fraksiyonlanması	63
3.5.7. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Ölçümü	63
3.5.8. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü	64
3.5.9. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	66
3.5.10. Protein Miktarının Belirlenmesi	68
3.5.11. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	69
3.5.12. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi	71

3.5.13. Karbonil Grubu Düzeylerinin Ölçümü	72
3.5.14. DNA İzolasyonu	73
3.5.15. DNA Baz Hasarının Belirlenmesi	75
3.5.16. Western Blotting ile Protein Tayini	77
3.5.17. Mikroskopik İncelemeler	81
3.5.18. TUNEL Analizi	82
3.5.19. Kaspaz 3 Düzeylerinin Ölçümü	83
3.5.20. Kaspaz 8 Düzeylerinin Ölçümü	85
4. BULGULAR	87
4.1. Sitotoksosite Tayini	87
4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Üretiminin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	90
4.3. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi	91
4.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	92
4.5. Katalaz Aktivitesi	93
4.6. Lipid Peroksidasyonu Düzeyleri	94
4.7. Total Glutasyon Düzeyleri	95
4.8. Protein Oksidasyonu	96
4.9. DNA Baz Lezyonu Ölçümleri	97
4.10. Endoplazmik Retikulum Stresi	98
4.11. Mikroskopik Bulgular	103
4.11.1. Faz Kontrast Mikroskobu Bulguları	103
4.11.2. Işık Mikroskobu Bulguları	104
4.11.3. Elektron Mikroskobu Bulguları	108
4.12. Apoptotik Analizler	121
4.12.1. TUNEL Analizi	121
4.12.2. Kaspaz 3 Düzeyleri	123
4.12.3. Kaspaz 8 Düzeyleri	124
5. TARTIŞMA	126
5.1. Hücre Canlılığı	127

5.2. Oksidan/Antioksidan Statü Üzerine Etkiler	129
5.2.1. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Üretimi	129
5.2.2. Antioksidan Enzim Aktiviteleri	130
5.2.3. Glutasyon	132
5.2.4. Lipid Peroksidasyonu	134
5.2.5. Protein Karbonil Düzeyleri	135
5.2.6. DNA Hasarı	135
5.3. Endoplazmik Retikulum Stresi	136
5.4. Mikroskopik İncelemeler	140
5.4.1. Işık Mikroskobu İncelemeleri	140
5.4.2. Elektron Mikroskobu İncelemeleri	141
5.5. Apoptotik Parametreler (TUNEL, Kaspaz 3, Kaspaz 8)	142
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	145
7. KAYNAKLAR	149
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

8-oksodG	7,8-Dihidro-8-Oksoguanin
ATP	Adenozintrifosfat
BCA	Bişinkoninik Asit
BSA	Sığır Serum Albumini
CAT	Katalaz
cm²	Santimetre Kare
CuZnSOD	Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz
DMEM	Dulbecco' Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazin
D-PBS	Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik
DTNB	5,5'-Diti-Bis-(2-Nitrobenzoik) Asit
DTPA	Dietilen Triamin Pentaasetik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit, Disodyum Tuzu
ER	Endoplazmik Retikulum
ETC	Elektron Taşıma Zinciri
FBS	Fötal Bovin Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon (Glutasyon Disülfid)
GST	Glutasyon S-Transferaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
HepG2	İnsan Hepatosellüler Karsinoma Hücreleri
HO⁻	Hidroksil Anyonu
IC₃₀	Hücrelerin %30'unun Öldüğü İnhibitor Konsantrasyon
IC₅₀	Hücrelerin %50'sinin Öldüğü İnhibitor Konsantrasyon

KOH	Potasyum Hidroksit
Kromojen	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
LP	Lipit Peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
MnSOD	Mangan Süperoksit Dismutaz
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-İl)-2,5 Difenil Tetrazolyum Bromür
NaCl	Sodyum Klorür
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NO[·]	Nitrik Oksit
O₂	Moleküler Oksijen, Dioksijen
O₂⁻	Süperoksit Anyonu
OH[·]	Hidroksil Radikali
PBS	Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik
pH	Hidrojenin Gücü
Purpald (Kromojen)	4-Amino-3-Hidrazino-5-Merkapto-1,2,4-Triazol
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşikler
TCA	Trikloroasetik Asit

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Ftalatların genel kimyasal yapısı.	9
2.2. Di-2-etilhekzil ftalat biyotransformasyonu.	12
2.3. Bisfenol A' nın kimyasal yapısı.	14
2.4. Bisfenol A biyotransformasyonu.	16
2.5. Oksidatif stres.	19
2.6. Endoplazmik retikulum stresi oluşum şeması.	26
3.1. Canlı hücreler tarafından MTT'nin formazan tuza dönüşüm metabolizması.	61
3.2. Süperoksit dismutaz ölçümü reaksiyon şeması.	65
3.3. Süperoksit Dismutaz Standart Eğrisi.	66
3.4. Formaldehit Standart Eğrisi.	67
3.5. Protein Standart Eğrisi.	69
3.6. GSH döngüsü.	69
3.7. GSSG Standart Eğrisi.	70
3.8. MDA-TBA kompleksinin oluşumu.	71
3.9. MDA Standart Eğrisi.	72
3.10. 8-OHdG Standart Eğrisi.	76
3.11. Precision plus protein™ dual iki renkli standart.	78
3.12. Sandviç yöntemi ile transfer şeması.	79
3.13. Kaspaz 3 Standart Eğrisi.	85
3.14. Kaspaz 8 Standart Eğrisi.	86
4.1.a. HepG2 hücre canlılığı üzerinde BPA'nın 25 – 1000 uM konsantrasyon aralığında etkisi.	87
4.1.b. HepG2 hücre canlılığı üzerinde BPA'nın 25 – 1000 uM konsantrasyon aralığında etkisi.	88
4.2.a. HepG2 hücre canlılığı üzerinde MEHP'in 5 – 75 uM konsantrasyon aralığında etkisi.	88
4.2.b. HepG2 hücre canlılığı üzerinde MEHP'in 5 – 75 uM konsantrasyon aralığında etkisi.	89
4.3.a. HepG2 hücre canlılığı üzerinde BPA + MEHP'in 5 – 100, 30-1000 uM konsantrasyon aralığında etkisi.	89

4.3.b.	HepG2 hücre canlılığı üzerinde BPA + MEHP'in 5 – 100, 30-1000 uM konsantrasyon aralığında etkisi.	90
4.4.	Hücre içi ROS oluşumu.	91
4.5.	Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi.	92
4.6.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.	93
4.7.	Katalaz Aktivitesi.	94
4.8.	Malondialdehit Düzeyleri.	95
4.9.	Total Glutasyon Düzeyleri.	96
4.10.	Protein Karbonil Düzeyleri.	97
4.11.	8-OHdG Düzeyleri.	98
4.12.	Western Blotting deneyi sonucunda ER yolağındaki proteinlerin sitozolik fraksiyondaki ekspresyonları.	99
4.13.	Western Blotting deneyi sonucunda ER yolağındaki proteinlerin nükleer fraksiyondaki ekspresyonları.	99
4.14.	Sitozolik fraksiyonda yer alan aktine normalize edilmiş ER stres yolağındaki proteinlerin ekspresyon düzey değişimleri.	101
4.15.	Nükleer fraksiyonda yer alan aktine normalize edilmiş ER stres yolağındaki proteinlerin ekspresyon düzey değişimleri.	102
4.16.	HepG2 hücre hattına ait hücrelere BPA ve/veya MEHP uygulaması sonrası morfolojik değişiklikler I.	103
4.17.	HepG2 hücre hattına ait hücrelere BPA ve/veya MEHP uygulaması sonrası morfolojik değişiklikler II.	104
4.18.	Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinin ışık mikrografı.	105
4.19.	BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin ışık mikrografı I.	106
4.20.	BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin ışık mikrografı II.	106
4.21.	MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin ışık mikrografı.	107
4.22.	MEHP ve BPA nın birlikte uygulandığı HepG2 hücrelerinin ışık mikrografı.	107
4.23.	HepG2 hücre hattının elektron mikroskopta incelemesi I.	108
4.24.	HepG2 hücre hattının elektron mikroskopta incelemesi II.	109
4.25.	HepG2 hücre hattının elektron mikroskopta incelemesi III.	109
4.26.	HepG2 hücre hattının elektron mikroskopta incelemesi IV.	110
4.27.	HepG2 hücre hattının elektron mikroskopta incelemesi V.	110
4.28.	BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskobunda incelemesi I.	111

4.29.	BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi II.	112
4.30.	BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi III.	112
4.31.	BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi IV.	113
4.32.	BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi V.	113
4.33.	MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi I.	114
4.34.	MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi II.	115
4.35.	MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi III.	115
4.36.	MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi IV.	116
4.37.	MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi V.	116
4.38.	MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi VI.	117
4.39.	MEHP ve BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi I.	118
4.40.	MEHP ve BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi II.	118
4.41.	MEHP ve BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi III.	119
4.42.	MEHP ve BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi VI.	119
4.43.	MEHP ve BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi V.	120
4.44.	MEHP ve BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi VI.	120
4.45.	Deney gruplarında apoptotik hücreler.	122
4.46.	Deney gruplarında apoptotik hücre yüzdesini gösteren grafik.	123
4.47.	Kaspaz 3 Düzeyleri.	124
4.48.	Kaspaz 8 Düzeyleri.	125

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. Çalışma Grupları.	59
3.2. Primer Antikorlar.	80
3.3. Sekonder Antikorlar.	80
4.1. Çalışma Gruplarının IC ₃₀ ve IC ₅₀ Değerleri.	87
4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Düzeyleri.	90
4.3. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi.	91
4.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.	92
4.5. Katalaz Aktivitesi.	93
4.6. Malondialdehit Düzeyleri.	94
4.7. Total Glutasyon Düzeyleri.	95
4.8. Protein Karbonil Düzeyleri.	96
4.9. 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin Düzeyleri.	97
4.10. ER stres yolağında sitozolik fraksiyonda yer alan proteinlerin ekspresyon düzeylerinin aktine normalize edilerek oranlanması sonucu elde edilen veriler.	100
4.11. ER stres yolağında nükleer fraksiyonda yer alan proteinlerin ekspresyon düzeylerinin aktine normalize edilerek oranlanması sonucu elde edilen veriler.	102
4.12. Kaspaz 3 Düzeyleri.	123
4.13. Kaspaz 8 Düzeyleri.	124

1. GİRİŞ

Endokrin bozucu kimyasal maddeler, hormonları taklit ederek veya hormonların etkilerini engelleyerek, hormonların sentez, salgılanma, taşınma, metabolizma, eliminasyon, reseptöre bağlanma ve doğal homeostazını etkileyen, üreme ve gelişimsel sorunlara neden olabilen sentetik veya doğal bileşiklerdir (1).

İnsanda ve hayvansal gıdalarda bulunan bazı doğal kimyasal maddeler (örneğin; fitoöstrojenler) endokrin bozucu olarak davranabilir. Sentetik yapıda olanları ise, endüstride pek çok alanda kullanılan maddeler ve bunların yan ürünleridir. Bu bileşiklere poliklorlu bifeniller (PCB), polibromlu bifeniller (PBB), bisfenol A (BPA), ftalatlar, pestisitler, bazı ilaç ve farmasötik ürünler [dietilstilbesterol (DES)] örnek olarak verilebilir (2, 3).

Endokrin bozucu kimyasal maddelere yaşamın her döneminde, fetal dönem dahil, maruz kalılabilmektedir. Bu bileşiklere özellikle prenatal dönemde ve çocukluk çağındaki maruziyetin önemi üzerinde durulmakta; organizmada başta erkek üreme sistemi olmak üzere; büyüme, stres yanıtı, cinsiyet gelişimi, metabolik hız, insülin yapımı ve kullanımı gibi birçok temel süreci etkiledikleri ve hormonal bozukluklara yol açtıkları düşünülmektedir (4-9).

Sentetik endokrin bozucu kimyasal maddeler arasında yer alan bisfenol A (BPA) ve ftalatlar plastizer olarak birçok endüstriyel üründe kullanılır. Ftalatlar, imitasyon deri, yağmurluk, ayakkabı, döşeme, duş perdesi, gıda ambalaj malzemesi, oyuncaklar, kauçuk, medikal malzemeler ile kişisel bakım ürünleri, parfümler, boyalar gibi pek çok alanda yaygın kullanıma sahiptir (10, 11). Östrojenik etkili BPA ise yemek kapları, yapıştırıcılar, boya tozları, spor malzemeleri ve biberonlarda plastik monomeri olarak kullanılan endokrin bozucu bir kimyasal maddedir. Sıklıkla ve pek çok farklı kaynaktan maruz kalınabilen bu maddelere oral, inhalasyon, dermal ve parenteral yolla temas edilebilmektedir. Ayrıca, endüstri çalışanlarında mesleki maruziyet de söz konusu olabilmektedir (11-13).

Günümüzde bu kimyasal maddelerin artan kullanımı ile birlikte aynı anda birden fazla kimyasal maddeye kombine maruziyet söz konusudur. Kombine maruziyet söz konusu olduğunda gözlenebilecek etki şiddetinde artış meydana gelebileceği öngörülmektedir. Literatürde bu maddelerin endokrin bozucu etkilerini gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte, karışım halinde veya bir arada maruziyetin

etkilerinin değerlendirildiği kapsamlı çalışmaların sınırlı olduğu ve olası istenmeyen etkilerinin altında yatan mekanizmaların yeterince incelenmediği görülmektedir.

Bu bilgiler ışığında, planlanan tez çalışmasında BPA ve yaygın kullanıma sahip bir ftalat türevi olan di-2-etilhekzil ftalatın (DEHP)'in metaboliti mono- etil hekzil ftalatın (MEHP) ayrı ayrı ve kombine maruziyetin olası toksik etkilerinin HepG2 (insan hepatoselüler karsinoma) hücre hattı kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Söz konusu bileşiklere temasla oluşabilecek olası istenmeyen etkilere literatürde işaret edilmekle birlikte, bu etkilerin altında yatan mekanizmalara yönelik çalışmalar yeterince kapsamlı değildir. Birden fazla endokrin bozucu maddeye aynı anda maruziyetin etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar da oldukça sınırlıdır. Özellikle endoplazmik retikulum stresinin değerlendirildiği çalışmalar da son derece sınırlıdır ve bu konuda değerli veriler elde edebilmek amaçlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında hedef hücre hattı olarak seçilen insan hepatoselüler karsinoma hücre hattında (HepG2) kontrol, BPA, MEHP ve BPA+MEHP grupları çalışılmıştır.

Tez kapsamında bu maddelerin ayrı ayrı veya bir arada maruziyetine bağlı olarak oluşabilecek

- Sitotoksik etkiler,
- Sitopatolojik ve apoptotik değişiklikler,
- Maruziyet ile oluşabilecek istenmeyen etkilerin altında yatan mekanizmalardan biri olan oksidatif stres ve oksidan/antioksidan statü değişiklikleri [reaktif oksijen bileşiklerinin (ROS) üretimi, glutatyon peroksidaz 1 aktivitesi (GPx1), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitesi, lipid peroksidasyonu, total glutatyon düzeyleri, protein oksidasyonu, oksidatif DNA hasarı],

- Endoplazmik retikulum stresi ile ilişkili proteinlerin [glukozla düzenlenen protein 78 (GRP78), protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK), CCAAT-artırıcı bağlayıcı protein homolog proteini (CHOP) ve X box bağlayıcı protein 1 (XBP-1)] ekspresyonlarındaki değişimler belirlenmiş ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Endokrin bozucu kimyasal maddelere kombine maruziyetin etkilerinin incelendiği çalışmalar sınırlıdır. Özellikle karaciğer hücrelerinde, bu tür plastizer maddelere bir arada maruziyetin etkilerinin belirlendiği çalışma tek bir çalışma bulunabilmiştir (14). Tez alışması ile elde edilecek bulgular sıklıkla maruz kalınan endokrin bozuculara bir arada maruziyet sonucu karaciğerde ortaya çıkabilecek istenmeyen etkilerin ve bu etkilerin altında yatması olası olan mekanizmalarının ayınlatılmasına katkı sağlamıştır. Bu alanda sınırlı sayıda veri olması nedeniyle elde edilecek verilerin yayınlanması ile mevcut bilimsel birikim için önemli düzeyde katkı elde edilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler

Endokrin sistem, başta santral ve periferik sinir sistemi ve üreme sistemi olmak üzere birçok sistem ile koordinasyon içinde çalışan bir sistemdir (15). Yaşamın tüm dönemlerinde vücutta, biyolojik işlevleri ve süreçleri etkileyen bu sistemin ana organları tiroit, hipofiz, testis, over, pankreas ve böbreküstü bezleridir. Endokrin sistem üzerinde istenmeyen etkilere neden olan ve ‘Endokrin bozucu kimyasal maddeler’ (EDC’ler) olarak adlandırılan bileşikler, hormonların vücuttaki etkisini, kan düzeyini ve/veya sentezini etkilemek suretiyle pek çok hedef organda istenmeyen etkilere neden olur ve bu bileşiklere hayatın her döneminde yaygın bir temas söz konusudur.

Endokrin bozucu kimyasal maddeler, homeostazın korunması ve gelişim gibi temel süreçlerin düzenlenmesinden sorumlu olan hormonların sentez, salgılanma, taşınma, metabolizma, eliminasyon, reseptöre bağlanma ve doğal homeostazını etkileyen dış kaynaklı (ekzojen) bileşikler olarak tanımlanmaktadır (1).

Endokrin bozucu kimyasal maddeler, doğal olarak bulunabildiği gibi sentetik yapıda da olabilir. Bazı doğal kimyasal maddeler (örneğin; kumestrol, genistein, daidzein vb. fitoöstrojenler) endokrin bozucu olarak davranabilir. Sentetik EDC’ler ise, endüstride pek çok kullanım alanına sahip maddeler ve bu maddelerin yan ürünleridir. Sentetik EDC’lere örnek olarak PBB’ler, PCB’ler, dioksinler, ftalatlar, BPA, pestisitler [metoksiklor, diklorodifeniltrikloroetan (DDT), fungusitler (vinklozolin)], bazı ilaç ve farmasötik ürünler (DES) verilebilir (2, 16, 17).

Günümüzde, EDC maruziyeti ile ilişkili olduğu düşünülen birçok hastalığın artış göstermesi konuya olan ilgiyi arttırmıştır ve bu kimyasal maddelerin neden olduğu toksik etkilerin anlaşılması, toksisite mekanizmalarının aydınlatılması, risk değerlendirmelerinin yapılması ve kullanımlarının sınırlandırılması açısından pek çok çalışma yapılmaktadır.

Endokrin bozucu kimyasal maddelere dünya genelinde çok farklı kaynaklardan ve çok yaygın bir şekilde maruziyet söz konusudur. Endüstriyel alanlarda çevresel kontaminasyon sonucu birçok kimyasal madde karışımlarının yeraltı sularını, toprağı ve havayı kirletmesi mümkün olabildiği gibi, bu kimyasal maddelerin kullanıldığı

ürünler ile temasın gerçekleşmesi de insan sağlığı üzerine olumsuz etkiler meydana getirebilmektedir. Medikal malzemeler, kişisel bakım ürünlerinin kullanımı, yemek kapları, bebek biberonları, yapıştırıcılar, boya tozları gibi çeşitli ürünlere temas da önemli maruziyet yollarıdır. Kullanım alanları ve sıklığı göz önüne alındığında da birden fazla EDC'ye aynı anda temasın kaçınılmaz olduğu da açıktır.

Endokrin bozucu kimyasal maddelerden bazıları uzun yarılanma ömrüne sahiptir; çevre ve insan sağlığı açısından daha uzun süre risk oluşturabilmektedir. Uzun yıllar sonra dahi hayvan ve insan vücudunda tespit edilebilen kimyasal maddeler (DDT gibi) de bulunmaktadır (18). Uzun yarılanma ömrüne sahip olması bu maddelerin dayanıklılığını artırır ve maddeler akümüle olarak besin zinciri ile aktarılabilir. Uzun yıllar bulundukları bölgelerde veya doğa olayları ile ulaştıkları bölgelerde etki gösterebilirler. Ftalat ve BPA gibi kimyasal maddelerin de kullanımlarının yaygınlığı, yüksek kontaminasyon riski meydana getirmektedir (19, 20).

Endokrin bozucu kimyasal maddeler; normal hormon salgılanmasını inhibe ya da stimüle ederek, hormonların bağlanma yerlerini etkileyerek ya da metabolizmalarını değiştirerek fizyolojik hormon düzeylerini değiştirir ve hormonal homeostazi bozar. EDC'lerin başlıca nükleer hormon reseptörleri [östrojen reseptörleri, androjen reseptörleri (AR), progesteron reseptörleri ve tiroid reseptörleri], retinoid reseptörler ve diğer hormon reseptörleri aracılığıyla etki gösterdiği düşünülmektedir (19, 21, 22)

Endokrin bozucu kimyasal maddelere maruziyet ile ortaya çıkabilecek temel bozukluklar aşağıda sıralanmıştır (19, 23-26).

- Karaciğer fonksiyon bozuklukları, karaciğer kanseri (Ftalatlar, BPA, arsenik, pestisitler)
- Tiroid hormon bozuklukları [BPA, dioksinler, PCB'ler, pestisitler, DES, geistein, ftalatlar, polibromlu difenil eterler (PBDE), perkloratlar]
- Obezite ve diyabet gibi metabolik bozukluklar [pestisitler, BPA, DES, genistein, kurşun, ftalatlar, PCB'ler, perflorooktanoik asit (PFOA)]
- Erkek üreme sistemi bozuklukları: Düşük sperm kalitesi, infertilite, erken ve gecikmiş puberte, malformasyonlar, testiküler kanserler, prostat kanseri (Ftalat esterleri, pestisitler, PCB'ler, DES, BPA, arsenik, kadmiyum)

- Kadın üreme sistemi bozuklukları: Polikistik over sendromu, kısırlık, puberte prekoks, endometriozis, prematür telarş, gecikmiş puberte, üreme organlarında anomaliler, menstrüel döngü ve yumurtalık işlevlerinde bozulmalar, erken menapoz, meme ve üreme sistemi kanserleri (BPA, PCB'ler, ftalat esterleri, pestisitler, kurşun, DES, dioksinler)
- Prenatal maruziyete bağlı olarak; prematüre doğum, düşük doğum ağırlığı, malformasyonlar, ileriki yaşlarda kanserler (DDT, PCB'ler, BPA, ftalat esterleri)
- Nöroendokrin etkiler: GnRH nöronları üzerine etkiler, hipotalamus-hipofiz-gonad aksında problemler, davranışsal problemler, öğrenme ve hafıza bozuklukları (PCB'ler, pestisitler, genistein, BPA, dioksinler, PBDE'ler, kadmiyum, metil civa, kurşun, bakır).

Endokrin bozucu kimyasal maddelere maruziyetin etkilerini değiştirebilen birçok farklı etken bulunmaktadır. Bu etkenler; maruz kalınan doz ve süre, maruz kalınan yaş dönemi, birden fazla EDC'ye aynı anda kombine olarak maruz kalma, gecikmiş etkiler ve bu etkilerin sonraki nesillere aktarılabilmesi olarak sıralanabilir.

Maruz kalınan doz ve maruziyet süresi kavramları, tüm ksenobiyotik maruziyetinde olduğu gibi EDC maruziyetinde de oldukça önemlidir. Ancak ortaya çıkan profil her zaman monotonik doz yanıt eğrileri gibi değildir. Bu nedenle bazı EDC'ler için düşük dozlarda maruziyet, hedef doku üzerinde yüksek dozlardan daha fazla etki gösterebilmekte ve doz yanıt eğrisi (monotonik olmayan [NMDR], U, ters U gibi) çok farklı şekillerde olabilmektedir. Bu da endokrin bozucuların etkisinin anlaşılması ve yorumlanmasını karmaşıklaştıran etmenlerden biridir (27).

Düşük doz kavramı, belirli bir kimyasal madde için belirlenmiş olan, hiçbir ters etki gözlenmeyen doz düzeyinin (NOAEL) altındaki dozlarda etki gözlenmesidir. Çevre Koruma Ajansı (United States Environmental Protection Agency, EPA) ve Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) tarafından EDC'lerde düşük doz etkisine ilişkin yapılan çalışmada, bu etki tipik insan maruziyetinin ve standart toksikoloji testlerinde kullanılan dozun altındaki düzeylerde görülmesi olarak tanımlanmıştır (28)

Monotonik doz yanıt eğrileri çok düşük dozlarda görülebilecek toksik etkinin değerlendirilmesi için ön bilgi verebilmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda EDC'ler için oluşturulan doz yanıt eğrileri ile bu öngörünün mümkün olmadığı ortaya çıkmıştır.

Çok sayıda EDC'nin çok düşük dozlarda bile hücre çoğalması ve organ gelişimi üzerine ciddi ters etkileri olabileceği, birçok EDC'nin NMDR eğrilerine sahip olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (29, 30). NMDR eğrilerinin oluşum nedeni ve mekanizmaları ile ilgili farklı görüşler vardır. Bu mekanizmalardan bazıları: sitotoksosite, reseptör seçiciliği, reseptör sayısında azalma ve desensitizasyon, reseptör yarışması ve endokrin sistem negatif geri bildirim döngüleridir (31-33).

Endokrin bozucu kimyasal maddeler için tanımlanan düşük doz kavramı ve NMDR eğrileri, toksik dozların tanımlanması ve toksisitenin değerlendirilmesi açısından zorluklara neden olmaktadır. Mevcut analitik yöntemlerle saptanamayan dozlarda bile EDC'lerin etkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle düşük dozlarla çalışmalar yapmak ve limit doz değerlerini [NOAEL, referans doz (RfD)] belirlemek EDC'ler için zorlaşmaktadır (34).

Kombine Maruziyet

Günümüzde endüstrinin hızla gelişmesine bağlı olarak çok çeşitli kimyasal maddelerin üretilmesi ve tüketilmesi ile bu maddelere aynı anda maruziyetin gerçekleşme olasılığı oldukça artmıştır. Bireylerin günlük yaşantısı değerlendirildiğinde bu maddelere; çevresel (su kaynakları, ortam havası gibi), mesleki ve bireysel (ev ortamına, beslenme alışkanlıklarına, kullandığı kişisel bakım ürünlerine) olarak maruziyet söz konusu olmaktadır. Örneğin, aynı anda endokrin bozucu özelliği olan pestisit, PCB'ler, ftalat ve BPA'ya içme suları aracılığıyla maruziyet söz konusudur .

Aynı anda maruziyet ile ortaya çıkan etkinin bu maddelere ayrı ayrı maruziyetle ortaya çıkan etkilerden farklı olacağı öngörülmektedir. Çünkü aynı anda maruz kalınan kimyasal maddelerin birbirlerinin etkilerini değiştirebileceği bilinmektedir. Ancak bu etkilerin mekanizmalarının anlaşılması ve risk değerlendirme yöntemlerinin uygulanabilmesi için daha fazla çalışmaya ve bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Kimyasal madde karışımlarının toksik etkileri farklı şekillerde ortaya çıkabilir. Burada iki kavramdan söz edilebilir: doz toplamı ve etki toplamı. Doz toplamı, benzer mekanizmalarla etki gösterdiği bilinen kimyasal maddelerden oluşan karışımlar için kullanılan bir kavramdır ve görülen etkinin kimyasal maddelerin dozlarının toplamı ile orantılı olarak artabileceği düşünülmektedir. Etki toplamı ise

kimyasal maddelerin toksisitelerinin ya da mekanizmalarının birbirinden çok farklı olduğu durumlar için kullanılmakla birlikte bu kimyasal maddelere karışım halinde maruz kalındığında tekli maruziyette gözlenen toksik etkilerin toplamı ortaya çıkar.

Etki toplamı ve doz toplamı terimlerini kapsayan bir başka terim ise etkileşimdir. Kimyasal karışımlar birbirlerinin etkilerini, tekli maruziyete göre değiştirmeyebilir, azaltabilir ya da arttırabilir. Bu değişimler aşağıdaki gibidir (26, 35-37):

- Değişikliğe neden olmayan; kimyasal maddeler farklı organlarda toksisite gösteriyor ise karışım halinde maruz kalınması ile ortaya çıkacak toksisitede bir değişiklik gözlenmez.
- Sinerjizma; kimyasal maddelere karışım halinde maruz kalınması maddelere tekli maruziyette görülen toksisitenin toplamından daha yüksek şiddette sonuçlara neden olabilir ve aditif etki veya potansiyalizasyon ile sonuçlanabilir.
- Aditif etki (Sumasyon); karışımın etkisi tekli maruziyette ortaya çıkan etkilerin matematiksel toplamıdır.
- Potansiyalizasyon; kimyasal maddelerden biri, etki gözlenen sistem veya organ üzerinde etkisiz olduğu halde, karışımdaki diğer kimyasal maddenin etkisini arttırmasıdır.
- Antagonizma; karışımın etkisinin kimyasal maddelerin ayrı ayrı etkilerinden daha düşük olmasıdır.
- İnhibisyon; kimyasal maddelerden biri, etki gözlenen sistem veya organ üzerinde etkisiz olduğu halde, karışımdaki diğer kimyasal maddenin etkisini azalttığı durumdur.
- Maskeleye; bileşikler aynı sistem veya organ üzerinde birbirlerine zıt etkiler gösteriyorlarsa, birlikte maruz kalındığında birbirlerinin etkilerini azaltabilir ya da ortadan kaldırabilir.

Bu etkileşimler; doğrudan maddeler arasında kimyasal etkileşimler şeklinde olabileceği gibi, farmakodinamik (reseptörelere bağlanma) ve farmakokinetik (absorpsiyon, dağılım, metabolizma, ıtrah) düzeyde de gerçekleşebilir (38, 39).

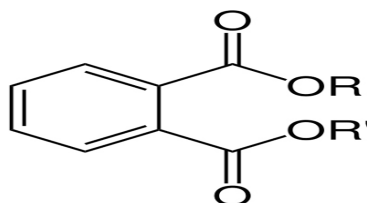
Risk değerlendirmesi, karışım halindeki kimyasal maddeler için oldukça zordur ve bu maddelere homojen olmayan karışımlar halinde maruz kalındığı

bilinmektedir. Maruziyetin heterojen ve tahmin edilemiyor olması değerlendirmeleri kompleks bir hale getiren ve gerçeğe yakın olacak şekilde risk değerlendirilmelerinin yapılmasını zorlaştıran bir durumdur. Kimyasal karışımların etkilerinin değerlendirilmesi konusunda bilim çevrelerinde çok farklı yaklaşımlar olmakla birlikte, uluslararası kabul görmüş bir prosedürse henüz bulunmamaktadır. Karışım halinde bulunan endokrin bozucuların etkilerinin değerlendirilmesi, çeşitli endokrin bozuculara bir arada maruziyet ile ortaya çıkabilecek sağlık sorunlarının değerlendirilmesi açısından büyük bir önem taşımaktadır. Düzenleyici kuruluşlarca yıllardır bu karışımların toksik etkilerinin değerlendirilmesine gerek olduğunun belirtilmesine rağmen, literatürde bu konuda henüz yeteri kadar çalışma bulunmamaktadır (40). Doğru değerlendirmelerin yapılabilmesi için tüm varsayımları kapsayan geniş tabanlı modellere ihtiyaç duyulmaktadır (36, 41).

2.1.1. Ftalatlar

Ftalatlar, 1,2-benzendikarboksilik asitin dialkil veya alkil/aril esterleri olup, 1930'lardan bu yana katkı maddesi olarak çok yaygın kullanılan endüstriyel ürünlerdir. Ftalatlar ftalik anhidrid ile uygun bir alkolün (genelde 6-13 karbonlu) reaksiyonu ile elde edilen renksiz ve oda ısısında sıvı olan maddelerdir. Kimyasal yapısı Şekil 2.1.'de gösterilmiştir (20).

Bu kimyasal maddeler, alkil yan zincirlerinin uzunluğuna göre uzun ve kısa zincirli ftalatlar olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Kısa zincirli ftalatlar di-n-butil ftalat (DnBP), benzil butil ftalat (BBP) gibi ftalat türevlerinden oluşurken, uzun zincirli ftalatlar esas olarak polivinil klorür (PVC) polimer üretiminde kullanılan ve DEHP, di-izononil ftalat (DINP), di-izodesil ftalat (DIDP) ve di (2-propilheptil) ftalat (DPHP) gibi ftatlardan oluşmaktadır (42, 43).



Şekil 2.1. Ftalatların genel kimyasal yapısı.

$$R \text{ ve } R' = C_nH_{2n+1}; n = 4-15$$

Ftalatların Kullanım Alanları

Uzun zincire sahip ftalatlar genelde plastizer olarak kullanılmalarının dışında sıvı deterjanlarda, endüstriyel yağlarda, kağıt ve mukavva imalatında ve pestisitlerde inert madde olarak; kısa zincire sahip olan ftalatlar ise çözücü, kozmetik ve ilaç katkı maddeleri, insektisit gibi amaçlarla kullanılır (42-45).

Yüksek molekül ağırlığına sahip olan DEHP, çok tehlikeli ftalat sınıfında yer alması ve çok geniş bir kullanıma sahip olması nedeniyle meydana getirdiği toksisite açısından önemli bir yere sahiptir. DEHP, imitasyon deri, yağmurluk, ayakkabı, döşeme, tel ve kablo, masa örtüsü, duş perdesi, gıda ambalaj malzemesi, oyuncaklar, alüminyum folyo, mantar, kauçuk ve çözücülerde bulunabilmektedir. Ayrıca, kan ve parenteral beslenme torbaları, kataterler ve diğer medikal amaçlı kullanılan tüplerde çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Maruziyet Yolları

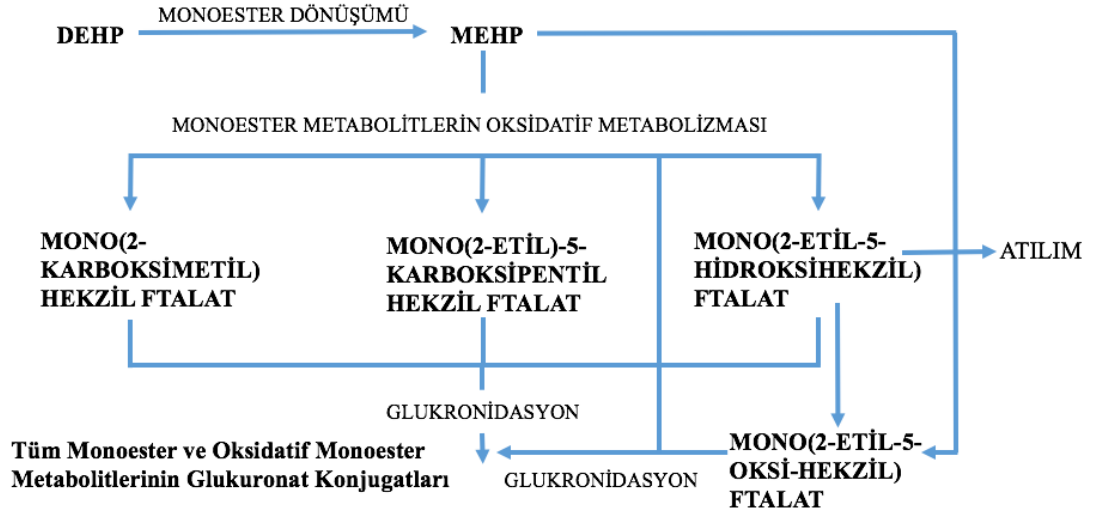
Ftalatlar, polimerlere kimyasal olarak bağlı değildir ve plastik materyalden kolayca uzaklaşabilir. Kolayca çevreye yayılabilmeleri ve yaygın kullanımlarına bağlı olarak ftalatlara dermal, oral, inhalasyon veya parenteral yollarla ciddi maruziyet söz konusudur (46). En önemli parenteral maruziyet kaynakları arasında kan transfüzyon, serum ve diyaliz torbaları gibi medikal malzemeler sayılabilir (16, 47). Diğer bir maruziyet yolu, evlerde kullanılan PVC pencere ve yer kaplamalarıdır (44). Bu nedenle kapalı alanlarda iç mekan hava ftalat konsantrasyonları dış mekan konsantrasyonlarına göre daha yüksektir. Kentsel bölgelerdeki açık hava ftalat konsantrasyonlarının kırsal bölgelerdeki konsantrasyonlardan daha yüksek olduğu bildirilmektedir (48, 49). Ev içi tozlarında DMP, DINP, DEHP, DIBP ve BBzP gibi ftalat türevlerinin saptandığı bildirilmiştir (50, 51). Ftalat içeren kaplarda bulunan içecek ve yiyecekler yoluyla maruziyet de mümkündür. Özellikle bu kapların mikrodalga ile ısıtılması sonucu maruziyet artabilir. Ftalat içeren, oyuncak, dış kaşıyıcısı ve diğer bazı ürünleri çocukların ağızlarına almaları maruziyet riskini artırır. Ayrıca, erişkin ve çocukların birçok farklı kişisel bakım ürünü ile ftalatlara maruziyeti de söz konusudur (10, 46). Yaygın kullanımları ve biyolojik etkilerine bağlı olarak ftalatlar, EPA ve Avrupa Birliği tarafından öncelikli kirleticiler listesine alınmıştır (52).

Di-2-etilhekzil ftalat, plastizör olarak en yaygın kullanılan maddelerden biridir ve DEHP'e maruziyet, mesleki ve çevresel (hava, su, toprak, gıdalar, medikal malzemeler) temasla da olmaktadır (42). DEHP'e en yaygın gıda yoluyla maruz kalınmaktadır. Ayrıca, DEHP'in kullanıldığı pek çok malzemeye (kişisel bakım ürünleri dahil) temas ile DEHP maruziyeti söz konusudur (44, 47).

Ftalatların Organizmadaki Yazgısı

Ftalaların absorpsiyon ve metabolizması oldukça hızlıdır; kısa yarılanma (6–12 saat) ömrüne sahip, birikme eğilimi göstermeden hızla metabolize edilen bileşiklerdir. Ftalatların biyotransformasyonu ftalat diesterlerinin lipaz/esterazlar ile ftalat monoesterlerine dönüştürülmesiyle başlar. Ftalat monoesterleri sitokrom P450 enzimleriyle (CYP450) yan zincir oksidasyonuna uğrar ve monoester okside metabolitler oluşur. Oksidasyonu takiben oluşan oksidatif metabolitler ileri oksidasyona uğrayabilir. Bazı ftalatların monoesterleri diesterlerinden biyolojik olarak daha aktiftir. Oluşan metabolitler glukroniltransferaz (UGT) ve sülfotransferaz (SULT) enzimleri aracılığı ile glukuronat ya da sülfat konjugatlarına dönüştürülür. Ftalat metabolitleri, serbest veya konjugatları halinde ana olarak idrar ve az miktarda feçesle elimine edilir. Uzun zincirli ftalatların yarı ömürleri %60 daha kısa olup, 24 saat içinde vücuttan atılır (20, 53).

Di-2-etilhekzil ftalat, oral yolla en çok maruz kalınan ftalat türevidir. Öncelikle ana metaboliti olan MEHP'e dönüşür. MEHP en toksik metabolit olarak bilinmektedir. Oluşan MEHP'in büyük bir kısmı mono-(2-etil-5-hidroksihekzil) ftalat (MEHHP), mono-(2-etil-5-oksohekzil) ftalat (MEOHP) ve mono-(2-etil-5-karboksipentil) ftalat (MECPP)'e dönüşür (42). DEHP biyotransformasyonu Şekil 2.2.'de özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Di-2-etilhekzil ftalat biyotransformasyonu (54).

Ftalatların Toksik Etkileri

Ftalatların toksik etkileri uzun yıllardır incelenmektedir. Akut toksisite profili maruz kalan ftalatın türüne, temas yolu ve temas yaşına göre değişkenlik gösterir. Kronik toksisitelerinde ise hedef organlar karaciğer, böbrek, tiroid ve testistir (55-58). Hayvan çalışmalarında, DEHP'in özellikle erkek üreme sisteminde anogenital açıklıkta azalma, testiküler anomaliler, testosteron seviyelerinde düşüş, inmemiş testis, testiküler atrofi gibi çeşitli problemlere neden olduğu gösterilmiştir (59-61). Dişi hayvanlarda ise erken ergenlik ya da gecikmiş ergenlik, serum estradiol düzeylerinde değişiklikler gibi ciddi sonuçlara yol açtığı görülmüştür (60, 62). Böbrek fonksiyonlarında değişiklikler, tiroid hormon bozuklukları ve metabolik işleyişte bozulma gözlenen diğer etkilerdir (63, 64). DEHP ile ilgili insan çalışmaları daha az sayıdadır. Çalışmalarda DEHP maruziyeti endometriozis, prematür telarş, puberte prekoks, sperm kalitesinde ve testosteron düzeylerinde düşüş, diyabet, obezite ile ilişkili bulunmuştur (65-67). Bu etkilerden farklı olarak ftalat maruziyetinin astım, dikkat bozukluğu, hiperaktivite, meme kanseri, düşük IQ, nörogelişimsel problemler, davranış bozuklukları ve otizm ile ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (68-72).

Di-2-etilhekzil ftalat toksisitesinin altında yatan mekanizmalardan birinin oksidatif stresi indüklemesi olduğu ve bu etkiden metaboliti MEHP'in sorumlu olduğu düşünülmektedir (73).

Di-2-etilhekzil ftalatın hepatokarsinojen etkileri bilinmektedir. Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından olası insan karsinojeni (2B) olarak sınıflandırılmıştır (74). Bu etkinin altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, mekanizmalardan birinin DEHP gibi genotoksik olmayan karsinojenlerin hepatik peroksizom proliferasyonu ve hücre replikasyonunu indüklemesi olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, DEHP ile indüklenen peroksizom proliferasyonu hayvan türleri arasında önemli farklılıklar göstermektedir. DEHP'in, peroksizom proliferatör-aktif reseptör alfa (PPAR alfa)-bağımlı yollarla karaciğer tümörüne neden olabileceği çalışmalarda gösterilmiştir (22, 75, 76). Sıçanlarda yapılan deneylerde peroksizom proliferasyonu için NOAEL değeri 5 mg/kg/gün DEHP olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, PPAR alfa-bağımsız bir yolla da karaciğer kanseri oluşumunda rol oynayabileceği PPAR alfa-null farelerde yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (23). DEHP'in neden olduğu karaciğer karsinoma ve hepatosit adenomalarının ise, DEHP'in hücre siklusundaki G2/M fazının durmasını ve kaspaz3 bağımlı apoptozu inhibe ederek meydana getirdiği düşünülmektedir (77). Ayrıca, p53 bağımlı apoptotik yolak da, DEHP kaynaklı hepatotoksisitede kritik bir rol oynamaktadır (78, 79). DEHP'e kısa süreli maruz bırakılan sıçanların karaciğer ağırlıklarında kontrole oranla belirgin bir artış (hepatomegali oluşumunu gösteren) saptanmış ve DEHP uygulanan sıçanlarda, alkalen fosfat (AP) ve glutamik piruvik transaminaz (GPT) enzim seviyelerinde artış ile birlikte karaciğer fonksiyon bozukluğu tespit edilmiştir (80).

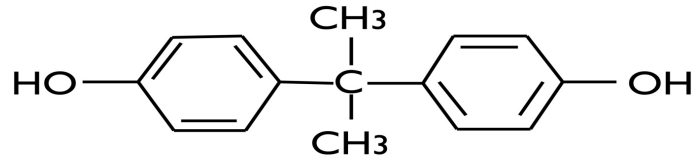
Amerika Birleşik Devletleri'nde popülasyonun DEHP'e maruziyetinin 3–30 ug/kg/gün düzeyinde olduğu tahmin edilmektedir. Bunun çok önemli bir kısmının besinler yoluyla olması nedeniyle kronik temasın tolere edilebilir düzeyleri aşabileceğinden endişe edilmekte, maruziyet kaynaklarını ve düzeylerini en aza indirmek için tedbir alınmaya çalışılmaktadır (81). Nitekim çocukların olası zararlı etkilerden korunması amacıyla oyuncaklarda ve çocuk bakım ürünlerinde DEHP'in kullanımına, Avrupa Birliğinde ve ABD'de son yıllarda yasak getirilmiştir. Avrupa Birliğinde gıda katkı maddeleri ile ilgili bilimsel panel (AFC), DEHP'nin testiküler toksisitesine ilişkin NOAEL değerinin 5 mg/kg/gün olmasını esas alarak "tolere edilebilir günlük alım düzeyi"ni (TDI) 50 µg/kg olarak belirlemiştir. Sıçanlarda yapılan deneylerde testiküler toksisite için NOAEL değeri 5,8 mg/kg/gün, "toksik etki

oluşturan en düşük doz (LOAEL)’’ değeri ise 29 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir (54, 82). Mesleki maruziyet göz önünde bulundurularak; DEHP’e günde 8, haftada 40 saat çalışma süresince uzun süreli ve tekrar edebilen maruziyetlerde, çalışanların sağlığını bozmayacak en yüksek konsantrasyon (TLV-TWA) 5 mg/m³ olarak belirlenmiştir. DEHP’in gebelerde oluşturacağı etkiler göz önünde bulundurulduğunda gebelik risk kategorisi C olarak belirlenmiştir (83).

Ülkemizde 2011 ve 2015 yılında yayınlanan kararlarla, DEHP, DBP, BBP DiNP, DIDP ve di-n-oktil ftalat (DNOP)’nin bazı ürün gruplarında kullanımı plastik içeriğinin %0,1’den daha yüksek konsantrasyonlarda olmayacak şekilde sınırlandırılmıştır. Bu ürün grupları arasında: çocuk kullanım ve bakım ürünleri, oyuncaklar, kırtasiye ürünleri, beslenme ve okul çantaları, spor malzemeleri, tekstil ürünlerindeki baskılar ve ayakkabılar yer almaktadır.

2.1.2. Bisfenol A

Bisfenol A 1940’lardan beri kullanılan ve genelde plastikleri sertleştirme amacıyla plastik materyale eklenen fenol yapısında bir kimyasal maddedir. 1930’ların başında BPA’nın yapay östrojen olarak kullanımı düşünülmüş, ancak daha etkili olduğu düşünülen DES farmasötik kullanımda BPA’ya tercih edilmiştir (84, 85). BPA’nın kimyasal yapısı Şekil 2.3.’te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Bisfenol A’ nın kimyasal yapısı.
4,4-dihidroksi-2,2- difenilpropan

Bisfenol A’nın Kullanım Alanları

Bisfenol A en çok rastlanan çevresel kirleticilerden biridir. Günümüzde polikarbonat ve epoksi reçine üretiminde yaklaşık %95 oranında BPA kullanıldığı düşünülmektedir (86). Gıda paketleri, plastik şişeler, kaplanmış teneke kutular, medikal malzemeler, plastik torbalar, diş hekimliği dolgu malzemeleri, oyuncaklar, lensler, bebek bakım ürünleri, biberonlar, çeşitli endüstriyel cihazlar, güneş gözlükleri,

CD ve DVD'ler, otomotiv sanayi, cep telefonları, bilgisayarlar, geri dönüşümlü kağıtlar gibi pek çok çeşitli ürünlerde kullanımları mevcuttur (87, 88).

Bisfenol A moleküllerini polikarbonat bileşiklerine ya da epoksi reçinelere bağlayan ester bağları güneş ışınları, sıcaklık ya da asidik-bazik yapıli bileşiklere temas ile kolayca kopabilmektedir (89). Özellikle BPA içeren gıda kaplama materyalleri ya da yiyecek kapları yanlış kullanım sonucunda yüksek oranda kontaminasyon riski taşır. Ayrıca, sterilizasyon ya da sürtme, birden fazla yıkama gibi fiziksel eylemler de bu malzemelerden BPA salınım riskinde artışa neden olmaktadır (90).

Bisfenol A'ya Maruziyet Yolları

Bisfenol A, günümüzde dünya genelinde en çok üretilen kimyasal maddelerden biridir (85). Çok sayıda endüstriyel ürünün içeriğinde bulunması, polimer yapıli ürünlerden kolayca ayrılması ve çevreye salınması BPA'nın insan sağlığı için ciddi tehlike arz etmektedir. BPA'ya gerek üretim, depolama esnasında gerekse endüstriyel ürünlerin kullanımı sırasında oral, inhalasyon ve dermal yolla maruz kalınabilir (89, 91). Başlıca maruziyet kaynağı kontamine besin ya da içme sularıdır. Otomobil, elektronik eşya, spor malzemeleri, CD ve DVD kaplama işlerinde çalışanlar kişilerde mesleki maruziyetin de söz konusu olduğu bilinmektedir (92). Ayrıca, bebeklerde ve küçük çocuklarda oyuncak, biberon gibi malzemelere temas ile yüksek oranda BPA maruziyetinin olduğu da görülmüştür (89). İnsan idrar, plazma, serum, tükürük, anne sütü gibi vücut sıvılarında BPA düzeylerinin ölçüldüğü çalışmalar maruziyetin yaygınlığının bir göstergesidir (93-95).

Bisfenol A'nın Organizmadaki Yazgısı

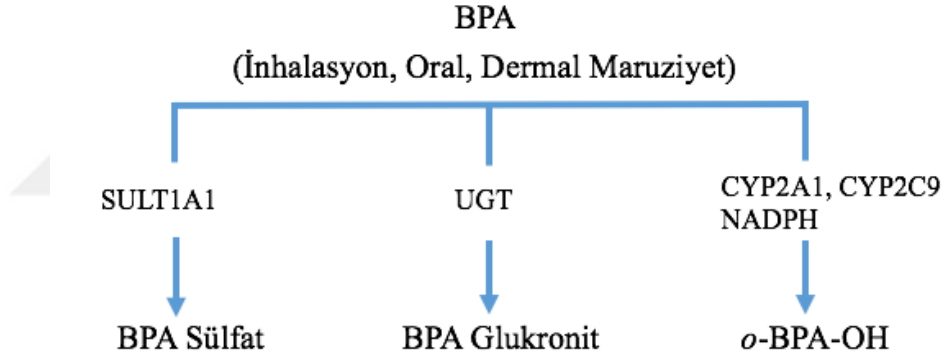
Bisfenol A, oral yoldan maruz kalındığında gastrointestinal sistemden hızlıca emilmektedir. Karaciğer ve barsakta ilk geçiş etkisine uğramaktadır. Inhalasyon yolu ya da dermal yol ile maruziyette ise ilk geçiş etkisine uğramadığı ve daha yavaş atıldığı bildirilmektedir (96).

Bisfenol A oral absorpsiyonu takiben, insan karaciğerinde hızla esas olarak CYP2C18 ve daha az olarak CYP2C19 ve CYP2C9 enzimleri ile metabolize edilir (97). BPA karaciğerde ve böbrekte faz II reaksiyonları ile aktif olmayan glukronit

konjugatları haline dönüşmektedir. Daha az kısmı da sülfat konjugatları şeklinde atılmaktadır. Çok yüksek miktarda BPA alındığında glukronidasyon yolağı doygunluğa ulaşmakta ve sülfatasyon yolağı devreye girmektedir (98).

Bisfenol A'nın glukronidasyonunu katalizleyen ana enzimler hepatik uridin 5'-difosfo-glukronoziltransferazlar (UGT) (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7 ve UGT2B15)'dir (99). Ayrıca, ekstrahepatik UGT'ler, UGT2A1 ve UGT1A10 solunum sistemi ve barsaklardaki UGT1A1 ise meme dokusunda gerçekleşen BPA glukronidasyonu için önemlidir. Sülfatasyondan sorumlu ana enzim ise sulfotransferaz (SULT) 1A1'dir (98). BPA biyotransformasyonu Şekil 2.4.'te özetlenmiştir.

Karaciğerde konjugatlarına dönüşen BPA kana geçmekte ve idrarla atılmaktadır (96). BPA'nın eliminasyon yarı ömrünün 4-6 saat olduğu ve yaklaşık 42 saatte tamamına yakınının idrarla atıldığı belirlenmiştir (97).



Şekil 2.4. Bisfenol A biyotransformasyonu.

Bisfenol A'nın Toksik Etkileri

Bisfenol A'nın östrojen reseptörü alfa (ERa) ve östrojen reseptörü beta (ERb) reseptörlerini bağlayarak östrojen hormonunu taklit ettiği bilinmektedir. Ancak BPA'nın ERb'ya afinitesi ERa'ya göre 10 kat daha fazladır. Bu reseptörlere afinitesi ise östrojenden ~10.000 kat daha azdır. Ayrıca, östrojen reseptörü ERR-γ'ya (Estrogen-related receptor gamma, ERγ) da bağlandığı bildirilmiştir (100). Bu nedenle BPA "zayıf östrojen ve endokrin bozucu" olarak tanımlanmaktadır. BPA'nın besin zincirinde birikip taşınabildiği bilinmektedir. Çeşitli çalışmalarla hayvan ve insan dokularında tespit edilmiştir. Plasental geçiş yolu ile taşındığı da bilinmektedir (93).

Ayrıca, hücre çoğalması, apoptoz, intraselüler iletişim, proteomik ve epigenetik mekanizmalarda da değişikliklerle ters etkilere neden oldukları bilinmektedir (101-103).

Yapılan *in vitro*, *in vivo* ve insan çalışmaları BPA'nın insan sağlığı üzerinde çok çeşitli ters etkileri olabileceğini göstermiştir. Bu etkiler arasında BPA'nın;

- Östrojenik ve antiandrojenik etkilerine bağlı olarak görülen üreme ve gelişme problemleri,
- Diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklar,
- Tiroid hormon bozuklukları,
- Oksidatif strese bağlı çeşitli organ (testis, beyin, karaciğer, böbrek, kalp) hasarları,
- Estradiol düzeyinde artış, sperm motilitesinde azalma, gebelikte maruziyetle düşük doğum ağırlığı,
- Fetal merkezi sinir sistemde kromozomal olmayan malformasyonlar,
- Davranış bozuklukları, beyin dokusu hasarı, ve otizim gibi çok çeşitli bozukluklar sayılabilir (9, 26, 31, 85, 91, 101).

BPA uygulamasına bağlı olarak gözlenebilecek karaciğer toksisitesine ilişkin deney hayvanlarında yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Sıçanlarda BPA maruziyetinin serum testosteron düzeylerini azalttığı, karaciğer ve böbrek ağırlıklarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (104). Hassan ve ark. (2012) tarafından sıçanlarda yapılan bir çalışmada BPA'nın, ROS oluşturduğu ve antioksidan gen ekspresyonunu azaltarak karaciğer toksisitesine neden olduğu gösterilmiştir (105). Diğer taraftan, BPA'nın farelerde, prenatal maruziyet sonucu fetal karaciğer gelişimini bozduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, BPA'dan kaynaklanan hepatik fonksiyon bozukluğu ve hastalıkların fetal orijinli olabileceği görüşünü desteklemektedir (106). BPA'ya prenatal dönemde maruziyet ile doğan yavrularda karaciğer tümör insidansının arttığı ve preneoplastik lezyonların gözleendiği saptanmıştır (107). Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada BPA'nın insülin sinyal iletimini yavaşlatarak glikojen içeriğini ve glikoz oksidasyonunu bozduğu ileri sürülmüştür (108). C57BL/6 erkek farelerde yapılan çalışmada BPA'ya hem akut hem kronik maruziyetin karaciğer glukokinaz aktivitesini ve fonksiyonunu bozduğu gösterilmiştir (109). Non-parankimal hepatositlerde BPA'nın ER stresi ile ilişkili apoptozu tetiklediği de yapılan bir çalışmada

gösterilmiştir (110). Çalışmalar, BPA maruziyeti sonucu oluşan toksik etkinin farklı mekanizmalar ile meydana gelebileceğini göstermektedir.

Bisfenol A'nın ters etkilerinin anlaşılması açısından geleneksel doz yanıt eğrilerinin çizilmesi mümkün değildir. Belirlenen sınır düzeylerin ve dozların altındaki maruziyetlerde bile ters etkilerin gözlemlendiği çeşitli çalışmalar mevcuttur (27, 31, 111). Sınır değerlerinin belirlenmesi bu nedenler daha zor ve karmaşık bir hale gelmektedir.

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority) tarafından geçmişte yapılan çalışmaların verilerine göre, BPA için NOAEL düzeyi 5 mg/kg/gün, üreme sistemi için LOAEL değeri ise 50 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir ve bu değer yapılan sonraki çalışmalarla da desteklenmiştir (112). 50 mg/kg/gün'den daha düşük dozlarda gelişimsel ve reproduktif toksisitenin gözlenmediği de belirtilmiştir. TDI, 0,01 mg/kg olarak belirlenmiş, ancak 2006 yılında bu değer 0,05 mg/kg olarak değiştirilmiştir (95). Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak çocuklar gibi hassas popülasyonlar dahil olmak üzere, yaşam boyu herhangi bir ters etki oluşturmada alınabilecek günlük oral alım düzeyi olan RfD, EPA tarafından 0,016 mg/kg olarak belirlenmiştir.

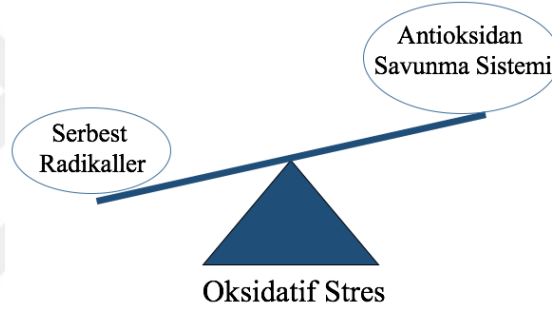
Avrupa Birliği ülkelerinde 2011 yılında bebek biberonları ve bebek gıdalarında kullanılan ambalaj malzemelerinin üretiminde BPA kullanımı yasaklanmıştır. FDA ise 2012 yılında bebek biberonları ve bardaklarının üretiminde; 2013 yılında bebek gıdalarında kullanılan ambalaj malzemelerinin üretiminde BPA kullanılmasını yasaklamıştır. Ülkemizde ise 2011 yılında yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Tebliği'nde bebeklerde kullanılan plastik ve benzeri ürünlerde BPA kullanılması yasaklanmıştır.

2.2. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen bileşikleri ve reaktif nitrojen bileşikleri (RNS), normal hücre metabolizmasının ürünleridir. ROS'lar yapılarında oksijen bulunduran son derece yüksek reaktiviteye sahip organik veya inorganik serbest radikaller veya peroksitlerdir ve biyolojik sistemlerde en çok rastlanan, en önemli serbest radikalleri oluştururlar.

Hücrelerin oksijen tüketmesi ve reaktif oksijen radikallerini üretmesi, oluşan ilk aerobik hücre ile başlamıştır. Mitokondrial solunum prosesi, peroksizomal oksidasyon, mikrozomal sitokrom P450 metabolizması, nötrofil, eozinofil, makrofaj

hücreleri ve inflamator sitokinlerin aktivasyonu, aldehit oksidaz ve ksantin oksidaz gibi çok sayıda enzimin katalitik etkisi, tiyoller, katekolaminler, flavinler gibi bazı hücre içi küçük moleküllerin oksidasyonu ya da araşidonik asitin lipooksijenaz ve siklooksijenazlarla oksidasyonu esnasında endojen kaynaklı olarak üretilmektedir. Ayrıca ilaç kullanımı (parasetamol, bleomisin, doksorubisin, etanol), genotoksik olmayan karsinojenlerin de dahil olduğu klorlu bileşikler, çevresel kirleticiler, bazı metal iyonları, UV ışınları, iyonize radyasyon, alkol ve sigara kullanımı, beslenme bozuklukları ve mineral dengesizlikleri (Fe ve Cu gibi minerallerin normalden fazla olması) gibi çok çeşitli etkenler aracılığı ile ekzojen kaynaklı üretimleri de mevcuttur. Hücreler bu bileşikleri sahip oldukları enzimler ve antioksidan ögeler ile indirger. Bu durum, organizmanın belirli bir redoks dengesini oluşturmasını sağlar (113, 114).



Şekil 2.5. Oksidatif Stres.

Hücresinin normal redoks durumu bazı durumlarda bozulur. Oksidatif stres ROS'un üretimi/varlığı ile biyolojik sistemin bunları detoksifiye etmesi ve oluşturdukları hasarı onarması arasında bir dengesizlik oluşması ile ortaya çıkar (Şekil 2.5.). Bu durumda hücrenin indirgeme potansiyeli bozulmuş, hasara uğramış veya doygunluğa ulaşmış ve GSH gibi hücrenin indirgemeyi sağlayan ögeler baskılanmış olabilir. Bu dengesizlik sonucu oluşan peroksitler ve serbest radikaller hücrenin proteinlere, lipitlere ve DNA'ya hasar verir (115, 116). Ortaya çıkan oksidatif stresin büyüklüğü hücrenin indirgeme mekanizmalarında ortaya çıkan değişimlerin boyutuna bağlıdır. Eğer hücre ortaya çıkan değişimlerin düzelmesini sağlayabiliyorsa ve normal haline geri dönebiliyorsa, hücrede hasar ya görülmez ya da küçük bir hasar ortaya çıkar. Ancak hücre onarımı sağlayamıyorsa ve ATP depleasyonu da varsa, hücre ölümü gerçekleşir. Hasar orta düzeyde ise, hücre apoptoza gider; hasar büyükse nekroz gerçekleşir (117, 118). Oksidatif stresin patolojik durumların nedeni mi olduğu veya

patolojik durumlar nedeniyle mi ortaya çıktığı tartışmalı bir konudur. Ancak, oksidatif stres pek çok patolojik durumla ilişkilendirilmiştir. Bunlardan bazıları yaşlanma, esansiyel hipertansiyon, karsinojenik etki, kas defektleri, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, astım, iskemik hasar gibi durumlardır. Ayrıca mukus salgılanması, redoks sinyalleşmesi, hücre içi veya hücreler arası sinyalleşme, hücre çoğalması, farklılaşması ve büyümesinde rol alan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gibi çeşitli fizyolojik mekanizmalarda da rol oynadıkları bilinmektedir (119-122).

2.2.1. Oksidatif Stresin Biyogöstergeleri

Oksidatif stres kompleks bir süreçtir ve nicel olarak tespit edilmesi kolay olmamakla birlikte, oksidatif stresin değerlendirilmesinde en çok kullanılan biyogöstergeler aşağıda belirtilmiştir (123).

- Doğrudan ROS/RNS'nin ölçümü
- Total antioksidan kapasite
- Antioksidan enzim aktiviteleri (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, tiyoredoksin redüktaz, glutatyon redüktaz)
- Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (Vit-C, E, glutatyon, flavonoidler ve karotenoidler)
- Redükte/okside glutatyon (GSH/GSSG) oranı
- Lipit oksidasyon ürünleri (konjuge dienler, hidroperoksidler, tiyobarbitürik asit, malondialdehit, 8-izoprostan F2 α)
- Protein oksidasyon ürünleri (karbonil grupları, nitrözaminler)
- DNA oksidasyonu (8-hidroksi-2-deoksi guanozin ve 8-hidroksi guanin düzeyleri)

Glutatyon

Glutatyon, organizmada bulunan önemli bir antioksidan moleküldür. “ γ -Glutamil Sisteinil Glisin” yapısında atipik bir tripeptittir. Vücutta L-glutamik asit, L-sistein ve glisinden sentezlenir. Hayvan dokularında, bitkilerde ve bakterilerde bulunur. Canlı hücrelerin karakteristik ve önemli bir bileşenidir. Vücutta redükte GSH ve okside glutatyon halinde bulunabilir. İnsanda GSH 1-10 mM konsantrasyonlarda

bulunur ve ROS'ların temizlenmesine yardımcı olur. GSH'daki sisteinin tiyol grubu stabil olmayan (ROS gibi) molekülleri redükleyebilir. Bu durumda kendisi de reaktif hale gelir ve iki reaktif glutatyon birleşerek glutatyon disülfiti (GSSG) oluşturur. GSSG daha sonra glutatyon redüktaz (GR) ile tekrar GSH'a dönüşür. GSH vücutta başta karaciğer hücreleri olmak üzere farklı hücrelerde bulunur ve dokularda glutatyon havuzunun %90'ından fazlası GSH'tan oluşur. Çekirdekdeki glutatyon, DNA'nın onarımı ve ekspresyonu için protein sülfidlerin redoks durumunu korumaktadır. Ciddi oksidan stres durumlarında hücrenin GSSG'yi GSH'a indirgeme özelliği azalır ve böylece GSSG hücrede akümüle olur. Okside GSH, hücrelerde birikebilir ve GSH/GSSG oranı oksidatif stresin önemli bir ölçüsü olarak değerlendirilir (124-126).

Glutatyon molekülünün oksidatif strese karşı başlıca koruyucu rolleri:

1. Oksidatif strese karşı detoksifikasyonda yer alan glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon s-transferaz (GST) gibi enzimlerin kofaktörüdür. Vücudun tüm elektrofilik, halojenli yapılar, epoksitlere karşı korunmasında rol oynar.
2. Plazma membranından aminoasit taşınımına katılır.
3. Hidroksil radikali ve singlet oksijeni doğrudan süpürür.
4. GPx'in kofaktörü olması nedeniyle H_2O_2 ve lipit peroksitlerin detoksifikasyonuna katkıda bulunur.
5. Vitamin C ve vitamin E gibi nonenzimatik antioksidanları yeniden aktif formuna dönüştürme kapasitesine sahiptir.
6. Apoptozise karşı hücreleri korur. Bu koruyucu etki, detoksifikasyon ve hücre redoks durumunu kapsayan çok faktörlü mekanizmalardan kaynaklanmaktadır (124, 126).

Sigara ve alkol kullanımı, kafein, asetaminofen, aşırı egzersiz, α -, γ - ve UV radyasyon, enfeksiyonlar, stres, yetersiz beslenme, bazı ilaçlar ve bazı çevresel kirleticiler GSH tüketimine neden olur. Ayrıca, yaşla beraber de vücuttaki GSH miktarında azalma gözlenir (127).

Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu (LP), genellikle oksidanların karbon-karbon bağı içeren membran lipitlerinden (özellikle doymamış yağ asitlerinin) bir elektron koparılması olarak tanımlanabilir. Membran lipitlerinin oksidatif hasarla bütünlüğünün bozulması

sonucunda membran yapı ve fonksiyonlarında değişikler meydana gelebilir. LP' nun biyolojik membranlardaki sonuçları, membran akışkanlığının değişmesi, membran potansiyelinin dūřürölmesi, H^+ ve diğer iyonlara permeabilitesinin artması ve membranın yırtılarak hücre içeriğinin ve lizozomal hidrolitik enzimlerin dışarıya salınması şeklinde görölür. Hücre ölümü ile sonuçlanan tablolar da meydana gelebilir. LP sonucu oluşan ürünler başlıca lipit hidroperoksitler (LOOH), malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksialkanellerdir. MDA başta olmak üzere 4-hidroksialkanellerin de çeşitli toksik etkilere sahip oldukları gösterilmiştir (128). MDA, hücre membranlarında yer alan hidroperoksitleri etkileyerek iyon geğirgenliğini bozar ve enzim aktivitelerini değiştirebilir. Ayrıca, DNA gibi makromolekülleri etkileyerek ciddi hasarlara neden olabilen MDA uzun yıllardır LP'nin belirlenmesinde önemli bir biyogösterge olarak kullanılmaktadır (129). LP'nin en önemli bir diğer aldehit ürünü 4-hidroksi-2-nonenal (HNE)'dir. MDA bakteri ve memeli hücrelerinde mutajen, sıçanlarda kanserojendir. HNE, zayıf bir mutajendir ve LP'nin en önemli toksik ürünüdür (130).

Yapılan birçok çalışma LP'nin; inflamasyon, kanser, nörodejeneratif hastalık, böbrek dejenerasyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir (129, 130).

Protein Oksidasyonu

Proteinlerde bulunan aromatik aminoasit ve sülfidril grupları oksidatif hasara karşı savunmasızdır. Protein oksidasyonu, ROS ile doğrudan veya proteinlerin kovalent modifikasyonu (oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu dolaylı olarak indüklenen) olarak tanımlanmaktadır. ROS üretimine sebep olan tüm ajanlar ve reaksiyonlar protein oksidasyonuna yol açabilmektedir. Bu protein hasarı, bölgesel amino asit modifikasyonu, peptit zinciri fragmentasyonu, hücrede elektriksel yükün farklılaşması, enzim aktivitesinde değişiklikler, membran taşıyıcılarının hasarı ve reseptörlerle etkileşme gibi çeşitli mekanizmalarla oluşabilmektedir (131).

Protein oksidatif modifikasyonunun pek çok farklı tipi olduğu için tek bir gösterge olmamakla birlikte, protein karbonil grupları oksidatif strese bağlı hücrel hasarın en genel belirteci olarak kabul edilmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır (132, 133).

Oksidatif DNA Hasarı

“Oksidatif DNA Hasarı” serbest radikallerin DNA’da oluşturduğu hasardır ve genelde DNA hasarı “DNA Onarım Prosesleri” ile onarılır. Ancak bazı durumlarda DNA’da gerçekleşen oksidatif hasar onarılamaz. Özellikle son derece reaktif bir bileşik olan hidroksil anyonunun ($\text{OH}^\bullet$), tümör süpresör genlerin inaktivasyonuna, nokta mutasyonlarına neden olarak onkogenlerin aktivasyonuna ve DNA hasarının onarımının önlenmesine neden olarak karsinogenik etkinin başlamasında en önemli molekül olduğu bildirilmektedir (134, 135). Onarılmayan hasarların sonucunda mutagenез, karsinogenез veya yaşlanma olayları ortaya çıkar (136). ROS oluşumu ve kalıcı oksidan stresin karsinoma hücrelerinin karakteristik özelliği olduğu, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak gösterilmiştir (134). Ayrıca oksidatif DNA hasarının, diyabet, Alzheimer hastalığı, ateroskleroz, immün ve inflamatuvar hastalıklarda rol oynadığı da bilinmektedir (137, 138).

DNA’da görülen oksidatif hasar DNA yapısındaki bazları, şekerleri veya nükleotidleri etkileyebilir. $\text{OH}^\bullet$ ’nin etkisiyle oluşan 8-hidroksi-2’-deoksiguanozin (8-OHdG) en sık görülen baz hasarı türüdür ve DNA hasarının en iyi göstergelerinden biridir. 8-hidroksiguanozinin (8-dG) hidroliz ürünü olan 8-OHdG’nin veya tatomeri olan 8-okzo-7-hidro-2’-deoksiguanozinin (8-okzodG) deteksiyonu kolay olduğu için DNA hasarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılır (27, 139).

Antioksidan Savunma sistemi

Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak amacıyla organizmada, antioksidan savunma sistemi başta olmak üzere çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Düşük konsantrasyonlarda dahi herhangi bir molekülün oksidasyonunu geciktiren ya da inhibe eden moleküllere “antioksidan” denmektedir. Antioksidanlar biyolojik sistemde endojen olarak sentezlenebilmekte ya da sistem içerisine dış kaynaklı olarak alınmaktadır. Endojen antioksidanlar, yapılarına göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere sınıflandırılmaktadır. SOD, GPx, CAT ve tiyoredoksin redüktaz (Trx) enzimatik; GSH, α -tokoferol (vitamin E), askorbik asit (vitamin C), karotenoidler ve flavonoidler enzimatik olmayan antioksidanlardır. Enzimatik antioksidanlar hücre içi savunmadan sorumludur (115, 117). Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalının H_2O_2 ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü

katalizleyen antioksidan bir enzimdir. Süperoksit anyonunu H_2O_2 'e dönüştüren tek memeli antioksidan enzim grubudur ve mangan süperoksit dismutaz (MnSOD), bakır-çinko süperoksit dismutaz (CuZnSOD) ve ekstraselüler süperoksit dismutaz (ECSOD) olmak üzere 3 izoformu mevcuttur (140-142).

Katalaz, antioksidan savunma sisteminin diğer önemli bileşenidir. Aerobik hücrelerin çoğu bu enzimi içerir. Memeli hayvanların tüm organlarında bulunur. Özellikle karaciğer, eritrosit ve daha az ölçüde böbrekte lokalize olmuştur. Hücre içinde de %80 peroksizomlarda, %20 oranında sitozolde bulunmaktadır. CAT, H_2O_2 'in H_2O ve O_2 'e yıkımının katalizlenmesinden sorumludur (115, 117).

Glutatyon peroksidaz, hemoglobin oksidasyonu ve hemolize karşı eritrositlerin korunmasında yer alan bir enzim olarak tanımlanmış, takiben insan eritrositlerindeki varlığı ve oksidatif hasara karşı eritrositlerin korunmasındaki esas önemini açıkça gösterilmiştir. Bu enzimin aktif bölgesinde kovalan bağlı olarak selenosistein bulunmaktadır ve bu nedenle selenyum bağımlı bir enzimdir. Selenyum bağımlı enzim, organik hidroperoksitler ve H_2O_2 'e karşı aktiftir. H_2O_2 dahil çok çeşitli hidroperoksitlerin yıkımı GSH oksidasyonu ile katalizlemektedir (143, 144).

2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi

Ökaryotlarda endoplazmik retikulum (ER), hücrede birçok önemli göreve sahip, sitoplazmik bir organeldir. Hücrede yapı ve fonksiyon olarak farklı iki tip ER bulunur: Granüllü ER ve Granülsüz ER. Granülsüz ER tübüler veya vesiküler bir yapıya sahiptir; granüllü ER membranlarından türevlenir ve protein sentezine katılmaz. Organel, farklı hücrelerde farklı işlevler gerçekleştirir. Granüllü ER'de lipit biyosentezi, steroid hormon sentezi, lipit taşınması, kas kasılması, metabolik işlevler, safra ve kolesterol sentezi, glikojen yıkımı, ilaç detoksifikasyonu gibi önemli işlevler meydana gelmektedir. Granüllü ER'ye bağlı ribozomlarda hücrenin salgı proteinleri, lizozomal enzimleri ve plazma membranı glikoproteinlerinin sentezi gerçekleşir. Kompleks protein katlanması (complex protein folding) ve olgunlaşması bu organelde gerçekleşir; ayrıca, proteinlerin hücre içinde gerekli bölgelere taşınmasından ve proteinlerin kalite kontrolünden sorumludur (145, 146). Katlanmanın doğru olup olmadığı, yanlış katlanma varsa katlanmanın düzeltilmesi, düzeltilemiyor ise yanlış katlanan proteinlerin yıkım için gönderilmesinden de ER sorumludur (147).

Yeni sentezlenmiş proteinler, önce çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlara (N glikozilasyon, disülfid oluşumu, hidroksilasyon, oligomerizasyon gibi) uğrar ve sonra katlanır (146). Protein doğru katlanmış ise, son glukozun uzaklaştırılmasıyla şaperonların bağlı olduğu bölge ortadan kaldırılır ve olgunlaşan protein golgiye transfer edilir. Proteinlerin katlanması birçok aşamadan oluşur ve bu aşamaların uygun bir şekilde tamamlanmasında glukozla düzenlenen protein 78 olarak adlandırılan GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein), glukozla düzenlenen protein 94 (94 kDa glucose-regulated protein, GRP94) gibi moleküler şaperonlar (polipeptitlerin doğru katlanmasına yardımcı olan proteinler), kalretikulin ve kalneksin gibi proteinler (lektin benzeri) ve foldazlar rol alır. Aktiviteleri için kalsiyuma ihtiyaç duyan moleküler şaperonlar, proteinlerin katlanması ve transportunun gerçekleştiği kalsiyum içeriği oldukça zengin olan ER’de çokça bulunur (148). GRP78’in monomerik formu şaperon görevi görür ve proteinin translokasyonunun düzenlenmesi, kalsiyumun bağlanması, apoptozun düzenlenmesi, katlanmamış protein cevabının (unfolded protein response, UPR) düzenlenmesi, kalite kontrol, protein yıkımı gibi birçok görevde rol alır. GRP94 ise hücre içinde gerçekleşen, protein katlanmasının yanı sıra katlanamayan proteinlerin yıkıma gönderilmesi, apoptozun düzenlenmesi, kalsiyum bağlanması ve immünite gibi olaylarda yer alır. Glikoproteinlerin kalite kontrolünden kalretikulin ve kalneksin sorumludur ve glikoproteinlere bağlanırlar. Disülfid izomerazlar ve foldazlar için substrat görevi görürler. Foldazlar ise şaperon benzeri enzimlerdir. Foldazların katlanmanın dışında disülfid bağ oluşumu, katlanmamış proteinlerin tanınması, yıkımı gibi görevleri de mevcuttur (148).

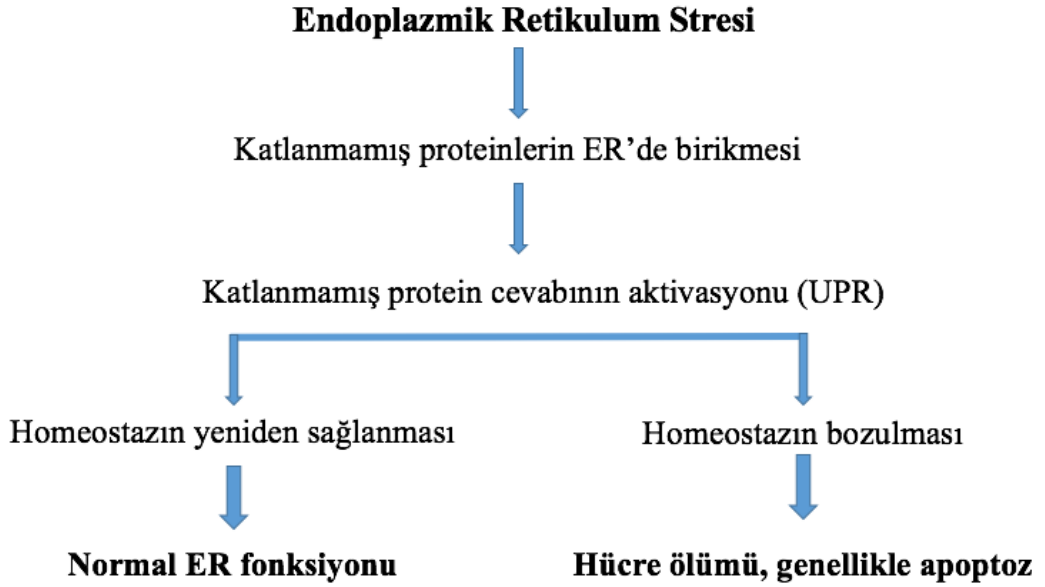
Hatalı Katlanma

Proteinlerin katlanması oldukça karmaşık ve hata olasılığı yüksek bir işlem döngüsünden oluşur. Oksidatif stres, N-bağımlı glikolizasyon inhibisyonu, hipoksi, ortam sıcaklığı, kalsiyum homeostazının bozulması, enfeksiyon gibi birçok etkenin doğru katlanma üzerine etkisi olduğu bilinmektedir (145, 147).

Posttranslasyonel modifikasyonlar sırasında proteinlere takılan şeker grupları, proteinin hidrofobik kısımlarını kapatacak şekilde önemli noktalara takılır. Yanlış katlanma durumunda hidrofobik kısımlar dış tarafta kalırken şekerler ise iç tarafta kalır. Böyle bir durumda hidrofobik kısımlara GRP78 bağlanır ve protein bu şekilde

işaretlenmiş olur. İşaretlenen proteinlerin ise ER'den dışarı atılması gerekir. Bu protein EDEM adlı enzim (ER degradation-enhancing 1,2-mannosidase-like protein) ile tanınır ve parçalanmaya gönderilir. Hatalı katlanan proteinlerin dışarı atılımı gecikirse, proteinler birbirlerine yapışabilir, büyük kitleler oluşturabilir. Proteinlerin hatalı katlanması ya da katlanamaması durumunda ERAD (ER-associated degradation) kontrol sistemi hatalı katlanmış ve hasarlı proteinlerin yıkımını sağlar ve ER'de bu proteinlerin birikimini önler (149). Protein birikimini çeşitli etkenler tetikleyebilir. Bu etkenler, hatalı katlanmış proteinlerin fazla miktarda eksprese olması, salgı proteinlerinin yüksek miktarda sentezlenmesi, besinsiz kalma, katlanma işlevinde görevli proteinlerdeki mutasyonlar, viral enfeksiyonlar ve kalsiyum seviyesindeki anormal değişimler olabilir.

Endoplazmik retikulumda bazı patolojik veya fizyolojik durumlarda, lümende yanlış katlanmış ya da katlanmamış protein birikimi meydana gelir ve bu durum “endoplazmik retikulum stresi” olarak adlandırılır (Şekil 2.6.) (150).



Şekil 2.6. Endoplazmik retikulum stresi oluşum şeması.

Hücrede ER stresi meydana geldikten sonra hücre, homeostazını tekrar sağlamak ve en az hasarla stresten kurtulabilmek için “katlanmamış protein cevabı (unfolded protein response, UPR)”’nı aktifleştirir. UPR, hücre içi sinyal yollarından oluşan eylemler dizisidir. UPR, öncelikle hücre yaşamının idamesi ve fizyolojik ya da

patolojik durumlarda adaptasyon için kullanılan yolaktır (151, 152). Katlanmamış protein cevap yolağının aktif hale gelmesiyle birlikte verilen ilk cevap translasyonun durdurularak protein yükünün azaltılmasıdır (153). Stres durumunda şaperonların gen ekspresyonları da artmakta ve katlanamayan proteinlerin birikmemesi için proteinler yıkıma gönderilmektedir (154).

Endoplazmik retikulum stresi durumunda aktif hale gelen hücre içi yollar; inositol gerektiren enzim-1 (IRE-1) yolağı, PERK sinyal yolağı ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (atf6) sinyal yolağıdır. IRE-1 yolağı, hücrenin stres ve ölümden korunmasında önemli bir role sahiptir (155). IRE1, sitozolik kinaz ve endoribonükleaz (RNaz) aktivitesine sahip tip 1 transmembran proteindir. Memelilerde IRE1 α ve IRE1 β olmak üzere iki izoformu mevcut olmakla birlikte, ER membranında lokalize olup, stres ile ilişkili sinyal yollarını devreye sokabilmektedir ve ER membranında sinyal iletme kapasitesine sahiptir (156). ER stresi sırasında, IRE-1, ER-hedefli mRNA'ların degradasyonuna aracılık ederek, ER'de yeni sentezlenmiş proteinlerin yükünü azaltmaya yardımcı olur. IRE-1, GRP78 ile birlikte bulunduğu inaktiftir. Stres durumunda GRP 78 ayrılır, IRE-1'in RNaz kısmı aktif hale gelir. RNaz, ER şaperonlarının ve protein katlanmasına yardımcı olan enzimleri upregüle eden XBP-1'i kırparak transkripsiyon faktörüne dönüşmesini sağlar ve XBP-1 ER stresine adaptif yanıtın ana düzenleyicisi olarak görev yapar. IRE1 α ile yapısal ve işlevsel yönden benzerlik gösteren PERK, tip1 transmembran proteindir. gösterir. Ancak, sitozolik kısmında RNaz aktivitesi yoktur (157, 158). Aktive olan PERK, ökaryotik başlatıcı faktör α 'nın (eukaryotic initiation factor 2, eIF2 α) fosforilleyerek translasyonu yavaşlatır ve yeni sentezlenen proteinlerin stres altındaki ER'ye girişini önleyerek ER'nin iş yükünün azalmasına aracılık eder. Ayrıca, ER'nin kapasitesini artırarak stresini azaltmaya yardım eden "aktive edici transkripsiyon faktörü-4 (activating transcription factor-4, ATF-4)'nın ekspresyonunu indükler. ATF4, hücrel stres, oksidatif stres ve apoptozdan sorumlu genleri regüle eder (159-161). Bunlardan biri CHOP indüksiyonudur ve stres altındaki hücrelerin apoptoza girmesine neden olmaktadır. Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ise tip2 transmembran proteindir (162). ER stresi oluşması halinde, ATF6 GRP78'den ayrılır. Ancak bu noktada IRE-1 ve PERK'ten farklı olarak, ATF6 golgi cismine taşınır ve site1 ve site2 proteazlar tarafından iki parçaya kesilerek aktif hale gelir (163). Kesilerek ayrılan bir

parça aktif bir transkripsiyon faktörüne dönüşerek, ERAD ve apoptozda rol oynar. ATF6, aynı zamanda XBP1'in ve GRP78 gibi diğer şaperonların ekspresyonunu artırır. Sonuç olarak, ER'de hasar yaratan, hatalı katlanmış ve katlanmamış proteinlerin birikimini azaltılmış olur. Eğer hatalı katlanmış protein miktarı çok fazla olur ve stres devam eder ise, UPR'nin aktivasyonu ER stresıyla baş etmek için yetersiz kalabilir. Uzun süreli UPR aktivasyonunun ve ER stres cevaplarının oluşmamasının bir sonucu olarak, otofajik programlar veya apoptoz aktivasyonu ile hücre ölümü gerçekleşebilir (152, 164).

2.4. Oksidatif Stres ve Endoplazmik Retikulum Stresi İlişkisi

Günümüzde endoplazmik retikulum stresinin tetiklendiği pek çok hastalık grubu olduğu bilinmektedir. Bu hastalık gruplarında stres ve stres cevap yollarının aktif olduğu görülmüştür. Ancak araştırmalardan elde edilen bulgular oldukça az sayıdadır ve ER stres varlığında etkilenen tüm hücrel yollar ve yolların birbirleriyle olan etkileşimleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte hiperhomosisteinemi, serebral iskemi, nörodejeneratif hastalıklar, amiyotrofik lateral skleroz, parkinson, Alzheimer, Huntington, diyabet, hipoksi ve kanser gibi birçok hastalık ile ER stresinin ilişkili olduğu düşünülmektedir (165-169).

Endoplazmik retikulum, protein katlanması için oldukça uygun oksitleyici bir ortam sağlar. Disülfid bağlarının oluşumu sırasında ER'de ROS üretilir ve bağ oluşumu sırasında sistein kalıntılarının oksidasyonunun oksidatif strese önemli katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. ER lümeninde katlanmış veya yanlış katlanmış (oksidasyona bağlı olarak) proteinlerin birikmesi sonucu yüksek miktarda H_2O_2 üretebilir ve redoks homeostazı için gerekli olan GSH'ın tükenmesine neden olabilir. Ayrıca, mitokondri stres altındaki ER'den salınan Ca^{2+} iyonlarını alarak daha fazla ROS üretir. Fazla Ca^{2+} , sitokrom C'nin mitokondriden salınmasına neden olur ve bu da ROS üretiminde artışa neden olan elektron taşıma zincirini (ETC) inhibe eder. Ca^{2+} Krebs döngüsünde dehidrojenazları uyarır ve ROS üretimini artırır. ETC'yi bozan ve ROS üreten nitrik oksit sentazları aktive eder. UPR'nin proapoptotik bir regülatörü olan CHOP'un aktivasyonu, disülfid bağlarını protein disülfid izomerazına transfer eden bir oksidoredüktaz olan Ero1'yı düzenleyerek ROS'u artırır. Antioksidanlarla yapılan

tedavinin, ER stresini inhibe etmesi ROS ile ER stresi arasında karşılıklı bir ilişki olduğunu göstermektedir (167, 170).

2.5. Konu ile İlgili Çalışmalar

2.5.1. Bisfenol A ile İlgili Çalışmalar

Bisfenol A maruziyeti ile oksidatif stres ve/veya ER stresinin indüklenmesine ilişkin *in vitro* çalışmalar değerlendirildiğinde özellikle karaciğer hücrelerinde yürütülen çalışmaların sınırlı sayıda olduğu gözlenmiştir; mevcut çalışmaların son yıllarda yoğunluk kazandığı görülmüştür. Çalışmalarda bu maddelerin olası istenmeyen etkileri ve altında yatan mekanizmalar incelenmekle birlikte, daha ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Huc ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, HepG2 hücrelerine BPA maruziyetinin (10^{-4} – 10^{-12} M) etkileri saptamaya çalışılmış ve fizyolojik parametreleri akım sitometrisi ile ölçülmüştür. Yapılan incelemelerde özellikle düşük doz maruziyetlerde ROS üretiminde artış, mitokondriyal disfonksiyon, lipit birikimi, lipoperoksidasyon ve proinflatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-8 [10^{-5} M, $p<0,05$] ve tümör nekroz faktör α (TNF α) [10^{-5} M, $p<0,05$]) salınımlarında artış gibi birçok fizyolojik bozukluk gözlenmiştir. Araştırmacılar, düşük doz BPA maruziyetinin hepatik hücrelerde mitokondriyal fonksiyonları bozarak lipit birikimine yol açtığı ve lipit metabolizmasını değiştirerek inflamasyon aracılığıyla steatoza neden olabileceği sonucuna varmışlardır (171).

HepG2 hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada, Fic ve ark. (2013), 8 farklı yapısal BPA analogunun (BPF, BPAF, BPZ, BPS, DMBPA, DMBPS, BP-1 ve BP-2) Ames testi ve Comet deneyi ile mutajenik ve genotoksik etkilerini incelemiştir. Toksik olmayan BPA dozları (0,1 μ mol/L- 10 μ mol/L) 4 saat ve 24 saat uygulanarak HepG2 hücrelerinde genotoksik etkileri Comet deneyi ile incelendiğinde BPA ve analogu olan BPS'nin 24 saatlik 0,1 μ mol/L ($P<0,001$) ve 1 μ mol/L ($P<0,01$), maruziyet sonrası DNA hasarına neden olduğu, ayrıca DMBPS, BP-1 ve BP-2 analoglarının DNA iplikçik kırılmalarında geçici olarak artışa yol açtıkları görülmüştür (172).

Sertoli hücrelerinin proliferasyonuna düşük doz BPA etkisini incelemek amacıyla tasarlanan bir diğer çalışmada, Sertoli TM4 hücrelerine 10^{-8} M ve 10^{-5} M

BPA uygulanmıştır. Yapılan proteomik analizlerde ve ekspresyon analizlerinde (gerçek zamanlı- polimeraz zincir reaksiyonu [qRT-PCR] ve Western-blot analizi) protein ekspresyonlarındaki değişiklikler incelenmiştir. Proteomik çalışmalarda 24 saat 10^{-8} M ve 10^{-5} M BPA uygulamasıyla enerji metabolizması ve oksidatif stres ile ilgili 36 protein ve 2 büyük protein kümesinin ekspresyonlarında anlamlı olmayan değişiklikler saptanmıştır. Yapılan diğer incelemeler sonucunda mikromolar düzeyde BPA maruziyetinin oksidatif strese artışa bağlı olarak proliferasyonu inhibe ettiği ($p<0,05$), nanomolar düzeyde BPA'nın enerji metabolizmasını arttırarak proliferasyonu stimüle ettiği görülmüştür ($p<0,05$) (103).

Fei ve ark. (2014), INS-1 hücre hattında yaptıkları bir çalışmada BPA'nın önemli düzeyde ROS düzeylerini artırdığını göstermiştir (100 μ M BPA; $p<0,01$) ve oluşan oksidatif stresin DNA hasarını indükleyebileceğini savunmuşlardır (173). Bir başka çalışmada Neuro2a ve GC1 hücrelerinde 50 μ M veya 100 μ M BPA uygulaması ile ROS düzeylerinin arttığı bulunmuştur. Neuro2a hücrelerinde zamanla ROS düzeylerinin arttığı bulunurken, GC1 hücrelerinde 12. saatten sonra düzeylerde azalma saptanmıştır (174). Keçi Sertoli hücrelerine (goat testis Sertoli cell) uygulanan 400-600 μ M BPA, ROS düzeylerinde zaman bağlı olarak önemli ölçüde artış meydana getirmiştir ($p<0,05$) (175).

İnsan kırmızı kan hücrelerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada, hücrelere BPA, BPF, BPS ve BPAF maddeleri uygulanmıştır. 4 saat inkübasyondan sonra, 250 μ g/ml ve 500 μ g/ml BPA uygulanan hücrelerde SOD aktivitesinde %60,0-83,1'lik bir azalma meydana geldiği görülmüştür. 500 μ g/ml BPF uygulamasında %79,1'lik azalma ve 100 μ g/ml BPAF uygulamasında %80,9'luk bir azalma gözlenmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra 100 μ g/ml BPA, SOD aktivitesinde % 82,6'lık bir düşüşe neden olurken, BPF (25-100 μ g/ml) daha ciddi bir azalmaya neden olmuştur (%72.3-85.7). SOD aktivitesindeki en belirgin düşüş (%73,0-87,4) BPAF ile muamele edilen hücrelerde gözlenmiştir. BPA (250 μ g/ml ve 500 μ g/ml) ve BPS (500 μ g/ml)'nin inkübasyonu sonrası GPx aktivitesinde de azalma kaydedilmiştir ancak, bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca, 100-500 μ g/ml BPA uygulanması sonucunda CAT aktivitesinin %64,7-82,8 oranında azaldığı belirlenmiştir. 24 saatlik maruziyette bu oranlar daha da artmıştır. 25–500 μ g/ml BPA uygulamasında ise GSH seviyelerinin %68,1-92,14 oranında düştüğü gözlenmiştir (176).

Testis Sertoli hücrelerinin kullanıldığı bir diğer çalışmada, hücrelere düşük veya orta dozda BPA uygulaması yapılmıştır. Düşük doz BPA maruziyeti ile GSH düzeylerinde hiçbir değişiklik gözlenmezken, orta dozda BPA maruziyeti ile hücrelerde GSH seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir. Hücre içi GSH seviyelerinde; 10 μ M BPA uygulamasında 3. ve 24. saatlerde, 10 μ M BPA uygulaması sonrasında da 1, 3 ve 24. saatlerde anlamlı bir artış görülmüştür. Araştırmacılar GSSG'nin GSH'a dönüştüğünü ve bu nedenle GSH seviyelerinin yüksek bulunduğu savını ortaya koymuşlardır. Çalışmada ayrıca GR ekspresyonu da değerlendirilmiştir. 10 μ M BPA uygulanan çalışma grubunda GR düzeylerinde bir değişim gözlenmezken, 50 μ M BPA uygulanmasının ardından 1. saatte GR ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. 3. veya 24. saatte ekspresyon düzeylerinde bir artış görülmemiştir (177).

Bisfenol A'nın ER stres ve apoptorik değişiklikler ile ilişkisini inceleyen çalışmaların çok daha sınırlı sayıda olduğu görülmektedir. Asahi ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 100 μ M BPA (48 saat) ile muamele edilen NCTC Clone 1469 (fare non-parenkimal hepatositi) hücrelerinde ER stres ile ilişkilendirilen apoptoz incelenmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan morfolojik incelemede BPA uygulanan grupta ER'nin uzadığı gözlenirken, diğer hücre içi organellerde yapısal bir değişiklik gözlenmemiştir. Çalışmada RT-PCR analizi sonucu anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2 ekspresyonunda hafif bir düşüş gözlenmiştir. Apoptozda yer alan hedef genlerin promotörlerine bağlanan ve stres oluşan ER'den gelen sinyallerle indüklenen bir downstream transkripsiyon faktörü olan CHOP mRNA ekspresyonunda, BPA uygulanan NCTC Clone 1469 hücrelerinde bir artış (1,42 kat) görülmüştür. Ayrıca, ER'de lokalize olan ve burada fazla protein birikimi ile aktive olabilen kaspaz-12'nin ekspresyonunun arttığı (1,33 kat) saptanmıştır. ER fonksiyonunu bozan bir dizi farklı uyarana cevap olarak uyarılan, ER-lokalize bir protein olan ve tam lizatta bakılan GRP78/BiP proteininin de ekspresyonunun arttığı (1,36 kat) gözlenmiştir. Kaspaz-12'nin aktivasyonu ve mevcut çalışmada gözlenen GRP78/BiP'nin up-regülasyonu, ER stres varlığını destekler niteliktedir (110).

Granüloza hücrelerinde BPA'nın apoptozu indükleyip indüklemediğini incelemek için, Xu ve ark. (2002) tarafından hücreler farklı süre ve konsantrasyonlarda BPA ile inkübe edilmiştir. Yapılan TUNEL analizinde, artan doz ve sürelerde

apoptotik hücre sayısının arttığı gözlenmiştir. Kontrol grubunda apoptotik hücre oranı %1,6±0,7; 100 fM BPA uygulanan grupta %1,9±0,9; 100 pM uygulamada %6,3±0,9; 100 nM'lık grupta %10,8±1,3 ve 100 µM uygulamada ise %16,6±2,0 bulunmuştur. Apoptotik hücreler, hücreSEL büZülme, membran kabarması ve nükleer kondensasyon ile karakterize edilmiştir (178).

HL-60 hücrelerinde BPA maruziyetinden sonra, prokaspaz 3, 8 ve 9'un aktif formlarının ekspresyonlarının western blot yöntemi ile tayin edildiği bir çalışmada; 0,4 mM BPA ile muamele edilmiş hücrelerde prokaspaz 3 ve 9 gözlenirken, prokaspaz 8 gözlenmemiştir. Kaspaz 9'un aktif formunun ekspresyonunun zamana bağlı bir şekilde 3 saatte pik düzeylere ulaştığı; benzer şekilde, kaspaz 3'ün aktif formunun 3 saatte bir pik gösterdiği ve daha sonra azaldığı saptanmıştır. Ancak, kaspaz 8'in aktif formu 5 saatte dahi görülmemiştir. Elde edilen verilere dayanarak BPA'nın HL-60 hücrelerinde apoptoz yollarını daha hızlı harekete geçirdiği söylenebilir (179).

İnsan plasental JEG-3 hücrelerinde, BPA, nonil- (NP) ve oktilfenol(OP), benzil bütıl ftalat (BBP), DBP, DEHP ve dimetil ftalat (DMP) maruziyetinin ROS ile arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada, 24 saatlik maruziyet sonucu OP ve NP en yüksek sitotoksisiteyi göstermiştir (IC50: 36–40 μ M). OP ve NP'den sonra en yüksek sitotoksosite değerini ise BPA gösterirken (138–219 μ M), diğer ftalat türevlerinde anlamlı bir toksisite gözlenmemiştir (180).

2.5.2. Ftalat ile İlgili Çalışmalar

Günümüzde yaygın olarak kullanılan ftalat ve türevleri ile ilgili literatürde pek çok çalışma mevcuttur. Özellikle oksidatif stres oluşturarak istenmeyen etkiler meydana getirdiği düşünülen bu kimyasal maddelere ilişkin çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Gebe Wistar sıçanlarından alınan embriyonik ekstremite tomurcuk hücre örnekleri kullanılan bir çalışmada hücreler, DBP (15,625; 31,25 ve 62,5 µg/ml) ve monobutilftalata (MBuP) (250, 500 ve 1000 µg/ml) 96 saat maruz bırakılmıştır. MBuP'nin toksik etkileri DBP'den daha yüksek dozlarda gözlenmiştir. Bu ftalat türevlerinin doza bağlı olarak artan şekilde sitotoksisiteye neden olduğu ve hücre farklılaşmasını inhibe ettiği belirlenmiştir. Vitamin E ve katalaz gibi antioksidan moleküller ile birlikte bu bileşiklere maruziyet sonucunda ise sitotoksik etkinin

azaldığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, çalışmada kullanılan maddelerin neden olduğu gelişimsel toksisitenin altında yatan mekanizmalardan birinin oksidatif stres olduğunu düşündürmüştür (181). Bir başka çalışmada olgunlaşmamış farelerin testislerinden alınan Leydig hücreleri kültürlenip, MEHP, MBP ve MBeP'ye artan konsantrasyonlarda (1, 3, 10, 30 ve 90 μ M) 48 saat maruz bırakılmıştır. Çalışmada yalnızca MEHP'in steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) ekspresyonlarını değiştirip, bazal androjenezini stimüle ederek Leydig hücre fonksiyonlarını etkilediği gözlenmiştir. Ayrıca MEHP, bir ROS türevi olan süperoksit oluşturarak mitokondriyal disfonksiyona neden olmuştur (182).

Chen ve ark. (2012) tarafından L02 (İnsan normal karaciğer hücresi) ve HepG2 hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda MEHP maruziyeti (6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 μ M) sonrası hücre canlılığı, oksidatif stres parametreleri ve apoptoz değerlendirilmiştir (24/48 saat). MEHP, 24 saatte L02 hücrelerinin canlılığını 50 μ M'da %21 ve 100 μ M uygulama grubunda ise %23 oranında azaltmıştır ($p<0,01$). Uygulamadan 48 saat sonra L02 hücrelerinin canlılığı, 50 μ M'da %30, 100 μ M tedavi grubunda ise %74 azalmıştır ($p<0,01$). HepG2 hücrelerinde 100 μ M MEHP ile hücre canlılığının 24 saatte %56, 48 saatte ise %68 azaldığı bulunmuştur. L02 hücrelerinde tüm doz gruplarının GSH seviyelerinde dalgalanmalar gözlenmiştir. 6,25 μ M ve 50 μ M MEHP maruziyeti, GSH düzeylerinde azalmaya neden olurken, diğer çalışma gruplarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bununla birlikte, HepG2 hücrelerinde MEHP maruziyetinden 24 ve 48 saat sonra, GSH seviyelerinde azalma meydana gelmiştir ($p<0,01$). L02 hücrelerinde MEHP maruziyetinden 24 saat sonra, 100 μ M çalışma grubu hariç tüm gruplarda kaspaz 3 aktivitesinde önemli artışlar gözlenirken, HepG2 hücrelerinde 25 μ M MEHP uygulamasında önemli bir artış meydana gelmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,01$). Elde edilen veriler MEHP'in hücre hatlarında mitokondriyal ve kaspaz 3'e bağlı yollar ile apoptozu indükleyebileceğini düşündürmektedir (76).

MEHP'in 6,25-100 μ M konsantrasyon aralığında HepG2 hücre hattına uygulandığı bir çalışmada, 100 μ M uygulamada hücre canlılığının (MTT yöntemi ile, 24/36 saat) önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir ($p<0,01$). SOD aktivitesinin, 24 saatte 100 μ M MEHP uygulanan grupta ve 36 saatte 50 μ M ve 100 μ M maruziyet gruplarında önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir ($p<0,05$, hepsi). Tüm doz gruplarında SOD

düzeylerinin ve GPx aktivitelerinin düştüğü gözlenmiştir ($p<0,01$). Ayrıca çalışmada DNA hasarı da değerlendirilmiştir. Her iki maruziyet süresinde 8-OHdG seviyeleri yüksek konsantrasyon gruplarında anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$ veya $p<0,01$). Apoptotik sürecin kaspaz 9 ve kaspaz 3 enzimatik aktiviteleri ile ilişkili olup olmadığını da değerlendirmek isteyen araştırmacılar, 36 saat maruziyet sonrası MEHP'in, 6.25 μM deney grubu hariç, diğer deney gruplarında kaspaz-9 ve -3 aktivitelerini önemli ölçüde indüklediği sonucuna varmışlardır ($p<0,05$ veya $p<0,01$). Özellikle, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda MEHP'in, sırasıyla kaspaz 3 aktivitesinde 1,65 kat ve 1,67 kat artış, kaspaz 9 aktivitesinde 1,76 kat ve 1,64 kat artışa neden olduğu görülmüştür (79).

Wang ve ark.'nın yaptığı bir diğer çalışmada, fare over antral folikülleri 72 veya 96 saat MEHP'e maruz bırakılmıştır. 72 saatte 10 $\mu\text{g/ml}$ MEHP uygulanan grupta SOD1 aktivitesi önemli ölçüde artmıştır. 96 saatte yine aynı doz uygulamasında MEHP SOD1 aktivitesini artırırken, 100 $\mu\text{g/ml}$ MEHP uygulamasının SOD1 aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (152). Over antral foliküllerinde yapılan bir başka çalışmada, 10 $\mu\text{g/ml}$ ve 100 $\mu\text{g/ml}$ MEHP uygulamasının 72 saatte GPX aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği; 96 saatte ise uygulanan tüm MEHP dozları GPX aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ve 10 $\mu\text{g/ml}$ MEHP uygulanan over antral foliküllerinde kontrole kıyasla CAT aktivitesinin önemli ölçüde arttığı saptanmıştır ($p<0,05$) (183). Aynı çalışma grubu, bir diğer çalışmada MEHP'in ana bileşik olan DEHP'e göre farklı mekanizmalarla oksidatif stres oluşturduğunu öne sürmektedir. MEHP'in DEHP'e kıyasla farklı antioksidan enzimleri etkilediği ve bununla birlikte MEHP ve DEHP uygulanan antral foliküllerde farklı düzeylerde ROS üretimi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, DEHP'in SOD1'in ekspresyon ve aktivitesini değiştirdiği, ancak GPX ve CAT'ı etkilemediği de gösterilmiştir. Mevcut veriler, MEHP'in GPx ekspresyonunu ve aktivitesini baskılayarak oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir (184).

Sertoli hücrelerinde yapılan bir çalışmada, 24 saat 200 μM MEHP'e maruz bırakılan hücrelerde oksidatif stres göstergelerinden biri olan glutatyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, koruyucu olarak N-asetil sistein (NAC) tek başına veya MEHP ile kombinasyon halinde uygulanmış ve kontrol grubuna kıyasla NAC uygulanan grupların glutatyon

düzeylerinde artış meydana geldiği görülmüştür. MEHP'in lipid peroksidasyon düzeylerine etkisinin de incelendiği çalışmada MEHP uygulanan hücrelerde lipoperoksit düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (185).

HepG2 hücre hattında DEHP maruziyetinin sebep olabileceği metabolik disfonksiyonun olası mekanizmalarının belirlenebilmesi için 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonlarında hücreler DEHP'e maruz bırakılmış, DEHP'in hücrelerde lipid birikimine sebep olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca, çalışma sonucunda gözlenen SOD aktivitesinde azalma ve MDA düzeylerindeki artış oksidatif stres varlığını düşündürmüştür. Takiben yapılan Western Blot analizinde peroksizom proliferatörleri aktive reseptörlerin ve sterol metabolizmasını düzenleyen PPAR α ve sterol düzenleyici elemana bağlanan transkripsiyon faktörü 1c (SREBP-1c) proteinlerinin ekspresyonunun da özellikle 50 ve 100 $\mu\text{mol/L}$ dozlarda olmak üzere, DEHP konsantrasyonuna doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir (186).

Pankreatik β -hücrelerinde oluşan DNA hasarında DEHP kaynaklı oksidatif stresin rolünü inceleyen bir başka çalışmada, 1 saat boyunca 100 μM , 200 μM ve 400 μM DEHP'e maruz bırakılan hücrelerde DEHP maruziyetinin doza bağlı olarak artan şekilde DNA migrasyonu ve oksidatif stresi arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca, lizozomal membran geçirgenliğinin ve mitokondriyal membran potansiyelinin azaldığı, ROS üretiminin arttığı ve buna bağlı olarak glutatyon düzeylerinde azalma ortaya çıktığı gözlenmiştir. Ayrıca, çalışmada SOD aktivitesinin anlamlı bir şekilde azaldığı ve MDA düzeylerinin de arttığı belirlenmiştir (187).

LnCAP ve Leydig MA-10 hücrelerinin kullanıldığı diğer çalışmalarda, DEHP ve ana metaboliti MEHP'in bu hücrelerde oluşturduğu oksidan/antioksidan statü değişiklikleri, intrasellüler ROS, genotoksisite, p53 ve p21 ekspresyon değişiklikleri değerlendirilmiştir. LnCAP hücrelerinde 24 saatlik maruziyette 10^{-3} -10 mM gibi geniş bir doz aralığı seçilmiş ve bu doz aralığında değişken bir canlılık (5 μM - 3 mM uygulamada canlılık %40-60) olduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada hücrelere MEHP uygulaması yapılmış ve 3 μM 'lık MEHP uygulamasında canlılık %60 bulunmuştur. DEHP'e maruz bırakılan hücrelerde ROS üretimi 30 dakikalık inkübasyondan sonra 1,5 kat ve 60 dakikalık inkübasyondan sonra 2 kat artmıştır ($p<0,05$). MEHP ile muamele edilen hücrelerde ise, ROS üretimini hızlı bir yükseliş göstermiş ve 30 dakikada 2,6 kat ve 60 dakikada 9,2 kat artmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar,

MEHP'in çok daha düşük dozlarda sitotoksik olduğunu ve DEHP toksisitesinden ana sorumlu bileşiğin MEHP olduğunu göstermiştir. Her iki bileşiğin de oksidatif stresi indüklediği, antioksidan enzim aktivitelerinde değişikliklere yol açtıkları, intrasellüler glutasyon düzeylerini etkiledikleri, genotoksik etki oluşturduğu, MEHP'in ise p53 ve p21 ekspresyonlarını indüklediği belirlenmiştir (188, 189).

Endokrin bozucu kimyasal maddelerin bir diğer hedef organı olan tiroid üzerindeki etkileri değerlendirmek üzere yürütülen bir çalışmada, 24 saat boyunca Nthy-ori 3-1 normal insan tiroid epitelyal hücre hattına 100, 200 ve 400 μ M dozlarda DEHP verilmiş, Nthy-ori 3-1 hücrelerinde DEHP'in doz-bağımlı bir şekilde hücre canlılığında artışa neden olduğu görülmüştür. Özellikle 400 μ M DEHP verilen grupta hücre canlılığının kontrole oranla tirositlerde % 46 arttığı saptanmıştır ($p<0,001$). Ek olarak hayvanlardan alınan tiroid dokusunda da tiroid folikül epitel hücrelerinde gözlenen artış ($p<0,001$) ve tiroid foliküler boşluklarındaki azalma ($p=0,015$), doku hiperaktivitesini düşündürmüştür. Bununla birlikte, DEHP maruziyetinin Nthy-ori 3-1 hücrelerinde, ROS üretimini kontrole oranla %39,2 arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,001$) (58).

Di-2-etil heksil ftalatın ER stres üzerindeki etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, Vero ve HaCat hücre hattına 4 veya 24 saat 1-100 μ M DEHP uygulanmış ve Western blotting ile ER stresin olası indüksiyonunu belirlemek için UPR'nin iki kritik markörü incelenmiştir: CHOP/Gadd153 ve GRP78/BiP. CHOP protein ekspresyonu Vero hücrelerinde 4 saatlik uygulama sonrası değişmezken, 24 saatlik uygulamada az miktarda düşüş göstermiştir. HaCat hücrelerinde ise 4. saatte yükselme (1,5 kat) gözlenirken, 24. saatte kontrol grubunun değerlerine geri döndüğü gözlenmiştir. GRP78'in Vero hücrelerinde ekspresyonu 4 saatte yükselme eğilimi gösterirken, 24 saatlik DEHP uygulamasında ise önemli derecede artış (2,1 kat) gözlenmiştir. Çalışmada anti-apoptotik Bcl-2 proteini, Vero hücre hattında 24 saat DEHP uygulaması ile artış (2,8 kat) göstermiştir. HaCat hücre hattında 4. saatte yükselme gözlenirken, 24. saatte protein ekspresyonunda azalma saptanmıştır (190). Sonuçlar, DEHP toksisitesinde ER stres indüksiyonunun rolünü düşündürür niteliktedir.

Başka bir çalışmada GRP78 protein düzeylerinin 25, 125 veya 625 μ M DEHP'e maruz kalan INS-1 hücrelerinde, doza bağımlı olarak up-regüle olduğu gösterilmiştir

($p<0,001$). Benzer şekilde, GRP94 proteininin seviyesi 25 veya 625 μM DEHP'e maruz kalan hücrelerde anlamlı olarak artmıştır ($p<0,001$). PERK ve substratı $\text{EIF2}\alpha$ 'nın fosforilasyon miktarlarının 25, 125 veya 625 μM DEHP'e maruz kaldıktan sonra önemli ölçüde arttığı saptanmıştır. Fosforilize PERK ve $\text{EIF2}\alpha$ 5 μM DEHP'e maruz kalan hücrelerde de hafifçe yükselmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. $\text{EIF2}\alpha$ fosforilasyonu ile indüklendiği bilinen ATF4 proteininin düzeylerinin 25, 125 veya 625 μM DEHP uygulanan hücrelerde anlamlı şekilde yükseldiği gözlenmiştir ($p<0,001$). Yüksek doz DEHP gruplarında, CHOP'un transkripsiyonu ve translasyonu da önemli ölçüde artmıştır ($p<0,001$). Çalışmada ayrıca, ER stresini tetiklediği düşünülen Ca^{2+} seviyeleri de incelenmiştir. DEHP maruziyeti ile INS-1 hücrelerinde doza bağımlı olarak ER Ca^{2+} düzeylerinin azaldığı, intraselüler Ca^{2+} düzeylerinde ise artış gözlemlendiği rapor edilmiştir ($p<0,01$ veya $p<0,001$) (191).

Fare spermatosit hücrelerinde (GC-2 hücreleri) DBP maruziyetinin (25, 50, 200 μM ; 24 saat) ER stres üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, doza bağımlı olarak ROS düzeylerinde artış görülmüştür. Çalışma DBP'nin oluşturduğu oksidatif stresin ER stresine neden olduğunu ve bunların bir sonucu olarak otofaji meydana getirebileceği fikrini savunmaktadır. ER stresinin otofajiye neden olduğunu kanıtlamak amacıyla ER stres inhibitörü olan 4-fenilbütirat (4-PBA) kullanılmış ve inhibitörün kullanıldığı grupta LC3-I'nin LC3-II'ye dönüşümünün (otofaji göstergesi) azaldığı kaydedilmiştir. Bu bulgular, DBP'nin ER stres kaynaklı otofajiye sebep olduğunun bir göstergesidir. ER stresin göstergelerinden biri olan ATF4 ve $\text{EIF2}\alpha$ protein ekspresyonunun artışının da DBP ile tedavi edilen GC-2 hücrelerinde ER stresine bağlı otofajiye neden olduğunu destekler niteliktedir (192). Aynı çalışma grubunun yaptığı başka bir çalışmada, ER stres aracılı CHOP aktivasyonunun yüksek DBP konsantrasyonunda (100 μM) ER strese bağlı apoptoza neden olduğu öne sürülmüştür. 100 μM DBP maruziyeti ile hücre içi Ca^{2+} seviyelerinde artış görülmüştür. Ayrıca, ER stres göstergelerinden GRP78, ATF6 ve $p\text{-EIF2}\alpha$ ekspresyon düzeylerinde doza bağlı artış görülmüştür. Bu bulgular ER stres varlığını ve ER stres aracılı apoptozu destekler niteliktedir (193).

İnsan endotelial hücreleri 200 μM MEHP'e maruz bırakılmış ve hücrel apoptozu değerlendirmek için TUNEL boyama yapılmıştır. 12 ve 24 saat maruziyetten sonra apoptotik hücre sayısında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca, apoptozun bir

göstergesi olan kaspaz 3 seviyeleri de kuvvetli bir şekilde artarken, 6 saatlik maruziyette kaspaz 3 seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır. Çalışmada, MEHP ile indüklenen apoptozun otofajiye bağlı olup olmadığının anlaşılması için hücreler, otofaji inhibitörü olan 3-metiladenine (3MA) 2 saat süreyle tabi tutulmuş ve apoptozda azalma meydana geldiği gösterilmiştir. Sonuçlar MEHP'in otofajiye bağlı olarak apoptozu indüklediği fikrini destekler niteliktedir (194).

Liu ve ark.'nın (2017) insan vasküler endotelial hücrelerinde yaptığı bir diğer çalışmada da, MEHP'in doz bağımlı olarak (0-200 μ M; 24 saat) ROS düzeylerini artırdığı ve otofajiye sebep olabileceği gösterilmiştir. MEHP grubunda otofaji varlığını kanıtlayan LC3-II ekspresyonunda artış görülürken, NAC verilen MEHP grubunda ROS düzeyleri azalmış ve LC3-II ekspresyonunda da düşüş görülmüştür (195).

Naarala ve Korpi fare makrofaj hücre hattında DEHP, BBP, DBP ve DIBP test maddeleri ile çalışmıştır. DEHP ve BBP'nin, çalışılan dozlardan herhangi birinde nekrotik veya apoptotik hücre ölümüne neden olmadığı; hem DIBP hem de DBP'nin en yüksek iki konsantrasyonda (100 μ M ve 1 mM) doz-bağımlı nekrotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (196).

2.5.3. Kombine Maruziyet ile İlgili Çalışmalar

Endokrin bozucu olduğu bilinen birden fazla kimyasal maddeye aynı anda maruz kalmak tekli maruziyete göre farklı sonuçlar doğurabilir. Günümüze kadar yapılmış olan çok sayıda çalışmanın bu kimyasal maddelere tekli maruziyetin sonuçlarını incelediği görülmektedir. Ancak, çok az sayıda çalışma birden fazla kimyasal madde maruziyetinin değerlendirilebileceği şekilde tasarlanmıştır. Özellikle kombine maruziyetin etkilerinin değerlendirildiği tek bir *in vitro* çalışma saptanabilmiştir.

Li ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, HepG2 hücreleri BPA, DBP ve Cd'a tekli veya ikili kombinasyonlar şeklinde 24 saat maruz bırakılmıştır. Bu çalışma sınırlı sayıdaki kombine maruziyet çalışmalarından biridir. BPA ve Cd maruziyetinde mortalite doz bağımlı olarak artmıştır ($p < 0,05$). DBP ise 10^{-6} - 10^{-4} mol/L doz aralığında benzer sonuç vermiştir. Kendi içlerinde sitotoksiteleri değerlendirildiğinde hücre canlılığı üzerine en etkili olan Cd'dur. Çalışmada tekli maruziyetlere kıyasla kombine maruziyetler daha sitotoksik bulunmuştur. BPA+DBP

($10^{-6}+10^{-6}$ mol/L) kombinasyonunda canlılık %54 civarında bulunmuştur ($p<0,05$). 6 saat sonunda tekli maruziyetlerde doz bağımlı olarak ROS düzeylerinde artış görülürken, kombine gruplarda düzeyler daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Çalışmada, Cd'un kullanıldığı çalışma grupları başta olmak üzere test maddelerinin uygulandığı tüm gruplarda SOD düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$) Cd grubunda MDA düzeyleri kontrol grubuna kıyasla %221 oranında yüksek bulunurken, ikili maruziyet gruplarında MDA düzeyleri gerek kontrol gerekse tekli maruziyet gruplarına oranla daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (14).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

2-Merkaptoetanol	Merck Millipore
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma – Aldrich
4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15- well, 15 µl	BIO-RAD
8-OHdG Tayin kiti (BIOXYTECH® 8 – OHdG – EIA™)	Oxis International, Inc.
Anti-beta Actin Antibody – Loading Control	Abcam
Bisfenol A	Sigma - Aldrich
CHOP Mause mAb	Cell Signaling Technology
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Duchefa Biochemical
Donkey Anti-Goat IgG (HRP)	Abcam
DNA İzolasyon kiti (Quick-DNA™ Miniprep Kit)	Zymo Research
Dulbecco' Modified Eagle's Medium (DMEM Low Glucose)	Biowest
Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (D-PBS)	Biowest
Florometrik Hücre içi ROS kiti	Sigma - Aldrich
Fötal Sığır Serum (FBS)	Biowest
Glisin (Elektforez için, ≥%99)	Sigma – Aldrich
Glutatyon kiti	Cayman Chemical
Glutatyon Peroksidaz kiti	Cayman Chemical
GRP78 Antibody (A-10) Mause Monoclonal IgM	Santa Cruz Biotechnology
Halt™ Proteaz ve Fosfataz İnhibitör Kokteyli	Thermo Fisher Scientific
Hücre Liziz Reaktif (CellLytic MT)	Sigma – Aldrich

Kaspaz 3 Deney kiti	Mybiosource
Kaspaz 8 Deney kiti	Mybiosource
Katalaz kiti	Cayman Chemical
Laemmlı Örnek Tamponu (2X)	BIO-RAD
Mause Anti-Rabbit IgG (HRP)	Santa Cruz Biotechnology
Mono-2-Etilhekzil Ftalat (100 UG/ML)	Cambridge Isotope Laboratories
NE-PER™ (Nükleer ve sitoplazmik ekstraksiyon reaktifi)	Thermo Fisher Scientific
Penisilin-Streptomisin	Biological Industries
PERK Rabbit mAb	Cell Signaling Technology
Pierce™ ECL Plus Western Blot Substratı	Thermo Fisher Scientific
Precision Plus Protein™ İki Renkli Standart	BIO-RAD
Proteaz İnhibitör Kokteyli	Sigma – Aldrich
Protein Karbonil kiti	Cayman Chemical
Protein Miktar Tayini kiti (BCA kiti)	Sigma – Aldrich
Rabbit Anti-Mause IgG mAb (HRP Konjugat)	Cell Signaling Technology
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma – Aldrich
Süperoksit Dismutaz kiti	Cayman Chemical
TBARS Deney kiti	Cayman Chemical
Tripsin-EDTA	Sigma – Aldrich
Tris	Merck
Triton X-100	Merck
TUNEL Deney kiti	Roche
Tunikamisin	Abcam
Tween 20	Merck Millipore

XBP-1 Rabbit mAb

Cell Signaling Technology

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

96 kuyucuklu plak	Greiner bio-one, Cellstar
Biyogüvenlik kabini	Holten, Lamin Air Model 1,2
Buz kırma makinası	Scotsman AF100
Buzdolabı	Arçelik, 2 kapılı
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik, Tek kapılı
Derin dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Distile su cihazı	MES mp Minipure, mes08/Thermo Scientific,
Dijital Kamera	Leica DC490
Elektroforez Sistemi	Invitrogen
Elektron Mikroskop	JEOL-JEM 1400
Güç Kaynağı	Invitrogen
Hassas Terazı	Mettler Toledo, XS105
Hücre kültürü uyumlu flask (25/75 cm ²), pipet (1-25 ml), falcon tüpü (15, 50 ml), eppendorf tüp	Corning, Labosel Directive 98/79/CE
Immun-Blot® PVDF Membran	BIO-RAD
Işık ve Faz Kontrast Mikroskobu	Leica, DFC280
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments, Funvtion Line
Kalın blot kağıdı	BIO-RAD
Lamel	Isolab
Mikro Santrifüj	Heraeus, Hettich, Mikro22
Mikropipet (10 – 100 µl, 100 – 1000 µl, 1 – 5 ml)	Eppendorf, Finnpiette, Labsystems

Neubauer Lamı (Hücre sayım lamı)	Marienfeld
pHmetre	Isolab
Pipet ucu (0,5 – 10, 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl'lik)	Eppendorf, Top-Line
Santrifüj	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
Spektrofotometre / Spektrofluorometre	Molecular Devices, SpektraMax M2
Su Banyosu	Memmert, Edelstaht Rostfrei
Terazi	XS105 Dual Range
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX-3000L

3.3. Kullanılan Hücre Hattı

Çalışmada insan hepatoselüler karsinoma (HepG2) hücre hattı (ATCC®HB-8065™) kullanılmıştır. Bu hücre hattı 15 yaşında erkek bir adölesanın hepatoselüler karsinoma dokusundan elde edilen adherent epitel hücrelerden oluşmaktadır.

3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. BPA ve MEHP Çözeltilerinin Hazırlanması

BPA: 29 mg Bisfenol A tartılmış, 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüştür. Besiyeri içinde, nihai DMSO oranı %0,1 olacak şekilde 343 µM BPA çözeltisi hazırlanmıştır.

MEHP: Hazır olarak temin edilen 360 µM'lık MEHP çözeltisinden alınarak 4,5 µM olacak şekilde besiyeri ile seyreltilmiştir.

3.4.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Hücre hatlarının çoğaltılabilmesi için kullanılan besiyeri, Dulbecco's Modified Eagle Medyum (DMEM, 500 ml) içerisine %10 (50 ml) fetal sıgır serumu (FBS), %1 (5,5 ml) penisilin streptomisin eklenerek hazırlanmış, +4°C'de saklanmıştır.

3.4.3. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Dimetil Sülfoksit:

Dimetil sülfoksit (C_2H_6OS) yoğunluğu 1,1 g/ml'dir. Oda sıcaklığında saklanabilir.

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

15 mg 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür tartılmış, 3 ml D-PBS içerisinde çözüldükten sonra 27 ml DMEM eklenerek 0,5 mg/ml konsantrasyondaki çözelti elde edilmiştir. Hazırlanan MTT çözeltisi ışıktan korunmalıdır ve 24 saat dayanıklıdır.

3.4.4. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

ROS Tayin Reaktifi:

Kit 1 ml ROS tayin reaktifi içermektedir. -20 ° C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

Dimetil Sülfoksit:

Kit 0,1 ml DMSO içermektedir. Tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır.

Deney Tamponu:

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

Master Reaksiyon Karışımı:

20 µl 500X ROS tayin reaktifi ve 10 µl deney tamponu içeren karışımdır. -20°C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

3.4.5. Glutatyon Peroksidaz 1 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu (10X):

Kit 3 ml deney tamponu içermektedir ve 27 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. 1X çözelti, 5 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) tamponudur. 4°C’de 6 ay dayanıklıdır.

Örnek Tamponu (10X):

Örnek tamponundan 2 ml alınır ve 18 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. Çözelti, GPx kontrol çözeltisini ve örnekleri seyreltmek için kullanılmıştır. 1X çözelti, 5 mM EDTA ve 1 mg/ml BSA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) tamponudur. 4°C’de 6 ay dayanıklıdır.

Glutatyon Peroksidaz (Kontrol):

Kit 50 µl sığır eritrosit GPx’i içermektedir. Kullanmadan önce, enzimin 10 µl’si başka bir vialle aktarılaraq 490 µl 1X örnek tamponu ile seyreltilir. Seyreltilmiş enzim 4 saat içerisinde kullanılmalıdır. -20°C’de saklanmalıdır.

Ko – Substrat Karışımı:

Kit liyofilize toz halinde NADPH, GSH ve GR içermektedir. Her bir vial ihtiyacı karşılayacak şekilde 6 ml distile suda çözülür. Deney yapılırken oluşturulan reaktif 25°C’de bekletilir. 4°C’de 2 gün dayanıklıdır.

Kümen Hidroperoksit:

Kit 2.5 ml kümen hidroperoksit içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. -20°C’de saklanmalıdır.

3.4.6. Süperoksit Dismutaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu (10X):

3 ml deney tamponu 27 ml distile su ile seyreltilir. Elde edilen 1X deney tamponu radikal detektörü seyreltmek için kullanılır. 1X çözelti, 0,1 mM dietilen

triamin pentaasetik asit (DTPA) ve 0,1 mM hipoksantin içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponudur. 4°C’de 2 ay dayanıklıdır.

Örnek Tamponu (10X):

50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponudur. Örnek tamponundan 2 ml alınır ve 18 ml distile su ile seyreltilir. Elde edilen 1X örnek tamponu SOD standartlarını hazırlamak, ksantin oksidazı ve SOD örneklerini seyreltmek için kullanılır. 4°C’de 6 ay dayanıklıdır.

Radikal Detektör:

Kit, 250 µl tetrazolyum tuzu çözeltisi içermektedir. Kullanmadan önce, eldeki çözeltinin 50 µl’si başka bir vial e aktarılır ve 19,95 ml 1X deney tamponu ile seyreltilir. 2 saat içerisinde, ışıktan korunarak kullanılmalıdır.

SOD Stok ve Standart Çözeltileri:

Vial, 100 µl sığır eritrosit SOD stok çözeltisi (Cu/Zn-SOD şeklinde) içermektedir. SOD standart çözeltilerini hazırlamak için kullanılır. 20 µl SOD stok çözeltisi 1,98 ml 1X örnek tamponu ile seyreltilir. Seyreltilmiş SOD stok çözeltisinden sırasıyla 0 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 120 µl, 160 µl ve 200 µl alınarak, 1000 µl, 980 µl, 960 µl, 920 µl, 880 µl, 840 µl ve 800 µl örnek tamponu ile seyreltilir ve 0; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03, 0,04 ve 0,05 U/ml SOD aktivitesine sahip bir seri standart çözelti hazırlanır. Standart çözeltiler taze olarak hazırlanmalıdır.

Ksantin Oksidaz:

Kit, 150 µl ksantin oksidaz içermektedir. Kullanmadan önce 50 µl’si başka bir vial e aktarılarak 1X örnek tamponu (1,95 ml) ile seyreltilir. Seyreltilmiş enzim bir saat dayanıklıdır. Buzda bekletilerek kullanılır.

3.4.7. Katalaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu (10X):

2 ml CAT deney tamponu 18 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. 1X çözelti, 100 mM potasyum fosfat (pH 7,0) tamponudur. 4°C’de 2 ay dayanıklıdır.

Örnek Tamponu (10X):

5 ml CAT örnek tamponu 45 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. 1X çözelti, %0,1 sığır serum albümin ve 1 mM EDTA içeren 25 mM potasyum fosfat (pH 7,5) tamponudur. Elde edilen örnek tamponu analizden önce formaldehit standartlarını ve örnekleri seyreltmek için kullanılır. 4°C’de 2 ay dayanıklıdır.

Formaldehit Stok ve Standart Çözeltileri:

Kit, 4,25M formaldehit stok çözeltisi içermektedir. Formaldehit stok çözeltisinin 10 µl’si 9,99 ml seyreltilmiş örnek tamponu ile seyreltilir ve 4,25 mM formaldehit ara stok çözeltisi elde edilir. Ara stok çözeltisinden alınan 0 µl, 10 µl, 30 µl, 60 µl, 90 µl, 120 µl ve 150 µl formaldehit, 1X örnek tamponuyla (sırasıyla 1000 µl, 990 µl, 970 µl, 940 µl, 910 µl, 880 µl, 850 µl alınarak) seyreltilir ve 0, 5, 15, 30, 45, 60 ve 75 µM konsantrasyonlarında standart çözeltileri hazırlanır.

Potasyum Hidroksit:

Kit, 4 ml 10M potasyum hidroksit (KOH) içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 4°C’de 3 ay dayanıklıdır.

Hidrojen Peroksit:

Kit, 8,82 M H₂O₂ çözeltisi içermektedir. Bu çözeltinin 40 µl’si 9,96 ml distile su ile seyreltilerek 35,28 mM çözelti elde edilmiştir. Çözelti 2 saat dayanıklıdır.

Purpald (Kromojen):

0,5 M hidroklorik asit (HCl) içerisinde hazırlanmış 4 ml “4-amino-3-hidrazino-5-merkapt-1,2,4-triazol” (purpald) içermektedir. CAT deney kiti içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir.

Potasyum Periyodat:

0,5 M potasyum hidroksit içerisinde 1,5 ml potasyum periyodat içermektedir. CAT deney kiti içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

3.4.8. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

QuantiPro Buffer QA:

Reaktif QA 0,2 M NaOH içerisinde sodyum tartarat, sodyum karbonat ve sodyum bikarbonattan oluşan 250 ml’lik bir çözeltidir (pH 11,25). QuantiPro BCA Kiti içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir.

QuantiPro BCA QB:

Reaktif QB, 250 ml %4’lük bişinkoninik asit (BCA) çözeltisidir (pH 8,5). Kitin içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir.

Bakır (II) Sülfat:

12 ml %4’lük bakır(II)sülfat pentahidrat çözelti halinde kullanıma hazır halde temin edilmiştir.

Protein Stok ve Standart Çözeltileri:

Koruyucu olarak %0,05 sodyum azid içeren, 0,15 M NaCl’de 1,0 mg/ml sığır serum albümininden oluşan 1,0 ml’lik çözelti “stok protein çözeltisi” olarak kullanılır. Stok protein çözeltisi ve distile su kullanılarak 0; 0,5; 5; 10; 20; 30; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında protein standart çözeltileri hazırlanır.

3.4.9. Glutasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

2-(N-morfolin)etansülfonik Asit Tamponu (2X):

Tampon, 0,4 M 2-(N-morfolin) etansülfonik asit (MES), 2 mM EDTA ve 0,1 M fosfat içermektedir (pH 6,0). 60 ml MES tamponu 60 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir.

Okside Glutasyon Stok ve Standart Çözeltileri:

Kit, MES tamponu içerisinde 2 ml okside glutasyon (GSSG, 25 μ M) içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 0 - 4°C'de saklandığında 1 yıl dayanıklıdır. GSSG stok çözeltisi (sırasıyla 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 μ l) ve 1X MES tampon çözeltisi (sırasıyla 500, 495, 490, 480, 460, 420, 380, 340 μ l) kullanılarak 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 μ M konsantrasyonlarında GSSG standartları hazırlanmıştır.

Ko-Faktör Karışımı:

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

Enzim Karışımı:

Kit içerisinde bulunan tampon çözelti (0,2 ml), GR ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz içermektedir. 1X MES tampon çözeltisinden 2 ml eklenerek seyreltilir. 0 - 4°C'de saklandığında 2 hafta dayanıklıdır.

5,5'-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit:

Kit, liyofilize toz halinde 5,5'-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit (DTNB, Ellman reaktifi) içermektedir. Kullanmadan önce vial 0,5 ml distile suda çözülür. Reaktif çözeltisi hazırlandıktan itibaren 10 dakika içerisinde kullanılmalıdır.

3.4.10. Lipit Peroksidasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Tiyobarbitürik Asit:

Kit içerisinde 2 g tiyobarbitürik asit (TBA) bulunmaktadır. Renk reaktifini hazırlamak için kullanılır.

Asetik Asit:

Kit, 20 ml konsantre asetik asit içermektedir. 40 ml asetik asit 160 ml distile su ile seyreltilir ve renk reaktifi hazırlamak için kullanılır. Oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

Sodyum Hidroksit (10X):

20 ml NaOH çözeltisi 180 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir ve renk reaktifi hazırlamak için kullanılır. Oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

Malondialdehit Stok ve Standart Çözeltileri:

Kit, 500 μ M MDA stok çözeltisi içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 250 μ l MDA stok çözeltisi 750 μ l distile su ile seyreltilmiş ve 125 μ M ara stok çözeltisi elde edilmiştir. Ara stok çözeltisi ve distile su kullanılarak 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50 ve 75 μ M konsantrasyonlarında MDA standartları hazırlanmıştır.

Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi:

Kit, tedarik edildiği gibi kullanıma hazır olan sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi içermektedir.

Renk Reaktifi:

530 mg TBA'nın, seyreltilmiş asetik asit çözeltisi (50 ml) ve seyreltilmiş sodyum hidroksit çözeltisi (50 ml) içinde çözülmesi ile hazırlanır. Çözelti 24 saat dayanıklıdır.

3.4.11. Protein Karbonil Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Hidroklorik Asit:

Kit ile 12 M HCl temin edilir. 40 ml distile suya 2,5 M HCl elde etmek için 1 ml HCl çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

2,4-dinitrofenilhidrazin:

2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) 10 ml HCl (2,5 M) içerisinde çözölmüştür. 4°C’de saklandığında 1 hafta dayanıklıdır. Karanlıkta saklanmalıdır.

Trikloroasetik Çözeltisi (%20):

Kit içerisinde 1 g/ml trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi içermektedir. 12 ml TCA çözeltisi 48 ml distile su ile seyreltilmiştir (%20). %20’lik TCA çözeltisinin 20 ml’sine 40 ml distile su eklenerek %10’luk TCA çözeltisi elde edilir. Oda sıcaklığında 1 ay dayanıklıdır.

Guanidin Hidroklorür:

Kitin içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilir.

Etanol:

Kitin içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilir (30 ml).

Etil Asetat:

Kitin içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilir (30 ml).

Etanol - Etil Asetat:

30 ml etil alkol 30 ml etanol ile karıştırılır, 1:1 oranında etanol:etil asetat çözeltisi elde edilir.

3.4.12. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Genomik Liziz Tamponu:

50 ml çözelti kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanabilir.

DNA Ön Yıkama Tamponu:

15 ml çözelti kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanabilir.

g-DNA Yıkama Tamponu:

50 ml çözelti kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanabilir.

DNA Elüsyon Tamponu:

10 ml çözelti kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanabilir.

3.4.13. DNA Baz Hasarı Tespitinde Kullanılan Çözeltiler

Primer Antikor Seyreltme Tamponu:

6 ml fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) içermektedir.

Primer Antikor Çözeltisi:

Kit içinde bulunan primer antikor, primer antikor seyreltme tamponu ile çözülerek taze kullanılmıştır.

Sekonder Antikor Seyreltme Tamponu:

12 ml PBS içermektedir.

Sekonder Antikor Çözeltisi:

Kit içinde bulunan HRP-konjuge sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme tamponu ile çözülerek taze kullanılmıştır.

Kromojen:

3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (250 µl) içermektedir.

Kromojen Seyreltme Tamponu:

Hidrojen peroksit/sitrat – PBS (12 ml) içermektedir.

Yıkama Tamponu (5X):

Konsantre PBS (26 ml) içermektedir. Distile su ile 1'e 5 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

Durdurma Çözeltisi:

1 M fosforik asit çözeltisi (12 ml) içermektedir.

Standart Çözeltileri:

Kit içerisinde her biri 1 ml olmak üzere 0,5 ng/ml, 2 ng/ml, 8 ng/ml, 20 ng/ml, 80 ng/ml, 200 ng/ml 8-OHdG standart çözeltileri bulunmaktadır. Reaktifler kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. Reaktifler karanlık ortamda ve 2-8°C'de saklanmalıdır.

3.4.14. Western Blotting Analizinde Kullanılan Çözeltiler**Yürütme Tamponu:**

25 mM Tris, 190 mM glisin ve %0,1 SDS içermektedir (pH 8,3). 500 mM'lık Tris çözeltisinden 100 ml, %10'luk SDS çözeltisinden 20 ml alınmıştır ve 28,5 g glisin eklenmiştir. Çözelti hacmi 2 L'ye distile su ile tamamlanmıştır. pH 8,3'e ayarlanmıştır.

Transfer Tamponu:

25 mM Tris, 190 mM glisin, %20 metanol ve %0,1 SDS içermektedir (pH 8,3). 500 mM'lık Tris çözeltisinden 100 ml, %10'luk SDS çözeltisinden 20 ml alınmıştır, 400 ml metanol ve 28,5 g glisin eklenmiştir. Çözelti hacmi 2 L'ye distile su ile tamamlanmıştır. pH 8,3'e ayarlanmıştır.

Tween 20 İçeren Tris- Salin Tamponu (Tris-Buffered Saline with Tween 20, TBST):

20 mM Tris, 150 mM NaCl, %20 metanol ve %0,1 Tween 20 içermektedir (pH 7,5). 500 mM'lık Tris çözeltisinden 80 ml, %10'luk Tween 20 çözeltisinden 20 ml alınmıştır ve 17,53 g NaCl eklenmiştir. Çözelti hacmi 2 L'ye distile su ile tamamlanmıştır. pH 7,5'e ayarlanmıştır.

Soyulma Çözeltisi (Stripping Buffer):

0,5 M Tris, %10 SDS, 2-merkapto etanol ve ultrasaf su içermektedir (pH 6,8). 500 mM'lık Tris çözeltisinden 12,5 ml; %10'luk SDS çözeltisinden 20 ml; 0,8 ml 2-merkapto etanol alınmıştır ve 67,5 ml ultrasaf su eklenerek çözelti hazırlanmıştır.

NE-PER™ (Nükleer ve Sitoplazmik Ekstraksiyon Reaktifi):

Sitoplazmik Ekstraksiyon Reaktifi I (CER I) : 10 ml çözelti kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. 4°C'de saklanmalıdır.

Sitoplazmik Ekstraksiyon Reaktifi II (CER II): 550 µl çözelti kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. 4°C'de saklanmalıdır.

Nükleer Ekstraksiyon Reaktifi (NER): 5 ml çözelti kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. 4°C'de saklanmalıdır.

Elde edilen nükleer ve sitoplazmik hücre ekstraktları protein tayini yapıldıktan sonra -80°C'de analize kadar muhafaza edilmiştir.

Laemmlı Örnek Tamponu (2X):

65,8 mM'lık Tris-HCl (pH 6,8) tamponu, %26,3 (a/h) oranında gliserol, %2,1 oranında SDS ve %0,01 bromofenol mavi içermektedir. Tampon oda sıcaklığında saklanır.

%4-20'lik mini protean jele örnek yüklemesi yapılmadan önce tampon örneklere eklenerek 90-95°C'de 5 dakika boyunca ısıtma ile proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır. Örnek tamponu 2-merkaptoetanol ile 17:1 oranında karıştırılmıştır ve örnekler bu çözelti ile 1:1 oranda seyreltilmiştir.

Pierce™ ECL Plus Western Blot Substratı:

Substrat A (100 ml) ve Substrat B (2,5 ml) içermektedir. Substrat çalışma çözeltisi membranın her cm²'si için 0,125 ml olacak şekilde Substrat A ve Substrat B çözeltilerinden 40:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. Çözelti ışıktan korunmalıdır. Hazırlandıktan sonra 1 saat içerisinde kullanılmalıdır.

3.4.15. Işık Mikroskobu İncelemelerinde Kullanılan Çözeltiler

0,1 M Fosfat Tamponu:

20 ml disodyum hidrojen fosfat çözeltisi ve 80 ml sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi karıştırılır ve bu karışıma 100 ml distile su eklenir. Çözeltinin pH'sı 7,42'ye ayarlanır. 4°C'de 4 ay dayanıklıdır.

Dörtlü Plastik Karışım Çözeltisi:

20 ml araldahit; 22 ml DDSA; 1,1 ml BDMA, 0,5 ml DBP önceden 60°C'ye ısıtılmış beher içerisinde sırayla karıştırılır.

Metilen Mavisi (%1, a/h):

1 g metilen mavisi ve 1 g disodyum tetrahidroborat tartılır, 100 ml deiyonize suda çözülür.

Azur II Çözeltisi (%1, a/h):

1 g Azur II 100 ml deiyonize suda çözülür.

%1'lik Metilen Mavisi – Azur II Çözeltisi:

50 ml metilen mavisi çözeltisi ve 50 ml Azur II çözeltisi karıştırılır.

%2,5'lik Gluteraldehit Çözeltisi:

%25'lik gluteraldehitten 10 ml alınır, distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

%2'lik Agar:

12,5 distile su içine 0,25 gr agar konulmuş, agar karışımı bir erlenin içine alınmıştır. İçinde su bulunan beherin içine erlen yerleştirmiş ve kısık ateşte ısıtılmıştır. Şeffaflaşınca kadar kaynatılıp, etüve konulmuştur.

3.4.16. TUNEL Tayininde Kullanılan Çözeltiler**Enzim Çözeltisi (10X):**

Terminal deoksinükleotidil transferaz buzağı timusundan elde edilen çözelti -20°C'de muhafaza edilir.

Label Çözeltisi (1X):

Reaksiyon tamponunda hazırlanmış nüleotit karışımıdır. Çözelti -20°C'de muhafaza edilir.

TUNEL Reaksiyon Çözeltisi:

Enzim çözeltisi (50 µl) ve Label çözeltisi (450 µl) karıştırılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kullanılmadan hemen önce hazırlanmalıdır. Buz içerisinde tutulmalıdır.

3.4.17. Kaspaz 3 Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Tamponu:

Kit içinde hazır olarak temin edilen konsantre yıkama tamponu (30 ml) 1'e 25 oranında deiyonize/distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

Standart Çözeltileri:

Kit içinde hazır olarak bulunan 20 ng/ml stok çözeltisi, standart dilüsyon çözeltisi kullanılarak 0; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5 ve 10 ng/ml konsantrasyonlarında standart çözeltileri hazırlanmıştır.

Primer Antikor Dilüsyon Çözeltisi:

Kit içinde hazır olarak temin edilir. +4°C'de muhafaza edilir.

Primer Antikor Çözeltisi:

Biotin-işaretli antikor 1'e 100 oranında primer antikor dilüsyon çözeltisi ile seyreltilerek kullanılmıştır.

Sekonder Antikor Dilüsyon Çözeltisi:

Kit içinde hazır olarak temin edilir. +4°C'de muhafaza edilir.

Sekonder Antikor Çözeltisi:

HRP-Streptavidin konjuge antikor 1'e 100 oranında sekonder antikor dilüsyon çözeltisi ile seyreltilerek kullanılmıştır.

3.4.18. Kaspaz 8 Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Tamponu:

Kit içinde hazır olarak temin edilen konsantre yıkama tamponu (30 ml) 1'e 25 oranında deiyonize/distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

Standart Çözeltileri:

Kit içinde hazır olarak bulunan 10 ng/ml stok çözeltisi, standart dilüsyon çözeltisi kullanılarak 0; 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2.5 ve 5 ng/ml konsantrasyonlarında standart çözeltileri hazırlanmıştır.

Primer Antikor Dilüsyon Çözeltisi:

Kit içinde hazır olarak temin edilir. +4°C’de muhafaza edilir.

Primer Antikor Çözeltisi:

Biotin-işaretli antikor 1’e 100 oranında primer antikor dilüsyon çözeltisi ile seyreltilerek kullanılmıştır.

Sekonder Antikor Dilüsyon Çözeltisi:

Kit içinde hazır olarak temin edilir. +4°C’de muhafaza edilir.

Sekonder Antikor Çözeltisi:

HRP-Streptavidin konjuge antikor 1’e 100 oranında sekonder antikor dilüsyon çözeltisi ile seyreltilerek kullanılmıştır.

3.5. Deneysel İşlemler ve Yöntemler

3.5.1. Hücre Kültürü

Çalışmada HepG2 hattı kullanılmıştır. HepG2 hücre hattı adherent ve epitel kökenli hücre hattıdır. Hücre ekimi DMEM (%10 FBS ve %1 penisilin streptomisin içeren) içerisinde 75 cm²’lik hücre kültür plaklarına yapılmış ve 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Kültür ortamındaki hücrelerin inkübatör içerisinde uygun aralıklarla besiyeri değiştirilmiş, uygun zamanlarda pasajlanarak HepG2 hücreleri çoğaltılmıştır.

3.5.2. Çalışma Grupları

Tez çalışması kapsamında, HepG2 hücre hattında aşağıdaki çalışma grupları oluşturulmuştur (**Tablo 3.1.**).

Tablo 3.1. Çalışma Grupları.

Test Maddesi	Doz	İnkübasyon Süresi
Kontrol	Herhangi bir maddeye maruz bırakılmamış hücreler	-
BPA	343 μM^*	24 saat
MEHP	4,5 μM^*	24 saat
MEHP + BPA	10+400 μM^*	24 saat

*MTT deneyi ile tayin edilen BPA, MEHP ve BPA+ MEHP grubuna ait IC_{30} dozları kullanılmıştır. IC_{30} , hücre canlılığında %30 inhibisyona neden olan konsantrasyonu ifade etmektedir.

3.5.3. Uygun Hücre Sayılarının Belirlenmesi

1. Flaskta tutunmuş HepG2 hücreleri üzerinden besiyeri çekilerek ölü hücreler uzaklaştırılmıştır.
2. Flaska tutunmuş hücreler 4 ml D-PBS çözeltisi ile ikişer kez yıkanmıştır.
3. Daha sonra, flaska 3 ml tripsin-EDTA eklenmiş, hücreler 3 – 5 dk inkübatörde tutulmuştur.
4. Işık mikroskopunda hücrelerin tutundukları yerden ayrılarak süspande oldukları kontrol edilmiştir.
5. Flask üzerine 3 ml besiyeri eklenerek tripsin-EDTA'nın etkisi ortadan kaldırılmıştır.
6. Steril Falkon tüpe 4 ml besiyeri eklenmiştir.
7. Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler steril falkon tüpe aktarılmıştır, besi yeri 10 ml'ye tamamlanmıştır.
8. Hücre süspansiyonu 1200 devir/dak hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası tüpteki süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti 6 ml besiyeri ile süspande edilmiştir.

9. Hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak steril bir ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 50 µl tripan mavisi çözeltisi (%0,4) eklenerek hücreler süspande edilmiştir.
10. Hücre süspansiyonu Neubauer hücre sayım lamı üzerinde ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Neubauer hücre sayım lamının üst ve alt kısımlarında bulunan dört karenin kenar çizgileri üzerindeki hücreler hariç, karelerdeki hücreler soldan sağa ilerleyerek sayılmıştır. Sekiz ayrı kareden elde edilen hücre sayılarının ortalamaları alınmıştır ve ml'deki canlı hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam hücre/ml} = \text{Sayılan toplam hücre sayısı} \times (\text{dilüsyon faktörü} / *8) \times 10.000 \text{ hücre/ml}$$

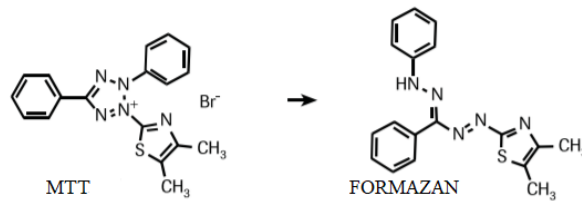
*8: hücre sayım lamında sayılan kareler.
11. Canlı hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra hücre süspansiyonu, her bir kuyucukta 10.000 hücre/100 µl olacak şekilde seyreltilmiş, 96 kuyucuklu plağa hücre ekimi yapılmıştır.
12. 24 saat inkübasyon süresince hücrelerin kuyucuklara tutunması ve çoğalması sağlanmıştır.

3.5.4. HepG2 Hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür kullanılarak gerçekleştirilen, radyoaktif olmayan, kolorimetrik deney sistemi, radyoaktif izotoplar kullanmadan hücre büyümesi ve canlılığının spektrofotometrik olarak tayini için tasarlanmıştır. Büyüme faktörleri, sitokinler ve besin öğeleri yanıt olarak hücre proliferasyonunun ölçümü için kullanılmaktadır. Aynı zamanda MTT, hücre aktivasyonu ve sitotoksisitenin ölçümü için de kullanılmaktadır.

Yöntemin esası, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile sarı renkteki tetrazolyum tuzunu (MTT) kullanarak mor renge dönüştürmesi ve oluşan renk şiddetinin spektrofotometre ile 570 nm'de ölçülmesine dayanır (Şekil 3.1.). Hücresel indirgenme, piridin nükleotid kofaktörleri NADH ve NADPH ile gerçekleşmektedir.



Şekil 3.1. Canlı hücreler tarafından MTT'nin formazan tuza dönüşüm metabolizması.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Steril şartlarda besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler DMEM besiyeri (%10 FBS ve %1 penisilin streptomisin içeren) içinde 343 μ M; 4,5 μ M , 400+10 μ M konsantrasyonlarda BPA, MEHP ve BPA+ MEHP ile 24 saat inkübe edilmiştir.
2. Kontrol olarak, herhangi bir uygulama yapılmamış HepG2 hücre hattı kullanılmıştır.
3. İnkübasyon süresi sonunda uygulama çözeltileri atılarak her bir kuyucuğa hazırlanan MTT çözeltisinden (0,5 mg/ml) 100 μ l eklenmiş ve 3 saat inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon süresi sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin oluşturduğu formazan kristallerini çözmek için her bir kuyucuğa 150 μ l DMSO eklenmiş ve çalkalayıcıda 5 – 10 dk süre ile çalkalanmıştır.
5. Kuyucukların absorbans değerleri 570 nm’de ölçülmüştür.
6. MTT çözeltisinin ışık ile bozunmasını önlemek için deney karanlık ortamda yapılmıştır.
7. Kontrol olarak kullanılan hücrelerin absorbans değeri %100 olarak kabul edilmiştir. IC₃₀ ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.
8. Çalışma üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama alınarak hesaplanmıştır.

Hücre Canlılığının Hesaplanması:

Kontrol hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilerek, diğer hücrelerin canlılığı kontrole kıyasla % olarak hesap edilmiştir.

3.5.5. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Yöntem esası, floresan olmayan bir prob olan 5-(ve 6-) klorometil-2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (CM-H2DCFDA)'ın canlı hücreler tarafından yeşil-floresans veren 2',7'-diklorofloresein (CM-DCF)'ne dönüştürülmesi ve oluşan floresans şiddetinin ölçülmesi ($\lambda_{ex}=640$ nm, $\lambda_{em}=675$ nm) esasına dayanmaktadır. Florometrik Hücre içi ROS Kiti, 1 saatlik inkübasyondan sonra canlı hücrelerdeki hücre içi ROS (özellikle süperoksit ve hidroksil radikalleri) düzeylerini tespit etmek için hassas, tek aşamalı bir florometrik analiz sağlamaktadır. ROS, sitoplazma içinde bulunan florojenik bir sensörle reaksiyona girerek mevcut ROS miktarıyla orantılı florometrik bir ürün oluşturur.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Bütün reaktifler deneye başlamadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.
2. 500X ROS tayin reaktif çözeltisi kit içinde yer alan ROS tayin reaktifi ile 40 μ l DMSO karıştırılarak hazırlanmıştır.
3. 96 kuyucuklu siyah hücre kültür plağına HepG2 hücre örnekleri 90 μ l DMEM içinde olacak şekilde eklenmiştir. IC₃₀ konsantrasyonlarının 10 katı olacak şekilde BPA, MEHP ve BPA+ MEHP test maddeleri hazırlanmış ve her kuyucuğa 10 μ l eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına (test maddesi içermeyen HepG2 hücreleri) 10 μ l DMEM eklenmiştir.
4. Hücre kültür plağı 30 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
5. Master reaksiyon karışımı (20 μ l 500X ROS tayin reaktifi ve 10 μ l deney tamponu içeren karışım) hazırlanmıştır. Karışım tek bir hücre kültür plağı için yeterlidir.
6. 100 μ l/kuyucuk olacak şekilde master reaksiyon karışımı eklenmiştir.
7. Hücre kültür plağı 30 dakika – 1 saat aralığında inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
8. Kuyucukların floresansı ($\lambda_{ex}=640$ nm, $\lambda_{em}=675$ nm) ölçülmüştür.

ROS Düzeylerinin Hesaplanması:

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

3.5.6. HepG2 Hücrelerinin Lizisi ve Fraksiyonlanması

1. Konfluent hale gelmiş flasklara IC₃₀ dozunda test maddesi uygulanarak 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda flasklara tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin tutundukları yerden ayrılması sağlanmıştır. Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücrelere takiben besi yeri eklenmiştir.
2. Lize etme işlemi hücre liziz tampon çözeltisi ve proteaz inhibitör kokteyli kullanılarak yapılmıştır. Proteaz inhibitör kokteyli 100 ml liziz tampon çözeltisi içerisinde 1 ml proteaz inhibitörü içerecek şekilde hazırlanmıştır. Proteaz inhibitörü -20°C’de saklanmış, liziz tampon çözeltisi ise 4°C’de saklanmıştır.
3. BPA, MEHP ve BPA+ MEHP içeren her bir hücre grubuna 800 µl liziz tamponu eklenmiş, takiben hücre süspansiyonları iki gruba ayrılmıştır. İlk grup 3500 devir/dak hızda 15 dakika, ikinci grup 13000 devir/dak hızda 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatantlar toplanarak -80°C’de saklanmıştır.

3.5.7. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Ölçümü

Yöntemin Esası:

Yöntem, hidroperoksitin GPx ile indirgenmesi sonucu oluşan okside GSSG, GR ve NADPH ile indirgenmiş duruma geri döndürmesi; NADPH’ın NADP⁺’ye oksidasyonu sonucu absorbansta meydana gelen azalmanın 340 nm’de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bir ünite GPx, dakikada 1 nmol NADPH’ı NADP’ye dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Enzimatik olmayan kuyucuklar (3 kuyucuk): 120 µl deney tamponu ve 50 µl ko-substrat karışımı eklenmiştir.

2. Pozitif kontrol kuyucukları (3 kuyucuk): 100 µl deney tamponu, 50 µl ko-substrat ve 20 µl dilüe edilmiş GPx (kontrol) eklenmiştir.
3. Örnek kuyucukları: 100 µl deney tamponu, 50 µl ko-substrat ve 25 µg/ml konsantrasyona sahip BPA, MEHP ve BPA+ MEHP içeren HepG2 hücre örneklerinden 20 µl belirlenen kuyucuklara eklenmiştir.
4. Kullanılan bütün kuyucuklara 20 µl kümen hidroperoksit eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Hücre kültür plağı birkaç saniye çalkalanarak reaktifin karışması sağlanmıştır.
5. En az 5 zaman noktası elde etmek koşulu ile spektrofotometre aracılığıyla 340 nm'de dakikada bir kez olmak üzere 5 dakika boyunca absorbanstaki azalma ölçülmüştür.

Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Hesaplanması:

Dakika başına absorbans değişiklikleri (ΔA_{340}) hesaplanarak, absorbans değerleri zamanın bir fonksiyonu olacak şekilde grafik çizdirilmiştir.

Enzimatik olmayan örneklerin dakika başına absorbans değerleri ile örneklerin absorbans değerleri arasındaki fark bulunmuştur. Aşağıdaki formül kullanılarak GPx aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\text{GPx aktivitesi (nmol/min/ml)} = (\Delta A_{340} / 0,00373 * \mu\text{M}^{-1}) \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

*NADPH ekstinksiyon katsayısı

$$\text{Dilüsyon Faktörü} = V_{\text{final}} / V_{\text{örnek}} \times d_{\text{örnek}}$$

V_{final} : Kuyucuğun nihai hacmi (0,19 ml)

$V_{\text{örnek}}$: Kuyucuğa eklenen örnek hacmi (0,02 ml)

$d_{\text{örnek}}$ = örnek dilüsyonu (1)

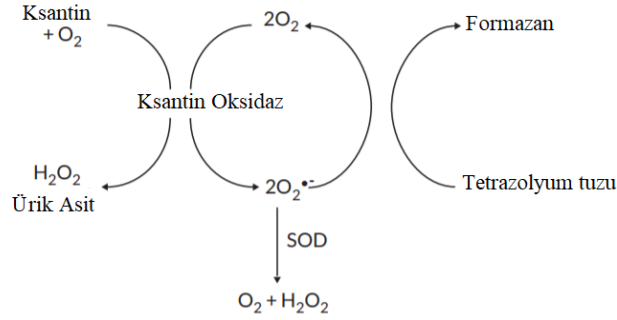
$$\text{Spesifik Enzim Aktivitesi (nmol/min/mg protein)} = \text{GPx aktivitesi/protein (mg/ml)}$$

3.5.8. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü

Yöntemin Esası:

Süperoksit dismutaz kiti, hipoksantin ve ksantin oksidaz ile üretilen süperoksit radikallerini tespit etmek için tetrazolyum tuzu kullanılır ve üç tip SOD (Cu/Zn, Mn ve FeSOD) ölçülebilmektedir.

Total SOD aktivitesi ölçüm yöntemi, ksantin oksidazın ksantini ürik aside dönüştürürken oluşturduğu $O_2^{\cdot-}$ iyonunun SOD ile dismutasyonu esnasında ortama eklenen WST-1 formazan (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu) maddesinin WST1'ye dönüşmesinin ölçülmesinde ortaya çıkan renk değişiminin spektrofotometrik bir yöntemle 460 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.2.).



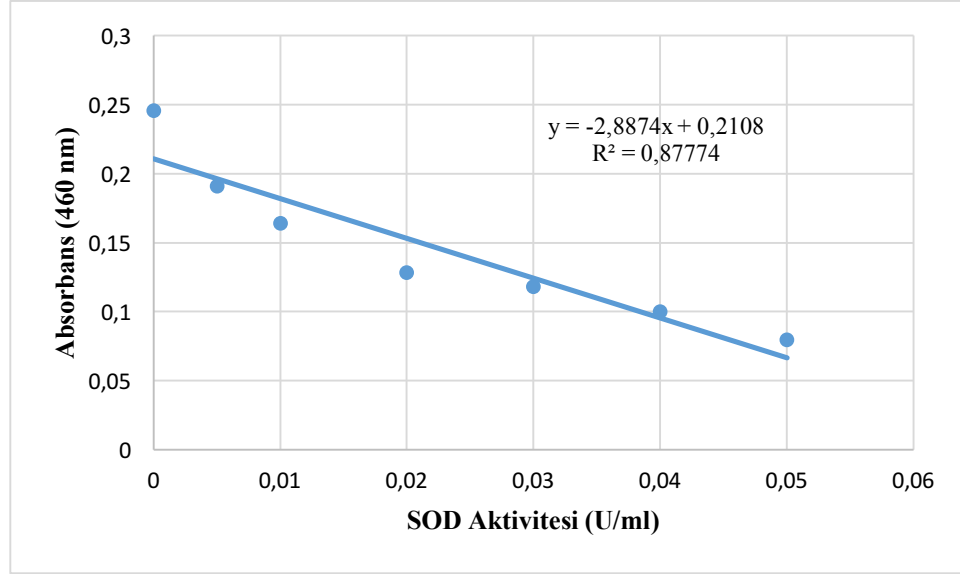
Şekil 3.2. Süperoksit dismutaz ölçümü reaksiyon şeması.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Kuyucuklara 200 µl dilüe edilmiş radikal detektörü ve 10 µl SOD standardı veya BPA, MEHP ve BPA+ MEHP içeren HepG2 hücre lizatlarından eklenmiştir.
2. Ksantin oksidaz (20 µl) eklenerek reaksiyon başlatılmış, birkaç saniye hücre kültür plağı çalkalanmıştır.
3. Hücre kültür plağı, oda sıcaklığında çalkalayıcıda 30 dakika inkübe edilmiştir.
4. Örneklerin absorbans değerleri 460 nm'de ölçülmüştür.

Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Hesaplanması:

Kör, standart ve tüm örneklere ait ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. Köre ait absorbans değerinin kendisine ve standartların absorbans değerlerine bölünmesi ile elde edilen oran, standartların SOD aktivitesine karşı grafiğe geçilerek “standart eğri” elde edilmiştir (Şekil 3.3.). Standart eğriden hareketle, örneklerin SOD aktiviteleri belirlenmiştir. Dilüsyon faktörü ve protein değerleri kullanılarak spesifik aktivite (U/mg protein) hesaplanmıştır. Süperoksit radikallerinin %50'sininin dismutasyonu için gerekli olan enzim miktarı bir ünite olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.3. Süperoksit Dismutaz Standart Eğrisi.

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

Dilüsyon Faktörü = $V_{\text{final}} / V_{\text{örnek}} \times d_{\text{örnek}}$

V_{final} : Kuyucuğun nihai hacmi (0,23 ml)

$V_{\text{örnek}}$: Kuyucuğa eklenen örnek hacmi (0,01 ml)

$d_{\text{örnek}}$ = örnek dilüsyonu (1)

3.5.9. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Yöntemin Esası:

Yöntem, hidrojen peroksit substratının CAT ile enzimatik olarak tepkimeye girmesi sonucunda oluşan formaldehitin, kromojen (4-amino-3-hidrazino-5-merkapt-1,2,4-triazol; purpald) ile renkli bir bileşik oluşturması ve oluşan renk şiddetinin kolorimetrik olarak 540 nm’de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. 1 ünite enzim 25°C’de, 1 dakikada 1 nmol formaldehit oluşumuna neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

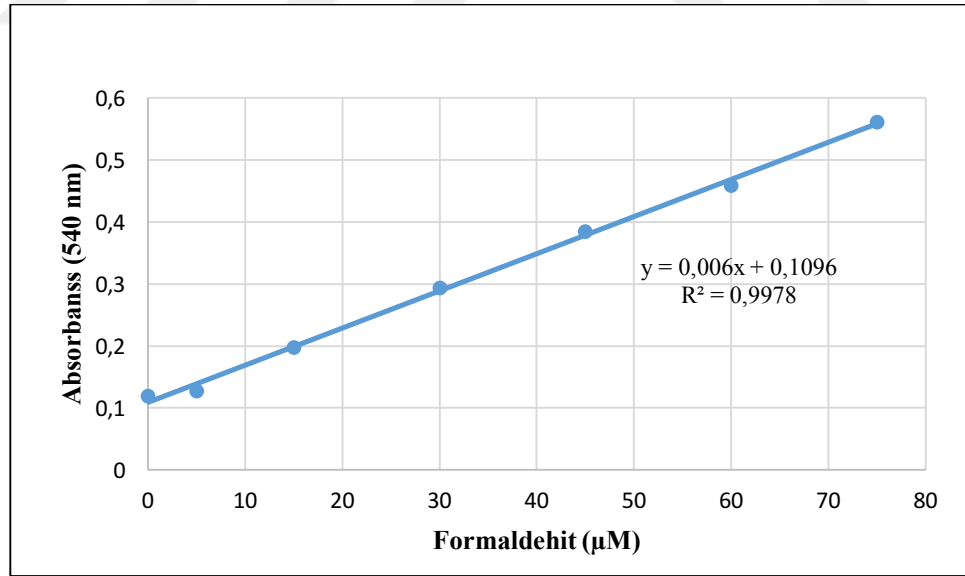
Yöntemin Uygulanışı:

1. 100 µl seyreltilmiş deney tamponu, 30 µl metanol ve 20 µl formaldehit standardı veya BPA, MEHP ve BPA+ MEHP içeren HepG2 hücre lizatları ilgili kuyucuklara eklenmiştir.

2. Tüm kuyucuklara 20 µl seyreltilmiş H₂O₂, reaksiyonun başlama zamanına dikkat edilerek hızlı bir şekilde eklenmiştir.
3. Hücre kültür plağı, oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 20 dakika inkübe edilmiştir.
4. Tüm kuyucuklara reaksiyonu sonlandırmak üzere 30 µl potasyum hidroksit eklenmiş, ardından 30 µl katalaz purpald eklenmiştir.
5. Hücre kültür plağı, oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir.
6. Kullanılan bütün kuyucuklara 10 µl potasyum periyodat eklenmiş, hücre kültür plağı, oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 5 dakika inkübe edilmiştir.
7. Örneklerin absorbans değerleri 540 nm’de ölçülmüştür.

Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması:

Formaldehit standartlarının konsantrasyonları ve deney sonucunda elde edilen absorbans değerleri ile oluşturulan standart eğrisinden (Şekil 3.4.) formaldehit konsantrasyonları (µM) hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Formaldehit Standart Eğrisi.

Katalaz aktivitesi hesaplanırken formaldehit konsantrasyonu, tepkimenin izlenme süresi ve dilüsyon faktörü kullanılmış; protein değerleri kullanılarak spesifik aktivite belirlenmiştir.

CAT Aktivitesi (nmol/dk/ml) = Formaldehit (μ M)/ 20 dk x Dilüsyon faktörü

Dilüsyon Faktörü = $V_{\text{final}} / V_{\text{örnek}} \times d_{\text{örnek}}$

V_{final} = Kuyucuğun nihai hacmi (0,17 ml)

$V_{\text{örnek}}$ = Kuyucuğa eklenen örnek hacmi (0,02 ml)

$d_{\text{örnek}}$ = örnek dilüsyonu (9)

Spesifik Aktivite (nmol/mg protein) = Aktivite (nmol/dk/ml)/ mg protein.ml⁻¹

3.5.10. Protein Miktarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

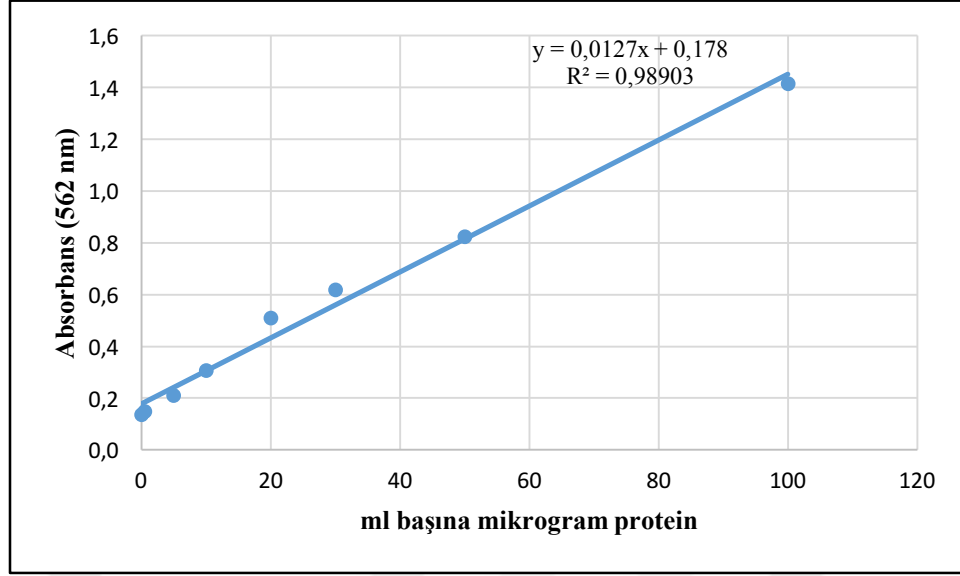
Bişinkoninik asit (BCA) deneyinin esası, alkali koşullar altında Cu^{+2} – protein kompleksinin oluşumuna, ardından Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesine dayanmaktadır. İndirgenme miktarı mevcut protein ile orantılıdır. Sistein, triptofan, sistin, tirozin ve peptid bağlarının Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirgeyebildiği bilinmektedir. BCA, alkali ortamlarda Cu^{+1} ile mavi – mor renkli kompleks oluşturmakta ve böylece proteinler ile alkali Cu^{+2} indirgenmesi spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Hücre lizatları 1/50 oranında seyreltilmiştir.
2. Kuyucuklara BCA standartları, kontrol HepG2 hücre lizatları ve BPA, MEHP ve BPA+ MEHP ile muamele edilmiş HepG2 hücre lizatlarından 150 μ l eklenmiştir.
3. 7 ml QA tamponu, 7 ml QB tamponu ve 280 μ l bakır (II) Sülfat içeren çalışma çözeltisi hazırlanmış ve bu çalışma çözeltisi (150 μ l) kuyucuklara eklenmiştir.
4. Plak, çalkalayıcıda 15 dakika ve takiben etüvde (37°C) 2 saat inkübe edilmiştir.
5. Örneklerin absorbans değerleri 562 nm'de ölçülmüştür.

Protein Miktarının Hesaplanması:

Protein standartlarının konsantrasyonları ve deney sonucunda elde edilen absorbans değerleri ile standart eğrisi (Şekil 3.5.) oluşturulmuş, protein miktarları hesaplanmış ve dilüsyon faktörü ile çarpılarak örnekte protein miktarı belirlenmiştir.

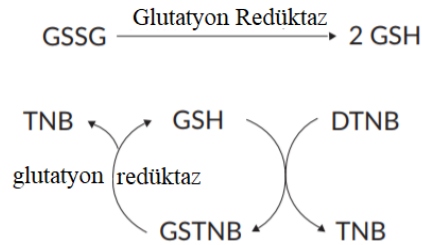


Şekil 3.5. Protein Standart Eğrisi.

3.5.11. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Yöntem, DTNB'nin GR ile katalizlenen bir reaksiyonla, sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)'ye dönüşmesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Üretilen disülfür GSTNB (GSH ve TNB arasında), GSH'yi geri dönüştürmek ve daha fazla TNB üretmek amacıyla GR tarafından indirgenmektedir (Şekil 3.6.). Üretilen TNB oranı doğrudan bu geri dönüşüm reaksiyonu ve dolayısıyla örnekteki GSH konsantrasyonu ile orantılıdır. TNB'nin absorbansının 414 nm'de ölçülmesi ile örnekteki GSH düzeyi belirlenebilmektedir.



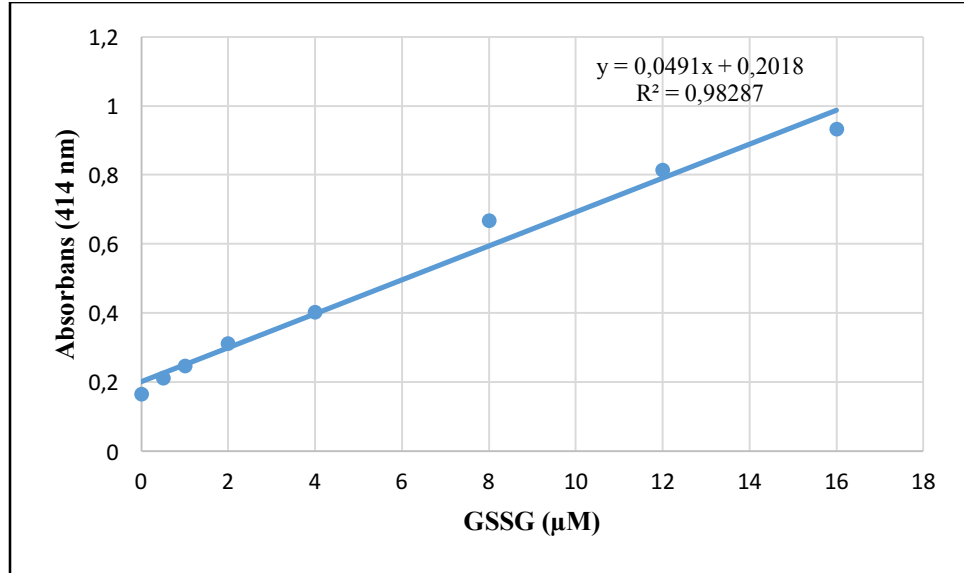
Şekil 3.6. GSH döngüsü.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Kuyucuklara 50 µl GSSG standart çözeltisi eklenmiştir.
2. Kuyucuklara kontrol HepG2 hücre lizatları ve BPA, MEHP ve BPA+ MEHP ile muamele edilmiş HepG2 hücre lizatlarından 50 µl eklenmiştir.
3. Deney kokteyli, 20 ml'lik vialde, MES tamponu (11,25 ml), ko-faktör karışımı (0,45 ml), enzim karışımı (2,1 ml), distile su (2,3 ml) ve DTNB (0,45 ml) karıştırılarak hazırlanmıştır.
4. Kuyucuklara taze olarak hazırlanmış deney kokteylinden 150 µl eklenmiştir.
5. Hücre kültür plağı çalkalayıcıda ışıktan korunarak 25 dakika inkübe edilmiştir.
6. Örneklerin absorbens değerleri 414 nm'de ölçülmüştür.

Total Glutasyon Düzeylerinin Hesaplanması:

GSSG standartlarının konsantrasyonlarına karşı standartlara ait absorbens değerleri ile oluşturulan standart eğrisinden (Şekil 3.7.) örneklerdeki total GSH konsantrasyonları hesaplanmıştır. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir.

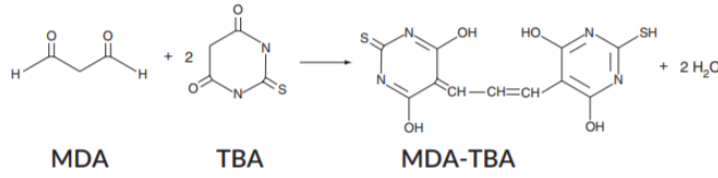


Şekil 3.7. GSSG Standart Eğrisi.

3.5.12. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Malondialdehit, lipit peroksidasyonunun doğal olarak meydana gelen ürünüdür. Yöntem, malondialdehit ve tiyobarbitürik asidin yüksek sıcaklık ve asidik koşullar altında reaksiyonu ile oluşan MDA-TBA kompleksinin kolorimetrik veya florometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.8.).



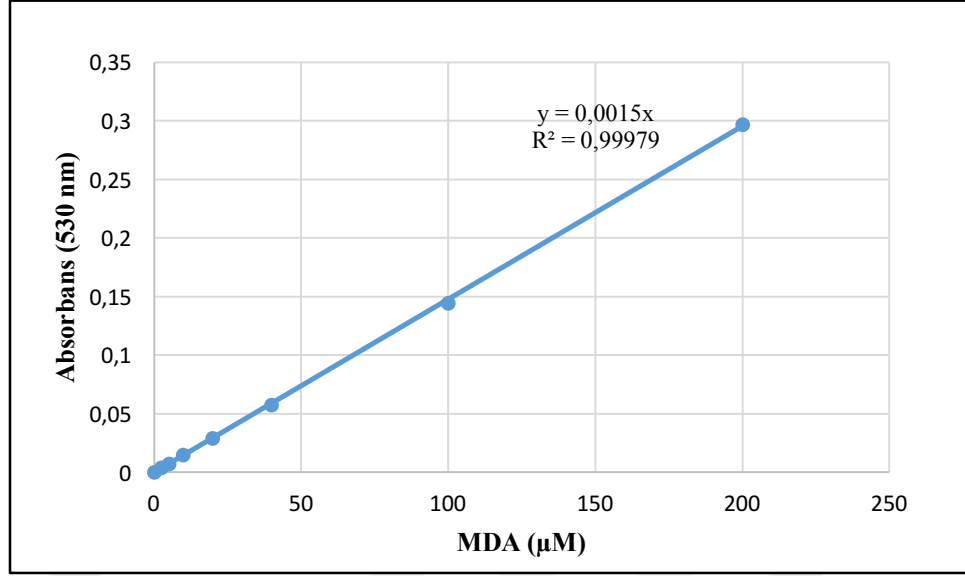
Şekil 3.8. MDA-TBA kompleksinin oluşumu.

Yöntemin Uygulanışı:

1. 100 µl seyreltilmiş standart çözeltisi veya hücre lizatları 5ml'lik cam tüplere eklenmiş ve her tüpe 100 µl SDS çözeltisi eklenerek hızlıca karıştırılmıştır.
2. Her cam tüpe 4 ml renk reaktifi eklenerek karıştırılmıştır.
3. Tüpler su banyosunda (100°C) bir saat boyunca bekletilmiştir. Bir saat sonunda cam tüpler kaynayan sudan hızlıca alınarak buzda 10 dakika süre ile inkübe edilmiştir.
4. Tüpler 3500 devir/dak 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
5. Tüplerden 150 µl alınarak hücre kültür plağına eklenmiştir.
6. Örneklerin absorbans değerleri 530 nm'de ölçülmüştür.

MDA Düzeylerinin Hesaplanması:

Her standart ve örneğin ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. 0 µM standardı kendi absorbans değerinden ve diğer absorbans değerlerinden (standartlar) çıkartılarak doğru absorbans değerleri elde edilmiştir. Bu değerler MDA konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak çizdirilmiş, standart eğri (Şekil 3.9.) elde edilmiş, MDA düzeyleri µM cinsinden hesaplanmıştır. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.9. MDA Standart Eğrisi.

3.5.13. Karbonil Grubu Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası:

Protein oksidasyonunun en genel göstergesi protein karbonilleridir. Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi redoks döngüsü katyonları, proteinler üzerindeki katyon bağlama bölgelerine bağlanmakta ve H_2O_2 veya O_2 'nin yardımı ile birkaç aminoasidin yan zincir amin gruplarını karbonillere dönüştürülmektedir. 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ve protein karbonilleri arasındaki reaksiyon sonucu spektrofotometrik olarak analiz edilebilen hidrazon oluşmaktadır.

Yöntemin Uygulanışı:

1. 200 µl hücre lizatı ve 200 µl hücre lizatı-kontrol hazırlanmıştır.
2. Örnek gruplarına 800 µl DNPH, kontrol gruplarına ise 800 µl HCl (2,5 M) eklenmiştir.
3. Örnek ve kontrol grupları oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince, her 15 dakikada bir örnek ve kontrol tüplerine vorteks uygulanmıştır.
4. Tüplere %20'lik TCA (1 ml) eklenmiş, tüpler vortekslenmiş ve buzda 5 dakika inkübe edilmiştir.

5. Tüpler 15000 devir/dak 10 dakika süre ile 4°C’de santrifüj edilmiştir.
6. Tüplerden süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti 1 ml TCA (%10) ile süspand edilmiştir. Takiben tüpler buzda 5 dakika inkübe edilmiştir.
7. Tüpler 15000 devir/dak 10 dakika süre ile 4°C’de santrifüj edilmiştir.
8. Tüplerden süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti 1 ml (1:1) etanol/etil asetat karışımı ile süspand edilmiştir. Tüpler 15000 devir/dak 10 dakika süre ile 4°C’de santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kere daha tekrarlanmıştır.
9. Protein pelletleri 500 µl guanidin hidroklorit ile süspand edilmiştir.
10. Tüpler 15000 devir/dak 10 dakika süre ile 4°C’de santrifüj edilmiştir.
11. Örnek ve kontrol tüplerinden 220 µl 96 kuyucuklu plaklara eklenmiştir.
12. Örneklerin absorban değerleri 360 nm’de ölçülmüştür.

Karbonil Düzeylerinin Hesaplanması:

Kontrol gruplarının absorban değerleri ile örnek gruplarının absorban değerleri arasındaki fark hesaplanmıştır (CA). Aşağıdaki formül ile karbonil konsantrasyonları nmol/ml cinsinden belirlenmiştir.

$$\text{Protein Karbonil (nmol/ml)} = [(CA) / (*0,011 \mu\text{M}^{-1})] \times (500 \mu\text{l} / 200 \mu\text{l})$$

*DNPH 370 nm’deki ekstinksiyon katsayısı $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($0,022 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dir.

Bu değer kuyucuktaki çözeltiye da bağlı olan yol uzunluğu da hesaba katılarak yeniden hesaplanmıştır.

Daha sonra karbonil düzeyleri nmol/mg cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Karbonil (nmol/mg)} = [\text{Protein Karbonil (nmol/ml)}] / \text{protein (mg/ml)}$$

3.5.14. DNA İzolasyonu

Yöntemin Esası:

DNA izolasyonu, çeşitli biyolojik örnek kaynaklarından DNA’nın (genomik, mitokondriyal, viral) izolasyonunu sağlayan “Quick-DNA™ Miniprep” kiti ile gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Hücreler 343 μ M, 4,5 μ M, 400+10 μ M konsantrasyonda BPA, MEHP ve BPA+ MEHP ile 24 saat inkübe edilmiştir. Kontrol olarak test maddesi uygulanmayan HepG2 hücre hatları kullanılmıştır.
2. Flaskta tutunmuş HepG2 hücreleri üzerinden besiyeri çekilerek ölü hücreler uzaklaştırılmış, hücreler D-PBS ile yıkanmış ve daha sonra, flaska 3 ml tripsin-EDTA eklenmiş, hücreler 3–5 dk inkübatörde tutulmuştur.
3. Işık mikroskopunda hücrelerin tutundukları yerden ayrılarak süspande oldukları kontrol edilmiştir.
4. Flask üzerine 4 ml besiyeri eklenerek tripsin-EDTA'nın etkisi ortadan kaldırılmış ve hücreler steril falkon tüplere aktarılmıştır.
5. Hücre süspansiyonu 1200 devir/dak hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası tüpteki süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti 1 ml besiyeri ile süspande edilmiş ve ependorflara ayrılmıştır.
6. Hücre süspansiyonu 1500 devir/dak hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj sonrası tüpteki süpernatant uzaklaştırılmış ve örnekler (BPA, MEHP ve BPA+ MEHP içeren HepG2 hücreleri ve kontrol HepG2 hücreleri) 500 μ l genomik lizis tampon çözeltisi eklenmiştir.
8. Örnekler 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1500 devir/dak hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj sonrası tüpteki süpernatantlar (400 μ l) tüp içerisindeki deney kiti kolonlarına alınmış, 15000 devir/dak hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Tüpler yenileri ile değiştirilerek 200 μ l DNA ön yıkama tamponu örnekler eklenmiş ve örnekler 15000 devir/dak hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Örnek kolonlarına 500 μ l g-DNA yıkama tamponu eklenmiş, 15000 devir/dak hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.
12. Santrifüj sonrası örnek kolonları temiz tüplere alınmış ve örnek kolonlarına 125 μ l DNA elüsyon tampon çözeltisi eklenmiştir. Örnekler

3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve ardından 15000 devir/dak hızda 30 saniye santrifüj edilmiştir.

13. Santrifüj sonrası tüpteki süpernatantlar (125 µl) ependorflara alınmıştır. -20°C’de saklanmıştır.

3.5.15. DNA Baz Hasarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

DNA’nın oksidatif hasarından kaynaklı doku, serum, plazma, idrar ve hücre lizatında 8-hidroksi-2’deoksiguanin (8-OHdG) oluşumunun ELISA ile ölçümü esasına dayanmaktadır. 8-OHdG, DNA onarımı sırasında üretilmektedir ve ölçümü yaşlanma, kanser ve diğer dejeneratif hastalıklara bağlı oksidatif hasarın göstergesi olarak yararlı olabilir.

8 – OHdG – EIA™ Kiti, 8-OHdG monoklonal antikoru ve örnek veya standartların 8-OHdG’lere bağlanma özelliğinden yararlanarak 8-OHdG tayini yapmaktadır. Standart veya örnekteki 8-OHdG’lere bağlanmış antikorların yıkanması ile sadece sabit 8-OHdG’ler ortamda kalmaktadır. Sabit 8-OHdG’leri belirlemek için ikinci bir antikor daha eklenmekte, bu antikor ortamda kalan monoklonal antikorlara bağlanmaktadır. Tekrar yıkama işleminden sonra kromojen eklenmesi ortamdaki antikor miktarı oranına göre renk değişimine neden olmaktadır. Renk reaksiyonu sonlandırıldıktan sonra 450 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapılmaktadır.

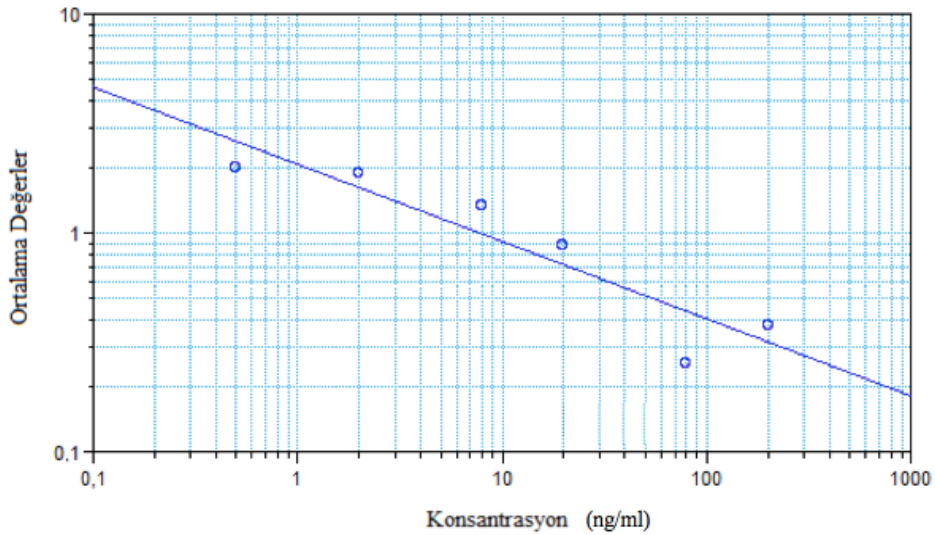
Yöntemin Uygulanışı:

1. Primer antikor, primer antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
2. 50 µl standart çözeltisi veya kontrol HepG2 hücre lizatları, BPA, MEHP ve BPA+ MEHP içeren HepG2 hücre lizatları kuyucuklara eklenmiştir.
3. Kör dışında bütün kuyucuklara seyreltilmiş 50 µl primer antikör çözeltisi eklenmiş, plak 1 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
4. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar 250 µl yıkama tamponu ile 2 defa yıkanmıştır.
5. Sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.

6. 100 µl seyreltilmiş sekonder antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 1 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
7. Kromojen (1X) kromojen seyreltme tamponu (99X) ile seyreltilmiştir. 100 µl seyreltilmiş kromojen çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
8. Kuyucuklara 100 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş, 3 dakika beklemeden sonra örneklerin absorbans değerleri 450 nm’de ölçülmüştür.

DNA Hasarı Hesaplanması:

DNA hasarı, Molecular Devices - Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan lineer, semi-log, log-log, kuadratik, 4- parametre (lojistik), log-logit, noktadan noktaya, üstel ve kübik spline eğri uydurma algoritmalarından loglog algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir (Şekil 3.10.). Sonuçlar ng/ml cinsinden verilmiştir.



Şekil

3.10. 8-OHdG Standart Eğrisi.

3.5.16. Western Blotting ile Protein Tayini

Yöntemin Esası:

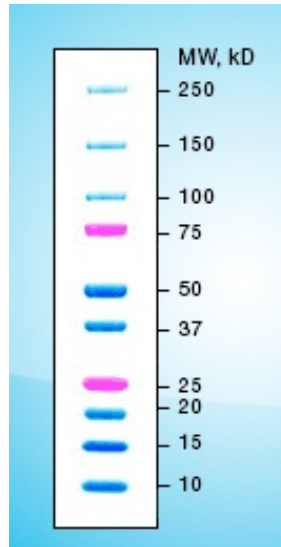
“Western Blot” herhangi bir örnekten elde edilen ve çok fazla sayıda protein içeren bir karışımda, istenen tek bir proteini özgün bir şekilde saptamak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ile aranan proteinin örnekte bulunup bulunmadığı saptamak, kontrol proteinine kıyasla aranan proteinin ifadenme (ekspresyon) ve ifadenme düzeylerini belirlemek mümkündür. Membran üzerinde bulunan 5 ng gibi düşük miktarda proteinler dahi bu yöntemle tespit edilebilmektedir. Western blot işleminden önce örnekte proteinler genellikle bir ön ayırma tabi tutulmaktadır. Yöntem temel olarak altı basamaktan oluşur: Proteinlerin jel elektroforez ile ayrımı, proteinlerin membrana aktarımı, bloklama, primer antikor uygulanması, sekonder antikor uygulanması ve elektrokemilüminesan görüntüleme işlemleridir.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Test maddesi uygulanan hücrelerin NE-PER deney kiti ile sitozolik ve nükleer fraksiyonlarına ayrılması amaçlanmıştır. Hücreler tripsinle kaldırılmıştır. 1200 rpm’de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmıştır ve hücreler D-PBS ile yıkanmıştır. Ardından 1200 rpm’de 2-3 dakika santrifüjlenmiştir.
2. Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine 100 µl %1 proteaz-fosfatase inhibitörü içeren CER I çözeltisi eklenmiştir. 15 saniye vorteks yapılmış ve örnekler 10 dakika buzda bekletilmiştir.
3. Örnekler 5,5 µl CER II çözeltisi eklenmiştir. 5 saniye vorteks yapılmış ve örnekler 1 dakika buzda bekletilmiştir. 5 saniye daha vorteks yapıldıktan sonra soğutmalı santrifüjde 4°C’de 16000 rpm’de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatantlar hızlıca önceden soğutulmuş ependorflara alınmıştır. Böylelikle hücrenin sitozolik fraksiyonu elde edilmiştir.
4. Elde edilen pellet üzerine 50 µl CER çözeltisi eklenmiştir. 5 saniye vorteks yapılmış ve soğutmalı santrifüjde 4°C’de 16000 rpm’de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Sonrasında 15 saniye daha vorteks yapılmış ve örnekler buza

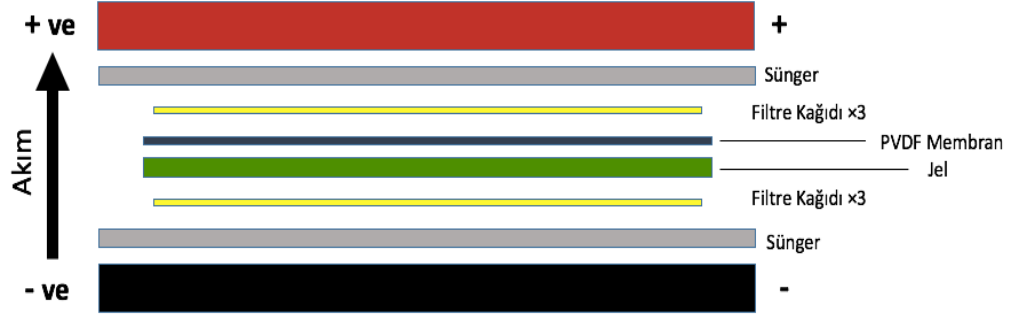
yerleştirilmiştir. Örnekler her 10 dakikada bir kez 15 saniye vortekslenmiştir ve işlem 4 kez tekrarlanmıştır. 4°C’de 16000 rpm’de 10 dakika santrifüj yapılmıştır ve süpernatantlar hızlıca önceden soğutulmuş ependorflara alınmıştır. Bu kısım ise hücrenin nükleer fraksiyonunu oluşturmaktadır.

5. Hücrenin her iki fraksiyonunda protein tayini yapılmış (BCA deney kiti ile) ve örneklerdeki protein miktarları standart eğri oluşturularak hesaplanmıştır.
6. 1X Laemmli çözeltisine nihai konsantrasyonu % 2,5 olacak şekilde 2-merkaptoetanol eklenmiş ve elde edilen denatüre edici çözelti toplam 20 µg protein içeren örneklerle ilave edilmiştir. Ardından örnekler 95°C’de 5 dakika kaynatılmıştır. Bu aşamayla proteinlerin denatürasyonu tamamlanmıştır. SDS-PAGE elektroforezi için örnekler hazır hale getirilmiştir.
7. Dikey elektroforez tankına yürütme tamponu eklenmiş ve mini-protean %4-20’lik gradyent jel yerleştirilmiştir. Örnek yükleme işlemine başlamadan önce kuyucuklara yürütme tamponu eklenmiş ve kuyucuklar yıkanmıştır.
8. Precision plus protein™ iki renkli standartı (Şekil 3.11.) 5 µl 2. ve 8. kuyucuklara uygulanmıştır. 3, 4, 5, 6 ve 7. kuyucuklara sırasıyla kontrol hücreleri, BPA, MEHP, BPA+MEHP ve tunikamisin grubunun sitozolik fraksiyonları uygulanmıştır. 9, 10, 11, 12 ve 13. kuyucuklara sırasıyla kontrol hücreleri, BPA, MEHP, BPA+MEHP ve tunikamisin grubunun nükleer fraksiyonları uygulanmıştır.



Şekil 3.11. Precision plus protein™ iki renkli standart.

9. Yürütme işlemine 50 V, 10 dakika yürütme ile başlanmıştır. 10 dakikanın sonunda voltaj 100 V'a yükseltilmiştir. Yürütme işlemi 2,5 saatte tamamlanmıştır.
10. Transfer işlemi için kullanılacak filtre kağıtları ve süngerler transfer tamponunda ıslatılmıştır. PVDF membran aktifleşmesi için 5 dakika metanolde bekletilmiştir.
11. Sandviç yöntemiyle SDS-PAGE jeli, PVDF membran, filtre kağıtları ve süngerler western blot transfer aparatına aşağıdaki sıra gözetilerek yerleştirilmiştir (Şekil 3.12.). Hava kabarcığının kalmadığı kontrol edilmiştir. Sandviç aparatı SDS-PAGE jeli katod kutbunda olacak şekilde yerleştirilmiş ve sabit 100 V'ta 4°C'de 2 saat boyunca transfer gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.12. Sandviç yöntemi ile transfer şeması.

12. Proteinlerin transferi tamamlandıktan sonra PVDF membran %5 (a/h) yağsız süt tozu içeren 1X TBST içerisinde (bloklama tamponu) 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bloklanmıştır.
13. Bloklama tamponu dökülmüş ve membran 3 kere 10'ar dakika 1X TBST ile yıkanmıştır.
14. Bloklama tamponunun içinde ilgilenilen proteine özgün "primary antibody" (birincil antikor) uygun oranda seyreltilerek 12-16 saat çalkalayıcıda +4°C'de çalkalanmıştır (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Primer Antikorlar.

Primer Antikor	Özgüllük	Molekül Ağırlığı, kDa	Kaynak	Dilüsyon
CHOP	Monoklonal	30 kDa	Fare	1:500
Beta-Aktin*	Poliklonal	40 kDa	Keçi	1:500
XPB-1	Monoklonal	60 kDa	Tavşan	1:500
GRP 78	Monoklonal	78 kDa	Fare	1:200
PERK	Monoklonal	140 kDa	Tavşan	1:200

*Western blot deneyinde yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

15. Membran 10'ar dakika 4 kere 1X TBST ile çalkalayıcıda yıkanmıştır.
16. Membran, bloklama tamponu içinde uygun oranda seyreltilerek hazırlanmış “secondary antibody” (ikincil antikor) ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat muamele edilmiştir (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3. Sekonder Antikorlar.

Sekonder Antikor	Özgüllük	Kaynak	Dilüsyon Oranı
Donkey Anti-Goat IgG-HRP	Poliklonal	Eşek	1:1000
Mouse anti-rabbit IgG-HRP	Monoklonal	Fare	1:1000
Rabbit anti-mouse IgG-HRP	Monoklonal	Tavşan	1:1000

17. Membran 10'ar dakika 4 kere 1X TBST ile çalkalayıcıda yıkanmıştır.
18. Substrat çalışma çözeltisi membranın her cm²'si için 0,125 ml ve substrat A ve substrat B çözeltilerinden 40:1 oranında olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti ışıktan korunmalıdır ve hazırlandıktan sonra 1 saat içerisinde kullanılmalıdır. Membran, substrat çözeltisi ile 5 dakika muamele edilmiştir.
19. Ardından membran görüntüleme, BIO-RAD ChemiDoc Kemilüninesans Jel görüntüleme sistemleri ile gerçekleştirilmiştir.

20. Elde edilen görüntülerde proteinlere ait bantların yoğunluğu, β -aktine oranlanarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar için BioRad Image Lab™ Software sistemi kullanılmıştır.
21. Deneyler 3 defa tekrar edilmiş, Image Lab™ Software aracılığı ile elde edilen bant yoğunlukları her bir protein için tespit edilmiş ve deney kontrolü referans alınıp oranlanarak sonuçlar sunulmuştur.

3.5.17. Mikroskopik İncelemeler

Faz Kontrast ve Işık Mikroskobu İncelemesi

Kontrol grubu ve test maddeleri ile 24 saat inkübe edilen hücreler faz kontrast mikroskopunda morfolojik değişiklikler açısından değerlendirilmiş ve Leica DFC280 mikroskop ile görüntülenmiştir.

Elektron Mikroskop İncelemesi

1. Kontrol grubu ve test maddeleri uygulanan hücreler tripsinle kaldırılıp, toplanmıştır. D-PBS ile yıkama yapılmıştır.
2. Süpernatant atıldıktan sonra pellet halindeki hücreler fosfat tamponu ile ikinci kez pipetaj yapılmadan kaldırılmış ve santrifüj edilmiştir.
3. Pellet halindeki hücreler %2,5 glutaraldehit ile 2 saat oda ısısında fiske edilmiştir.
4. Fiksasyon sonrası glutaraldehitin uzaklaştırılması için hücre pelleti 0,1 M fosfat tamponu ile 1200 rpm'de 5 dakika 3'er kez santrifüj edilerek yıkanmıştır.
5. Postfiksasyon için hücre pelleti osmium tetroksit ile oda sıcaklığında, karanlıkta 1 saat fiske edilmiş ve 0,1 M fosfat tamponu ile 1200 rpm' de 5 dakika 3 kez santrifüj edilerek osmium tetroksit uzaklaştırılmıştır.
6. Hücreler fiske edildikten sonra hücre pelleti %2'lik agara gömülmüş ve takip için Leica EM TP takip cihazına alınmıştır.
7. Takip cihazında 0,1 M fosfat tamponu ile 45 dakika yıkanarak dehidratasyonu sağlamak için sırayla %50, %60, %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkollerden geçirilmiştir.

%50 alkol.....	15 dakika
%60 alkol.....	15 dakika
%70 alkol.....	15 dakika
%80 alkol.....	10 dakika
%90 alkol.....	10 dakika
%100 alkol.....	10 dakika
%100 alkol.....	15 dakika

8. Hücreler propilen oksit içinde iki defa 15 dakika bekletilmiştir.
9. Ardından dörtlü plastik karışımında alıştırılmıştır. Alıştırma yapılırken hücreler 2 saat 3 ölçü propilen oksit + 1 ölçü dörtlü plastik karışımında, 2 saat 1 ölçü propilen oksit + 1 ölçü dörtlü plastik karışımında, 8 saat 1 ölçü propilen oksit + 3 ölçü dörtlü plastik karışımında, 10 saat dörtlü plastik karışımında tutulduktan sonra dörtlü plastik karışımla bloklanarak etüvde 60°C’de 48 saat polimerize edilmiştir.
10. Leica RM 2265 mikrotomunda alınan 1µm yarı ince kesitler %1 lik boraks içindeki %1’lik metilen mavisi- Azur II karışımında boyanmıştır. Hücrelerde ışık mikroskop düzeyinde morfolojik değişikliklerin belirlenmesi ve TEM’de incelenecek alanın belirlenebilmesi için DC490 digital camera (Leica, Wetzlar-Germany) bağlı Leica DM6000B (Wetzlar-Germany) mikroskop ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.
11. Elektron mikroskobunda görüntüleme alabilmek için Leica Ultracut R ile 70 nm’lik ince kesitler bakır gridler üzerine alınmıştır.
12. Gridler Leica EM AC20 cihazı kullanılarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandıktan sonra JEOL-JEM 1400 elektron mikroskop ile incelenerek CCD kamera (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA) ile fotoğraflanmıştır.

3.5.18. TUNEL Analizi

Kontrol grubu ve test maddesi uygulanan gruplardaki apoptotik hücreler, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein kiti kullanılarak TUNEL (terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP çentik uç işaretleme) yöntemi ile belirlenmiştir.

TUNEL analizi için:

1. 5×10^4 hücre/kuyu 12 kuyulu lamlara ekilmiş ve 1 gün boyunca hücrelerin tutunması sağlanmıştır.
2. Ertesi gün test maddeleri deney gruplarına uygulanmış ve 24 saat inkübasyondan sonra TUNEL işaretleme yapılmıştır.
3. Hücreler %4 paraformaldehit ile 15 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra 3 kez 5 dakika süre ile PBS yıkanmıştır.
4. Permeabilizasyon, taze olarak hazırlanan %0,1 Triton X- 100 çözeltisi ile 5 dakika (buz üzerinde) muamele edilerek sağlanmıştır.
5. Hücreler 3'er kez 5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra işaretleme basamağına geçilmiştir. Reaksiyon karışımı için 450µl işaretleme çözeltisi, 50µl enzim çözeltisinden alınarak karıştırılmış ve tüm kuyulara (negatif kontrol için 100µl işaretleme çözeltisi konulur) 100 µl reaksiyon karışımı konularak 37°C'de, nemli ortamda 1 saat inkübe edilmiştir.
6. Inkübasyon sonrası hücreler 3'er kez 5 dakika PBS ile yıkanmıştır.
7. Yıkama işleminden sonra hücreler çekirdek boyaması için DAPI (3,3'-Diaminobenzidine) ile 1 dakika muamele edilmiş ve distile su ile yıkanan hücreler floresans mounting medium ile kapatılarak DFC7000T digital kamera (Leica, Wetzlar, Almanya) bağlı floresans mikroskopunda (Leica DM6B) değerlendirilmiştir.

Her bir grupta 5 alanda X40'luk büyütme ile TUNEL pozitif (apoptotik) hücre ve toplam hücre sayısı belirlenerek apoptotik hücre sayısı % olarak gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.19. Kaspaz 3 Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası:

Kit içinde yer alan plak anti-kaspaz 3 monoklonal antikoru ile kaplıdır ve antikoru tespit edebilmek için biyotin konjuge anti-kaspaz 3 antikoru kullanılır. Standartlar, örnekler ve biyotin-işaretli antikor, kuyucuklara eklenir. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara HRP-konjuge streptavidin eklenir. Renklendirme için TMB substrat kullanılır ve TMB, HRP ile katalizlenerek mavi renkte ürün meydana

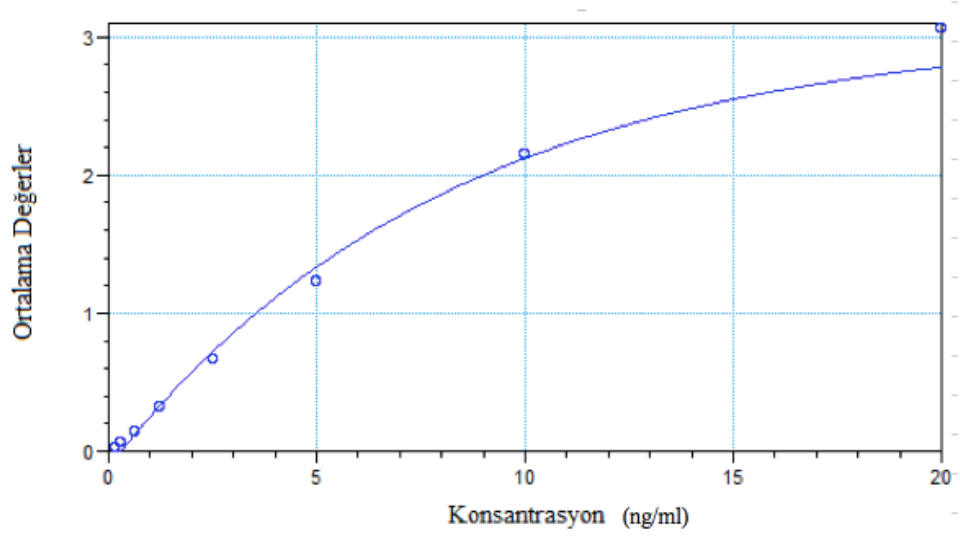
getitirir. Durdurma çözeltisi eklenir, asidin etkisi ile renk sarıya dönüşür. Oluşan renk şiddeti 450 nm’de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

1. 100 µl standart çözeltisi veya kontrol HepG2 hücre lizatları, BPA, MEHP ve BPA+ MEHP içeren HepG2 hücre lizatları kuyucuklara eklenmiştir.
2. Plak 1,5 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
3. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 2 defa yıkanmıştır.
4. Primer antikor, primer antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
5. 100 µl seyreltilmiş primer antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 1 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
6. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 defa yıkanmıştır.
7. Sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
8. 100 µl seyreltilmiş sekonder antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 30 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
9. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 defa yıkanmıştır.
10. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı eklenmiş ve 15 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
11. Kuyucuklara 50 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş, örneklerin absorbans değerleri 450 nm’de ölçülmüştür.

Kaspaz 3 Düzeylerinin Hesaplanması:

Kaspaz 3 düzeyleri, Molecular Devices - Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan lineer, semi-log, log-log, kuadratik, 4- parametre (lojistik), log-logit, noktadan noktaya, üstel ve kübik spline eğri uydurma algoritmalarından üstel algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir (Şekil 3.13.). Sonuçlar ng/ml cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.13. Kaspaz 3 Standart Eğrisi.

3.5.20. Kaspaz 8 Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası:

Kit içerisinde yer alan plak anti-kaspaz 8 monoklonal antikoru ile kaplıdır ve antikor tespit edebilmek için biyotin konjuge anti-kaspaz 8 antikoru kullanılır. Standartlar, örnekler ve biyotin-işaretli antikor, kuyucuklara eklenir. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara HRP-konjuge streptavidin eklenir. Renklendirme için TMB substrat kullanılır ve TMB, HRP ile katalizlenerek mavi renkte ürün meydana getirir. Durdurma çözeltisi eklenir, asidin etkisi ile renk sarıya dönüşür. Oluşan renk şiddeti 450 nm’de ölçülür.

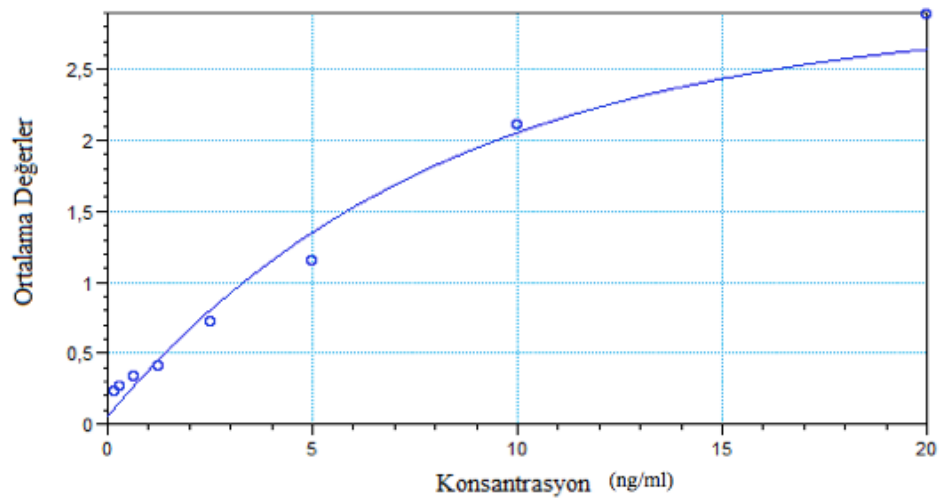
Yöntemin Uygulanışı:

1. 100 µl standart çözeltisi veya kontrol HepG2 hücre lizatları, BPA, MEHP ve BPA+ MEHP içeren HepG2 hücre lizatları kuyucuklara eklenmiştir.
2. Plak 1,5 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
3. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 2 defa yıkanmıştır.
4. Primer antikor, primer antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
5. 100 µl seyreltilmiş primer antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 1 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.

6. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 defa yıkanmıştır.
7. Sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
8. 100 µl seyreltilmiş sekonder antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 30 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
9. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 defa yıkanmıştır.
10. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı eklenmiş ve 15 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
11. Kuyucuklara 50 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş, örneklerin absorbans değerleri 450 nm'de ölçülmüştür.

Kaspaz 8 Düzeylerinin Hesaplanması:

Kaspaz 8 düzeyleri, Molecular Devices - Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan lineer, semi-log, log-log, kuadratik, 4- parametre (lojistik), log-logit, noktadan noktaya, üstel ve kübik spline eğri uydurma algoritmalarından üstel algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir (Şekil 3.14.). Sonuçlar ng/ml cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.14. Kaspaz 8 Standart Eğrisi.

4. BULGULAR

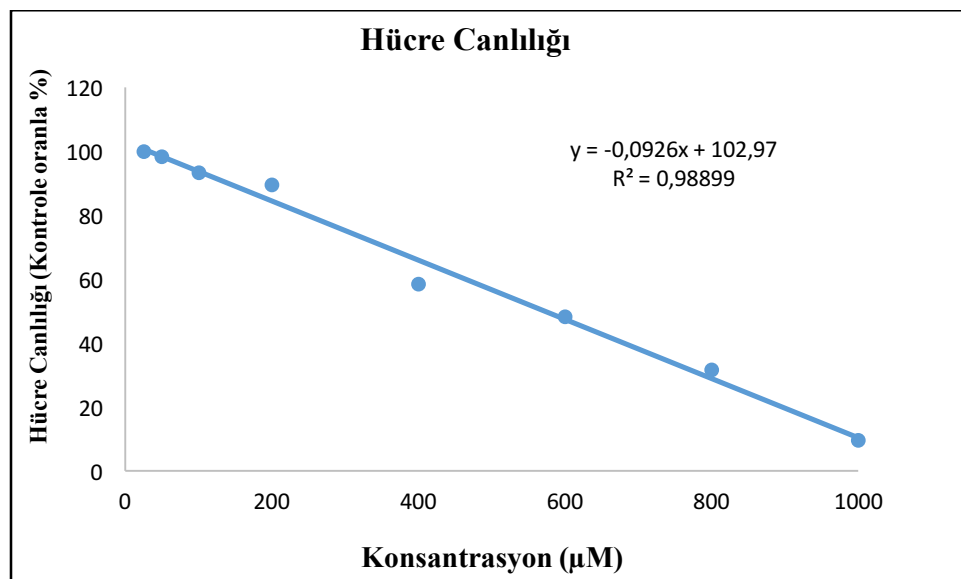
4.1. Sitotoksosite Tayini

HepG2 hücreleri BPA (25-1000 μ M), MEHP (5-75 μ M) ve BPA+MEHP (5-100, 30-1000 μ M) karışımına farklı dozlarda 24 saat maruz bırakılmış ve bu maddelerin/madde karışımlarının MTT yöntemi ile hücre canlılığı üzerine etkileri incelenmiştir. Sitotoksosite deneyleri, üç farklı zamanda ve gün içi iki tekrar ile yapılmıştır. Hücre canlılıkları herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücrelerine göre % olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılığında %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon (medyan inhibitör konsantrasyon, IC₅₀) değerleri ile %30 inhibisyona neden olan konsantrasyon (inhibitör konsantrasyon 30, IC₃₀) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.1.).

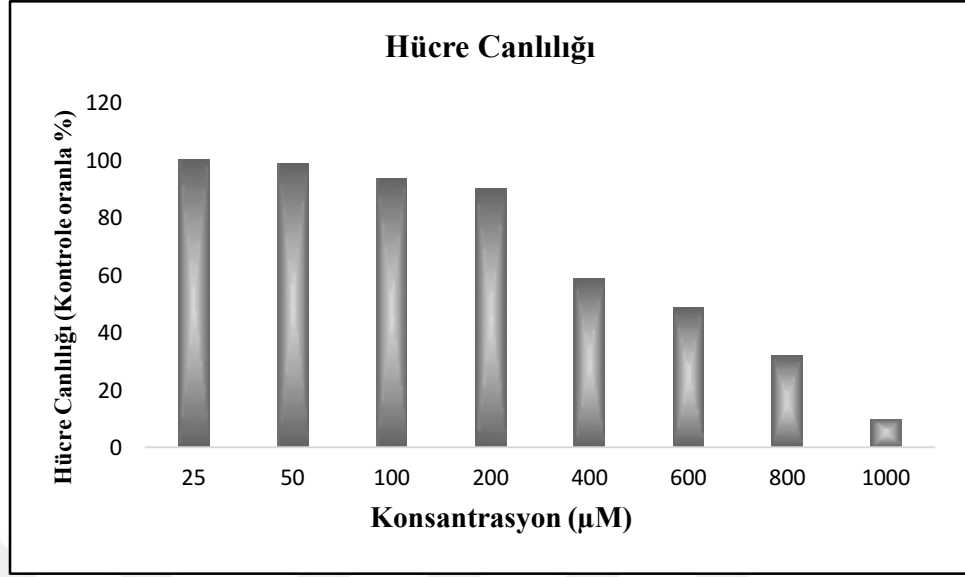
Tablo 4.1. Çalışma Gruplarının IC₃₀ ve IC₅₀ Değerleri.

Çalışma Grupları	BPA (μ M)	MEHP (μ M)	MEHP+BPA (μ M)
IC ₃₀	343*	4,5*	10+400*
IC ₅₀	615*	17,4*	15+500*

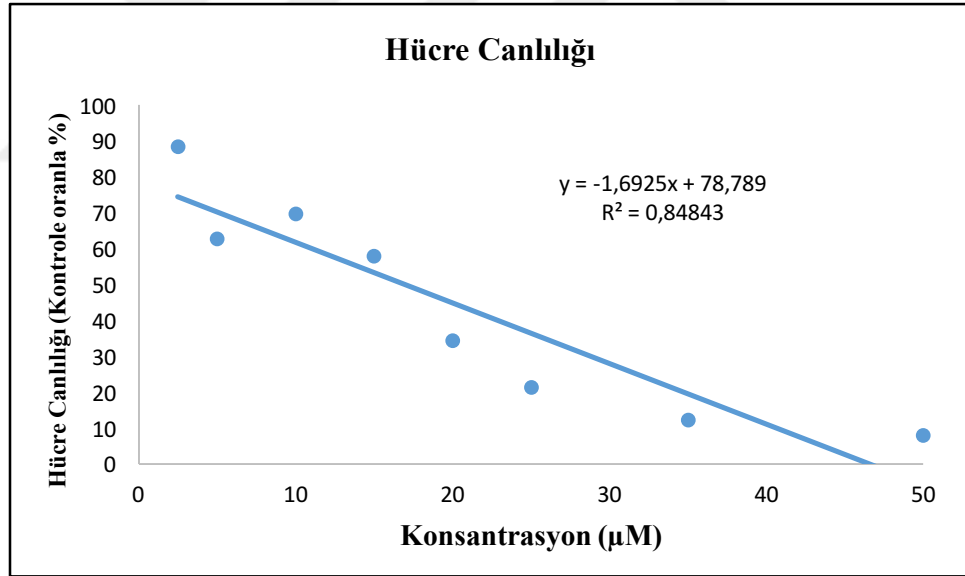
*Sonuçlar, üç farklı zamanda ve gün içi iki tekrarla yapılan çalışmaların ortalama değerlerini göstermektedir. IC30: inhibitör konsantrasyon 30; IC50:medyan inhibitör konsantrasyon.



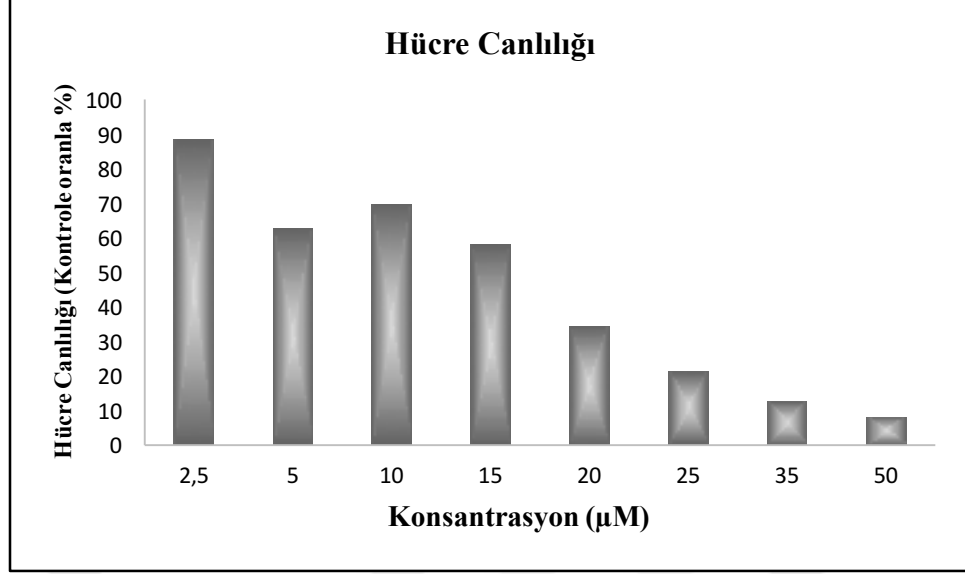
Şekil 4.1.a. HepG2 hücre canlılığı üzerinde BPA'nın (25-1000 μ M) etkisi.



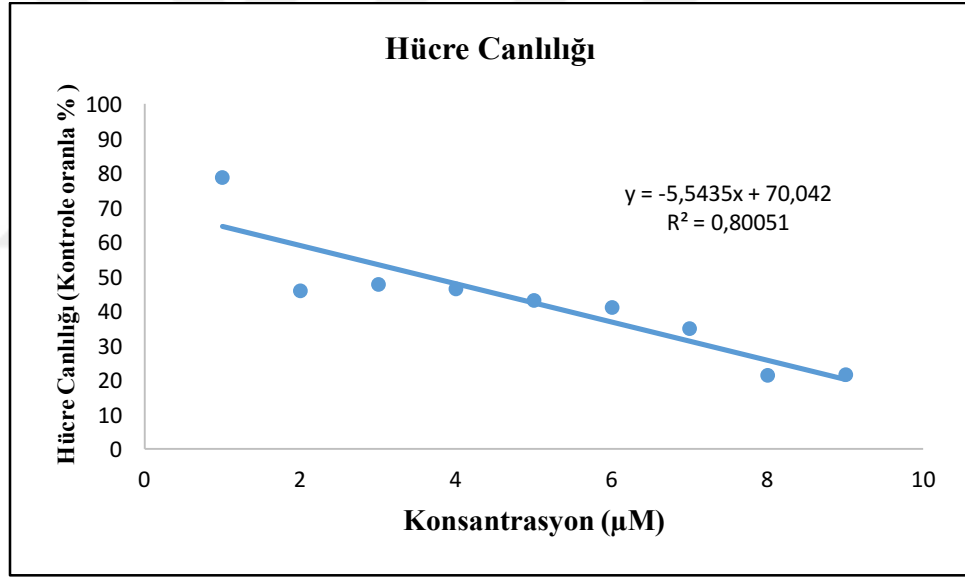
Şekil 4.1.b. HepG2 hücre canlılığı üzerinde BPA'nın (25-1000 µM) etkisi.



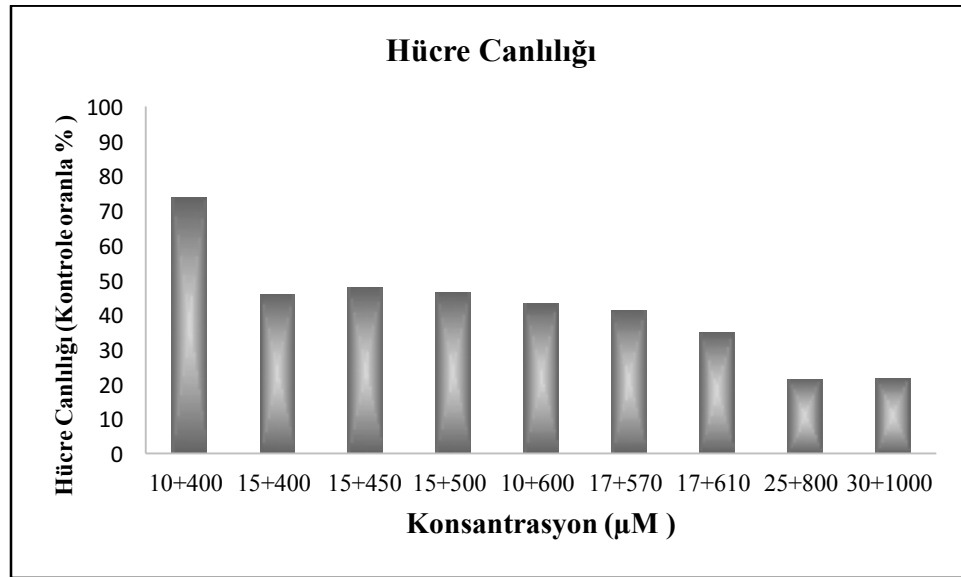
Şekil 4.2.a. HepG2 hücre canlılığı üzerinde MEHP'in (5-75 µM) etkisi.



Şekil 4.2.b. HepG2 hücre canlılığı üzerinde MEHP'in (5-75 µM) etkisi.



Şekil 4.3.a. HepG2 hücre canlılığı üzerinde BPA + MEHP'in (5-100, 30-1000 µM) etkisi.



Şekil 4.3.b. HepG2 hücre canlılığı üzerinde BPA + MEHP'in (5-100, 30-1000 µM) etkisi.

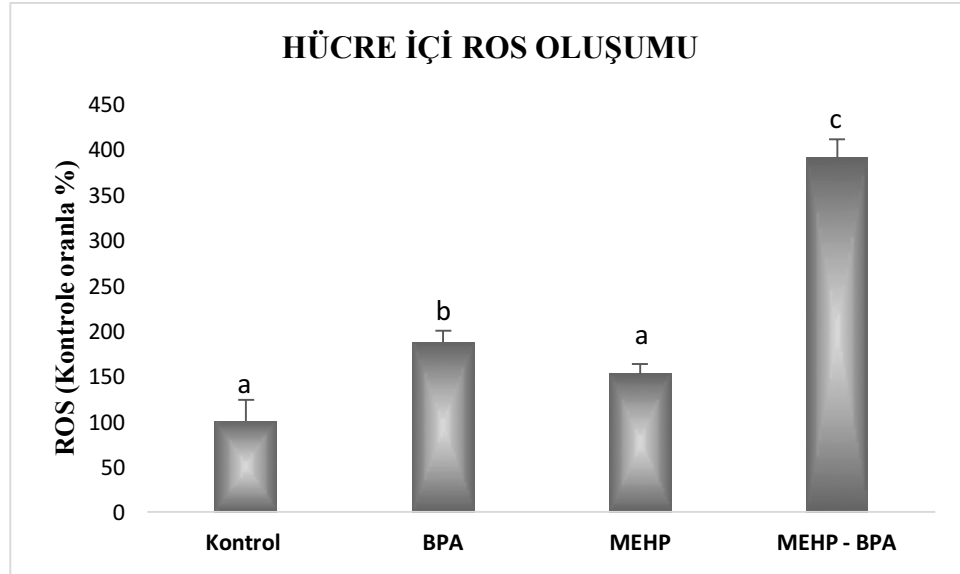
4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Üretiminin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Çalışma gruplarında hücre içi ROS değerleri kontrol grubuna göre % olarak hesaplanmıştır. Kontrole oranla hücre içi % ROS düzeyleri Tablo 4.2. ve Şekil 4.4.'de verilmiştir. BPA (%86) ve kombine grupta (%290) ROS düzeyleri kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı olarak artmıştır ($p < 0,05$). MEHP grubunda ROS düzeylerinde %51'lik bir artış görülse de, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.2. Hücre içi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Düzeyleri.

Çalışma Grupları	ROS Oluşumu (kontrole göre%)
BPA	186,8±23,3 ^b
MEHP	151,9±12,6 ^a
MEHP - BPA	390,4±11,4 ^c

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.4. Hücre içi ROS oluşumu.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.
^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.05$).

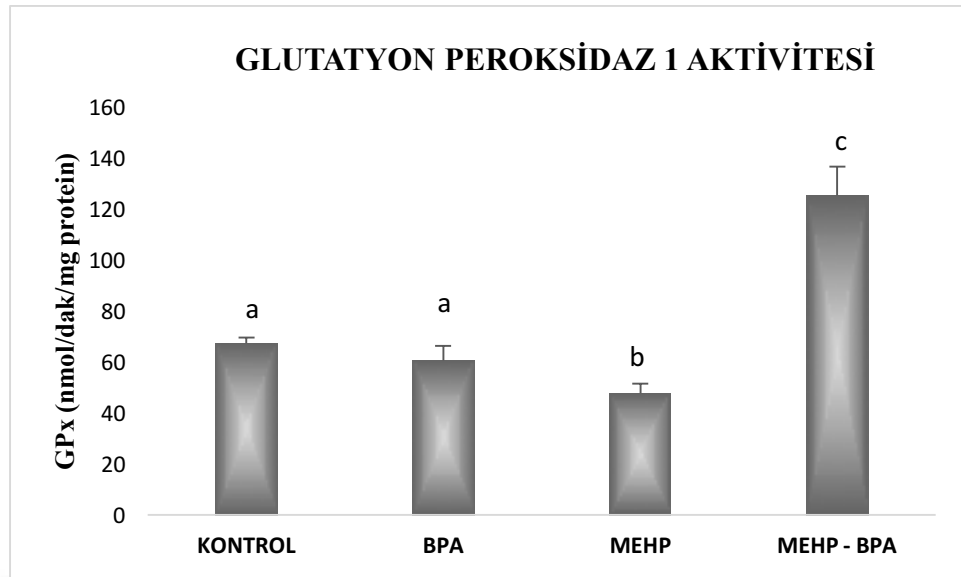
4.3. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi

Çalışma gruplarına ait glutasyon peroksidaz aktivitesi Tablo 4.3. ve Şekil 4.5.'de verilmiştir. BPA grubunda GPx aktivitesinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, MEHP grubunda kontrol grubuna oranla enzim aktivitesi anlamlı olarak düşük (%29) bulunmuştur. Ancak, kombine grupta GPx1 aktivitesi 1.8 katına çıkmıştır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Tablo 4.3. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi.

Çalışma Grupları	Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)
Kontrol	67,2 $\pm$ 2,4 ^a
BPA	60,5 $\pm$ 5,9 ^a
MEHP	47,7 $\pm$ 3,8 ^b
MEHP - BPA	125,3 $\pm$ 11,1 ^c

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.05$).



Şekil 4.5. Glutatyon Peroksidaz 1 Aktivitesi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

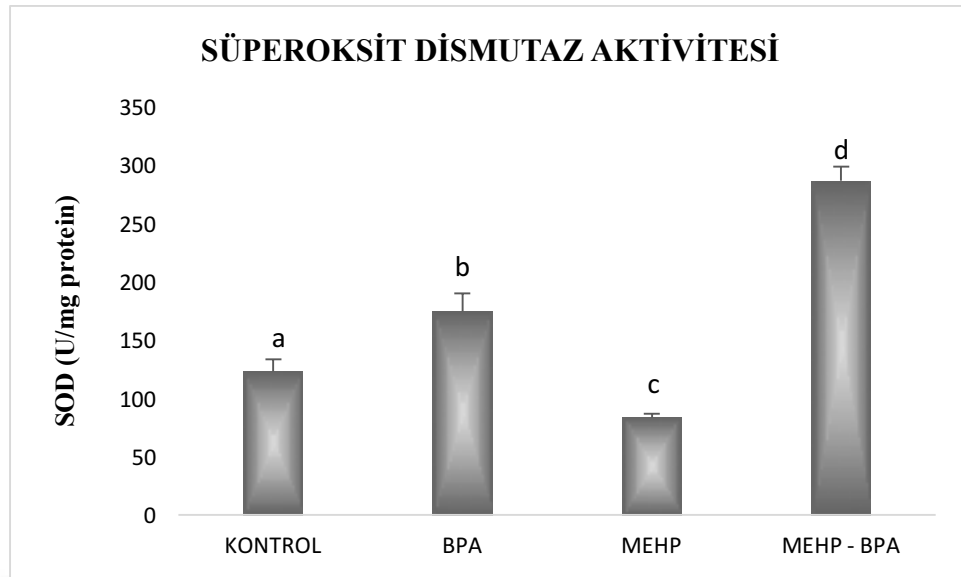
4.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Çalışma gruplarına ait SOD aktivitesi Tablo 4.4. ve Şekil 4.6.'de verilmiştir. Kontrol grubuna oranla tüm çalışma gruplarında SOD aktivitesi istatistiksel olarak farklı ve anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). BPA grubunda SOD aktivitesinde kontrole oranla artış %42'dir. Kombine grupta ise 1,3 katlık bir artış belirlenmiştir ($p < 0,05$). MEHP grubunda ise, SOD aktivitesinde kontrol grubuna oranla %32'lik bir azalma görülmüştür ($p < 0,05$).

Tablo 4.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.

Çalışma Grupları	SOD Aktivitesi (U/mg protein)
Kontrol	122,8 $\pm$ 10,5 ^a
BPA	174,5 $\pm$ 15,4 ^b
MEHP	83,2 $\pm$ 3,7 ^c
MEHP - BPA	286,3 $\pm$ 12,2 ^d

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c, d} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.6. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

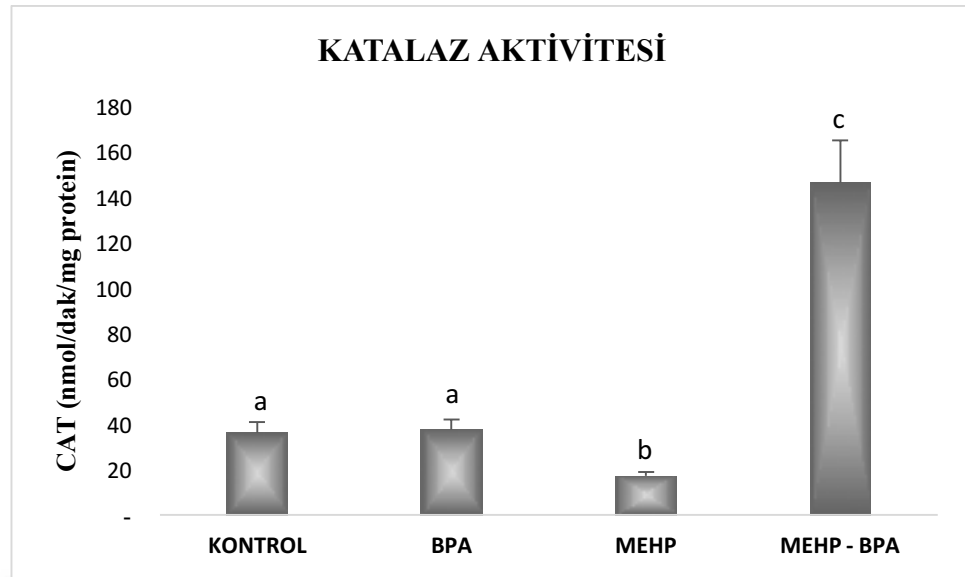
4.5. Katalaz Aktivitesi

Çalışma gruplarına katalaz aktiviteleri Tablo 4.5. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir. Kontrole oranla CAT aktivitesinde BPA grubunda anlamlı bir fark görülmezken, MEHP grubu anlamlı bir şekilde düşük (%53) bulunmuştur. Bununla birlikte, CAT aktivitesinde kombine grupta kontrol grubunun 3,0 katı kadar bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.5. Katalaz Aktivitesi.

Çalışma Grupları	Katalaz Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)
Kontrol	36,2 $\pm$ 4,9 ^a
BPA	37,7 $\pm$ 4,4 ^a
MEHP	17,2 $\pm$ 1,7 ^b
MEHP - BPA	146,4 $\pm$ 18,7 ^c

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.7. Katalaz Aktivitesi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

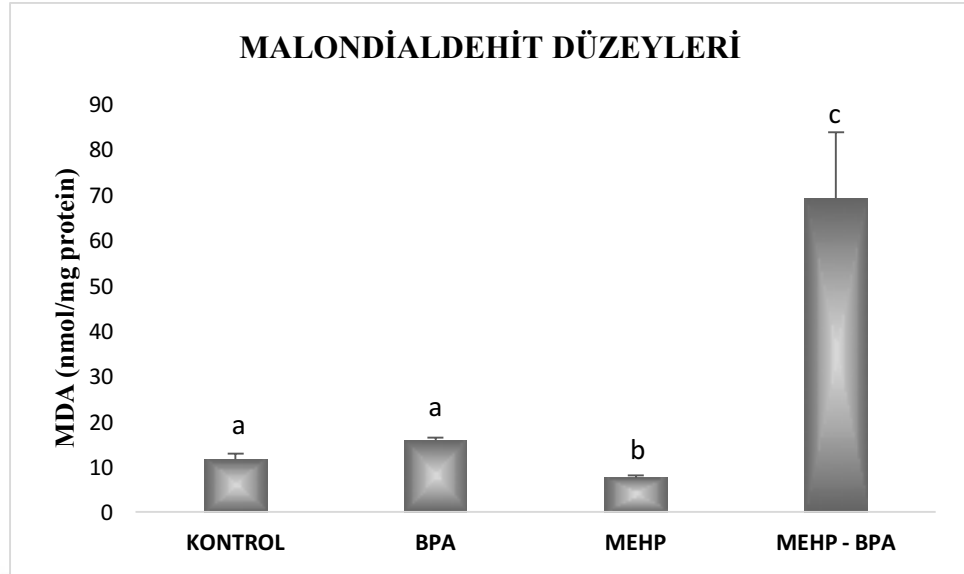
4.6. Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait kontrole kıyasla malondialdehit düzeyleri Tablo 4.6 ve Şekil 4.8.'de verilmiştir. MDA düzeylerinde MEHP-BPA grubunda kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış (4,9 kat) gözlenmiştir ($p < 0,05$). BPA grubunda ölçümü yapılan MDA düzeylerinde kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik saptanmazken, MEHP grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.6. Malondialdehit Düzeyleri.

Çalışma Grupları	Malondialdehit Düzeyleri (nmol/mg protein)
Kontrol	11,6 $\pm$ 1,3 ^a
BPA	15,8 $\pm$ 0,6 ^a
MEHP	7,5 $\pm$ 0,5 ^b
MEHP - BPA	69,2 $\pm$ 14,5 ^c

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.8. Malondialdehit Düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

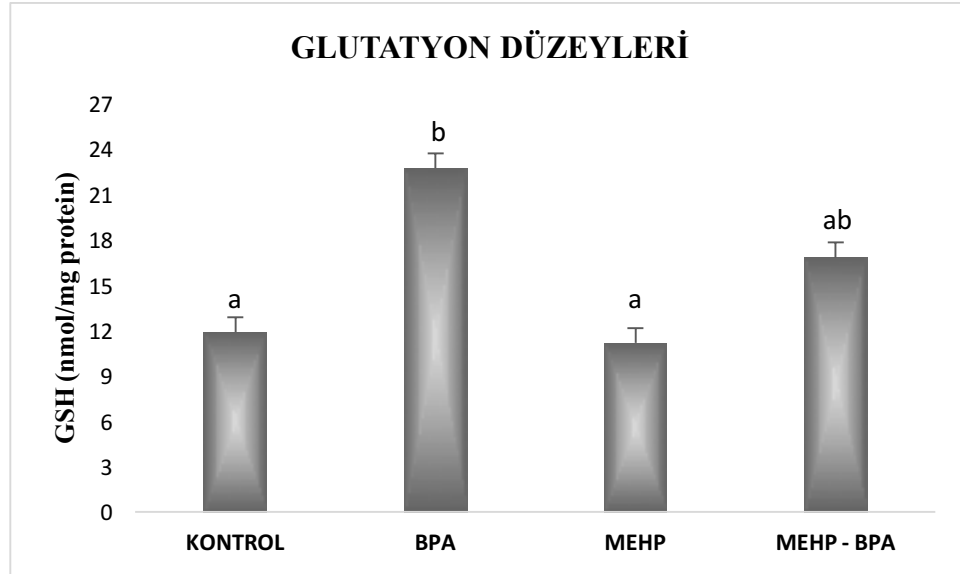
4.7. Total Glutasyon Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait total GSH düzeyleri Tablo 4.7 ve Şekil 4.9.'de verilmiştir. BPA grubunda total GSH düzeylerinin kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde arttığı (%91, $p < 0,05$) saptanmış; MEHP ve BPA+MEHP gruplarında istatistiksel olarak önemli bir değişiklik belirlenememiştir.

Tablo 4.7. Total Glutasyon Düzeyleri.

Çalışma Grupları	Glutasyon Düzeyleri (nmol/mg protein)
Kontrol	11,89 $\pm$ 0,8 ^a
BPA	22,72 $\pm$ 1,7 ^b
MEHP	11,16 $\pm$ 0,8 ^a
MEHP - BPA	16,81 $\pm$ 5,0 ^{ab}

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.9. Total Glutasyon Düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

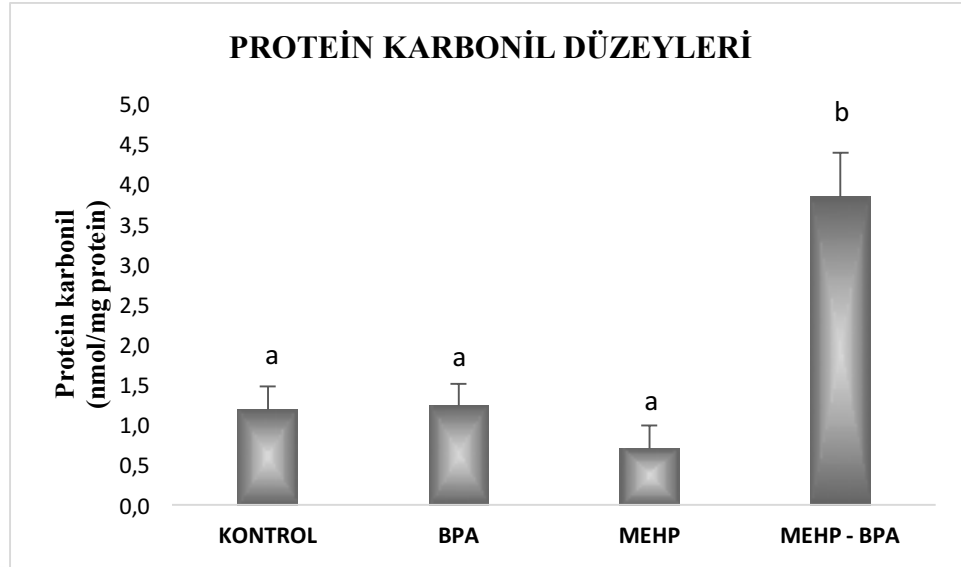
4.8. Protein Oksidasyonu

Çalışma gruplarına ait protein karbonil düzeyleri Tablo 4.8 ve Şekil 4.10.'de verilmiştir. MEHP - BPA grubunda karbonil düzeyleri kontrole oranla 2,2 kat artış göstermiştir ($p < 0,05$). Ayrıca kombine gruptaki karbonil düzeyleri BPA ve MEHP gruplarına göre (sırasıyla 2,1 ve 4,4 kat) yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). BPA ve DEHP gruplarında ölçülen karbonil düzeylerinde kontrole oranla anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır.

Tablo 4.8 Protein Karbonil Düzeyleri.

Çalışma Grupları	Protein Karbonil Düzeyleri (nmol/mg protein)
Kontrol	1,19 $\pm$ 0,3 ^a
BPA	1,24 $\pm$ 0,3 ^a
MEHP	0,71 $\pm$ 0,3 ^a
MEHP - BPA	3,84 $\pm$ 0,6 ^b

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.10. Protein Karbonil Düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

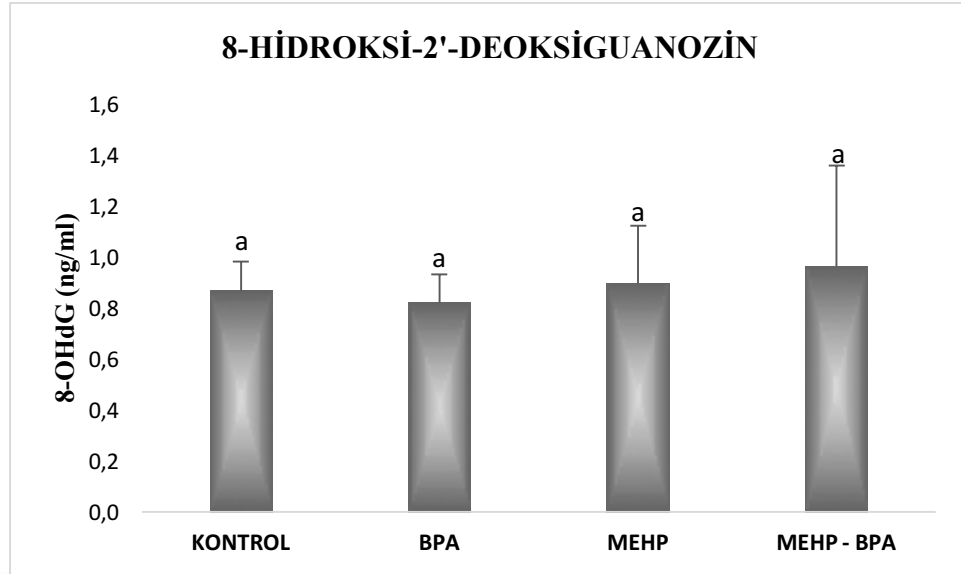
4.9. DNA Baz Lezyonu Ölçümleri

Oksidatif DNA baz hasarının tespiti için 8-OHdG düzeyleri ölçülmüş ve düzeyler Tablo 4.9. ve Şekil 4.11.'de verilmiştir. Bu verilere göre gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). Kontrole oranla MEHP - BPA grubunda %11 oranında bir artış görülmekle birlikte, istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Tablo 4.9. 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin Düzeyleri.

Çalışma Grupları	8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin Düzeyleri (ng/ml)
Kontrol	0,87 $\pm$ 0,1 ^a
BPA	0,82 $\pm$ 0,1 ^a
MEHP	0,90 $\pm$ 0,2 ^a
MEHP - BPA	0,96 $\pm$ 0,4 ^a

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.11. 8-OHdG Düzeyleri.

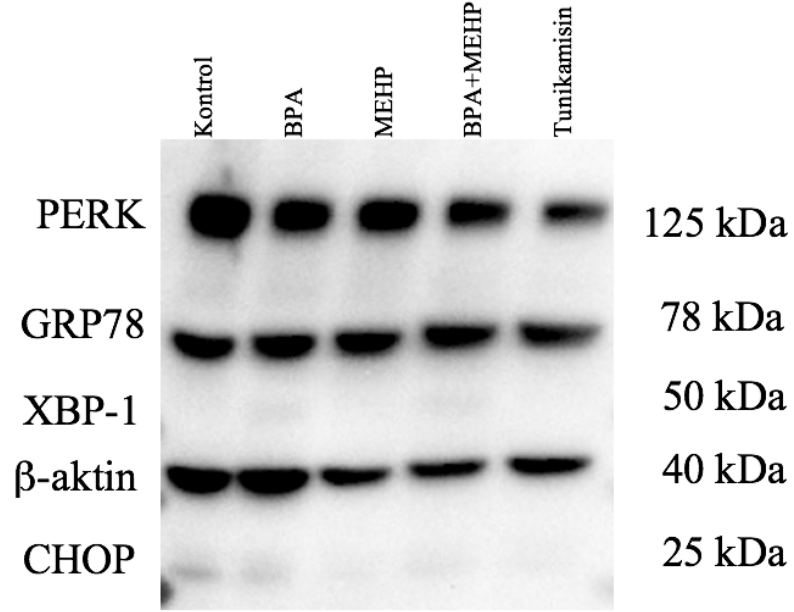
Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

4.10. Endoplazmik Retikulum Stresi

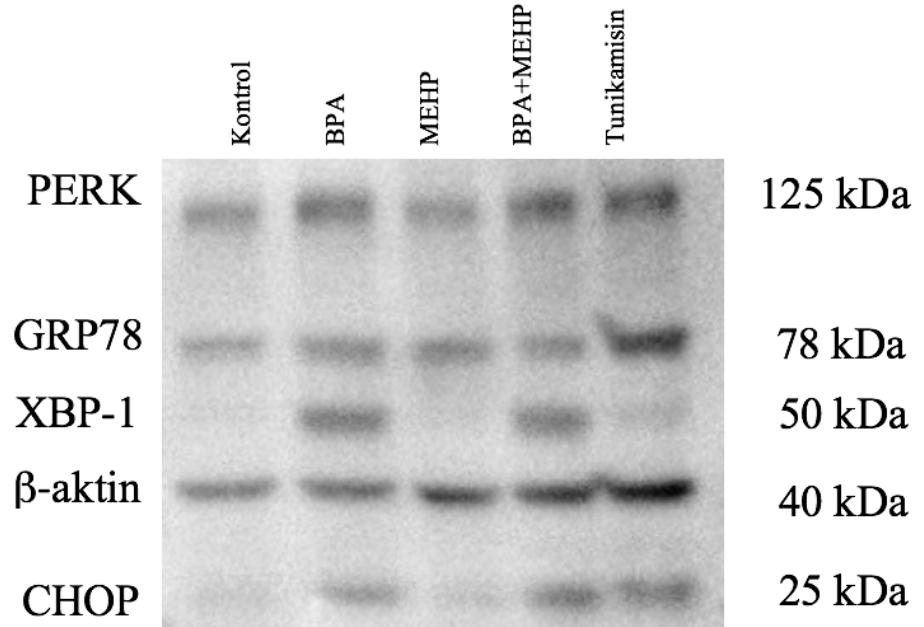
HepG2 hücrelerinden saflaştırılan proteinler, iki farklı alt fraksiyonda (sitozolik ve nükleer fraksiyon) tespit edilecek şekilde elde edilmiştir. ER stresinin farklı yollarında yer alan ve aktive olan proteinlerini tespit etmek için Western blotting yöntemi uygulanmıştır. PERK, GRP78, XBP-1 ve CHOP proteinleri yüksek özgüllükte antikorlar kullanılarak protein ekspresyonlarının düzeylerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Her bir fraksiyona ait ekspresyon profilleri ImageLab programı kullanılarak kantite edilmiştir (Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.).

Sitozolik Fraksiyon



Şekil 4.12. Western Blotting deneyi sonucunda ER yolağındaki proteinlerin sitozolik fraksiyondaki ekspresyonları

Nükleer Fraksiyon

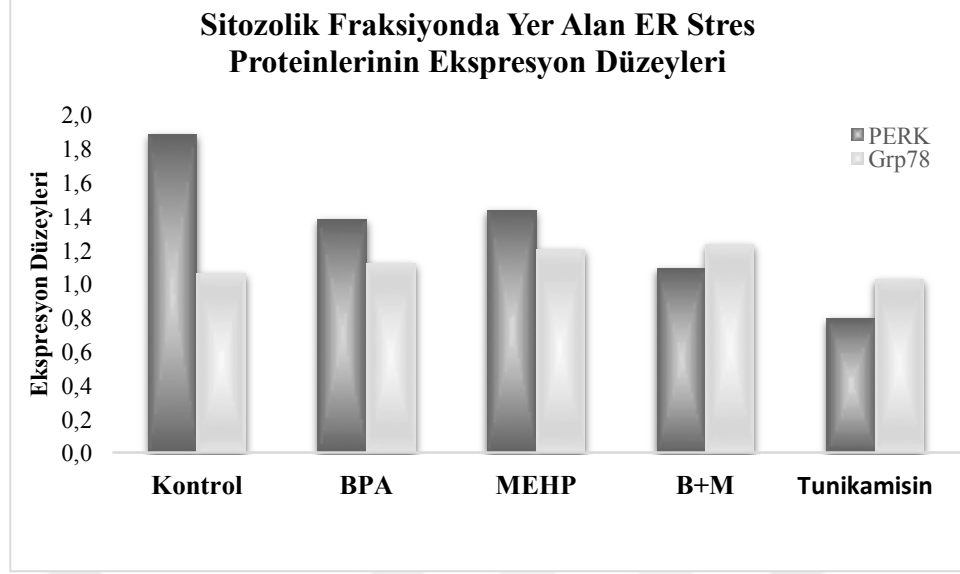


Şekil 4.13. Western Blotting deneyi sonucunda ER yolağındaki proteinlerin nükleer fraksiyondaki ekspresyonları

Ekspresyon düzeyleri belirlenmek istenen proteinler internal kontrol olarak β -aktin'e normalize edilmiştir. Uygulamaya maruz kalmamış HepG2 hücreleri deney kontrolü olarak belirlenmiştir. Deneyin pozitif kontrolü tunikamisin ile inkübe edilmiş HepG2 hücreleridir. Her bir uygulama grubu için β -aktine normalize edilmiş bulgular deney kontrolünün değerleri ile karşılaştırılmıştır. Sitozolik fraksiyonda sadece iki proteinin (PERK ve GRP78) eksprese edildiği görülmüştür. Bu proteinlerden PERK'in en yüksek ekspresyon düzeyini kontrol grubunda gösterdiği, buna karşılık 24 saatlik uygulama sonrasında tüm gruplarda kontrole kıyasla azalma olduğu görülmektedir. Pozitif kontrol olan tunikamisinde bu azalma % 57,9 oranıyla en çarpıcı şekilde öne çıkmaktadır. Bunun yanında BPA ve MEHP gruplarında kontrole kıyasla ekspresyon düzeyindeki azalma sırasıyla %26 ve %23,8'dir. BPA+MEHP'in beraber uygulandığı örneklerde ise 24 saatlik inkübasyon sonrasında PERK'in protein ekspresyonunun %41,8 oranında azaldığı görülmektedir. GRP78 proteininin ekspresyon profiline bakıldığında kontrole kıyasla hiçbir uygulama grubunda değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.14. ve Tablo 4.10.).

Tablo 4.10. ER stres yolağında sitozolik fraksiyonda yer alan proteinlerin ekspresyon düzeylerinin aktine normalize edilerek oranlanması sonucu elde edilen veriler.

	Kontrol	BPA	MEHP	BPA+MEHP	Tunikamisin
PERK	1,88	1,38	1,43	1,09	0,79
GRP78	1,06	1,12	1,20	1,23	1,03



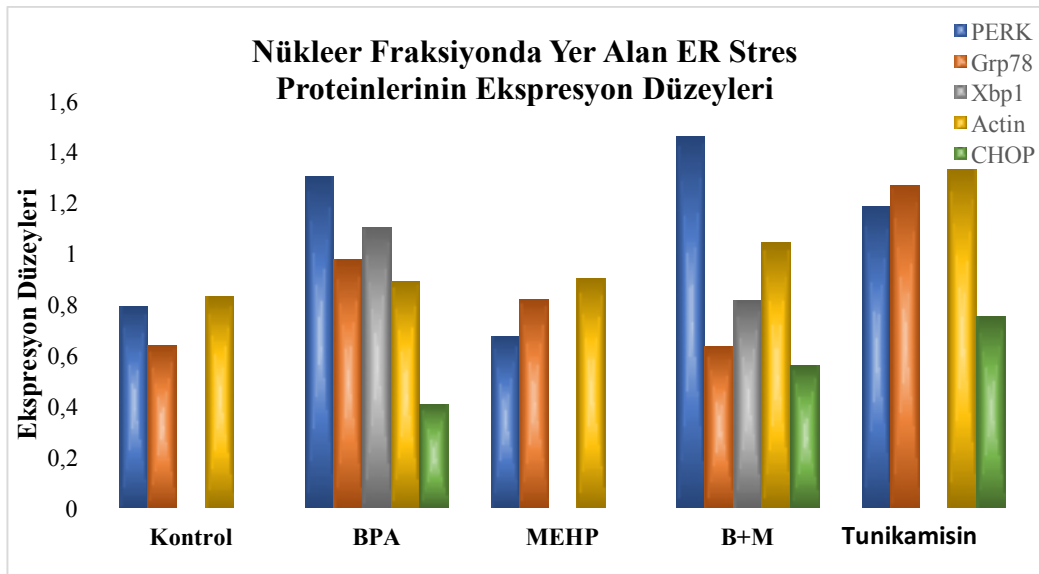
Şekil 4.14. Sitozolik fraksiyonda yer alan aktine normalize edilmiş ER stres yolağındaki proteinlerin ekspresyon düzey değişimleri

Nükleer fraksiyonda yer alan proteinlerden PERK'in kontrol grubuna kıyasla en yüksek ekspresyonu BPA+MEHP grubunda gösterdiği görülmektedir. BPA ve MEHP'in beraber uygulandığı HepG2 hücrelerinde PERK'in ekspresyon düzeyinde %85 oranında artış tespit edilmiştir. Bu artış tek başına BPA'nın uygulandığı grupta %65 olarak kaydedilirken, MEHP uygulaması sonrası sadece %15 civarında olması (Şekil 4.15. ve Tablo 4.11.) nükleer fraksiyonda PERK üzerindeki ekspresyon artışının BPA'dan kaynaklandığını kanıtlamaktadır. Pozitif kontrol olan tunikamisinin uygulaması sonrasında ekspresyon düzeyindeki artış sadece %50 olarak gözlenmiştir. GRP78 proteininin ekspresyon düzeyleri en yüksek değişimi tunikamisin uygulaması sonrasında göstermiştir (kontrole kıyasla %101 artış). BPA uygulaması sonrasında ekspresyon düzeyi %55 oranında artmıştır. Sitozolik fraksiyondan farklı olarak (Şekil 4.12 ve Şekil 4.14) nükleer fraksiyonda GRP78 kombine uygulama hariç tüm gruplarda artış göstermiştir. BPA ve MEHP'in beraber uygulandığı grupta kontrole kıyasla belirgin bir artış olmamıştır. Daha önce sitozolik fraksiyonda tespit edilemeyen XBP-1 ve CHOP proteinleri ise beklenildiği gibi nükleer fraksiyonda görülmüştür. XBP-1 proteini kontrol grubunda gözlenmemiştir. Bunun yanında tunikamisin uygulanan pozitif kontrol grubunda ve MEHP'in uygulandığı deney grubunda da gözlenmemiştir. BPA ve BPA+MEHP kombine uygulaması sonrasında ise belirgin bir artış gözlenmesi XBP-1 proteinine ait internal ER stres yolağının BPA tarafından

seçilimli olarak indüklendiğine işaret etmektedir. Benzer bir sonuç CHOP proteininde de elde edilmiştir (Şekil 4.13. ve Şekil 4.15.). Kontrol grubunda ve MEHP uygulanan grupta CHOP proteininin eksprese edilmediği gözlenmiştir. Tunikamisin uygulaması sonrasında β -aktine normalize edilmiş ekspresyon düzeyinde yaklaşık 75 kat artış kaydedilmiştir (Tablo 4.11.). XBP-1 proteininde olduğu gibi MEHP uygulaması sonrası CHOP proteininin tespit edilmemesi, buna karşılık BPA ve kombine uygulama sonrasında kontrole kıyasla sırasıyla % 40 ve % 56 oranında artış elde edilmesi CHOP proteinine ait nükleer fraksiyondaki aktivasyonun BPA tarafından yönlendirildiğine işaret etmektedir.

Tablo 4.11. ER stres yolağında nükleer fraksiyonda yer alan proteinlerin ekspresyon düzeylerinin aktine normalize edilerek oranlanması sonucu elde edilen veriler.

	Kontrol	BPA	MEHP	B+M	Tunikamisin
PERK	0,79	1,30	0,67	1,46	1,19
GRP78	0,64	0,98	0,82	0,64	1,27
XBP-1	0,00	1,10	0,00	0,82	0,00
Actin	0,83	0,89	0,90	1,04	1,33
CHOP	0,00	0,41	0,00	0,56	0,75

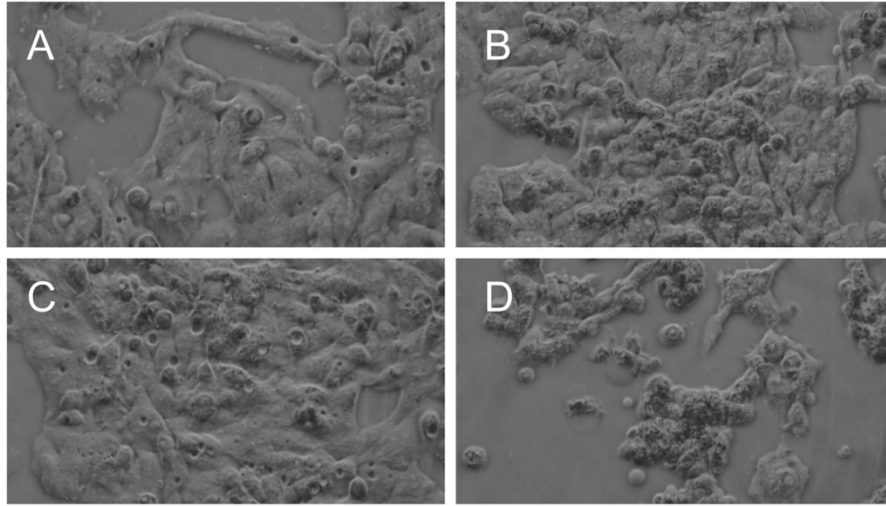


Şekil 4.15. Nükleer fraksiyonda yer alan aktine normalize edilmiş ER stres yolağındaki proteinlerin ekspresyon düzey değişimleri

4.11. Mikroskopik Bulgular

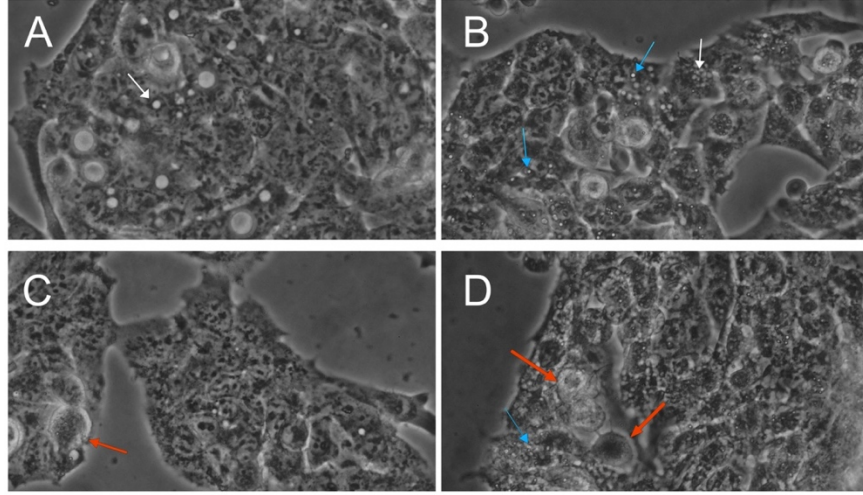
4.11.1. Faz Kontrast Mikroskobu Bulguları

Faz kontrast mikroskop ile yapılan incelemede, kontrol grubunda HepG2 hücre hattına ait hücreler tutunan ve monolayer halinde üreyen hücreler olarak izlenmiştir. Hücrelerin sitoplazmasında lipit damlacıkları izlenmiştir. BPA veya MEHP uygulaması sonrası hücrelerin sitoplazmasında vakuolizasyon gözlenmiştir. Vakuolizasyon BPA uygulanan grupta MEHP grubuna göre daha yüksek oranda görülmüştür. MEHP ve BPA'nın birlikte uygulandığı grupta hücre sayısında azalma, sitoplazmik vakuolizasyon ve komşu hücreler ile ve flask tabanı ile bağlantılarını koparmış yuvarlak dejenere hücreler gözlenmiştir (Şekil 4.16., Şekil 4.17.).



Şekil 4.16. HepG2 hücre hattına ait hücrelere BPA ve/veya MEHP uygulaması sonrası morfolojik değişiklikler I.

MEHP ve BPA birlikte uygulanan grupta tutunan hücre sayısı belirgin olarak azalmıştı. A- Kontrol, B- BPA, C- MEHP, D- MEHP ve BPA birlikte uygulaması X10.



Şekil 4.17. HepG2 hücre hattına ait hücrelere BPA ve/veya MEHP uygulaması sonrası morfolojik değişiklikler II.

A- Kontrol grubunda tutunan ve monolayer halinde üreyen HepG2 hücrelerinde sitoplazmada lipit damlacıkları (beyaz ok), B- BPA uygulanan grupta HepG2 hücrelerinde lipit damlacıkları (beyaz ok) yanısıra sitoplazmada vakuoller (mavi ok) ve yer yer komşu hücreler ile bağlantılarını kopartmış dejenere yuvarlak hücreler C- MEHP uygulanan grupta birkaç dejenere hücre (kırmızı ok); D- MEHP ve BPA birlikte uygulanan grupta artmış vakuolizasyon ve dejenere hücreler izlenmektedir X20.

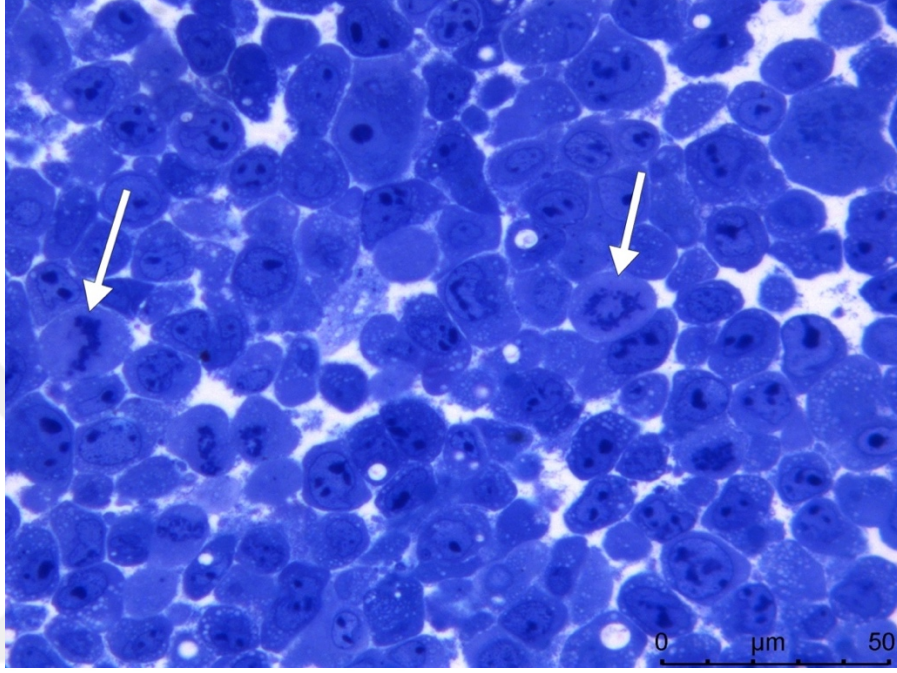
4.11.2. Işık Mikroskobu Bulguları

Işık mikroskobunda HepG2 hücrelerinin incelemesinde belirgin çekirdekçikler ve yuvarlak çekirdekler gözlenmiştir. HepG2 hücrelerinde çekirdek sitoplazma oranının çekirdek lehine arttığı gözlenmiştir. Hücrelerin genelde mitotik bölünmenin metafaz ve anafaz evresine ait olduğu görülmüştür. Birkaç hücrenin sitoplazmasında yuvarlak geniş boşlukların varlığı izlenmiştir (Şekil 4.18.).

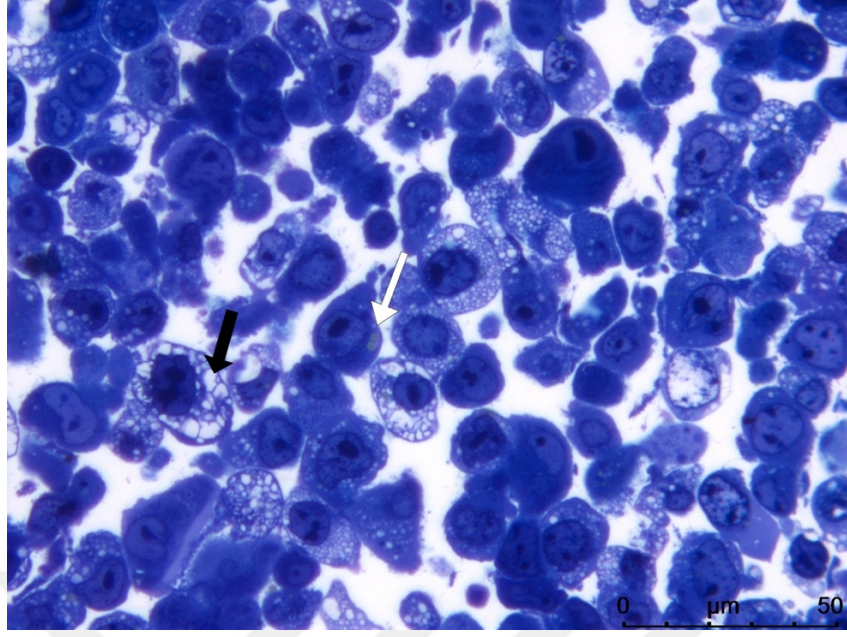
BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin ışık mikroskobunda incelemesinde hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir. Yer yer nekrotik hücreler ve hücre artıkları da izlenmiştir. Bazı hücrelerin sitoplazmasında lipit damlacıkları izlenirken, birçok hücrede sitoplazmanın vakuoller ile dolu olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.19., Şekil 4.20.).

MEHP uygulanan HepG2 hücre hattına ait hücreler kontrol grubundaki hücrelere benzer görünümde izlenmiştir. Ancak, bu grupta bazı hücrelerde sitoplazmadaki boşlukların oldukça büyük olduğu ve yer yer çekirdeği sitoplazmanın kenarına ittiği gözlenmiştir. Mitotik figür gözlenmemiştir (Şekil 4.21.).

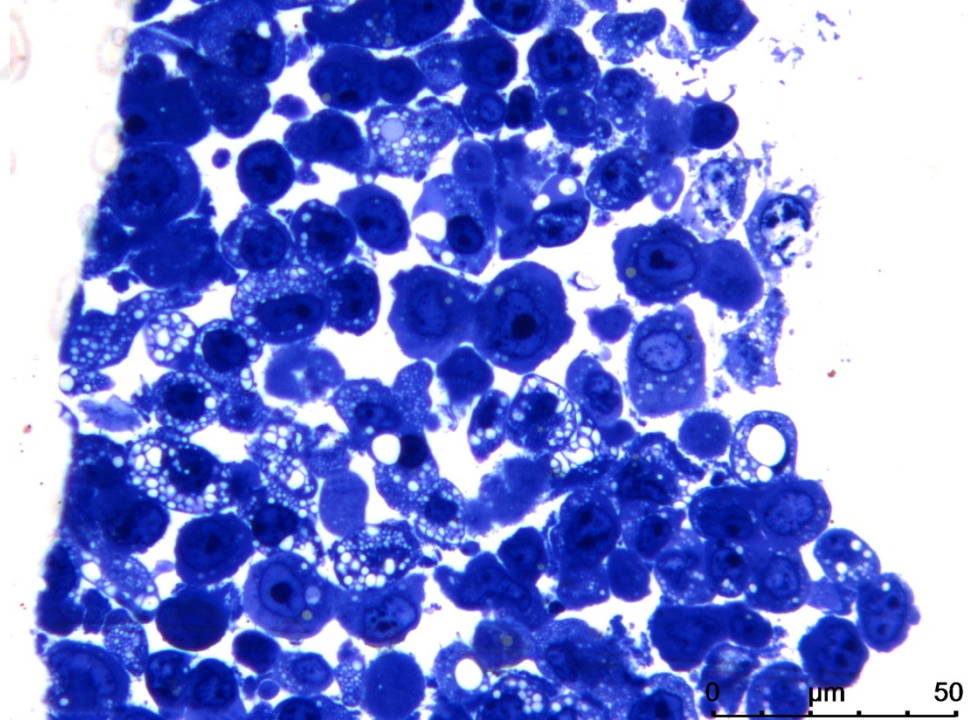
MEHP ve BPA'nın birlikte uygulandığı grupta ise, hücre sayısının diğer gruplara göre azaldığı izlenmiştir. BPA grubuna benzer şekilde hücre artıkları ve dejenere hücreler gözlenmiştir. İncelenen hücrelerin hepsinin sitoplazmasının vakuollerle dolu olduğu görülmüştür (Şekil 4.22.).



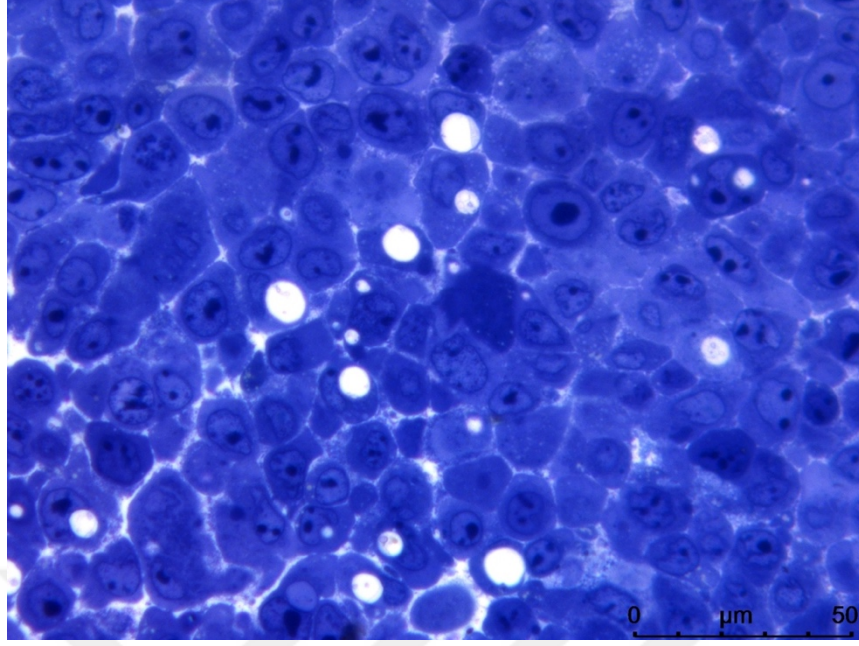
Şekil 4.18. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinin ışık mikrosafı. Belirgin çekirdekçik, yuvarlak çekirdekleri ile HepG2 hücreleri izlenmektedir. Çekirdek sitoplazma oranının çekirdek lehine arttığı gözlenmektedir. Mitozun çeşitli evrelerinde HepG2 hücreleri (ok) gözlenmektedir. Birkaç hücre sitoplazmasında yuvarlak geniş boşluklar izlenmektedir. (Metilen mavisi-Azur II X630).



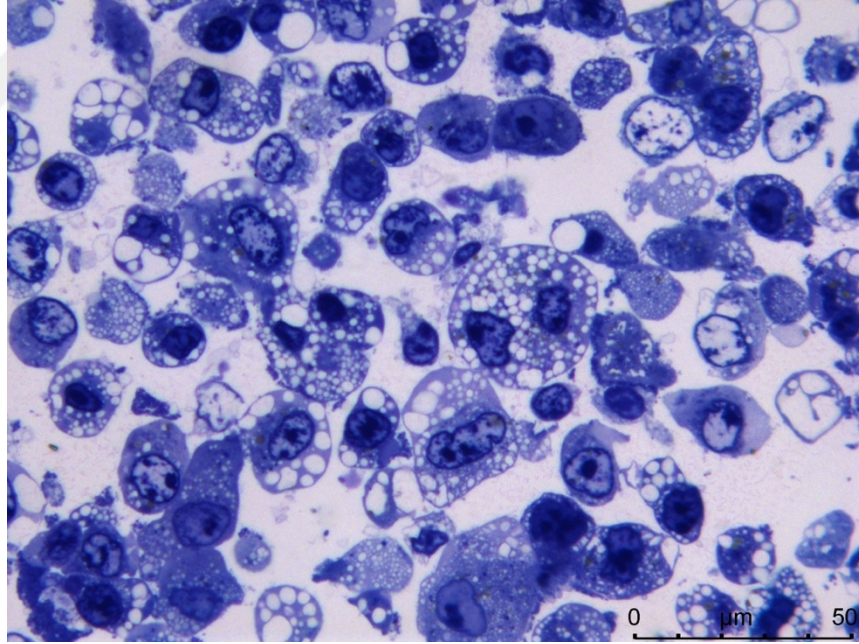
Şekil 4.19. BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin ışık mikrografı I. Hücre sayısının azaldığı, hücreler arasında yer yer hücre artıkları ve dejenere hücreler izlenmektedir. Bazı hücrelerin sitoplazmasın lipid damlacıkları (beyaz ok), birçok hücrenin sitoplazmanın vakuoller (siyah ok) ile dolu olduğu gözlenmektedir. (Metilen mavisi-Azur II X630).



Şekil 4.20. BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin ışık mikrografı II. Hücrelerin sitoplazmasında lipid damlacıkları ve vakuoller izlenmektedir. (Metilen mavisi-Azur II X630).



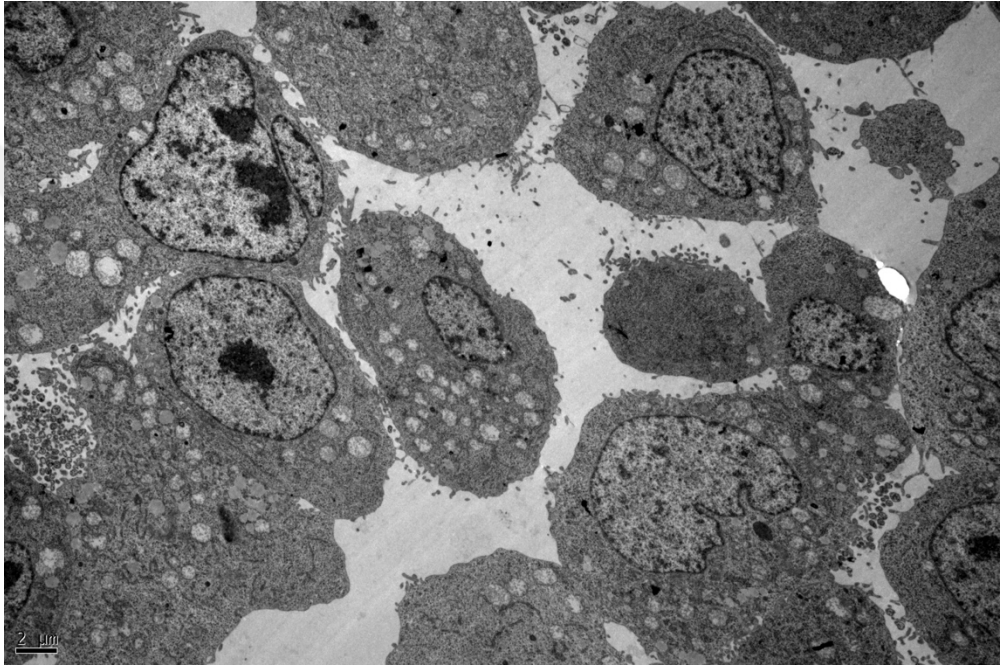
Şekil 4.21. MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin ışık mikrografı. Bazı hücrelerde sitoplazmada oldukça büyük boşluklar izlenmektedir. (Metilen mavisi-Azur II X630)



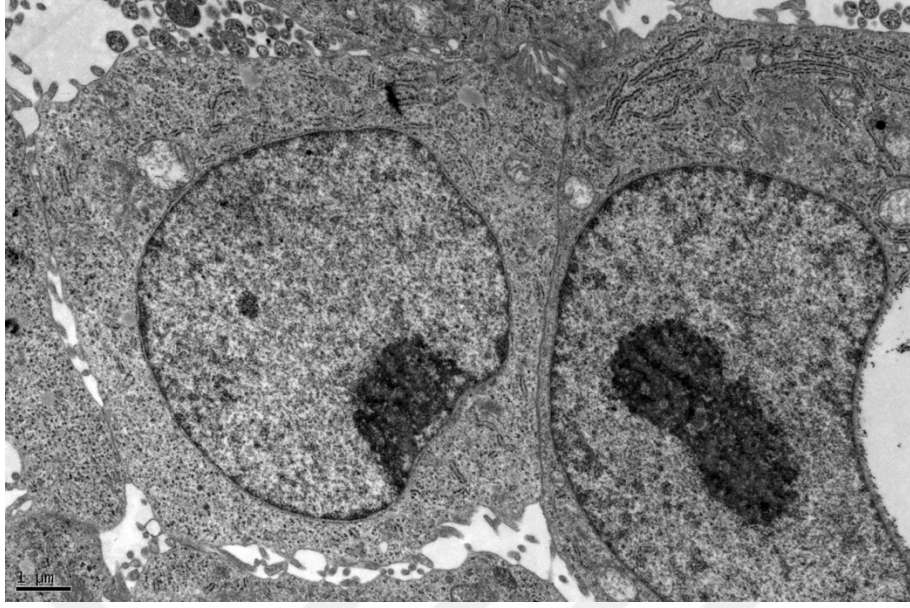
Şekil 4.22. MEHP ve BPA'nın birlikte uygulandığı HepG2 hücrelerinin ışık mikrografı. Azalmış hücre sayısı, hücre artıkları ve nekrotik hücreler izlenmektedir. HepG2 hücrelerinin hepsinin sitoplazmasının vakuollerle dolu olduğu gözlenmektedir. (Metilen mavisi-Azur II X630).

4.11.3. Elektron Mikroskobu Bulguları

HepG2 hücre hattının elektron mikroskopta incelemesinde hücrelerin mikrovillusları, ortada yerleşmiş ökromatik çekirdekleri, belirgin çekirdekçikleri, sitoplazmada mitokondriyon, granüllü ER, lipid damlacıkları, glikojen tanecikleri gözlenmiştir (Şekil 4.23.- 4.27). HepG2 hücrelerinin birbirleri ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Birkaç hücre bir araya gelerek dokudaki safra kanalikulunu taklit eden boşluklar oluşturmuştur (Şekil 10). HepG2 hücreleri polarite göstermişlerdir.

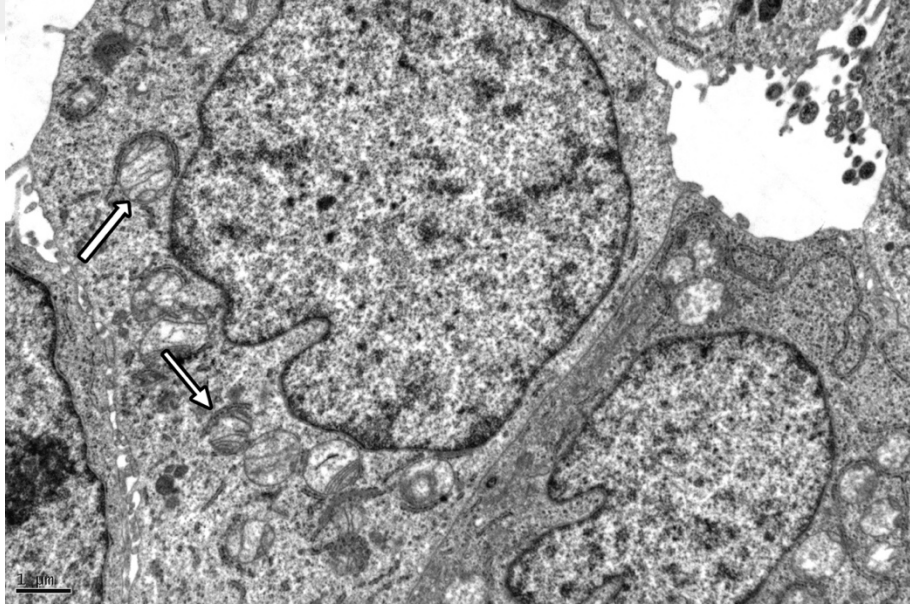


Şekil 4.23. HepG2 hücre hattının elektron mikroskopta incelemesi I. Hücrelerin mikrovillusları, belirgin çekirdekçik içeren ökromatik çekirdek ve çevresinde sitoplazmada izlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X 4000).



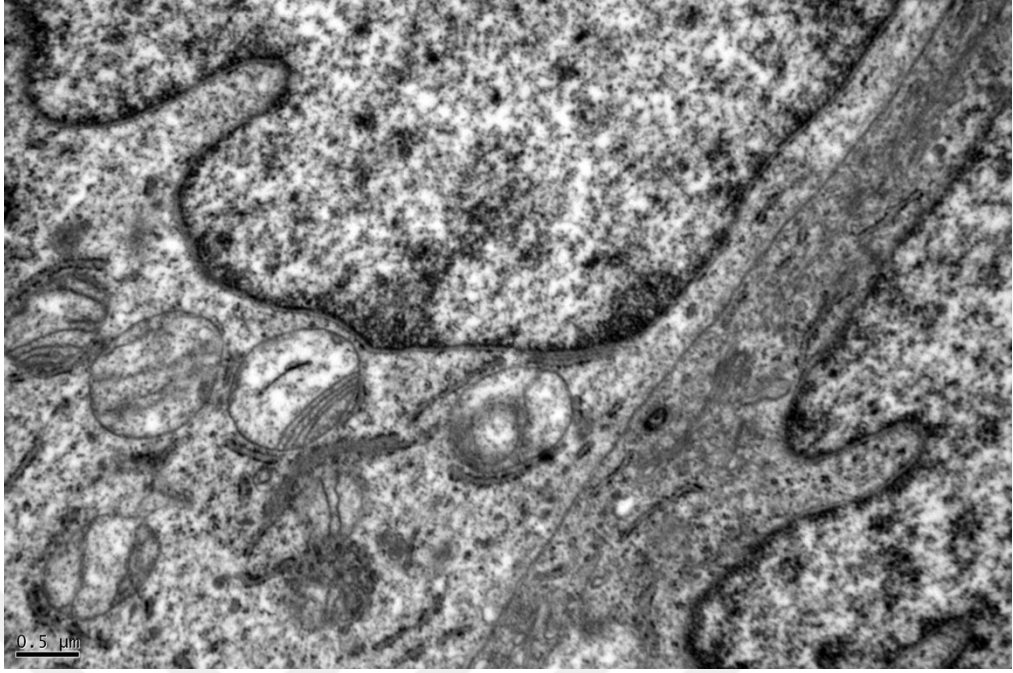
Şekil 4.24. HepG2 hücre hattının elektron mikroskopta incelemesi II.

HepG2 hücre hattına ait hücreler daha büyük büyütmede hücre kenarında mikrovillüsleri, ortada yerleşmiş ökromatik çekirdekleri, belirgin çekirdekçikleri, perinükleer aralık ile normal yapıda izlenmektedir. Sitoplazmada mitokondriyon, granüllü ER, glikojen tanecikleri gözlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X12 000).

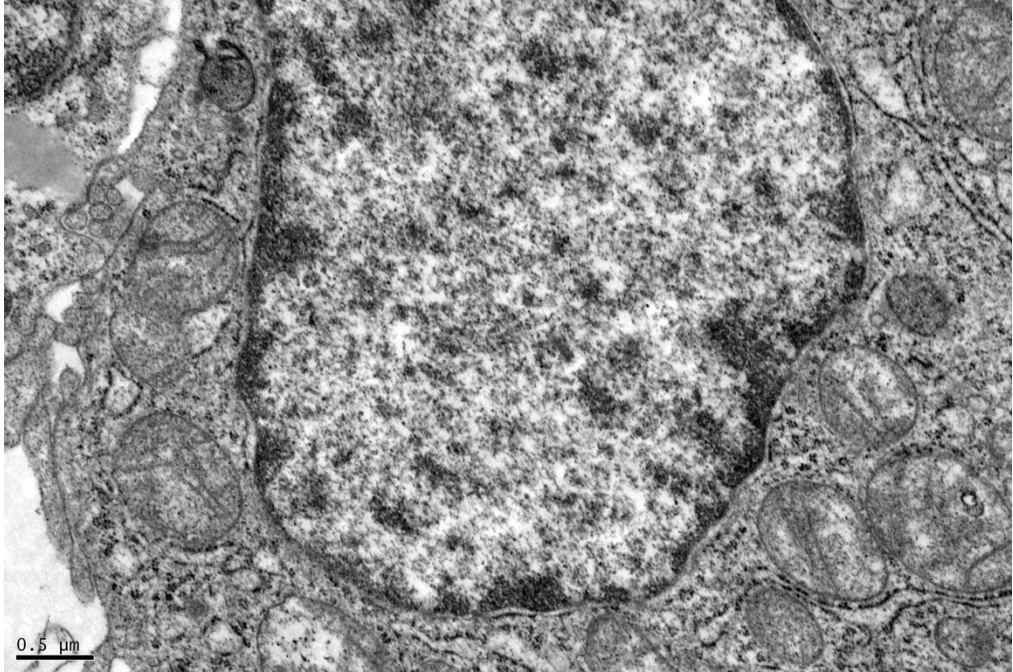


Şekil 4.25. HepG2 hücre hattının elektron mikroskopta incelemesi III.

HepG2 hücre hattına ait hücrede sitoplazmada kristalları korunmuş mitokondriyonlar (ok), granüllü ER, glikojen tanecikleri gözlenmektedir. Hücrelerin birbirleri ile bağlantı yaptıkları ve bir araya gelerek dokudaki safra kanalikülünü taklit eder boşluk oluşturduğu mikrografın sağ üst tarafında gözlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X12 000).

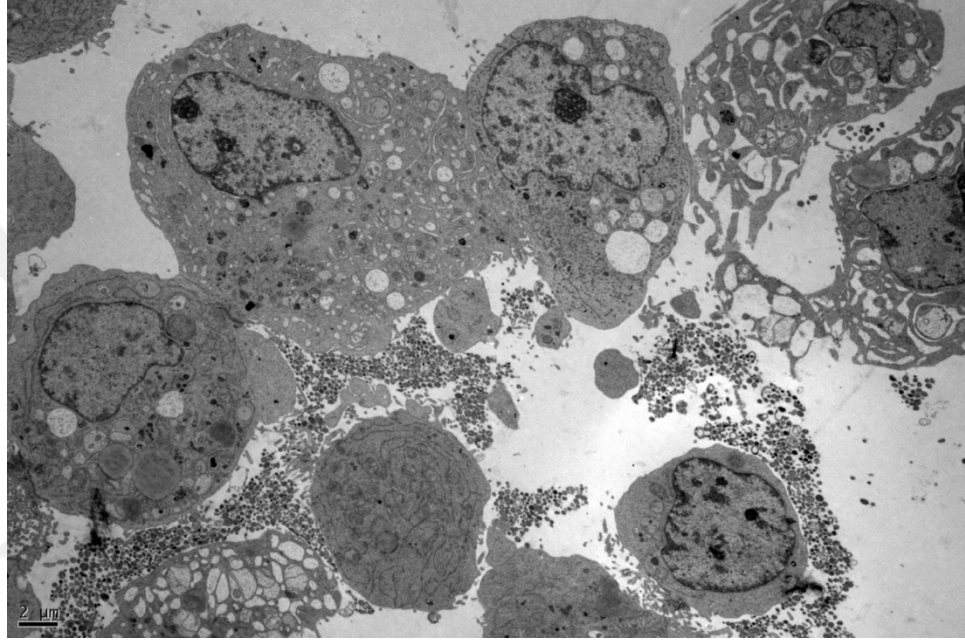


Şekil 4.26. HepG2 hücre hattının elektron mikroskopta incelemesi IV. Daha büyük büyütmede çekirdek çevresinde perinükleer aralık, kristalleri korunmuş mitokondriyumlar ve granüllü ER, glikojen tanecikleri komşu hücre sitoplazmasında düz endoplazma retikulumu izlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X 25 000).



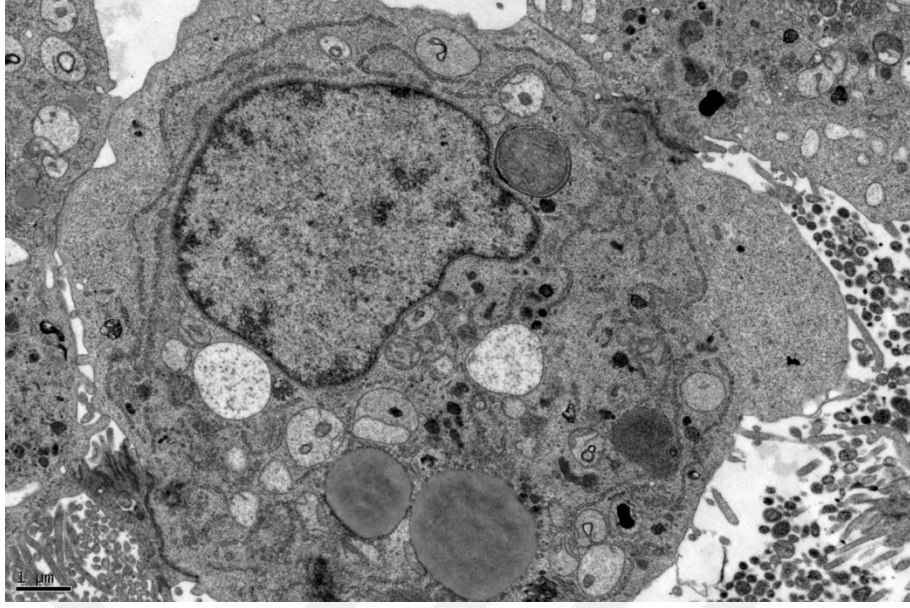
Şekil 4.27. HepG2 hücre hattının elektron mikroskopta incelemesi V. HepG2 hücresinde çok sayıda mitokondriyum, granüllü ER, glikojen tanecikleri, komşu hücrede sitoplazmada lipit damlacıkları izlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X 30 000).

BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskobunda incelemesinde hücrelerin mikrovillusları oldukça azalmıştır. Bazı hücrelerde gözlenmemiştir. Hücrelerin sitoplazmasında granüllü ER yanı sıra çok sayıda iri vakuoller, lipid damlacıkları gözlenmiştir. Bazı mitokondriyumların irileştiği, bazılarının membran ile çevrili olduğu ve otofajiye gittiği gözlenmiştir. Bazı hücrelerin sitoplazmasının genişlemiş düz ER ile dolu olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.28.- 4.32.).



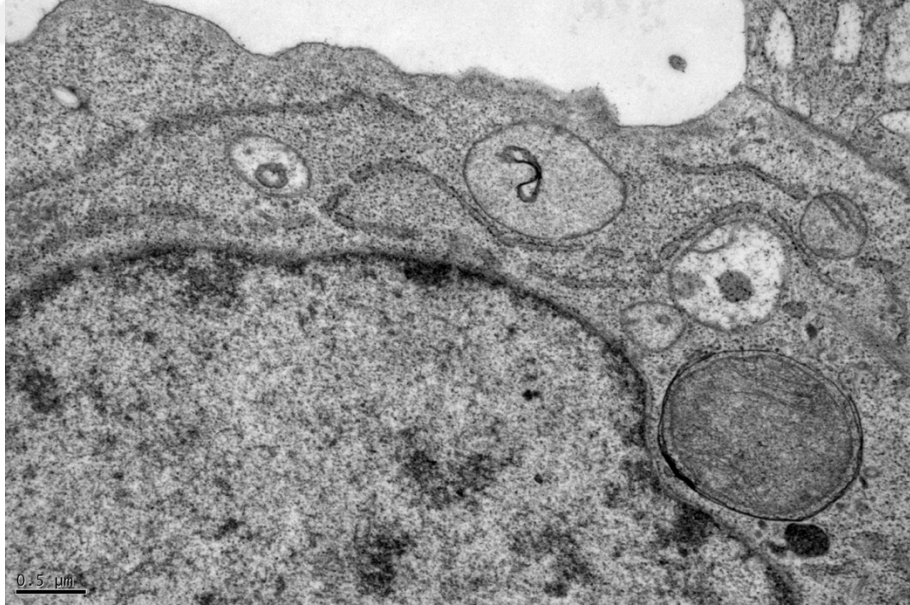
Şekil 4.28. BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskobunda incelemesi I.

BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikrografında hücrelerden uzanan mikrovilluslar gözlenmemekte, hücrelerin arasında öbek halinde kopmuş olarak izlenmektedir. Hücrelerin sitoplazmasında çok sayıda iri vakuoller, lipid damlacıkları ve genişlemiş düz ER gözlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X 4000)



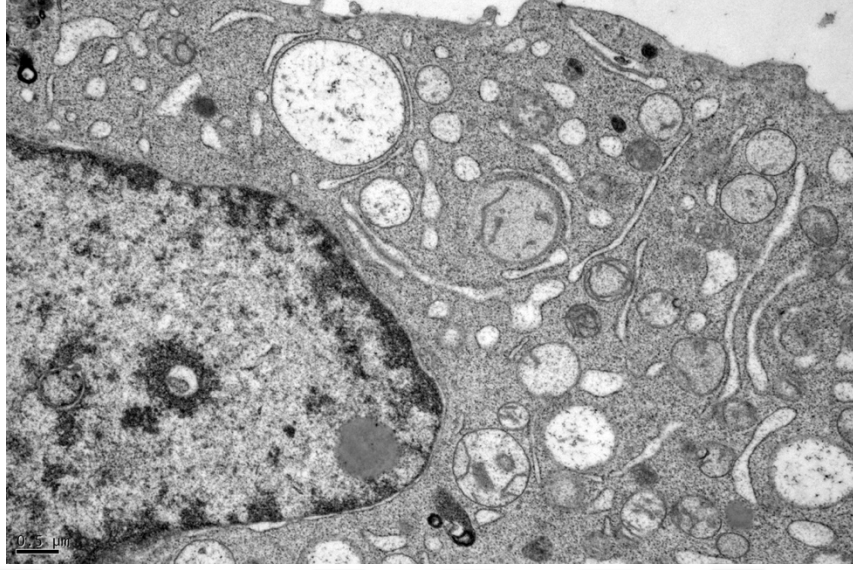
Şekil 4.29. BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi II.

BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesinde sitoplazmasında granüllü ER, iri vakuoller, lipid damlacıkları gözlenmektedir. Bazı mitokondriumlarda krista kaybı bazı mitokondriyumların membran ile çevrili olduğu ve otofajiye gittiği izlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X12 000)



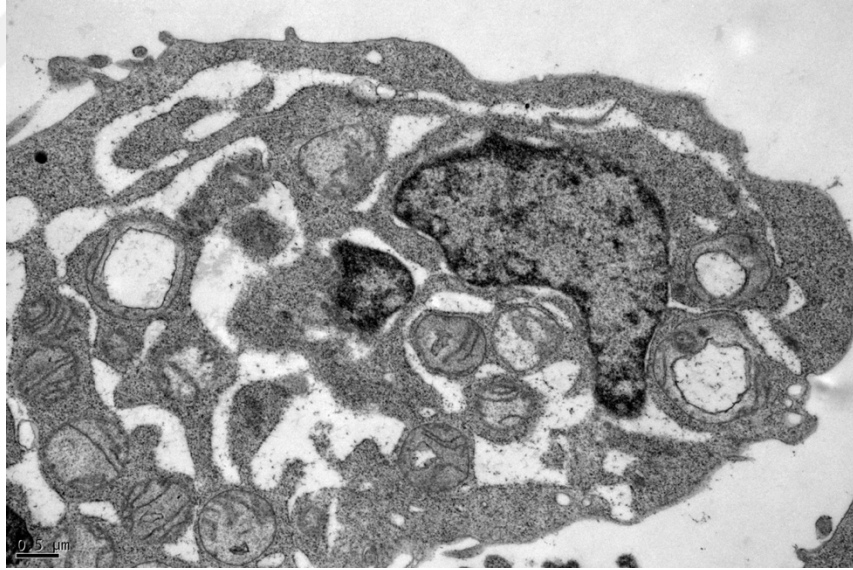
Şekil 4.30. BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi III.

BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin daha büyük büyütmesinde perinükleer aralık normal genişlikte, komşuluğundaki sitoplazmada granüllü endoplazma retikulumu, membran ile çevrili yapılar gözlenmektedir (Uranil asetat-Kurşun sitrat X30 000)



Şekil 4.31. BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi IV.

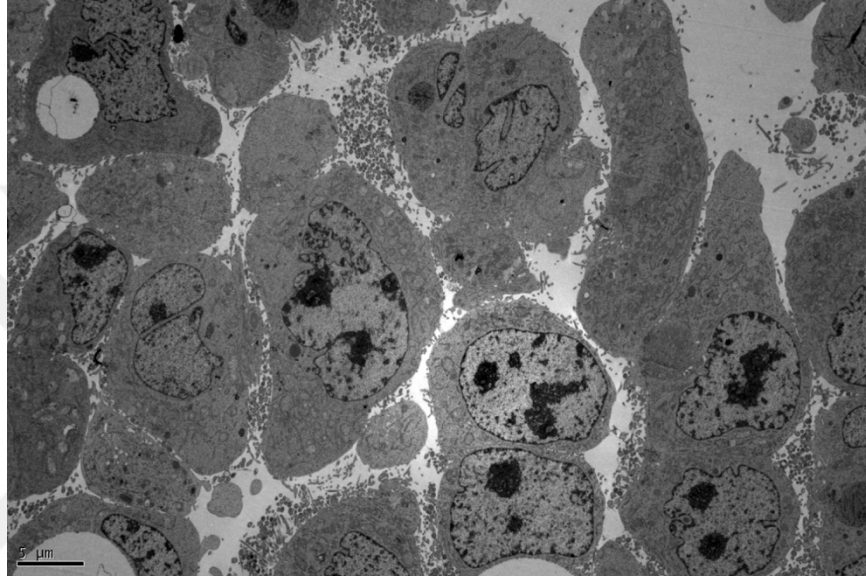
BPA uygulanan HepG2 hücresinde yer yer perinükleer aralıkta genişleme, sitoplazmada genişlemiş düz ER, iri vakuoller, lipit damlacıkları gözlenmektedir. Çekirdek içinde de lipit damlacığı izlenmektedir. Mitokondriyumlarda krista kaybı gözlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X20 000)



Şekil 4.32. BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi V.

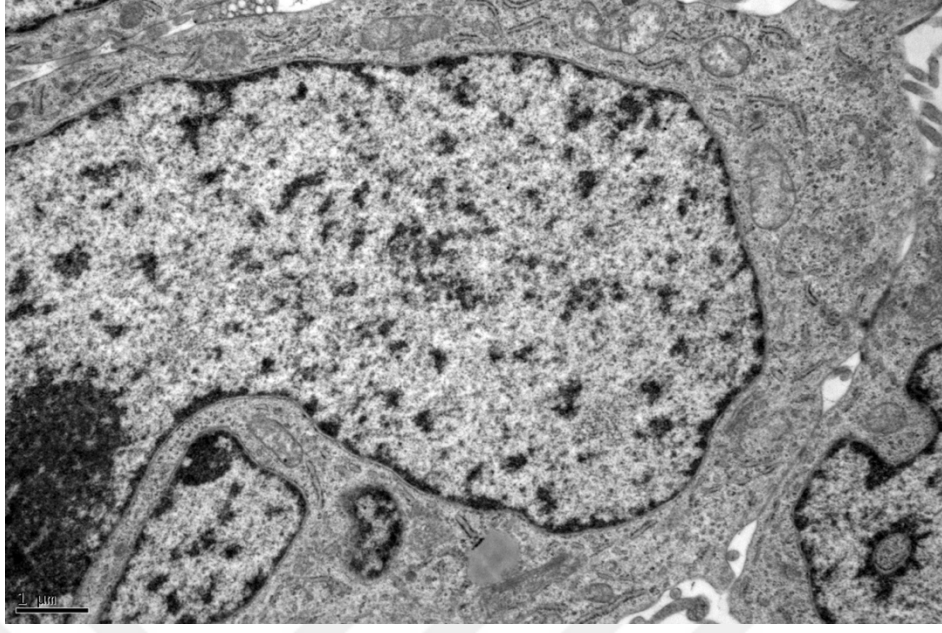
BPA uygulanan HepG2 hücresinde yer yer perinükleer aralıkta genişleme, sitoplazmada oldukça genişlemiş düz ER, genişlemiş alanlar arasında kalan sitoplazmada mitokondriyumlar, membran ile çevrili organeller gözlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X20 000)

MEHP uygulanan HepG2 hücre hattına ait hücrelerin elektron mikroskobu incelemesinde hücrelerin sitoplazmasında granüllü ER hemen komşuluğunda mitokondriyumlar, düz endoplazma retikulumu, glikojen granülleri, lipid damlacıkları, lizozomlar gözlenmiştir. Bazı hücrelerde granüllü ER’de genişleme, bazı mitokondriyonlarda yer yer krista kaybı izlenmiştir (Şekil 4.33.- 4.38). MEHP uygulanan gruptaki hücreler kontrol grubuna benzemektedir.



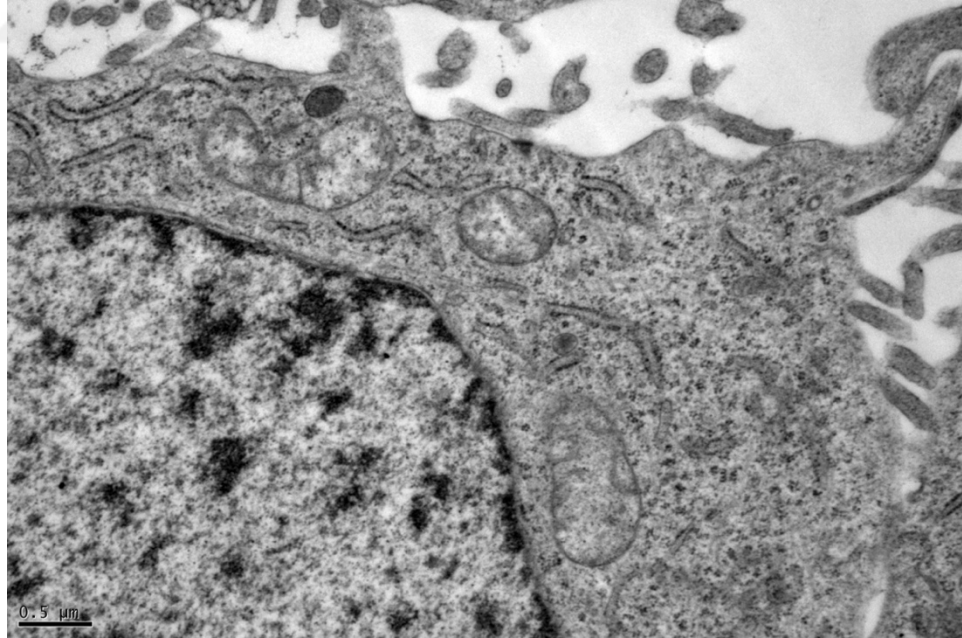
Şekil 4.33. MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskobunda incelemesi I.

MEHP uygulanan grupta elektron mikroskopta ökromatik çekirdek belirgin çekirdekçik ve hücrelerden uzanan mikrovilluslar ile HepG2 hücre hattına ait hücreler izlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X3000)



Şekil 4.34. MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi II.

MEHP uygulanan HepG2 hücre hattına ait hücrelerin elektron mikroskopta incelemesinde hücrelerin sitoplazmasında granüllü ER hemen komşuluğunda kristalleri korunmuş mitokondriyumlar, düz endoplazma retikulumu, glikojen granülleri, lipid damlacıkları gözlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X 15 000)



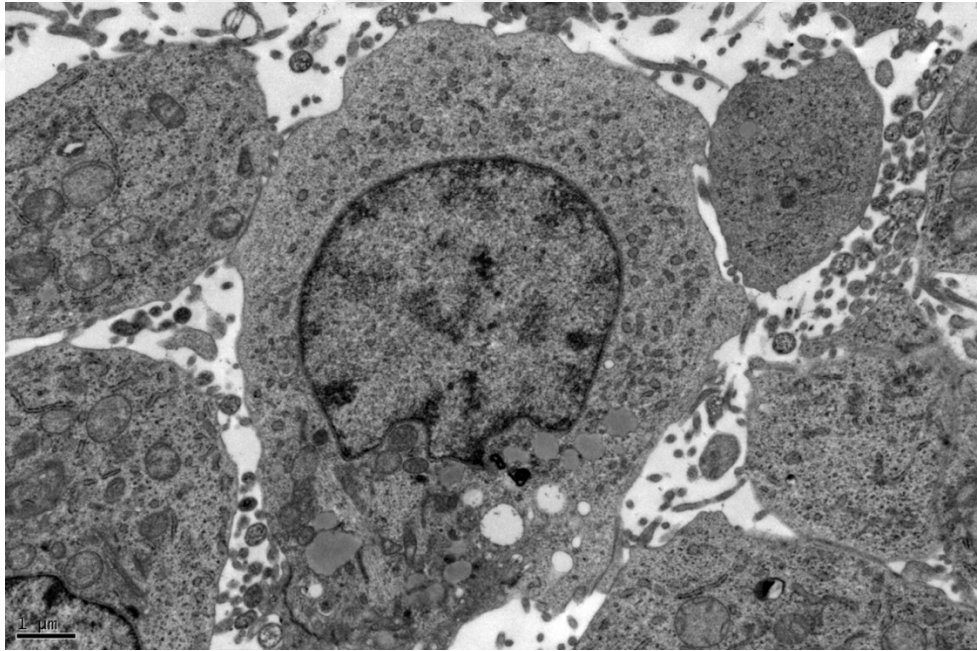
Şekil 4.35. MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi III.

MEHP uygulanan grupta HepG2 hücresi sitoplazmasında ER, hemen yanında mitokondriyumlar gözlenmektedir (Uranil asetat-Kurşun sitrat X30 000)



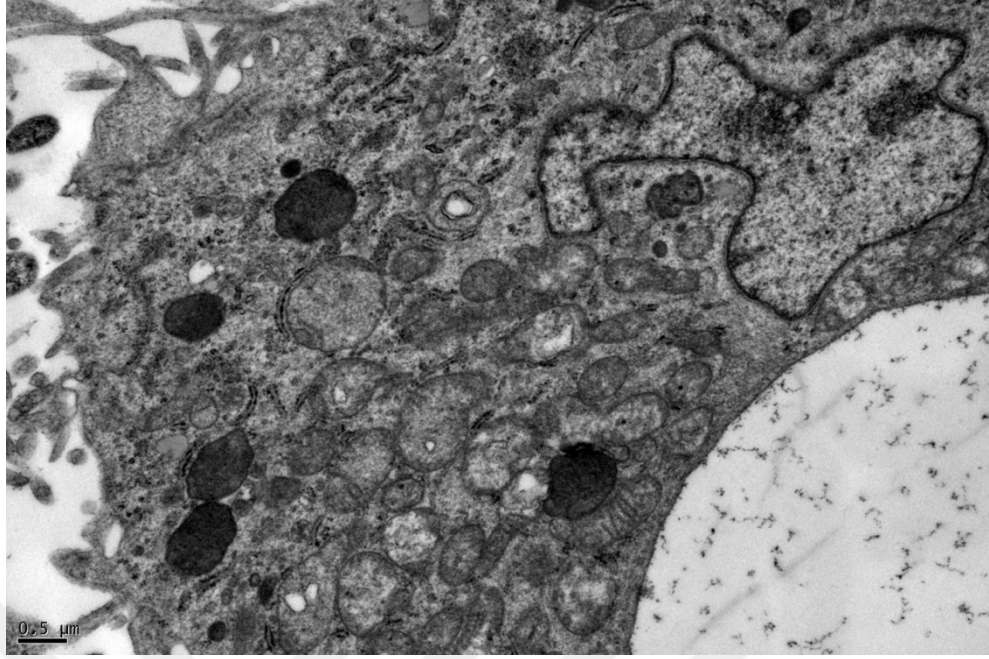
Şekil 4.36. MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi IV.

MEHP uygulanan grupta HepG2 hücresi sitoplazmasında granüllü ER, düz endoplazma retikulumu, glikojen granülleri izlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X 30 000)



Şekil 4.37. MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi V.

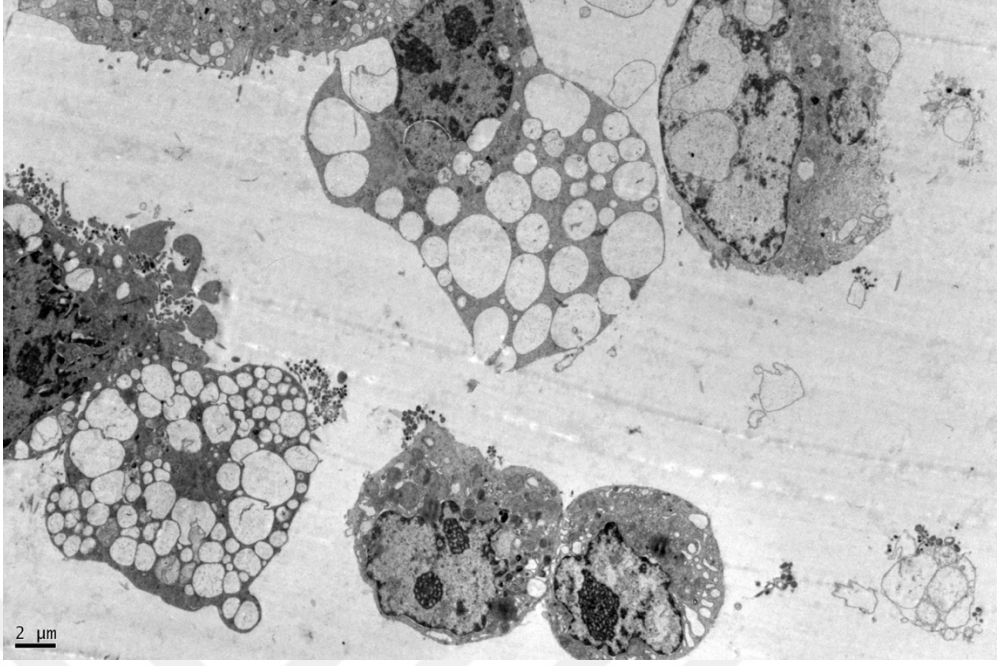
MEHP uygulanan HepG2 hücre hattına ait hücrelerin elektron mikroskop altında incelemesinde lipid damlaları, vakuoller, genişlemiş ER gözlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X12 000)



Şekil 4.38. MEHP uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi VI.

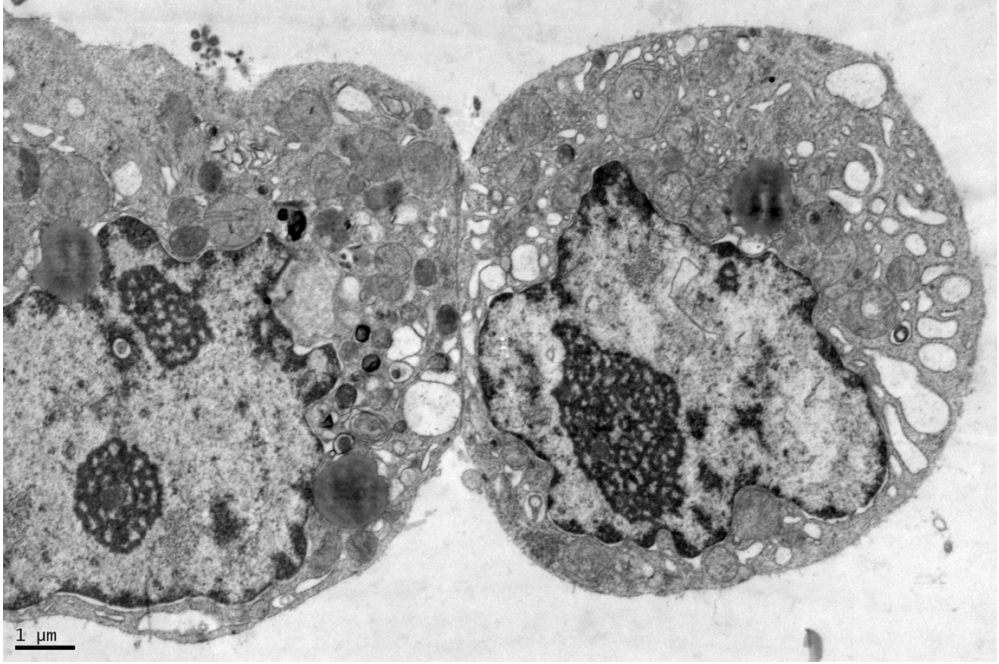
MEHP uygulanan grupta HepG2 hücre sitoplazmasında granüllü ER, hemen yanında mitokondriyumlar, glikojen granülleri, lizozomlar gözlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X20 000)

MEHP ve BPA'nın birlikte uygulandığı grubun elektron mikroskop incelemesinde hücrelerde mikrovillus ve polarite kaybı izlenmiştir. HepG2 hücrelerinin çekirdek şeklinde deformeite gözlenmiştir. Hücrelerin sitoplazmasında iri vakuoller saptanmıştır. Bazı hücrelerin sitoplazması bu iri vakuoller ile doludur. Bazı hücrelerde ise vakuoller yanısıra mitokondriyumlar, genişlemiş düz endoplazma retikulumu, lipit damlaları, myelin figürler izlenmiştir (Şekil 4.39.- 4.44.). Mitokondriyumlarda irileşme, bazı mitokondriyonların uç kısmında tomurcuklanma tarzında uzama gözlenmiştir. Hücre dejenerasyonun en şiddetli olduğu grup MEHP+BPA uygulanan grup olarak belirlenmiştir.



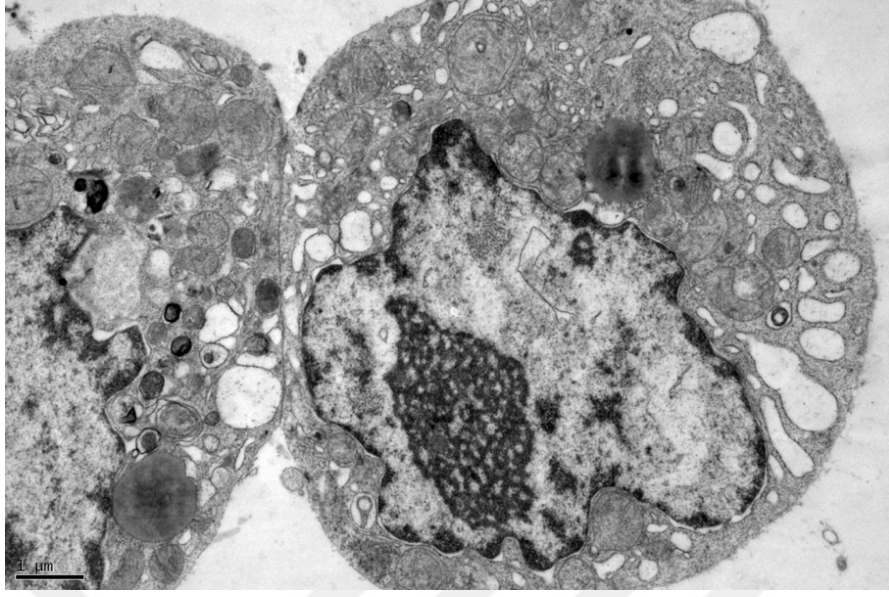
Şekil 4.39. MEHP ve BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi I.

MEHP ve BPA'nın birlikte uygulandığı grupta sitoplazması iri vakuoller ile dolu hücreler izlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X4000)



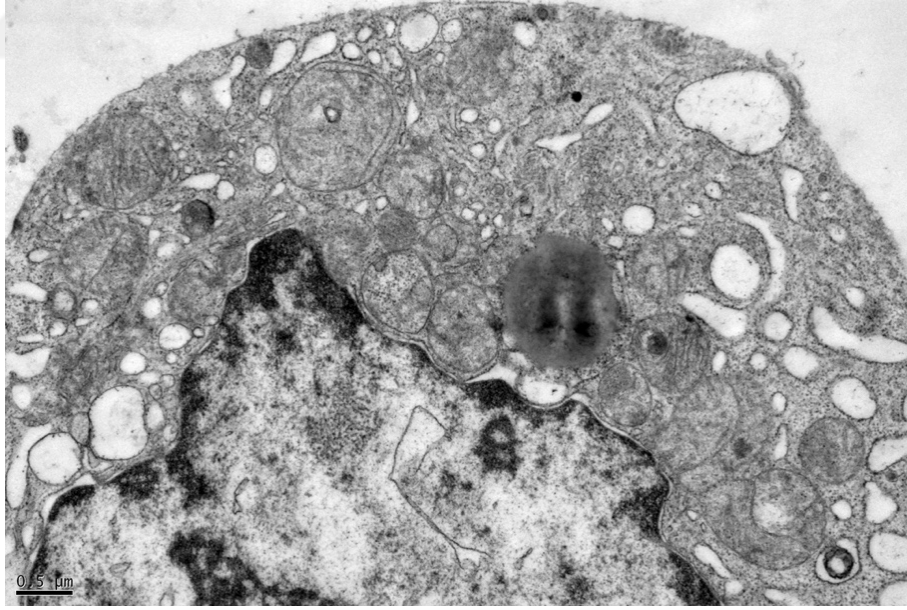
Şekil 4.40. MEHP ve BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi II.

MEHP ve BPA'nın birlikte uygulandığı grupta yanyana iki HepG2 hücresinde deforme şekilde çekirdek, çekirdek çevresinde perinükleer aralıkta genişleme, sitoplazmada genişlemiş düz ER, mitokondriyumlar, lipid damlacıkları, myelin figürler izlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X12 000)



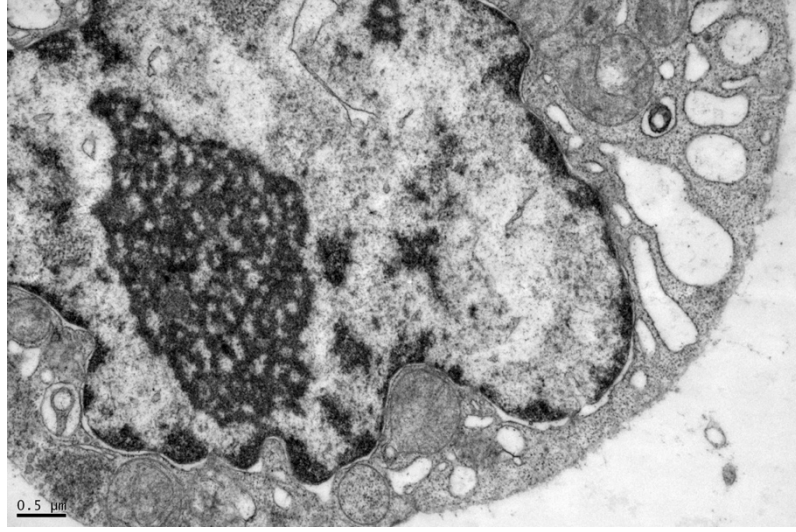
Şekil 4.41. MEHP ve BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskobunda incelemesi III.

MEHP ve BPA'nın birlikte uygulandığı grupta yanyana HepG2 hücrelerinde belirgin çekirdek içeren çekirdek, çekirdek çevresinde perinükleer aralıkta genişleme, sitoplazmada genişlemiş düz ER, kristalleri ile mitokondriyumlar, lipid damlacıkları, myelin figürler, vakuoller izlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X15 000)



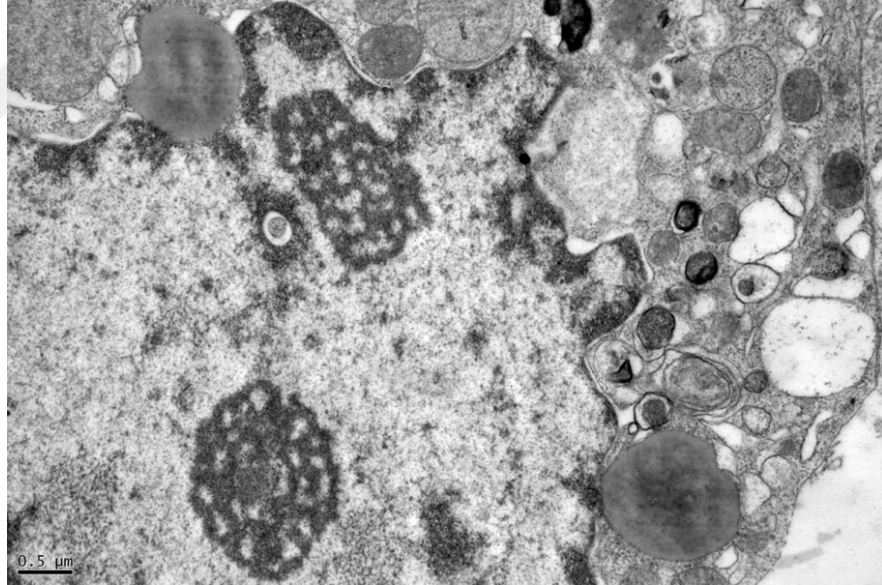
Şekil 4.42. MEHP ve BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskobunda incelemesi IV.

MEHP ve BPA'nın birlikte uygulandığı gruba ait örneğin daha büyük büyütmesinde çekirdek çevresinde perinükleer aralıkta genişleme, sitoplazmada genişlemiş düz ER, kristalleri ile mitokondriyumlar, lipid damlacıkları, myelin figürler, vakuoller izlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X25 000)



Şekil 4.43. MEHP ve BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi V.

MEHP ve BPA'nın birlikte uygulandığı gruba ait örneğin daha büyük büyütmesinde çekirdek çevresinde perinükleer aralıkta genişleme, sitoplazmada genişlemiş düz ER, kristalleri ile mitokondriyumlar, lipid damlacıkları, myelin figürler, vakuoller izlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X25 000)



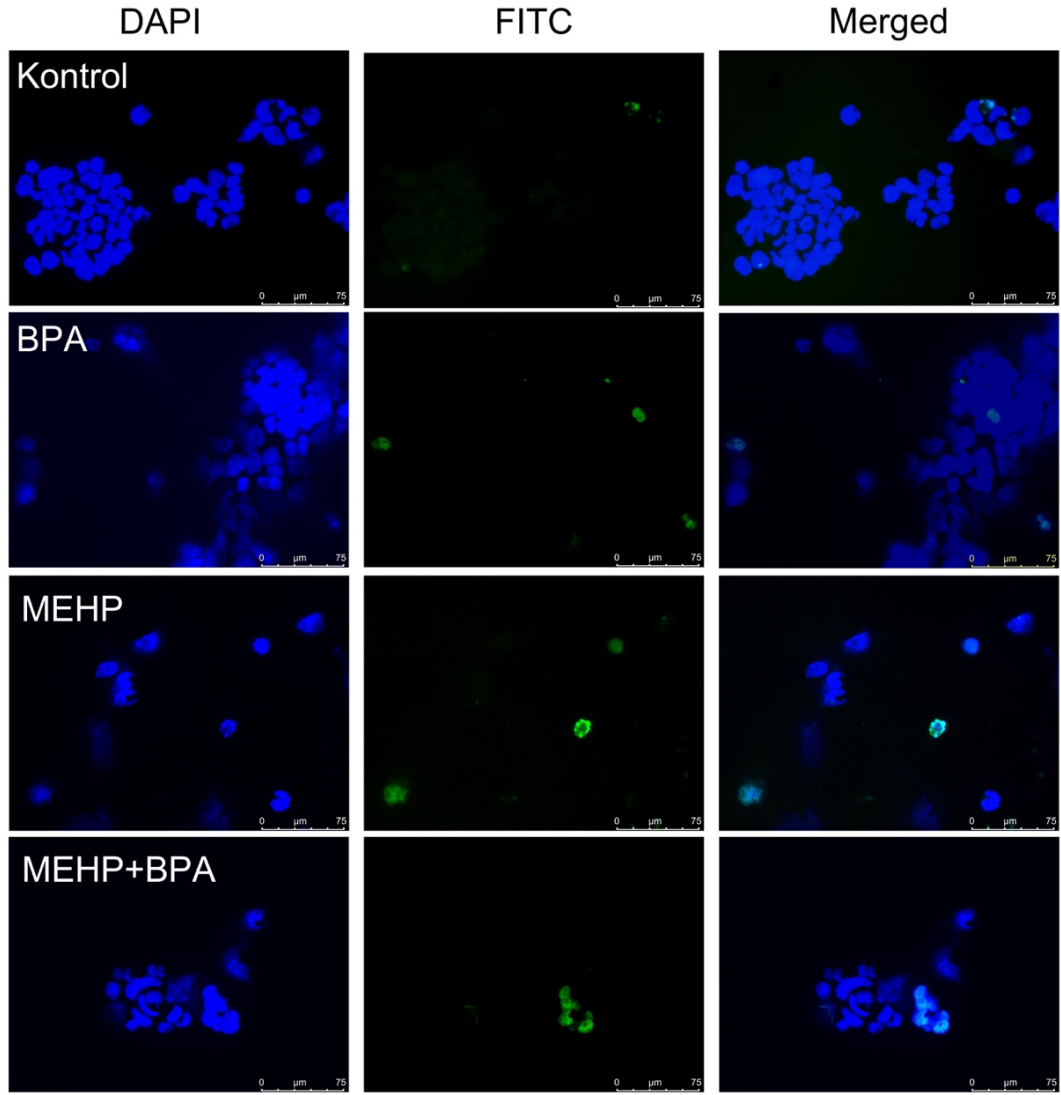
Şekil 4.44. MEHP ve BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskopunda incelemesi VI.

MEHP ve BPA'nın birlikte uygulandığı gruba ait örneğin daha büyük büyütmesinde belirgin çekirdekçik, eukromatik çekirdek, çekirdek çevresinde perinükleer aralıkta genişleme, sitoplazmada genişlemiş düz ER, kristalleri ile mitokondriyumlar, lipid damlacıkları, myelin figürler, vakuoller izlenmektedir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X25 000)

4.12. Apoptotik Analizler

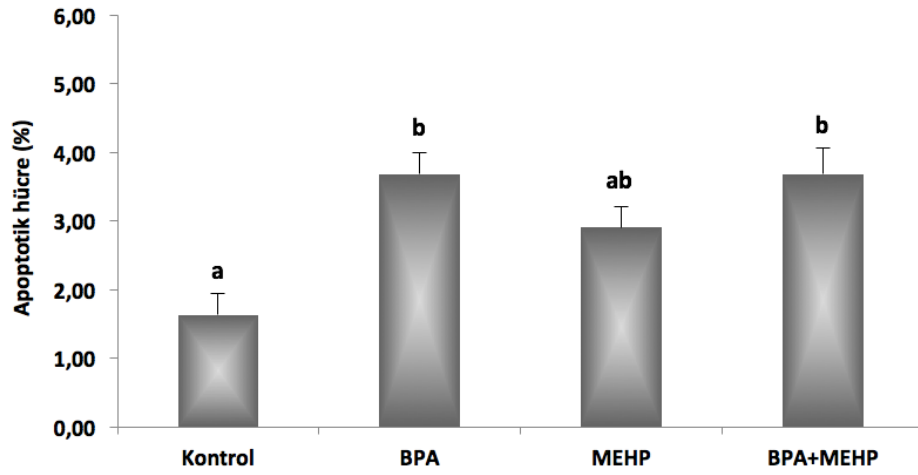
4.12.1. TUNEL Analizi

Apoptotik hücreleri belirlemek için yapılan TUNEL analizinde kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde ortalama %1,6 TUNEL pozitif hücre saptanmıştır. BPA uygulanan grupta %3,7; MEHP uygulanan grupta %2,9; BPA+MEHP uygulanan grupta ise, %3,7 TUNEL pozitif hücre belirlenmiştir. BPA grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek TUNEL pozitif hücre saptanmıştır. MEHP grubunda da kontrol grubuna kıyasla yüksek TUNEL pozitif hücre saptansa da, kontrol ve MEHP grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Kombine maruziyet grubunda da TUNEL pozitif hücre sayısında kontrole oranla anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.45., Şekil 4.46.).



Şekil 4.45. Deney gruplarında apoptotik hücreler.

Kontrol grubu ve deney gruplarına ait HepG2 hücrelerinde DAPI ile çekirdekler mavi, TUNEL pozitif hücreler yeşil izlenmektedir. (X400)



Şekil 4.46. Deney gruplarında apoptotik hücre yüzdesini gösteren grafik.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

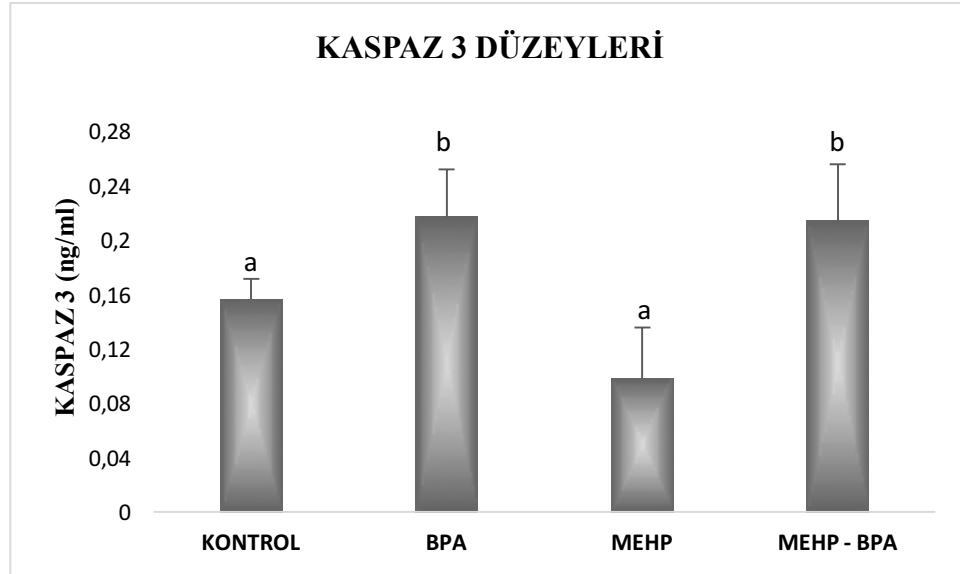
4.12.2. Kaspaz 3 Düzeyleri

Kaspaz 3 düzeylerinin tespiti için yapılan analiz sonuçları Tablo 4.12. ve Şekil 4.47.'de verilmiştir. BPA ve BPA+MEHP grubunda kontrole oranla artış (%54, her iki grup için) gözlenmekle birlikte, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 4.12. Kaspaz 3 Düzeyleri.

Çalışma Grupları	Kaspaz 3 Düzeyleri (ng/ml)
Kontrol	0,156 $\pm$ 0,015 ^a
BPA	0,241 $\pm$ 0,035 ^b
MEHP	0,110 $\pm$ 0,038 ^a
MEHP - BPA	0,236 $\pm$ 0,041 ^b

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.47. Kaspaz 3 Düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

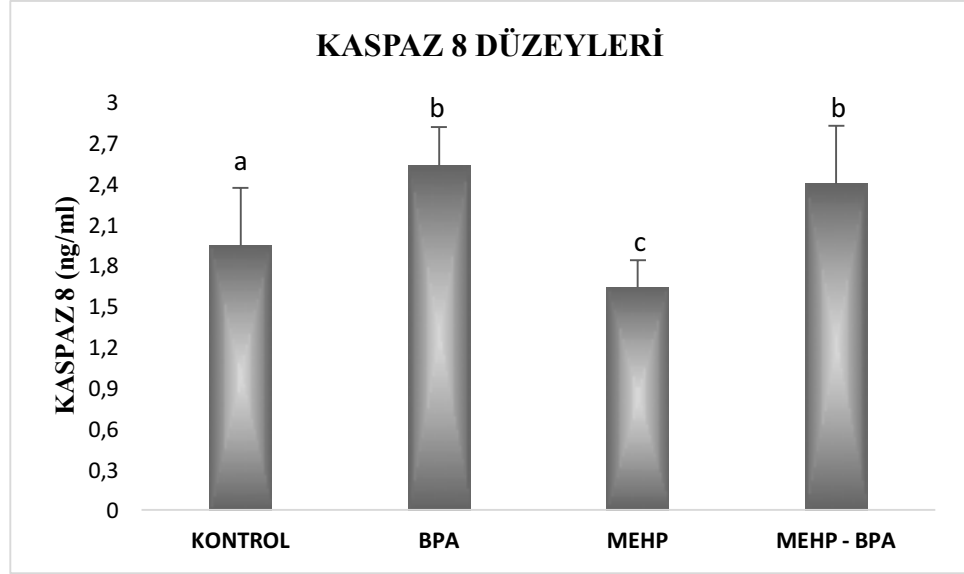
4.12.3. Kaspaz 8 Düzeyleri

Kaspaz 8 düzeylerinin tespiti için yapılan analiz sonuçları Tablo 4.13. ve Şekil 4.48.'de verilmiştir. Bu verilere BPA grubu ve kombine grupta kontrole kıyasla anlamlı bir artış (sırasıyla %30 ve %24) görülmüştür ($p < 0,05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.13. Kaspaz 8 Düzeyleri.

Çalışma Grupları	Kaspaz 8 Düzeyleri (ng/ml)
Kontrol	1,94 $\pm$ 0,4 ^a
BPA	2,53 $\pm$ 0,3 ^b
MEHP	1,64 $\pm$ 0,2 ^c
MEHP - BPA	2,4 $\pm$ 0,4 ^b

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.48. Kaspaz 8 Düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

5.TARTIŞMA

Endokrin bozucu kimyasal maddeler, hormonların sentez, salgılanma, taşınma, metabolizma, eliminasyon, reseptöre bağlanma ve doğal homeostazını etkileyen, üreme ve gelişimsel sorunlara neden olabilen sentetik veya doğal bileşikler olarak tanımlanmaktadır (1). EDC'ler hormonları taklit edebilir veya etkilerini engelleyebilir. Bu maddelere yaşamın her döneminde maruz kalınabilir ve bu maruziyet organizmada başta erkek üreme sistemi olmak üzere; büyüme, stres yanıtı, cinsiyet gelişimi, metabolik hız, insülin yapımı ve kullanımı gibi birçok temel süreci etkileyebilir ve hormonal bozukluklara yol açabilir (4-9).

Ftalatlar plastiğe esneklik vermek ve plastiği yumuşatmak için en yaygın kullanılan ve endokrin bozucu etkileri bilinen kimyasal maddelerdendir (20). Ftalatlar, imitasyon deri, yağmurluk, döşeme, duş perdesi, gıda ambalaj malzemesi, oyuncaklar, medikal malzemeler, parfümler ve boyalarda kullanılır. Ftalatlar içinde en yaygın kullanılan türev DEHP'tir. DEHP oksidasyon ile ana metaboliti MEHP'e dönüştür (54). MEHP'in DEHP'den çok daha toksik olduğu belirtilmektedir (188, 189). BPA ise, plastiğe sertlik vermek için en yaygın kullanılan plastizerlerdendir ve endokrin bozucu özellikleri uzun yıllardır bilinmektedir (91). BPA yemek kapları, yapıştırıcılar, boya tozları, spor malzemeleri ve biberonlarda plastik monomeri olarak kullanılmaktadır. İnsanların her iki maddeye de oral, inhalasyon, dermal ve parenteral yolla teması söz konusudur. Ayrıca, endüstri çalışanlarında mesleki maruziyet de gözlenebilmektedir (11-13). Günümüzde bu kimyasal maddelerin artan kullanımı ile birlikte aynı anda birden fazla kimyasal maddeye kombine maruziyet söz konusudur (197). Kombine maruziyet söz konusu olduğunda, gözlenebilecek etki şiddetinde artış meydana gelebileceği veya beklenmeyen farklı etkilerin ortaya çıkabileceği öngörülebilir. Literatürde bu maddelere tek tek maruziyet sonucu endokrin bozucu etkilerin görülebileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ancak, karışım halinde ve/veya aynı anda maruziyetin etkilerinin değerlendirildiği kapsamlı çalışmalar oldukça sınırlıdır, özellikle karaciğerde bu tür plastizer maddelere birarada maruziyetin etkilerinin belirlendiği bir çalışma bulunmamaktadır ve olası istenmeyen etkilerinin altında yatan mekanizmaların yeterince incelenmediği görülmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, EDC'ler olarak tanımlanan BPA ve yaygın kullanıma sahip bir ftalat türevi olan DEHP'in ana metaboliti MEHP'e ayrı ayrı ve

kombine halde maruziyetin karaciğer hücrelerinde olası toksik etkileri kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak HepG2 hücre hattında incelenmiştir. Hücrelerdeki sitopatolojik değişiklikler ışık mikroskobu ve elektron mikroskop ile incelenmiş, sitotoksik ve apoptotik etkileri (TUNEL yöntemi ve kaspaz aktivitelerinin ölçümü) değerlendirilmiştir. Toksik etkilerin altında yatabileceği düşünülen olası mekanizmaların incelenmesi amacıyla oksidan/antioksidan statü parametreleri (LP, GSH, antioksidan enzim aktiviteleri, protein oksidasyonu, oksidatif DNA hasarı) ve ER stresi (ilgili proteinlerin ekspresyonlarında meydana gelen değişimler) kapsamlı olarak değerlendirilmiştir.

5.1. Hücre Canlılığı

Bisfenol ve ftalat türevleri ile ilgili literatürde farklı hücre hatlarında yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (76, 79, 172, 188, 189). Çalışmalar değerlendirildiğinde, aynı test maddesi ile ilgili gerek doz seçimi ve inkübasyon süreleri, gerekse hücre hatlarındaki farklılıklardan kaynaklanan çelişkili sonuçların elde edildiği görülmektedir. HepG2 hücrelerinde yürütülen çalışmalar ise sınırlıdır.

Bisfenol A ile HepG2 hücre hattında yapılan bir çalışmada 12,5-100 μM arası farklı konsantrasyonlarda MTT ile hücre canlılığı testi uygulanmış (24 saat) ve 100 μM konsantrasyonda hücre canlılığı sunulan tez çalışmasında gözlenen sonuçlara (%93) benzer şekilde %90 olarak bulunmuştur. 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarda ise hücre canlılığının arttığı gözlenmiştir (sırasıyla kontrole göre %114, %116). Sonuçlar, düşük doz BPA maruziyetinin hücre proliferasyonunu artırdığına işaret etmektedir (172). Kim ve ark. (2018) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada HepG2 hücreleri 24 veya 48 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda BPA'ya maruz bırakılmıştır. 24 saat boyunca 25 μM 'dan daha düşük ve 48 saat boyunca 50 μM 'dan daha düşük konsantrasyonlarda BPA uygulamasının hücre canlılığını artırdığı saptanmıştır. BPA'nın düşük konsantrasyonlarında (<20 μM) 24, 48 veya 72 saat uygulamalarda, hücre canlılığını sürekli olarak artırdığı da gösterilmiştir. (198).

MEHP'in 6,25-100 μM konsantrasyon aralığında HepG2 hücrelerine uygulandığı bir çalışmada, 100 μM MEHP'e maruziyet sonucu hücre canlılığının (MTT yöntemi ile, 24 saat) önemli ölçüde azaldığı, daha düşük konsantrasyonlarda ise bir etki gözlenmediği saptanmıştır ($p<0,01$) (79). Chen ve ark. (2012) tarafından

HepG2 hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada ise hücre canlılığı ticari bir kit (Cell titer-Glo luminesan hücre canlılığı kiti) ile ölçülmüş (24 ve 48 saat) ve hücre canlılığının 100 μ M MEHP uygulaması ile 24 saatte %56, 48 saatte %68 azaldığı belirlenmiştir (76). 5-75 μ M konsantrasyon aralığında MEHP'in sitotoksitesini MTT yöntemi ile değerlendirdiğimiz çalışmamızda ise 24 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığında %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon 17,5 μ M olarak belirlenmiştir.

Literatürde DEHP ile ilgili farklı hücre hatlarında yapılmış sitotoksiste çalışmaları da mevcuttur. 5-200 μ M konsantrasyon aralığında HepG2 hücrelerine 48 saat DEHP uygulamasının yapıldığı bir çalışmada hücre sayım kiti kullanılarak canlılık belirlenmiş ve 200 μ M konsantrasyonda hücre canlılığının %70'in altına düştüğü görülmüştür (186). LnCAP hücrelerinde yapılan bir çalışmada 24 saatlik maruziyette 10^{-3} -10 mM gibi geniş bir doz aralığı seçilmiş ve bu doz aralığında değişken bir canlılık olduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada hücrelere MEHP uygulaması da yapılmış ve 3 μ M'lık MEHP uygulamasında canlılık ~%60 bulunmuştur (189). MA-10 fare Leydig tümör hücre hattında yapılan çalışmada 24 saat maruziyet sonrasında DEHP ve MEHP'in IC₅₀ değerleri sırasıyla 3 mM ve 3 μ M olarak bulunmuştur (188). Gaitantzi ve ark. (2018) tarafından farklı karaciğer hücre tiplerinde (HepG2, primer mürin hepatosit, insan primer hepatosit, LX-2, hepatik stellat hücreleri, karaciğer organoidleri) yapılan çalışmada DEHP, HepG2 hücreleri için sitotoksik bulunmamıştır (199). Bu tez çalışması kapsamında DEHP için MTT yöntemi sitotoksiste deneyleri yapılmış ve DEHP (25 μ M- 5 mM aralığındaki konsantrasyonlarda; 24 ve 48 saat) HepG2 hücrelerinde çalışılan aralıkta sitotoksik etki gözlenmemiştir.

Kombine maruziyete ait tespit edilen tek çalışma, Li ve ark. (2017) tarafından HepG2 hücre hattında BPA, DBP ve Cd'un tekli veya ikili kombinasyonlarının 24 saat uygulanması ile yürütülmüştür. BPA ve Cd maruziyetinde mortalite doz bağımlı olarak artmıştır ($p<0,05$). DBP ise, 10^{-6} - 10^{-4} mol/L doz aralığında benzer sonuç vermiştir. Kendi içlerinde sitotoksiteleri değerlendirildiğinde hücre canlılığında en çok azalmaya neden olan madde Cd'dur. Çalışmada tekli maruziyetlere kıyasla kombine maruziyetler daha sitotoksik bulunmuştur. BPA+DBP (10^{-6} + 10^{-6} mol/L) kombinasyonunda canlılık %54 civarında bulunmuştur ($p<0,05$) (14). BPA ve MEHP'e birlikte maruziyetin hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin belirlendiği bir

çalışmaya literatürde rastlanmamış olup, sunulan tez çalışmasında hücre canlılığının belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılarak test maddelerinin IC₃₀ ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri BPA için 615 µM; MEHP için 17,4 µM; MEHP+BPA ise 15+500 µM bulunmuştur, IC₃₀ değerleri ise BPA, MEHP ve kombine grup için sırasıyla 343 µM, 4,5 µM ve 10+400 µM olarak bulunmuştur.

5.2. Oksidan/Antioksidan Statü Üzerine Etkiler

5.2.1. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Üretimi

Reaktif oksijen türlerinin üretimi oksidatif stresin en önemli göstergelerinden biridir ve konu ile ilgili çok sayıda çalışmada değerlendirilen bir parametredir. Literatürde özellikle endokrin bozucu kimyasal maddeler ile ilgili yapılan çalışmalar, bu kimyasal maddelere maruziyetin ROS üretiminde artışa neden olabildiğini göstermektedir (173, 189, 200).

Fei ve ark. (2014) INS-1 hücre hattında yaptıkları çalışmada BPA maruziyetinin önemli düzeyde hücre içi ROS düzeylerini artırdığını belirlemiştir (100 µM BPA; p<0,01). Ayrıca, oluşan oksidatif stresin DNA hasarını indükleyebileceğini ifade edilmiştir (173). Bir başka çalışmada, Neuro2a ve GC1 hücrelerinde 50 µM veya 100 µM BPA uygulaması ile ROS düzeylerinin arttığı bulunmuştur. Neuro2a hücrelerinde zamanla ROS düzeylerinin arttığı bulunurken, GC1 hücrelerinde 12. saatten sonra ROS düzeylerinde azalma saptanmıştır (174). Keçi Sertoli hücrelerine 400- 600 µM doz aralığında uygulanan BPA, ROS düzeylerinde zaman bağlı olarak önemli ölçüde artışa yol açmıştır (p<0,05) (175). HepG2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise mitokondriyal ROS düzeyleri ölçülmüştür ve hücreler 24, 48 ve 72 saat için 10⁻⁴ ila 10⁻¹² M arasındaki konsantrasyonlarda BPA'ya maruz bırakılmıştır. 24 saat sonrasında 10⁻⁹ M gibi oldukça düşük konsantrasyonlarda bile mitokondriyal ROS düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir (171). LnCAP hücrelerinde DEHP ve MEHP ile yapılan bir çalışmada, DEHP'e maruz bırakılan hücrelerde ROS üretimi 30 dakikalık inkübasyondan sonra 1,5 kat ve 60 dakikalık inkübasyondan sonra 2 kat artmıştır (p<0,05). MEHP ile muamele edilen hücrelerde ise, ROS üretimini hızlı bir yükseliş göstermiş ve 30 dakikada 2,6 kat ve 60 dakikada 9,2 kat artmıştır (189). İnsan plasental hücrelerinde de MEHP'in (45, 90 veya 180 µM) ROS düzeylerini doz-

bağımlı olarak anlamlı ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (201). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, farklı hücre hatlarında gerek BPA gerekse DEHP/MEHP maruziyeti ile gözlenen toksisitenin altında oksidatif stres varlığına işaret etmektedir.

Yukarıda da sözü edilen bir diğer çalışmada, HepG2 hücrelerinin BPA, DBP ve Cd ile tek tek veya kombine olarak 6 saat maruz bırakılması sonrasında hücre içi ROS düzeyleri ölçülmüştür. Tekli maruziyetlerde doz bağımlı olarak ROS düzeylerinde artış görülürken, kombine gruplarda düzeyler daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (14). Çalışmamızda hücre içi ROS düzeyleri, kontrol grubuna oranla MEHP grubunda %51 ve BPA grubunda %86 anlamlı bir artış göstermiştir. Kombine grupta ise her iki test maddesinin ayrı ayrı maruziyetinden daha yüksek düzeylerde ROS üretimi gözlenmiştir ve kontrole kıyasla bu oran %290'dır ($p<0,05$). Bu durum test maddelerine kombine maruziyetin etkilerinin, tekli maruziyetten daha ciddi istenmeyen etkilere neden olabileceğinin bir kanıtı niteliğindedir.

5.2.2. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Enzimatik antioksidanların en önemlilerinden biri SOD enzimidir ve oksidatif stres durumunda enzim inhibe olabilir ya da aktivitesinde artış meydana gelebilir. SOD aktivitesindeki azalma veya artma maruz kalınan maddenin dozu ve maruziyet süresine göre değişebilir. Genelde kısa süreli (örneğin, 24 saat) maruziyetler ile görülebilen SOD aktivite artışı organizmanın artan oksidatif strese verdiği adaptif yanıt ile açıklanabilir. Oksidatif strese karşı detoksifikasyonda rol alan diğer antioksidan enzimler, GPx ve CAT enzimleridir. Her iki enzim düzeylerinde de SOD'ye benzer şekilde oksidatif strese neden olan etkenler karşısında artma ya da azalma şeklinde değişiklikler gözlemlendiği rapor edilmektedir. Endokrin bozucu özellik gösteren kimyasal maddelere maruziyetin antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkilerini inceleyen çeşitli *in vitro* çalışmalar bulunmakla birlikte, tez çalışması kapsamında değerlendirilen test maddelerinin HepG2 hücre hattında etkilerinin incelendiği çalışmaların son derece sınırlı olduğu belirlenmiştir.

İnsan kırmızı kan hücrelerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada, hücrelere BPA, BPF, BPS ve BPAF maddeleri uygulanmıştır. 4 saat inkübasyondan sonra, 250 µg/ml ve 500 µg/ml BPA uygulanan hücrelerde SOD aktivitesinde %60,0-83,1'lik bir azalma meydana geldiği görülmüştür. SOD aktivitesinde 500 µg/ml BPF uygulamasında

%79,1'lik azalma ve 100 µg/ml BPAF uygulamasında %80,9'luk bir azalma gözlenmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra 100 µg/ml BPA, SOD aktivitesinde %82,6'lık bir düşüşe neden olurken, BPF (25-100 µg/ml) daha ciddi bir azalmaya neden olmuştur (%72,3-%85,7). SOD aktivitesindeki en belirgin azalma, BPAF'ye (%73,0-%87,4) maruz kalan hücrelerde gözlenmiştir (176). Aynı çalışmada, BPA ve BPS uygulaması sonrasında GPx aktivitesinde de azalma saptanmış olmakla birlikte, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. CAT aktivitelerinde ise 4 saatlik BPA (100-500 µg/ml) uygulanması sonucu %64,7-82,8 oranında azalma gözlenmiş; 24 saatlik inkübasyon sonrası bu azalmanın daha da belirgin hale geldiği rapor edilmiştir. Sunulan tez çalışmasında, IC₃₀ konsantrasyonunda (343 µM) BPA'ya 24 saatlik inkübasyon sonrası HepG2 hücrelerinde SOD aktivitesinde adaptif bir artış gözlenirken, GPx ve CAT aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik saptanamamıştır.

Wang ve ark. (2012)'nin yaptığı bir çalışmada fare over antral folikülleri 72 veya 96 saat MEHP'e maruz bırakılmıştır. 72 saat inkübasyon sonucu 10 ve 100 µg/ml MEHP uygulaması GPx aktivitesini inhibe ederken, 10 µg/ml MEHP uygulanan grupta SOD1 aktivitesi önemli ölçüde artmıştır. 96 saatte her 2 doz uygulaması sonucu GPx aktivitesi azalırken; 10 µg/ml MEHP SOD1 aktivitesinde artışa, 100 µg/ml MEHP ise azalmaya neden olmuştur. 100 µg/ml MEHP'e 96 saat maruziyet sonucu bu hücrelerde hem SOD1 hem de GPx ekspresyonlarında azalma gözlenmiş; CAT ekspresyonunda ise anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır (183). MEHP'in indüklediği GPx inhibisyonunun antral foliküllerde H₂O₂ birikimine yol açabileceği; bu durumda oksidatif hasardan hücreleri korumak için diğer antioksidan enzimlerin aktive olmasına yol açabileceği vurgulanmaktadır.

HepG2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 36 saatlik MEHP (6,25- 100 µM) maruziyeti sonrası SOD aktivitesinin, 24 saatte 100 µM MEHP uygulanan grupta (p<0,05) ve 36 saatte 50 µM ve 100 µM maruziyet gruplarında önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (p<0,05) (79). GPx aktivitesi ise her 2 saat uygulamasında da 12,5-100 µM konsantrasyonda azalmalara neden olmuştur. Bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde, tez çalışmamızda HepG2 hücrelerinin tek başına 24 saat süreyle daha yüksek konsantrasyonda MEHP'e (343 µM) maruz bırakılması sonucu her 3 antioksidan enzim aktivitesinde de kontrol grubuna oranla

anlamli düzeyde azalmalar meydana geldiği gözlenmiş ve bu bulguların MEHP'in indüklediği bir oksidatif strese yanıt olarak meydana gelebileceği düşünülmüştür.

Wang ve ark. (2012) mevcut verilerden farklı olarak, MEHP'in ana bileşik olan DEHP'e göre farklı mekanizmalarla oksidatif stres oluşturduğunu öne sürmektedir. MEHP'in DEHP'e kıyasla farklı antioksidan enzimleri etkilediği; bununla birlikte MEHP ve DEHP uygulanan antral foliküllerde farklı düzeylerde ROS üretimi olduğu gösterilmiştir (184). Ayrıca, DEHP'in SOD1'in ekspresyon ve aktivitesini değiştirdiği; ancak GPx ve CAT'ı etkilemediği de gösterilmiştir. Mevcut veriler, MEHP'in GPx ekspresyonunu ve aktivitesini baskılayarak oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir.

HepG2 hücre hattının kullanıldığı ve BPA, DBP ve Cd test maddelerinin kombine maruziyetinin değerlendirildiği çalışma, sınırlı sayıdaki kombine maruziyet çalışmalarından biridir. Çalışmada test maddelerinin 6 saat süreyle uygulandığı tüm gruplarda SOD düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$; tüm gruplar). BPA ve DBP'nin birlikte en yüksek konsantrasyonda uygulandığı grupta SOD aktivitesinin diğer gruplara oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir. (14).

Sunulan çalışmamızda ise HepG2 hücrelerinin BPA ve MEHP'e bir arada daha uzun süreli maruziyeti (24 saat) sonucu kontrol grubuna kıyasla her 3 antioksidan enzim aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Bu durum, HepG2 hücrelerinin EDC'lere 24 saat süreyle bir arada maruziyeti sonucu oluşan oksidatif stresin şiddetlendiği ve hücrede oksidatif hasardan korunabilmek için adaptif bir savunma yanıtı geliştiği şeklinde yorumlanabilir. Ancak, bu konuda özellikle transkripsiyonel ve translasyonel düzeyle antioksidan enzimlerin mRNA ve protein düzeylerinin belirlendiği daha ileri çalışmalara gereksinim vardır. Ayrıca, daha uzun süreli maruziyetin gözlenen adaptif yanıtı ne şekilde etkileyeceği de incelenmelidir.

5.2.3. Glutasyon

Glutasyon organizmada bulunan en önemli antioksidandır ve GSH düzeylerinde meydana gelen değişimler oksidan/antioksidan dengenin bozulması anlamına gelebilir. Redükte glutasyon/okside glutasyon (GSH/GSSG) oranı, biyolojik sistemlerde oksidatif stres durumunun değerlendirilmesinde kullanılan en önemli

biyogöstergelerden biridir (124, 125). Literatürde HepG2 hücrelerinde BPA ve MEHP maruziyeti sonrasında GSH düzeylerinin değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma vardır. Kombine maruziyette GSH düzeylerinin ölçüldüğü bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Chen ve ark (2012) tarafından, L02 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde, farklı dozlarda MEHP (6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 μM) maruziyeti değerlendirilmiştir. 6,25 μM ve 50 μM konsantrasyonda MEHP'e 24 ve 48 saat maruziyet sonucu, GSH düzeylerinde anlamlı ölçüde azalma görüldüğü belirlenmiştir ($p<0,01$). Aynı çalışmada, HepG2 hücrelerinde MEHP maruziyetinin etkisi değerlendirilmiş; 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası tüm uygulanan konsantrasyonlarda (6,25- 100 μM) MEHP'in GSH düzeylerinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır (hepsi için $p<0,01$) (76).

Gualtieri ve ark. (2011) tarafından yapılan bir diğer çalışmada Sertoli hücreleri kullanılmış ve hücelere düşük veya orta dozda BPA uygulaması yapılmıştır. Düşük doz BPA maruziyeti ile GSH düzeylerinde hiçbir değişiklik gözlenmezken, orta dozda BPA maruziyeti ile hücrelerde GSH seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir. 1, 3 ve 24. saatlerde 10 μM BPA uygulamasından sonra hücre içi GSH seviyelerinde anlamlı bir artış görülmüştür. Çalışmada ayrıca GR ekspresyonu da değerlendirilmiştir. 10 μM BPA uygulanan çalışma grubunda GR protein ekspresyon düzeylerinde bir değişme gözlenmezken, 50 μM BPA uygulanmasının ardından 1. saatte GR protein ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Ancak, 3. veya 24. saatlerde GR protein ekspresyon düzeylerinde bir artış görülmemiştir. Araştırmacılar 50 μM 'lık uygulamadan sonra GSH'nin GSSG'ye dönüştüğünü ve bu nedenle total GSH seviyelerinin yüksek bulunduğu savını ortaya koymuşlardır (177). Sertoli hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada 24 saat 200 μM MEHP'e maruz bırakılan hücre grubunun GSH seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, koruyucu olarak NAC tek başına veya MEHP ile kombinasyon halinde uygulanmış ve kontrol grubuna kıyasla NAC uygulanan grupların GSH düzeylerinde artış meydana geldiği görülmüştür (185). Kan hücrelerinde yapılan bir diğer çalışmada da, 4 saatlik BPA (25–500 $\mu\text{g/ml}$) maruziyetinin sonunda GSH seviyelerinin %68,1-92,14 oranında azaldığı belirlenmiştir (176). Çalışmamızda kontrole kıyasla BPA grubunda total GSH düzeyleri %91 oranında yüksek

bulunmuştur ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Kombine grupta ise kontrole göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Literatürde bulunan çalışmalar göz önüne alındığında, gerek MEHP, gerekse BPA uygulamaları ile hücre için total/redükte GSH seviyelerinde dalgalanmaların görülebildiği söylenebilir. BPA grubunda görülen total GSH artışı, GSSG düzeylerindeki artıştan kaynaklanabileceği gibi, adaptif bir yanıtla redükte GSH düzeylerinin artırılmasından dolayı da gerçekleşmiş olabilir.

5.2.4. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu membran lipitlerinin oksidatif hasarı sonucu meydana gelir ve peroksidasyon sonucunda toksik etkilere sahip MDA gibi lipit peroksidasyon ürünleri oluşturur. Lipit peroksidasyonunun önemli göstergelerinden olan MDA, hücre membranlarında yer alan lipitlerin peroksidasyonuna yol açarak membranların iyon geçirgenliğini bozar, enzim aktivitelerini değiştirebilir ve DNA gibi önemli makromolekülleri etkileyerek ciddi hasarlara neden olabilir (139). Ayrıca, lipit peroksidasyonu protein oksidasyonunun da en önemli nedenlerinden biridir (130). Literatürde lipit peroksidasyonunun BPA ve/veya ftalat maruziyetinin farklı hücre hatlarında değerlendirildiği az sayıda *in vitro* çalışma bulunmaktadır (14, 185).

Sertoli hücre hattında MEHP maruziyetinin lipit peroksidasyon düzeylerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, MEHP uygulanan hücrelerde lipoperoksit düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). (185). HepG2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, BPA, DBP veya Cd'a ayrı ayrı ve ikili kombinasyonlar şeklinde maruziyetin sonuçları değerlendirilmiş ve 10^{-6} mol/L BPA ve 10^{-6} mol/L DBP'nin bir arada uygulandığı grupta MDA düzeylerinin diğer gruplara oranla anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (14). HepG2 hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada ise, farklı konsantrasyonlarda (6,25-100 μ M) 24 ve 36 saatlik MEHP maruziyeti sonrası tüm doz gruplarında MDA düzeylerinin arttığı gözlenmiştir ($p<0,01$) (79). Araştırmacılar ayrıca MDA/GPx ve MDA/SOD oranlarını da değerlendirmiş ve artan konsantrasyonlarda maruziyet ile bu oranlarda da kontrole kıyasla anlamlı artışlar olduğunu saptamışlardır. Sunulan tez çalışmasında kontrole kıyasla kombine grupta MDA düzeylerindeki artış (4,9 kat) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Ayrıca, kombine maruziyet grubunda tekli maruziyet gruplarına

göre MDA düzeyleri anlamlı derecede yüksektir. Bulgular, EDC'lere tekli maruziyet ile lipit peroksidasyonda bir değişiklik gözlenmezken, kombine maruziyetin lipitlerde peroksidasyona yol açabileceğini göstermektedir. Bu durumda, kombine MEHP+BPA temasının hücrede ciddi membran hasarlarına yol açabileceği ve bunun da hücrenin ölümünü tetikleyecek mekanizmaları devreye sokabileceği öngörülebilir.

5.2.5. Protein Karbonil Düzeyleri

Protein oksidasyonunun tek bir göstergesi olmamakla birlikte, protein karbonil grupları oksidatif strese bağlı hücrel hasarın en genel belirteci olarak kabul edilir ve sıklıkla kullanılır (132, 133). Literatürde gerek tekli gerekse kombine MEHP ve BPA maruziyetlerinde protein oksidasyon düzeylerinin ölçüldüğü bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda karbonil gruplarının düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla kombine grupta yaklaşık 2,2 kat bir artış görülmüştür ($p<0,05$). Ancak, tekli uygulamalarda BPA ve MEHP maruziyeti kontrol grubuna oranla protein karbonil düzeylerinde anlamlı bir değişime yol açmamıştır ($p<0,05$). Bu sonuçlar, kombine maruziyet grubunda lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonundaki korele artışların, kombine grupta görülen protein oksidasyonunun temel nedenlerinden birinin artan lipit peroksidasyonu olduğuna işaret etmektedir. Bu durumda kombine maruziyetin primer olarak lipit hasarını, bunu takiben de protein hasarını tetiklediği belirtilebilir.

5.2.6. DNA Hasarı

Oksidatif DNA hasarı serbest radikallerin DNA'da oluşturduğu hasardır ve genellikle onarım prosesleri ile onarılır. Ancak bazı durumlarda DNA'da gerçekleşen oksidatif hasar onarılamaz. Onarılmayan hasarların sonucunda mutagenез, karsinogenез veya yaşlanma olayları ortaya çıkar. DNA'da meydana gelen oksidatif hasar DNA yapısındaki bazları, şekerleri veya nükleotidleri etkileyebilir. 'OH'nin etkisiyle oluşan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) en sık görülen baz hasarı türüdür ve DNA hasarının en iyi göstergelerinden biridir (139). HepG2 hücrelerinde BPA ve/veya MEHP maruziyeti sonucu DNA hasarının değerlendirildiği çalışmalar son derece sınırlıdır.

HepG2 hücrelerinde MEHP maruziyetinin etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, hücreler farklı konsantrasyonlarda (6,25-100 μ M) MEHP ile 24 veya 36 saat inkübe edilmiştir. 8-OHdG seviyeleri maruziyetten 24 saat sonra yüksek konsantrasyon gruplarında anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$ veya $p<0,01$). Maruziyetten 36 saat sonra 100 μ M MEHP ile muamele edilen grupta 8-OHdG düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir ($p<0,01$) (79). HepG2 hücreleri ile yapılan bir çalışmada da, Fic ve ark. 8 farklı yapısal BPA analogunun (BPF, BPAF, BPZ, BPS, DMBPA, DMBPS, BP-1 ve BP-2) Ames testi ve Comet deneyi ile mutajenik ve genotoksik etkilerini incelemiştir. Toksik olmayan BPA dozları (0,1 μ mol/L- 10 μ mol/L) 4 saat ve 24 saat uygulanarak HepG2 hücrelerinde genotoksik etkileri Comet deneyi ile incelendiğinde BPA ve analogu olan BPS'nin 24 saatlik 0,1 μ mol/L ($P<0,001$) ve 1 μ mol/L ($P<0,01$) maruziyeti sonrası DNA hasarına neden olduğu, ayrıca DMBPS, BP-1 ve BP-2 analoglarının DNA iplikçik kırılmalarında geçici olarak artışa neden olduğu görülmüştür (172). Çalışmamızda oksidatif DNA baz hasarının tespiti için yapılan analiz sonucu saptanan 8-OHdG düzeyleri, gruplar arasında anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0,05$). Çalışma için seçilen dozların düşük olması (IC30 uygulanmıştır), test maddelerinin düşük düzeyde hasar meydana getirmesi ve bu hasarın 24 saatte onarılması ya da DNA hasarına yol açmaması elde edilen verilerin nedenleri arasında sıralanabilir. Çalışmada daha ciddi istenmeyen etkiler oluşturmaması beklenen kombine grupta da kontrol grubuna kıyasla %11 oranında bir artış meydana gelmiştir. Ancak, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

5.3. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulumda proteinlerin doğru katlanmasında rol alan GRP78 moleküler bir şaperondur. Proteinin translokasyonunun düzenlenmesi, kalsiyumun bağlanması, apoptozun düzenlenmesi, katlanmamış protein cevabının (unfolded protein response, UPR) düzenlenmesi, kalite kontrol, protein yıkımı gibi birçok görevde rol alır (152). PERK proteini ise UPR'nin regülasyonunu sağlar ve oluşan strese karşı hücrenin protein yükü azaltılarak katlanmamış proteinlerin düzeltilmesini sağlar (164). PERK, apoptoz yollarının aktivasyonuna da sebep olabilir. Downstream transkripsiyon faktörü olan CHOP'u indükleyerek bu etkisini gösterir.

CHOP, ER stresi durumunda yüksek oranda indüklenebilmektedir; apoptozda yer alan hedef genlerin promotörlerine bağlanır. Ayrıca, ATF6 golgi cisimciğinde aktive olduktan sonra hücre çekirdeğine taşınır ve CHOP, XBP-1 gibi proteinlerin aktivasyonunu sağlar. ER stres durumunda bu proteinlerin eksprese olması beklenmektedir. EDC'lere maruziyet sonucu ER stresi oluşumuna ilişkin yapılan çalışmaların çok az sayıda olduğu belirlenmiştir (110, 191-193).

Asahi ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 100 μ M BPA (48 saat) ile muamele edilen NCTC Clone 1469 (fare non-parenkimal hepatositi) hücrelerinde ER stresi ile ilişkilendirilen apoptoz incelenmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan morfolojik incelemede BPA uygulanan grupta ER'nin uzadığı gözlenirken, diğer hücre içi organellerde yapısal bir değişiklik gözlenmemiştir. Çalışmada RT-PCR analizi sonucu anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2 ekspresyonunda hafif bir düşüş gözlenmiştir. CHOP, apoptozda yer alan hedef genlerin promotörlerine bağlanan ve stres oluşan ER'den gelen sinyallerle indüklenen bir downstream transkripsiyon faktörüdür. BPA uygulanan NCTC Clone 1469 hücrelerinde CHOP mRNA ekspresyonunda bir artış (1,42 kat) görülmüştür. Ayrıca, ER'de lokalize olup burada fazla protein birikimi ile aktive olabilen kaspaz-12'nin ekspresyonunun arttığı (1,33 kat) saptanmıştır. ER fonksiyonunu bozan bir dizi farklı uyarana cevap olarak uyarılan, ER-lokalize bir protein olan ve tam lizatta bakılan GRP78/BiP proteininin de ekspresyonun arttığı (1,36 kat) gözlenmiştir. Kaspaz-12'nin aktivasyonu ve GRP78/BiP'nin up-regülasyonu, ER stresinin varlığını destekler niteliktedir (110). Bir diğer çalışmada, Vero ve HaCat hücre hattına 4 veya 24 saat 1-100 μ M DEHP uygulanmış ve Western blotting ile ER stresin olası indüksiyonunu belirlemek için UPR'nin iki kritik markörü incelenmiştir: CHOP/Gadd153 ve GRP78/BiP. CHOP protein ekspresyonu Vero hücrelerinde 4 saatlik uygulama sonrası değişmezken, 24 saatlik uygulamada az miktarda düşüş göstermiştir. HaCat hücrelerinde ise 4. saatte yükselme (1,5 kat) gözlenirken, 24. saatte kontrol gurubunun değerlerine geri döndüğü gözlenmiştir. GRP78'İNin Vero hücrelerinde ekspresyonu 4 saatte yükselme eğilimi gösterirken, 24 saatlik DEHP uygulamasında ise önemli derecede artış (2,1 kat) gözlenmiştir. Çalışmada anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2 proteini, Vero hücre hattında 24 saat DEHP uygulaması ile artış (2,8 kat) göstermiştir. HaCat hücre hattında ise Bcl-2 düzeylerinde 4. saatte yükselme gözlenirken, 24. saatte protein

ekspresyonunda azalma gözlenmiştir (190). Başka bir çalışmada, GRP78 protein düzeylerinin 25, 125 veya 625 μM DEHP'e maruz kalan INS-1 hücrelerinde, doza bağımlı olarak up-regüle olduğu gösterilmiştir ($p<0,001$). Benzer şekilde, GRP94 proteininin seviyesi 25 veya 625 μM DEHP'e maruz kalan hücrelerde anlamlı olarak artmıştır ($p<0,001$). PERK ve substratı $\text{EIF2}\alpha$ 'nın fosforilasyon miktarları 25, 125 veya 625 μM DEHP'e maruz kaldıktan sonra önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca, DEHP'e maruz kalan hücrelerde fosforilize PERK ve $\text{EIF2}\alpha$, 5 μM DEHP'e maruz kalan hücrelerde de hafifçe yükselmiştir; ancak bu artışlar kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildir. $\text{EIF2}\alpha$ fosforilasyonu ile indüklendiği bilinen ATF4 proteininin düzeylerinin 25, 125 veya 625 μM DEHP uygulanan hücrelerde anlamlı şekilde yükseldiği gözlenmiştir ($p<0,001$). Yüksek doz DEHP gruplarında, CHOP'un transkripsiyonu ve translasyonu da önemli ölçüde artmıştır ($p<0,001$) (191). Çalışmada ayrıca, ER stresini tetiklediği düşünülen Ca^{2+} seviyeleri de incelenmiştir. DEHP maruziyeti ile INS-1 hücrelerinde doza bağımlı olarak ER Ca^{2+} düzeylerinin azaldığı, intraselüler Ca^{2+} düzeylerinin arttığı gözlenmiştir ($p<0,01$ veya $p<0,001$).

Fare spermatosit hücrelerinde (GC-2 hücreleri) DBP maruziyetinin (25, 50, 200 μM ; 24 saat) ER stres üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, doza bağımlı olarak ROS düzeylerinde artış görülmüştür. Çalışma DBP'nin oluşturduğu oksidatif stresin ER stresine neden olduğunu ve bunların bir sonucu olarak otofaji meydana getirebileceği fikrini savunmaktadır. ER stresinin otofajiye neden olduğunu kanıtlamak amacıyla ER stres inhibitörü olan 4-fenilbütirat (4-PBA) kullanılmış ve inhibitörün kullanıldığı grupta LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünün (otofaji göstergesi) azaldığı kaydedilmiştir. Bu bulgular DBP'nin ER stres kaynaklı otofajiye sebep olduğunun bir göstergesidir. ER stresin göstergelerinden biri olan ATF4 ve $\text{EIF2}\alpha$ protein ekspresyonunun artışının da DBP ile tedavi edilen GC-2 hücrelerinde ER stresine bağlı otofajiye neden olduğunu destekler niteliktedir (192). Aynı çalışma grubunun yaptığı başka bir çalışmada, GC-2 hücrelerinde yüksek DBP konsantrasyonunda (100 μM) ER stres aracılı CHOP aktivasyonunun ER strese bağlı apoptoza neden olduğu öne sürülmüştür. 100 μM DBP maruziyeti ile hücre içi Ca^{2+} seviyelerinde artış görülmüştür. Ayrıca ER stres göstergelerinden GRP78, ATF6 ve p-

EIF2 α ekspresyon düzeylerinde doza bağılı artış görülmüştür. Bu bulgular ER stres varlığını ve ER stres varlığını ve apoptoz gelişimini destekler niteliktedir (193).

Çalışmamızda sitozolik fraksiyonda PERK ve GRP78 proteinlerinin eksprese edildiği görülmüştür. PERK en yüksek ekspresyon düzeyini kontrol grubunda gösterirken, 24 saatlik uygulama sonrasında tüm gruplarda kontrole kıyasla azalma olduğu görülmüştür. Pozitif kontrol olan tunikamisinde (ER stres indükleyicisi) bu azalma % 57,9 oranıyla en çarpıcı şekilde öne çıkmaktadır. Bunun yanı sıra, BPA ve MEHP gruplarında kontrole kıyasla ekspresyon düzeyindeki azalma sırasıyla %26 ve %23,8'dir. BPA+MEHP'in beraber uygulandığı örneklerde ise 24 saatlik inkübasyon sonrasında PERK'in protein ekspresyonunun %41,8 oranında azaldığı görülmektedir. GRP78 proteininin ekspresyon profiline bakıldığında kontrole kıyasla hiçbir uygulama grubunda değişme gözlenmemiştir. Nükleer fraksiyonda ise PERK'in kontrol grubuna kıyasla en yüksek ekspresyonu BPA+MEHP grubunda gösterdiği görülmüştür. Kombine maruziyet grubunda PERK'in ekspresyon düzeyinde %85 oranında artış tespit edilmiştir. Bu artışın tek başına BPA'nın uygulandığı grupta %65 olarak kaydedilirken MEHP uygulaması sonrası sadece %15 civarında olması nükleer fraksiyonda PERK üzerindeki ekspresyon artışının BPA'dan kaynaklandığını kanıtlar niteliktedir. Pozitif kontrol olan tunikamisinin uygulaması sonrasında ekspresyon düzeyindeki artış sadece %50 olarak gözlenmiştir. GRP78 proteininin ekspresyon düzeyleri en yüksek değişimi tunikamisinin uygulaması sonrasında göstermiştir (kontrole kıyasla %101 artış). BPA uygulaması sonrasında ekspresyon düzeyi %55 oranında artmıştır. Sitozolik fraksiyondan farklı olarak nükleer fraksiyonda GRP78 kombine uygulama hariç tüm gruplarda artış göstermiştir. BPA ve MEHP'in beraber uygulandığı grupta kontrole kıyasla belirgin bir artış olmamıştır. Sitozolik fraksiyonda tespit edilemeyen XBP-1 ve CHOP proteinleri ise beklenildiği gibi nükleer fraksiyonda görülmüştür. Bu olay, proteinlerin hücre çekirdeğine geçerek transkripsiyon faktörü olarak davranabileceklerine ve diğer ilgili proteinlerin ekspresyonlarını indükleyebileceklerine işaret etmektedir. XBP-1 proteini ekspresyonu, kontrol grubunda gözlenmemiştir. Bunun yanında tunikamisinin uygulanan pozitif kontrol grubunda ve MEHP'in uygulandığı deney grubunda da XBP-1 proteini ekspresyonu gözlenmemiştir. BPA ve BPA+MEHP kombine uygulaması sonrasında ise XBP-1 proteini ekspresyonunda belirgin bir artış

gözlenmesi bu proteine ait internal ER stres yolağının BPA tarafından spesifik olarak indüklendiğine işaret etmektedir. Benzer bir sonuç, CHOP proteininde de elde edilmiştir. Kontrol grubunda ve MEHP uygulanan grupta CHOP proteininin eksprese edilmediği gözlenmiştir. Tunikamisin uygulaması sonrasında β -aktine normalize edilmiş ekspresyon düzeyinde yaklaşık 75 kat artış olarak kaydedilmiştir. XBP-1 proteininde olduğu gibi MEHP uygulaması sonrası CHOP proteininin tespit edilmemesi, buna karşılık BPA ve kombine uygulama sonrasında kontrole kıyasla sırasıyla %40 ve %56 oranında artış elde edilmesi CHOP proteinine ait nükleer fraksiyondaki aktivasyonun BPA tarafından yönlendirildiği düşüncesini destekler niteliktedir. Ayrıca, tez çalışmasının sonuçları maruz kalınan EDC'lerin oluşturduğu oksidatif stresin ER stresine neden olabileceği ve bunların bir sonucu olarak otofaji/apoptoz meydana getirebileceği görüşünü destekler niteliktedir.

5.4. Mikroskopik İncelemeler

5.4.1. Işık Mikroskobu İncelemeleri

Tez çalışması kapsamında HepG2 hücrelerinin ışık mikroskobunda incelemesinde belirgin çekirdekçikler ve yuvarlak çekirdekler gözlenmiştir. HepG2 hücrelerinde çekirdek sitoplazma oranının çekirdek lehine arttığı belirlenmiştir. Hücrelerin genelde mitotik bölünmenin metafaz ve anafaz evresine ait olduğu görülmüştür. Birkaç hücrenin sitoplazmasında yuvarlak geniş boşlukların varlığı izlenmiştir.

BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin ışık mikroskobunda incelemesinde hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir. Yer yer nekrotik hücreler ve hücre artıkları da izlenmiştir. Bazı hücrelerin sitoplazmasında lipit damlacıkları izlenirken, birçok hücrede sitoplazmanın vakuoller ile dolu olduğu gözlenmiştir. MEHP uygulanan HepG2 hücre hattına ait hücreler kontrol grubundaki hücrelere benzer görünümde izlenmiştir. Ancak, bu grupta bazı hücrelerde sitoplazmadaki boşlukların oldukça büyük olduğu ve yer yer çekirdeği sitoplazmanın kenarına ittiği gözlenmiştir. Mitotik figür gözlenmemiştir.

MEHP ve BPA'nın birlikte uygulandığı grupta ise, hücre sayısının diğer gruplara göre azaldığı izlenmiştir. BPA grubuna benzer şekilde hücre artıkları ve

dejenere hücreler gözlenmiştir. İncelenen hücrelerin hepsinin sitoplazmasının vakuollerle dolu olduğu görülmüştür. Kombine uygulamanın gerek hücre içi organizasyonda daha belirgin değişikliklere neden olduğu, gerekse hücredeki yapısal değişiklikler ve dejenerasyonu daha yüksek oranlarda tetikleyebileceği ifade edilebilir.

Literatürde karaciğer dokusu veya hücrelerinde BPA ve/veya MEHP maruziyeti sonrası yapılmış bu kapsamda histo/sitopatolojik bir çalışma bulunamamıştır.

5.4.2. Elektron Mikroskobu İncelemeleri

HepG2 hücre hattının elektron mikroskopta incelemesinde hücrelerin mikrovillusları, ortada yerleşmiş ökromatik çekirdekleri, belirgin çekirdekçikleri, sitoplazmada mitokondriyon, granüllü ER, lipid damlacıkları, glikojen tanecikleri gözlenmiştir. HepG2 hücreleri birbirleri ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Birkaç hücre bir araya gelerek dokudaki safra kanalikulunu taklit eden boşluklar oluşturmuştur. HepG2 hücrelerinin polarite gösterdiği saptanmıştır.

BPA uygulanan HepG2 hücrelerinin elektron mikroskobunda incelemesinde hücrelerin mikrovilluslarının oldukça azaldığı saptanmıştır. Bazı hücrelerde gözlenmemiştir. Hücrelerin sitoplazmasında granüllü ER yanı sıra çok sayıda iri vakuoller, lipid damlacıkları gözlenmiştir. Bazı mitokondriyumların irileştiği bazılarının membran ile çevrili olduğu ve otofajiye gittiği gözlenmiştir. Bazı hücrelerin sitoplazmasının genişlemiş düz ER ile dolu olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular, ER stresi oluştuğuna dair veriler ile de uyumludur.

MEHP uygulanan HepG2 hücre hattına ait hücrelerin elektron mikroskobu incelemesinde hücrelerin sitoplazmasında granüllü ER hemen komşuluğunda mitokondriyumlar, düz endoplazma retikulumu, glikojen granülleri, lipid damlacıkları, lizozomlar gözlenmiştir. Bazı hücrelerde granüllü ER’de genişleme, bazı mitokondriyonlarda yer yer krista kaybı izlenmiştir. MEHP uygulanan gruptaki hücreler kontrol grubuna benzemektedir.

MEHP ve BPA’nın birlikte uygulandığı grubun elektron mikroskop incelemesinde hücrelerde mikrovillus ve polarite kaybı izlenmiştir. HepG2 hücrelerinin çekirdek şeklinde deformite gözlenmiştir. Hücrelerin sitoplazmasında iri vakuoller saptanmıştır. Bazı hücrelerin sitoplazmasının bu iri vakuoller ile dolu

olduğu belirlenmiştir. Bazı hücrelerde ise vakuollerin yanısıra mitokondriyumlar, genişlemiş düz ER, lipit damlaları, myelin figürler izlenmiştir. Mitokondriyumlarda irileşme, bazı mitokondriyonların uç kısmında tomurcuklanma tarzında uzama gözlenmiştir. Tüm bu bulgular, hücre dejenerasyonun en şiddetli olduğu grubun MEHP+BPA uygulanan grup olduğunu göstermektedir. Ayrıca, kombine grupta elde edilen gerek oksidatif stres, gerekse ER stresi markörlerine dair verilerle de uyumludur. Tüm bilgiler dikkate alındığında kombine maruziyet ile hücrede yapısal ve işlevsel olarak daha fazla stres olduğu söylenebilir. Bu stres, zamanla hücreyi farklı mekanizmalarla ölüme götürebilir. Bu mekanizmalar uygulama doz ve süresine bağlı olarak apoptoz, otofaji veya nekroz olabilir. Bu nedenle kombine maruziyetin intrasellüler toksisitesinin tekli maruziyetlerden daha şiddetli olduğu belirtilebilir.

Karaciğer dokusu veya hücrelerinde BPA ve/veya MEHP maruziyeti sonrası yapılan, histo/sitopatolojik veya morfolojik değişikliklerin elektron mikroskobu ile incelendiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

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

Bilindiği üzere TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP-biotin nick endlabeling) yöntemi DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar ve sadece apoptoza uğramış hücre çekirdekleri boyanır (202). BPA ve ftalat türevlerinin apoptotik etkilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Granüloza hücrelerinde BPA'nın apoptozu indükleyip indüklemediğini incelemek için, Xu ve ark. (2002) tarafından hücreler farklı süre ve konsantrasyonlarda BPA ile inkübe edilmiştir. Yapılan TUNEL analizinde, artan doz ve sürelerde apoptotik hücre sayısının arttığı gözlenmiştir. Kontrol grubunda apoptotik hücre oranı $1,6 \pm 0,7$; 100 fM BPA uygulanan grupta $1,9 \pm 0,9$; 100 pM uygulamada $6,3 \pm 0,9$; 100 nM'lık grupta $10,8 \pm 1,3$ ve 100 μ M uygulamada ise $16,6 \pm 2,0$ bulunmuştur. Apoptotik hücreler, hücresel büzülme, membran kabarması ve nükleer kondensasyon ile karakterize edilmiştir (178). Diğer bir çalışmada, insan endotelial hücreleri 200 μ M MEHP'e maruz bırakılmış ve hücresel apoptozu değerlendirmek için TUNEL boyama yapılmıştır. 12 ve 24 saat maruziyetten sonra apoptotik hücre sayısında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca, 12 ve 24 saat sonra apoptozun bir göstergesi

olan kaspaz 3 seviyeleri de belirgin bir şekilde artarken, 6 saatlik maruziyet sonrası kaspaz 3 seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde değişmediği saptanmıştır. Çalışmada, MEHP ile indüklenen apoptozun otofajiye bağlı olup olmadığının anlaşılması için hücreler, otofaji inhibitörü olan 3-metiladenine (3MA) 2 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Bu durumda apoptozda azalma görülmüştür. Sonuçlar MEHP'in otofajiye bağlı olarak apoptozu indüklediği fikrini destekler niteliktedir (194). Liu ve ark.'nın (2017) yaptığı bir çalışma, MEHP'in doz bağımlı olarak (0-200 μ M; 24 saat) insan vasküler endotelyal hücre hattında ROS düzeylerini artırdığını ve otofajiye sebep olabileceğini göstermiştir. MEHP grubunda bir otofaji markörü olan ve otofagozomlarca kullanılan mikrotübül assosiye protein 1A/1B- hafif zincir 3 fosfotidil etanolamin konjuge form (LC3-II) ekspresyonunda artış görülürken, N-asetil sistein verilen MEHP grubunda ROS düzeyleri azalmış ve LC3-II ekspresyonunda da düşüş görülmüştür (195).

Çalışmamız kapsamında yapılan TUNEL analizinde kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde ortalama %1,6 TUNEL pozitif hücre saptanmıştır. BPA uygulanan grupta %3,7; MEHP uygulanan grupta %2,9; MEHP-BPA uygulanan grupta ise, %3,7 TUNEL pozitif hücre belirlenmiştir. BPA grubunda gözlenen TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur MEHP grubunda da kontrol grubuna kıyasla daha yüksek TUNEL pozitif hücre saptanmakla birlikte, kontrol ve MEHP grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Kombine maruziyet grubunda da TUNEL pozitif hücre sayısında kontrole oranla anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).

Kaspaz 3, efektör bir kaspazdır (203). Aktivitesi apoptoz seviyelerini yansıtır. L02 hücrelerinde MEHP maruziyetinden (6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 μ M) 24 saat sonra, 100 μ M çalışma grubu hariç tüm gruplarda aktifleşmiş kaspaz 3'te önemli artışlar gözlenmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,01$). Elde edilen veriler MEHP'in hücre hatlarında mitokondriyal ve kaspaz 3'e bağlı yolaklar yoluyla, apoptozu indükleyebileceğini düşündürmektedir (76). Kaspaz 9 da apoptotik süreçte yer alan anahtar proteazlardandır (204). Yang ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada MEHP'e farklı doz ve sürelerde (6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 μ M, 24/48 saat) maruziyetin kaspaz yolları (kaspaz 9 ve kaspaz 3) üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğini araştırmışlardır.

MEHP'in 36 saat maruziyet sonrası 6,25 μ M deney grubu hariç, diğer tüm deney gruplarında kaspaz-9 ve -3 aktivitelerini önemli ölçüde indüklediği görülmüştür ($p<0,05$ veya $p<0,01$). Özellikle, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda MEHP, sırasıyla kaspaz 3 aktivitesinde 1,65 kat ve 1,67 kat artış ve kaspaz 9 aktivitesinde 1,76 kat ve 1,64 kat artışa neden olmuştur (79).

Bir başka çalışmada, Naarala ve Korpi fare makrofaj hücre hattında DEHP, BBP, DBP ve DIBP test maddeleri ile 10 μ M, 100 μ M ve 1 mM konsantrasyonlarda çalışmıştır. DEHP ve BBP'nin, çalışılan dozlardan herhangi birinde nekrotik veya apoptotik hücre ölümüne neden olmadığı; hem DIBP hem de DBP'nin en yüksek iki konsantrasyonda (100 μ M ve 1 mM) doz- bağımlı nekrotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (196).

HL-60 hücrelerinde BPA maruziyetinden sonra, prokaspaz 3, 8 ve 9'un aktif formlarının ekspresyonlarının western blotting ile tayin edildiği bir çalışmada; 0,4 mM BPA ile muamele edilmiş hücrelerde prokaspaz 3 ve 9 ekspresyonlarında gözlenirken, prokaspaz 8 ekspresyonunda bir değişim gözlenmemiştir. Kaspaz 9'un aktif formunun ekspresyonunun zamana bağlı bir şekilde 3 saatte pik düzeylere ulaştığı; benzer şekilde, kaspaz 3'ün aktif formunun 3 saatte bir pik göstermiş ve daha sonra azaldığı gösterilmiştir. Ancak, kaspaz 8'in aktif formunun ekspresyonu 5 saatte sonrasında bile görülmemiştir. Elde edilen verilere dayanarak BPA'nın HL-60 hücrelerinde apoptoz kaskadlarını daha hızlı harekete geçirdiği söylenebilir (179).

Çalışmamızda, 24 saatlik maruziyet sonrası kaspaz 3 düzeyleri BPA ve BPA+MEHP grubunda kontrole oranla artış (%54, her iki grup için) göstermekle birlikte, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Kaspaz 8 düzeyleri ise BPA grubu ve kombine grupta kontrole kıyasla anlamlı bir artış (sırasıyla %30 ve %24 kat) göstermiştir. ($p<0,05$). Diğer grupların kaspaz 8 düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Bu durumda ekstrinsik kaspaz yolağının BPA ve kombine uygulama ile indüklendiği; ancak MEHP'in HepG2 hücrelerinde bu yolağı uyarmadığı söylenebilir. Bu bulgular TUNEL yöntemiyle elde edilen bulgular ile uyumludur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında HepG2 hücre hattında BPA ve MEHP'e tek tek maruziyetin ve bir arada maruziyetin neden olabileceği toksik etkiler incelenmiştir. Bu kimyasal maddelere maruziyetin oksidatif stres, oksidan/antioksidan statüdeki değişimler ve ER stresi ile ilişkisinin ele alınmasının yanı sıra, hücrelerde maruziyet sonucu meydana gelen morfolojik değişimler, sitotoksik ve apoptotik etkiler de bu kapsamda değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir:

1. Hücre canlılığının belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılarak test maddelerinin IC30 ve IC50 değerleri hesaplanmıştır. IC50 değeri BPA için 615 μ M; MEHP için 17,4 μ M; MEHP+BPA ise 15+500 μ M bulunmuştur, IC30 değerleri ise BPA, MEHP ve kombine grup için sırasıyla 343 μ M; 4,5 μ M ve 10+400 μ M olarak bulunmuştur.
2. Hücre içi ROS düzeyleri, kontrol grubuna oranla MEHP grubunda %51 ve BPA grubunda %86 oranında anlamlı bir artış göstermiştir. Kombine grupta ise her iki test maddesinin ayrı ayrı maruziyetinden daha yüksek düzeylerde ROS üretimi gözlenmiş olup; kontrole kıyasla artış oranının %290 olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu durum test maddelerine kombine maruziyetin etkilerinin, tekli maruziyetten daha ciddi istenmeyen etkilere neden olabileceği görüşünü desteklemektedir.
3. HepG2 hücrelerinin BPA ve DEHP'e bir arada maruziyeti (24 saat) sonucu kontrol grubuna kıyasla her 3 antioksidan enzim aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Bu durum, HepG2 hücrelerinin EDC'lere kombine maruziyeti sonucu oluşan oksidatif stresin tek tek maruziyete oranla şiddetlendiği; hücrenin oksidatif hasardan korunabilmek için adaptif bir savunma yanıtı geliştirdiği şeklinde açıklanabilir.
4. Total GSH düzeylerinin BPA grubunda kontrole oranla %91 oranında yüksek olduğu bulunmuştur ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Kombine grupta ise kontrole göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. BPA grubunda görülen total GSH artışı, GSSG

düzeylerindeki artıştan kaynaklanabileceği gibi, adaptif bir yanıt olarak redükte GSH düzeylerinin artışından da kaynaklanabilir.

5. Kombine maruziyet grubunda gözlenen MDA düzeylerindeki artışın (4,9 kat) gerek kontrol gerekse tekli maruziyet gruplarında saptanan düzeylere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu bulgular, EDC'lere tekli maruziyet ile lipit peroksidasyonda bir değişiklik gözlenmezken, kombine maruziyetin lipitlerde peroksidasyona yol açabileceğini göstermektedir. Kombine BPA+MEHP temasının hücrede ciddi membran hasarlarına neden olabileceği ve hasar sonrası hücre ölümüne yol açabilecek mekanizmaları tetikleyebileceği görüşünü desteklemektedir.
6. BPA+ MEHP grubunda saptanan karbonil düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2,2 kat yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Kombine maruziyet grubunda lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonundaki korele artışların, kombine grupta görülen protein oksidasyonunun temel nedenlerinden birinin artan lipit peroksidasyonu olduğuna işaret etmektedir. Bu durumda kombine maruziyetin birincil olarak lipit hasarını, takiben de protein hasarını tetiklediği söylenebilir.
7. 8-OHdG düzeyleri, gruplar arasında anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0,05$). Çalışma için seçilen dozların düşük olması (IC30 uygulanmıştır), test maddelerinin düşük düzeyde hasar meydana getirmesi ve bu hasarın 24 saatte onarılması ya da DNA hasarına yol açmaması şeklinde açıklanabilir. Çalışmada daha ciddi istenmeyen etkiler oluşturması beklenen kombine grupta da kontrol grubuna kıyasla %11 oranında bir artış meydana gelmiş olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).
8. Tez çalışması kapsamın elde edilen sonuçlar özellikle kombine maruziyet grubunda ER stresinin indüklendiğine işaret etmektedir. Nükleer fraksiyonda PERK'in kontrol grubuna kıyasla en yüksek ekspresyonu (%85 artış) BPA+MEHP grubunda gösterdiği görülmüştür. Bu artış, tek başına BPA'nın uygulandığı grupta %65 olarak kaydedilirken, MEHP uygulaması sonrası sadece %15 civarında olması nükleer fraksiyonda PERK üzerindeki

ekspresyon artışının BPA'dan kaynaklandığını düşündürmektedir. XBP1 ve CHOP proteinleri nükleer fraksiyonda görülmüştür; bu durum, proteinlerin hücre çekirdeğine geçerek transkripsiyon faktörü olarak davranabileceklerine ve diğer ilgili proteinlerin ekspresyonlarını indükleyebileceklerine işaret etmektedir. BPA ve BPA+MEHP kombine uygulaması sonrasında ise XBP1 proteini ekspresyonunda belirgin bir artış gözlenmesi bu proteine ait internal ER stres yolağının BPA tarafından spesifik olarak indüklendiğini göstermektedir. Benzer bir sonuç, CHOP proteininde de elde edilmiştir. XBP1 proteininde olduğu gibi MEHP uygulaması sonrası CHOP proteininin tespit edilmemesi, buna karşılık BPA ve kombine uygulama sonrasında kontrole kıyasla sırasıyla %40 ve %56 oranında artış elde edilmesi CHOP proteinine ait nükleer fraksiyondaki aktivasyonun BPA tarafından yönlendirildiği düşüncesini desteklemektedir. Ayrıca, tez çalışmasının sonuçları maruz kalan EDC'lerin oluşturduğu oksidatif stresin ER stresine neden olabileceği ve bunların bir sonucu olarak otofaji meydana getirebileceği görüşünü destekler niteliktedir.

9. Işık mikroskop değerlendirmeleri, BPA ve MEHP'e bir arada maruziyetin gerek hücre içi organizasyonda daha belirgin değişikliklere neden olduğunu, gerekse hücredeki yapısal değişiklikler ve dejenerasyonu daha yüksek oranlarda tetikleyebileceğini göstermiştir. Faz kontrast mikroskop incelemelerinde BPA uygulanan grupta genişlemiş düz ER yapısının gözlenmesi ER stresi oluştuğuna dair veriler ile uyumludur. Hücre dejenerasyonunun en şiddetli olduğu grubun MEHP+BPA uygulanan grup olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, kombine grupta elde edilen gerek oksidatif stres, gerekse ER stresi markörlerine dair verilerle de uyumludur. Tüm bilgiler dikkate alındığında kombine maruziyet ile hücrede yapısal ve işlevsel olarak daha fazla stres oluştuğu söylenebilir. Bu stres, zamanla hücreyi farklı mekanizmalarla ölüme götürebilir. Bu mekanizmalar uygulama doz ve süresine bağlı olarak apoptoz, otofaji veya nekroz olabilir. Sonuç olarak kombine maruziyetin intrasellüler toksisitesinin tekli maruziyetlerden daha şiddetli olduğu yorumu yapılabilir.

10. TUNEL analizinde kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde ortalama %1,6 TUNEL pozitif hücre saptanmıştır. BPA uygulanan grupta %3,7; MEHP uygulanan grupta %2,9; MEHP-BPA uygulanan grupta ise, %3,7 TUNEL pozitif hücre belirlenmiştir. BPA grubunda gözlenen TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. MEHP grubunda da kontrol grubuna kıyasla daha yüksek TUNEL pozitif hücre saptanmakla birlikte, kontrol ve MEHP grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Kombine maruziyet grubunda da TUNEL pozitif hücre sayısında kontrole oranla anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).
11. BPA grubu ve kombine grubun kaspaz 3 düzeyleri kontrole kıyasla %54 oranında yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Kaspaz 8 düzeyleri ise BPA grubu ve kombine grupta kontrole kıyasla anlamlı bir artış (sırasıyla %30 ve %24 kat) göstermiştir ($p<0,05$). Bu durumda ekstrinsik kaspaz yolağının BPA ve kombine uygulama ile indüklendiği; ancak MEHP'in HepG2 hücrelerinde bu yolağı uyarmadığı söylenebilir. Bu bulgular TUNEL yöntemiyle elde edilen bulgular ile uyumludur.

Tüm bu sonuçlar EDC'lere maruziyetin karaciğer hücrelerinde ters etkilere neden olabileceğini göstermektedir. Bu ters etkiler hücrede morfolojik değişimlerin görülmesi, apoptoz, oksidan/antoksidan dengenin bozulması, ER stresi olarak sıralanabilir. Sunulan tez çalışması, özellikle en yaygın kullanıma sahip EDC'ler olan BPA ile DEHP'in ana ve toksik metaboliti olan MEHP'e tekli ya da bir arada maruziyetin istenmeyen etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği ilk çalışma niteliğindedir. BPA ve DEHP'e aynı anda maruziyet ile karaciğer hücrelerinde gözlenen toksik etkilerinin şiddetinin önemli düzeyde artacağı belirlenmiştir. Bu maddelere özellikle yaşamın erken dönemlerinde maruziyet düzeyinin azaltılması için gerekli önlemlerin alınması ve yasal düzenlemelerin getirilmesi önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Environmental Protection Agency, What is Endocrine Disruption? [Internet]. [Erişim tarihi 15.01.2018]. Erişim adresi: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>.
2. Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Korn LR, Brody JG. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ. Sci. Technol.* 2003;37(20):4543-53.
3. Green C, Kelly A. Effect of the exogenous soyabean phyto-oestrogen genistein on sperm quality, ATP content and fertilization rates in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) and walleye *Sander vitreus* (Mitchill). *J Fish Biol.* 2008;72(10):2485-99.
4. Axelsson J, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Lindh CH, Jonsson BA, Giwercman A. Prenatal phthalate exposure and reproductive function in young men. *Environ Res.* 2015;138:264-70.
5. Gascon M, Casas M, Morales E, Valvi D, Ballesteros-Gómez A, Luque N, et al. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and childhood respiratory tract infections and allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2015;135(2):370-8. e7.
6. Smit LA, Lenters V, Høyer BB, Lindh CH, Pedersen HS, Liermontova I, et al. Prenatal exposure to environmental chemical contaminants and asthma and eczema in school-age children. *Allergy.* 2015;70(6):653-60.
7. Zhao Y, Chen L, Li L-x, Xie C-m, Li D, Shi H-j, et al. Gender-specific relationship between prenatal exposure to phthalates and intrauterine growth restriction. *Pediatr Res.* 2014;76(4):401-8.
8. Trasande L, Spanier AJ, Sathyanarayana S, Attina TM, Blustein J. Urinary phthalates and increased insulin resistance in adolescents. *Pediatrics.* 2013;132(3):e646-e55.
9. Stojanoska MM, Milosevic N, Milic N, Abenavoli L. The influence of phthalates and bisphenol A on the obesity development and glucose metabolism disorders. *Endocrine.* 2017;55(3):666-81.
10. Guo Y, Wu Q, Kannan K. Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures. *Environ Int.* 2011;37(5):893-8.
11. Hines CJ, Hopf NB, Deddens JA, Silva MJ, Calafat AM. Estimated daily intake of phthalates in occupationally exposed groups. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2011;21(2):133-41.
12. Bekö G, Callesen M, Weschler CJ, Toftum J, Langer S, Sigsgaard T, et al. Phthalate exposure through different pathways and allergic sensitization in preschool children with asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic dermatitis. *Environ Res.* 2015;137:432-9.

13. Wittassek M, Angerer J. Phthalates: metabolism and exposure. *Int J Androl*. 2008;31(2):131-8.
14. Li X, Yin P, Zhao L. Effects of individual and combined toxicity of bisphenol A, dibutyl phthalate and cadmium on oxidative stress and genotoxicity in HepG 2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2017;105:73-81.
15. Jameson JL. *Harrison's endocrinology*. 2nd ed. USA: McGraw Hill Professional; 2010.
16. Green R, Hauser R, Calafat AM, Weuve J, Schettler T, Ringer S, et al. Use of di (2-ethylhexyl) phthalate-containing medical products and urinary levels of mono (2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants. *Environ Health Perspect*. 2005;113(9):1222.
17. Dickerson SM, Gore AC. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007;8(2):143-59.
18. Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC, et al. Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2006;143(3):303-15.
19. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009;30(4):293-342.
20. Hauser R, Calafat AM. Phthalates and human health. *Occup Environ Med*. 2005;62(11):806-18.
21. Ward JM, Peters JM, Perella CM, Gonzalez FJ. Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor α -null mice. *Toxicol Pathol*. 1998;26(2):240-6.
22. Peters JM, Cheung C, Gonzalez FJ. Peroxisome proliferator-activated receptor- α and liver cancer: where do we stand? *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(10):774-85.
23. Ito Y, Yamanoshita O, Asaeda N, Tagawa Y, Lee C-H, Aoyama T, et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate induces hepatic tumorigenesis through a peroxisome proliferator-activated receptor α -independent pathway. *J Occup Health*. 2007;49(3):172-82.
24. Cecchi A, Rovedatti M, Sabino G, Magnarelli G. Environmental exposure to organophosphate pesticides: assessment of endocrine disruption and hepatotoxicity in pregnant women. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012;80:280-7.
25. Erkekoğlu P, Giray BK, Kizilgun M, Hininger-Favier I, Rachidi W, Roussel A-M, et al. Thyroidal effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats of different selenium status. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2012;31(2).
26. Meeker JD, Ferguson KK. Relationship between urinary phthalate and bisphenol A concentrations and serum thyroid measures in US adults and adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2008. *Environ Health Perspect*. 2011;119(10):1396.

27. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;127(3-5):204-15.
28. Melnick R, Lucier G, Wolfe M, Hall R, Stancel G, Prins G, et al. Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environ Health Perspect*. 2002;110(4):427.
29. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environmental Health*. 2015;14:13.
30. Conolly RB, Lutz WK. Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicol Sci*. 2004;77(1):151-7.
31. Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, Vom Saal FS. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect*. 2003;111(8):994.
32. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1269-304.
33. Kohn MC, Melnick RL. Biochemical origins of the non-monotonic receptor-mediated dose-response. *J Mol Endocrinol*. 2002;29(1):113-23.
34. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*. 2012;33(3):378-455.
35. Lambert JC, Lipscomb JC. Mode of action as a determining factor in additivity models for chemical mixture risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2007;49(3):183-94.
36. Cassee FR, Groten JP, van Bladeren PJ, Feron VJ. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Crit Rev Toxicol*. 1998;28(1):73-101.
37. Meek M, Boobis AR, Crofton KM, Heinemeyer G, Van Raaij M, Vickers C. Risk assessment of combined exposure to multiple chemicals: a WHO/IPCS framework. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011;60(2 suppl 1):S1-S14.
38. Sexton K, Hattis D. Assessing cumulative health risks from exposure to environmental mixtures—three fundamental questions. *Environ Health Perspect*. 2007;115(5):825.
39. Viau C. Biological monitoring of exposure to mixtures. *Toxicol Lett*. 2002;134(1-3):9-16.
40. Viñas R, Jeng Y-J, Watson CS. Non-genomic effects of xenoestrogen mixtures. *Int J Environ Res Public Health*. 2012;9(8):2694-714.
41. Feron V, Groten J. Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(6):825-39.

42. Nakajima T, Hopf NB, Schulte PA. Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) 2000 [Internet]. [Erişim tarihi 15.01.2018]. Erişim adresi: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/TR42-18.pdf>.
43. Ventrice P, Ventrice D, Russo E, De Sarro G. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;36(1):88-96.
44. Food and Drug Administration, Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices 2003 [Internet]. [Erişim tarihi 15.01.2018]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/.../UCM080457.pdf>.
45. Wittassek M, Angerer J. Phthalates: metabolism and exposure. *Int J Androl*. 2008;31(2):131-8.
46. Wittassek M, Koch HM, Angerer J, Brüning T. Assessing exposure to phthalates—the human biomonitoring approach. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(1):7-31.
47. European Commission, Opinion on the safety of medical devices containing DEHP - plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk 2008 [Internet]. [Erişim tarihi 15.01.2018]. Erişim adresi: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_047.pdf.
48. Rudel RA, Perovich LJ. Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. *Atmos Environ*. 2009;43(1):170-81.
49. Carlstedt F, Jönsson B, Bornehag CG. PVC flooring is related to human uptake of phthalates in infants. *Indoor Air*. 2013;23(1):32-9.
50. Bamai YA, Shibata E, Saito I, Araki A, Kanazawa A, Morimoto K, et al. Exposure to house dust phthalates in relation to asthma and allergies in both children and adults. *Sci Total Environ*. 2014;485:153-63.
51. Hopf N, Berthet A, Vernez D, Langard E, Spring P, Gaudin R. Skin permeation and metabolism of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Toxicol Lett*. 2014;224(1):47-53.
52. Yaghjyan L, Ghita GL, Dumont-Driscoll M, Yost RA, Chang SH. Maternal exposure to di-2-ethylhexylphthalate and adverse delivery outcomes: A systematic review. *Reprod Toxicol*. 2016;65:76-86.
53. Bajkin I, Bjelica A, Ičin T, Dobrić V, Kovačev-Zavišić B, Medić-Stojanoska M. Effects of phthalic acid esters on fetal health. *Med Pregl*. 2014;67(5-6):172-5.
54. Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Ntp cerhr mon*. 2006(18):v, vii-7, II-iii-xiii passim.
55. Giammona CJ, Sawhney P, Chandrasekaran Y, Richburg JH. Death receptor response in rodent testis after mono-(2-ethylhexyl) phthalate exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;185(2):119-27.

56. Erkekoglu P, Giray BK, Kızılgün M, Rachidi W, Hininger-Favier I, Roussel A-M, et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate-induced renal oxidative stress in rats and protective effect of selenium. *Toxicol Mech Methods*. 2012;22(6):415-23.
57. Ha M, Wei L, Guan X, Li L, Liu C. p53-dependent apoptosis contributes to di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced hepatotoxicity. *Environ Pollut*. 2016;208:416-25.
58. Ye H, Ha M, Yang M, Yue P, Xie Z, Liu C. Di2-ethylhexyl phthalate disrupts thyroid hormone homeostasis through activating the Ras/Akt/TRHr pathway and inducing hepatic enzymes. *Sci Rep*. 2017;7:40153.
59. Earl Gray L, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, et al. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *Int J Androl*. 2006;29(1):96-104.
60. Talsness CE, Andrade AJ, Kuriyama SN, Taylor JA, vom Saal FS. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364(1526):2079-96.
61. Wei Z, Song L, Wei J, Chen T, Chen J, Lin Y, et al. Maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate alters kidney development through the renin-angiotensin system in offspring. *Toxicol Lett*. 2012;212(2):212-21.
62. Lyche JL, Gutleb AC, Bergman A, Eriksen GS, Murk AJ, Ropstad E, et al. Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2009;12(4):225-49.
63. Zong T, Lai L, Hu J, Guo M, Li M, Zhang L, et al. Maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate disrupts placental growth and development in pregnant mice. *J Hazard Mater*. 2015;297:25-33.
64. Rothenbacher K-P, Kimmel R, Hildenbrand S, Schmahl FW, Dartsch PC. Nephrotoxic effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) hydrolysis products on cultured kidney epithelial cells. *Hum Exp Toxicol*. 1998;17(6):336-42.
65. Buluş AD, Aşci A, Erkekoglu P, Balci A, Andiran N, Koçer-Gümüşel B. The evaluation of possible role of endocrine disruptors in central and peripheral precocious puberty. *Toxicol Mech Methods*. 2016;26(7):493-500.
66. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Radwan P, Jakubowski L, Wielgomas B, et al. Exposure to widespread environmental endocrine disrupting chemicals and human sperm sex ratio. *Environ Pollut*. 2016;213:732-40.
67. Legler J, Fletcher T, Govarts E, Porta M, Blumberg B, Heindel JJ, et al. Obesity, diabetes, and associated costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(4):1278-88.
68. Stelmach I, Majak P, Jerzynska J, Podlecka D, Stelmach W, Polańska K, et al., editors. The effect of prenatal exposure to phthalates on food allergy and early eczema in inner-city children. *Allergy Asthma Proc*. 2015;36(4):72-8.
69. North ML, Takaro TK, Diamond ML, Ellis AK. Effects of phthalates on the development and expression of allergic disease and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;112(6):496-502.

70. Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol*. 2014;13(3):330-8.
71. Kim B-N, Cho S-C, Kim Y, Shin M-S, Yoo H-J, Kim J-W, et al. Phthalates exposure and attention-deficit/hyperactivity disorder in school-age children. *Biol Psychiatry*. 2009;66(10):958-63.
72. Hsieh T-H, Tsai C-F, Hsu C-Y, Kuo P-L, Lee J-N, Chai C-Y, et al. Phthalates induce proliferation and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer through the AhR/HDAC6/c-Myc signaling pathway. *FASEB J*. 2012;26(2):778-87.
73. Erkekoglu P, Zeybek ND, Giray B, Asan E, Arnaud J, Hincal F. Reproductive toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate in selenium-supplemented and selenium-deficient rats. *Drug Chem Toxicol*. 2011;34(4):379-89.
74. IARC Monographs, Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) [Internet]. [Erişim tarihi 15.02.2018]. Erişim Adresi: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/TR42-18.pdf>.
75. Lapinskas PJ, Brown S, Leesnitzer LM, Blanchard S, Swanson C, Cattley RC, et al. Role of PPAR α in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology*. 2005;207(1):149-63.
76. Chen X, Wang J, Qin Q, Jiang Y, Yang G, Rao K, et al. Mono-2-ethylhexyl phthalate induced loss of mitochondrial membrane potential and activation of Caspase3 in HepG2 cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012;33(3):421-30.
77. Takashima K, Ito Y, Gonzalez FJ, Nakajima T. Different mechanisms of DEHP-induced hepatocellular adenoma tumorigenesis in wild-type and Ppar α -null mice. *J Occup Health*. 2008;50(2):169-80.
78. Ha, Guan X, Wei L, Li P, Yang M, Liu C. Di-(2-ethylhexyl) phthalate inhibits testosterone level through disturbed hypothalamic–pituitary–testis axis and ERK-mediated 5 α -Reductase 2. *Sci Total Environ*. 2016;563:566-75.
79. Yang G, Zhou X, Wang J, Zhang W, Zheng H, Lu W, et al. MEHP-induced oxidative DNA damage and apoptosis in HepG2 cells correlates with p53-mediated mitochondria-dependent signaling pathway. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(7):2424-31.
80. Miura Y, Naito M, Ablake M, Terayama H, Yi SQ, Qu N, et al. Short-term effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on testes, liver, kidneys and pancreas in mice. *Asian J Androl*. 2007;9(2):199-205.
81. Latini G. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin Chim Acta*. 2005;361(1-2):20-9.
82. ATSDR, Toxicological Profile for Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) [Internet]. [Erişim tarihi 15.01.2018]. Erişim adresi: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=684&tid=65>
83. NIOSH, Di(2-ethylhexyl) Phthalate [Internet]. [Erişim tarihi 15.01.2018]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0271.html>.

84. Erkekoglu P, Giray B, Durmaz E, Ozmert E, Kizilgun M, Derman O, et al. Evaluation of the correlation between plasma amylase and lipase levels and phthalate exposure in pubertal gynecomastia patients/Fitalat teması ile plazma amilaz ve lipaz duzeyleri arasindaki iliskinin pubertal jinekomasti hastalarinda degerlendirilmesi. *Turk Pediatri Ars.* 2010;366-71.
85. Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Ntp cerhr mon.* 2006(18):v, vii-7, II-iii-xiii passim.
86. 14th International Conference on Environmental Science and Technology [Internet]. [Erişim tarihi 15.01.2018]. Erişim adresi: <http://toc.proceedings.com/28192webtoc.pdf>.
87. Fenichel P, Chevalier N, Brucker-Davis F, editors. Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor. *Ann Endocrinol (Paris)*; 2013: Elsevier.
88. Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;127(1-2):27-34.
89. Mikołajewska K, Stragierowicz J, Gromadzinska J. Bisphenol A—Application, sources of exposure and potential risks in infants, children and pregnant women. *Int J Occup Med Environ Health.* 2015;28(2):209-41.
90. Brede C, Fjeldal P, Skjevrak I, Herikstad H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam.* 2003;20(7):684-9.
91. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol.* 2007;24(2):139-77.
92. Rubin BS, Soto AM. Bisphenol A: perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;304(1-2):55-62.
93. Hoekstra EJ, Simoneau C. Release of bisphenol A from polycarbonate—a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(4):386-402.
94. Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect.* 2005;113(4):391.
95. Koch HM, Kolossa-Gehring M, Schroter-Kermani C, Angerer J, Bruning T. Bisphenol A in 24 h urine and plasma samples of the German Environmental Specimen Bank from 1995 to 2009: a retrospective exposure evaluation. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2012;22(6):610-6.
96. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol.* 2002;15(10):1281-7.
97. Ye X, Wong L-Y, Bishop AM, Calafat AM. Variability of urinary concentrations of bisphenol A in spot samples, first morning voids, and 24-hour collections. *Environ Health Perspect.* 2011;119(7):983.

98. Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol*. 2001;14(2):149-57.
99. Hanioka N, Naito T, Narimatsu S. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere*. 2008;74(1):33-6.
100. Iso T, Watanabe T, Iwamoto T, Shimamoto A, Furuichi Y. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biolo Pharm Bull*. 2006;29(2):206-10.
101. Rochester JR. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol*. 2013;42:132-55.
102. Kaur S, Saluja M, Bansal M. Bisphenol A induced oxidative stress and apoptosis in mice testes: Modulation by selenium. *Andrologia*. 2018;50(3).
103. Ge L-C, Chen Z-J, Liu H, Zhang K-S, Su Q, Ma X-Y, et al. Signaling related with biphasic effects of bisphenol A (BPA) on Sertoli cell proliferation: a comparative proteomic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2014;1840(9):2663-73.
104. Takahashi O, Oishi S. Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food Chemical Toxicol*. 2003;41(7):1035-44.
105. Hassan ZK, Elobeid MA, Virk P, Omer SA, ElAmin M, Daghestani MH, et al. Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012.
106. DeBenedictis B, Guan H, Yang K. Prenatal Exposure to Bisphenol A Disrupts Mouse Fetal Liver Maturation in a Sex-Specific Manner. *J Cell Biochem*. 2016;117(2):344-50.
107. Weinhouse C, Anderson OS, Bergin IL, Vandenberg DJ, Gyekis JP, Dingman MA, et al. Dose-dependent incidence of hepatic tumors in adult mice following perinatal exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect*. 2014;122(5):485.
108. Jayashree S, Indumathi D, Akilavalli N, Sathish S, Selvaraj J, Balasubramanian K. Effect of Bisphenol-A on insulin signal transduction and glucose oxidation in liver of adult male albino rat. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;35(2):300-10.
109. Perreault L, McCurdy C, Kerege AA, Houck J, Færch K, Bergman BC. Bisphenol A impairs hepatic glucose sensing in C57BL/6 male mice. *PloS one*. 2013;8(7):e69991.
110. Asahi J, Kamo H, Baba R, Doi Y, Yamashita A, Murakami D, et al. Bisphenol A induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in mouse non-parenchymal hepatocytes. *Life Sci*. 2010;87(13-14):431-8.
111. Benachour N, Aris A. Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;241(3):322-8.

112. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission Related To 2,2-Bis(4-Hydroxyphenyl)Propane (Bisphenol A) [Internet]. 2006 [Erişim tarihi 15.01.2018]. Erişim adresi: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/428.pdf
113. Seaver LC, Imlay JA. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J Biol Chem*. 2004;279(47):48742-50.
114. Messner KR, Imlay JA. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem*. 2002;277(45):42563-71.
115. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57(1):395-418.
116. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1-40.
117. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
118. Djordjevic VB. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol*. 2004;237:57-89.
119. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7(1):65-74.
120. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci* 38(7):592-607.
121. Nash KM, Ahmed S. Nanomedicine in the ROS-Mediated Pathophysiology: Applications and Clinical Advances. *Nanomedicine* 2015;11(8):2033-40.
122. Ogita H, Liao J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium*. 2004;11(2):123-32.
123. Buettner GR, Schafer FQ. Free radicals, oxidants, and antioxidants. *Teratology*. 2000;62(4):234.
124. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(8):1499-503.
125. Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1-2):60-76.
126. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004;134(3):489-92.
127. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*. 2009;390(3):191-214.

128. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993;57(5 Suppl):715-24..
129. Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology.* 2012;2012:137289.
130. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
131. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(7):995-1014.
132. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20313-6.
133. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 2000;32(3-4):307-26.
134. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis.* 2007;115(2):81-103.
135. Dreher D, Junod AF. Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1995;162(1):147-53.
136. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement1, 2. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(11):1102-15.
137. Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996;149(1):21-8.
138. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, et al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet.* 1996;347(8999):444-5.
139. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):361-70.
140. Kohen R, Nyska A. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002;30(6):620-50.
141. Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32(8):595-603.
142. Sandström J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem.* 1994;269(29):19163-6.
143. Sun E, Xu H, Liu Q, Zhou J, Zuo P, Wang J. The mechanism for the effect of selenium supplementation on immunity. *Biol Trace Elem Res.* 1995;48(3):231-8.

144. Herbet S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. *FEBS J.* 2007;274(9):2163-80.
145. Dobson CM, Šali A, Karplus M. Protein folding: a perspective from theory and experiment. *Angew Chem Int Ed.* 1998;37(7):868-93.
146. Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science.* 2000;290(5496):1571-4.
147. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:739-89.
148. Buck TM, Wright CM, Brodsky JL, editors. The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Dec; 18(6): 751–761.
149. Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3641-51.
150. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 2004;14(1):20-8.
151. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest.* 2002;110(10):1389-98.
152. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology.* 2007;22(3):193-201.
153. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 1999;13(10):1211-33.
154. Ma Y, Hendershot LM. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2003;278(37):34864-73.
155. Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science.* 2007;318(5852):944-9.
156. Bertolotti A, Wang X, Novoa I, Jungreis R, Schlessinger K, Cho JH, et al. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice. *J Clin Invest.* 2001;107(5):585-93.
157. Hinnebusch AG, Lorsch JR. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(10):a011544.
158. Verfaillie T, Rubio N, Garg A, Bultynck G, Rizzuto R, Decuypere J, et al. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* 2012;19(11):1880.
159. Masuoka HC, Townes TM. Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice. *Blood.* 2002;99(3):736-45.

160. Roybal CN, Yang S, Sun C-W, Hurtado D, Vander Jagt DL, Townes TM, et al. Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem.* 2004;279(15):14844-52.
161. Zhang T, Zhang N, Baehr W, Fu Y. Cone opsin determines the time course of cone photoreceptor degeneration in Leber congenital amaurosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(21):8879-84.
162. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Dev Cell.* 2007;13(3):365-76.
163. Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem.* 2002;277(15):13045-52.
164. Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response—a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat.* 2004;28(1-2):79-92.
165. Santos LE, Ferreira ST. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and brain inflammation in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2017.
166. Yang Z, Kim H, Ali A, Zheng Z, Zhang K. Interaction between stress responses and circadian metabolism in metabolic disease. *Liver Res.* 2017 Sep;1(3):156-162.
167. Pathinayake PS, Hsu AC-Y, Waters DW, Hansbro PM, Wood LG, Wark PA. Understanding the Unfolded Protein Response in the Pathogenesis of Asthma. *Front Immunol.* 2018;9:175.
168. Charonis AS, Michalak M, Groenendyk J, Agellon LB. Endoplasmic reticulum in health and disease: the 12th International Calreticulin Workshop, Delphi, Greece. *J Cell Mol Med.* Dec;21(12):3141-3149.
169. Cybulsky AV. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nature Reviews Nephrology.* 2017;13(11):681.
170. Zeeshan HMA, Lee GH, Kim H-R, Chae H-J. Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *Int J Mol Sci.* 2016 Mar 2;17(3):327.
171. Huc L, Lemarié A, Guéraud F, Héliès-Toussaint C. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicol in Vitro.* 2012;26(5):709-17.
172. Fic A, Žegura B, Dolenc MS, Filipič M, Mašič LP. Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2013;64(2):189-200.
173. Xin F, Jiang L, Liu X, Geng C, Wang W, Zhong L, et al. Bisphenol A induces oxidative stress-associated DNA damage in INS-1 cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014;769:29-33.

174. Ooe H, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1. *Toxicol Sci.* 2005;88(1):114-26.
175. Zhang Y, Han L, Yang H, Pang J, Li P, Zhang G, et al. Bisphenol A affects cell viability involved in autophagy and apoptosis in goat testis sertoli cell. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2017;55:137-47.
176. Maćczak A, Cyrkler M, Bukowska B, Michałowicz J. Bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce different oxidative stress and damage in human red blood cells (in vitro study). *Toxicol in Vitro.* 2017;41:143-9.
177. Gualtieri A, Iwachow M, Venara M, Rey R, Schteingart H. Bisphenol A effect on glutathione synthesis and recycling in testicular Sertoli cells. *J Endocrinol Invest.* 2011;34(5):e102-e9.
178. Xu J, Osuga Y, Yano T, Morita Y, Tang X, Fujiwara T, et al. Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292(2):456-62.
179. Terasaka H, Kadoma Y, Sakagami H, Fujisawa S. Cytotoxicity and apoptosis-inducing activity of bisphenol A and hydroquinone in HL-60 cells. *Anticancer Res.* 2005;25(3B):2241-7.
180. Pérez-Albaladejo E, Fernandes D, Lacorte S, Porte C. Comparative toxicity, oxidative stress and endocrine disruption potential of plasticizers in JEG-3 human placental cells. *Toxicol in Vitro.* 2017;38:41-8.
181. Kim SH, Kim SS, Kwon O, Sohn KH, Kwack SJ, Choi YW, et al. Effects of dibutyl phthalate and monobutyl phthalate on cytotoxicity and differentiation in cultured rat embryonic limb bud cells; protection by antioxidants. *J Toxicol Environ Health A.* 2002;65(5-6):461-72.
182. Savchuk I, Söder O, Svechnikov K. Mono-2-ethylhexyl phthalate stimulates androgen production but suppresses mitochondrial function in mouse Leydig cells with different steroidogenic potential. *Toxicol Sci.* 2015;145(1):149-56.
183. Wang W, Craig ZR, Basavarajappa MS, Hafner KS, Flaws JA. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces oxidative stress and inhibits growth of mouse ovarian antral follicles. *Biol Reprod.* 2012;87(6):152, 1-10.
184. Wang W, Craig ZR, Basavarajappa MS, Gupta RK, Flaws JA. Di (2-ethylhexyl) phthalate inhibits growth of mouse ovarian antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;258(2):288-95.
185. Sobarzo CM, de Moraes Rosana N, Livia L, Berta D, Schteingart HF. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) affects intercellular junctions of Sertoli cell: A potential role of oxidative stress. *Reprod Toxicol.* 2015;58:203-12.
186. Zhang W, Shen X-Y, Zhang W-W, Chen H, Xu W-P, Wei W. The effects of di 2-ethyl hexyl phthalate (DEHP) on cellular lipid accumulation in HepG2 cells and its potential mechanisms in the molecular level. *Toxicol Mech Methods.* 2017;27(4):245-52.

187. She Y, Jiang L, Zheng L, Zuo H, Chen M, Sun X, et al. The role of oxidative stress in DNA damage in pancreatic β cells induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Chem Biol Interact.* 2017;265:8-15.
188. Erkekoğlu P, Rachidi W, Yuzugullu OG, Giray B, Favier A, Ozturk M, et al. Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di (2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono (2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;248(1):52-62.
189. Erkekoğlu P, Rachidi W, Yüzügüllü O, Giray B, Öztürk M, Favier A, et al. Induction of ROS, p53, p21 in DEHP-and MEHP-exposed LNCaP cells-protection by selenium compounds. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(7):1565-71.
190. Peropadre A, Freire PF, Martín JMP, Herrero Ó, Hazen MJ. Endoplasmic reticulum stress as a novel cellular response to di (2-ethylhexyl) phthalate exposure. *Toxicol in Vitro.* 2015;30(1):281-7.
191. Sun X, Lin Y, Huang Q, Shi J, Qiu L, Kang M, et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis in rat INS-1 cells is dependent on activation of endoplasmic reticulum stress and suppression of antioxidant protection. *J Cell Mol Med.* 2015;19(3):581-94.
192. Zhang G, Ling X, Liu K, Wang Z, Zou P, Gao J, et al. The p-eIF2 α /ATF4 pathway links endoplasmic reticulum stress to autophagy following the production of reactive oxygen species in mouse spermatocyte-derived cells exposed to dibutyl phthalate. *Free Radic Res.* 2016;50(7):698-707.
193. Zhang G, Liu K, Ling X, Wang Z, Zou P, Wang X, et al. DBP-induced endoplasmic reticulum stress in male germ cells causes autophagy, which has a cytoprotective role against apoptosis in vitro and in vivo. *Toxicol Lett.* 2016;245:86-98.
194. Wu X, Jiang L, Sun X, Yao X, Bai Y, Liu X, et al. Mono (2-ethylhexyl) phthalate induces autophagy-dependent apoptosis through lysosomal-mitochondrial axis in human endothelial cells. *Food Chem Toxicol.* 2017;106:273-82.
195. Liu N, Jiang L, Sun X, Yao X, Zhai X, Liu X, et al. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induced ROS-dependent autophagic cell death in human vascular endothelial cells. *Toxicol in Vitro.* 2017;44:49-56.
196. Naarala J, Korpi A. Cell death and production of reactive oxygen species by murine macrophages after short term exposure to phthalates. *Toxicol Lett.* 2009;188(2):157-60.
197. Erkekoglu P, Giray BK. Unpredictable Effects of Chemical Mixtures on Liver in Health and Disease. *J Liver: Dis Transplant* 2012, 1:1.
198. Kim S, Choi E, Kim M, Jeong JS, Kang KW, Jee S, et al. Submicromolar bisphenol A induces proliferation and DNA damage in human hepatocyte cell lines in vitro and in juvenile rats in vivo. *Food Chem Toxicol.* 2018;111:125-32.

199. Gaitantzi H, Hakenberg P, Theobald J, Heinlein H, Cai C, Loff S, et al. Di (2-Ethylhexyl) Phthalate and Its Role in Developing Cholestasis: An In Vitro Study on Different Liver Cell Types. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;66(2):e28-e35.
200. Rusyn I, Kadiiska MB, Dikalova A, Kono H, Yin M, Tsuchiya K, et al. Phthalates rapidly increase production of reactive oxygen species in vivo: role of Kupffer cells. *Mol Pharmacol.* 2001;59(4):744-50.
201. Tetz LM, Cheng AA, Korte CS, Giese RW, Wang P, Harris C, et al. Mono-2-ethylhexyl phthalate induces oxidative stress responses in human placental cells in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;268(1):47-54.
202. Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol.* 2011;682:3-13.
203. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.* 2001;92(1):57-70.
204. Sanders E, Parker E. The role of mitochondria, cytochrome c and caspase-9 in embryonic lens fibre cell denucleation. *J Anat.* 2002;201(2):121-35.

8. EKLER

EK-1 Tez Çalışması İle İlgili Bildiriler

Tez Çalışması ile İlgili Poster Bildirileri

1. **Gizem OZKEMAHLI**, Pınar ERKEKOGLU, Belma KOCER-GUMUSEL. Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Production Induced by Bisphenol A and/or Mono (2-ethylhexyl) Phthalate in Human Hepatocarcinoma Cells. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD), 5-7 October 2017, Erzurum, Turkey.



9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Kübra Gizem Özkemahlı

Doğum Yeri ve Tarihi: Erzurum, 03.02.1989

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

İletişim Adresi ve Telefonu: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Sıhhiye/ANKARA, 0531 395 6612

II. Eğitimi

2013- : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı (Doktora)

2008- 2013: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Lisans)

2003- 2007: Nevzat Karabağ Anadolu Öğretmen Lisesi

III. Mesleki Deneyimi

2013- 2015: Erzincan Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Araştırma Görevlisi)

2013- : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Araştırma Görevlisi, 35. Madde ile görevlendirme)

IV- Bilimsel Faaliyetleri

Yayınlar

Uluslararası İndekslerde Taranan Dergilerdeki Makaleler:

1. Kübra Gizem YILDIZTEKİN, Pınar ERKEKOĞLU, Belma KOÇER-GÜMÜŞEL. ‘‘Plastikler Sağlık İçin Bir Tehdit mi? Ftalatlara Genel Bir Bakış’’ FABAD J. Pharm. Sci., 42, 2, 111-123, 2017.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. Aylin Balci, Ünzile Yaman, Pinar Erkekoglu, Ali Ascı, Gizem Yıldıztekin, Didem Oral, Belma Kocer Gumusel. Protein Oxidation Levels in Different Organs of Rats Exposed to Aroclor 1254 at Different Selenium Status. International Eurasia Pharmacy Congress, Erzincan Turkey. 3-7 September 2015. CD, PP62, page 107 (Poster Presentation)
2. Ali Ascı, Kübra Gizem Yıldıztekin, Naciye Dilara Zeybek, Ofcan Oflaz, Aylin Balci, Pinar Erkekoglu, Ünzile Yaman, Belma Kocer-Gümüşel. Protective role of dietary selenium on toxic effects of Aroclor 1254 in brain tissues of rats. 9th Congress of the Turkish Society of Toxicology with the participation of the Hellenic Society of Toxicology, TurkHelTox, Izmir- TURKEY. 21-24 October 2015. P40, page 44 (Poster Presentation)
3. Aylin Balci, Pinar Erkekoglu, Ali Ascı, Murat Kızılgün, Kübra Gizem Yıldıztekin, Oğuz Han Edebal, Ünzile Yaman, Belma Kocer-Gümüşel. Thyroidal effects of Aroclor 1254 at different selenium status in rats. 9th Congress of the Turkish Society of Toxicology with the participation of the Hellenic Society of Toxicology, TurkHelTox, Izmir- TURKEY. 21-24 October 2015. P41, page 44 (Poster Presentation)
4. Ünzile Yaman, Dilara Zeybek, Pinar Erkekoğlu, Ofcan Oflaz, Aylin Balci, Kübra Gizem Yıldıztekin, Ali Aşçı, Belma Gümüşel. Farklı Selenyum Statülerine Sahip Sıçanlarda Aroclor 1254'ün Renal Histopatoloji, Oksidan/Antioksidan Durum ve Apoptoz Üzerindeki Etkileri. İVEK (2.Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi)/ IVEK 2nd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul- TÜRKİYE. 27-29 Kasım 2015. P-110, syf 119 (Poster Sunumu)
5. Aylin Balci, Ünzile Yaman, Derya Buluş, Kübra Gizem Yıldıztekin, Pinar Erkekoğlu, Nesibe Andıran, Belma Koçer-Gümüşel. Plasma Phthalate Levels of Pubertal Obese Children. International Society of Environmental Epidemiology - Asia Chapter Conference 2016, Sapporo- Japan. June 26-29 2016. (Oral Presentation)

6. Aylin Balcı, Kübra Gizem Yıldıztekin, Ünzile Yaman, Pınar Erkekoğlu, Ali Aşcı, Belma Koçer-Gümüşel. The Effects of Aroclor 1254 and/or Selenium on Oxidant/Antioxidant Status of Rat Heart. 6th International FESTEM Symposium on Trace Elements and Minerals, Catania, Sicily- Italy. 26-28 May 2016. (Poster Presentation)
7. Ünzile Yaman, Aylin Balcı, Dilara Zeybek, Pınar Erkekoğlu, Ofcan Oflaz, Kübra Gizem Yıldıztekin, Ali Aşcı, Belma Koçer-Gümüşel. Renal Toxicity of Aroclor 1254 in Sprague-Dawley Rats with Different Selenium Status. 6th International FESTEM Symposium on Trace Elements and Minerals, Catania, Sicily- Italy. 26-28 May 2016. (Poster Presentation)
8. Gülru Gürdemir, Pınar Erkekoğlu, Kübra Gizem Yıldıztekin, Ünzile Yaman, Aylin Balcı, Engin Tutkun, Dinç Yılmaz, Belma Gümüşel. Lipid Peroxidation and DNA Damage in Plastic Workers. 2nd International Congress of Forensic Toxicology, Ankara-Turkey. 26-30 May 2016. (Poster Presentation)
9. Pınar Erkekoğlu, Dilara Zeybek, Aylin Balcı, Kübra Gizem Yıldıztekin, Ünzile Yaman, Ali Aşcı, Sevtap Aydın, Murat Kızılgün, O.H. Edebal, Nurşen Başaran, Belma Gümüşel. Toxic Effects of Aroclor 1254 on Rat Testis and Modulatory Effect of Selenium Status. 52nd Congress of European Societies of Toxicology (EUROTOX), At Seville, Spain. 4-7 September 2016. (Poster Presentation)
10. Belma Kocer Gümüşel, Pınar Erkekoğlu, Aylin Balcı, Kubra Gizem Yıldıztekin. The Effects of Aroclor 1254 and/or Selenium Status on Testicular Caspase 3 and Caspase 8 Activities. İVEK (3.Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi)/ IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul- TÜRKİYE. 26-29 Nisan 2016. P-0454 (Poster Sunumu)
11. Belma Kocer Gümüşel, Gulru Gurdemir, Pınar Erkekoğlu, Aylin Balcı, Ünzile Yaman, Kubra Gizem Yıldıztekin, Engin Tutkun, Hınc Yılmaz, Ali Aşcı. Oxidative Stress, Selenium Levels and DNA Damage in Plastic Workers Exposed to Di(2 ethylhexyl) phthalate. İVEK (3.Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi)/ IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul- TÜRKİYE. 26-29 Nisan 2016. P-0457 (Poster Sunumu)

12. Belma Kocer Gümüsel, Pınar Erkekoğlu, Aylin Balcı, Kubra Gizem Yıldıztekin. The Effects of Aroclor 1254 and/or Selenium Status on Testicular Caspase 3 and Caspase 8 Activities. İVEK (3.Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi)/ IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul- TÜRKİYE. 26-29 Nisan 2017. P-0454 (Poster Sunumu)
13. Belma Kocer Gümüsel, Gulru Gurdemir, Pınar Erkekoğlu, Aylin Balcı, Unzile Yaman, Kubra Gizem Yıldıztekin, Engin Tutkun, Hınc Yılmaz, Ali Aşçı. Oxidative Stress, Selenium Levels and DNA Damage in Plastic Workers Exposed to Di(2 ethylhexyl) phthalate. İVEK (3.Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi)/ IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul- TÜRKİYE. 26-29 Nisan 2017. P-0457 (Poster Sunumu)
14. Balcı A, Zeybek ND, Yersal N, Yıldıztekin KG, Erkekoğlu P, Koçer Gümüsel B “Testicular effects of prenatal and lactational exposure to Bisphenol A and/or di-2-ethylhexyl phthalate in the rat offsprings” 15th Internatinal Congress of Histochemistry and cytochemistry “From molecules to diseases” ICHC 2017 Antalya, Türkiye, 18-21 Mayıs 2017. (poster presentation)
15. Zeybek ND, Oflaz O, Balcı A, Yaman U, Erkekoğlu P, Yıldıztekin KG, Aşçı A, Koçer Gümüsel B “Renal histopathological changes, cellular organization alterations and apoptosis caused by Aroclor 1254 in rats with different selenium status” 15th Internatinal Congress of Histochemistry and cytochemistry “From molecules to diseases” ICHC 2017 Antalya, Türkiye. 18-21 Mayıs 2017. (poster presentation)
16. B. Özyurt, K. G. Yıldıztekin, B. Kocer-Gumusel, P. Erkekoglu. The cytotoxic potential of different bisphenols in human hepatoma cells. Quest For Beauty in Science, Culture And Arts (Uluslararası Bilim Kültür Ve Sanatta Güzeli Arayış Kongresi). Çanakkale, Turkey. 11-13 May 2017. (poster presentation)
17. Aylin Balcı, Kübra Gizem Özkemahlı, Pınar Erkekoğlu, Naciye Dilara Zeybek, Nilgün Yersal, Belma Koçer-Gümüsel. Effects of prenatal exposure to bisphenol a and / or di-2-ethylhexyl phthalate on sperm parameters and reproductive hormones. GPSS 2017, Ankara, Turkey. (poster presentation)
18. B. Özyurt, K. G. Özkemahlı, B. Kocer-Gumusel, P. Erkekoglu. Cell viability and intracellular reactive oxygen species production after exposure to

bisphenol derivatives in HepG2 cell line. GPSS 2017, Ankara, Turkey. (poster presentation)

19. D. Oral, K. G. Özkemahlı, B. Kocer-Gumusel, P. Erkekoglu. Cytotoxic effects of helicobacter pylori exposure after different multiplicities of infection in human gastric adenocarcinoma cells. GPSS 2017, Ankara, Turkey. (poster presentation)
20. Gizem OZKEMAHLI, Pınar ERKEKOGLU, Belma KOCER-GUMUSEL. Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Production Induced by Bisphenol A and/or Mono (2-ethylhexyl) Phthalate in Human Hepatocarcinoma Cells. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD), 5-7 October 2017, Erzurum, Turkey. (poster presentation)
21. Gamze Tilbe Şen, Kübra Gizem Özkemahlı, Reza Shahbazi, P. Erkekoglu, Kezban Ulubayram, B. Kocer-Gumusel. Cytotoxicity and intracellular reactive oxygen species production after exposure to gold nanoparticles and coated gold nanoparticles HepG2 cell line. DRD, Erzurum, Turkey. (poster presentation)
22. Aylin Balcı, Gizem Özkemahlı, Ünzile Sur, Pınar Erkekoglu, Belma Koçer-Gümüşel. The Effects of Aroclor 1254 and/or Selenium Status on Testicular and Hepatic Selenoprotein Activities/Levels. ISEEP-2017 VIII. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL PROBLEMS. 4– 7 October 2017, Çanakkale, Turkey. (oral presentation)
23. Gizem Özkemahlı, Aylin Balcı, Ünzile Sur, N. Dilara Zeybek, Pınar Erkekoglu, Belma Koçer-Gümüşel. The Effects of Aroclor 1254 and/or Selenium Status on Hepatic Caspase 3 And Caspase 8 Activities. and Hepatic Apoptosis. ISEEP-2017 VIII. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL PROBLEMS. 4– 7 October 2017, Çanakkale, Turkey. (poster presentation)
24. Belma Koçer-Gümüşel, Pınar Erkekoglu, Aylin Balcı, Ünzile Sur, Gizem Özkemahlı, Ali Aşcı. Phthalate Exposure and Different Endocrine Diseases. 10th International Conference on Endocrinology, Endocrine Disorders and Therapies, October 30-November 1 2017, Chicago, USA.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

-

Projeler

Tamamlanan Projeler:

1. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Öğrenci Laboratuvarının Kurulması. Erzincan Üniversitesi BAP. Araştırmacı. Proje No: SAG-E-300614-0109 (24 Ay/ 30.06.2015-22.11.2016)
2. Prenatal Bisfenol A ve Ftalat Maruziyetinin Yenidoğanda Üreme Sistemi ve Tiroid Hormonları Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi, TÜBİTAK 1001, 115S477, **Bursiyer (15.09.2015-15.09.2017) (Bütçe 301142,96 TL)**
3. Prenatal ve Laktasyon Döneminde Bisfenol A ve/veya Di2etil Hekzil Ftalat Maruziyetinin Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Araştırma Projesi, Proje Yöneticisi: Prof.Dr. Belma Gümüşel Proje Id:12150 Yardımcı Araştırmacı (17.01.2017-17.01.2018) (Bütçe 21831,80)

Devam Eden Projeler:

1. Erkek Yenidoğanlarda Bisfenol A ve Ftalat Maruziyetinin Genital Sistem Özellikleri ve Hormonlara Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Araştırma Projesi, Yardımcı Araştırmacı (01.08.2014-...) (Bütçe 16.000)
2. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelere Kombine Maruziyetin Toksik Etkilerinin Farklı Hücre Hatlarında Değerlendirilmesi: Endoplazmik Retikulum Stresi Ve Oksidatif Stres, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Araştırma Projesi, Proje Id: 12882 Proje Yöneticisi: Prof.Dr. Belma Gümüşel Yardımcı Araştırmacı

Kongre, Sempozyum, Kurs Katılımı

1. Hacettepe Üniversitesi Afet Tıbbı Uygulama ve Araştırma Merkezi (HAMER) ‘‘Afetlerde Deneyim Paylaşım Günleri 1’’, Ankara. 13 Aralık 2013
2. II. Ulusal Sporcu Sağlığı ve Doping Sempozyumu, Ankara. 11 Haziran 2014

3. Türk Toksikoloji Derneği III.Bölgesel Toksikoloji Sempozyumu, İzmir. 12 Haziran 2014
4. Türk Toksikoloji Derneği III.Bölgesel Toksikoloji Sempozyumu, “Endokrin bozucu bileşikler ve analizleri” Kursu, İzmir. 12 Haziran 2014
5. Türk Toksikoloji Derneği III.Bölgesel Toksikoloji Sempozyumu, “Kimyasalların neden oldukları hastalıkların gelişimi ve tedavisinde genetik farklılıkların önemi ve analizi” Kursu, İzmir. 12 Haziran 2014
6. Spektroskopi Lisansüstü Yaz Okulu, Erzincan. 16-21 Haziran 2014
7. 1st International Congress and Workshop of Forensic Toxicology, FORETOX, Ankara- TURKEY. November 29-30, 2014
8. Kozmetik Analizleri Konferansı, Ankara. 4 Aralık 2014
9. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ISOPS, Ankara- TURKEY. June 09-12, 2015
10. International Eurasia Pharmacy Congress, Erzincan- TURKEY. September 3-7, 2015
11. 9th Congress of the Turkish Society of Toxicology with the participation of the Hellenic Society of Toxicology, TurkHelTox, Izmir- TURKEY. October 21-24, 2015
12. Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirmesi Kursu, Ankara-Türkiye. 11-14 Şubat, 2016
13. I. Ulusal Eczacılık Eğitimi ve Akreditasyon Kongresi, Ankara-Türkiye. 9-10 Mayıs, 2016
14. 6th International FESTEM Symposium on Trace Elements and Minerals, Catania, Sicily- Italy. 26-28 May 2016.
15. Madde ve Alkol Bağımlılığı Uygulama ve Araştırma Merkezi “ Her Yönüyle Alkol Sempozyumu”, Ankara, 6 Nisan 2017
16. Eppendorf Hücre Kültürü Semineri, Ankara, 19 Nisan 2017
17. 2nd International Gazi Pharma Symposium Series, GPSS, Ankara-Turkey, 11- 13 October 2017.
18. ISEEP-2017 VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems Çanakkale-Turkey, 4– 7 October 2017.

19. Workshop on 3Rs & 2D and 3D Liver, Skin, Eye and Intestinal Regulatory Models, TÜBİTAK Marmara Research Center, 2-3 November 2017.

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

1. Türk Toksikoloji Derneği (TTD)

