



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ENDOKRİN BOZUCU KİMYASALLARIN ZEBRA BALIĞI
EMBRİYOSUNDA APOPTOZ VE İNFLAMASYON İLİŞKİLİ
BAZI GENLERİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TUĞÇE AYIK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. EBRU IŞIK ALTURFAN

2020- İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tuğçe Ayık

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, her konuda desteğini, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen, yüksek lisans programım boyunca verdiği emek ve desteğinin hakkını ödeyemeceğim kıymetli ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren **Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan'a** teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Tezimin deney aşamasındaki verdiği emekler ve yüksek lisans dönemim boyunca hiç bir desteğini esirgemediği için sevgili arkadaşım *Perihan Seda Ateş'e* teşekkürü bir borç biliyor ve kendisine akademik hayatında başarılar diliyorum.

Ayrıca beni her konuda destekleyen ve bu hayattaki en büyük şansım olan dostlarıma ve aileme sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	v
TABLO LİSTESİ	xiii
RESİM LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
1- ÖZET	1
2- ABSTRACT	2
3- GİRİŞ VE AMAÇ	3
4- GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Endokrin Bozucu Kimyasallar.....	5
4.1.1. Endokrin Bozucu Kimyasalların sınıflandırılması.....	6
4.1.2. Bisfenol A.....	7
4.1.2.1. Bisfenol A'nın Yapısı ve Kullanım Alanları	7
4.1.2.2. Bisfenol A Toksisitesi	8
4.1.3. Dietilhekzil Fitalat	10
4.1.3.1. Dietilhekzil Fitalat'ın Yapısı ve Kullanım Alanları	10
4.1.3.2. Dietilhekzil Fitalat Toksisitesi	11
4.2. Apopoz	13
4.2.1. Apoptozda Morfoloji.....	14
4.2.2. Fas	15
4.2.3. Bax.....	16
4.2.4. Casp3	17
4.2.5. Casp8	18
4.2.6. Apoptozun Fizyolojik ve Patolojik Durumlardaki Rolü	18
4.2.7. Apoptozun Düzenlenmesi.....	20
4.2.8. p53.....	21
4.3. İnterferon Gamma.....	22
4.4. Zebra Balıkları.....	23

4.4.1. Zebra Balıklarının Biyomedikal Araştırmalarda Kullanılması ve Akut Balık Embriyo Testleri	24
4.4.2. Endokrin Bozucu Kimyasalların Etkilerinin İncelenmesinde Zebra Balığı Embryolarının Kullanımı.....	26
4.5. Krestinin Embriyo Gelişimindeki Rolü.....	27
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	30
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
5.2. Kullanılan Aletler.....	30
5.3. Zebra Balıklarının Bakım ve Beslenme Şartları.....	31
5.4. Zebra Balıklarından Embriyo Eldesi.....	32
5.5. Zebra Balığı Embriyoları ile Oluşturulan Gruplar ve İzlenen Protokol.....	33
5.6. Gen İfadesi Analizi (RT-PCR).....	34
5.6.1. RNA İzolasyonu	34
5.6.2. cDNA Sentezi.....	35
5.6.3. Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....	35
5.6.4. Delta Delta Ct Metodu İle Veri Analizi.....	36
5.7. In Situ Hibridizasyon Yöntemi ile Krestin İfadesi Analizi.....	36
5.8. İstatistiksel Analizi.....	38
6. BULGULAR.....	39
6.1. RT-PCR Analizi Sonuçları.....	39
6.1.1. Bax Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması	39
6.1.2. Casp3 Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması	39
6.1.3. Casp8 Ekspresyonu Düzeylerinin Karşılaştırılması	40
6.1.4. İfng1 Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	41
6.1.5. p53 Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	42
6.1.6. fas ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	43
6.2. Kontrol, DEHP ve BFA Gruplarında Krestin İfadesi Analizi Sonuçları.....	44
7. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	46
8. KAYNAKLAR.....	51
9. EKLER	61
EK-1. Uluslararası Kongre Bildiri Özeti.....	61
10. ÖZGEÇMİŞ.....	62

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

BFA: Bisfenol A

BFAG: BFA glukuronit

BFAS: BFA sülfat

CaCl₂: Kalsiyum klorür

DEHP: Bis (2-etilhekzil fitalat)

DNA: Deoksiribo nükleik asit

EDC: Endokrin Bozucu Kimyasallar

EDTA-Na: Etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu

EF: Ejeksiyon fraksiyonu

EFSA: Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu

EKG: Elektrokardiyografi

ELISA: Enzim ilintili immun test

ER α : Östrojen reseptörü α

FDA: Amerika Gıda ve İlaç İdaresi

FDA: Food and drug administration, Gıda ve ilaç dairesi

Fe-SOD: Demir içeren dismutaz

G: Gram

GnRH: Gonadotropik hormon salgılatıcı hormon

GSH: Glutatyon

HPLC: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

HQ $\cdot$: Semikinon radikali

IFN γ : İnterferon Gamma

K: Kör

K $^{+}$: Potasyum

kDa: Kilo dalton

L: Litre

LC50: Letal konsantrasyon 50

LD50: Letal doz 50

LDL: Low density lipoprotein, düşük yoğunluklu lipoprotein

LPO: Lipit peroksidasyon

MDA: Malondialdehit

MG: Miligram

ML: Mililitre

MMR: Uyuşmazlık onarımı

Mn-SOD: Mangan içeren dismutaz

MW: Mikrodalga

N: Numune

Nm: Nanometre

NO⁻: Nitrik oksit

NO: Nitrik Oksit

NO₂: Azot dioksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

O₂⁻: Süperoksid anyon radikali

O₃: Ozon

OECD: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü

PCNA: Proliferatif hücre nükleer antijeni

PCOS: Polikistik over sendromu

PET: Polietilen teraftalat

PP: Polipropilen

Pt: Protrombin

PVC: Polivinilklorür

R[•] : Organik radikaller
RNA: Ribo nükleik asit
ROS: Serbest oksijen radikali
SA: Siyalik Asit
sGC: Döngüsel guanil siklaz
SML: Spesifik migrasyon limiti
SO₂: Kükürt dioksit
SOD: Süperoksid Dismutaz
ST: Standart
STB: Stobadin
TBA: Tiyobarbitürik asit
TCA: Triklorasetik asit
TDI: Tolere edilebilir günlük alım miktarı
TSH: Tiroid uyarıcı hormon
UV: Ultra viyole
UV: Ultra viyole
VTG: Vitellogenin
XP-G: pigmenter kseroderma
YYPE: Yüksek yoğunluklu polietilen
α: Alfa
αT: Alfa tokoferol
β: Beta
δ: Sigma
μg: Mikrogram

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Endokrin Bozucu Kimyalların Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması

Tablo 2: EBK'ların etkiledikleri sistemler ve ilişkilendirildikleri hastalıklar

Tablo 3: Kullanılan Primer Dizileri

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Zebra Balıklarının Yaşadığı ZEBTEC Mini Akvaryum Sistemi

Resim 2: Kontrol Grubuna Ait Embriyoda Krestin Ekspresyonu

Resim 3: DEHP'ye Maruz Bırakılan Embriyoda Krestin Ekspresyonu

Resim 4: BFA'ya Maruz Bırakılan Embriyoda Krestin Ekspresyonu

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Bisfenol A'nın yapısı

Şekil 2: Dietilhekzil Fitalat'ın Yapısı

Şekil 3: Akut balık embriyo testinin uygulanması

Şekil 4 : Embriyo elde etme yöntemi (Bhasin ve ark 2016)

Şekil 5: Kontrol ve maruziyet gruplarının *bax* gen ekspresyon grafiği

Şekil 6: Kontrol ve maruziyet gruplarının *casp3a* gen ekspresyon grafiği

Şekil 7: Kontrol ve maruziyet gruplarının *casp8* gen ekspresyon grafiği

Şekil 8: Kontrol ve maruziyet gruplarının *ifng1* gen ekspresyon grafiği

Şekil 9: Kontrol ve maruziyet gruplarının *tp53* gen ekspresyon grafiği

Şekil 10: Kontrol ve maruziyet gruplarının *fas* gen ekspresyon grafiği

1. ÖZET

Bazı Endokrin Bozucu Kimyasalların Zebra Balığı Embriyosunda Apoptoz Ve İnflamasyon İlişkili Bazı Genlerin Ekspresyonu Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Öğrencinin Adı: Tuğçe Ayık

Danışmanı: Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan

Anabilim Dalı: Biyokimya (ECZ)

Amaç: Günümüzde Di-2-etilhekzilfitalat (DEHP) ve Bisfenol A'nın (BFA) olası etkileri ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Çalışmamızın amacı DEHP ve BFA'nın apoptoz ve inflamasyonla ilgili etkilerinin zebra balığı embriyosunda incelenmesidir. Çalışmamızda ayrıca DEHP ve BFA maruziyetinin embriyonel gelişimde önemli olan krestin molekülünün ekspresyonu üzerinde etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda DEHP ve BFA için zebra balığı embriyolarında önceki çalışmalarımızda belirlenmiş olan letal dozun altındaki konsantrasyonlara maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında apoptoz ve inflamasyon ile ilişkili genlerin ifadeleri RT-PCR yöntemi ile, krestin ekspresyon analiz *in situ* hibridizasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: BFA ve DEHP maruziyeti sonucunda zebra balığı embriyolarında kontrol grubu ile kıyaslandığında *bax* ve *casp8* ekspresyonları arttı; *casp3a*, *ifng1* ve *fas* ekspresyonları ise azaldı. Kontrol grubuna göre *tp53* ekspresyonu ise BFA'da artış gösterirken DEHP grubunda azaldı. DEHP'ye maruz bırakılan embriyolar BFA'ya maruz bırakılanlarla kıyaslandığında *bax*, *casp3a*, *casp8*, *fas*, *ifng1* ve *tp53* ekspresyonları azaldı. Krestin ekspresyonunda ise BFA ve DEHP gruplarında belirgin bir fark gözlenmemiştir.

Sonuç: Çalışmamız sonucunda BFA ve DEHP maruziyetinin zebra balığı embriyolarında apoptoz ve inflamasyonda rol oynayan mekanizmalarda farklılığa neden olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Zebra balığı, bisfenol A, Di-2-etilhekzilfitalat, apoptoz, inflamasyon, krestin

2. ABSTRACT

Investigation Of The Effects Of Some Endocrine Determining Chemicals On Expression Of Some Genes Related To Apoptosis And Inflammation In Zebra Fish Embryo

Name of the student: Tuğçe Ayık

Adviser: Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan

Department: Biochemistry (Pharmacy)

Objective: Currently, there is controversy about the possible effects of Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) and Bisphenol A (BPA). The aim of our study was to investigate the effects of DEHP and BPA exposure on apoptosis and inflammation in zebrafish embryos. We also aimed to determine the effects of DEHP and BPA exposure on the expression of crestin molecule, which is important for embryonic development.

Materials and Methods: In our study, zebrafish embryos were exposed to the concentrations below the lethal dose determined in our previous studies were used in zebrafish embryos and expressions of apoptosis and inflammation related genes were evaluated by RT-PCR method, and crestin expression was determined by *in situ* hybridization method.

Results: BFA and DEHP exposure increased *bax* and *casp8* expressions in zebrafish embryos compared with the control group; but decreased the expressions of *casp3a*, *ifng1* and *fas*. Compared to the control group, *tp53* expression increased in BPA and decreased in DEHP group. The embryos that were exposed to DEHP had decreased expressions of *bax*, *casp3a*, *casp8*, *fas*, *ifng1* and *tp53* compared to those exposed to BPA. Crestin expressions were not affected significantly in BPA and DEHP exposed groups.

Conclusion: As a result of our study, it was shown that BPA and DEHP exposure caused alterations in the mechanisms involved in apoptosis and inflammation in zebrafish embryos.

Keywords: Zebrafish, bisphenol A, Di-2-ethylhexylphthalate, apoptosis, inflammation, crestin

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Plastikten yapılmış kaplar ve ambalajlar gıda endüstrisinde daha hafif, kırılmaz ve de daha uygun fiyatlı olmaları sebebi ile günümüzde oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Ancak plastiklerin içerdikleri monomerlerin yanında toksik nitelikteki katkı maddelerinin gıda ve içeceklere geçme olasılığının bulunması halk sağlığı açısından ciddi bir kaygı ve risk nedeni haline gelmiştir. Bu nedenlerden dolayı plastik ve plastik türevlerini üreten fabrikalar doğaya kontrolsüz olarak çeşitli kimyasallar bırakmakta ve bu kimyasalların canlılar üzerindeki olası etkileri ile ilgili tartışmalar gün geçtikçe artmaktadır (Kabir ve ark., 2015). Endokrin sistemin fonksiyonlarını bozarak etki gösteren plastik ve türevlerinde de yaygın şekilde bulunan kimyasallar endokrin bozucu kimyasallar (EBK) olarak adlandırılmaktadır. Çalışmamızın amacı en yaygın kullanılan EBK’lardan olan bisfenol A (BFA) ve Di (2-etilheksil) ftalatın (DEHP) zebra balığı embriyolarında apoptoz üzerindeki etkilerini incelemektir.

Polietilen tereftalat (PET) plastik malzeme ve şişelerin üretiminde yaygın olarak kullanılır. PET şişelerde DEHP plastikleştirici ajan olarak kullanılmaktadır. Polikarbonat plastik (PC) ise özellikle damacanalarda ve ayrıca gıda ve medikal gereçlerde yaygın olarak kullanılır ve üretiminde BFA kullanılmaktadır (Sax, 2010).

Çağımızın önemli halk sağlığı problemlerinden biri haline gelen EBK maruziyeti, obezite, diyabet, kanser gibi birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir. BFA’nın temas ettiği gıdalara geçebildiği ve bu geçişin de ısı ile beraber arttığı gösterilmiştir. Plastik şişeler vasıtası ile tüketilen su ve gıda maddeleri ile vücudumuza alınan BFA’nın prostat, beyin gelişimi, kanser, kalp hastalıkları, karaciğer ve üreme sisteminde ciddi hasarlara neden olabildiği gösterilmiştir (Durusoy ve Karababa,2010; Sauvante ve ark., 1995; Sax,2010; Matthews, 2002).

Son yılların popüler model organizması olan Zebra balıkları omurgalı bir deniz canlısıdır. Zebra balıklarının son yıllarda sağladığı avantajlar arasında dişilerin günde 50 ile 300 arası yumurta bırakması, embriyoların eksternal fertilizasyon ile oluşması

ve hızlı gelişimleri, yaşam döngülerinin kısa olması ve şeffaf olmalarının sağladığı görüntüleme avantajları sağlanabilir (Matthews ve ark.,2002; Vargesson, 2007; Westerfield, 2000).

P53 tümör supresör geni ekspresyonunun çeşitli endokrin bozucu kimyasallar etkisiyle değişebildiği hayvan modellerinde gösterilmiştir (Lee ve ark.,2008). Steroidler ve seks hormonlarının immun yanıtları düzenlemede önemli rol oynadığı bilinmektedir, bu yüzden endokrin bozucular da immun cevap oluşumunu etkileyebilirler (Chang Hung ve ark., 2009). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada endokrin bozucuların IFN- γ ekspresyonlarının etkilendiği gösterilmiştir (Calamine ve ark.,2003). Ayrıca yine sıçanlarda endokrin bozucu kimyasal maruziyetinin tümör nekroz faktörü TNF- α 'nın ekspresyonunu değiştirdiği gözlemlenmiştir (Hong ve ark.,2004).

DEHP ve BFA 'nın zebra balığı embriyosunda apoptoz ve inflamasyon ile alakalı p53, Ifn- γ , Tnf- α ,Casp3, Casp8, Bcl2, Bax ve krestin belirteçleri üzerine olan muhtemel etkileri daha önce çalışılmamıştır. Bu çalışma DEHP ve BFA'nın teratojenik etkilerinin zebra balığı embriyosu üzerinde araştırılması amacıyla planlanmıştır. RT-PCR metodu ile apoptoz ve inflamasyon ile ilişkili p53, Ifn- γ , Tnf- α ,Casp3, Casp8, Bcl2, Bax genlerinin ekspresyonlarına bakılacaktır. *In situ* hibridizasyon yöntemiyle ve krestin ekspresyon seviyeleri belirlenecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Endokrin Bozucu Kimyasallar

Endokrin bozucu kimyasallar (EBK), organizmada endokrin sistemin fonksiyonlarını hormonların sentez, sekresyon, reseptör etkileşimi, taşınması ve atılmaları gibi basamaklar üzerinden değiştirerek bozan maddelerdir. EBK etkisi agonist ya da antagonist şekilde kendini gösterebilmektedir (Zoeller ve ark., 2012). EBK'lar günlük hayatta sıkça kullanılan birçok üründe karşımıza çıkabilmektedir. Bu ürünlerin başında kişisel bakım, temizlik ürünleri, oyuncaklar plastik saklama kap ve şişeleri gelmektedir. Bunun yanında EBK'lar doğal olarak da bulunabilirler (Schug ve ark., 2011). EBK'ların en fazla bilinienleri fitalatlar, dioksinler, pestisitler ve çeşitli ağır metallerdir.

Özellikle plastik ürünler EBK'lar açısından çok dikkat çekmektedir. Plastik ürünlerin marketlere ulaşmadan önce geçirildikleri işlemler sırasında uygulanan sıcaklık, basınç işlemleri ile ve de kimyasallar etkisiyle resinler meydana gelir. Bu sırada etilenden polietilen, polietilenden polipropilen, ve stirenden de polistiren meydana gelir ve sonuçta plastik oluşmuş olur (Hard,2001). Plastiklere esneme özelliğinin kazandırılması için katkı maddeleri ilave edilir. Bu ilave edilen katkı maddelerinin başında gelenler stabilizatörler ile plastikleştiricilerdir. DEHP plastikleştirici maddelerin en önemlilerinden biridir (Güler ve ark., 1997).

Gıda maddelerinin saklanması tüketiciye güvenle ulaştırılması için çok önemli bir basamaktır. Gıda maddeleri uygun bir şekilde saklanmak ve depo edilmek üzere ambalajlanır. Gıda maddelerinin ambalajlanması için değişen yapıda malzemeler bulunmaktadır. Ancak uygun olmayan saklama şartları ise ambalaj malzemeleriden gıdalara kimyasal sızıntısına neden olabilmektedir. Bu olay kimyasal migrasyon şeklinde tanımlanmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda özellikle fitalatların ve bisfenollerin saklandıkları ambalajlardan saklama koşullarına bağlı olarak gıdalara geçebildiği gösterilmiştir. Gıdalara geçebilen bu kimyasalların da vücut dokularında

birikim yapması sonucunda çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmeleri söz konusudur (Petersen ve ark., 1995).

4.1.1. Endokrin bozucu kimyasalların sınıflandırılması

EBK'ların çoğu üremeye müdahale eder. Östrojenlerin veya androjenlerin agonistleri veya antagonistleri olarak işlev görürler. Bazı EBK'lar, çevresel stres ve diğer olumsuz olaylarla başa çıkmanın günlük mekanizmalarına müdahale eder. Bunun yanında çok az sayıda EBK, temel yaşam sürdürme mekanizmalarının devamı için gerekli olan hormon sistemlerine müdahale ederek hayatı tehdit eden bir etki göstermektedir. Ancak bazı EBK'ların etkileri yaşamı tehdit edici olabilir, çünkü organların normal işlevlerine müdahale edebilir veya bu organların malignitelerine neden olabilirler. Çoğu EBK lipit (steroid) veya aminoasit türevli (tiroid) hormonların etkileriyle etkileşime girebilirken, birkaçı peptit / protein hormon sentezi veya sinyali ile etkileşime girebilir.

Tablo 1: Endokrin Bozucu Kimyalların Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması

	Mekanizma	Major Etki	Biyolojik Etki
AGONİST Bisfenol A Fitalatlar Polifenoller (izoflavonlar ve genistein) UV-screens (benzofenon; cinnamate; camphor türevleri)	Östrojen cevap elemanları aktivasyonu	Östrojenik	Üreme, uterus ve meme bezi üzerine zararlı etkili
ANTAGONİST Pestisitler, fungusitler, herbisitler	Genelde androjen cevap elemanları üzerinden düzenlemenin inhibisyonu	Antiandrojenik	Üreme üzerine zararlı etkili

Bununla birlikte, steroid reseptörleri yoluyla EBK'ların peptit / protein hormonları üzerindeki etkileri yaygındır. EBK'ların etki mekanizmalarına göre sınıflandırması

Tablo 1’de verilmiştir (Wuttke ve ark 2010). Tablo 2’de ise EBK’ların etkiledikleri sistemler ve ilişkilendirildikleri hastalıklar verilmiştir (Scognamiglio ve ark., 2016).

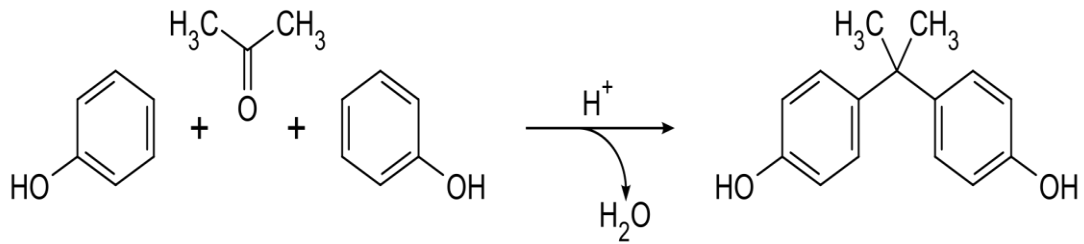
Tablo 2: EBK’ların etkiledikleri sistemler ve ilişkilendirildikleri hastalıklar

Endokrin Kimyasallar	Bozucu	Etkiledikleri Sistemler	İlişkilendirildikleri Hastalıklar
Bisfenol A, dioksin, ftalatlar, Östrojenler, PCB, Pestisitler		Üreme/Endokrin Sistem	Kanser, infertilite, obezite, diyabet, metabolik sendrom
Ağır metaller, pestisitler, PCB		Beyin/Sinir Sistemi	Alzheimer, Parkinson Hastalığı, öğrenme güçlüğü
Hava kirliliği, bisfenol A, PCB		Pulmuner/Kardiyovasküler	Astım, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme

4.1.2. Bisfenol A

4.1.2.1. Bisfenol A’nın yapısı ve kullanım alanları

BFA, kimyasal formülü $(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$ olan organik bir sentetik bileşiktir ve iki hidroksifenil grubuna sahip difenilmetan türevleri ve bisfenoller grubuna girmektedir (Şekil 1). BFA, organik çözücüler içinde çözünür, fakat suda zayıf çözünür.



Şekil 1: Bisfenol A’nın yapısı

BFA, senelik 2-3 milyon tondan fazla üretimesi nedeni ile sanayide dünyada en fazla kullanılan kimyasalların başında gelmektedir. BFA’ların büyük çoğunluğu

polikarbonat plastiklerin sentezinde, daha az oranda da epoksi reçinelerin işlenmesinde kullanılır.

BFA'nın kullanım alanları arasında diş dolgu malzemeleri, elektrik ve elektronik endüstrisi, polimer, kauçuk, boya üretimi ile polikarbonata esneklik kazandırma amaçlı damacanelerin üretiminde sayılabilir. Bunların dışında BFA içeren epoksi reçineler metal içecek kutuların iç yüzünde kaplanması için kullanılmaktadır. Özellikle çocuklarda ve erişkinlerde BFA maruziyeti için en önemli kaynak olarak pet şişelenmiş su tüketimi gelmektedir. BFA içeren malzemelerden gıda ve içeceklerle BFA migrasyonu olabildiği gösterilmiştir. Özellikle hatalı saklama koşulları, darbeye ve ısıya maruz kalma BFA'nın gıdalara migrasyonunu arttırmaktadır (US Department of Health and Human Services, 2008).

4.1.2.2. Bisfenol A toksisitesi

Suda çözünmeyen yapısı nedeni ile BFA, hayvan yağ dokularında yerleştiği zaman uzun süre vücuttan uzaklaştırılamamaktadır. İnsanlarda yapılan birçok araştırmada, BFA'nın serumda, idrarda, amniyon sıvısında, plasentada ve kordon kanında varlığı belirlenmiştir. Özellikle anne karnında ve çocukluk döneminde BFA maruziyetinin oranı diğer dönemlerle kıyaslandığında daha yüksek olarak bildirilmiştir (US Department of Health and Human Services, 2008). Ayrıca okul öncesi dönemindeki çocuklarda BFA maruziyetinin %99 oranında yiyecekler yoluyla gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Bu şekilde gıda vasıtası ile BFA miktarı çocuklarda 52–74 ng/kg/gün şeklinde, inhalasyon vasıtası ile maruz kalınan BFA miktarı da 0.24–0.41 ng/kg/gün şeklinde bildirilmiştir. Toler edilebilir günlük alım düzeyi (TDI), herhangi bir riske maruziyet vermeden maddenin vücut ağırlığına göre belirlenen günlük tüketilebilir miktardır. Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA = European Food Safety Authority) insanlarda BFA'nın günlük tolere edebileceği düzeyini 0,05 mg/kg şeklinde bildirmiştir (Akyüz ve ark., 2011). Amerika Çevre Koruma Örgütü ise BFA'nın bu düzeyini 50 µg/kg/gün, Avrupa'da ise 10 µg/kg/gün şeklinde olduğunu bildirmiştir (Kamrin, 2004).

Ülkemizde Tarım ve Köyşleri Bakanlığı BFA'nın, bebek ürünlerinde kullanılan polikarbonat üretiminde kullanılmasını yasaklamıştır. Günlük hayatımızda BFA kaynaklı PVC polimerlerin darbe neticesinde ve yüksek sıcaklık, asit veya bazik şartlar altında hidrolize olmaları sonucunda BFA'nın migrasyonu meydana gelebilir. Bu nedenden dolayıdır ki kişiler prenatal dönem itibarı ile hayatları süresince BFA'ya maruz kalabilirler. BFA'nın alkali nitelikteki bağırsak kanalında, hızla absorbe edildiği gösterilmiştir. Gastrointestinal sistemden emilmesinden sonra BFA, karaciğer enzimleri ile metabolizasyona uğrar. Glukuronik asit ve sülfatla konjugasyona uğraması karaciğerde olur, ve BFA glukuronit (BFAG) ve onun metaboliti olan BFA sülfata (BFAS) dönüşür (Ye ve ark., 2005). İdrar yolu ile atılamayan BFA metabolitlerinin kan, yağ dokusu, semen, anne sütü ve fetüs ile ilişkili amniyotik sıvı ve fetusta varlığı bildirilmiştir (Fernandez, 2007, Li ve ark., 2011).

Çocuklarda yetişkinlere oranla daha yüksek BFA marızietinin etkilerinin belirlenmesi postnatal evrede ilk 6 ayda azalan glukuronidasyon aktivitesi nedeni ile olabilmektedir. Konjugasyona uğramış olan BFA metabolitleri betaglukuronidaz enzimi vasıtası ile dekonjuge edilir ya da arilsulfataz c enzimi vasıtası ile serbest BFA'ya dönüşebilir. Bu da kanda toksik etkilere neden olan serbest BFA düzeylerini yükseltebilir (Ginsberg ve ark., 2009). BFA'nın toksik etkilerinden sorumlu olan hali serbest halidir (Snyder ve ark., 2000, Willhite ve ark., 2008)

BFA, zayıf östrojenik etki göstermek sureti ile cinsel farklılaşma ilişkili ilgili değişikliklere neden olabileceği belirtilmiştir. Hipofiz bezinde başlıca östrojen reseptörlerini uyarmak sureti ile üreme sistemini ve SSS'yi etkiler. Bundan dolayı da mental retardasyon ile hafıza bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir (MacLusky ve ark., 2005).

İnsanlarda gebeliğin on altıncı haftasında idrarda BFA ile bebek davranışları arasında anlamlı bir ilişki belirlenmiş ve BFA ilişkili hiperaktivitenin oldukça belirgin nitelikte olduğu belirtilmiştir (Braun ve ark., 2002).

Düşük doz BFA maruziyetinin erkek sıçanlarda testiküler ve epididimal ağırlık, sperm üretimi ve fertilité düşüşü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (US Department of Health and Human Services, 2008).

Doğumdan hemen sonra 10 gün süre ile BFA maruziyetinin farelerde puberteye erken giriş ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve farelerin LH düzeylerinde farklılık olduğu belirlenmiştir (Rasier ve ark., 2007). Bu etkilerin östrojen reseptörü alfa ($Er\alpha$) ile ilişkili GnRH sekresyonu ile ilişkili olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Dickerson ve ark., 2012).

BFA'nın prenatal maruziyetinin fare yumurtalık anatomisini değiştirdiği ve fetusta kromozom hasarına neden olduğu belirlenmiştir (Hunt ve ark., 2003).

İnsanlarda yapılan başka bir çalışmada BFA maruziyetinin tekrarlayan düşük ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sugiura ve ark., 2005). Yine gebe kadınlarda yapılan bir çalışmada amniyosentezde belirlenen anormal karyotipin annenin kanındaki yüksek BFA düzeyleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Yamada ve ark., 2002).

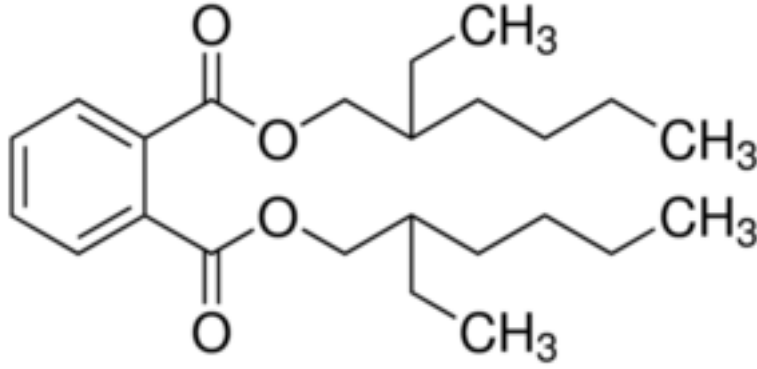
BFA maruziyetinin obezite ilişkili olarak yumurtalıklarda fonksiyon bozulması ile ilişkilendirilmiştir (Takeuchi ve ark., 2004). Ayrıca BFA'nın pankreasta östrojen reseptörüne bağlandığı gösterilerek insülin direnci ile ilişkilendirilmiştir (Shankar, Teppala, 2011). BFA maruziyeti kalp ve damar hastalıklarında artış ile de ilişkilendirilmiştir (Melzer ve ark., 2010).

Literatürde BFA'nın kanser gelişimi ile ilişkilendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar BFA'nın ksenöstrojenik etkileri üzerinde durmaktadır. BFA maruziyetinin östrojenik uyarılara karşı duyarlılığın artması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Durando ve ark., 2007, Ho ve ark., 2006).

4.1.3. Dietilhekzil fitalat

4.1.3.1. Dietilhekzil fitalat'ın yapısı ve kullanım alanları

DEHP, formülü $C_{24}H_{38}O_4$ olan ve molekül ağırlığı 390 g/mol olan bir kimyasaldır (Şekil 2). Fitalat yapısında iki adet yan zincir içeren benzen dikarboksilik asittir. Farklı zincir yapısına sahip olan fitalatlar üretilmiştir. Bunlar arasında dimetil fitalat, dietil fitalat, dibütil fitalat ve difenil fitalat bulunmaktadır. Genelde fitalatlar iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar yüksek moleküler ağırlığa sahip olan DEHP, bütıl benzil fitalat ile düşük molekül ağırlığına sahip olan fitalatlardır. Düşük molekül ağırlıktaki fitalatlar dimetil fitalat, dietil fitalat ile dibütil fitalattır (Serrano ve ark., 2014).



Şekil 2: Dietilhekzil Fitalat'ın Yapısı

DEHP, plastıklere esneklik kazandırmak amaçlı kullanılır ve en yaygın kullanılan fitalatların başında gelir. DEHP'nin kullanım amaçları arasında kozmetik ürünler ve parfümler, kan torbaları, tüpler, sondalar eldivenler, maskeler gibi medikal malzemeler ile endüstriyel amaçlı plastikler bulunmaktadır (Bradbury, 1996).

4.1.3.2. Dietilhekzil fitalat toksisitesi

Yağda çözünen bir madde olan DEHP maruziyeti ne fazla oral yolla olmaktadır. DEHP metabolizması ince bağırsak, pankreas, deri, akciğer ve karaciğerdeki lipaz enzimi vasıtası ile mono-etil-hidroksietil fitalata (MEHP) dönüşmesi ile gerçekleşir. MEHP ise otuzdan fazla metabolite dönüşür.

Fitalatlar monoester halde iken idrarla atılırken eğer uzun zincir içeren fitalat şeklinde iseler glukuronik asitle konjugasyona uğrayarak suda çözünür hale geçerler ve idrar ile feçes yolu ile atılırlar. DEHP metabolitlerinden 2-etilhekzanol oksidasyona uğrar ve etilhekzanoik asit ve diğer ketoasit türevlerine dönüşüp idrarla atılır (Koch, Bolt ve ark., 2005).

DEHP maruziyeti dikkat eksikliği ile hiperaktivite ile ilişkilendirilmiştir. Bunun dışında obezite, çeşitli kanser türleri, doğumsal anomaliler, astım ve erkek kısırlılığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca erken puberte de DEHP kaynaklı olarak gösterilmiştir (Hauser ve Calafat, 2005)..

DEHP maruziyeti, ksenoöstrojen etki ile ve de antiandrojenik etkileri ile üreme sistemini etkilediği gösterilmiştir (Hauser ve Calafat, 2005).

Endometriosisin artmış oranlarının kadınlarda kanda artan DEHP oranları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Reddy, 2006). Başka bir çalışmada kız çocuklarında prematür telarş ile kandaki fitalat düzeyleri arasında ilişki olduğu belirlenmiştir (Colon ve ark., 2000). Başka bir çalışmada büyümenin daha hızlı gerçekleştiği süreçte fitalat maruziyetinin hem östrojenik hem de anti-adrojenik etkileri bildirilmiştir (Qiao ve ark., 2007).

Bunun dışında, DEHP meme kanser hücre hattında tamoksifen ile uyarılmış apoptozu önlediği bildirilmiştir (Kim ve ark., 2004). Pubertal jinekomasti olgularının artmış DEHP düzeyleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Durmaz E ve Özmert EN, 2010). Ayrıca DEHP maruziyeti yapılan başka bir çalışmada inhibitör etkili bir nörotransmitter olan gamma-aminobütirik asit (GABA)'ın azalması, uyarıcı nörotransmitter aspartatın ise artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Carbone ve ark., 2012).

Aromataz enzimi, testosteronun östradiole dönüşümünü uyardığı için beyinde seksüel farklılaşmasında önemli role sahiptir. Özellikle gestasyon ve laktasyon

sırasında DEHP maruziyetinin sıçanlarda aromataz aktivitesinin arttırdığı gösterilmiştir (Andrade ve ark., 2006).

Çocuklarda ddrarda yüksek DEHP düzeylerinin otizm ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Testa ve ark., 2012). Ayrıca annede hamilelikte idrarda yüksek DEHP düzeyleri çocuklarda dikkat eksikliği ile hiperaktivite ile ilişkilendirilmiştir (Braun ve ark., 2014, Kim ve ark., 2009)

PVC ürünleri vasıtası ile açığa çıkan ftalatların inhalasyon yolu ile astıma neden olabileceği bildirilmiştir (Hauser ve Calafat, 2005, Parks ve ark., 2000).

Özellikle gebelikte ve emzirme döneminde DEHP'ye maruz bırakılan hayvanlarda doğumda görülen malformasyonların plasental geçiş ile alakalı olduğu düşünülmüştür. Ayrıca amniyon sıvısı ile anne sütünde DEHP varlığı çok erken dönem maruziyetin göstergesidir (Rubin ve Soto, 2010, Gray ve ark., 2000).).

4.2 Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz süreci farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağımlı biyokimyasal mekanizmalar ile karakterizedir. Apoptoz normal hücre döngüsü de dahil olmak üzere bağışıklık sisteminin gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişme ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi işlemlerin hayati bir bileşeni olarak kabul edilir. Bunun yanı sıra, uygun olmayan apoptoz (çok az veya çok fazla) ise nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün bozukluklar ve birçok kanser türü ile ilgilidir. Bir hücrenin yaşamını veya ölümünü modüle etme yeteneğinin çok büyük bir terapötik potansiyeli bulunur. Bu nedenle, hücre döngüsü ve hücre döngüsünü kontrol eden sinyal yollarında apoptotik mekanizmaların incelenmesi günümüzün en ilgi çekici araştırma alanlarından (D'Arcy 2019; Elmore 2007).

Apoptoz normalde gelişme ve yaşlanma sırasında dokularda hücre popülasyonlarını korumak adına homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar.

Apoptoz aynı zamanda bağışıklık reaksiyonları veya hücreler hastalık veya zararlı maddelerden zarar gördüğünde bir savunma mekanizması olarak ortaya çıkar. Hem fizyolojik hem de patolojik boyutta apoptozu tetikleyebilen çok çeşitli uyarılar ve koşullar olmasına rağmen tüm hücreler mutlaka aynı uyarana cevap vermez. Radyasyon veya kanser kemoterapisi için kullanılan bazı ilaçlar, p53 bağımlı bir mekanizma üzerinden bazı hücrelerde apoptotik ölüme yol açabilir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar bazı hücreleri hiç etkilemezken bazı hücrelerde (örn. timositler) apoptotik ölüme yol açabilir (Elmore 2007).

Bazı hücreler ligand bağlanması ve protein çapraz bağlanması yoluyla apoptoza yol açabilen Fas veya TNF reseptörlerini eksprese eder. Diğer hücrelerin bir hormon veya büyüme faktörü gibi bir hayatta kalma faktörü tarafından inhibe edilmesi gereken ölüm yolağı vardır. Apoptozun nekrozdan ayırt edilmesini sağlayan bazı özellikleri vardır. Düşük dozlarda, ısı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyarılar apoptozu indükleyebilir, ancak bu aynı uyarılar daha yüksek dozlarda nekroza neden olabilir. Sonuç olarak apoptoz “kaspazlar” adı verilen bir grup sistein proteazının aktivasyonunu ve başlangıç uyarılarını hücrenin son ölümüne bağlayan karmaşık bir olaylar dizisini içeren koordineli ve çoğunlukla enerjiye bağımlı süreçtir (D'Arcy 2019).

4.2.1. Apoptozda morfoloji

Işık ve elektron mikroskopisi yöntemleri kullanılarak, apoptoz sırasında meydana gelen çeşitli morfolojik değişiklikler tanımlanmıştır. Apoptozun erken süreci sırasında hücre büzülmesi ve piknoz, ışık mikroskopisi ile görülebilir. Hücre büzülmesiyle, hücreler daha küçüktür, sitoplazma yoğundur ve organeller daha sıkı bir şekilde paketlenir. Piknozis kromatin yoğunlaşmasının sonucu oluşur ve bu apoptozun en karakteristik özelliğidir. Hematoksilin ve eozin boyası ile yapılan histolojik incelemede, apoptoz tek hücreleri veya küçük hücre kümelerini içerir. Apoptotik hücre, koyu eozinofilik sitoplazma ve yoğun mor nükleer kromatin fragmanları ile yuvarlak veya oval bir kitle olarak görülür. Elektron mikroskopisi ile hücredeki değişiklikler daha iyi tanımlanabilir (D'Arcy 2019; Martinez ve ark., 2010).

Plazma membranında çıkıntılar oluşmasını karyoreksis ve hücre fragmentlerinin “tomurcuklanma” adı verilen bir işlem sırasında apoptotik cisimlere ayrılması takip eder. Apoptotik cisimler, nükleer bir fragmanla veya nükleer fragman olmadan sıkıca paketlenmiş organelleri içeren sitoplazmadan oluşur. Organel bütünlüğü hala korunur ve bunların hepsi sağlam bir plazma membranı içine alınır. Bu cisimler daha sonra makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücreler ve fagolizosomlar içinde degrade edilirler. Apoptotik hücreleri saran ve sindiren makrofajlara “tingible body makrofajlar-boyanabilir cisim makrofajları” denir ve genelde lenfoid foliküllerin reaktif germinal merkezleri içinde veya bazen timik korteks içinde bulunurlar. Boyanabilir cisimler, apoptotik hücrelerden gelen nükleer kalıntıların parçalarıdır. Apoptoz işlemi veya apoptotik hücrelerin çıkarılması enflamatuvar reaksiyonlar ile ilişkili değildir, çünkü: apoptotik hücreler hücre sel bileşenlerini çevreleyen interstisyel dokuya salmaz; çevreleyen hücreler tarafından hızla fagosit edilirler, bu nedenle muhtemelen sekonder nekrozu önlerler; ve çevre hücreler antienflamatuvar sitokinleri üretmez (D'Arcy 2019; Elmore 2007).

4.2.2. Fas

Fas ligandı (FasL, CD95L), ölüm reseptörlerinin tümör nekroz faktörü (TNF) üst familyasındaki bir tip-II membran proteinidir. FasL, tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) gibi ilgili aile üyesi proteinlerle % 25 ila % 30 dizi homolojisini paylaşır (Caulfield ve Lathem, 2014).

FasL, ekstrinsik apoptoz yolunu başlatmak için ölüm reseptörü Fas'ı (CD95) hücre yüzeylerine bağlar ve trimerize eder. Fas-FasL etkileşimi, ölümü indükleyen sinyal kompleksini (DISC) oluşturmak için Fas ile ilişkili ölüm bölgesi adaptör proteinini (FADD) aktive eder (Park ve ark., 2003; Farnand ve ark. 2011; Caulfield ve Lathem, 2014).

Kaspaz-8 otoaktivasyonunu katalizler, ardından kaspaz-3 ve 7 gibi kaspazların olgunlaşmış formlarına proteolitik dönüşümü sağlar. Efektör kaspazlar apoptozla

hücre ölümünü yönlendirir, bu da nükleer ve sitoplazmik kondenzasyona ve ardından membrana bağlı apoptotik cisimlerin oluşumuna neden olan hücresel parçalanmaya neden olur. Kaspazla aktive edilen DNaz (CAD), hücresel kondenzasyon ve zarın kabarcıklaşmasından önce kısa fragmanlar üretmek üzere genomik DNA'yı parçalar. Membran fragmanları genellikle diğer hücreler tarafından alınır ve efferositoz olarak bilinen bir işlemle fagozomlarda parçalanır. Apoptotik hücrelerin efferositozu, sitotoksik hücresel kalıntıları hızla temizleyerek iltihapların giderilmesine katkıda bulunur ve bu süreçteki kusurlar akut akciğer hasarı gibi enflamatuvar hastalıklara yol açabilir (Caulfield ve Lathem, 2014).

FasL birçok hücre tipi tarafından eksprese edilmesine rağmen, öncelikle aktive T lenfositleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerle ilişkili olarak tanınır. FasL'ye bağlı apoptoz, gelişme sırasında bağışıklık toleransını korumak için dokunun yeniden şekillenmesinde ve potansiyel otoreaktif timositlerin ortadan kaldırılmasında önemli rol oynar. Ayrıca efektör NK hücreleri tarafından tümör hücrelerinin temizlenmesine katkıda bulunur. Apoptozun geleneksel olarak enflamatuvar olmadığı bildirilse de, FasL'nin neden olduğu hücre ölümünün mikrobiyal enfeksiyonlar bağlamında oldukça proinflamatuvar olduğu gösterilmiştir (Park ve ark., 2003; Farnand ve ark. 2011; Caulfield ve Lathem, 2014).

Birçok bakteriyel patojene yanıt olarak konakçı, FasL'ye bağlı hücre ölümünü inflamatuvar bir doğal bağışıklık yanıtı olarak tetikleyerek yanıt verir. Epitelyal hücrelerin fas aracılı apoptozu, TNFa, interlökin 8 (IL-8), makrofaj inflamatuvar protein 2 (MIP-2), monosit kemotaktik protein 1 (MCP-1) ve interlökin-1 beta dahil olmak üzere proenflamatuvar sitokinlerin salımını indükler (Park ve ark., 2003; Farnand ve ark. 2011; Caulfield ve Lathem, 2014).

4.2.3. BAX

Bcl-2 benzeri protein 4 olarak da bilinen apoptoz regülatörü BAX, insanlarda BAX geni tarafından kodlanan bir proteindir. BAX, Bcl-2 gen ailesinin bir üyesidir. BCL2 ailesi üyeleri hetero- veya homodimerler oluşturur ve çok çeşitli hücresel

aktivitelerde yer alan anti- veya pro-apoptotik regülatörleri olarak işlev görür (Peña-Blanco ve García-Sáez 2018).

BAX proteini BCL2 ile bir heterodimer oluşturur ve apoptotik aktivatör olarak işlev görür. Bu proteinin, membran potansiyelinde kayba ve sitokrom c'nin salınmasına yol açacak şekilde mitokondriyal voltaja bağlı anyon kanalı (VDAC) ile etkileşime girdiği ve açılmasını arttırdığı bildirilmektedir. Genin ekspresyonu tümör baskılayıcı P53 tarafından düzenlenir ve P53 aracılı apoptozda rol oynadığı gösterilmiştir (Cosentino ve García-Sáez 2017).

Sağlıklı memeli hücrelerinde, BAX'ın çoğunluğu sitozolde bulunur, ancak apoptotik sinyalizasyonun başlangıcında, BAX konformasyonel bir değişikliğe uğrar. Apoptozun indüklenmesi üzerine BAX, organel membran ile ilişkili ve özellikle mitokondriyal membran ile ilişkili hale geçer (Peña-Blanco ve García-Sáez 2018).

BAX, mitokondriyal voltaja bağlı anyon kanalı VDAC ile etkileşime girer ve açılmasına neden olur. Bu durum, mitokondriyal dış zar geçirgenliği olarak da adlandırılan ve kaspazların aktivasyonuna yol açan mitokondriden sitokrom c ve diğer pro-apoptotik faktörlerin salınmasına neden olur (Cosentino ve García-Sáez 2017).

BAX ekspresyonu, tümör baskılayıcı protein p53 tarafından uyarılır ve BAX'ın p53 aracılı apoptozda rol oynadığı gösterilmiştir. P53, BAX'ın apoptotik etkilerini birincil transkripsiyon faktörü olarak teşvik eder (Peña-Blanco ve García-Sáez 2018).

4.2.4. Casp3

Kaspaz ailesinin önemli bir üyesi olan casp3, programı hücre ölümünün gerçekleşmesi için çeşitli yaşamsal substratların ayrılmasını sağlar. Casp3 aktivasyonu yıllardır apoptozun gerçekleşmesinde apoptotik hücrelerde markır olarak kabul görmüştür. (Yahav Yosefzon ve Yaron Fuchs, 2018) casp3 apoptozun en önemli sonuçlarından biridir. (Xin He, 2017) kaspazlar yukarı yönlü başlatıcılar ve aşağı yönlü uygulayıcılar olarak iki gruba ayrılabilir. Casp3 apoptozda bir uygulayıcıdır. Bu

hücre ölümünün terminal fazında geniş spektrumlu substratlarla DNA'nın bozulmasını aktivasyonunu başlatan çoklu apoptotik sinyalleri içerir. (Haeryung Lee ve ark, 2015)

4.2.5. Casp8

Kaspaz-8, korunmuş sistein-aspartik asid proteaz (kaspaz) ailesinin bir üyesidir. Kaspaz-8'in ana rolü hücre apoptozunda aşağı akış yolu hücre reseptörü olarak görev yapmaktır. Kaspaz-8 bir proenzim olarak sentezlenir. Büyük bir N-terminal önbölüm ve bir C-terminal katalitik bölüm içerir. Kaspaz-8 öncü bir kaspazdır. Apoptozu tetiklemek için efektör kaspazların inaktif önformlarının ayrılmasını sağlar. Kaspaz-8 önformu ölüm efektör formu içerir. Bu form diğer proteinlerin aktiasyonunu regüle etmek için onlarla etkileşime girmeye olanak verir. (Haeryung Lee ve ark, 2015)

4.2.6. Apoptozun fizyolojik ve patolojik durumlardaki rolü

Apoptozun normal fizyolojideki rolü, mitoz kadar önemlidir. Çeşitli hücre popülasyonlarının düzenlenmesinde mitoz ve hücre proliferasyonuna komplementer fakat zıt bir etki gösterir. Yetişkin insan vücudunda homeostazı korumak için, her gün sadece apoptoz ile ölen hücreleri dengelemek için yaklaşık 10 milyar hücre yapıldığı tahmin edilmektedir. Bu sayı, normal gelişim ve yaşlanma sırasında veya hastalık sırasında artan apoptoz olduğunda önemli ölçüde artabilir. Apoptoz, çeşitli gelişim süreçleri sırasında kritik öneme sahiptir (D'Arcy 2019; Elmore 2007).

Apoptoz, vücudu patojen istilacı hücrelerin istilasından kurtulmak, enflamatuvar hücrelerin uzaklaştırılması ve yara iyileşmesi, granülasyon dokusunun skar dokusuna dönüştürülmesi için gereklidir (D'Arcy 2019; Martinez ve ark., 2010).

Yara iyileşmesi sırasında apoptozun düzensizliği, aşırı yara izi ve fibroz gibi patolojik iyileşme biçimlerine yol açabilir. Apoptoz, merkezi lenfoid organlarda (kemik iliği ve timus) olgunlaşma sırasında veya periferik dokularda aktif veya oto-agresif bağışıklık hücrelerini ortadan kaldırmak için de gereklidir (Elmore 2007).

Ayrıca, apoptoz, ovulasyon sonrası folikülün foliküler atrezisi ve süttten kesildikten sonra meme bezi invazyonu gibi erişkinlerde yeniden şekillenme işlemlerinin merkezinde yer alır. Organizmalar yaşlandıkça, bazı hücreler daha hızlı bir şekilde bozulmaya başlar ve hücreler apoptoz ile elimine edilir. Bir teori, oksidatif stresin mitokondriyal DNA' da birikmiş serbest radikal hasarı üzerinden yaşa bağlı apoptozun patofizyolojisinde birincil rol oynadığıdır. Çok az veya çok fazla hücre ölümü, gelişimsel kusurlar, otoimmün hastalıklar, nörodejenerasyon veya kanser dahil farklı patolojilere yol açabileceğinden apoptoz sıkı bir şekilde düzenlenmelidir. Apoptozun düzenlemesindeki anormallikler, kanser, otoimmün lenfoproliferatif sendrom, AIDS, iskemi ve Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların önemli bir bileşeni olabilir. Bazı koşullar yetersiz apoptoz, diğerleri ise aşırı apoptoz içerir (D'Arcy 2019).

Kanser, hücre döngüsünün düzenlenmesindeki normal mekanizmalarının, hücrelerin aşırı çoğalması ve / veya hücrelerin uzaklaştırılmasının azalması ile işlevsiz kaldığı durumlara bir örnektir. Karsinogenez sırasında apoptozun baskılanmasının bazı kanserlerin gelişimi ve ilerlemesinde merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir. Tümör hücrelerinin apoptozu bastırmak için kullandığı çeşitli moleküler mekanizmalar vardır (Elmore 2007).

Tümör hücreleri, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu veya Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin aşağı regülasyonu veya mutasyonu ile apoptoza direnç kazanabilir. Hem Bcl-2'nin hem de Bax'ın ekspresyonu p53 tümör baskılayıcı gen tarafından düzenlenir. Bazı insan B hücresi lenfoma formlarının aşırı Bcl-2 ekspresyonu vardır, bu durum apoptozun başarısızlığının kansere katkıda bulunduğu dair ilk ve en güçlü kanıtlardan biridir. Kanserde başka bir apoptoz supresyonu yöntemi bağışıklık ile ilişkilidir (Elmore 2007).

Bazı bağışıklık hücreleri (T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler) normalde perforin / granzim B yolu veya ölüm-reseptör yoluyla tümör hücrelerini yok eder.

Çeşitli hücre sinyal yollarındaki değişiklikler apoptozun düzensizliği kansere neden olabilir (D'Arcy 2019; Martinez ve ark., 2010).

Aşırı apoptoz, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve iskemi ile ilişkili yaralanma gibi bazı durumlarda görülebilir. Otoimmün eksiklik sendromu (AIDS), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile enfeksiyondan kaynaklanan otoimmün hastalığa örnektir (D'Arcy 2019; Ouyang ve ark., 2012).

Aşırı apoptozun çeşitli iskemi ile ilişkili yaralanmalarda da önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Örnek olarak yetersiz kan akışının neden olduğu miyokardiyal iskemi verilebilir. Kardiyomiyositlere oksijen gelmesinde bir azalma ve bunu takiben ölümü gerçekleşebilir. Nekroz meydana gelmesine rağmen, iskemik miyokard dokusunda BAX'in aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. Ayrıca apoptozu azaltmaya yönelik tedavi, doku hasarı derecesini azaltmada başarı sağlamıştır (D'Arcy 2019; Elmore 2007).

4.2.7. Apoptozun düzenlenmesi

Sağlıklı dokulardaki hayati hücrelerin kaybı, nörolojik bozukluklar ile bulaşıcı hastalıklar, çevresel toksisiteler dahil olmak üzere birçok insan hastalığının gelişimine, ilerlemesine engel olarak tedavi sürecine katkıda bulunur. Tersine, anormal hayatta kalma ve hasarlı veya gereksiz hücrelerin birikmesi, kanserler ve otoimmün hastalıklar gibi önemli insan patolojilerine sebep olur. Apoptoz, normal ökaryotik gelişim ve organizmal homeostazın sürdürülmesi sırasında hücrelerin programlanmış ayrışmasından sorumlu olan evrimsel olarak korunan bir hücre ölüm yoludur. Bu yol, hücre yaşamı ve ölüm arasındaki kararı dengeleyen hem pro-apoptotik hem de sağkalım yanlısı üyeleri içeren BCL-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir. BCL-2 ailesi proteinleri arasındaki dinamik etkileşimlere ve bunların sağlıklı ve hastalıklı hücrelerde apoptotik hücre ölümünü nasıl kontrol ettiklerine dair son yıllardaki görüşler, terapötik müdahale için yeni fırsatlar ortaya çıkarmıştır. Apoptozun hem pozitif hem de negatif modülatörlerinin geliştirilmesi, araştırmacıların

laboratuvar bulgularını insan sağlığını olumlu yönde etkileyecek klinik uygulamaya dönüştürmelerini sağlamaktadır (Singh ve ark., 2019).

Sistein proteaz ailesi olan kaspazlar, apoptozun merkezi düzenleyicileridir. Başlatıcı kaspazlar (8, 9, 10 ve 12) pro-apototik sinyallere yakından bağlıdır. Bir kez aktive edildiğinde, bu kaspazlar, hücre iskeleti ve nükleer proteinleri parçalayıp ederek apoptozu indükleyen efektör kaspazları (3, 6 ve 7) ve aktive eder. Mitokondriden salınan sitokrom C, önemli bir başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'un aktivasyonuna neden olur. Pro-apoptotik uyaranlara FasL, TNF, DNA hasarı ve endoplasmik retikulum stresi dahildir. Fas ve TNFR, kaspazlardan 8 ve 10'u aktive eder; DNA hasarı kaspaz 9'un aktivasyonuna yol açar; ve endoplasmik retikulum stresi, kaspaz 12'nin kalsiyum aracılı aktivasyonuna yol açar (Burlacu A., 2003).

Apoptoz inhibitörleri (IAP'ler), doğal bağışıklık ve iltihaplanma, hücre proliferasyonu, hücre göçü ve apoptozun düzenlenmesi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip bir protein ailesidir. Çoğu bir E3-ubikitin ligaz aktivitesi gösteren bir C-terminal RING alanı içerir. *Drosophila*'da, apoptotik proteaz kaspazlarının kontrolsüz aktivasyonunu önleyerek hücre hayatta kalmasını sağlamak için IAP'ler gereklidir. Memelilerde, IAP'ler kaspaz aktivitesini ve kaspaz aktive edici platform oluşumunu kontrol ederek apoptozu düzenleyebilir. Memeli IAP'lerin, hücrelerin endojen veya eksojen yaralanmalara tepkisinde, hayatta kalma sinyalini bir hücre ölüm indüklemeye sinyaline dönüştürebilmesinin önemli belirleyicileri olduğu belirtilmiştir (Vasudevan ve Ryoo, 2015).

4.2.8. P53

P53 proteini hücrenin düzgün çalışabilmesi için gerekli olan bir çok işlemin düzenleyicisi ve hücrenin yaşamı ve ölümü ile ilgili bir dizi sürecinde etkilidir. Aktifleşen p53 proteini, hücre döngüsünün durması veya apoptozu gibi çeşitli yanıtlara neden olur. Bu aynı zamanda tümör gelişimi için bir bariyer oluşturmaktadır. Aktive olan p53, bir dizi gene bağlanır. Biyoinformatik çalışmalar insan genomunda 4000'den fazla varsayılan p53'ün bağlanma bölgesi içerdiğini göstermiştir.

Çok sayıda p53 hedef geni, hücre fonksiyonundaki değişikliklerin p53'ün bir kaç genin düzenlenmesine bağlı aşağı yönlü efektörleri olarak tanımlanmıştır. Örneğin, mitokondriyal aktivasyonu aktive ederek hücre apoptozuna aracılık eder ve ölüm reseptörünün yol açtığı apoptotik yollarla her iki yol daha sonra apoptozu indükleyen kaspaz sinyalinin indüksiyonu ile sonuçlanır. (Wang ve ark., 2015)

Ayrıca p53, hücresel DNA'nın onarımını düzenler. Bu protein geni hasara uğradığında hücre apoptoza gider ve bu geri döndürülmesi imkansız önemli bir süreçtir. İnsan kanserlerinde en çok mutasyona uğramış tümör baskılayıcı gendir. Bir tümör baskılayıcı gen olarak hücre döngüsünde hedef geni transkripsiyonel olarak düzenleyerek programlı hücre ölümünün gerçekleşmesinde etkilidir. (Yang ve ark., 2015)

4.3. İnterferon Gamma

İnterferon gamma (IFN γ), tanımlanan ilk sitokinler arasındadır. Genetik, yapısal ve fonksiyonel olarak iyi tanımlanan bir çok türü vardır. Reseptör aracılı sinyallerle yüzlerce genin transkripsiyonundaki değişikliklere yol açar. (Murphy ve ark., 2009)

IFN γ bağışıklık sisteminin önemli bir pleotropik düzenleyici sitokindir. IFN γ , otoantikorları indükleme, otolog sitotoksik T hücrelerini aktive etme ve hedef hücre apoptozunu indükleme gibi otoimmün patolojiye katkıda bulunur. (Yang ve ark., 2015) İnterferonlar hücre proliferasyonunun önemli inhibitörleridir ve her iki parakrin ve otokrin büyüme düzenlenmesinde farklı tipte interferonlar yer alabilir. IFN γ esas olarak aktive edilmiş T lenfositleri ve doğal öldürücü hücrelerden hücrelerden üretilirler ve bağışıklık yanıtı ve enflamatuvar koşullar sırasında salınır. (Mattyasovszky ve ark., 2016)

IFN γ , bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu, hücre döngünün durması ve apoptoz gibi çeşitli ekilere yol açan bir dizi hedef geni aktive edebilir veya

baskılayabilir. IFN γ 'nın hem kaspazlara bağı, hem bağımsız diğr yollarla hücre ölümünü indüklediğı kanıtlar sağılanmıştır. (Pedersen ve ark., 2004)

4.4. Zebra Balıkları

Zebra balığı, Sazangiller Ailesi'ne mensup olan teleost bir balıktır. *Danio cinsi*, zebra balığı (*Danio rerio*) ile birlikte 40'tan fazla ilişkili tür içerir. Doğal ortamları Hindistan, Pakistan, Nepal ve Bangladeş'in durgun suları olan zebra balıkları berrak ve ılık suları tercih etmekle birlikte, çeşitli farklı ortamlarda da bulunmuşlardır.

Zebra balıkları kemikli balıklardan (Teleostei) Actinopterygii sınıfının içinde bulunur ve Cyprinidae ailesine mensuptur (Carpio ve Estrada, 2006). Boyutları 4-5 cm kadardır ve gövdelerinin üzerinde gümüş renginde mavi renkli çizgiler bulunur. Zebra balıklarının yaşamaları için en uygun sıcaklık 26-28°C arasıdır. Bir dişi zebra balığı haftada yaklaşık 200-300 adet yumurta üretir. Bu embriyolar 48. Saatten sonra koryondan çıkar ve bundan sonra larva olarak adlandırılır. Embriyonel gelişimleri hızlıdır ve embriyo şeffaflığı birçok avantaj sağlar. Zebra balığının ve insanlar ile genetik benzerliği % 73 oranındadır (Howe ve ark., 2013).

Zebra balıklarının yaşam süresi laboratuvar ortamında en fazla 5,5 yıl olarak bildirilirken genelde ortalama 3,5 yıl civarındır. Ayrıca laboratuvar ortamında, bu hayvanlar rutin olarak sadece 18 ay ila iki yıl tutulur, sonrasında üreme yeteneklerinin düştüğü kabul edilir. Doğada ise yırtıcı hayvanlar veya parazitlerden dolayı zebra balıklarının bir veya iki yıldan daha uzun hayatta kalabildiğine dair çok az kanıt vardır. Laboratuvarda tutulan zebra balıklarında, ikinci yıllarından sonra spinal eğrilik gözlenebilmektedir. Bu durum, vahşi popülasyonlardaki balıklarda koşulun gelişmeden ölümlerin muhtemel olması nedeniyle görülmemektedir (Lawrence ve Mason 2012).

Zebra balığı barındırma sistemleri 30 yıl içinde önemli ölçüde gelişmiştir. Her ne kadar standart cam akvaryumlar hala bazı ortamlarda kullanılsa da, artık çok daha sofistike yaşam destek sistemleri mevcuttur. Teknolojinin gelişmesi ile beraber, en yeni sistemler internet üzerinden uzaktan erişilebilen ve çalıştırılabilen tam otomatik

elektronik su kalitesi izleme ve kontrol sistemleri, özel üretim odaları ve robotik besleyiciler gibi yenilikleri içermektedir (Avdesh ve ark. 2012).

Düzgün çalışan bir akvaryum sisteminde temiz bir ortam sağlanması önemlidir. Bu amaçla düzenli olarak sistem filtrelerini değiştirerek tüm tanklara uygun su akışı ve temiz suyun sağlanması gerekmektedir.

4.4.1. Zebra balıklarının biyomedikal araştırmalarda kullanılması ve akut balık embriyo testleri

Bir çok farklı biyolojik olayların araştırılması ve mekanizmalarının belirlenmesi için farklı model organizmalar kullanılır. Bu model organizmaların arasında gelişmiş hayvan modellerinin yanı sıra prokaryotlar, funguslar ve bitkiler de bulunmaktadır (Hedges, 2002).

Model organizmaların insan genomuna yakınlığı ve kısa jenerasyon süresinin olması başlıca avantajları olarak kabul edilir. Bu gibi avantajları nedeni ile son yılların popüler model organizmalarının başında zebra balıkları gelmektedir.

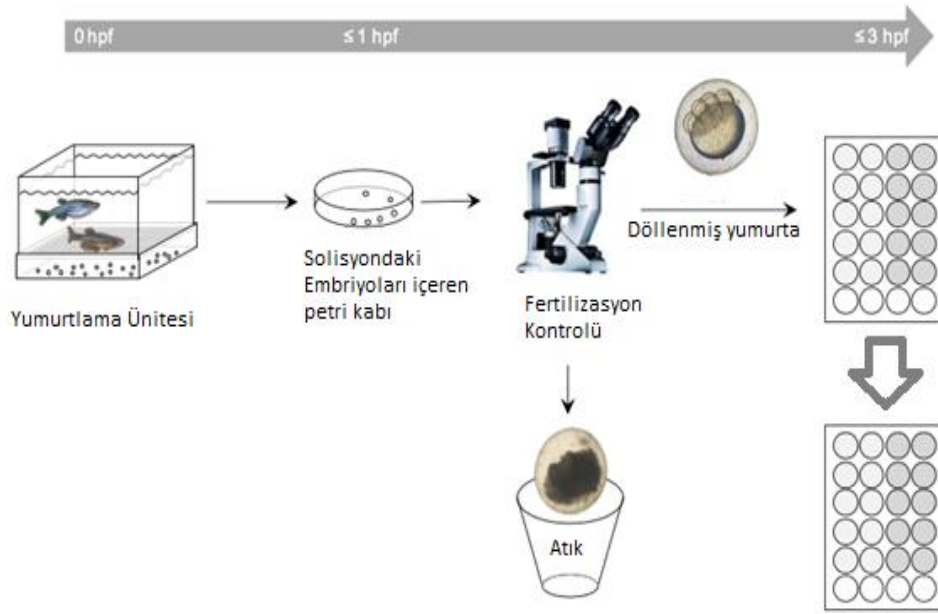
Zebra balıkları günümüzde insanlarda görülen hastalıklarının mekanizmalarının araştırılması için uygun modeller olarak kabul edilmektedir. Özellikler gelişim biyolojisi, toksikoloji ve ilaç araştırmaları için sıklıkla kullanılmışlardır (Ma ve ark., 2013). Bunun dışında birçok insanlarda görülen birçok hastalık modellerinin oluşturulması için de kullanılmaktadırlar. Örneğin kanser, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar zebra balıklarında deneysel olarak oluşturulmuştur (Unal ve ark., 2019).

Zebra balıklarının üretimi için gereken maliyet rodentler ile kıyaslandığında daha düşüktür. Cinsel olgunluğa ulaşma süresi olan üç ay da birçok diğer hayvanla kıyaslandığında uygun bir süredir. Uygun koşullar altında üretimleri nispeten daha kolaydır. Dişilerin yıl boyu yumurtlaması da önemli bir avantaj olarak değerlendirilir (Brand ve ark., 2002).

Ekonomik Kalkınma ve İş birliği Örgütü (OECD) çeşitli kimyasalların toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlı zebra balıklarının kullanımını uygun görmüştür. Bu

amaçla akut balık embriyo testlerinin kullanımı yaygın hale gelmiştir. Özellikle Almanya’ da balık embriyo toksisite testi rutin olarak atık suların ve de kanalizasyon güvenliğinin kontrolü amaçlı kullanılmaktadır. OECD balık toksisite testlerini hem yetişkin balıklarda hem de embriyoda kullanımı için çeşitli kılavuzlar hazırlamıştır. Bu kılavuzlarda uygulanacak yöntemler, kimyasalların çözündüğü çözücünün özellikleri ve deneylerin süresi ile bitiş noktaları hakkında bilgi verilmektedir. Bu testler de genel prensip olarak beş güne yani 120. saate kadar zebra balığı embriyoları henüz serbest beslenme dönemine geçmedikleri için etik onayından muaf olarak değerlendirilir (OECD, 2006).

Zebra balığı embriyosu kullanılarak uygulanan embriyo toksisite testinde, yeni döllenmiş yumurtalar kimyasallara statik veya yarı statik ortamda maruz bırakılırlar. Akut balık embriyo testinin prensibi Şekil 3’de verilmiştir. Bu yöntemde kullanılan sonlandırma noktaları embriyonun pıhtılaşması, somit gelişmemesi, kalp atışındaki anomaliler ve kuyruğun besin kesesinden ayrılamaması şeklinde birinci ve ikinci günlerin sonunda kaydedilir. Kaydedilen bu değerlerle beraber mortalite oranları letal doz 50 (LC50) değerinin belirlenmesi amacı ile kullanılır. Belirli bir nüfusun yarısının tepki verdiği konsantrasyon, LC50 veya dozu-LD50 şeklinde tanımlanır.



Şekil 3: Akut balık embriyo testinin uygulanması

Akut balık embriyosu testleri sonucunda elde edilen veriler, istatistiksel bir yöntem olan Probit Analizi yöntemi kullanılarak belirli bir kimyasalın bir organizmada toksisitesinin belirlenmesi amacı ile kullanılır. Probit analizi sonucunda kullanılan ve elde edilen cevap ölüm var ya da yok şeklindedir, başka bir deyimle binomeldir. Alınan cevap ile farklı konsantrasyonlar arasındaki ilişki ise sigmoidal niteliktedir. Dolayısıyla Probit analizi, sigmoidal verilerin doğrusala çevrilmesi ve sonrasında bu ilişkinin regresyonun alınması şeklinde gerçekleştirilir. (Lammer ve ark. 2009).

4.4.2. Endokrin bozucu kimyasalların etkilerinin incelenmesinde zebra balığı embriolarının kullanımı

Tarama testlerinin amacı, kimyasal bir maddenin endokrince aktif olma potansiyelini göstermektir. Zebra balığı ile yapılan çoğu tarama çalışmasında balıklar, genç (pre-mature) veya yetişkin (olgun) yaşam evrelerinde kullanılmıştır. EBK tarama deneylerinde uç nokta olarak, özellikle test ajanlarının endokrin aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Zebra balığı kullanılarak yapılan EBK tarama tahlillerinde en sık ölçülen belirteçlerden biri, östrojenlerin kontrolü altında dişi balıkların karaciğerinde sentezlenen bir yumurta sarısı öncüsü proteini olan vitellogenin (VTG)

indüksiyonudur. Kadınlarda VTG sentezi fizyolojik bir fenomen olsa da, VTG sentezi, östrojen aktif bileşiklerle, yani östrojen reseptörlerine (ER'ler) bağlanan ve aktive eden maddelerle indüklenirse, erkeklerin karaciğerinde fizyolojik olarak indüklenebilir. Bu nedenle, erkeklerde vitellogenin indüksiyonu, balıkların östrojenik maruziyetinin hassas ve spesifik bir belirteci olarak kabul edilir. Test kimyasallarının östrojenik aktivitesinin bir biyobelirteç olarak VTG'nin avantajları arasında özgüllüğü, duyarlılığı ve indüklenebilir yanıtın büyüklüğü bulunur (Segner 2009).

Endokrin süreçler üzerine EBK etkisinin daha geniş bir değerlendirmesini elde etmek için başka bir yaklaşım histopatolojidir. EBK'ye maruz kalan balıklarda hormonal metabolizmanın ve fonksiyonların bozulması, duyarlı organlarda, yani hormon etkisinde veya hormon sentezinde yer alan organlarda patolojik değişikliklere yol açacaktır. Örneğin gonadlar, seks hormonlarının sentezi ve fonksiyonunda önemli bir rol oynar ve bu nedenle seks steroidine müdahale eden EBK'lere maruz kalma durumunda yapısal değişiklikler göstermesi muhtemeldir (Hutchinson ve ark. 2006).

EBK'ler gonad farklılaşma veya olgunlaşma durumunu değiştirebilir - veya nekroz, apoptoz veya hücrel hiperplazi ve hipertrofi indüksiyonu gibi doku hasarına neden olabilir. Balıklarla EBK testinde gonad histopatolojisinin kullanımındaki bir dezavantaj, balık gonadlarının histopatolojisi hakkında halen çok detaylı bilginin mevcut olmayışındır. Balıkların gonad histopatolojisinde neyin normal ve anormal olduğunu bilinmesinin önemi günümüzde daha belirgin hale gelmiştir (Segner 2009).

EBK'lerin tarama testleri için biyobelirteçlere bir alternatif yöntem de transgenik zebra balığıdır. Bunlar endojen östrojen reseptörlerinin kontrolü altında lusiferaz raportör geni içeren stabil olarak transfekte edilmiş bir suş şeklindedir. Transgenik zebra balığının östrojenik bileşiklere maruz bırakılması ER transaktivasyonuna, ardından lusiferaz gen aktivasyonuna ve doku lizatlarında ölçülebilen artmış lusiferaz aktivitesine yol açar. Transgenik suşlar hem yetişkinlerde hem de zebra balığı erken yaşam evrelerinde EBK taraması için uygun olduğu bulunmuştur (Segner 2009).

4.5. Krestinin Embriyo Gelişimindeki Rolü

İnsanlarda embriyo gelişiminin üçüncü haftasında nöral krest hücreleri gelişir. Bu hücreler pluripotent karakterdedirler ve embriyoda çeşitli farklı hücre tiplerine dönüşerek farklılaşmak için değişik yerlere göç ederler. Bu hücrelerin göçü, işlev görecekları yerdeki rolleri için morfogenez adına gerekmektedir (Berke ve Keklikoğlu 2010; Mayor ve Theveneau 2013).

Kafa ve yüz bölgesinin gelişmesi nöral krest hücrelerinin büyümesi, çoğalması, göç ederek farklılaşması gibi birden fazla biyolojik işlemin sonucu meydana gelmektedir (Berke ve Keklikoğlu 2010; Mayor ve Theveneau 2013).

Ektomezenkimal hücrelerin nöral krest hücrelerinden köken almaları sonucu ağız ve yüz ile dış dokusunun gelişimi gerçekleşmiş olur (4). Bu süreçte meydana gelen eksiklik ve düzensizlikler çeşitli gelişimsel anomalilere neden olabilmektedir. Örnek olarak nöral krest hücrelerince normalde eksprese edilen fibronektin lösinden zengin transmembran proteini-2'nin ekspresyonunda bozulma damakta defektlere sebep olduğu gösterilmiştir. Wnt yolağı'nın nöral krest hücrelerinin göçünün yönlendirilmesinde etkili olduğu bilinmektedir (Berke ve Keklikoğlu 2010; Mayor ve Theveneau 2013).

Nöral krest hücrelerinin oluşumunda öncelikli olarak nöral plak ve nöral tüp gelişir. Nöral plaktan merkezi sinir sistemi, nöral krest ile bazı başka nöral oluşumlar şekillenir (Berke ve Keklikoğlu 2010).

Zebra balığı embriyolarında, nöral krest gelişimi diğer omurgalı embriyolarına çok benzer bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, zebra balığı embriyoları başlangıçta optik olarak berrak olduğu ve nöral krest hücreleri diğer türlere göre daha büyük ve sayıca daha az olduğu için, canlı prematüre nöral krest hücreleri canlı embriyolarda tanımlanabilir ve manipüle edilebilir (Luo et al., 2001).

Krestinin zebra balıklarında embriyogenez sırasında eksprese edildiği bilinmektedir. Krestin ekspresyonu ilk olarak ektodermin nöral krest hücrelerinde

somitogenez başlangıcında gözlenmiştir. Krestin ekspresyonu daha sonra premigratör kranial ve gövde nöral kret hücrelerinde ve daha sonra da aktif olarak göç eden krest hücrelerinde gözlenmiştir. Krestini eksprese eden prömigratör gövde nöral krest hücrelerinin sayıları, kretsini bu aşamada tüm nöral kret hücreleri tarafından eksprese edildiğini göstermektedir. Kretsini ekspresyonu, fazla farklılaşmış hücrelerde yavaş yavaş down regüle edilir. Sonuçlarımız, kretinin zebra balığı embriyogenezi boyunca spesifik bir pan-nöral kret markörü olduğunu göstermektedir (Luo et al., 2001).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Deney sonunda 100 embriyo serum fizyolojik (1mL) ilavesi ile homojenize edilerek doku homojenatları hazırlandı. Hazırlanan doku homojenatları tüplere konarak derin dondurucuda -20°C 'de kullanılacağı tarihe kadar saklandı. Derin dondurucuda saklama sürelerinin aynı olmasına dikkat edildi.

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullandığımız maddeler analitik saflıktadır. Kullanılan kimyasal maddelerden aşağıda belirtilenler; Sigma, Merck, Mp-Biomedisis, Fluka, Alfa Asear Biolabo ve İnvitrogen firmalarından elde edilmiştir.

- NaCl [Merck 106404]
- CaCl_2 [Sigma 12022]
- Sodyum sitrat [Sigma S1804]
- NaOH [Merck 106498]
 - BFA [Sigma 80-05-7]
 - DEHP [Sigma 117-81-7]
 - DMSO [Sigma 67-68-5]
 - Methanol [Sigma 67-56-1]

5.2. Kullanılan Aletler

Vortex	JANKE & KUNKEL, IKA LABOR TECHNIK
Santrifüj	HERAEUS-SEPATECH, LABOFUGE 200
Etüv	NÜVE FN 500, Memmert Modell 400
Distile su cihazı	SCHOTT GERATE

Derin dondurucu	ARÇELİK, -25, AEG NoFrost Deepfreeze
PH Metre	ORION pH/ISE meter model 710A
Magnetik Karıştırıcı	JANKE&KUNKEL IKA Labortechnik
Hassas terazi	SARTORIUS
Elektronik kaba terazi	SCALTEC SPB62
Otomatik pipetler	GILSON
Spektrofotometre	SHIMADZU UV-120-02
Mekanik Karıştırıcı	JANKE&KUNKEL IKA Labortechnik RW20
Su banyosu (37 ⁰ C)	OEHRINGER-MANNHEIM PRECITHERM-PFV
Su banyosu (100 ⁰ C)	HEIZBAD, KERMANLAR, 34680

5.3. Zebra Balıklarının Bakım ve Beslenme Şartları

Çalışmamızda ZEBTEC akvaryum sistemi içinde barındırılan yabanıl tip AB zebra balıklarından temin edilen embriyolar kullanılmıştır. Zebra balıkları bilgisayar kontrollü inkübasyon tankında (ZEBTEC Mini system) yetiştirilmiştir. Günde 14 saat gün ışığına, 10 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sistemi kurularak balıkların üremesi için gereken sirkadien ritim oluşturuldu. Sıcaklık ve nem sırasıyla $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %61 olarak ayarlanarak sistem tarafından sabit tutuldu. Suyun pH'sı pH: 7,2 arasında ayarlandı. Tanktaki suyun parametreleri günlük ve haftalık olarak kontrol edilmiştir. Fiziksel ve UV sistemlerini içeren filtrasyon mekanizmaları ile balıkların ortam temizliği sağlanmıştır. Embriyolar tanklardan günlük olarak toplanmıştır.

Yetişkin balıklar litrede 2-5 tane olacak şekilde özel akvaryumlarında, embriyolar ise 1 ml’de 20 tane olacak şeklilde 24 kuyucuklu plate kaplarda barındırılmıştır. Embriyonik gelişim aşamaları Zeiss Sterio Discovery V8 mikroskop altında incelenmiştir.

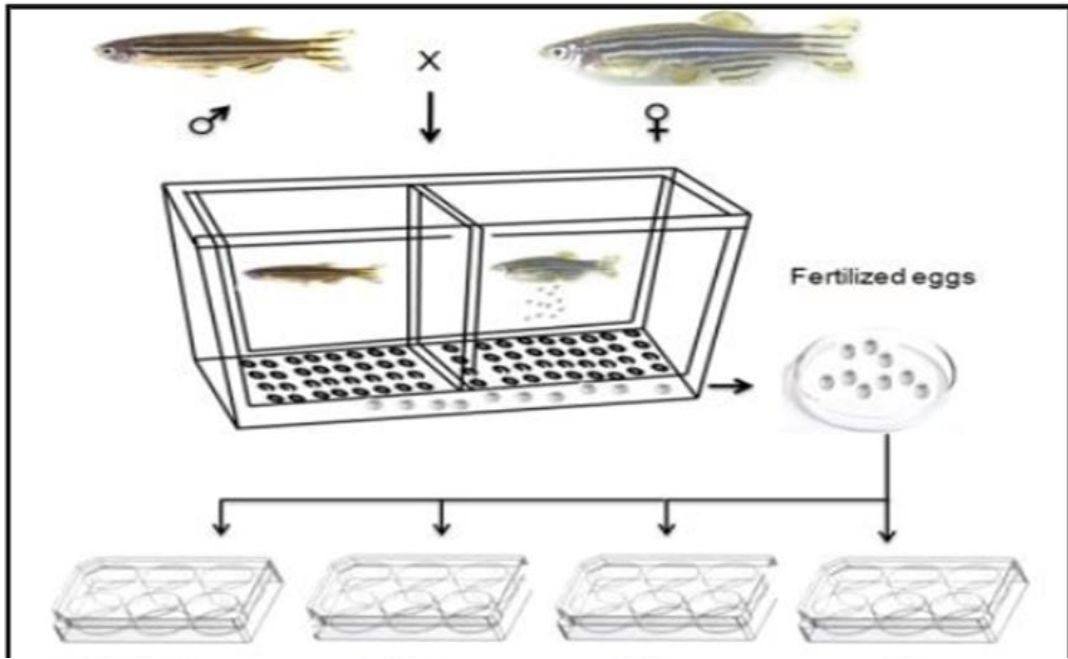


Resim 2: Zebra BalıklarınınYaşadığı ZEBTEC Mini Akvaryum Sistemi

5.4. Zebra Balıklarından Embriyo Eldesi

Zebra balıkları fotoperiyodik üreme gösterir. Şafakla beraber ışığın ortaya çıkması ile üreme davranışını başlatırlar. Işıkla beraber erkek ve dişi zebra balıkları, koordine halde yumurtlama ve sperm salınımına yol açan belirgin kur hareketleri sergiler.

Yumurta dökmeye hazır bir dişi, yüzlerce hatta bazen bine kadar fazla oosit serbest bırakır. Döllenmiş yumurtalar dibe çöker ve genelde ebeveynler tarafından tüketilirler; bu nedenle laboratuvar ortamında döllenmiş yumurtalar ebeveynlerinden elek veya oluklu bir bariyer vasıtası ile ayırır. Şekil 4 'de zebra balıklarının örnek bir eşleştirme düzeneği verilmiştir. Ardışık iki gün boyunca ikili eşleştirme yapılmamalıdır.



Şekil 4 : Embriyo elde etme yöntemi (Bhasin ve ark 2016)

5.5. Zebra Balığı Embriyoları İle Oluşturulan Gruplar ve İzlenen Protokol

Zebra balığı embriyoları BFA ve DEHP için daha önceden Üstündağ ve ark. 'nın (2017) belirlemiş olduğu LC50 değerlerinin altındaki dozlara maruz bırakılmışlardır. Bu amaçla Zebra balığı embriyoları 4 hücreli aşamada olacak şekilde kuyucuklara yerleştirilip BFA ve DEHP maruziyet gruplarının letal doz konsantrasyonları belirlenmişti. Embriyolar BFA ve DHEP bulunan sularda gelişimleri 96 saate kadar Zeiss Sterio Discovery V8 mikroskop altında incelenmiş ve görüntüleri düzenli olarak kayıt altına alınmıştı.

Zebra balığı embriyolarında % 50 mortaliteye (LC50) neden ölümcül konsantrasyon altındaki değer 20 adet 1-4 hücreli aşamadaki embriyonun 0.1 mL / L DMSO çözeltisindeki 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2,5 µg/ml konsantrasyonlarına maruz bırakılması ile mortalite değerlerinin Probit analizi ile değerlendirilmesi ile Zebra balıklarında ölümcül BFA konsantrasyonu 1 µg /L olarak belirlenmiştir (Üstündağ ve ark., 2017). DEHP deneyleri için zebra balığı 0.1 mL / L Metanol çözeltisindeki değişik DEHP konsantrasyonlarına maruz bırakıldılar. Her grup için üç tekerrür yapıldı. Fertilizasyondan sonra 72. Saate kadar stero mikroskop altında izlendi. Kaydedilen mortalite değerleri Probit analizi ile değerlendirildi. Zebra balıklarında LC50 dozu DEHP için 2,5 µg/L olarak belirlendi (Üstündağ ve ark., 2017)..

5.6. Gen İfadesi Analizi (RT-PCR)

Gen ekspresyonlarının belirlenebilmesi için 72 hpf dönemdeki embriyolar RLT lizis tamponu içinde homojenize edilmiştir (Tissue lyser, Qiagen). Elde edilen homojenizatlardan ekstrakte edilen RNA örneklerinden önce cDNA sentezi yapılmış daha sonra genlerin ekspresyon düzeyleri Qiagene RT SYBR Green kiti kullanılarak Rotor Gene-Q (Qiagen) ile belirlenmiştir.

Maruziyet sonrası embriyolar öncelikle homojenize edilmiştir (Tissue lyser, Qiagen). Bu homojenatlardan mRNA elde edilerek cDNA sentezi yapılmış ve daha sonrasında *casp3a*, *casp8*, *Ifng1*, *fas*, *tp53* ifade düzeyleri RT SYBR Green kiti (Qiagene, Almanya) kullanılarak Rotor Gene-Q (Qiagene, Almanya) ile analiz edilmiştir.

5.6.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonları RNeasy Mini kit ile Qiacube (Qiagen) aleti kullanılarak yapılmıştır. RNA izolasyonu için, embriyolar RLT lizis tamponu eklenerek homojenize edilmiştir. Daha sonra lizata etanol eklenerek RNA'nın RNeasy membranına bağlanabilmesi için gerekli koşullar sağlanmış ve örnekler RNeasy spin kolonuna aktarılmıştır. Total RNA membrana bağlandığında kontaminantların da

yıkınması ile RNA elüsyonu RNase-free su içinde gerçekleştirilmiştir. Bağlanma, yıkınma ve elüsyon işlemleri Qiacube (Qiagen) izalasyon cihazı kullanılarak yapılmıştır.

5.6.2. cDNA sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi, One Script (ABM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere mRNA'dan cDNA sentezi için öncelikle ters transkripsiyondan önce RNA örneklerinde kontamine edici genomik DNA ortadan kaldırır. Oligo-dT primerleri, ters transkripsiyonu hazırlar ve bir ters transkriptaz, cDNA ürününü optimum uzunlukta sentezler.

5.6.3. Gen ekspresyonlarının belirlenmesi

Analiz edilecek genlerin ifadeleri, RT² SYBR Green Master Mix karışımına elde edilen cDNA örneklerinin eklenmesi şeklinde Rotor-Gene Q cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Housekeeping gen olarak *actb1* kullanılmıştır. Örnekler üç tekrarlı çalışılmıştır. Tablo 3 'de primer dizileri verilmiştir.

Tablo 3: Kullanılan Primer Dizileri

	İleri	Geri
<i>casp3</i> <i>a</i>	AAGGACTTTGATCGCAGGAC	TAATCTGCGCAACTGTCTGG
<i>casp8</i>	TATTCAAGCCTGCCAAGGAG	CCGATCAGGAAATCAGCTTC
<i>Ifng1</i>	CTGTTTTTCGGGATGGATGAC	AGCTTTGAGCTCTTCGATGC
<i>fas</i>	GTGACGCTAATGCAAAAATGAAG	CGATGTCCTGCAGAGTGGTG
<i>tp53</i>	GGGCAATCAGCGAGCAAA	ACTGACCTTCCTGAGTCTCCA

5.6.4. Delta delta C_t metodu ile veri analizi

Verilerin analizi house keeping gen *actb1* ile normalizasyona dayalı delta delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) metodu kullanılarak yapılmıştır.

Bu yöntem ile PCR’da belirlenen eşik değer döngü sayısı (threshold cycle number = C_t), kontrol ve araştırılan gen için karşılaştırılır. Kontrol (referans) ile incelenecek gen bölgesi arasındaki C_t değer farklılığı housekeeping gen ile normalize edilip $\Delta\Delta C_t$ oranı belirlenerek bulunur. “Housekeeping” genler tüm çekirdekli hücrelerde aktif olarak bulunan genlerdir ve bunlara spesifik primerlerle amplifiye edilerek belirlenirler. Bu amaçla kullanılan gen bölgeleri arasında β -aktin, albumin, β -globin, hipoksantin fosforibozil transferaz sayılabilir. Karşılaştırmalı C_t metodu aynı zamanda $2^{-[\Delta\Delta C_t]}$ olarak bilinmektedir (Yuan ve ark., 2008).

$$[\Delta\Delta C_t] = [\Delta C_t]_{\text{örnek}} - [\Delta C_t]_{\text{referans}}$$

Bu formülde $[\Delta C_t]_{\text{örnek}}$; ilgilenilen örneğe ait C_t değeri ile housekeeping genin C_t değer farklılığıdır. $[\Delta C_t]_{\text{referans}}$ ise kontrole ait C_t değeri ile housekeeping genin C_t değer farklılığıdır (Yuan ve ark., 2008).

5.7. In situ Hibridizasyon Yöntemi ile Krestin İfadesi Analizi

In situ hibridizasyon yöntemi ile krestin ifadesinin belirlenmesi amacı ile krestin hedef alınarak daha önceden hazırlanmış bir RNA probu kullanıldı. 72 saate ulaşan 10 adet embriyo homojenat haline getirilerek RNeasy mini kit ile RNA izolasyonu yapıldı. RNA cDNA’ya çevrildikten sonra PCR ile daha önceden dizayn edilen krestine özgü primerler ile istenilen bölgesi çoğaltıldı. Çoğalan bölgenin doğruluğunu kontrol etmek adına jel elektroforezi yöntemiyle validasyonu yapıldı. Daha sonra PCR ile istenen bölge çoğaltıldıktan sonra clean-up kiti ile çoğaltılan bölge dışında istenmeyen moleküller (dntpler vb) uzaklaştırıldı. Daha sonra in vitro transkripsiyon metodu ile elde edilen PCR ürünü DIG ile işaretli bir RNA haline getirildi. Elde edilen RNA, RNA clean-up kitiyle temizlenerek kullanılabilir hale getirildi. Bu şekilde elde edilen prob, in situ hibridizasyon yönteminde kullanılarak

BFA ve DEHP'ye maruz bırakılan ve kontrol grubu embriyolar birbiri ile kıyaslandı. In Situ Hibridizasyon basamaklarının Thisse metoduna göre uygulanışı aşağıda açıklanmıştır (Thisse ve Thisse 2008).

Fiksasyon/permeabilization:

Fikse edilecek embriyoların aynı büyüklükte olmasına dikkat edilerek seçildi ve maksimum 8 embriyo olacak şekilde eppendorflara alındı. Koryon içindeki embriyolar pronaz ile koryonlarından çıkarıldı. Koryondan çıktıktan sonra embriyolar E3 solusyonu ile yıkandı ve pronaz uzaklaştırıldı. Embriyoların üzerini geçecek kadar %4'lük PFA (paraformaldehit) eklendi ve eppendorflar karıştırıcıya kondu ve 20 dk boyunca düşük hızda çalıştırıldı. PFA, PBST ile 2 kez yıkandı.- PBST yerine 1/4 oranında Metanol+PBST eklendi, 2-3 dakika tutuldu. Daha sonra 1/1 oranında Metanol + PBST eklendi, 2-3 dakika beklendi, eppendorflar hafifçe sallandı. Sonra 4/1 oranında Metanol + PBST eklendi, 2-3 dakika beklenir eppendorflar hafifçe sallandı. Son olarak metanol eklendi.

Postpermeabilization/Proteinaz K Uygulaması

Sırası ile %75 Metanol + %25 PBST; %50 Metanol + %50 PBST ve %25 Metanol+ %75 PBST eklenerek her basamaktan sonra 2-3 dakika beklendi ve eppendorflar hafifçe karıştırıldı. Son olarak 2 kez PBST ile yıkandı ve eppendorflar hafifçe sallandı.

-5 ug/ml Proteinaz K uygulandı (2ml PBST + 0,5 ul 20 mg/ml). Proteinaz K farklı büyüklükteki hayvanlar için farklı sürelerde uygulanır;

Proteinaz K solusyonu eppendorflara eklendi ve shakerda gerekli sürelerde bekletildi. Gerekli sürenin sonunda embriyolar 3 kez PBST ile yıkandı. %4'lük PFA ile oda sıcaklığında 20 dakika boyunca yine fiksasyon yapıldı. Üç kez PBST ile embriyolar yıkandı.

Prehibridizasyon / Hibridizasyon

Sıcak su banyosu 67 °C'ye ayarlandı ve üzerinde Hyb- solusyonu eklendi ve sıcak su banyosunda 5 dk beklendi.

Hyb- solüsyonu Hyb+ ile değiştirildi ve 1 saat sıcak su banyosunda bekletildi. 1 saatin sonunda prob eklendi ve sıcak su banyosunda 1 gece bekletildi.

Probun yıkanması

Sıcak su banyosunda 2 kez 30 dakika boyunca Formamide ve SSCT ile 1 kez 2x SSCT çözeltisi; 2 kez 0.2X SSCT ile yıkandı.

Belirleme-Deteksiyon

Bu basamaktan sonra örnekler plate üzerine alınıp oda sıcaklığında PBST ile yıkandı. Bir saat süre ile oda sıcaklığında bloklama tamponu ile karıştırıcıda bloklandı.

Örneklerden bloklama tamponu uzaklaştırıldı ve Fab antikoru eklenen tampon çözeltiden örnekler üzerine eklendi.

Örnekler buzdolabında (+4 C'de) 1 gece bekletildi. Ertesi gün örnekler oda sıcaklığında, karıştırıcıda PBST ve sonrasında staining buffer ile yıkandı. Plate alüminyum folyoya sarıldı ve boyanıp boyanmadığı mikroskopta kontrol edildi.

Örnekler boyandıktan sonra 3 kez PBST ile yıkandı ve PFA ile yeniden fikse edilerek buzdolabında saklandı.

5.8. İstatistiksel Analizi

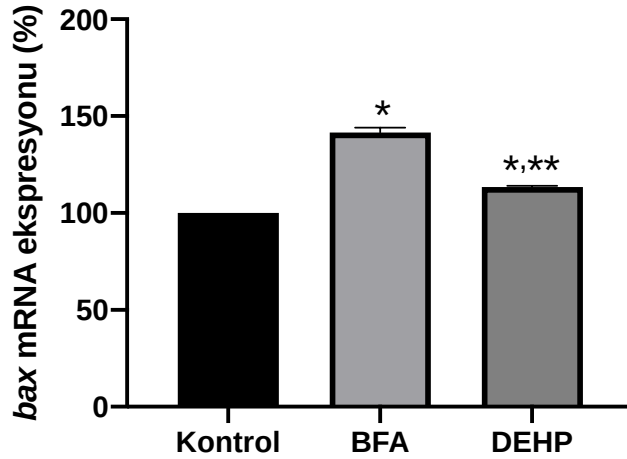
Verilerin istatistiksel analizi One Way Anova sonrası Post Hoc Tukey Çoklu Karşılaştırma Analizi kullanılarak Graph Pad 7 İstatistik programı ile yapılmıştır. Sonuçlar Ortalama±Standart Sapma şeklinde verilmiş, $p<0,05$ anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. RT-PCR Sonuçları

6.1.1. *bax* ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

Kontrol (K), Bisfenol A (BFA), Di-2-etilhekzilfitalat (DEHP) gruplarının *bax* mRNA düzeyleri sonuçlarının karşılaştırması Şekil 5’de gösterilmiştir. BFA ve DEHP gruplarında *bax* mRNA ifade düzeyinde K grubuna göre anlamlı derecede artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). DEHP grubu BFA grubu ile kıyaslandığında ise *bax* mRNA ifade düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

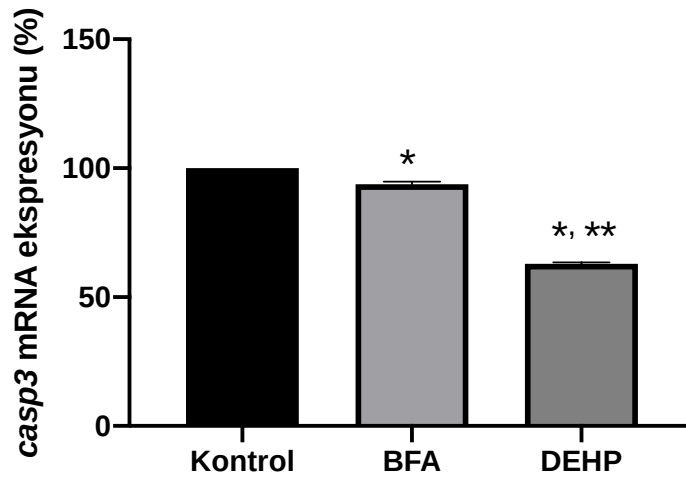


Şekil 5: Kontrol ve maruziyet gruplarının *bax* gen ekspresyon grafiği

Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD'dir. Anlamlı fark yıldızla gösterilmiştir, * $p<0.05$ kontrol grubundan anlamlı derecede farklıdır; ** $p<0.05$ BFA grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.1.2. *casp3a* ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

Kontrol (K), Bisfenol A (BFA), Di-2-etilhekzilfitalat (DEHP) gruplarının *casp3a* mRNA düzeyleri sonuçlarının karşılaştırması Şekil 6'de gösterilmiştir. BFA ve DEHP gruplarında *casp3a* mRNA ifade düzeyinde K grubuna göre anlamlı derecede azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). DEHP grubunda ise BFA grubu ile kıyaslandığında *casp3a* mRNA ifade düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$).



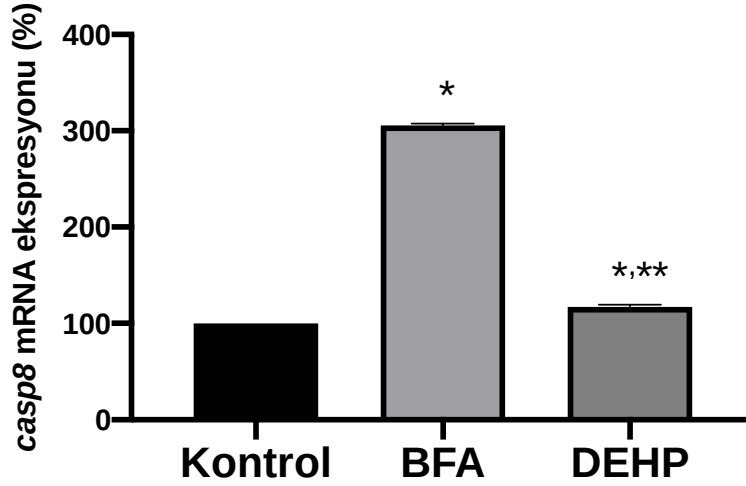
Şekil 6: Kontrol ve maruziyet gruplarının *casp3a* gen ekspresyon grafiği.

Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD'dir. Anlamlı fark yıldızla gösterilmiştir, * $p < 0.05$ kontrol grubundan anlamlı derecede farklıdır; ** $p < 0.05$ BFA grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.1.3. *casp8* ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

Kontrol (K), Bisfenol A (BFA), Di-2-etilhekzilfitalat (DEHP) gruplarının *casp8* mRNA düzeyleri sonuçlarının karşılaştırması Şekil 7'de gösterilmiştir. BFA ve DEHP gruplarında *casp8* mRNA ifade düzeyinde K grubuna göre anlamlı derecede artma olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). DEHP grubunda ise BFA

grubu ile kıyaslandığında *casp8* mRNA ifade düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

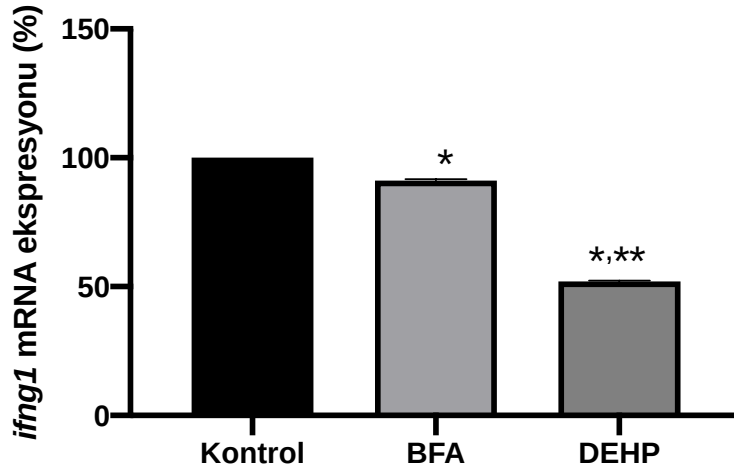


Şekil 7: Kontrol ve maruziyet gruplarının *casp8* gen ekspresyon grafiği.

Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD'dir. Anlamlı fark yıldızla gösterilmiştir, * $p<0.05$ kontrol grubundan anlamlı derecede farklıdır; ** $p<0.05$ BFA grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.1.4. *ifng1* ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

Kontrol (K), Bisfenol A (BFA), Di-2-etilhekzilfitalat (DEHP) gruplarının *ifng1* mRNA düzeyleri sonuçlarının karşılaştırması Şekil 8'de gösterilmiştir. BFA ve DEHP gruplarında *ifng1* mRNA ifade düzeyinde K grubuna göre anlamlı derecede azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). DEHP grubunda ise BFA grubu ile kıyaslandığında *ifng1* mRNA ifade düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

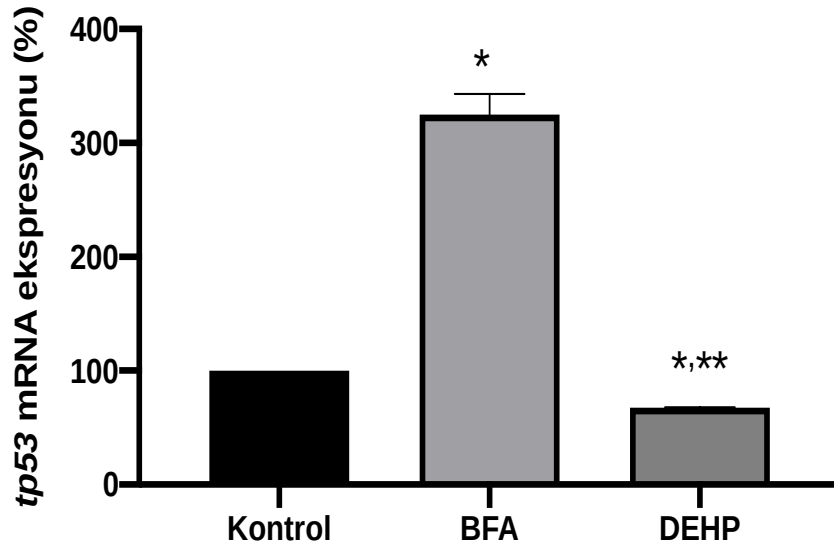


Şekil 8: Kontrol ve maruziyet gruplarının *ifng1* gen ekspresyon grafiği.

Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD'dir. Anlamlı fark yıldızla gösterilmiştir, * $p < 0.05$ kontrol grubundan anlamlı derecede farklıdır; ** $p < 0.05$ BFA grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.1.5. *tp53* ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

Kontrol (K), Bisfenol A (BFA), Di-2-etilhekzilfitalat (DEHP) gruplarının *tp53* mRNA düzeyleri sonuçlarının karşılaştırması Şekil 9'de gösterilmiştir. BFA grubunda *tp53* mRNA ifade düzeyinde K grubuna göre anlamlı derecede artma olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). DEHP grubunda ise hem kontrol hem de BFA grubu ile kıyaslandığında *tp53* mRNA ifade düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

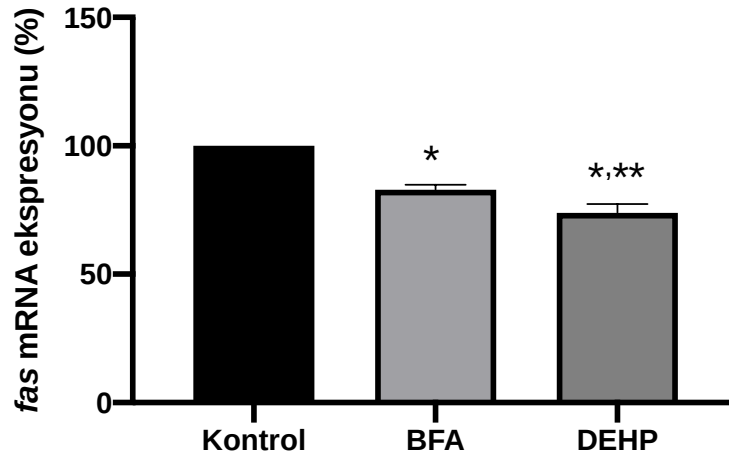


Şekil 9: Kontrol ve maruziyet gruplarının *tp53* gen ekspresyon grafiği.

Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD'dir. Anlamlı fark yıldızla gösterilmiştir, * $p < 0.05$ kontrol grubundan anlamlı derecede farklıdır; ** $p < 0.05$ BFA grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.1.6. *fas* ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

Kontrol (K), Bisfenol A (BFA), Di-2-etilhekzilfitalat (DEHP) gruplarının *fas* mRNA düzeyleri sonuçlarının karşılaştırması Şekil 10'de gösterilmiştir. BFA ve DEHP gruplarında *fas* mRNA ifade düzeyinde K grubuna göre anlamlı derecede azalma olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). DEHP grubunda BFA grubu ile kıyaslandığında *fas* mRNA ifade düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).



Şekil 10: Kontrol ve maruziyet gruplarının *fas* gen ekspresyon grafiği

Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD'dir. Anlamlı fark yıldızla gösterilmiştir, * $p < 0.05$ kontrol grubundan anlamlı derecede farklıdır; ** $p < 0.05$ BFA grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.2. Kontrol, DEHP ve BFA Gruplarında Krestin İfadesi Analizi Sonuçları

Kontrol, DEHP ve BFA Gruplarında Krestin İfadesi Analizi Sonuçları incelendiği gruplar arasında belirgin fark gözlenmemiştir.



Resim 2: Kontrol Grubuna Ait Embriyoda Krestin Ekspresyonu



Resim 3: DEHP'ye Maruz Bırakılan Embriyoda Krestin Ekspresyonu



Resim 4: BFA'ya Maruz Bırakılan Embriyoda Krestin Ekspresyonu

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Endokrin bozucu kimyasallardan BFA ve DEHP'ye embriyonal dönemde maruziyetin zebra balığı embriyolarında apoptoz ile ilişkili *p53*, *casp3*, *casp8*, *bax* genleri ile inflamasyonla ilişkili *ifn-γ* ve *tnf-α* genlerinin ekspresyonları üzerindeki etkilerini incelediğimiz çalışmamızda ayrıca embriyonal dönemde önemli bir belirteç olan krestin ekspresyonu *in situ* hibridizasyon yöntemi ile araştırılmıştır. BFA ve DEHP'nin bu belirteçler üzerine olan etkileri zebra balığı embriyosunda daha önce çalışılmamıştır.

BFA ve DEHP maruziyeti sonucunda zebra balığı embriyolarında kontrol grubu ile kıyaslandığında *bax* ve *casp8* ekspresyonları arttı; *casp3a*, *ifng1* ve *fas* ekspresyonları ise azaldı. Kontrol grubuna göre *tp53* ekspresyonu ise BFA'da artış gösterirken DEHP grubunda azaldı. DEHP'ye maruz bırakılan embriyolar BFA'ya maruz bırakılanlarla kıyaslandığında *bax*, *casp3a*, *casp8*, *fas*, *ifng1* ve *tp53* ekspresyonları azaldı.

Sentetik bir östrojen olan BFA, polikarbonat plastiğin yapı taşıdır. Oyuncaklar, biberonlar, şişeler, gıda kapları, su boruları ve tıbbi cihazlar dahil olmak üzere geniş bir ürün yelpazesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Plastikler modern yaşamda yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu nedenle BFA, doğrudan veya normal koşullar altında eksik polimerizasyon nedeniyle çevre ortama serbest bırakılmaktadır. Asidik, bazik veya ısıtılmış ortamlar, BFA monomerlerini bağlayan ester bağlarının hidrolizini hızlandırır, böylece BFA'nın salınmasını teşvik eder ve göç oranını artırır. Bu sızıntı sayesinde BFA akarsu, nehir ve içme suyunda bulunur. Temel maruz kalma kaynağı yiyecek ve içecek yoluyla oluşur (Lakind ve Naiman 2011).

BFA, gelişim, üreme ve metabolizma ile ilgili çok çeşitli fizyolojik fonksiyonları etkiler. Bu etkiler esas olarak aynı hücrel reseptörleri bağladığı için östrojen benzeri etkisine atfedilebilir, böylece vücudun hormonal dengesini değiştirir. BFA maruziyetinin, yumurtalık hastalığı ve meme kanseri gibi östrojen düzeyindeki değişiklikten etkilenen birçok hastalıkla bağlantılı olduğu ileri sürülmektedir. Ek

olarak, kadınlarda vücut yağ dağılımı ile BFA kan düzeyleri arasında bir ilişki olduğu önerilmiştir (Valentino ve ark., 2013).

Apoptoz, canlıların normal gelişimi sırasında, hatalı germ hücrelerinin ortadan kaldırılmasında, uygun germ hücresi ile Sertoli hücre oranının korunmasında ve sperm üretiminin kontrol edilmesinde önemli bir rol oynayan programlanmış bir olaydır. BFA'nın ratlarda Sertoli ve Leyding hücrelerinde otofaji ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Quan ve ark. 2017).

BFA'nın testiküler Leydig hücrelerinde protein kinaz A (PKA) ve Akt aktivasyonunu indükleyebileceği bildirilmiştir. BFA'nın çeşitli hücre modellerinde çeşitli reseptörler ve / veya sinyal yolları yoluyla hücre proliferasyonu, apoptoz ve steroidogenezde rol oynadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, BFA tarafından indüklenen germ hücre apoptozunun altında yatan mekanizma, özellikle apoptoz sinyal yollarının tutulumu hakkında çok az şey bilinmektedir.

Oka ve ark. (2003) BFA'nın *Xenopus laevis* embriyolarının erken gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Embriyolar 10-100 mikrom BFA'ya maruz bırakılmış ve embriyolar en az 20 mikrom BFA'ya maruz kaldığında gelişimsel anormallikler gözlenmiştir.

Apoptoz birkaç farklı uyaran tarafından indüklenebildiği gibi, hücre içindeki apoptotik sinyal esas olarak ölüm reseptör yolu (ekstresek-dış yol) ve mitokondriyal yol (intresek-iç yol) şeklinde iki tanımlanmış moleküler yoluyla aktarılır. İntresek yol, radyasyon, oksidatif stres, toksinler, BFA gibi ksenobiyotik metabolizmanın reaktif ara maddeleri ve mitokondriyal disfonksiyona neden olan bazı kemoterapötik ilaçlar gibi farklı hücre dışı veya hücre içi sinyaller tarafından tetiklenebilir. Mitokondri, hücresel apoptozun intrinsik apoptotik yolunun kontrol edildiği yerdir, ve Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenen bir sistem sonucu sitokrom c'nin ve diğer proapoptotik efektörlerin hücre ölümüne yol açması ile sonuçlanır (Quan ve ark. 2017).

Çalışmamızda casp8, bax ve p53 ekspresyon düzeyi BFA'ya maruz bırakılan embriyolarda kontrole göre anlamlı derecede artmış, casp3 ise azalmıştır. Lloyd ve ark. (2009) meme kanseri hücre hattında western blot analizi yöntemi ile BFA'nın konsantrasyona bağlı bir şekilde hücre protein P53'te bir artışa neden olduğunu göstermiştir. BFA uygulaması ile P53'ün sitolokalizasyonunu etkilenmese de, hücre proliferasyonunda bir artış gözlenmiştir.

Jiang ve ark. (2020) beş hafta boyunca yemlerine BFA eklenen sıçanlarda yaptıkları çalışmada BFA maruziyetinin böbrekte casp 3, 8, 9 ve 10 ekspresyon düzeylerini arttırarak apoptotik etki gösterdiğini bildirmiştir.

Xu ve ark. (2002) BFA'nın ratlarda yumurtalık granüloza hücreleri üzerindeki etkisi incelemişler; yumurtalık granüloza hücrelerini 24 saat ila 72 saat süreyle BFA'ya maruz bırakmışlardır ve BFA'nın granüloza hücre canlılığını doza ve zamana bağlı bir şekilde azalttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar BFA'nın Bax ekspresyonunu arttırdığını ve granüloza hücrelerinin hem protein hem de mRNA seviyelerinde Bcl2 ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Bu bulgular, düşük, muhtemelen çevresel olarak anlamlı BFA dozlarının, apoptozu indükleyerek granüloza hücrelerinin canlılığını azalttığını göstermektedir. Bu apoptotik etkiye Bax ekspresyonunun artması ve Bcl2'nin azalmasının etkili dahil olduğu ileri sürülmüştür.

Çalışmamızda ifng1 ekspresyon düzeyleri BFA grubu embriyolarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Yapısal olarak östrojenden farklı olmasına rağmen, BFA östrojen reseptörü (ER) alt tiplerine ve özellikle de ER-beta'ya 6 kat daha fazla afinite ile bağlanır. Bağışıklık sistemi hücreleri östrojen de dahil olmak üzere seks hormonlarına yanıt verir. Östrojenin ER bağlanması üzerine, ligand-reseptör kompleksi östrojen tepki elemanları (ERE'ler) içeren genlerin transkripsiyon aktivitesine aracılık eder. Hem interferon gamma (IFN- γ) hem de interleukin -10 (IL-10) östrojen ile düzenlenir. IFN- γ promoteri ERE benzeri sekanslar içerir ve östrojenin IFN- γ üretimini aktive ettiği bildirilmiştir (Karpuzoglu-Sahin ve ark. 2001).

Östrojenin IFN-y üretimini artırdığı bildirilmiş olmakla beraber (Karpuzoglu-Sahin ve ark. 2001), hem erkek hem de dişi farelerde BFA'nın IFN-y düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (Sawai ve ark., 2003).

Üstündağ ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada BFA'ya maruz kalan zebra balığı embriyolarında artan vitellogenin seviyeleri, apoptoz ve wnt3a ve gsk3 ekspresyonları gözlemlemiştir. BFA'ya maruz kalan embriyolarda artan apoptozun Wnt3a kaynaklı pro-apoptotik değişikliklere bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. DEHP maruziyeti durumunda ise Wnt3a'nın daha az bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür. Aynı çalışmada DEHP'ye maruz kalan embriyolarda vitellogenin düzeyleri ve apoptoz önemli ölçüde artmamıştır. Üstündağ ve ark.'nın çalışmasında çalışmamızdan farklı olarak apoptoz akridin oranj yöntemi ile değerlendirilmiştir.

DEHP, zebra balığı embriyosu ve larva için toksik etkilidir ve gelişimsel anomalilere neden olduğu gösterilmiştir. DEHP'nin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda 1.50 ppm konsantrasyonlarda östrojenik aktiviteyi artırabildiği, bu da DEHP'nin ER'nin transaktivasyonunu indüklemek yolu ile gerçekleştiği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2014).

Çalışmamız sonucunda DEHP maruziyeti sonucunda zebra balığı embriyolarında kontrol grubu ile kıyaslandığında *bax* ve *casp8* ekspresyonları arttığı *casp3a*, *ifng1*, *fas* ve *tp53* ekspresyonlarının ise azaldığı bulundu. Ayrıca DEHP'ye maruz bırakılan embriyolar BFA'ya maruz bırakılanlarla kıyaslandığında *bax*, *casp3a*, *casp8*, *fas*, *ifng1* ve *tp53* ekspresyonları azalmıştır.

DEHP'nin apoptozu indüklediği, DNA zincir kopmalarına, mitokondriyal hasarın indüksiyonuna ve artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine neden olabildiği önceki çalışmalarda gösterilmiştir. DNA hasarı SIRT1 (mitokondriyal fonksiyon regülatörü) zayıflamasına yol açar ve böylece testiküler ATP seviyeleri baskılanır. Spermatozoanın motilitesi sperm ATP'sine bağlı olduğundan, DEHP'nin yol açtığı ATP seviyelerinin zayıflaması erkek doğurganlığı için çok önemli bir sorun olarak kabul edilmiştir (Li ve ark., 2014).

DEHP'nin yumurtalık ve foliküller üzerindeki toksik etkilerinin apoptoza bağlı ger ekle ebildiği bildirilmiştir. Folikül fonksiyonu, steroidogenezin uygun şekilde düzenlenmesini ve atreziden sağ kalımını gerektirir. Atrezi, foliküllerin ölümü ile gerçekleşen, yumurtalık ve üreme sağlığı üzerinde zararlı bir etkiye sahip olan doğal bir apoptotik olaydır. Yumurtalık foliküler atrezisi proapoptotik faktörler (Bad, Bax ve Bok gibi) ve genellikle DEHP'ye maruz kalma ile inhibe olan antiapoptotik faktörler (Bcl2 ve Bcl2l10 gibi) tarafından kontrol edilir. DEHP ile oksidatif stresin indüksiyonu foliküler atreziye yol açan başka bir nedendir. DEHP ayrıca oksidatif stres yoluyla folikül büyümesini inhibe edebilir (Wang ve ark., 2012).

8. KAYNAKLAR

Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. A dose–response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose–response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology*, 2006;227(3):185-192.

Avdesh A, Chen M, Martin-Iverson MT, et al. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *J Vis Exp*. 2012;(69):e4196.

Berke N, Keklikoğlu N. Contributions Of Neural Crest-Derived Cells To The Development Of Oral And Maxillofacial Region And The Anomalies Caused By These Cells. *İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi DERLEME*. 2010;Cilt: 44, Sayı: 1 Sayfa: 39-43

Bhasin, C, Mudgal P, Joshi A, Mangla AG, Madhu VS, Jain S, Mathur M. Zebrafish Early Stage Developmental Defects as Indicator of Site Specific Water Composition of River Yamuna. *Zebrafish*, 2016;2(1),40-55.

Bradbury J. UK panics over phthatales in babymilk formulae. *Lancet* 1996;347:1541.

Carbone S, Samaniego Y A, Cutrera R, Reynoso R, Cardoso N, Scacchi P, Ponzo OJ. Different effects by sex on hypothalamic–pituitary axis of prepubertal offspring rats produced by in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Neurotoxicology*. 2012;33(1),78-84.

Carpio Y, Estrada MP. Zebrafish as a Genetic Model organism. *Biotechnol*. 2006;23:4

Caulfield AJ, Lathem WW Disruption of Fas-Fas Ligand Signaling, Apoptosis, and Innate Immunity by Bacterial Pathogens. *PLoS Pathog* 2014;10(8):e1004252.

Colon I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect* 2000;108:895-900.

Crook MA. Sialic acid and cardiovascular disease. *Med Biochem*.1999;1:123-130

Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305:761-70.

Cosentino K, García-Sáez AJ. Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle? *Trends Cell Biol*. 2017;27(4):266-275.

D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-592. doi:10.1002/cbin.11137

Dickerson SM, Cunningham SL, Gore AC. Reproductive neuroendocrine targets of developmental exposure to endocrine disruptors. In: Diamanti-Kandarakis E, Gore AC (eds). *Endocrine Disruptors and Puberty*. Part of Contemporary Endocrinology Book Series. City: Springer, Humana Press, 2012:49-117.

Durando M, Kass L, Piva J. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect* 2007;115:80-86.

Durmaz E, Özmert ÖN. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2010;53:305-317.

Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 2007;35(4),495-516.

Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufik J, Navalón A, Ballesteros O, Pulgar R, Ole N. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol* 2007;24(2):259-264.

Ginsberg G, Deborah C, Rice G, Rice DC. Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A. *Environ Health Perspec* 2009;117:1639-1643.

Gray LE Jr, Ostby J, Furr J, Price M, Veermachaneni DR, Parks L. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci* 2000;58(2):350-365.

Güler Ç. ve Çobanoğlu Z. Plastikler. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi. Sağlık Bakanlığı TSH Genel Müdürlüğü. Ankara. 1997;No:46. ISBN:975-8088-51-3.

Hard DJ. Best Practices and Industry Standards in PET Plastic Recycling. NY. 2001; 17

Hauser R, Calafat AM. Phthalates and human health, *Occup Environ Med*. 2005;62: 806-818

He X., Sun J., Huang X. Expression of Caspase-3, Bax and Bcl2 in hippocampus of rats with diabetes and subarachnoid hemorrhage. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018;15:873-877

Hedges SB. The Origin and Evolution of Model Organisms. *Nature Rev*. 2002;3:838-849

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, McLaren S. "The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome." *Nature* 2013;496.7446:498-503.

Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M. Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol* 2003;13:546-553.

Hutchinson, T., Ankley, G.T., Segner, H., Tyler, C.R., Screening and testing for endocrine disruption in fish—biomarkers as “signposts” not “traffic lights” in risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 2006;114 (supplement 1), 106-114.

Jiang W, Zhao H, Zhang L, Wu B, Zha Z. Maintenance of mitochondrial function by astaxanthin protects against bisphenol A-induced kidney toxicity in rats. *Biomedicine&Pharmacotherapy.* 2020;121:109629

Kamrin M. Bisphenol A: a scientific evaluation. *Med Gen Med* 2004;6:7.

Karpuzoglu-Sahin E, Zhi-Jun Y, Lengi A, Sriranganathan N, Ansar Ahmed S. Effects of long-term estrogen treatment on IFN-gamma, IL-2 and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice. *Cytokine* 2001;14:208-217.

Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J. New metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium labeled DEHP. *Arch Toxicol* 2005;79:367-376.

Lakind J.S. Naiman D.Q. Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005–2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 2011;21,272-279.

Lee H., Park S., Kang Y., Park S. EphA receptor form a complex with Caspase-8 to induce apoptotic cell death. *Molecules and Cells.* 2015;38(4):349-355

Lloyd V, Morse M, Purakal B, Parker J, Benard P, Crone M, Pfiffner S, Szmyd M, Dinda S. Hormone-like effects of bisphenol A on p53 and estrogen receptor alpha in breast cancer cells, *BioResearch Open Access* 2009;8:1,169-184

Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for

the fish acute toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2009; Part C 149: 196–209

Lawrence C, Mason T. Zebrafish housing systems: a review of basic operating principles and considerations for design and functionality. *ILAR J*. 2012;53(2):179-91.

Luo R, An M, Arduini BL, Henion PD. Specific pan-neural crest expression of zebrafish Crestin throughout embryonic development. *Dev Dyn*. 2001;220(2):169-74.

Martinez MM, Reif RD, Pappas D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical methods*. 2010;2(8),996-1004.

Mattyasovszky S., Mausbach S., Ritz U., Wollstadter J., Schmidtmann I., Baranowski A., Drees P., Rommens P., Hoffman A. Cytokine interferon gamma supresses the function of capsule myofibroblasts and induces cell apoptosis. *Journal Of Orthopaedic Research* 2017;35(11):2524-2533

Mayor R, Theveneau E. The neural crest. *Development* 2013;140:2247-225

Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS. Association of urinary bisphenol A concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PloS One* 2010;5:e8673.

Murphy S., Tayade C., Ashkar A., Hotta K., Zhang J., Croy A. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biology of Reproduction*. 2009;80,848-859

Oka T, Adati N, Shinkai T, Sakuma K, Nishimura T, Kurose K. Bisphenol A induces apoptosis in central neural cells during early development of *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;26;312(4):877-82.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, 2012;45(6),487-498.

Park DR, Thomsen AR, Frevert CW, Pham U, Skerrett SJ, et al. Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 2003;170:6209–6216.

Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, et al. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* 2000;58:339-349

Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J.* 2018;285(3):416-431.

Petersen JH, Namansen ET, Nielsen PA. PVC cling film in contact with cheese: health aspects related to global migration and specific migration of DEHA. *Food Addit. Contam.* 1995;12:245-253

Qiao L, Zheng L, Cai D. Study on the di-n-butyl phthalate and di-2-ethylhexyl phthalate level of girl serum related with precocious puberty in Shanghai. *Wei Sheng Yan Jiu* 2007;36:93-95.

Quan C, Wang C, Duan P, Huang W, Yang K. Prenatal bisphenol a exposure leads to reproductive hazards on male offspring via the Akt/mTOR and mitochondrial apoptosis pathways. *Environ. Toxicol.* 2017;32: 1007–1023.

Rasier G, Parent AS, Gérard A, Lebrethon MC, Bourguignon JP. Early maturation of gonadotropinreleasing hormone secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biol Reprod* 2007;77: 734-742.

Reddy BS, Rozati R, Reddy BV, Raman NV. Association of phthalate esters with endometriosis in Indian women. *BJOG* 2006;113:515-520

Rubin BS, Soto AM. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;304(1-2):55-62

Sawai C, Anderson K, Walser-Kuntz D. Effect of Bisphenol A on Murine Immune Function: Modulation of Interferon- γ , IgG2a, and Disease Symptoms in NZB $\times$ NZW F1 Mice. *Environmental Health Perspectives*. 2003;111(16),

Sax L.” Polyethylene terephthalate may yield endocrine disruptors.” *Environmental Health Perspectives*. 2010;118(4):445-8. doi: 10.1289/ehp.0901253.

Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;127-3,204-215.

Scognamiglio V, Antonacci A, Patrolecco L, Lambrevia MD, Litescu SC, Ghuge SA, Rea G. Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals. *Trends in Analytical Chemistry* 2016;80:555-567.

Segner H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149 2009;187-195.

Serrano SE, Braun J, Trasande L, Dills R, Sathyanarayana S.” Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data.” *Environ Health*. 2014;13(1): 43.

Shankar A, Teppala S. Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:3822-3826.

Singh, R., Letai, A., Sarosiek, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 175–193 (2019)

Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med.* 2003 ;7(3):249-57.

Snyder RW, Maness SC, Gaido KW, Welsch F, Sumner SC, Fennell TR. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;168: 225-234.

Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, Makino T, Suzumori K. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2005;20:2325-2329.

Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J* 2004;51:165-169.

Thisse, C. and Thisse, B. High resolution in situ hybridization on whole-mount zebrafish embryo. *Nat. protoc.* 2008;3:59-69

US Department of Health and Human Services. NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A. 2008;08-5994.

Üstündağ ÜV, Ünal İ, Ateş PS, Alturfan AA, Yiğitbaşı T, Emekli-Alturfan E. Bisphenol A and di(2-ethylhexyl) phthalate exert divergent effects on apoptosis and the Wnt/ β -catenin pathway in zebrafish embryos: A possible mechanism of endocrine disrupting chemical action. *Toxicol Ind Health.* 2017;33(12):901-910.

Ünal İ, Çalışkan-Ak E, Üstündağ ÜV, Ateş PS, Alturfan AA, Altinoz MA, Elmaci I, Emekli-Alturfan E. Neuroprotective effects of mitoquinone and oleandrin on Parkinson's disease model in zebrafish. *Int J Neurosci*. 2019;4:1-9

Valentino R., D'Esposito V., Passaretti F. et al Bisphenol-A impairs insulin action and up-regulates inflammatory pathways in human subcutaneous adipocytes and 3T3-L1 cells. 2013;PLOS ONE 8, e82099.

Vasudevan D, Ryoo HD. Regulation of Cell Death by IAPs and Their Antagonists. *Curr Top Dev Biol*. 2015;114:185-208

Wang X., Simpson E., Brown K. P53: Protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis. *Cancer Research* 2015;1;75(23):5001-7

Willhite CC, Ball GL, McLellan CJ. Derivation of a bisphenol A oral reference dose (RfD) and drinkingwater equivalent concentration. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008;11: 69-146.

Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones (Athens)*. 2010;9(1):9-15.

Xu J, Osuga Y, Yano T, Morita Y, Tang X, Fujiwara T, Takai Y, Matsumi H, Koga K, Taketani Y, Tsutsumi O. Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;29;292(2):456-62.

Yamada H, Furuta I, Kato EH, Kataoka S, Usuki Y, Kobashi G, Fujimoto S. Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol* 2002;16(6) :735-739.

Yang L., Wei Y., Sun Y., Shi W., Yang J., Zhu L., Li M. Interferon-gamma inhibits melanogenesis and induces apoptosis melanocytes: A pivotal role of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in vitiligo. *Acta Derm Venereol* 2015;95: 664–670

Yuan JS, Wang D, Steward CN JR. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnol.* 2008;3(1):112-23.

Yosefhon Y., Fuchs Y., Exiting the dark side: A vital rol for Caspase-3 in Yap signaling. *Molecular and Cellular Oncology* 2018;6;5(4):e1494947

Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, Vom Saal FS. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology.* 2012;153(9), 4097-4110.

9. EKLER

EK-1. Uluslararası Kongre Bildiri Özeti

