

MİNE ÇAĞLAYAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2021



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

(DOKTORA TEZİ)

**BİSFENOL A VE ANALOGLARININ ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ**

MİNE ÇAĞLAYAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. SİBEL ÖZDEN**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Rahmetli babacığma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Danışman hocam Prof. Dr. Sibel Özden’e teşekkürü bir borç bilirim.

Desteklerinden dolayı İ.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gül Özhan’a, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Eski Başkanı Sayın Prof. Dr. Buket Alpertunga’ya ve Farmasötik Toksikoloji ve Biyokimya Anabilim Dalı üyelerine,

Yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, Prof. Dr. Elif Damla Arısan’a ve Araş. Gör. Özge Rencüzoğulları’na,

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı çalışanı, değerli ağabeyim Fatih Mehmet Sarı’ya ve değerli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Merve Arıcı’ya ve Dr. Tuğçe Boran’a,

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili annem Nurhan Şenyıldız, rahmetli babam Mehmet Ali Şenyıldız’a, en büyük destekçim, sevgili eşim Asım Can Çağlayan’a, kardeşim Melike Şenyıldız’a, rahmetli dedem Ali Hikmet Şenyıldız’a ve rahmetli babaannem Ayşe Şenyıldız’a, kuzenim Kudret Erol’a, eşi Serpil Erol’a ve kızları Amine Hatice ile sevimli kardeşlerine, eşimin ailesine ve tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmam sırasında TÜBİTAK-BİDEB “2211-C/Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı” 2018/3 kapsamında bursiyer olarak desteklenmiş olduğumdan dolayı TÜBİTAK’a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-31614.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİİ
BEYAN.....	İV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ	Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	XVİİ
ÖZET	XXİİ
ABSTRACT.....	XXİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Bisfenol A (BPA)	5
2.1.1. BPA'nın Kimyasal Yapısı	5
2.1.2. BPA'nın Fizikokimyasal Özellikleri.....	6
2.2. BPA Analogları ve Kimyasal Yapıları.....	7
2.3. BPF ve BPS'nin Fizikokimyasal Özellikleri.....	8
BPA, BPF ve BPS'nin Kullanım Alanları.....	9
2.4. BPA, BPF ve BPS'ye Maruziyet Yolları	10
2.5. BPA, BPF ve BPS'nin Toksikokinetiği	11
2.6. BPA, BPF ve BPS'nin Toksik Etki Mekanizmaları	17
2.6.1. Endokrin Bozucu Etkiler	17
2.6.2. Sitotoksik ve Genotoksik Etkiler	18
2.6.3. Üreme Sistemi Üzerine Etkiler	19
2.6.4. BPA, BPF ve BPS ile ilgili Yasal Düzenlemeler.....	21
2.7. Endoplazmik Retikulum.....	23
2.8. Endoplazmik Retikulum Stresi.....	24
2.8.1. Protein Degredasyonu	25
2.8.1.1. Ubikitin-Proteazom Sistemi (UPS)	25

2.8.2. Katlanmamış Protein Cevabı (UPR)	27
2.8.2.1. IRE1	29
2.8.2.2. PERK	30
2.8.2.3. ATF6	31
2.8.3. Hücre Ölümü Yanıtı	32
2.8.3.1. Apoptoz	32
2.9. Prostat Kanseri ve ER Stresi İlişkisi	34
2.10. Memeli Hücre Kültüründe, Endoplazmik Retikulum Stresi ve UPR'nin Araştırılmasında Kullanılan Teknikler	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	39
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	41
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	42
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	43
3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği	43
3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini	44
3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	44
3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması	45
3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)	45
3.4.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	46
3.4.7. Hücrelerin Sayılması	46
3.5. Sitotoksikite Testleri	46
3.5.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması	46
3.5.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması	47
3.5.3. BPA'nın Hücre Kültürüne Maruziyeti	49
3.6. BrdU Testi	52
3.7. Flow sitometri ile Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Tayini	53
3.7.1. Diklorofluoressein (DCF) Testi ile ROS Tayini	53
3.8. Flow Sitometri ile Apoptoz Tayini	55
3.8.1. Annexin V-FITC/PI Testi ile Apoptoz Tayini	55
3.9. Gen Ekspresyonu Tayini	59
3.9.1. Total RNA İzolasyonu	59

3.9.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	60
3.9.3. cDNA Sentezi	60
3.9.4. Gen Ekspresyonunun Real-Time PCR ile Tayini	61
3.10. Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile Tayini.....	63
3.10.1. Protein İzolasyonu.....	63
3.10.2. Proteinlerin Miktar Tayini	64
3.10.3. Protein Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Tayini	65
3.11. İstatistiksel Değerlendirme	69
4. BULGULAR.....	70
4.1. Sitotoksosite Sonuçları.....	70
4.1.1. BPA, BPF ve BPS'nin PC-3 Hücrelerinde Sitotoksosite Üzerine Etkileri	70
4.1.2. BPA, BPF ve BPS'nin PNT1A Hücrelerinde Sitotoksosite Üzerine Etkileri	72
4.2. BrdU Hücre Proliferasyonu Testi Sonuçları	75
4.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Flow Sitometri Analizi ile Sonuçları.....	77
4.1.1. BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PC-3 Hücrelerinde ROS Sonuçları.....	78
4.1.2. BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PNT1A Hücrelerinde ROS Sonuçları.....	79
4.2. Annexin V- FITC/PI Analizi ile Apoptoz Sonuçları	80
4.2.1. BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PC-3 ve PNT1A Hücrelerinde Annexin V- FITC ⁺ /PI ⁺ (Geç Apoptoz) Sonuçları.....	80
4.2.2. BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PC-3 ve PNT1A Hücrelerinde Annexin V- FITC ⁺ /PI ⁺ (Erken Apoptoz) Sonuçları.....	82
4.3. BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PNT1A ve PC-3 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Miktarları ve Saflıkları	85
4.4. ER Stresi ile ilişkili Genlerin Gen İfadesi Sonuçları	87
4.4.1. 48 saat BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PC-3 ve PNT1A Hücrelerinde ER Stresi ile İlişkili Genlerin Gen İfadesi Sonuçları.....	87
4.4.2. 96 saat BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PNT1A Hücrelerinde Gen İfadesi Sonuçları	97
4.4.3. 48 saat BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PC-3 ve PNT1A Hücrelerinde Apoptoz ile İlişkili Genlerin Gen İfadesi Sonuçları	99
4.5. Protein Miktar Tayini Sonuçları.....	106
4.6. Western Blot Tekniği ile CHOP Proteininin Ekspresyon Sonuçları	106
5. TARTIŞMA	109

KAYNAKLAR	122
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	146
ÖZGEÇMİŞ	147



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: BPA'nın genel özellikleri	6
Tablo 2-2: BPF'nin genel özellikleri.....	8
Tablo 2-3: BPS'nin genel özellikleri.....	8
Tablo 3-1: Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile tayininde kullanılan primer dizileri.....	61
Tablo 3-2: RT-PCR protokolü.	63
Tablo 4-1: 31,25-1000 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde MTT testi % ölüm ve standart sapma değerleri.....	70
Tablo 4-2: 250-1000 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPF maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde MTT testi % ölüm ve standart sapma değerleri.....	71
Tablo 4-3: 31,25-1000 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde MTT testi % ölüm ve standart sapma değerleri.....	73
Tablo 4-4: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde % hücre proliferasyonu ve standart sapma değerleri.....	75
Tablo 4-5: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde % hücre proliferasyonu ve standart sapma değerleri.....	76
Tablo 4-6: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde % MFI ve standart sapma değerleri.....	78
Tablo 4-7: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde % MFI ve standart sapma değerleri.....	79
Tablo 4-8: BPA, BPF ve BPS'nin PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri.....	80
Tablo 4-9: BPA, BPF ve BPS'nin PNT1A hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri.....	81
Tablo 4-10: BPA, BPF ve BPS'nin PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri.....	83

Tablo 4-11: BPA, BPF ve BPS'nin PNT1A hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri.....	84
Tablo 4-12: 0-10 μ M Konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrasında PC-3 hücrelerinden izole edilen RNA'ların miktar ve saflıkları.	85
Tablo 4-13: 0-10 μ M Konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrasında PNT1A hücrelerinden izole edilen RNA'ların miktar ve saflıkları.	86



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: BPA, DES ve β -östradiol'ün kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2-2: Bazı bisfenol analoglarının kimyasal yapıları.....	7
Şekil 2-3: BPA'nın memeli canlılardaki biyotransformasyon yolları	13
Şekil 2-4: BPF metabolizmasının şematik gösterimi	15
Şekil 2-5: BPS metabolizmasının şematik gösterimi	16
Şekil 2-6: Ubikitin-Proteazom Sistemi (UPS)'nin genel gösterimi	27
Şekil 2-7: Katlanmamış Protein Cevabının (UPR) yanıt kategorilerinin gösterimi (Oslowski ve Urano, 2011).....	29
Şekil 2-8: UPR'nin üç sinyal dönüştürücü ailesinin (ATF6, PERK ve IRE1) gösterimi (Walter ve Ron, 2011).....	32
Şekil 2-9: Prostat kanserinde UPR sinyal yolağının şematik gösterimi	36
Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikropalakaya hücre ekimi.....	47
Şekil3-2: BPA, BPF ve BPS'nin 1/2 oranında seyreltilmesi.	49
Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikropalakalarının düzeni.....	51
Şekil 3-4: FSC/SSC grafiğinde hücre kapılanmasının gösterimi.....	57
Şekil 3-5: Nokta alan grafiği.....	58
Şekil 3-6: Flowsitometride apoptoz tayini için elde edilen grafiğin şematik gösterimi.....	58
Şekil 4-1: PC-3 hücrelerine 48 saat 31,25-1000 μ M konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonucu MTT testi sonuçları.	72
Şekil 4-2: PNT1A hücrelerine 48 saat 31,25-1000 μ M konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonucu MTT testi sonuçları.	74
Şekil 4-3: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde % hücre proleferasyonu (kontrole göre kıyasla) üzerine etkisi.....	75

Şekil 4-4: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde % hücre proleferasyonu (kontrole göre kıyasla) üzerine etkisi.	76
Şekil 4-5: PNT1A hücrelerinin SSC-H/FSC-H kanalında dağılımı.	77
Şekil 4-6: PC-3 hücrelerinin SSC-H/FSC-H kanalında dağılımı.	77
Şekil 4-7: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde %ortalama floresans şiddetine (%MFI, kontrole karşı) etkisi.....	78
Şekil 4-8: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde %ortalama floresans şiddetine (%MFI, kontrole karşı) etkisi.	79
Şekil 4-9: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde % geç apoptoz oranı (kontrole kıyasla).	81
Şekil 4-10: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde % geç apoptoz oranı (kontrole kıyasla).	82
Şekil 4-11: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde % erken apoptoz oranı (kontrole kıyasla).	83
Şekil 4-12: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde % erken apoptoz oranı (kontrole kıyasla).	84
Şekil 4-13: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>PERK</i> geni relatif ekspresyonu.	88
Şekil 4-14: PNT1A hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>PERK</i> geni relatif ekspresyonu.	88
Şekil 4-15: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>GRP78</i> geni relatif ekspresyonu.	89
Şekil 4-16: PNT1A hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>GRP78</i> geni relatif ekspresyonu.	89
Şekil 4-17: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>ATF4</i> geni relatif ekspresyonu.	90
Şekil 4-18: PNT1A hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>ATF4</i> geni relatif ekspresyonu.	91

Şekil 4-19: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>eIF2α</i> geni relatif ekspresyonu.	92
Şekil 4-20: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>eIF2α</i> geni relatif ekspresyonu.	92
Şekil 4-21: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>CHOP</i> geni relatif ekspresyonu.	93
Şekil 4-22: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>CHOP</i> geni relatif ekspresyonu.	94
Şekil 4-23: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>IRE1α</i> geni relatif ekspresyonu.	95
Şekil 4-24: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>IRE1α</i> geni relatif ekspresyonu.	95
Şekil 4-25: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>ATF6</i> geni relatif ekspresyonu.	96
Şekil 4-26: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>ATF6</i> geni relatif ekspresyonu.	97
Şekil 4-27: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 96 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>ATF4</i> , <i>PERK</i> , <i>IRE1α</i> , <i>CHOP</i> , <i>eIF2α</i> ve <i>GRP78</i> genlerinin relatif ekspresyonu.	98
Şekil 4-28: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>BAX</i> geni relatif ekspresyonu.	99
Şekil 4-29: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>BAX</i> geni relatif ekspresyonu.	100
Şekil 4-30: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>BCL-2</i> geni relatif ekspresyonu.	101
Şekil 4-31: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>BCL-2</i> geni relatif ekspresyonu.	101

Şekil 4-32: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>XIAP</i> geni relatif ekspresyonu.	102
Şekil 4-33: PNT1A hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>XIAP</i> geni relatif ekspresyonu.	103
Şekil 4-34: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>AIF</i> geni relatif ekspresyonu.	104
Şekil 4-35: PNT1A hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>AIF</i> geni relatif ekspresyonu.	104
Şekil 4-36: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin <i>KASPAZ-9</i> geni relatif ekspresyonu.	105
Şekil 4-37: PC-3 hücrelerinde protein örneklerinin ölçümünde kullanılan protein standart ölçü eğrisi.	106
Şekil 4-38: PNT1A hücrelerinde protein örneklerinin ölçümünde kullanılan protein standart ölçü eğrisi.	106
Şekil 4-39: 48 saat 1-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde CHOP proteini western blot membran görüntüleri.	107
Şekil 4-40: 48 saat 1-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde CHOP protein ekspresyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.	107
Şekil 4-41: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde CHOP proteini western blot membran görüntüleri.	108
Şekil 4-42: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde CHOP protein ekspresyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.	108

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μm	Mikrometre
A.B.D.	Amerika Birleşik Devletleri
Actb	β -aktin geni
Annexin V	İnsan vasküler antikoagülan protein 5
AR	Androjen reseptörü
ASK1	Apoptoz-sinyali düzenleyen kinaz
ATCC	Amerikan hücre kültür bankası ('American Type Culture Collection')
ATF6	Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
ATP	Adenozin trifosfat
BiP	İmmunoglobulin ağır zincir bağlama proteini
BPA	Bisfenol A
BPF	Bisfenol F
BPS	Bisfenol S
BSA	Sığır serum albümini
b-ZIP	Lösün fermuarı
CHOP	C/EBP (CCAAT-arttırıcı-bağlayıcı protein) homolog protein
CMF-PBS	Kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi
CO_2	Karbondioksit
DCFDA	Diklorofloresan diasetat
DDIT3	DNA hasarı ile indüklenbilir transkript 3

DES	Dietilstilbestrol
DMEM/F12	Dulbecco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri/F12
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DUB	Deubikitinasyon inositol gerektiren enzim 1
EC ₅₀	Kimyasalın en etkili olduğu konsantrasyonun yarısı
ECHA	Avrupa Kimyasallar Ajansı
EDC	Endokrin bozucu kimyasallar
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
Eif2 α	Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α
ER	Endoplazmik retikulum
ER	Endoplazmik retikulum
ERAD I	Ubikitin-proteozom aracılı ERAD
ERAD II	Otofaji yoluyla lizozom-aracılı ERAD
ERAD	ER ile ilişkili protein degradasyonu
ERK	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar
ERSE	ER stres cevap elementi
ER α	Östrojen reseptör alfa
ER β	Östrojen reseptör beta
FBS	Fetal sığır serumu
FITC	Floresan izotiyosiyanat
GADD153	DNA hasarı ile indüklenen gen 153
GRP78	Glukoz-regüle edici protein 78
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat

HSPA5	Isı şok proteini 5
IARC	Uluslararası Kanseri Araştırma Enstitüsü
IC ₅₀	%50 İnhibisyon konsantrasyonu
IgG	İmmünglobulin G
IRE1	İnositol gerektiren enzim 1
JNK	JUN proto-onkogeni tarafından kodlanan -N-teminal protein kinaz
JUN	Proto-onkogen
kg	Kilogram
LD ₅₀	Medyan letal doz
M	Molar
MCF-7	İnsan meme kanseri hücresi
MDZ	Mitokondriyal dış zar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
NOAEL	Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen değer('No observed adverse effect level')
O ₂	Oksijen
OD	Optik dansite
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi

PC-3	İnsan prostat kanser hücresi
PCa	Prostat kanseri
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PERK	Protein kinaz R (PKR)-benzeri ER kinaz
PNT1A	İnsan normal prostat hücresi
PVC	Polivinil klorür
REACH	Kimyasalların kaydı, değerlendirilmesi, izni ve kısıtlanması
RER	Granüllü endoplazmik retikulum
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki dönüş
RPMI 1640	Roswell park memorial institute medium
RT-PCR	Gerçek zamanlı termal döngü cihazı ('Real-Time PCR')
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SER	Düz endoplazmik retikulum
SULT	Sülfotransferaz
sXBP-1	Aktif transkripsiyon faktörü
SYBR® Green	Yeşil asimetrik siyanin boyası
TBST	Tuzlu ve Tween 20'li tris tamponu
TDI	Tolare edilebilir günlük alım miktarı ('Tolerable daily intake')
TNF	Tümör nekroz faktör
TRAF2	Tümör nekroz faktör (TNF)-reseptör-iliskili faktör 2
t-TDI	Geçici tolare edilebilir günlük alım miktarı ('Temporary tolerable daily intake')
TUNEL	TdT aracılı dUTP çentik uç etiketleme

UGT2B15	UDP-glukuronosiltransferaz 2B15
UPR	Katlanmamış Protein Cevabı
UPR	Katlanmamış protein cevabı
UPRE	Hedef genlerin UPR elementi
UPS	Ubikitin-Proteazom Sistemi
UV	Ultraviyole (Mor ötesi)
XBP-1	X-kutusunda bağlanan protein 1



ÖZET

Çağlayan, M. (2020). Bisfenol A ve Analoglarının Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Hücre Kültüründe İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bisfenol A (BPA) ve analogları olan bisfenol F (BPF) ve bisfenol S (BPS), günlük hayatta kullanılan pek çok üründe bulunması ve suları kontamine etmesinden dolayı, özellikle insan sağlığı açısından yüksek risk oluşturan kimyasalardır. Doktora tez çalışmasında, BPA, BPF ve BPS'nin endoplazmik retikulum (ER) stresi üzerine toksik etkileri insan prostat kanseri (PC-3) ve insan normal prostat (PNT1A) hücrelerinde incelenerek ER stres yolları ile muhtemel ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Tez çalışmasında, BPA, BPF ve BPS için MTT testi sonuçlarına göre IC₅₀ değerleri, 48 saatlik maruziyet sonrası, sırasıyla, PC-3 hücrelerinde; 157,66 µM, 510,17 µM ve 519,61 µM ve PNT1A hücrelerinde; 101,05 µM, 485,5 µM ve 659,24 µM olarak tespit edildi. BrdU testi ile belirlenen hücre proliferasyonunda, 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrasında, kontrole kıyasla, PC-3 hücrelerinde, 1-10 µM konsantrasyonlarda, %10-41,85 oranlarında anlamlı artış gözlenirken; PNT1A hücrelerinde yalnızca 10 µM BPA maruziyeti sonrası %29,7 oranında anlamlı azalma gözlemlendi. ROS oluşumunda ise; BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrasında kontrole kıyasla, PC-3 ve PNT1A hücrelerinde anlamlı olmayan değişiklikler gözlemlendi. 0,1-10 µM 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrası, PC-3 hücrelerinde, geç apoptozda %16,2-22,14; PNT1A hücrelerinde ise geç apoptozda %21,27 oranında, kontrole kıyasla anlamlı farklılıklar gözlemlendi. 1-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin hem PC-3 hem de PNT1A hücrelerinde, ER stresi ile ilişkili genlerin (*PERK*, *eIF2α*, *IRE1α*, *CHOP*, *GRP78*, *ATF4*, *ATF6*) ve apoptozda rol oynayan genlerin (*BAX*, *BCL-2*, *XIAP*, *AIF*, *KASP-9*) ekspresyon seviyelerini önemli derecede değiştirdiği gösterildi. Ayrıca, 1-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin western blot tekniği ile CHOP proteini üzerinde anlamlı değişikliklere neden olduğu da görüldü. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, BPA ve analoglarının hücresel stres ve apoptotik mekanizmalar üzerinden toksik etki gösterebileceği, BPA'nın BPF ve BPS'ye göre daha etkili olabileceği öne sürülmekte olup; bu çalışmanın endokrin bozucu maddelerin ER stress mekanizmaları üzerine etkileri konusunda literatüre katkı sağlaması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bisfenol A, Bisfenol F, Bisfenol S, Endoplazmik retikulum stresi, PC-3 hücreleri, PNT1A hücreleri.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-31614.

ABSTRACT

Caglayan, M. (2021). Investigation of the Effects of Bisphenol A and Its Analogs on Endoplasmic Reticulum Stress in Cell Culture. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Doctorate Thesis. İstanbul.

Bisphenol A (BPA) and its analogs bisphenol F (BPF) and bisphenol S (BPS) are endocrine disrupting chemicals widely used in industry. It has high risks, especially for human health, because it is found in many products used in daily life and contaminates water. In doctorate thesis, the toxicological effects of BPA, BPF and BPS on endoplasmic reticulum (ER) stress and their possible relationship with ER stress pathways have been investigated in PC-3 and PNT1A cells. In PC-3 cells, IC₅₀ values were determined for BPA, BPF and BPS respectively; 157,66 µM, 510,17µM and 519,6 µM after 48 h of exposure; in PNT1A cells, the IC₅₀ values were determined for BPA, BPF and BPS respectively; 101,05 µM, 485,5 µM and 659,24 µM after 48 h of exposure. In the cell proliferation determined by BrdU test, after 48 h of exposure to BPA, BPF and BPS at 1-10 µM concentrations, a significant increase was observed in PC-3 cells at the rate of 10-41,85%; a significant decrease of 29,7% was determined in PNT1A cells after only 10 µM BPA exposure. In ROS formation, non-significant changes were observed in PNT1A and PC-3 cells compared to control. In addition, after 48 h of exposure to 0,1-10 µM BPA, BPF and BPS, significant differences were observed in PC-3 cells; 16,2-22,14% in late apoptosis; significant differences were observed in PNT1A cells, 21,27% in late apoptosis compared to the control. Furthermore, exposure to BPA, BPF and BPS at 1-10 µM concentrations, in both PC-3 and PNT1A cells have shown significant alterations of expression levels in the ER stress-related genes (*PERK*, *EIF2α*, *IRE1α*, *CHOP*, *GRP78*, *ATF4*, *ATF6*) and genes involved in apoptosis (*BAX*, *BCL-2*, *XIAP*, *AIF*, *CASPASE-9*). In addition, exposure to BPA, BPF and BPS at concentrations of 1-10 µM was found to cause significant changes on CHOP protein by western blot technique. According to the results obtained from the thesis study, it is suggested that BPA and its analogs may have toxic effects through cellular stress and apoptotic mechanisms, and BPA may be more effective than BPF and BPS; it is expected that results from this thesis will contribute to the literature on the effects of endocrine disruptors on ER stress mechanisms.

Key Words: Bisphenol A, Bisphenol F, Bisphenol S, Endoplasmic reticulum stress, PC-3 cells, PNT1A cells.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: TDK-2018-31614.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endokrin bozucu kimyasallar (EDC), homeostazın, üremenin, gelişimin ve/veya davranışın korunmasından sorumlu vücuttaki doğal hormonların sentezine, salgılanmasına, taşınmasına, bağlanmasına veya ortadan kaldırılmasına etki eden, doğal ya da sentetik maddeler veya kimyasal karışımlardır (Kavlock ve diğerleri, 1996; Choi ve Jeung, 2003; Kabir ve ark., 2015). Bir EDC prototipi olan BPA, 1950'lerden itibaren sentetik monomer olarak endüstride polikarbonat plastik ve epoksi reçinesinin üretiminde kullanılırken, termal kağıtlarda ve karbonsuz kopya kağıdında, gözlük lenslerinde, cep telefonlarında, medikal malzemelerde, CD ve DVD'lerde, yiyecek ve içecek kutularının iç kaplamalarında, bilgisayarlarda, toz boyalarda, güvenlik kasklarında, kurşun geçirmez malzemelerde, PVC pencerelerde, otomobil parçalarında, koruyucu giysilerde, polikarbonat şişeler ve kaplarda), elektrik malzemeleri ve elektronik parçaların kaplamalarında, yapışkanlarda ve diş dolgu malzemelerinde bulunabilen BPA özellikle insan sağlığında yüksek risk oluşturduğu düşünülmektedir (Ho ve ark., 2017; Olea ve ark., 1996; Wolstenholme ve ark., 2011). BPA günümüzde Avrupa Birliği (AB) CLP¹ Tüzüğü (Yönetmelik 2016/1179) kapsamında üreme toksik madde kategorisi 1B grubunda² sınıflandırılmaktadır ve bebekler ve çocuklar için çok sayıda tüketici ürünüde de kullanımı kısıtlanmıştır (Avrupa Birliği Yönetmeliği, 2016). Ayrıca BPA, 2016 yılında REACH (Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzni ve Kısıtlanması) ek XVII kısıtlı maddeler listesine de eklenmiştir (Avrupa Birliği Yönetmeliği, 2016). Ne yazık ki, bu düzenlemeler BPA ile benzer toksisiteye sahip olabilecek diğer bisfenol analoglarının artan bir şekilde BPA yerine kullanılması ile sonuçlanmıştır. Bu kimyasallar endüstriyel uygulamalarda BPA yerine kullanılan BPS(4,4'-sülfonilbisfenol) veya BPF (4,4'-dihidroksidifenil-metan) gibi bisfenol analoglarını içermektedir (Bousoumah ve ark., 2021).

¹ Maddelerin ve Karışımların Sınıflandırılması, Etiketlenmesi ve Ambalajlanmasına ilişkin AB Tüzüğü'nün İngilizce adının kısaltmasıdır.

² Büyük ölçüde hayvanlar üzerindeki deney verilerine dayanarak, insanlar için CMR (karsinojen, mutajenik ve reprotoksik maddeler) potansiyeline sahip olduğu tahmin edilen gruptur.

Sonuç olarak, BPA kullanımına alternatifler geliştirilmekte ve bu alternatifler giderek BPA'nın yerini almaktadır. BPS, termal kağıtta, pestisitlerde, boyar maddelerde, renk atmayan maddelerde, deri tabaklama maddelerinde, boya dağıtıcılarda, elyaf geliştiricilerde, elektrokaplama ve temizlik ürünlerinde kimyasal katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Gramec Skledar ve ark., 2015; Rochester ve Bolden, 2015). BPS'nin BPA'dan daha az biyolojik olarak parçalanabilir olduğu bilindiğinden, BPS'nin yaygın kullanımının endişe verici olduğu düşünülmektedir (Danzl ve ark., 2009; Ike ve ark., 2006). BPF ise; çoğunlukla epoksi resinlerin üretiminde ve su tankları, su boruları, endüstriyel zeminler, yol ve köprü güverte döşemeleri, yapıştırıcılar, vernikler ve harçlar gibi kaplama ürünleri, diş dolgu materyalleri ve gıda ambalajlarında kullanılmaktadır (Gramec Skledar ve ark., 2015; Rochester ve Bolden, 2015). Ayrıca, posta zarfları, uçak biletleri, gıda ürünleri (süt ürünleri, et ve et ürünleri, sebzeler, konserve gıdalar), kişisel bakım ürünleri (vücut yıkama, saç bakım ürünleri, makyaj, losyonlar, diş macunu), kağıt ürünleri (para, el ilanı, bilet, vb.) gibi günlük yaşamda kullanılan pek çok üründe BPS ve BPF tespit edilmiştir (Rochester ve Bolden, 2015). BPA'nın plastik taşıyıcılardan gıda, içecekler ve çevreye sürekli salınımı insanların bu kimyasala maruziyetine sebep olmakta ve bu nedenle BPA'nın insan sağlığında yüksek risk oluşturabileceği belirtilmektedir (Brotons ve ark., 1995; Vandenberg ve ark., 2007). BPF ve BPS için ise; farklı çevresel ortamlardaki seviyelerinde ciddi artışlar gözlemlendiğinden bir çok çalışmada sağlık riskleri değerlendirilmektedir (Catenza ve ark., 2021).

Yapılan çalışmalarda, BPF ve BPS'nin de dahil olduğu BPA analoglarının yüzey sularında oldukça önemli bir kirletici olduğu (Yamazaki ve ark., 2015) ve BPA ile kıyaslandığında BPF ve BPS'nin çevresel degradasyona daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Liao ve ark., 2012b). Bununla birlikte, BPF ve BPS'nin farmakokinetik mekanizmalar açısından BPA ile benzer özelliklere sahip olmaları nedeniyle akut ve kronik toksik etkilerinin de benzer olabileceği düşünülmektedir (Chen ve ark., 2002; Eladak ve ark., 2015; Liao ve ark., 2012b).

Son yıllarda BPA'nın başta üreme bozuklukları olmak üzere, obezite, diyabet, kardiyovasküler bozukluklar, doğum anomalileri, kronik solunum ve böbrek bozuklukları ve meme kanseri gibi birçok kronik hastalığın etiyolojisinde rolünün

olabileceği üzerinde durulmaktadır (Rezg ve ark., 2014). BPA ve analoglarının östrojenik ve anti-androjenik etkilerine ek olarak anti-östrojenik ve androjenik etkileri de rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2016). Stossi ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışma ile BPA analoglarının östrojen reseptör beta ($ER\beta$) antagonisti gibi davranarak $ER\beta$ 'ya östrojen reseptör alfa ($ER\alpha$)'dan daha fazla afinite gösterdiğini ve kullanılan kimyasalın en etkili olduğu konsantrasyonun yarısı (EC_{50}) değerlerinin BPA'dan daha düşük olduğunu ve bu analogların $ER\alpha$ 'ya daha fazla agonist ya da antagonist olarak hareket ettiklerini göstermişlerdir (Stossi ve ark., 2014). BPF'nin anti-östrojenik etkilerine bakıldığında insan meme adenokarsinoma (MCF-7) hücrelerinde endojen östrojen hormonu olan 17β -östradiol ile ER 'ye bağlanmak için yarıştığı rapor edilirken (Stroheker ve ark., 2004); tersine BPS'in ise zayıf bir insan androjen reseptörü (hAR) agonisti olarak hareket ettiği rapor edilmiştir (Molina-Molina ve ark., 2013). Elde edilen bu veriler doğrultusunda, BPF ve BPS'nin akut ve kronik toksik etkileri ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir; ancak bu maddelerin toksisiteleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Lee et al., 2013). Ayrıca, yapılan çalışmalar, ER stresi ile ilişkili yolların, BPA kaynaklı erkek üreme toksisitesinde hayati bir rol oynadığını göstermiştir (Yin ve ark., 2017). BPA analoglarının BPA ile benzer endokrin etkilere sahip olması nedeniyle BPA analoglarına maruziyet sonucu üreme sisteminde meydana gelen olumsuz etkilerin, BPA maruziyeti sonucu meydana gelen olumsuz etkilere benzer olabileceği düşünülmektedir (Siracusa ve ark., 2018). Üreme sistemi ile ER stresi arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalara bakıldığında, bazı üreme sistemi doku kanserlerinde UPR sinyal proteinleri ATF6, PERK ve IRE ve GRP78 gibi ER stres şaperonlarında, *in situ* seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu artışın, ER homeostazisine rol oynayan ER protein bağlama kapasitesinin yanı sıra bağlanmamış ya da yanlış bağlanmış proteinleri degrade etmek için artan otofajik aktivite yoluyla, kanser hücrelerinin stres koşullarına spesifik bir adaptasyon geliştirerek ER stresini arttırabileceği düşünülmektedir (Guzel ve ark., 2017).

Bisfenol analoglarının üretim ve uygulamalarının arttığı ve birçoğunun zaten çevrede, gıdalarda ve insan vücudunda mevcut olduğu göz önüne alındığında, bilgi boşluklarını doldurmak ve toksisite değerlendirmelerini derinleştirmek için araştırmalara ihtiyaç vardır. Tez çalışmasında; BPA ve BPA'ya getirilen yasal düzenlemelerden dolayı BPA yerine oldukça sık kullanılan ve toksisite mekanizması

hakkında verilerin sınırlı olduğu BPF ve BPS'nin endokrin bozucu etkileri göz önünde bulundurulduğunda toksik etkileri *in vitro* yöntemler kullanılarak aydınlatılması amaçlanmıştır. Kimyasalların risk değerlendirilmesinde *in vivo* yaklaşımların yanı sıra *in vitro* alternatif yöntemlerin de geliştirilmesine oldukça ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla; üreme sistemi ile ilişkili insan normal prostat hücrelerinde (PNT1A) ve insan prostat kanser hücrelerinde (PC-3), BPA, BPF ve BPS'nin, ER stresi üzerine etkileri araştırılacaktır. Ayrıca, BPA'nın da bu mekanizmalar üzerine etkileri araştırılacağından dolayı, BPS ve BPF'nin toksisitelerinin BPA ile kıyaslanması da sağlanmış olacaktır. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, BPA ve analoglarının hücresel stres ve apoptotik mekanizmalar üzerinden toksik etki gösterebileceği, BPA'nın BPF ve BPS'ye göre daha güçlü etkiler gösterebileceği öne sürülmekte olup; bu çalışmanın endokrin bozucu maddelerin ER stress mekanizmaları üzerine etkileri konusundan literatüre katkı sağlaması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bisfenol A (BPA)

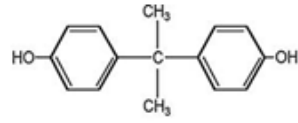
1950'lerden itibaren endüstride polikarbonat plastik ve epoksi reçinesinin üretiminde sentetik monomer olarak kullanılan BPA, endokrin bozucu özelliğinden dolayı özellikle insan sağlığı açısından yüksek risk oluşturmaktadır (Wolstenholme ve ark., 2011). BPA'nın yüksek üretim hacmi, plastiklerin yaygın kullanımı ve sağlık açısından yan etkileri nedeniyle bilimsel çevreler, düzenleyici otoriteler ve halkın dikkatini çekmektedir (Halden, 2010).

2.1.1. BPA'nın Kimyasal Yapısı

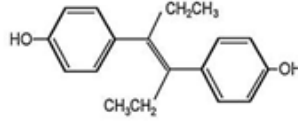
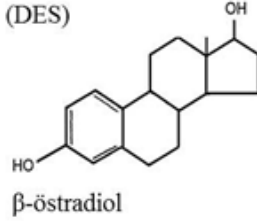
BPA [2,2-bis (4-hidroksifenil) propan] iki molekül fenolün bir molekül aseton ile düşük pH'da ve basınçta ve yüksek sıcaklıkta kondensasyonu ile elde edilen bir bileşiktir. 1891 yılında Kimyager A. P. Dianin tarafından ilk defa sentezi gerçekleştirilmiştir (Lintelmann ve ark., 2003). Sanayide birçok amaçla üretilen ürünlerde hammadde olarak kullanılmaktadır. BPA, doymamış iki fenol halka içermesi bakımından güçlü sentetik östrojen olarak bilinen dietilstilbestrol³ (DES)'e benzer kimyasal yapıya sahiptir. Ancak endojen östrojen hormonu olan 17 β -östradiol⁴ ile kimyasal yapıları karşılaştırıldığında aralarında hiçbir benzerlik olmadığı görülmektedir (Gaido ve ark., 1997). Şekil 2-1'de BPA, DES ve β -östradiol'ün kimyasal yapısı gösterilmiştir.

³ Steroid olmayan bir yapay östrojendir.

⁴ Östrojenik bir steroid hormondur.



Bisfenol A

Dietilstilbestrol
(DES) β -östradiol**Şekil 2-1: BPA, DES ve β -östradiol'ün kimyasal yapısı.****2.1.2. BPA'nın Fizikokimyasal Özellikleri**

BPA'nın fizikokimyasal özellikleri Tablo 2-1'de verilmiştir.

Tablo 2-1: BPA'nın genel özellikleri

(Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu, 2014)

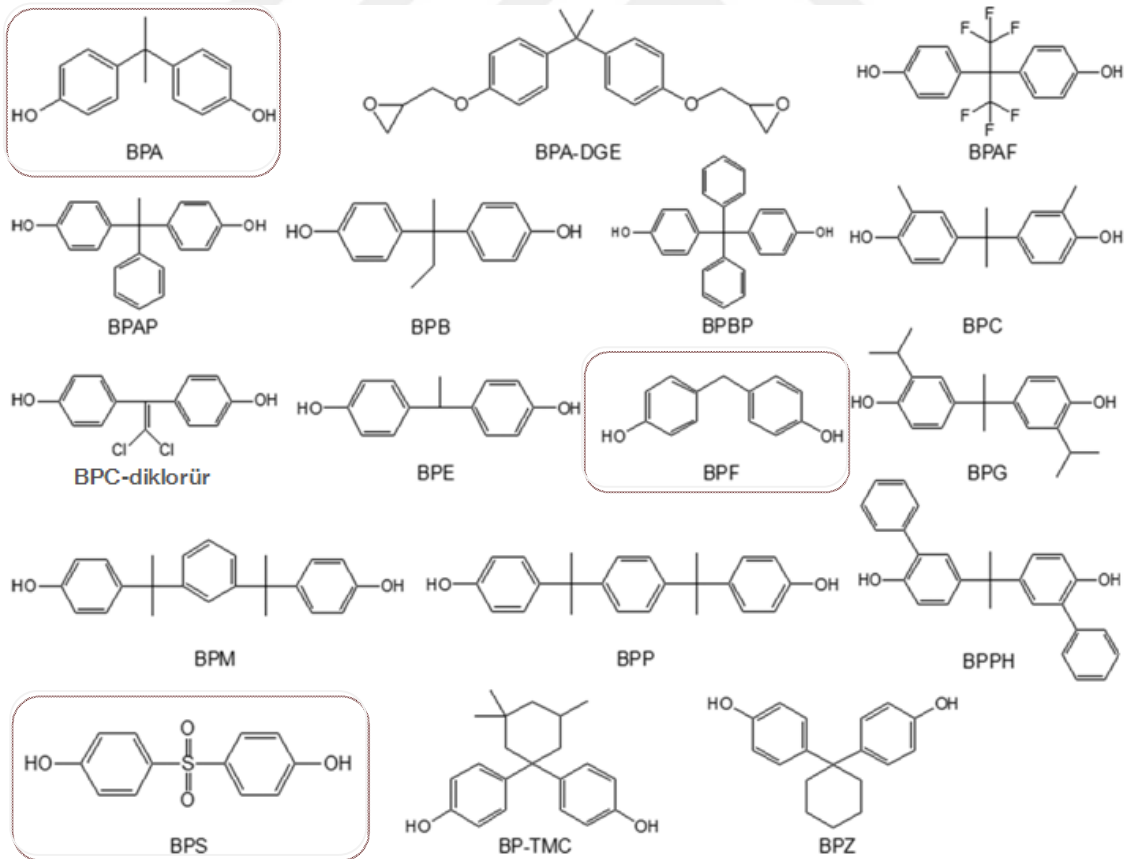
Genel Adı	Bisfenol A
IUPAC adlandırması	2,2-bis(4-hidroksifenil)propan
CAS numarası	80-05-7
Endeks numarası	604-030-00-0
Görünüş	Fiziksel hal: kristal; Renk: bej
Koku	Kokusuz
Kimyasal formülü	$C_{15}H_{16}O_2$
Yapısal formülü	$(CH_3)_2-C(C_6H_4-OH)_2$
Moleküler ağırlığı	228,9 g/mol
Erime sıcaklığı	158-159°C-lit
Donma sıcaklığı	-156,5°C
Kaynama sıcaklığı	220°C (0,5 kPa)
Su içerisindeki çözünürlüğü	25°C'de 0,298 g/L
Uçuculuğu	193°C (1 atm basınçta)
Sudaki çözünürlüğü (25°C)	120 mg/L
Bağıl yoğunluk (su=1)	1,2 g/L

BPA hem asit hem de alkaliyle katalizlenebilen reaksiyon sonucu oluşsa da yan ürün miktarının ve sayısının minimuma indirilmesi için endüstriyel üretimde asitle

(hidroklorik asit) katalizleme tercih edilmektedir. Reaksiyon sonucu, daha düşük saflıkta ve epoksi reçine imalatında kullanılan BPA ve yüksek saflıkta ve polikarbonat imalatında kullanılan BPA olmak üzere iki farklı kalitede ürün oluşmaktadır (Yıldız, 2009).

2.2. BPA Analogları ve Kimyasal Yapıları

BPA'ya yapısal olarak benzeyen bir takım kimyasallar, halihazırda polikarbonat plastiklerin ve epoksi reçinelerinin imalatında kullanılmaktadır. Bu kimyasallar, iki hidroksifenilin ortak bir yapısını paylaşır ve toplu olarak bisfenol ya da BPA analogları olarak adlandırılır (Chen ve ark., 2016; Hoekstra ve Simoneau 2013; Liao ve Kannan, 2013). Endüstriyel uygulamalarda kullanılan toplam 16 bisfenol analoğu belgelenmiştir (Chen ve ark., 2016). Bu alternatif analoglar arasında BPS geniş çapta endüstriyel ve ticari kullanımı amacıyla piyasaya sürülmüştür (Changkhamchom ve Sirivat, 2010; Zhou, 2018).



Şekil 2-2: Bazı bisfenol analoglarının kimyasal yapıları

BPA: 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan; BPA-DGE: 4,4'-izopropilidenedifenol diglisidil eter; BPAF: 4,4'-(heksafloroizopropiliden) difenol; BPAP : 4,4'-(1-feniletiden) bisfenol; BPB : 2,2-bis (4-hidroksifenil) bütan; BPBP: bis (4-hidroksifenil) difenilmetan; BPC: 2,2-bis (4-hidroksi-3-metilfenil) propan; BPC-diklorür: 1,1-dikloro-

2,2-bis (4-hidroksifenil) etilen; BPE: 4,4'-etilidenbisfenol; BPF: 4,4'-metilendifenol; BPG: 2,2-bis (4-hidroksi-3-izopropilfenil) propan; BPM: 4,4' - (1,3-fenilendiizopropiliden) bisfenol; BPP: 4,4' - (1,4-fenilendiizopropiliden) bisfenol; BPPH: 2,2-bis (2-hidroksi-5-bifenilil) propan; BPS: 4-hidroksifenil sülfon; BP-TMC: 1,1-bis (4-hidroksifenil) -3,3,5-trimetilsikloheksan; BPZ: 4,4'-sikloheksilidenebisfenol.

2.3. BPF ve BPS'nin Fizikokimyasal Özellikleri

BPF'nin fizikokimyasal özellikleri Tablo 2-2'de verilmiştir.

Tablo 2-2: BPF'nin genel özellikleri

(Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu, 2014).

Genel Adı	Bisfenol F
IUPAC adlandırması	Bis(4-hydroxyphenyl)methane
CAS numarası	620-92-8
Endeks numarası	210-658-2
Görünüş	Fiziksel hali: kristal Renk: açık kırmızı
Koku	Uygun veri yoktur
Kimyasal formülü	$C_{13}H_{12}O_2$
Yapısal formülü	$(CH_3)_2-C(C_6H_4-OH)_2$
Moleküler ağırlığı	200,23 g/mol
Erime sıcaklığı	162 - 164 °C - lit
Donma sıcaklığı	Uygun veri yoktur
Kaynama sıcaklığı	Uygun veri yoktur
Su içerisindeki çözünürlüğü	Uygun veri yoktur
Uçuculuğu	3.7×10^{-7}
Sudaki çözünürlüğü (25°C)	Uygun veri yoktur
Bağıl yoğunluk (su=1)	Uygun veri yoktur

BPS'nin fizikokimyasal özellikleri Tablo 2-3'te verilmiştir.

Tablo 2-3: BPS'nin genel özellikleri

(Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu, 2019).

Genel Adı	Bisfenol S
IUPAC adlandırması	4-(4-hydroxyphenyl)sulfonylphenol
CAS numarası	80-09-1
Endeks numarası	604-030-00-0
Görünüş	Fiziksel hal: toz; Renk: beyaz
Koku	Uygun veri yoktur
Kimyasal formülü	$C_{12}H_{10}O_4S$
Yapısal formülü	$(CH_3)_2-C(C_6H_4-OH)_2$
Moleküler ağırlığı	250.27 g/mol
Erime/Donma noktası	245 - 247 °C
Kaynama sıcaklığı	315 °C

Su içerisindeki çözünürlüğü	Çözünmez
Uçuculuğu	Uygun veri yoktur
Sudaki çözünürlüğü (25°C)	Uygun veri yoktur
Bağıl yoğunluk (su=1)	Uygun veri yoktur

BPA, BPF ve BPS'nin Kullanım Alanları

BPA, 1930'lu yıllarda Dodds ve Lawson tarafından sentetik östrojen olarak sentezlenmiş, ancak östrojenik etkinliğinin az olması nedeniyle kullanıma girmemiştir (Dodds ve Lawson, 1936; Vom Saal ve ark., 2004). 1950'li yıllarda polikarbonatların üretiminde kullanılmaya başlanmıştır. BPA dünya genelinde en fazla üretilen kimyasal maddelerden biridir. Yıllık üretimi, 2-3 milyon tonu aşmaktadır. BPA, gözlük lenslerinde, medikal malzemelerde, CD ve DVD'lerde, yiyecek ve içecek kutularının iç kaplamalarında, cep telefonlarında, bilgisayarlarda, termal faks kağıtlarında, güvenlik kasklarında, kurşun geçirmez malzemelerde, PVC pencerelerde, otomobil parçalarında, koruyucu giysilerde, toz boyalarda, polikarbonat şişeler ve kaplarda, elektrik malzemeleri ve elektronik parçaların kaplamalarında, diş dolgu malzemelerinde ve yapışkanlar gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Olea ve ark., 1996; Senyildiz, 2016).

BPA'nın üretimi ve kullanımıyla ilgili sıkı düzenlemeleri takiben, özellikle bebek ürünlerinde ve su damacalarında BPA'sız (BPA-free) plastik/polikarbonat kullanımına yönelilmesi ile (Sur ve ark., 2017), BPF ve BPS gibi bazı BPA analogları tüketici ürünlerinde BPA'ya alternatif olarak giderek daha fazla kullanılmaya başlanmıştır (Chen ve ark., 2016; Eladak ve ark., 2015).

BPS ilk olarak 1869 yılında bir boya çeşidi olarak sentez edilmişken 2000'li yıllarda ise tüketici ürünlerinde BPA'ya alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. BPS kullanımı ile ilgili bir düzenleme olmadığından BPS içeren veya BPS'nin sızdığı ürünleri belirlemek oldukça zordur (Wu ve ark., 2018). Buna ek olarak, BPS plastik ve termal kağıtların geri dönüşümünde özellikle de termal kağıtların geri dönüşümünde yegane kaynaktır (Wu ve ark., 2018). BPF, çoğunlukla epoksi resinlerin üretiminde ve su tankları, su boruları, endüstriyel zeminler, yol ve köprü güverte döşemeleri, yapıştırıcılar, vernikler ve harçlar gibi kaplama ürünleri, diş dolgu materyalleri ve gıda

ambalajlarında kullanılırken; BPS ise polikarbonat plastiklerin üretiminde monomer olarak, termal fatura kağıtları gibi ürünlerde, temizlik ürünlerinde ve elektrokaplama BPA yerine kullanılmaktadır (Gramec Skledar ve ark., 2014; Rochester ve Bolden, 2015). BPS ayrıca termal kağıtlarda renk verici olarak BPA'nın yerine kullanılan başlıca analoglardan biridir. Ayrıca, posta zarfları, uçak biletleri, gıda ürünleri (süt ürünleri, et ve et ürünleri, sebzeler, konserve gıdalar), kişisel bakım ürünleri (vücut yıkama, saç bakım ürünleri, makyaj, losyonlar, diş macunu), kağıt ürünleri (para, el ilanı, bilet, vb.) gibi günlük yaşamda kullanılan pek çok üründe BPF ve BPS tespit edilmiştir (Rochester ve Bolden, 2015).

2.4. BPA, BPF ve BPS'ye Maruziyet Yolları

İnsanlarda BPA'yamaruziyet, inhalasyon yoluyla (havanın ve tozların solunması) ve oral yolla (gıda maddelerinin tüketilmesi) mikropplastiklere düşük doz ve mikropplastik dışı kaynaklara hem düşük hem de yüksek doz maruz kalma sonucu meydana gelmektedir (Smith ve ark., 2018).

İnsanların BPA'ya maruziyetini değerlendirmek temel olarak kısa biyolojik yarı ömrü ve hızlı atılımı nedeniyle oldukça zordur. BPA, BPA-konjugatları olarak hızla atıldığından biyolojik izleme için matriks olarak yaygın olarak idrar kullanılmıştır (Geens ve ark., 2012). BPA maruziyetini değerlendirmek için toplam idrar (serbest ve faz II konjugatları) (Liao ve Kannan, 2013; Vandenberg ve ark., 2007), kan plazması, serum ve dokular değerlendirilirken; toplam üriner BPA'nın analizi standart yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Calafat ve ark., 2015). Bu nedenle, biyoizleme çalışmaları, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D) popülasyonlarının %90'ından fazlasında idrarda düşük konsantrasyonlarda BPA tespit ederek, yaygın ve günlük BPA maruziyetini göstermiştir (Becker ve ark., 2009; Calafat ve ark., 2008). İdrarda BPA konsantrasyonları, spesifik dokulardaki veya dahili seviyelerdeki biyoaktif konsantrasyonlar hakkında doğrudan bilgi vermediği veya maruz kalma yolları arasında ayırım yapmadığından, bazı çalışmalar, belirli koşullar altında diğer biyolojik matrislerdeki ölçümlerin de uygun olacağını öne sürmüştür (Stahlhut ve diğerleri, 2016).

BPA sucul ortamlara, endüstriyel atık su deşarjları, akarsular, katı atık sızıntıları ve atık su arıtma tesisi sızıntıları gibi farklı yollar ile ulaşabilir (Akhbarizadeh ve ark.,

2020). BPS çevrede diğer BPA analoglarından çok daha fazla bulunmaktadır (Wu ve ark., 2018). Yapılan çalışmalarda, BPS kapalı mekanlardaki tozlarda, nehir ve ırmak sularında, yüzey sularında, atık sularda, deniz dibi tortularında tespit edilmiştir (Lee ve ark., 2015; Liao ve ark., 2012a; Liao ve ark., 2012b; Song ve ark., 2014; Wang ve ark., 2015; Yamazaki ve ark., 2015; Yang ve ark., 2014; Yu ve ark., 2015). Japonya, Kore, Çin ve Hindistan'daki seçilmiş nehirlerden toplanan yüzey sularında çeşitli konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS'nin de dahil olduğu BPA analogları litrede 0,00054-0,00195 ppm⁵ düzeyinde belirlenmiştir. BPF'nin konsantrasyonları, Japonya, Kore ve Çin'den toplanan nehir ve deniz sularında BPA seviyelerinden 1-2 kat fazla bulunması, BPF'nin Güneydoğu Asya ülkeleri yüzey sularında oldukça önemli bir kirlenici olduğunu göstermektedir (Yamazaki ve ark., 2015). Japonya'da yapılan bir çalışmada ise, BPA yerine kullanılan BPF ve BPS'nin BPA ile kıyaslandığında çevresel degradasyona daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Liao ve ark., 2012b). Deniz ortamında BPA ve analoglarının varlığı, sucul organizmalar ve onları tüketen diğer organizmalar düşünüldüğünde letal ve subletal toksik etkileri nedeniyle endişe verici olmaktadır (Akhbarizadeh ve ark., 2020). Yapılan bir çalışmada, BPA'nın medyan letal konsantrasyonları (LC₅₀), sucul omurgasız canlılarda 960-2700 µg/L iken balıklarda 6800-17,900 µg/L konsantrasyonları arasında değiştiği gösterilmiştir (Akhbarizadeh ve ark., 2020). Her ne kadar tüketici ürünlerinde kullanılan BPS'yi yavaş yavaş kullanımdan kaldırmak kolay olsa da bahsi geçen tüm bu tüketici ürünleri, çevrede BPS için potansiyel kaynak olabilmektedir. Sızan BPS, hava, partikül/toz, toprak, su, tortu, biyota ve gıda maddelerine girebilmekte ve degrade olabilmektedir. Tüm bunların sonucunda ise çevredeki BPS kirliliğinde ve insanların BPS'ye maruz kalmalarında artış meydana gelmektedir (Wu ve ark., 2018).

2.5. BPA, BPF ve BPS'nin Toksikokinetiği

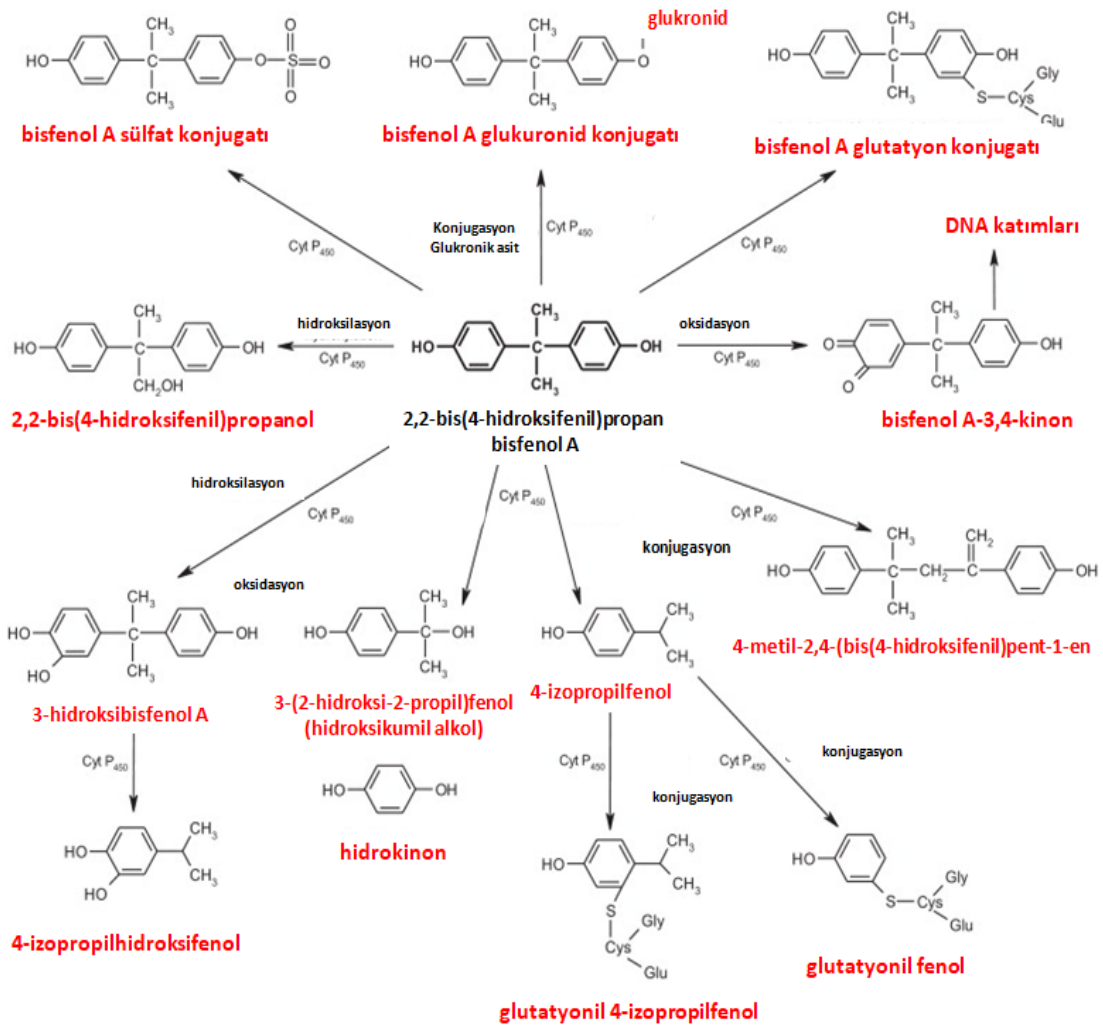
BPA insan vücuduna eses olarak oral yoldan girmektedir. Oral yolla maruziyetten sonra, BPA gastrointestinal sistem tarafından emilir ve karaciğere taşınır. Karaciğerde, BPA, omurgalılarda sitokrom P450 mikrozomal enzimler

⁵mg/L

tarafından katalize edilen oksidasyonreaksiyonları ile biyotransformasyona uğramaktadır(Vandenberg ve ark., 2007). Bu oksidatif metabolizma, bir dizi farklı metabolit oluşumna yol açar, burada en yaygın olanı, BPA'nın hidroksillenmiş formu BPA katekol (3-hidroksibisfenol A)'dür. BPA'nın faz I metabolizmasının metabolitlerinin, östrojenik özellik açısından bileşik ile benzer özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Kitamura ve ark., 2005; Nakamura ve ark. 2011). Oral olarak uygulanan bir BPA-C₁₄'ün biyotransformasyonu üzerine yapılançalışmada, hidroksillenmiş bir BPA metaboliti olan2,2-bis(4-hidroksifenil)propanol, BPA halkasının doğrudan hidroksilasyonu sırasında oluşan en önemli BPA metabolitlerinden biri olarak tespit edilirken; 3-hidroksibisfenol A (3-OH-BPA), 4-izopropilhidroksifenol (BPA'nın bölünmesiyle üretilen) ve BPA dimerleri gibi BPA metabolitleri de tespit edilmiştir (Michałowicz, 2014). BPA, faz II aşamasında, glukuronik asit ve sülfat ile konjuge edilerek hidrofilik inaktif BPA formlarına dönüştürülür.İnsanlarda BPA hızla glukuronidasyona uğrayıp esas olarak idrarla ve daha az safra ile atılırken, sıçanlarda ise BPA enterohepatik dolaşıma girmektedir (Provencher ve ark., 2014; Völkel ve ark., 2002;Ye ve ark., 2005). BPA'nın oral alındığındaki biyoyararlanımı, subkutan uygulanmasından sonraki biyoyararlanımından daha düşüktür (Almeida ve ark., 2018).Önemsiz miktarlarda BPA'nın (genellikle %1'in altında) konjuge olmadığı ve daha sonra atıldığı ve lipofilik olduğu için dokularda biriktiği de bulunmuştur (Kamrin, 2004). BPA'nın dağılımı insanlarda, yağ dokusu, karaciğer, beyin gibi hemen hemen tüm dokularda, ayrıca amniyotik sıvıda, göbek kordon kanında, fetal kanda ve fetal karaciğer dokusunda da tespit edilmiştir (Almeida ve ark., 2018). BPA'nın UDP-glukuronosiltransferaz 2B15 (UGT2B15) tarafından glukuronize edildiği ve bu enzimin genetik polimorfizmindeki farkın (altı alelik varyantının varlığının) BPA metabolizması üzerinde etkili olduğu ve dolayısıyla bu bileşiğin toksisitesini etkilediği bulunmuştur (Michałowicz, 2014).

BPA'nın reaktif bir metaboliti olan 3,4-kinon (BPA-kinon) peroksidaz varlığında DNA ile kovalent bağlar oluşturabilmektedir. Ayrıca, BPA-kinon tarafından oluşturulan DNA eklentilerinin genetik materyale zarar verdiği ve dolayısıyla BPA toksisitesindeki artıştan sorumlu olduğu ortaya konmuştur. Tüm bunlara ek olarak, BPA-kinon'un redoks reaksiyonlarına katılımı ve reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu nedeniyle canlı organizmalar üzerinde güçlü toksisite sergilediği kanıtlanmıştır

(Michałowicz, 2014). Kitamura ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2005), BPA'nın tersine, karaciğer mikrozomal enzimleri tarafından oluşturulan BPA metabolitleri, BPA katekol (5-hidroksi BPA), BPA ol (2,2-bis-(4-Hidroksifenil)-1-propanol) ve BPA karboksilik asit (2,2-bis-(4-hidroksifenil)-1-propiyonik asit)'in azalmış östrojenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Kitamura ve ark.,2005).



Şekil 2-3: BPA'nın memeli canlılardaki biyotransformasyon yolları

(*in vitro* ve *in vivo* çalışmalara dayanmaktadır, Michałowicz, 2014).

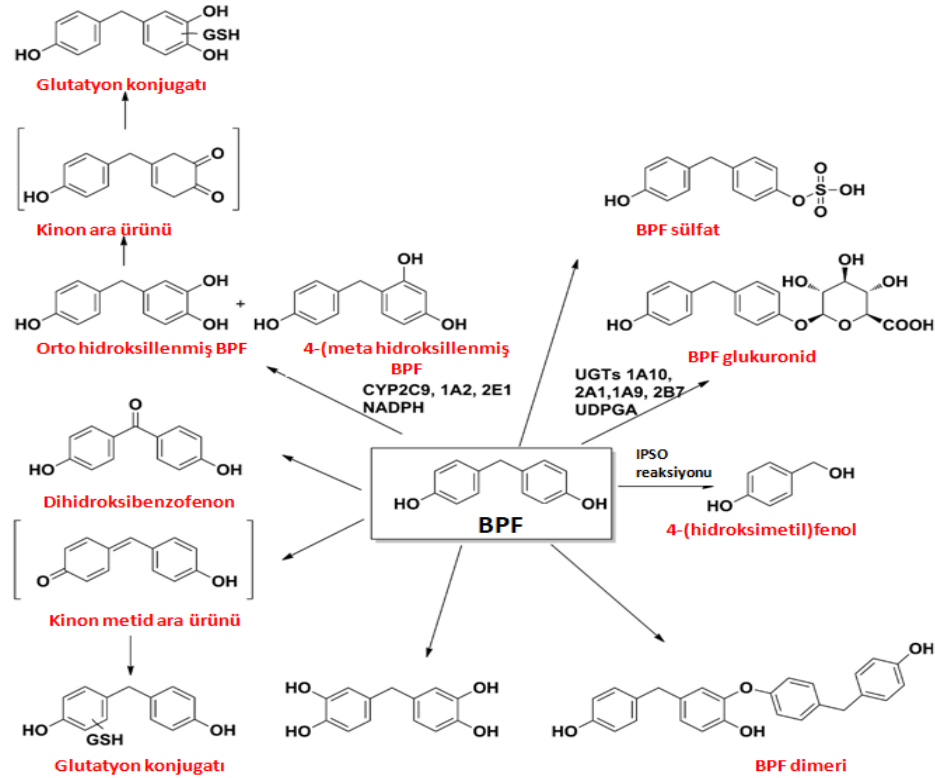
Suudi Arabistan, Cidde'deki bir popülasyonun idrardaki BPS konsantrasyonları, BPA ve BPF'yi aşarak popülasyonun idrar örneklerindeki en baskın analog olmuştur. Bu sebepten, BPS, sert O=S=O çift bağları nedeniyle BPA'ya nispeten daha fazla ısı ve ışığa dayanıklı olduğundan, BPS'nin çalışmanın yapıldığı ülkelerde BPA'dan daha yaygın olarak kullanıldığı düşünülmektedir (Asimakopoulou ve ark., 2016). İnsan

kanında bulunan bisfenollerin değerlendirildiği bir çalışmada, sağlıklı ve endometriotik kadınlardan alınan insan serumunda, BPA konsantrasyonlarından daha yüksek, BPB'nin varlığını bildirmiştir (Cobellis ve ark., 2009).

Bisfenol analoglarının metabolizması ve atılım yolları BPA'ninkine benzediği düşünülmektedir (Chen ve ark., 2016). Ayrıca, östrojenik aktivitenin, daha fazla oksitlenmiş metabolitlere veya hidroksil grubundaki glukuronik asit veya sülfürik asitli konjugatlara transformasyon yoluyla azaldığı düşünülmektedir (Kitamura ve ark., 2005).

BPF metabolizması üzerine dişi Sprague-Dawley sıçanları ile *in vivo* çalışmayapılmış ve bu sıçanların idrarındaki ana metabolitin BPF sülfat olduğu tespit edilmiştir (Cabaton ve ark., 2006). Bununla birlikte, bu sıçanların idrarında en az beş başka metabolit de tespit edilmiştir; bu da, BPF'nin çeşitli metabolik yollardan geçtiğini düşündürmektedir. HepG2 hücre dizisi ile gerçekleştirilen bir *in vitro* çalışmada, BPF sülfatın BPF'nin ana metaboliti olarak oluşumu gözlenirken (Audebert ve ark., 2011; Dumont ve ark., 2011), insan hepatositleriyle yapılan diğer bir çalışmada ise hem BPF sülfat hem de BPF glukuronid oluşumu gözlenmiştir (Dumont ve ark., 2011). BPF glukuronidinin tespit edilen ana metabolit olduğu insan bağırsak (LS174T) hücrelerinde, BPF için yüksek metabolik aktivite gözlenmiştir (Audebert ve ark., 2011). Bağırsakta karaciğerden daha yüksek BPF biyotransformasyonu ile uyumlu olan bir bağırsak UGT'sinin (UGT1A10) esas olarak BPF glukuronidasyonundan sorumlu olduğunu ortaya konulmuştur (Gramec Skledar ve ark., 2015). BPF oksidatif metabolizmasının araştırıldığı bir *in vitro* çalışmada, aralarında hidroksillenmiş BPF'lerden olan birkaç oksidatif metabolitle oluşumu gözlenmiştir (Cabaton ve ark., 2008, Schmidt ve ark., 2013). Fenol halkasının hem orto hem de meta konumlarında hidroksilasyon meydana gelmiştir. Bu inkübasyonlarda dihidroksile BPF ve dihidroksibenzofenon da tespit edilmiştir. Ayrıca, BPF dimeri olarak tanımlanan BPF'den daha düşük polariteye sahip bir oksidatif metabolit tespit edilmiştir (Cabaton ve ark., 2008). Ek olarak, ilk reaksiyonun reaktif BPF kinon oluşumu olduğu düşünülmüş ardından glutatyon ile reaksiyonun takip ettiği iki glutatyon konjugatı tespit edilmiştir. Daha sonra ikinci olarak, kinon metid ara ürünü ile reaksiyondan sonra

glutasyon konjugatı da oluşmuştur. Ayrıca, bu inkübasyonlarda 4-(hidroksimetil)-fenol tespit edilmiştir (Schmidt ve ark., 2013).



Şekil 2-4: BPF metabolizmasının şematik gösterimi

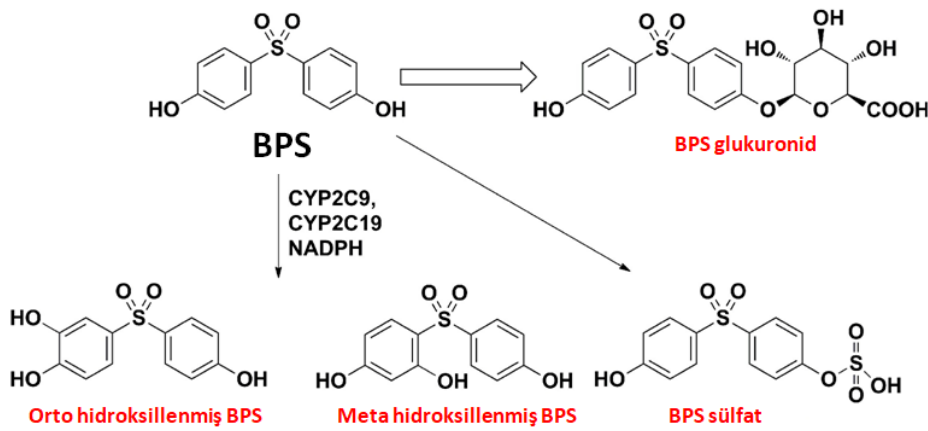
(Gramec Skledar ve Peterlin Mašič, 2016).

BPS metabolizması esas olarak BPS glukuronid oluşumuna yol açmaktadır (Skledar ve ark., 2016). Karaciğer, BPS metabolizmasının ana bölgesidir, ancak az miktarda BPS bağırsakta metabolize edilebilmektedir. Öncelikle hepatik enzim UGT1A9, BPS glukuronidasyonunda yer alan ana UGT izoformudur (Gramec Skledar ve ark., 2015). Le Fol ve arkadaşları (2015), farklı insan ve zebra balığı modellerinde BPS metabolizmasının *in vitro* bir çalışmada, BPS glukuronid, zebra balığı modellerinde saptanan ana metabolit iken, insan hepaRG hepatik hücre dizisinde hem BPS glukuronid hem de BPS sülfat saptanmıştır (Le Fol ve ark., 2015).

Oksidatif yollar, BPS metabolizmasının küçük bir bölümünü temsil eder. Yapılan *in-silico* tahminler, BPS'nin fenol halkasının orto ve meta pozisyonlarında hidroksilasyonunu göstermiştir (Grignard ve ark., 2012). İnsan karaciğer mikrozomları

ile gerçekleştirilen bir *in vitro* çalışmada, orto-hidroksile BPS oluşumu gözlenmiştir. Bununla birlikte, inkübasyon karışımına UDPGA eklendiğinde, hidroksillenmiş metabolit miktarı önemli ölçüde azalmış, bu da glukuronidasyonun BPS için baskın reaksiyon yolu olduğunu düşündürmektedir (Skledar ve ark., 2016).

Oh ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada (2018), gönüllüler tek bir doz (8.75µg/kg) BPS tükettikten sonra BPS'nin hızla emildiğini (0,7±0,3 saat) ve insan idrarında elimine edildiğini (yarı ömür<7 saat) tespit etmiştir (Oh ve ark., 2018). Kağıt makbuzları kullanan (1,09mg BPS/g) kasiyerler arasında yapılan bir çalışmada ise serum BPS seviyeleri genellikle analitik saptama sınırından (0,002–0,01 ng/mL) daha yüksek tespit edilmiştir (Thayer ve ark., 2016). Okuda ve arkadaşları (2011), sıçan karaciğeri S9 fraksiyonu ile inkübasyondan sonra BPB, BPC, BPE, BPF ve BPZ'nin katekol metabolitlerinin saptandığını bildirmiştir (Okuda ve ark., 2011). BPF rezidülerinin atılımı esas olarak idrar yoluyla ve daha az ölçüde feçes olmuştur. BPF'nin eliminasyon oranı, BPA için bildirilenden daha düşük bulunmuştur. İdrarda, ana ürün olarak bir sülfat konjugatı dahil en az altı metabolit tespit edilmiştir. İnsan karaciğer mikrozomlarında veya rekombinant sitokrom P450 izoenzimleri ile trifosfopiridin nükleotid (NADPH) ve indirgenmiş glutatyon (GSH), BPA, BPAF, BPC, BPF ve BPZ, hidroksillenmiş metabolitlere ve bunların karşılık gelen glutatyon (GSH) konjugatlarına biyotransforme edilmiştir (Schmidt ve ark., 2013).



Şekil 2-5: BPS metabolizmasının şematik gösterimi

(Gramec Skledar, D., & Peterlin Mašič, 2016).

2.6. BPA, BPF ve BPS'nin Toksik Etki Mekanizmaları

BPA ve analoglarının sitotoksosite, genotoksosite, üreme toksisitesi, endokrin sistem toksisitesi, dioksin benzeri etkiler ve nörotoksosite dahil olmak üzere çeşitli toksik etkileri bulunmaktadır. Çalışmalar, BPA analoglarının toksikolojik profillerinin BPA'ninkine benzer olduğu sonucuna işaret etmektedir (Chapin ve ark., 2008; Corrales ve ark., 2015; Goodman ve ark., 2008; Hengstler ve ark., 2011; Willhite ve ark., 2008). Rochester ve Bolden (2015) yaptıkları bir çalışmada, BPF ve BPS'nin hormonal aktivitelerini sistematik olarak gözden geçirmiş ve bu iki analogun östrojenik, antiöstrojenik, androjenik ve antiandrojenik aktiviteler için BPA'ya benzer bir güce sahip olduğu sonucuna varmıştır. Bu çalışmaya göre, BPS ayrıca proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrel eylemler için kritik olan membran aracılı yollarda östradiolünkine benzer potansiyele sahiptir (Rochester ve Bolden, 2015).

2.6.1. Endokrin Bozucu Etkiler

Bisfenol analoglarının östrojenik ve antiandrojenik etkileriyoğun araştırmaların konusu olmuştur. BPF ve BPS'nin yanı sıra BPAF, BPB ve BPC, BPA'ninkine benzer veya BPA'dan daha yüksek östrojenik potensler sergilemektedir.

Yapılan bir çalışmada, BPF ve BPS'nin östrojen ve androjen reseptörü (ER ve AR) aktiviteleri üzerindeki etkileri belirlenmiş ve çoğu analogun BPA'nınkiyle aynı büyüklükte potens sergilediği ortaya konulmuştur (Rosenmai ve ark., 2014). Başka bir çalışmada ise, BPA, BPF ve BPS, insan östrojen reseptörlerini aktive ettiği (Molina-Molina ve ark., 2013). Eladak ve arkadaşları (2015), BPS, BPF ve BPA'nın insan fetal testislerinden bazal testosteron salgısını azalttığını ve anti-androjenik etkiler gösterdiğini bildirmişlerdir (Eladak ve ark., 2015). Steroidogenez testi kullanılarak yapılan bir çalışmada, BPF ve BPA'nın 17 β -estradiol üretimini indüklediğini, buna karşın BPA ve BPS'nin serbest testosteron üretimini inhibe ettiği ortaya konmuştur (Goldinger ve ark., 2015).

Östrojenik ve antiandrojenik etkilere ek olarak, bisfenol analogları için anti-östrojenik ve anti-androjenik aktiviteler de rapor edilmiştir. Stossi ve arkadaşları, BPAF, BPAP, BPB, BPC ve BPZ'nin ER β için ER α için olduğundan daha yüksek afinite sergilediğini ve ER β antagonistleri olarak hareket ettiğini ve bunların log EC₅₀

değerlerinin BPA'ninkinden daha düşük bir büyüklük sırası olduğunu bulmuştur (Stossi ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda, MCF-7 hücrelerindeki ER'ye bağlanmak için 17 β -estradiol ile rekabet eden BPF'nin anti-östrojenik etki gösterirken (Stroheker ve ark., 2004) BPS'nin zayıf bir insan androjen reseptörüagonisti olarak etki gösterdiği rapor edilmiştir (Molina-Molina ve ark., 2013). Matsushima ve arkadaşları (2010) yaptıkları çalışmada, BPAF'ın ER α için tam bir agonist ve ER β için oldukça spesifik bir antagonist olduğunu, 17 β -estradiol aktivitesinin güçlü bir antagonisti olduğunu ve potensinin BPA'ninkinden 47,6 kat daha yüksek olduğunu bildirmiştir (Matsushima ve ark., 2010).

2.6.2. Sitotoksik ve Genotoksik Etkiler

Çalışmalar, BPAF, BPAP, BPF, BPP ve BPS'nin sitotoksik ve genotoksik etkilerini bildirmiş ve bu analogların bazılarının BPA'ninkinden daha fazla veya BPA'ya benzer genotoksik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur (Audebert ve ark., 2011; Cabaton ve ark., 2009; Castro ve ark., 2015; Fic ve ark., 2015; Michałowicz ve ark., 2015).

Birçok endokrin bozucu etki çalışmasının aksine, bisfenollerin sitotoksitesisi ve genotoksitesisi üzerine yapılan çalışmalar, nadiren EC₅₀ gibi etkili konsantrasyonlar veya dozlar elde edilmesini sağlamıştır (Chen ve ark., 2016).

BPA'nın MCF-7 hücrelerinde (1 μ mol/L ve 100 μ mol/L konsantrasyonda) DNA zincir kırılmalarını indüklediğini bildirilmiştir (Iso ve ark., 2007). Sıçanlarda, BPA maruziyeti, kemik iliğinde mikronükleus oluşumuna ve yapısal kromozom aberasyonlarına ve ayrıca lenfositlerde DNA hasarına neden olmuştur (Tiwari ve ark., 2021). Ayrıca 8-hidroksideoksiguanozin⁶ plazma seviyelerinde artış, lipid peroksidasyonunda artış ve karaciğerde glutatyon aktivitesinde azalma gözlenmiş, bunun da oksidatif stresin BPA genotoksitesisinin mekanizmalarından biri olabileceğini düşündürmektedir (Fic ve ark., 2013). Audebert ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, insan hepatoma (HepG2) hücrelerinde BPA ve BPF için benzer sitotoksik etkilere sahip

⁶DNA oksidasyonunun başlıca ürünlerinden biridir. Oksidatif DNA hasarının göstergesidir.

olduğunu rapor ederken; genotoksisitenin sadece BPF için gözlemlendiğini rapor etmiştir (Audebert ve ark., 2011). 1,1 ve 2,2 mM BPA ve 2 mM BPF uygulanan insan periferik kan mononükleer (PBMC) hücrelerinde 4 saatlik maruziyet sonrası hücre canlılığında azalmatespit edilmiştir (Michałowicz ve ark., 2015). BPA ile karşılaştırıldığında, BPF ve BPAF, PBMC hücrelerindeki lipidlere ve proteinlere zarar veren reaktif oksijen türlerinin ($\text{OH}\cdot$ dahil ROS) oluşumunu da arttırmıştır. Cabaton ve arkadaşları (2009) BPF'nin sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda HepG2 hücrelerinde DNA fragmantasyonu üzerinde etkili olduğunu göstermiştir (Cabaton ve ark., 2009). 0,1 ila 10 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonlarında 24 saat maruziyetten sonra HepG2 hücrelerinde BPA ve BPS önemli DNA hasarına (comet testi) neden olurken BPF, BPAF veya BPZ maruziyetinde bu etkiler gözlenmemiştir (Fic ve ark., 2013). Fic ve arkadaşları (2015), ayrıca, östrojene bağımlı osteosarkom hücrelerinde BPA (2,3 $\mu\text{g/L}$), BPAF (3,4 $\mu\text{g/L}$) ve BPS (2,5 $\mu\text{g/L}$) maruziyetinin genom çapında gen ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Bu çalışmaya göre, BPS, ardından BPAF ve BPA için gen ekspresyonu üzerinde önemli etkiler gözlenmiştir. Test edilen tüm bisfenoller, fetal gelişimle ilgili genleri etkilemiş, ancak yalnızca BPA, bağışıklık sistemiyle ilgili genleri etkilemiştir (Fic ve ark., 2015). Gebe kalan Wistar sıçanlarında yapılan bir *in vivo* çalışma, BPA, BPF ve BPS'nin, yavru dişi sıçanların prefrontal korteksindeki 5 α -redüktaz ekspresyonu ve dopamin-serotonin sistemlerini farklı şekilde etkilediğini ortaya koymuştur (Castro ve ark., 2015).

2.6.3. Üreme Sistemi Üzerine Etkiler

BPA, östrojen reseptörleri ile etkileşime girme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle özellikle hamile ve emziren kadınlarda belirli yaşam dönemlerinde çok önemli bir rol oynar (Almeida ve ark., 2018).

BPA, üreme sistemiyle ilişkili bir çok olumsuz etkiye yol açmaktadır. Bunlar: hipotalamik-hipofiz-yumurtalık eksenini üzerindeki etkiler (cinsel farklılaşmada değişiklikler, erken ergenlik) (Lee ve ark., 2014; Wolff ve ark., 2010); yumurtalıklar üzerine etkiler (insan ve hayvanlarda yumurtalıklarda mayoz bölünmenin başlangıcının etkilenmesi ve hayvan modellerinde germ hücre yuvasının parçalanmasına müdahale ve çeşitli hayvan türlerinde folikül geçişini hızlandırma) (Lenie ve ark., 2008; Machtinger ve ark., 2013); rahim üzerine etkiler (endometriyal hücre proliferasyonu, uterin

fonksiyonunu bozukluğu);prostat üzerine etkiler (prostat morfolojisindeki değişiklik göz önüne alındığında prostat bezi için toksik olduğu)(Tang ve ark., 2012; Wu ve ark., 2011) olarak ortaya çıkmaktadır. Çalışmalar ayrıca BPA'nın steroid biyosentezini değiştirdiğini ve kadınlarda oosit kalitesini düşürdüğünü (Ehrlich ve ark., 2012), polikistik over sendromunda gözlenen hiperandrojenizm ile bağlantılı olduğunu (Newbold ve ark., 2009) göstermektedir.

BPA ve yapısal analogları BPF ve BPS'nin de BPA'ya benzer şekilde üreme sistemi üzerine olumsuz etkiler gösterebileceği tahmin edilmektedir. BPA analogları, BPA ile karşılaştırıldığında benzer endokrin etkiler gösterdiğinden elde edilen veriler, hayvan modellerinde üreme üzerindeki risk oluşturabileceklerini göstermektedir (Siracusa ve ark., 2018).

Dişi yetişkin zebra balığının (*Danio rerio*) BPS'ye ($>0,5 \mu\text{g/L}$) maruz bırakıldığı bir çalışmada, yumurta üretiminin ve gonadosomatik indeksin önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, F1 zebra balığı embriyolarının BPS'ye uzun süre maruz kalması kuluçka randımanını azaltmış ve malformasyonu arttırmıştır. Maruz kalma sonucu, hipotalamik-hipofiz-gonadal ekseninin (HPG) geri besleme düzenleyici devrelerini de etkilenmiş ve yavruların gelişiminin bozulduğu gözlenmiştir (Ji ve ark., 2013). Zebra balığının gelişimsel olarak BPS'ye maruz kalması, yetişkinlerde üreme potansiyelini ve hormonal dengeyi de bozmuştur (Naderi ve ark., 2014). Fare adiposit hücrelerinin (3T3-L1) BPA ve BPS'ye maruz bırakılması sonucu lipolizde bir azalma gözlenmekle birlikte, yalnızca BPS glikoz alımını ve leptin üretimini arttırıcı etki göstermiştir (Héliès-Toussaint ve ark., 2014). Bu bulgular, farklı metabolik yollar aracılığıyla hem BPA'nın hem de BPS'nin obezite ve steatozda rol oynadığını düşündürmektedir (Chen ve ark., 2016). Dişi sıçanlardan oluşan gruplara 28 gün boyunca $50-500 \mu\text{g/mL}$ ve $5-50 \mu\text{g/kg}$ dozlarda BPA, BPF ve BPS enjekte edildiği bir çalışmada, tüm gruplarda sıçan yumurtalıklarında olumsuz morfolojik ve histopatolojik değişiklikler gözlenmiştir. 5 ve $50 \mu\text{mg/kg}$ BPA, BPF ve BPS maruziyet gruplarında kontrole kıyasla yumurtalıklarda atretik ve kistik foliküllerde artış olurken, antral ve korpus luteum foliküllerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir (Ijaz ve ark., 2020).

2.6.4. BPA, BPF ve BPS ile ilgili Yasal Düzenlemeler

Dünyada BPA'nın halk sağlığı üzerine riskleri konusunda birçok risk değerlendirme otoriteleri rapor yayınlamıştır.

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), tüketiciler için BPA'nın güvenliğini ilk olarak 2006'da değerlendirmiştir. EFSA, 2008, 2010, 2013 ve 2015'te BPA'yı değerlendirmiştir. EFSA, Gıda ile Temas eden Gıda Katkı Maddeleri, Tat vericiler ve Ambalaj Materyelleri Paneli ('Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food', AFC) 2006 yılında yayınladığı raporda çeşitli populasyon grupları için BPA'nın tolere edilebilir günlük alım değerini ('tolerable daily intake', TDI) 50 µg/kg v.a olarak belirlemiştir (EFSA, 2006). 2008'de veri eksikliği nedeniyle TDI'yi yeniden doğrulamıştır (50 µg/kg v.a) (EFSA, 2010). Ayrıca, EFSA düşük dozlarda BPA'nın toksisitesine ilişkin yeterli bilimsel kanıtların olmadığı konusunda görüş belirtmiştir (EFSA, 2012).

Kanada'da Nisan 2008 ve Danimarka'da Nisan 2010'da BPA içeren bebek biberonlarının kullanımı yasaklanmıştır.²⁸ Ocak 2011 tarihli Avrupa Birliği Direktifi'nde (Commission Directive 2011/8/EU) 1 Mart'tan itibaren tüm Avrupa Birliği üye ülkelerinde BPA içeren polikarbonat biberonların üretiminin artık mümkün olmayacağı ve 1 Haziran ve sonrasında ise bu maddeyi içeren biberonların ithal edilmesine de izin verilmeyeceği bildirilmiştir (Avrupa Birliği Komisyonu, 2011).

EFSA'nın BPA maruziyeti ve toksisitesine ilişkin en son kapsamlı yeniden değerlendirme raporu Ocak 2015'te yayınlanmıştır. EFSA'nın bilimsel uzmanları, BPA'nın herhangi bir yaş grubundaki (doğmamış çocuklar, bebekler ve ergenler dahil) tüketiciler için herhangi bir sağlık riski oluşturmadığı sonucuna varmıştır. Çeşitli maruziyet kaynakları ve kombinasyonlarına (diyet, toz, kozmetik ve termal kağıt) maruz kalmanın gıdalardaki BPA'nın güvenli seviyesinin önemli ölçüde altında (4 µg/kg/gün v.a.) olduğu rapor edilmiş olup, toplu maruz kalma için en yüksek değerlendirmeler TDI'den 3-5 kat daha düşük bulunmuştur. EFSA/CEF Paneli 2015'de yayınladığı son raporda ise; geçici tolere edilebilir günlük değeri (t-TDI) 50 µg/kg/gün v.a'dan 4 µg/kg/gün v.a'ya düşürmüştür. EFSA bu değişikliği yeni veriler ve risk değerlendirmesi ve özellikle de meme bezi, üreme, metabolik, nörodavranışsal ve

immün sistemler hakkındaki veritabanlarındaki belirsizlikler yüzünden gerçekleştirmiştir (EFSA, 2015).

BPA'nın toksisite profili, AB'de uzun yıllardır çalışılmaktadır. 2016 yılında, yeni bilimsel verilerin ardından, BPA, “Maddelerin ve Karışımların Sınıflandırılması, Etiketlenmesi ve Ambalajlanması (CLP Yönetmeliği)” ve ilgili Yönetmelik (EC) 1272/2008'e göre reproduktif toksik etki kategori 2'den reproduktif toksik etkikategori 1B olarak yeniden sınıflandırılmış ve termal kağıtta kullanımı, REACH Ek XVII kapsamında kısıtlanmıştır (Avrupa Birliği Komisyonu, 2016; Chen ve ark., 2016).

2017 yılında, küçük çocuklara yönelik oyuncaklarda veya çocuklar tarafından ağza alınabileceği düşünülen diğer oyuncaklarda BPA migrasyon limiti (Madde veya malzemeden gıda vb. ürünlere geçen uçucu olmayan maddelerin izin verilen maksimum miktar) 2,5 kat artırılarak 0,1 mg/L'den 0,04 mg/L'ye yükseltilmiştir ve Şubat 2018'de, BPA geçiş sınırını, 0,6 mg/kg'dan 0,05 mg/kg'a (12 kat) arttıran mevcut ‘Gıdalarla Temas Eden Maddeler’ yasasını genişletmek için yeni bir mevzuat yayınlanmıştır (EFSA, 2017).

Avrupa Kimyasallar Ajansı (ECHA), 2017'den beri AB termal kağıt pazarında geliştiricilerin kullanımını ve özellikle Avrupa Komisyonu'nun talebi üzerine BPA'nın BPS ve diğer alternatiflerle değiştirilmesini izlemektedir. Belçika 2019'da maddenin üreme için toksik olarak sınıflandırılmasını ve etiketlenmesini uyumlu hale getirmek için bir teklifte bulunmuştur. Ayrıca, ECHA bisfenollerle ilgili daha kapsamlı bir düzenleyici strateji için bilgi toplamak amacıyla bisfenolleri tek tek maddelerden ziyade bir grup olarak incelemektedir (ECHA, 2020). 18 Haziran 2020 tarihinde Helsinki'de yapılan ECHA'nın termal kağıtta BPA ve diğer geliştiricilerin kullanımına ilişkin dördüncü ve son pazar araştırması, kağıt üreticilerinin BPA'yı BPS ile değiştirmeye devam ettiğini doğrulamıştır. 2019 yılında 187 kiloton BPS bazlı termal kağıdın AB pazarına sunulduğu rapor edilmiştir. 2022 yılına kadar, AB'deki tüm termal kağıtların %61'inin (veya 307 kilotonunun) BPS bazlı olması beklenmektedir. AB genelinde termal kağıtta BPA yasağı Ocak 2020'de yürürlüğe girmiştir. Yapılan ankete göre, BPA bazlı termal kağıt 2019'da AB'de hala %29 pazar payına sahipti. 2020'den itibaren BPA'nın yerini esas olarak BPS alacağı tahmin edilmektedir. BPS'nin insan üreme ve hormonal

sistemlerini etkilediğinden şüphelenildiğinden, termal kağıtta BPS'nin yaygın kullanımı endişe uyandırmaktadır.

Diğer bazı ülkelerin de BPA'nın gıda ile temas eden ürünlerde, özellikle de küçük çocuklar tarafından kullanılması amaçlanan ve tasarlananlarda kullanımını kısıtlamak veya yasaklamak için tasarlanmış mevzuatları bulunmaktadır. Bunlar: Arjantin, Avustralya, Brezilya, Kanada, Çin, Kosta Rika, Ekvador, Japonya, Malezya, Güney Afrika, Güney Kore, Tayvan ve Türkiye'dir.

7 Şubat 2011 tarihli ve 27839 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan “Emzik, Biberon, Biberon Başlığı, Alıştırma Bardağı, Alıştırma Bardağı Kapağı ve Benzeri Ürünlerin Üretimi, İthalatı ve Bildirim Esaslarına Dair” Tebliğ’inde bu tip ürünlerin teknik dosyasında bulunması gereken spesifikasyonlar arasında polikarbonat içeren termoplastik biberonlarda BPA miktarı da yer almaktadır (27839 sayılı Resmi Gazete, 2011). Daha sonar, 31 Ekim 2013 tarihli ve 28807 sayılı Resmi Gazete’de yayınlanan bu tebliğlerle aynı Tebliğ güncellenerek yayınlanmıştır (28807 sayılı Resmi Gazete, 2013). Böylelikle bu ürünlerin halk sağlığına ve çevreye zarar vermesini engellemek, topluma güvenli şekilde ulaşmasını teminen piyasaya arz edilmeden önce Bakanlığa yapılacak bildirimin usul ve esasları belirlenmiştir. Türkiye’de 2013/34 ve 2019/14 Türk Gıda Kodeksi ‘Gıda İle Temas Eden Plastik Madde ve Malzemeler’ Tebliğinde TGK-Bebek Formülleri ve TGK-Devam Formülleri Tebliğlerinde bebek olarak tanımlanan tüketici grubu için kullanılan, polikarbonat madde ve malzemelerin üretiminde kullanılamaz kısıtlaması getirilmiştir. Spesifik migrasyon limit değeri 60 mg/kg olarak belirlenmiştir (28710 sayılı Resmi Gazete, 2013; 30989 sayılı Resmi Gazete, 2019).

2.7. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum (ER), ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunan, düz keseciklerden ve dallı membranöz tübüllerden meydana gelen (Porter ve ark., 1945) ve protein katlanması, sentez, sekresyon, translokasyon ve post-translasyonel modifikasyonlardan sorumlu transmembran proteinler için önemli bir intraselüler organeldir (Oslowski ve Urano, 2011; Yadav ve ark., 2014). ER yapısı ilk olarak Porter ve arkadaşları tarafından gözlemlenmiş (Porter ve ark., 1945) ve ilk defa Porter ve Kallman tarafından "ER" olarak adlandırılmıştır (Porter ve Kallman, 1952). ER, düz (granülsüz) endoplazmik retikulum (SER) ve granüllü endoplazmik retikulum (RER)

olmak üzere iki bileşene sahiptir. SER genellikle lipidlerin ve steroidlerin oluşturulması/depolanması için kullanılırken, RER çeşitli proteinlerin sentezinde önemli rol oynamaktadır. RER, ribozomları olmayan SER'e kıyasla yüzeyinde ribozomal ekleri nedeniyle "granüllü" olarak adlandırılmaktadır. RER'in ribozomları zara kalıcı olarak bağlı değildir. Protein sentezi için gerektiğinde zara sürekli olarak bağlanır ve ayrılırlar. RER'deki zara bağlı ribozomlar, olgun mRNA transkriptini polipeptit olmak üzere bağlanan amino asitlere çevirir. Ökaryotik ribozomlar (80S), iki eşit olmayan alt birimden oluşmaktadır: küçük alt birim (40S) ve büyük alt birim (60S). Protein sentezinden sonra, RER'de translasyon sonrası bazı karbonhidratların eklenmesi ve bazı proteolitik bölünmeler meydana gelmektedir. Bununla birlikte, çeviri sonrası değişikliklerin çoğu Golgi kompleksinde gerçekleşmektedir. Uygun katlanmaya yönelik ilk adım, yeni oluşan peptit zincirini glikozile etmek için oligosakkariltransferazları gerektirmektedir. Peptidin glikozilasyonu, çözünürlüğünü artırır ve şaperonlar zincire bağlanıp katlama işlemine başlayana kadar onu korur. RER ayrıca bir proteinin üçüncül ve dördüncül yapısı için gerekli olan disülfid bağlarının oluşumunu katalize eden enzimlerden oluşur. Protein doğru şekilde katlanmazsa, moleküler şaperonlar polipeptit üzerine yeniden bağlanır ve proteini doğru şekle sokmaya çalışır. Birden fazla başarısız denemeden sonra, hatalı katlanmış proteinler sitozole aktarılır ve parçalanır (Mandon ve ark., 2013; Sanvictores ve Davis, 2021).

2.8. Endoplazmik Retikulum Stresi

Proteinlerin düzgün bir şekilde katlanabilmesi için, ER protein yükü ve katlanma kapasitesi arasında sabit bir denge vardır (Oslowski ve Urano, 2011). Bununla birlikte, biyokimyasal, fizyolojik ve patolojik uyaran nedeniyle ER çevresinde meydana gelen bozulma, besin yoksunluğu, değişen glikozilasyon, kalsiyum tükenmesi, oksidatif stres, DNA hasarı ve enerji bozulması/dalgalanması ER homeostazisini bozarak, ER stresi olarak adlandırılan, hatalı katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikmesine yol açan durumun meydana gelmesine neden olur (Ellgaard ve Helenius, 2003; Oslowski ve Urano, 2011; Wu ve Kaufman, 2006; Yadav ve ark., 2014). Virüsler, çevresel toksinler ve kronik inflamasyon da ER stresine yol açabilen etkenlerdir (Engin,

2016). ER stresini ortadan kaldırmak için hücre 3 temel mekanizmayı devreye sokmaktadır. Bunlar;

1. Protein sentezi ve proteinin ER'ye translokasyonu azaltılarak geçici bir adaptasyon ile ER'ye giren protein yükünde azalma sağlanması (protein degradasyonu),
2. Katlanmamış protein cevabı (UPR)
3. Homeostazın yeniden sağlanamaması durumunda, katlanmamış proteinleri sergileyen hücrelerden organizmanın korunması için, hücre ölümü yanıtının yani apoptozun oluşmasıdır.

2.8.1. Protein Degradasyonu

Proteinlerin yıkımı, hücrelerde protein homeostazının korunmasına yönelik olarak protein sentezi kadar önemlidir. Hücresel protein degradasyonu sitozol, membran, lizozom ve endoplazmik retikulum gibi farklı hücresel alanlarda meydana gelmektedir. ER ile ilişkili protein degradasyonu (ERAD), ER'deki hatalı katlanmış veya birleştirilmemiş proteinleri ortadan kaldırır. ERAD; hedef proteinin seçimi, ubiquitinasyon, retrotranslokasyon ve proteazomal yıkım gibi birden çok basamaktan oluşur.

ER stresi 2 protein degradasyon yolağının aktivasyonuna yol açmaktadır;

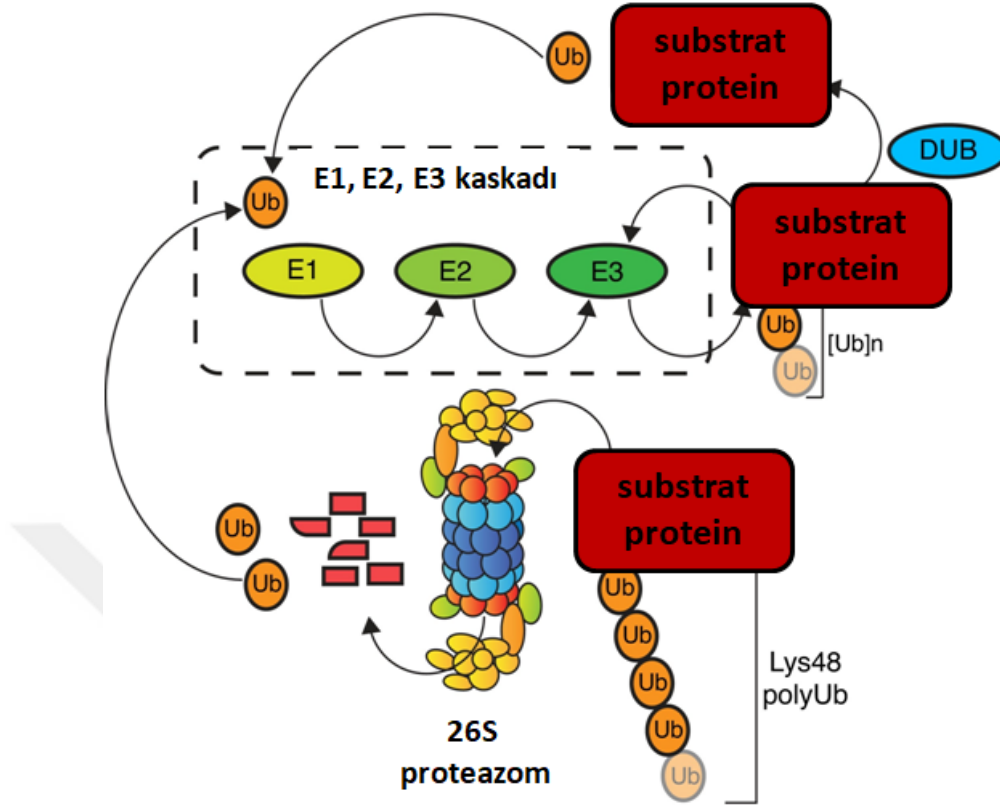
1. Ubikitin-proteozom aracılı (ERAD I),
2. Otofaji yoluyla lizozom-aracılı (ERAD II)

ERAD hedefleri, ER lümeni içindeki bir kalite kontrol sistemi tarafından seçilir ve nihayetinde sitoplazmik ubiquitin-proteazom sistemi (UPS) tarafından yok edilir.

2.8.1.1. Ubikitin-Proteazom Sistemi (UPS)

UPS, tüm ökaryotik hücrelerde bulunur ve üç tip ubiquitin enziminden ve 26S proteazomundan oluşur (Callis, 2014). 76 amino asitlik bir protein olan ubiquitin, ökaryotik organizmalar arasında yüksek oranda korunur ve adını hücrelerde her yerde bulunan anlamına gelen “ubikuitöz” ifadesinden alır ve translasyon sonrası bir modifikasyon olarak, diğer proteinlere eklenebilir (Leestemaker ve Ovaa, 2017). Ubikitinasyon, birçok hücresel süreçte dallanmaları olan en yaygın translasyon sonrası

modifikasyonlardan biridir. İşaretlediği substrat proteininin kaderini ve/veya işlevini belirlemek için bir etiket veya sinyal görevi görür (Amm ve ark., 2014). İşlem, bir ubiquitin molekülünün veya zincirinin, bir dizi enzim tarafından substrat proteininin C-terminalindeki bir lizin rezidüsüne kovalent bağlanmasını içerir. 26S proteazomu, her yerde bulunan substratları tanıyan ve bozan büyük bir çoklu katalitik proteaz kompleksidir. İki farklı kompleksten oluşur; 20S çekirdek partikülü ve 19S düzenleyici partikül. 19S düzenleyici partikül, her yerde bulunan proteinleri tanıma, ubiquitini çıkarma ve geri dönüştürme, substrat proteinini açma ve bunları bozunma için 20S proteazomuna yerleştirme işlevi görür. 20S çekirdek parçacığı, dört heptamerik halkadan oluşan fıçı şeklinde bir yapıdır; iki dış halka, 19S düzenleyici parçacık için bir yerleştirme alanı olarak hizmet eden α alt birimlerinden oluşur ve iki iç halka, üçü katalitik alanlar içeren β alt birimlerinden oluşur. Kaspaz benzeri, tripsin benzeri ve kimotripsin benzeri aktiviteler, sırasıyla, $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 5$ alt birimleri ile ilişkilidir ve asidik, bazik ve hidrofobik amino asit kalıntılarından sonra parçalanma yeteneği verir. UPS, hücre içi proteinlerin %80'inden fazlasının bozulmasından sorumlu olan oldukça karmaşık bir düzenleyici sistemdir, bu nedenle, hücredeki sayısız temel süreci denetler (Leestemaker ve Ovaa, 2017) UPS'in mekanizması ve işlevi aşağıda Şekil 2-6'da gösterilmektedir.



Şekil 2-6: Ubikitin-Proteazom Sistemi (UPS)’nin genel gösterimi

(Leestemaker ve Ovaa, 2017).

Ubikitin sisistemi, farklı substrat proteinlerine ubikuitin kısımlarının eklenmesini kolaylaştıran E1, E2 ve E3 enzimlerinden oluşur. Proteinler, bir veya daha fazla bölgede tek bir mono-ubikitin molekülü ile veya farklı uzunluklarda ve bağlantı tiplerinde ubikitin zincirleri ile modifiye edilebilir. Spesifik zincirlerle modifiye edilen substrat proteinleri, 26S proteazomu tarafından tanınır ve daha sonra bozunur. Ubikitin modifikasyonu oldukça spesifiktir ve düzenledikleri hücresel süreçlerin her biri için benzersizdir. Deubikitinasyon (DUB) enzim ailesi, ubikuitin modifikasyonunun çıkarılmasına izin verir ve hücre içindeki serbest ubikuitin havuzunu yeniler (Leestemaker ve Ovaa, 2017).

2.8.2. Katlanmamış Protein Cevabı (UPR)

ER stresi, homeostaziyi tamir eden ve ER stresini azaltan katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak adlandırılan kompleks bir sinyal ağını aktive eder. Hücre stresle baş edebildiği durumda katlanmamış proteinler ERAD aracılığı ile uzaklaştırılır. Stresle baş edemediği durumda ise proteozom inhibitörleri ERAD yolağını bloke eder ve sonuç olarak UPR olarak bilinen bir dizi sinyal kaskadını uyarır. Bu hücreler hayatta kalmak için ER fonksiyonundaki bozulmaların ve ER stresinin üstesinden gelmek zorundadır (Yadav ve ark., 2014). UPR, inositol gerektiren enzim 1 (IRE1), protein kinaz R (PKR)-benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) olmak üzere üç regülatör transmembran proteini tarafından başlatılır (Bernaies ve ark., 2006; Cawley ve ark., 2011; Chen ve ark., 2014a; Ellgaard ve Helenius, 2003; Hotamisligil, 2010; Ron

ve Walter, 2007; Walter ve Ron, 2011; Wu ve Kaufman, 2006). Stres altında olunmadığı sürece, ER şaperonu olan immunoglobulin ağır zincir bağlama proteini (BiP, aynı zamanda GRP78 ya da HSPA5⁷ olarak da bilinir), bahsi geçen üç temel regülatörün domainlerine yeni ER lümeni bölgesine bağlanarak onları inaktif hale getirir. ER stresi olduğunda ise, BiP domainlerden ayrılarak bu üç temel regülatörün aktif hale geçmesini sağlar (Osowski ve Urano, 2011). Aktive edilmiş PERK, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α (eIF2 α)'nın fosforilasyonuna neden olur ve eIF2 α 'yı inaktif hale getirerek protein sentezinin inhibisyonuna yol açar. Aktive edilmiş IRE1, X-kutusunda bağlanan protein 1 (XBP-1)'e bağlanmakta ve bağlı XBP-1, glukoz-regüle edici protein 78 (GRP78) gibi ER şaperon genlerinin ekspresyonunu arttırmaktadır (Chen ve ark., 2014a). Ayrıca, aktive edilmiş IRE1, XBP-1'in aktif olmayan mRNA'sından küçük bir intron uzaklaşmasını sağlayarak aktif bir transkripsiyon faktörü olan (sXBP-1)'i meydana getirmiş olur (Engin, 2016). ATF6, golgi aparatındaki konum 1 ve 2 proteazlar tarafından bağlanmaktadır. Bağlanan ATF6, C/EBP (CCAAT-arttırıcı-bağlayıcı protein) homolog protein (CHOP, DDIT3 geni tarafından kodlanır, GADD153 olarak da bilinir) gibi ER stresi ile ilişkili genlerin ekspresyonlarını regüle etmek için bir transkripsiyon faktörü olarak hareket etmektedir (Chen ve ark., 2014a). Aktif ATF6 ve sXPB-1, sırasıyla, ER stres cevap elementi (ERSE) ve hedef genlerin UPR elementi (UPRE)'ye bağlanarak bu genlerin ekspresyonlarını düzenlemektedir (Engin, 2016).

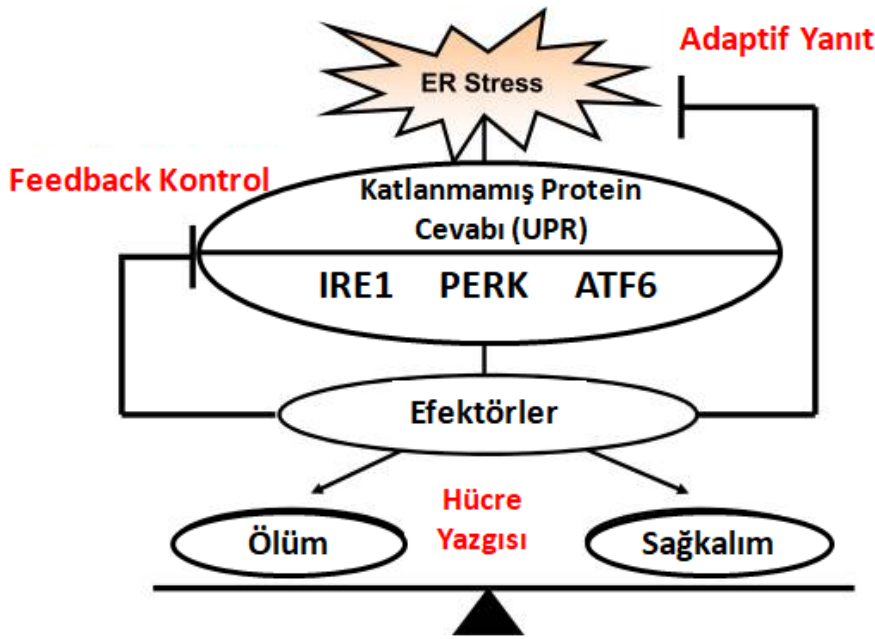
Aktif hale geçen UPR, aşağı sinyal yolağı efektörlerini (downstream efektörleri)⁸ üç ayrı fonksiyon ile regüle eder. Bunlar: adaptif yanıt, geribesleme (feedback) kontrol ve hücre yazgısı regülasyonudur. Moleküler şaperonların ve enzimleri oluşturan proteinlerin yukarı regülasyonun (up-regülasyon)⁹da dahil olduğu UPR adaptif yanıtı, katlanma ve taşınma verimliliğini artırır. Ayrıca, katlanmamış

⁷Isı şok protein ailesi HSP70'in bir üyesidir. Isı şok proteinleri, hücrede sitoplazmada bulunur ve hücre içi proseslerde görev alır. Proteinin katlanmasında, protein yıkımının engellenmesinde ve ortamdaki ihtiyaca göre proteinin oluşmasına yardımcı olarak hücre içi dengenin korunmasında görev alırlar.

⁸RNA polimeraz tarafından transkripsiyonun konumu ve yönü (5' ila 3'). Yukarı akış polimerazın (veya ribozomun) geldiği yöndedir.

⁹ RNA veya protein gibi hücresel bir bileşenin miktarını arttığı süreçtir.

proteinlerin birikimini önler ve ER iş yükünü azaltmak için translayonel azalmaya yol açar. İstenmeyen proteinlerin klirensini attırmak için ve ERAD ve otofaji elemanlarının sayısında artışa yol açar. Geribesleme kontrolü, zararlı bir hiperaktivasyonu önlemek için yeniden kurulan ER homeostazisi gibi UPR aktivasyonunun negatif regülasyonunu içermektedir. UPR tarafından yapılan hücre yazgısı regülasyonu, ER-stresi ilişkili hastalıkların patojenezinde önemli rol oynamaktadır(Oslowski ve Urano, 2011).



Şekil 2-7: Katlanmamış Protein Cevabının (UPR) yanıt kategorilerinin gösterimi(Oslowski ve Urano, 2011).

Üç ER transmembran proteini, IRE1, PERK ve ATF6, ER lümeninde ER stresini algılar ve topluca Katlanmamış Protein Cevabı (UPR) olarak adlandırılan bir dizi sinyal yolunu düzenleyerek aktive olur. UPR'nin üç işlevi vardır: uyarlanabilir yanıt, geri bildirim kontrolü ve hücre yazgısı. Adaptif yanıt altında, UPR, ER stresini azaltmayı ve ER homeostazisini düzeltmeyi amaçlar. UPR başarılı olursa, UPR sinyal yolları geri bildirim mekanizmaları tarafından kapatılır. UPR ayrıca, ER stres durumunun ciddiyetine bağlı olarak hücrenin yaşayıp yaşamayacağını yöneten hem hayatta kalma hem de ölüm faktörlerini düzenler (Oslowski ve Urano, 2011).

2.8.2.1. IRE1

ER stres sinyali regülatörü ve ER transmembran kinaz olan IRE1, N-terminal lümenal domain tarafından ER stresini algılar. Hatalı katlanan veya katlanmayan proteinlerin varlığını algıladığı sürece, IRE1 aktif hale gelmek için dimer oluşturur ve otofosforillenir. IRE1'in iki izoformu vardır. Bunlar: IRE1 α ve IRE1 β 'dir. IRE1 α , tüm hücre tiplerinde eksprese olur. Aktif hale gelmiş IRE1 α , XBP1 bir mRNA ile birleşir. Birleşmiş XBP1-mRNA, UPR hedef genlerini yukarı-regüle eden bir lörin fermuarı (b-ZIP) transkripsiyon faktörü kodlar (Hwang ve Qi, 2018; Oslowski ve Urano, 2011).

Yüksek seviyede kronik ER stresi, IRE1 tarafından tümör nekroz faktör (TNF)-reseptör-ilişkili faktör 2 (TRAF2)'nin alınmasına ve apoptoz-sinyali düzenleyen kinaz (ASK1)'in aktivasyonuna yol açar. Aktif hale gelmiş ASK1, apoptozda rol oynayan insanlarda JUN proto-onkogeni tarafından kodlanan bir protein (c-JUN)-N-teminal protein kinaz (JNK)'yı aktive eder (Osowski ve Urano, 2011; Vandewynckel ve ark., 2013). Ek olarak, IRE1 α , ER-lokalize mRNA'lar, ribozomal RNA ve miRNA'lar için düzenlenmiş IRE1'e bağlı bozunma (RIDD) olarak bilinen rastgele bir RNA bozunma sürecine dahil olabilir (Hwang ve Qi, 2018). RIDD'nin rolü ve IRE1'in tümör büyümesi ve anjiyogenez sırasında birkaç aşağı akış aracı ile etkileşimleri şu anda anlaşılamamıştır. Uzun süreli RIDD aktivasyonunun apoptozu arttırdığı bildirilmiştir (Vandewynckel ve ark., 2013).

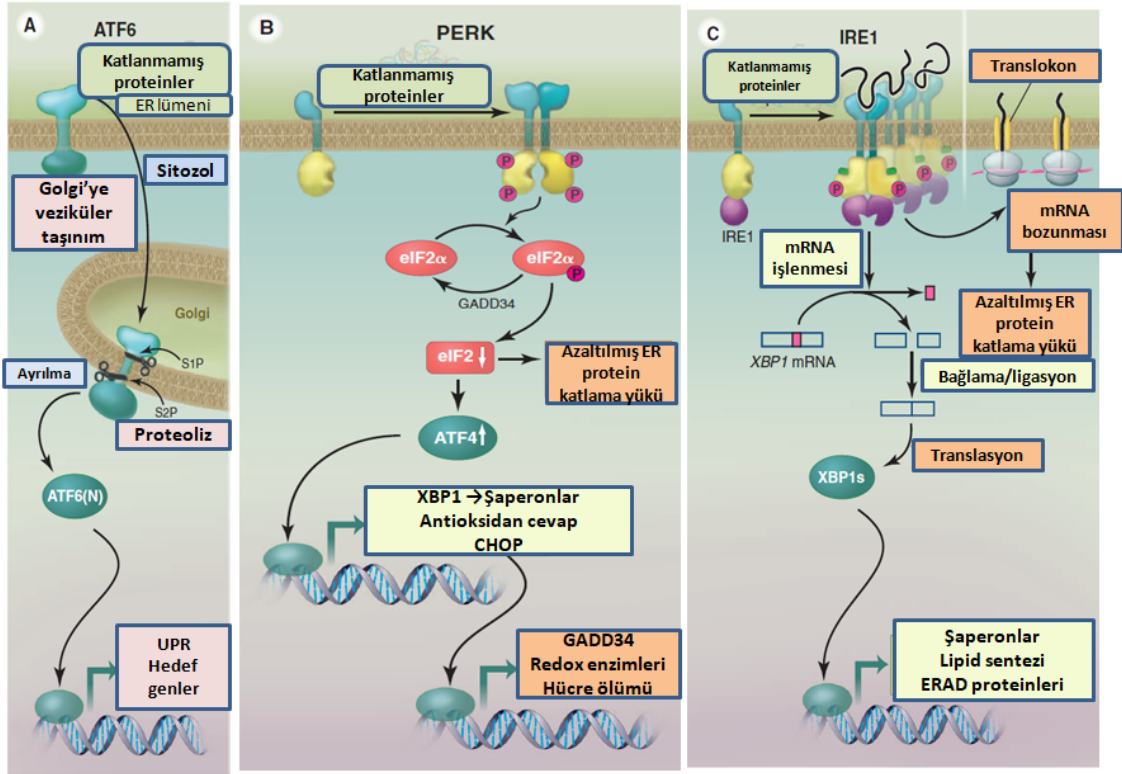
2.8.2.2. PERK

ER stres sinyalinin ikinci regülatörü PERK, bir ER membran kinazdır. IRE1 α 'ya benzer olarak, ER stresi tarafından aktive edildiğinde, PERK oligomerleşir, otofosforillenir ve sonrasında doğrudan eIF2 α 'nın α alt ünitesindeki serin aminoasiti (Ser51)'i fosforiller. Fosforillenen eIF2 α , global mRNA translasyonunda azalmaya yol açan ribozomal başlatıcı kompleksin oluşmasını engeller. ER iş yükündeki bu azalma hücreleri ER-stres aracılı apoptozdan korur. Bu sırada bazı mRNA'lar translasyon için eIF2 α 'nın fosforilasyonuna ihtiyaç duyar (Osowski ve Urano, 2011). PERK, eIF2 α 'yı fosforile ederek bir translasyon blokajına ve bağımsız ATF4 translasyonuna ve ayrıca nükleer faktör (eritroid türevi 2) benzeri 2 (NRF-2)¹⁰ yol açarak antioksidatif enzimlerin yukarı regülasyonuna yol açar. PERK, tümör progresyonu ve anjiyogenez ile ilişkilendirilmiştir. Son zamanlarda, PERK'in hücre kaderi üzerinde içeriğe bağlı bir etkisi olabileceği belirtilmiştir. PERK, eIF2 α de-fosforilasyonunu destekleyerek translasyon geri kazanımına yol açan negatif bir geri besleme döngüsü yaratır (Vandewynckel ve ark., 2013).

¹⁰ Faz II detoksifikasyonun (glutasyon S-transferazlar) indüksiyonunu veya antioksidan enzimleri (heme oksijenaz-1, HO-1) düzenleyerek, oksidatif stresin sebep olduğu sitotoksiteye karşı primer hücre savunması olarak kabul edilen bir transkripsiyon faktörüdür.

2.8.2.3. ATF6

ER stres sinyalinin üçüncü regülatörü ATF6'dır. ATF6, iki izoforma sahiptir. Bunlar: ATF6 α ve ATF6 β 'dır. ER stres durumunda, ATF6 α golgi aygıtına geçiş yapar ve burada konum 1 (site 1-S1) ve konum 2 (site 2-S2) proteazlar tarafından kırılarak aktive edilmiş bir b-ZIP meydana getirilir. ATF6 α 'dan meydana getirilen bu form nükleusa doğru yer değiştirir ve protein katlanması, yapımı ve degradasyonunda rol oynayan UPR genlerini aktif hale getirir (Oslowski ve Urano, 2011), proteom katlanmasını, kaçakçılığını veya bozulmasını etkilemeden proteostazı hassas bir şekilde ayarlayabilir; Vandewynckel ve ark., 2013). ATF6 fragmanının gelişmiş nüklear translokasyonu, çeşitli kanser türlerinde gözlenir ve ATF6 ekspresyonu, metastaz ve kanserin nüksetmesi ile bağlantılıdır. Ek olarak, organizma gelişimi için XBP1'ler gerekliken, ATF6'nın ER proteostasisin yeniden şekillenmesindeki işlevsel rollerde ve ER kapasitesinin ayarlanmasında etkili olabileceği düşünülmektedir. Dolayısı ile, ATF6 modülasyonu, proteom katlanmasını, kaçakçılığını veya bozulmasını etkilemeden proteostazı hassas bir şekilde ayarlayabilmektedir (Vandewynckel ve ark., 2013).



Şekil 2-8: UPR'nin üç sinyal dönüştürücü ailesinin (ATF6, PERK ve IRE1) gösterimi
(Walter ve Ron, 2011).

ER lümenindeki protein katlanma koşullarını algılar ve bu bilgiyi ileterek bZIP transkripsiyonunun üretilmesiyle sonuçlanır. UPR hedef genlerinin transkripsiyonunu sağlamak için çekirdeğe giren düzenleyiciler. Her yol farklı bir sinyal iletim mekanizması kullanır: ATF6 tarafından düzenlenen proteoliz, PERK tarafından yapılan translasyonel kontrol ve IRE1 tarafından yapılan konvansiyonel olmayan mRNA eklenmesi. Transkripsiyonel yanıtlara ek olarak, hem PERK hem de IRE1 ER'de protein katlama kapasitesini artırmaya hizmet eder ve ER katlama yükünü azaltmaya çalışırlar.

2.8.3. Hücre Ölümü Yanıtı

UPR, ER'yi yeniden normal haline getirmek için başarısız olursa, ER stresi hücresel fonksiyon bozukluğu ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Chen ve ark., 2014b; Osowski ve Urano, 2011).

2.8.3.1. Apoptoz

Apoptoz, hasar görmüş, mutasyona uğramış veya kansere dönüşebilecek hücreler gibi tüm organizma için bir tehdit oluşturan hücrelerin seçici olarak ortadan kaldırılması yoluyla doku homeostazını sürdürülmesini sağlayan anahtar bir mekanizmadır (Germain ve ark., 2005; Rozpedek ve ark., 2016). Apoptotik mekanizmanın ana moleküler bileşenleri, apoptoz sinyalleme için gerekli olan kaspazlar olarak adlandırılan sistein proteaz ailesi tarafından temsil edilir (Degterev ve ark., 2003; Rozpedek ve ark., 2016). Kaspazlar başlangıçta, oksijen tükenmesi de dahil olmak üzere çok sayıda hücre stresi tarafından aktive edilen inaktif pro-kaspazlar olarak translasyona uğrarlar. Kaspaz 8, 9 ve 12'yi içeren başlatıcı kaspazlar ve kaspaz 3, 6 ve 7 'yi içeren efektör kaspazlardan oluşan kaspaz sınıfının önemli üyeleri kaspaz kaskadının aktivasyonuna yol açan kaspaz 3, 6 ve 7'dir (Baliga ve Kumar., 2003; Cain ve ark., 2002).

Bcl-2 ailesinin proteinleri, apoptotik hücre ölümünün iyi karakterize edilmiş düzenleyicileridir (Martinou ve Youle., 2011). Mitokondriyal membranda lokalizedirler ve kaspazların aktivasyonundan sorumlu oldukları için apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde temel bir rol oynarlar (Tsujimoto., 1998). Pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesi Bax, Bak, Bok, Bid, Bim, Bad, Bmf, Bik, Blk, Noxa, Puma ve Hrk gibi proteinleri kapsamaktadır (Rozpedek ve ark., 2016). Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal dış zar (MDZ) bütünlüğünün düzenlenmesi ile sıkı sıkıya ilişkilidir. Stres koşulları altında anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri fonksiyonel olarak bastırılır. Tersine, Bax ve Bak gibi pro-

apoptotik Bcl-2 proteinleri, mitokondriyal dış zarın artan geçirgenliğini tetikler (Rozpedek ve ark., 2016).

MDZ geçirgenliği, apoptozda kritik öneme sahiptir, öyle ki, sitokrom c sitoplazmaya salınırsa, apoptozom adı verilen büyük bir kaspaz aktive edici kompleks yaratılır. Sitokrom c dışındaki bu çoklu protein kompleksi, hücre sitozolünde inaktif durumda bulunan Apaf-1 ve pro-kaspaz 9'u içerir. Sitokrom c ile hücresel etkileşimden sonra, pro-kaspaz 9 konformasyonel bir değişikliğe uğrar ve aktif hale gelir. Sonuç olarak, kaspaz 9 daha sonra birincil olarak hücre yıkımından sorumlu olan majör efektör kaspaz olan kaspaz 3'ün aktivasyonunu kolaylaştırabilir (Baliga ve Kumar., 2003; Cain ve ark., 2002). ER ve mitokondri sadece yapısal olarak değil, aynı zamanda işlevsel olarak da birbirine bağlıdır. Bcl-2 anti-apoptotik proteinler hem MDZ hem de ER nükleer zarfında bulunur. Ayrıca, Bax ve Bak dahil olmak üzere pro-apoptotik Bax benzeri proteinler de ER membranında lokalizedir. Sitozole kalsiyum iyonu sızıntısı, kaspaz bağımlı apoptotik hücre ölümüne neden olabilir (Rozpedek ve ark., 2016).

ATF4, bir b-ZIP transkripsiyon faktörüdür ve ER-stres aracılı apoptozda rol oynayan CHOP gibi çeşitli UPR hedef genini kodlar (Oslowski ve Urano, 2011). Uzun süreli ER stresinin, tümör hücrelerini apoptotik hücre ölümüne daha açık hale getirebileceğini gösterilmiştir (Ozcan ve Tabas., 2012). Proteinlerin uygun şekilde katlanmasından sorumlu olan ER mekanizmalarının başarısız olduğu durumlarda apoptotik yol aktive olur. Uzun süreli ER stresi sırasında, adaptif yanıtlar ER homeostazını sürdürmek için yetersiz olduğunda, PERK'e bağlı sinyal yollarının pro-apoptotik sinyalleri ortaya çıkarabileceğini ve bunun sonucunda hızlı hücre ölümü meydana gelmektedir (Rozpedek ve ark., 2016). CHOP kaynaklı apoptozun yaygın olarak kabul edilen bir başka mekanizması, hayatta kalma yanlısı protein Bcl-2'nin baskılanmasıdır. ER stresi altında, CHOP, Bcl-2'nin ekspresyonunu aşağı regüle eder, hücreleri apoptoza duyarlı hale getirir. Son çalışmalar, Bcl-2 ile ilişkili atanojen 5'in (*Bag5*) prostat kanserinde aşırı eksprese edildiğini ve ER stresinin neden olduğu apoptozu inhibe ettiğini göstermiştir. *Bag5* aşırı ekspresyonu, yalnızca CHOP'un azalmasına değil, aynı zamanda BAX'ın ekspresyonunun azalmasına ve Bcl-2 gen ekspresyonunun artmasına da neden olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2014).

Birkaç çalışma, BPA'nın fare yumurtalık granüloz hücreleri (Xu ve ark., 2002), fare nöronal hücreleri (Lee ve ark., 2008) ve fare testis (Li ve ark., 2009) gibi çeşitli hücre veya organ tiplerinde apoptozu indüklediğine dair kanıtlar sağlamıştır. BPA, fare yumurtalık granüloz hücrelerinde proapoptotik bir protein olan *Bax*'in ekspresyonunu arttırmış ve eş zamanlı olarak anti-apoptotik bir protein olan *Bcl-2*'nin ekspresyonunu azaltmıştır (Xu ve ark., 2002). BPA, Fas sinyal yolu yoluyla fare testisindeki Leydig ve germ hücrelerinin apoptozunu indüklemiştir (Li ve ark., 2009). Sıçan nöroblastom (PC12) hücrelerinin BPA kaynaklı hücre ölümünün östrojen reseptörlerinden bağımsız olarak meydana geldiğini bildirilmiştir (Lee et al., 2007). ER stresine bağlı apoptozun kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patofizyolojisi ile yakından ilişkili olması nedeniyle, araştırmalar, uzun vadeli ER stresinin apoptozu ne kadar aktive edebileceğine odaklanmıştır (Wang ve ark., 2009). IRE1'in prostat kanseri hücre dizilerinde XBP1 ekleme yoluyla *siklin A1* ekspresyonunu düzenleyerek hücre proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir. Özellikle, XBP1'ler katalaz ekspresyonunu artırır ve XBP1'lerin kaybı, hücreleri oksidatif stres kaynaklı apoptoza duyarlı hale getirir (Vandewynckel ve ark., 2013).

ER'nin neden olduğu apoptozda yer alan mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmekle birlikte, ER stresi altında ER lümeninden salınan kalsiyum iyonlarının, apoptotik hücre ölümüyle sıkı bir şekilde bağlantılı kaspazların aktivasyonunda merkezi bir rol oynadığı açıktır (Rozpedek ve ark., 2016).

2.9. Prostat Kanseri ve ER Stresi İlişkisi

Prostat kanseri (PCa), cilt kanserinden sonra en sık teşhis edilen (Storm ve ark., 2016), batı ülkelerinde erkekler arasında kansere bağlı ölümlerin üçüncü önde gelen nedeniyken (Fontana ve ark., 2019), A.B.D'de ise erkeklerde kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Kanser istatistiklerine göre, 2018'de A.B.D'deki tüm kanserler arasında, erkeklerde kanser insidansının %19'unu oluşturmaktadır. Bu veriler doğrultusunda, yaklaşık yedi erkekten birinin yaşamları boyunca PCa teşhisi konacağı (Storm ve ark., 2016) ve 2018 yılında ise 164,690 yeni prostat kanseri vakası teşhis edileceği tahmin edilmektedir (Nagesh ve ark., 2018).

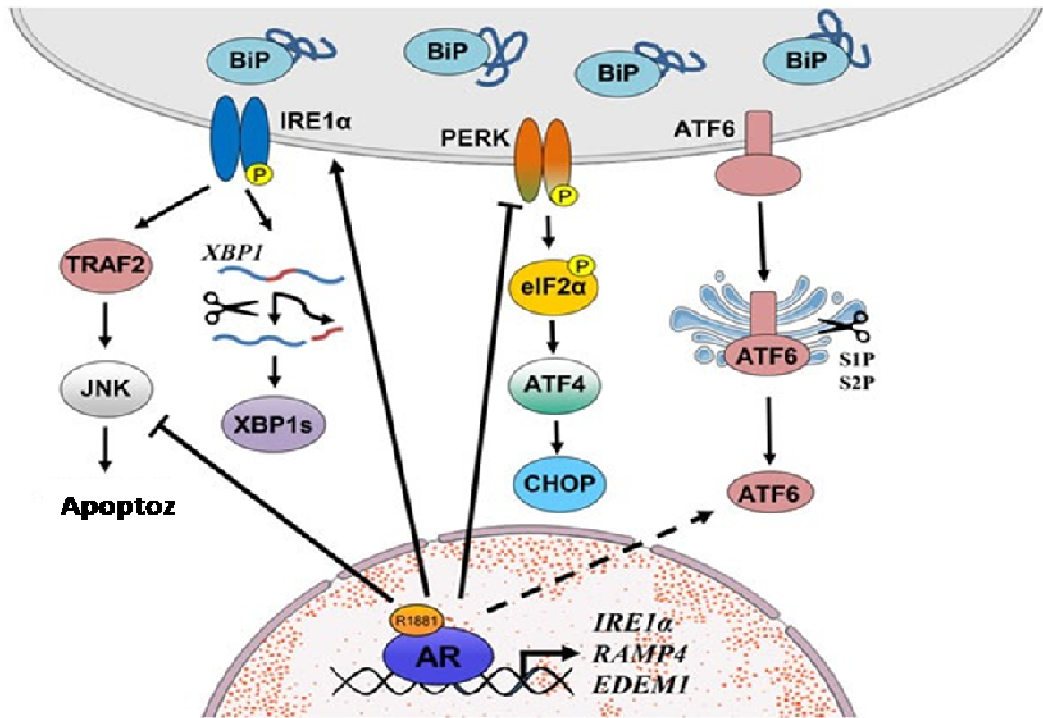
Hatalı katlanmış proteinlerin birikmesi ve ER adaptif kapasitenin başarısızlığı, kanser de dahil olmak üzere birçok kronik hastalıkta rol oynayan UPR'yi aktive eder.

Önemli bir salgı organı olan prostat, özellikle ER'nin düzgün çalışmasına bağlıdır ve ER stresine neden olan ajanlara veya koşullara karşı savunmasızdır. ER stresi ve UPR aktivasyonunun PCa ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Storm ve ark., 2016). Bir dizi çalışma, ER/UPR belirteçleri ile PCa gelişimi arasında pozitif bir ilişki olduğunu, gen ekspresyon profili, protein sentezi, bozunması ve işlenmesinde yer alan genlerin farklı şekilde eksprese edildiğini, ribozomal proteinler ve seminal vezikül salgılama proteinleri gibi protein sentezi, katlanması ve salgılanması ile ilişkili genlerin ekspresyonunun önemli ölçüde induklendiğini göstermektedir (Segawa ve ark., 2002; Storm ve ark., 2016). UPR'nin prostat kanseri hücrelerini aşağı regülasyonu, onların apoptotik yoldan kaçarak tümörigenezi arttırabileceğini düşündürmektedir (Vandewynckel ve ark., 2013).

PERK ve ATF6 ile karşılaştırıldığında, IRE1 α -XBP1s sinyalleşmesinin PCa'daki işlevsel rolü hakkında nispeten daha fazla veri vardır bulunmaktadır. IRE1 α -XBP1s kolu, PCa'da hayatta kalma yanlısı bir rol oynar, bu da IRE1 α sinyalini hedeflemenin PCa için yeni bir terapötik strateji olabileceğini düşündürmektedir IRE1 α yolağının aksine, PCa ilerlemesinde, PERK, eIF2 α ve ATF6'nın işlevleri hakkında çok az şey bilinmektedir (Sheng ve ark., 2015). Artan XBP1 eklemesi, kanser türlerinde gösterilmiştir ve daha ve zayıf sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. IRE1'in prostat kanseri hücre dizilerinde XBP1 ekleme yoluyla siklin A1 ekspresyonunu düzenleyerek hücre proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir (Vandewynckel ve ark., 2013). PERK aktivasyonu, tümör baskılanmasını ve uyku halini indüklerken; inaktivasyonun, tümör oluşumu, anjiyogenez ve metastaz gibi spesifik karsinogenez ayırt edici özellikleri üzerinde paradoksal etkilere neden olduğu görülmektedir (Vandewynckel ve ark., 2013). ATF4 ekspresyonunun, PCa hücrelerinde lösin veya androjen yoksunluğu ile induklendiği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2011). Hücreyi korumaya yönelik rollere sahip moleküler şaperonların ekspresyonu, PCa dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde yüksektir (Azad ve ark., 2015). PCa hücrelerinde en çok çalışılan ER şaperonu BiP'dir. Artan BiP ekspresyonu, daha yüksek PCa nüksü riski ve daha kötü sağkalım ile ilişkilidir (Pootrakul ve ark., 2006). Prostat tümörlerinde değişmiş *Bip* mRNA ekspresyonunun gözlemlenmesiyle UPR ve prostat tümörigenezi arasındaki bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir ve artmış mRNA ekspresyonu, hayatta kalma oranının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Vandewynckel ve ark., 2013). BiP, PCa da dahil olmak üzere birçok

kanserde hücre yüzeyinde saptanmış, ancak normal hücrelerde bulunmamıştır, bu da onun kansere özgü bir hücre yüzeyi belirteci olduğunu düşündürmektedir (Arap ve ark., 2004). Başka bir çalışma, androjen kaynaklı otofaji bozulmasını, PERK-eIF2 α -ATF4 yolu aktivasyonundan bağımsız olarak BiP protein seviyelerindeki bir artışa bağlamıştır (Bennett ve ark., 2010). BiP'nin PCa için bir biyobelirteç ve terapötik hedef olabileceği, UPR'nin adaptif sağkalım yönlerini hedeflemenin ve ER homeostazına müdahale etmenin potansiyel olarak PCa tedavisi için yeni ve umut verici bir yaklaşım olabileceğini düşünülmektedir (Storm ve ark., 2016).

Özetle, ER şaperonları, tümör sağkalımı ve tedavi direncinde kilit oyuncular olarak görünmektedir ve bu da onları potansiyel olarak değerli terapötik hedefler haline getirmektedir.



Şekil 2-9: Prostat kanserinde UPR sinyal yolağının şematik gösterimi

(Storm ve ark., 2016).

Androjen reseptörü (AR), ekspresyonlarını artırmak için IRE1 α , RAMP4 ve EDEM1 genlerinin yakınında bağlanır, böylece IRE1 α yolunu aktive eder, ancak aynı zamanda IRE1 α tarafından da aktive edilen pro-apoptotik JNK sinyalini inhibe eder. Tersine, PERK ve eIF2 α aktivitesini inhibe eder. Bununla birlikte, beklentilerin aksine ATF4 ve CHOP ekspresyonu androjene yanıt olarak artar; bu nedenle, prostat kanserinde PERK yolunun tam rolü ve androjenler tarafından düzenlenmesi daha fazla araştırma gerektirmektedir. ATF6 yolunun prostat kanseri hücrelerinde androjen sinyalleme tarafından düzenlenip düzenlenmediği şu anda bilinmemektedir. Düz çizgili oklar doğrudan belirlenmiş bir etkiyi gösterirken, kesik çizgili oklar dolaylı veya şu anda keşfedilmemiş etkileşimleri gösterir (Storm ve ark., 2016).

2.10. Memeli Hücre Kültüründe, Endoplazmik Retikulum Stresi ve UPR'nin Araştırılmasında Kullanılan Teknikler

ER'de protein katlanması, maya gibi tek hücreli organizmalarda UPR'nin evrimini açıklayarak, bireysel hücrelerin hayatta kalması için esastır. Ancak salgılama çok hücreliliğin temeli olduğundan, ER protein katlama homeostazı, memelilerin fizyolojisini güçlü bir şekilde etkiler. ER homeostazının düzensizliği insanlarda kronik hastalıklara neden olabilir. Bu nedenle, UPR ve ER stresi ile ilgili hastalıkları anlamak için memeli hücrelerini kullanarak ER stresi ve UPR'yi incelemek önemlidir.

Genellikle ortama bir ER stres indükleyicisi eklenerek UPR'nin aktivasyonunu ve bunun sonucunda ortaya çıkan aşağı akış tepkilerini ölçülmektedir. Ancak bu sonuçlar, ER lümeni içinde hatalı katlanmış ve katlanmamış protein birikimini doğrudan yansıtamayabilir. Hücrelerdeki ER stres seviyelerini doğrudan ölçmek oldukça zordur. ER stres seviyesi ölçümü yöntemlerinden bazıları arasında, ER lümeninin elektron mikroskopu kullanılarak hücre ve dokularda incelenmesi, ER stresi sırasında Real-Time Redox ölçümlerinin yapılması, UPR ana düzenleyicilerinin aktivasyonunu incelemek (Real-Time PCR ile ER stres belirteçlerini tespit etmek için primerlerin kullanılması, uygun antikorlar kullanılarak Western blot tekniği uygulanması), UPR downstream (aşağı akış) belirteçlerini ve yanıtlarını incelemek (İmmün boyama ve immünofloresan tekniklerinin kullanılması), transkripsiyonel aktivitenin ölçülmesi (ER protein katlama kapasitesini artırmak için protein katlama ve işlemede yer alan genlerin transkripsiyonunun Real-Time PCR cihazı kullanılarak kantitatif olarak ölçülmesi), UPR'nin translasyonel atenuasyonun (zayıflama) ölçülmesi (yeni sentezlenmiş proteinlerin metabolik puls etiketlemesi ve standart protokoller kullanılarak poliribzom profillemesi ile ölçülmesi), ERAD protein stabilitesinin ölçülmesi (immünoablota teknikleri kullanılarak), mRNA bozunmasının ölçülmesi (Aktinomisin D uygulanarak hücresel mRNA transkripsiyonu zayıflatılan hücrelerden elde edilen cDNA'ların Real-Time PCR kullanılarak ölçülmesi), ER stres aracılı apoptozun ölçülmesi (İmmünoablota ile kaspaz-3 bölünmesinin (Hücre Sinyali) ölçülmesi, hücrelerin PE Annexin-V ile boyanması ardından Floresan Aktivite Hücre Ayırma (FACS) analizi, kolorimetrik

TUNEL¹¹ Sistemi kullanılarak TUNEL boyaması ve hücre canlılığı testlerinin kullanılması) gösterilebilir (Osowski ve Urano, 2011; Sicari ve ark., 2020).



¹¹ DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlayan yöntemdir. DNA fragmentasyonu histokimyasal olarak gösterilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü ve Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

2',7'-Dihidroodiklorofluoressein diasetat (H2DCF-DA)	Thermo Scientific D399
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Biomatik A3338
Absolu alkol	Sigma-Aldrich 32221
Akrilamid-bis (29:1; %30)	Amresco 1610156
Amonyum persülfat (>%98) (APS)	Sigma-Aldrich A3678
Anti Chop DDIT3 antikoru	Boster M00311
Anti β -aktin antikoru	Sigma-Aldrich SAB550000-1
Anti-rabbit IgG, HRP-bağlı antikor	Boster BA1054
Apoptoz hasar tespit kiti (Annexin V FTIC/PI)	Biolegend (640914)
Ayırma jeli (Resolving) tamponu, 1,5 M Tris HCl tamponu, pH 8,8	Bio-Rad 161-0798
Bisfenol A (%99)	Sigma-Aldrich 239658
Bisfenol F (%99)	Sigma-Aldrich 51453
Bisfenol S ($\geq$ %98)	Sigma-Aldrich 43034
BLUelf protein standartı (3.5-245 kDa)	Jena Bioscience PS-105
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich A1933
cDNA sentez kiti (iScript™ cDNA Synthesis Kit)	Biorad 1708891

Dimetil sülfoksit (DMSO)	Biomatik A2424
Dubelco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri/F12 besiyeri (DMEM/F12)	Wisent-Multicell 319010CL
Etil alkol	Merck K38999227
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	Multicell 625 060 CG
Fetal sığır serumu (FBS)	Wisent-Multicell 080110
Fosfat tamponu (PBS-CMF) (kalsiyum ve magnezyumsuz) (10x)	Wisent-Multicell 311012CL
Glisin	Sigma-Aldrich 56-40-6
Hücre bağlayıcı tampon	Biolegend 420201
Metanol	Merck 106007
Ön ayırma jeli (Stacking) tamponu, 0,5 M Tris tamponu, pH 6,8	Sigma-Aldrich 67-56-1
Örnek indirgeyici ajan	Sigma-Aldrich S3401-10VL
Penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) çözeltisi	Wisent-Multicell 450201EL
Protein standardı (10-250 kDa)	Thermo Scientific 26619
RPMI 1640 besiyeri	Panbiotech p-04-16100
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich 151-21-3
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck 106469
Sodyum klorür (NaCl)	J. T. Baker 0278
Tetrametiletildiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich 110-18-9
Tripan mavisi	Fluka 93595
Tripsin (1:250)	Multicell 625-035-TG
Tris Hidroklorür (Tris HCL) (pH: 6,8)	Bio-Rad 161-0799

Tween 20	Applichem A49640
Western blot jel görüntüleme çözeltisi	Thermo Fisher Scientific 34075
Yağsız süt tozu	Sigma-Aldrich 70166
β -Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich 60-24-2

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (30-300 μ L)	Eppendorf
Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,1-2,5 μ L; 0,5-10 μ L; 2-20 μ L; 20-200 μ L; 100-1000 μ L)	Eppendorf
Bidistile su cihazı	Millipore Gradient
Blok ısıtıcı	Stuart SBH130D
Buzdolabı (+4°C)	Arçelik 5231 NFY
CO ² 'li inkübatör	Thermo-Scientific Heracell 150i
Çalkalamalı blok ısıtıcı	Biosan TS-100C
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik 2041 D
Derin dondurucu (-80 °C)	Daihan-Scientific Wisecry
Elektroforez güç kaynağı	Bio-Rad PowerPac™ Basic Power Supply (1645050)
Elektronik hassas terazi	Precisa XB 220 A
Etüv	Nüve
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus CKX4
Flow sitometri	Acea-Novocyte (1000)
Hassas terazi	Mettler H20
Jel görüntüleme cihazı	Vilber Louröat Fusion Fx

Laminar kabin ('Biosafety Level 2')	Tezsan
Mikrodalga fırın	Beko MD 1510 S
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Epoch Biotek
Mikrosantrifüj aleti	Hettich Micro 120
Mini orbital çalkalayıcı	Stuart SSMI
Otoklav	Hirayama HV-50L
Otomatik hücre sayımı cihazı	Luna Automated Cell Counter (Logos model: L10001)
Otomatik pipetör	Eppendorf
pH metre	Hanna HI 1131 B
Real Time PCR Cihazı	RocheLightcycler 480

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Enjektör (10 mL; 50 mL)	Set inject
Falkon tüp (15 mL; 50 mL)	Citotest
Falkon tüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Filtre kağıdı (110 mm)	Schleicher&Schvell
Hücre kültürü flaskı (25 cm ² ; 75 cm ²)	Nest
Kriyo vial (2 mL)	Greiner bio-one
Lateks eldiven	Broche
Mikroplaka (6; 24; 96 kuyucuklu)	Nest
Mikrotüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Nitril eldiven	Broche
Otoklav bandı	Sussex
RNA saklama kutusu	Greiner bio-one

Kalın filtre kağıdı (110 mm)	Schleicher&Schvell
Dikey elektroforez jel kaseti, büyük	Bio-Rad Mini Protean® 1653311
Dikey elektroforez jel kaseti, küçük	Bio-Rad Mini Protean® 1653308
İnce duvarlı PCR tüpü (0,2 mL)	Greiner bio-one
Polivinilidın florür (PVDF) transfer membranı 0,2 µm	Bio-Rad
Enjektör ucu steril filtre (0,22 µm naylon)	Minisart-Sartorius
Mikrotüp (0,5 mL; 1,5 mL)	Greiner bio-one

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği

Cam malzemeler musluk altında 7-8 defa bol su ile çalkalandılar ve sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içeren distile su dolu kovada 1 gece bekletildi. Ertesi gün tekrar musluk altında 7-8 defa yıkanarak çamaşır suyunun malzemelerden tamamen uzaklaştırılması sağlandı ve 1 gece distile su içeren kovada bekletildi. 40°C'lik etüvde kurutulan cam malzemeler, 165°C'de 2 saat süre ile kuru-sıcak hava sterilizasyonuna tabi tutuldular. Isıya dayanıklı pipet uçları, mikrotüpler, schott şişelerin kapakları gibi plastik malzemelerin ve hazırlanan çözeltilerin sterilizasyonu otoklavda 121°C'de 3 atm basınçta 15 dk.'da gerçekleştirildi. Besiyeri ve serum gibi ısıya dayanıksız çözeltiler ise 0,22 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek steril edildi.

Hücre kültürü laboratuvarı çalışma alanları ve laminar kabinin içi %70'lik alkol ile düzenli olarak temizlendi. Çalışma öncesi ve sonrasında belli süreler ile hücre kültürü laboratuvarı ve laminar kabinin UV lambaları açılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı. Hücre kültürü laboratuvarında çalışırken tek kullanımlık galoş ve eldiven kullanıldı, laboratuvar önlüklerinin ise başka çalışmalarda kullanılmamasına özen gösterildi.

3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini

Doktora çalışmasında, PCa'nın farklı aşamalarını taklit ettiği bilinen iki prostat hücre dizisi (PNT1A ve PC-3) kullanıldı. PNT1A, ölümsüzleştirilmiş, tümörijenik olmayan, prostat epitel hücreleridir. PNT1A'nın, androjenlere ve büyüme faktörlerine yanıt olarak prostatik epitel proliferasyonu gibi hücresel süreçlerin analizi için iyi bir model olduğu kanıtlanmıştır (Avancès ve ark., 2001). PC-3, PCa'nın ileri aşamalarını taklit edebilen metastatik adenokarsinom hücreleridir. Lokalize PCa metastazlarından izole edilen PC3 hücreleri, tümörijenik, androjenden bağımsız ve p53 negatiftir (Rizzi ve ark., 2014).

PNT1A hücreleri İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan temin edildi. PC-3 ise Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC) bankasından satın alındı. Hücre dizileri kriyo vialler içerisinde -196°C'de sıvı azot tankı içerisinde saklandı.

3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

Tripsin/EDTA çözeltisi (%0,2 / %0,04): 0,2 g tripsin ve 0,04 g EDTA tartılarak 100 mL bidistile suda çözündürüldü. 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek steril edildi. Porsiyonlanarak -20°C'de saklandı.

Fetal sıgır serumu (FBS): Hazır inaktive edilmiş FBS kullanıldı. Ancak, FBS inaktive edilmemiş ise; 56°C'de 30 dk. inkübe edilerek inaktive edildi. Porsiyonlanarak -20°C'de saklandı. Çalışma günü 37°C'de çözündürülerek kullanıldı. FBS, besiyerine eklenmeden önce 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek steril edildi.

Antibiyotik çözeltisi [penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) %10]: 1 mL penisilin (100U) / streptomisin (100 µg/mL) ana stok çözeltisinden alınır, 10 mL'ye CMF-PBS ile tamamlanır.

Hücre dondurma çözeltisi: 10 mL DMSO, 10 mL FBS ve 1 mL %1'lik antibiyotik çözeltisi hücreler için uygun besiyeri ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

PNT1A hücresi için besiyeri: L-Glutamin içeren RPMI-1640 besiyerine 10 mL inaktive edilmiş FBS (%10), 10 mL %1'lik antibiyotik çözeltisi eklenerek 100 mL olacak şekilde hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce besiyeri 37°C'de %5 CO₂'li

inkübatörde 15 dk. inkübe edilerek pH ve sıcaklık ayarlaması yapıldı. Taze olarak hazırlandı.

PC-3 hücresi için besiyeri: DMEM/F12 besiyerine 10 mL inaktive edilmiş FBS (%10), 10 mL %1'lik antibiyotik çözeltisi, eklenerek 100 mL olacak şekilde hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce besiyeri 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 15 dk. inkübe edilerek pH ve sıcaklık ayarlaması yapıldı. Taze olarak hazırlandı.

3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması

Sıvı azot tankından çıkarılan donmuş haldeki hücreler 37°C'lik su banyosunda 1-2 dk. çözülene kadar bekletildi. Vial kapağının su ile temas etmemesi için dikkat edildi. Vial %70'lik alkol ile silindi ve laminar kabin içine alındı. Hücreler, %10 FBS içeren besiyeri bulunan 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı, besiyerinde süspande edildi ve 1500 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelleti besiyerinde tekrar süspande edildi ve DMSO'nun toksik etkisinden kurtulmak amacıyla işlem tekrar edildi. Daha sonra, hücre pelletine 1 mL besiyeri eklendi, yavaşça pipetleme yapılarak hücreler süspande edildi ve 7-10 mL besiyeri içeren 25 cm²'lik ya da 75 cm²'lik flasklara ekildi. Flasklar 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldılar.

3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)

Hücre kültür flasklarının tüm yüzeyini kaplamış halde bulunan yoğunlaşmış hücreler için 'konfluent durumda' ifadesi kullanılır. Hücreler konfluent duruma geldiğinde pasajlandılar. Pasajlama için flask inkübatörden alındı, laminar kabinde flask içerisindeki besiyeri döküldü. Hücrelerin yüzeyi 2 mL CMF-PBS çözeltisi ile yıkandı. Bu adım, tripsin aktivitesini azaltacak serum protein kalıntılarını uzaklaştırmak amaçlı yapılır. Yıkama işleminden sonra CMF-PBS döküldü ve 2 mL tripsin/EDTA çözeltisi ilave edildi, flask 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 5-10 dk. bekletildi. Tripsin ile hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması sağlandı. Hücrelerin tripsin içinde gereğinden fazla beklememesi için mikroskop ile yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmelidir. Tripsin aktivasyonunu durdurmak amacıyla flaska 2-3 mL serumlu besiyeri eklendi, pipetleme yapıldı ve hücreler 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pellet 2 mL besiyeri ile süspande edildi. Hücreler hemisitometrede sayılarak, yaklaşık 10⁵ hücre/mL olacak şekilde içerisinde besiyeri bulunan flasklara ekildi. Flasklar, %90 bağıl nem, 37°C'de %5

CO₂'li inkübatörde inkübe edildiler. Hücre dizisinin devamlılığının sağlanması için pasajlama işlemi ortalama haftada 2-3 kez yapıldı.

3.4.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücre kültüründe meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklar ile dondurularak saklandılar. Bölüm 3.4.5.'te elde edilen hücre pelletinin üzerine 1 mL hücre dondurma çözeltisi eklendi ve pastör pipeti ile pipetleme yapılarak karıştırıldı. Yaklaşık 10⁶ hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stokları soğuğa dayanıklı kriyo viallere aktarıldı, sırasıyla -20°C'de 30 dk., -80°C'de 16-24 saat bekletildikten sonra sıvı azot tankına kaldırılarak saklandı.

3.4.7. Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin sayımı tripan mavisi testi ile yapıldı. Test, canlı hücrelerin tripan mavisi boyasını hücre içine almazken, ölü hücrelerin bozulmuş hücre membranlarından boyayı hücre içerisine alabilmeleri esasına dayanır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde; canlı hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenirken, ölü hücreler tamamıyla mavi renge boyanmış halde gözlenirler.

Hücre sayımı otomatik hücre sayım cihazı ile gerçekleştirildi. Ayrıca, kontrol etme amacıyla hücre sayımı thoma lamı (hemositometre) adı verilen 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4x16 küçük kareden oluşan özel sayım lamaları kullanılarak da ışık mikroskobunda gerçekleştirildi. Hücre süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı (Formül 3-1):

$$\text{Toplam hücre sayısı/mL} = \text{Sayım sonucu} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10^4 \times \text{Besiyeri miktarı (mL)}$$

Formül 3-1

3.5. Sitotoksisite Testleri

BPA, BPF ve BPS'ye maruz bırakılan hücrelerin canlılığının tespiti MTT testi uygulanarak gerçekleştirildi.

3.5.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

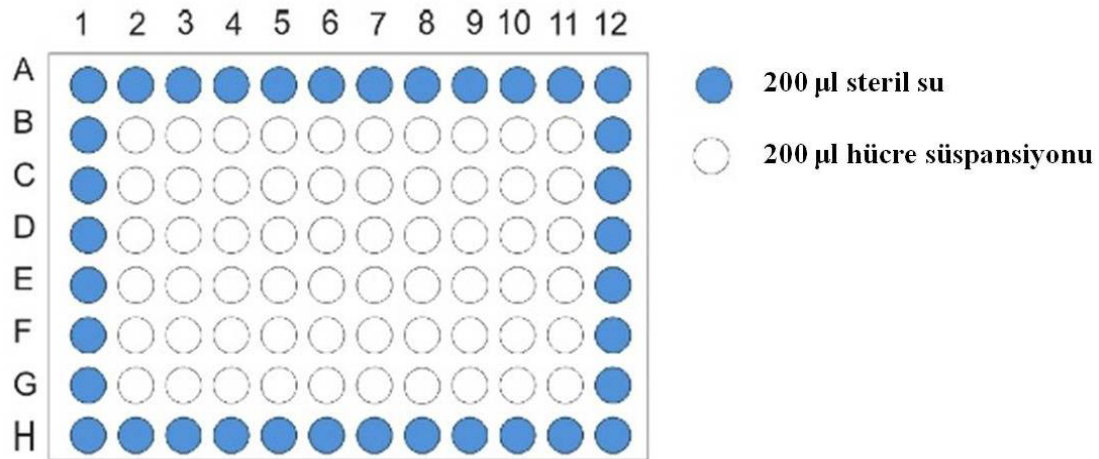
Hücre kültürlerinin mikroplakalara uygulanması esnasında kuyucuklarda düzensiz hücre yoğunluğu gerçekleşebilir. Hücre süspansiyonunun homojen olduğundan emin olunmalı ve hücre topaklarının oluşumu engellenmelidir. Aynı

zamanda, testin uygun hassasiyette olması için test esnasında hücrelerin yakın bitişiklikte olması gerekir. Hücrelerin kuyucuklar arasında düzenli ve eşit dağılıp dağılmadıkları ve sağlıklı olup olmadıkları mikroskopta incelenmelidir. Hücre kültürleri aşağıda belirtildiği şekilde 96 kuyucuklu mikrolakalarda hazırlandı:

1. Bir rezervuar içerisine steril bidistile su konuldu ve inkübasyon sırasında kültür besiyerinin buharlaşmasını azaltmak amacıyla 96 kuyucuklu mikrolakanın A ve H sıraları ile 1. ve 12. sütunlarındaki her bir kuyucuğuna 100 μ L su dağıtıldı (Şekil 3-1).

2. Her bir kuyucukta 10^4 hücre 100 μ L besiyeri içinde olacak şekilde 96 kuyucuklu mikrolakanın diğer kuyucuklarına hücreler şu şekilde dağıtıldı: $6,5 \times 10^5$ hücre 6,5 mL besiyerinde süspande edildi ve steril rezervuar içerisine hücre süspansiyonu konuldu. 96 kuyucuklu mikrolakalara Şekil 3-1’de gösterildiği şekilde 100 μ L hücre süspansiyonu dağıtıldı.

3. 96 kuyucuklu mikrolakadaki hücre süspansiyonu 37°C’de %5 CO²’li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi.



Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikrolakaya hücre ekimi.

3.5.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Sitotoksosite testleri için BPA stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mM konsantrasyonda olacak şekilde cam vial içinde 22,829 mg BPA 1 mL DMSO’da çözülerek stok çözelti hazırlandı.

Sitotoksosite testleri için BPF stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mM konsantrasyonda olacak şekilde cam vial içinde 20,023 mg BPF 1 mL DMSO'da çözülerek stok çözelti hazırlandı.

Sitotoksosite testleri için BPS stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mM konsantrasyonda olacak şekilde cam vial içinde 25,027 mg BPS 1 mL DMSO'da çözülerek stok çözelti hazırlandı.

%10'luk DMSO çözeltisinin hazırlanışı: 10 mL DMSO besiyeri ile 100 mL'ye tamamlandı. Maruziyet plakalarına uygulama sırasında 1/10 oranında seyreltilerek maruziyet sırasında konsantrasyonunun %1 olması sağlandı.

%1'lik SDS ana stok çözeltisinin hazırlanışı: 0,1 g SDS, PBS ile 10 mL'ye tamamlandı.

%0,1'lik SDS çalışma çözeltisinin hazırlanışı: %1'lik SDS ana stok çözeltisinden 1 mL alınıp besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı. Maruziyet plakalarına uygulama sırasında 1/10 oranında seyreltilerek hücrelere 0,1 mg/mL konsantrasyonunda SDS (~IC50) pozitif kontrol olarak uygulandı (ISO-10993-5) ve çözelti içindeki PBS konsantrasyonunun da %1 olması sağlandı.

BPA, BPF ve BPS'nin çözündürüldüğü DMSO'nun hücrelere maruziyet sırasında konsantrasyonunun %1'i geçmemesi gerektiğinden dolayı BPA 100 katı konsantrasyonda stok çözeltisi halinde DMSO içerisinde hazırlandı. Daha sonra BPA, BPF ve BPS çözeltilerinin farklı konsantrasyonları besiyerinde seyreltilerek aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

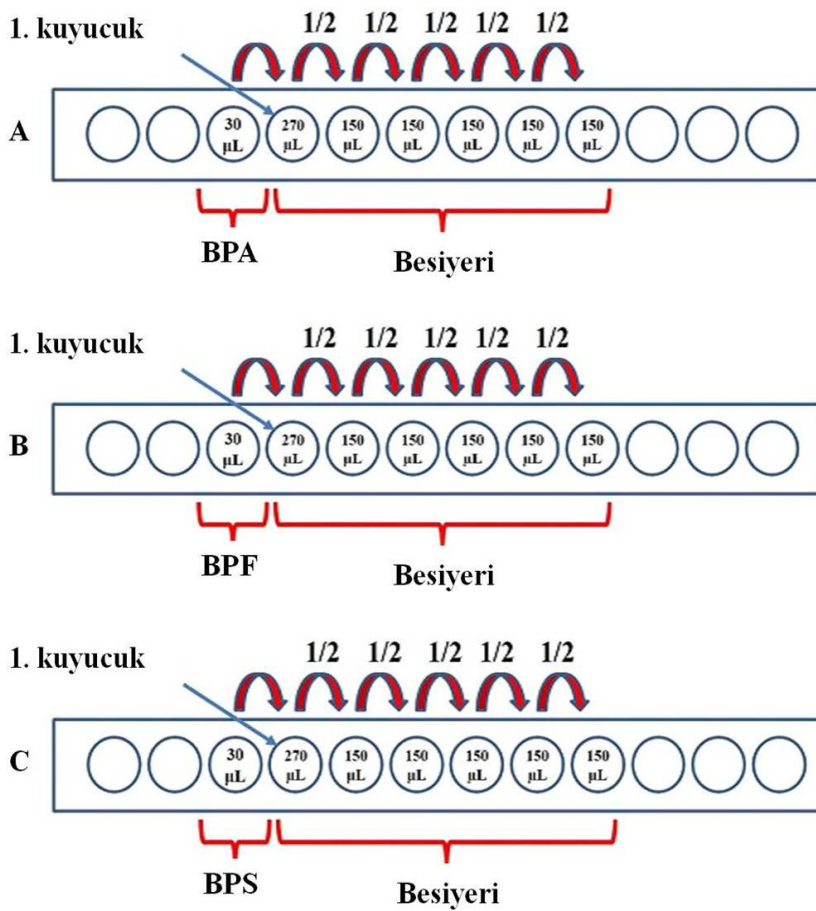
BPA, BPF ve BPS çözeltilerinin seyreltilmesi: Stok BPA, BPF ve BPS çözeltileri 96 kuyucuklu mikropalakada 1/10 oranında besiyeri ile seyreltildi. Daha sonra hazırlanan bu çözeltiden 1/2 oranında seyreltme yapılarak toplam 6 konsantrasyonda BPA, BPF ve BPS standart çözeltileri hazırlandı. Seyreltme işlemi için uygulanan plaka düzeni Şekil 3-2'de gösterildi:

1. A, B ve C sırasındaki 1. kuyucuğa 270 µL besiyeri 2.-6. kuyucuklara 150 µL besiyeri konuldu.

2. A sırasındaki 1. kuyucuğa BPA'nın DMSO içinde hazırlanan çözeltisinden 30 µL, B sırasındaki 1. kuyucuğa BPF'nin DMSO içinde hazırlanan çözeltisinden 30 µL ve

C sırasındaki 1. kuyucuğa BPS'nin DMSO içinde hazırlanan çözeltisinden 30 μL konuldu ve iyice karıştırıldı.

3. 1. kuyucuktan 150 μL alınarak 2. kuyucuğa aktarıldı ($1/2$ oranında seyreltme), iyice karıştırıldı ve bu kuyucuktan 150 μL alınarak 3. kuyucuğa aktarıldı. Bu işlem 5. kuyucuk da dahil olmak üzere yapıldı. En son 6. kuyucuktaki fazla olan 150 μL atıldı. Bu şekilde toplam 6 konsantrasyonda olmak üzere BPA, BPF ve BPS seyreltmeleri hazırlanmış oldu.



Şekil3-2: BPA, BPF ve BPS'nin $1/2$ oranında seyreltilmesi.

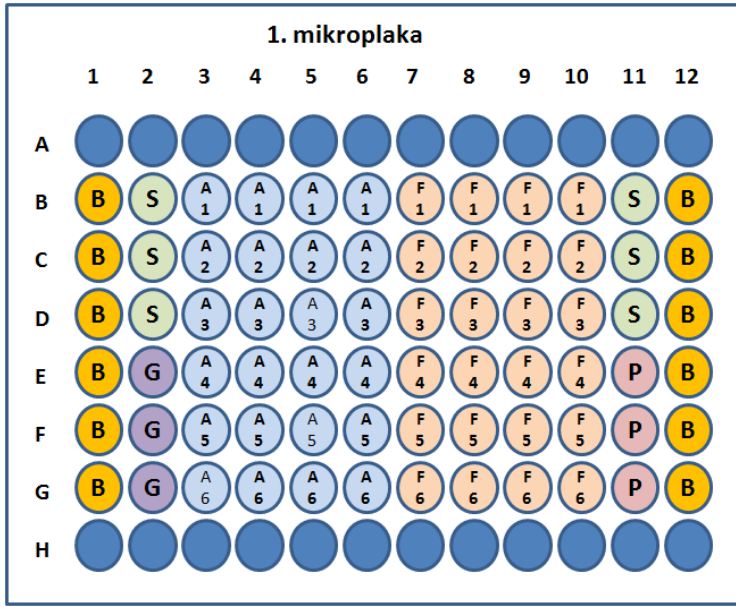
3.5.3. BPA'nın Hücre Kültürüne Maruziyeti

1. Bölüm 3.5.1'de belirtilen 24 saatlik inkübasyonun sonunda hücre kültür mikropalakasındaki kuyucuklardan (A ve H sırası hariç) 8 kanallı pipet kullanılarak kültür besiyeri uzaklaştırıldı.

2. Bu kuyucuklara 50 μ L PBS ilave edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi (kuyucuk yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin kazınmamasına, zarar görmemesine dikkat edilmelidir).

3. Vakit kaybetmeden her bir kuyucuğa 90 μ L taze hücre kültürü besiyeri eklendi (hücre katmanının kurumasından dolayı oluşabilecek hücre ölümü veya stresini engellemek için hızlı yapılmalıdır).

4. Maruziyet mikrolakaları Şekil 3-3'te gösterildiği şekilde düzenlendi:



A + H sıraları: Steril bidistile su

B: Kültür besiyeri + hücre yok (blank, negatif kontrol)

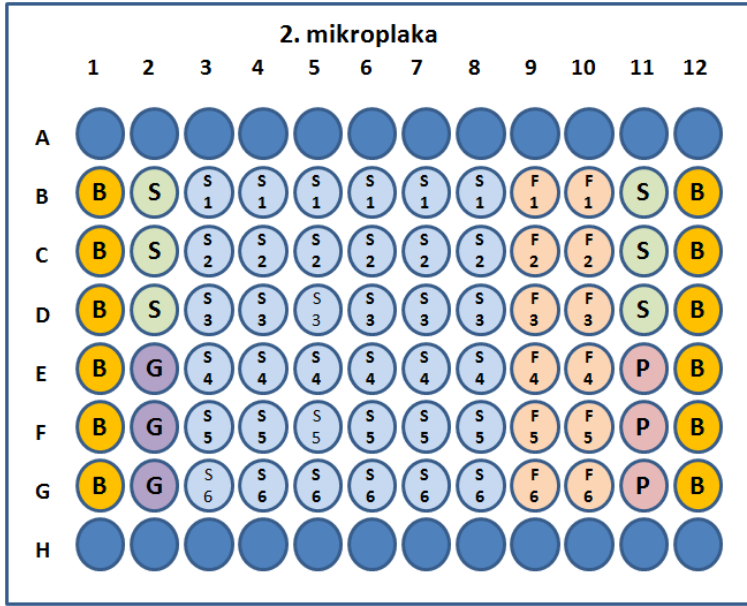
G: Kültür besiyeri + hücre (hücre büyüme kontrolü)

S: Kültür besiyeri + hücre + DMSO (%1) (çözücü kontrolü)

P: Kültür besiyeri + hücre + SDS (0,1 mg/mL) (pozitif kontrol)

A₁, A₂, ..., A₆: Kültür besiyeri + hücre + BPA'nın 6 farklı konsantrasyonu

F₁, F₂, ..., F₆: Kültür besiyeri + hücre + BPF'nin 6 farklı konsantrasyonu



A + H sıraları: Steril bidistile su

B: Kùltür besiyeri + hücre yok (blank, negatif kontrol)

G: Kùltür besiyeri + hücre (hücre büyüme kontrolü)

S: Kùltür besiyeri + hücre + DMSO (%1) (çözücü kontrolü)

P: Kùltür besiyeri + hücre + SDS (0,1 mg/mL) (pozitif kontrol)

S1, S2, ..., S6: Kùltür besiyeri + hücre + BPS'nin 6 farklı konsantrasyonu

F1, F2, ..., F6: Kùltür besiyeri + hücre + BPF'nin 6 farklı konsantrasyonu

Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikropılakalarının düzeni.

5. 1 ve 12. Sütunların B-G kuyucuklarına 100 µL besiyeri konuldu (blank, negatif kontrol).

6. B2, C2 ve D2 kuyucuklarına 10 µL hücre kùltürü besiyeri konuldu (hücre büyümesi kontrolü, G).

7. E2, F2, G2, B11, C11 ve D11 kuyucuklarına 10 µL %10'luk DMSO çözeltisi konuldu (çözücü kontrolü, S).

8. E11, F11 ve G11 kuyucuklarına 10 µL %0,1'lik SDS çözeltisi konuldu (pozitif kontrol, P).

9. A1-A6 şeklinde yazılmış kuyucuklara Bölüm 3.5.2'de belirtildiği üzere seyreltmeleri yapılmış BPA çözeltilerinden 10'ar µL tatbik edildi (6 konsantrasyon, her konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı). F1-F6 şeklinde yazılmış kuyucuklara Bölüm 3.5.2'de belirtildiği üzere seyreltmeleri yapılmış BPF çözeltilerinden 10'ar µL tatbik edildi (6 konsantrasyon, her konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı). S1-S6 şeklinde yazılmış kuyucuklara Bölüm 3.5.2'de belirtildiği üzere seyreltmeleri yapılmış BPS

çözeltilerinden 10'ar μL tatbik edildi (6 konsantrasyon, her konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı). Her test 1 mikrolakada 48 saatlik maruziyet için hazırlandı. Aynı düzende 2. farklı bir günde çalışılmak üzere toplam her konsantrasyon için 6 tekrar yapıldı.

10. 96 kuyucuklu mikrolakada 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 48 saat inkübe edildi.

MTT testi testleri için yukarda belirtildiği şekilde ayrı maruziyet plakaları oluşturuldu. PNT1A ve PC-3 hücreleri için yukarıda belirtilen koşullarda çalışıldı.

3.6. BrdU Testi

BrdU Testi Protokolü

1. Proliferasyon testi için çoğaltılan hücreler 96 kuyucuklu mikrolakaya her birkuyucukta 1×10^4 hücre/100 μL besiyeri olacak şekilde ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelere son hacim 100 μL olacak şekilde 1, 10, 50 μM konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılarak 48 saat inkübe edildi. 'Background' kontrol ve blank için de mikrolakada yer ayrıldı.

2. 'Background' kontrol hariç her bir kuyucuğa 10 μL BrdU etiketleme çözeltisi eklendi (son konsantrasyon: 10 μM BrdU) ve 37°C 'de 2,5 saat süreyle hücreler inkübe edildi. 'Background' kontrol, spesifik olmayan bağlanmaları kontrol etmek amacıyla kullanılır.

3. Inkübasyon sonrasında üst faz (besiyeri karışımı) döküldü.

4. Her bir kuyucuğa 200 μL FixDenat (Vial 2) eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi.

5. Mikrolakadan FixDenat çözeltisi uzaklaştırıldı.

6. Her bir kuyucuğa 100 μL anti-BrdU-POD çalışma çözeltisi ilave edildi. Yaklaşık 90 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

7. Mikrolakadan antikor konjugatı uzaklaştırıldı ve kuyucuklar üç kez 200 μL yıkama çözeltisi (PBS, 1x) ile yıkandı.

8. Son yıkama çözeltisi de uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 μL substrat çözeltisi eklendi. Fotometrik ölçüm için renk değişimi yeterli oluncaya kadar (5-30 dk.) oda sıcaklığında inkübe edildi.

9. Oluşan rengin şiddeti 370 nm'de (492 nm referans dalga boyuna karşı)mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Proliferasyon indeksini hesaplamak için önce kontrol ve maruziyet gruplarından blank değerlerinin ortalaması çıkarıldı. Maruziyet grubunun değerleri kontrol grubuna göre kıyaslanarak relatif BrdU hücre proleferasyonu % olarak hesaplandı.

3.7. Flow sitometri ile Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Tayini

3.7.1. Diklorofluoressein (DCF) Testi ile ROS Tayini

Dihidrodikloroflorosin diasetat ($H_2DCF-DA$), hücre kültürü çalışmalarında,oksidatif hücresel hasarı tespit etmek için kullanılan bir tarama yöntemidir. Meydana gelen değişiklikler, floresan flow sitometri ile ölçülür, böylelikle, oksidatif hücrelerin sayısı tespit edilir. Lipofilik özellikte olan ve floresans özelliği göstermeyen $H_2DCF-DA$, plazma membranından geçerek hücre esterase ile reaksiyona girer.Bu reaksiyon sonucu, hidrofilik özellik gösteren bir alkol yapısında olan H_2DCF molekülünü meydana getirir. ROS varlığında, H_2DCF , oksidasyona uğrayarak floresan özellik gösteren DCF molekülüne dönüşür (Karlsson ve ark., 2010).

DCF testi için çözeltilerin hazırlanışı

DCFH2-DA stok çözeltisi:20 mM olacak şekilde DMSO'da çözündürülerek hazırlandı.

BSA çalışma çözeltisi (%1): 30 mg BSA (Sığır serum albumin) 3 mL PBSiçerisinde çözündürülerek hazırlandı.

Test maddeleri:Bölüm 2.5.2'de bahsedildiği şekilde BPA, BPF ve BPS için hazırlanan ana stok çözeltileri, son maruziyet konsantrasyonları 0,1, 1, 10 μM olacak şekilde 24 kuyucuklu mikrolakaya uygulandı.

Testin Yapılışı

1. Yaklaşık $2.5 \times 10^3/100 \mu L$ /kuyu olacak şekilde 6 kuyulu mikrolakalara dağıtılan hücreler $37^\circ C$ 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 48 saat inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Her kuyuya taze besiyeri eklenerek 'Unstained' kontrol hücre kuyusu

hariç son konsantrasyonlar 0, 0,1, 1 ve 10 μ M olacak şekilde BPA, BPF ve BPS eklendi ve 48 saat inkübe edildi.

3. 48 saatlik maruziyetin ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve her kuyu 1 mL PBS (1x) ile 2 defa yıkandı. Bu yıkamaların ardından her kuyuya 0,5 mL %1'lik tripsin eklenerek hücreler tripsinize edildi ve 1,5 mL'lik mikrosantrifüje alındı.

4. Elde edilen hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildikten sonra sonra hücre pelleti 3 defa 1 mL PBS (1x) ile yıkandı. Son yıkamadan sonra hücre pelleti 1 mL PBS (1x) ile süspande edildi.

5. 'Unstained' kontrol hücre süspansiyonu hariç her maruziyet hücrelerine 1 μ L H₂DCF-DA (20 mM) eklenerek 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 30 dk. inkübe edildi.

6. Ardından boyanın uzaklaştırılması için hücreler 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

7. Pellet üzerine 200 μ L PBS (1x) ilave edilerek hücreler süspande edildi ve 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildi.

8. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra her tüpe hazırlanan %1'lik BSA çözeltisinden 150 μ L eklenerek hücreler süspande edildi.

9. Floresans yoğunluğu flow sitometride (ACEA NovoCyte, FITC filtre, eksitasyon/emisyon: 485/535 nm) ölçüldü. Deneyler, her konsantrasyon için en az 3 tekrar ve aynı koşullarda farklı 2 günde çalışmak üzere toplam en az 6 tekrar olacak şekilde yapıldı.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Veri analizinde, grafikteki X eksen, hücrenin boyutu ile ilişkili olan ileri dağılım ('Forward scatter', FSC) parametresini gösterirken; Y eksen ise, hücre içindeki bileşenlerle ilgili olan yan dağılım ('Side scatter', SSC) parametresini göstermektedir. Analiz edilen hücreler FSC/SSC grafiğinde belirli alanlara düşerler. Bu alanlardan incelenecek hücrelerin yeri belirlenerek 'kapılama' yapılır. Tez çalışmasında, her analiz ortamında 10⁴ hücre değerlendirildi. Hücrelerde meydana gelen ROS, ortalama floresans yoğunluğu ('mean fluorescence intensity', MFI) olarak ifade edildi.

Maruziyet grupları ile kontrol grubu arasındaki değişimin saptanmasında gözlemlenen % değişim (% MFI) ifade edildi.

3.8. Flow Sitometri ile Apoptoz Tayini

3.8.1. Annexin V-FITC/PI Testi ile Apoptoz Tayini

Normal şartlarda, negatif yüklü fosfatidilserin hücre membranının iç kısmında sınırlanmış durumda bulunmaktadır. Hücre apoptoza girdiğinde ise, fosfatidilserin birimleri hücre membranının dış yüzeyine doğru yer değiştirmektedir (Güleş ve Eren, 2008). Anneksin V, hücre membranının dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserine bağlanma kabiliyeti olan bir proteindir, bu yüzden, fluoresein isotiyosiyanat (FITC) gibi floresan özellik gösteren bir molekül ile işaretlendiğinde, flow sitometri cihazı ile apoptotik hücre yoğunluğu ölçülebilmektedir. Nekroza uğrayan hücrelerin membranlarında da Anneksin V-FITC bağlanması meydana gelebileceği için ikinci bir boya olarak vital olmayan bir boya olan propidyum iyodür (PI) eklenmektedir. Hücreler, anneksin V-FITC (yeşil floresans) ve PI (kırmızı floresans) ile eş zamanlı boyandığı zaman canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptoza giden hücreler (FITC+PI-), geç apoptoza giden hücreler (FITC+PI+) ve nekrotik hücrelerin (FITC-PI+) birbirinden ayırt edilmesi mümkün olabilmektedir (Overbeeke ve ark., 1998; Güleş ve Eren, 2008).

Kit içeriği

Anneksin V-FITC	0,5 mL
PI	1 mL
Bağlayıcı tampon (10X)	30 mL

Deney Protokolü

1. PNT1A ve PC-3 hücreleri, $2.5 \times 10^3/100$ μ L/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu mikropalakalara dağıtıldı ve 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Her kuyuya taze besiyeri eklenerek ‘Unstained’, ‘PI’ ve ‘Anneksin’

boyaları için hazırlanmış kontrol hücre kuyuları hariç son konsantrasyonlar 0, 0,1 1 ve 10 M olacak şekilde BPA, BPF ve BPS eklendi ve 48 saat inkübe edildi.

3. 48 saatlik maruziyetin ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve her kuyu 1 mL PBS (1X) ile 2 defa yıkandı. Ardından, her kuyuya 0,5 mL %1'lik tripsin eklenerek hücreler tripsinize edildi ve 1,5 mL'lik mikrosantrifüje alındı.

4. Elde edilen hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildikten sonra sonra hücre pelleti, 1 kez, 1 mL PBS (1X) ile yıkandı.

5. Elde edilen hücre pelleti 2 defa 200 µL soğuk hücre bağlayıcı tampon (Cell Staining Buffer) ile yıkanarak 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildi. Her yıkamadan sonra süpernatant atıldı.

6. Yıkamaların ardından elde edilen pellet üzerine 100 µL Anneksin V Binding Buffer eklendikten sonra hücreler süspande edildi.

7. 'Unstained' kontrol hücreleri hariç her maruziyet hücrelerine 5 µL FITC Anneksin V ve 10 µL PI boyaları eklendi. Anneksin V boyası için hazırladığımız hücrelere sadece Anneksin V, diğerine de sadece PI boyası eklendi.

8. Boya eklenen hücreler yavaşça yaklaşık 5 sn vortekslendikten sonra 15 dk. süre ile karanlık ortam ve oda sıcaklığında bekletildi.

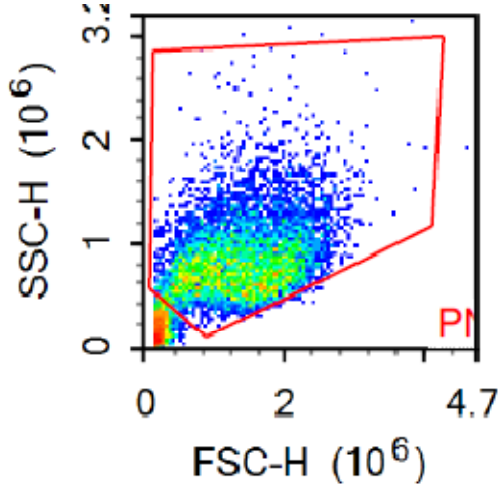
9. 15 dk. sonrasında her hücreye 200 µL Anneksin V Binding Buffer eklendi.
10. Hücrelerin floresans yoğunluğu flow sitometride (ACEA NovoCyte) Annexin V-FITC için Ex/Em: 494/518 nm, PI için Ex/Em: 535/617 nm dalga boyunda ölçüldü.

Deneyler, her konsantrasyon için en az 3 tekrar ve aynı koşullarda farklı 2 günde çalışmak üzere toplam en az 6 tekrar olacak şekilde yapıldı.

Sonuçların Değerlendirilmesi

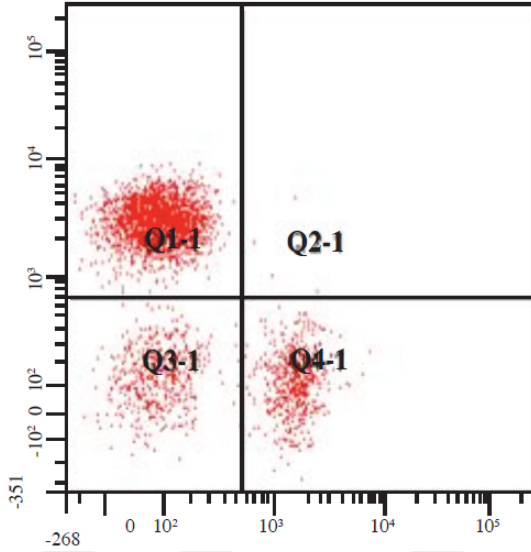
Flow sitometri, akan bir sistem içinde floresan yoğunluğuna bağlı olarak hücre veya parçacık popülasyonunun fiziksel ve kimyasal özelliklerini tespit etmek ve ölçmek için kullanılan, süspansiyon şeklindeki hücrelerin göre incelendiği bir tekniktir (Kanev ve Muranlı, 2016). Bilgisayar Programı (NovoExpress Software) ile gerçekleştirilen veri analizi sonucu, hücreler FSC/SSC grafiğinde belirli bir alana düşmektedir. Bu grafik sayesinde, hücrelerde yer alan farklı popülasyonlar hücre büyüklüğüne ve

granüleritesine ayırt edilebilmektedir. FSC/SSC grafiği üzerinde inceleme yapılacak hücreler bir çerçeve ile sınırlandırılır ve bu işleme ‘kapılama’ veya ‘kapı alma’ (gating) denilmektedir (Mutlu ve Gültekin, 2016). Kapılama yapılan alan ‘Main’ olarak gösterilmektedir (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: FSC/SSC grafiğinde hücre kapılanmasının gösterimi

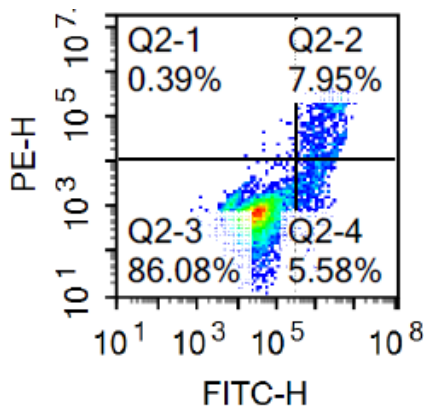
Verileri analiz etmek için, kapılanmış hücre alanı üzerinden analize devam edilmektedir (Mutlu ve Gültekin, 2016). Veriler birkaç farklı çizim türüyle görüntülenebilmektedir. Bunlar; histogramlardan nokta grafikleri, kontur ve yoğunluk grafikleri gibi 2 boyutlu grafiklere ve tomogram grafiği gibi 3 boyutlu grafiklere kadar uzanır (Adan ve ark., 2015). Grafikte, X eksen, araştırılan parametrenin floresans yoğunluğunu gösterirken, Y eksen ise belli bir sinyal yoğunluğundaki hücre sayısı göstermektedir (Mutlu ve Gültekin, 2016). M2 kapısı, hücre popülasyonunda analiz edilmek istenen tek bir parametreye ait hücre popülasyonunun yüzdesini ifade etmektedir. Bu yüzden, en sık tercih edilen grafik türü nokta alan grafiğidir (Şekil 3-5). Nokta grafiği iki parametrelili bir veri gösterimi sağlar ve her nokta bir veya daha fazla olayı (parçacığı) temsil ederken yoğunluk grafiği bir frekans dağılımı olarak iki parametreyi gösterir (Adan ve ark., 2015). Nokta alan grafiğinde, iki farklı floresan antikor taşıyan hücreler; her iki floresan antikoruna da bağlandıysa, grafiğin sağ üst kadranında; tek bir floresan antikoruna bağlandıysa, grafiğin sağ alt ve sol üst kadranında; her iki floresan antikorunu da bağlanmadıysa, grafiğin sol alt kadranında görüntülenmektedir (Taneli, 2007).



Şekil 3-5: Nokta alan grafiği

(Mutlu ve Gültekin, 2016).

Apoptotik hücrelerin tayininde, grafiğin 4 bölgesine düşen hücrelerin her biri farklı özellikteki hücreleri göstermektedir (Şekil 3-5). Hücrelerin, aynı anda, Annexin V-FITC ve PI ile boyanması canlı ve ölü hücrelerin ayrımını sağlamaktadır. Tez çalışmasında, Annexin V-FITC için Ex/Em: 494/518 nm, PI için Ex/Em: 535/617 nm kullanıldı. Analiz sonucunda, canlı hücreler FITC⁻PI⁻ (1.bölge), erken apoptotik hücreler FITC⁺PI⁻ (2. bölge), geç apoptotik hücreler FITC⁺PI⁺ (3. bölge), nekrotik hücreler ise FITC⁻PI⁺ (4. bölge) şeklinde tespit edildi. Her bir analiz için, ‘Main’ kapısı 10⁴ hücre olacak şekilde değerlendirildi. Başka bir ifade ile, her örnekte ‘Main’ kapısı içerisinde 10⁴ hücre okutuldu (Şekil 3-6).



Şekil 3-6: Flowsitometride apoptoz tayini için elde edilen grafiğin şematik gösterimi.

3.9. Gen Ekspresyonu Tayini

3.9.1. Total RNA İzolasyonu

Hücre kültüründen total RNA izolasyonu ‘High Pure RNA Isolation Kit‘ (Roche Life Science) ile üretici firmanın vermiş kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

Lizis/Bağlama tamponu: 4,5 M Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, %30 Triton X-100 (ağırlık/hacim) (pH 6,6). 25°C’de saklandı.

DNaz I (rekombinant, liyofilize): 10 KU liyofilize DNaz I. Çözündürüldükten sonra porsiyonlar -20°C’de saklandı.

DNaz inkübasyon tamponu: 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,0). 25°C’de saklandı.

Yıkama tamponu I: 5 M Guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl (pH 6,6). 25°C’de saklandı.

Yıkama tamponu II: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl (pH 7,5). 25°C’de saklandı.

Elüsyon tamponu: PCR kalitede su.

Filtreli tüp, toplama tüpü

Deney protokolü

1.Bölüm 3.6.1’de belirtildiği üzere hazırlanan 1×10^6 hücre 200 μ L PBS içinde süspande edildi.

2.Üzerine 200 μ L bağlama tamponu eklendi ve 15 sn. vorteks ile karıştırıldı.

3.Kitin içerisinden çıkan toplama tüpüne filtreli tüp yerleştirildi.

4.Yukarıda hazırlanan çözelti filtreli tüpe konuldu ve 8000 x g’de 15 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

5.Steril bir mikrotüpte her bir örnek için 90 μ L DNaz inkübasyon tamponu ve 10 μ L DNaz I eklendi ve karıştırıldı.

6.100 μ L DNaz I çözeltisi filtreli tüpün üst yüzeyine konuldu. 15-25°C’de 15 dk. inkübe edildi.

7.Filtreli tüpe 500 μ L Yıkama tamponu I eklendi ve 8000 g’de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

8.Filtreli tüpe 500 μ L Yıkama tamponu II eklendi ve 8000 g’de 15 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

9.Filtreli tüpe 200 μ L Yıkama tamponu II eklendi ve en yüksek devirde (yaklaşık 13000 g) 2 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı.

10.Filtreli tüp 1,5 mL’lik mikrotüp içine yerleştirildi.

11.Elüsyon tamponundan 50 μ L filtreli tüpe eklendi. 8000 x g’de 1 dk. santrifüj edildi.

Elde edilen RNA’lar, cDNA sentezi için -80°C’de saklandı.

3.9.2. RNA’nın Saflık ve Miktar Tayini

0,1-10 μ M konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrasında PNT1A ve PC-3 hücrelerinden izole edilen RNA’ların miktarı ve saflığı ‘Take-3 Plate’ kullanılarak mikrolaka okuyucu spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm’deki ölçümler RNA miktarının belirlenmesinde kullanıldı. RNA’nın saflığının belirlenmesinde kullanılan A_{260}/A_{280} oranı ise yaklaşık $1,95 \pm 0,1$ olmalıdır.

3.9.3. cDNA Sentezi

cDNA tek veya çift sarmallı olabilir ve mRNA kalıbından ters transkriptaz enzimi kullanılarak sentezlenir. Eğer yapılan deney çift sarmallı cDNA gerektiriyorsa, bir başka DNA sentez basamağı ile gerçekleştirilebilir.

Ölçüm sonucunda elde edilen RNA’lardan cDNA sentezi için total 1000 ng olacak şekilde ‘iScript™ cDNA Synthesis Kit’ (Bio-Rad) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

iScript reaksiyon karışımı (5x): 400 μ L

İScript ters transkriptaz reaksiyon tamponu: 100 µL

PCR kalitede su: 1,5 mL

Deney protokolü

1. Steril, nükleaz içermeyen, ince duvarlı PCR tüpü buz içine konuldu ve içerisinde kalıp primer karışımı hazırlandı:

Toplam RNA: 1000 ng

İScript reaksiyon karışımı (5X): 4µL

İScript ters transkriptaz reaksiyon tamponu: 1 µL

PCR kalitede su: Reaksiyonun toplam hacmi 20µL olacak şekilde su eklendi.

Tüp içindeki maddeler dikkatli bir şekilde karıştırıldı ve spin santrifüj yapıldı. Vorteks yapılmamalıdır.

2. Daha sonra ters transkriptaz karışımı sırasıyla 25 °C’de 5 dk. ve 46°C’de 20 dk. boyunca inkübe edildi.

3. Ters transkriptaz 95°C’de 1 dk. inkübe edilerek inaktif hale getirildi.

4. Tüp buz üstüne alınarak reaksiyon durduruldu.

5. cDNA saflaştırmaya gerek olmaksızın PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

3.9.4. Gen Ekspresyonunun Real-Time PCR ile Tayini

KASPAZ-9, AIF, XIAP, BAX, BCL-2, IRE1α, PERK, CHOP, ATF4, ATF6, eIF2α, GRP78 ve *β-aktin* genlerinin ekspresyonları primer ve SYBR Green karışımı kullanılarak RT-PCR ile gerçekleştirildi.

Kullanılan malzemeler

‘SYBR® Green PCR Master Mix’ karışımı,

Gene özgün primerler (Tablo 3-1’de deneylerde kullanılan primer dizileri gösterilmiştir.)

PCR kalitede su.

Tablo 3-1: Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile tayininde kullanılan primer dizileri.

Gen adı	Primer dizisi (5'-3')	Sıcaklık (°C)	Kaynak
<i>KASPAZ-9</i>	F:ACCAGAGATTCGCAAACCAG R:TCACCAAATCCTCCAGAACC	57	De Souza Prestes ve ark., 2019.
<i>AIF</i>	F:TGCTGGTGGACATGAAGGAC R:TTGGCGAACCCTGTCTCC	60	De Souza Prestes ve ark., 2019.
<i>XIAP</i>	F:ACTCTACTACACAGGTATTGG R:TCAGAACTCACAGCATCAG	60	Yin ve ark., 2015.
<i>BAX</i>	F:ACCAAGAAGCTGAGCGAGTATC R:ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC	60	Ali ve ark., 2017.
<i>BCL-2</i>	F:TGTGGCCCAGATAGGCACCCAG R:ACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG	65	Ali ve ark., 2017.
<i>IRE1</i>	F: AAGGCGTATCCGTTCTATCA R: CTTCCCGTTCATCTTCATTC	55	Fu ve ark., 2015.
<i>PERK</i>	F:ATTGCATCTGCCTGGTTAC R: GACTCCTTCCTTTGCCTGT	55	Fu ve ark., 2015.
<i>CHOP</i>	F:AGTCTAAGGCACTGAGCGTATC R: TCTGTTTCCGTTTCCTGGTT	58	Fu ve ark., 2015.
<i>ATF4</i>	F: CCAGCAAAGCACCCGAACA R: CCATCCACAGCCAGCCATT	58	Fu ve ark., 2015.
<i>ATF6</i>	F: CAGGGAGAAGGAAGTTGTGA R: ACTGACCGAGGAGACGAGA	57	Fu ve ark., 2015.
<i>eIF2α</i>	F: AAGGCGTATCCGTTCTATCA R: CTTCCCGTTCATCTTCATTC	55	Fu ve ark., 2015.
<i>GRP78</i>	F: CAGAAGAACCGTCCCAATC R:AACAATGCAATAAGGGCTAG	55	Fu ve ark., 2015.
<i>β-aktin</i>	F:AACTACCTTCAACTCCAT R: TGATCTTGATCTTCATTGTG	48	Rosa ve ark., 2009

Deney Protokolü

Aşağıdaki gösterildiği gibi uygun miktarlarda bileşenler ilave edilerek RTPCR karışımı hazırlandı ve dikkatlice pipetleme yapıldı:

'SYBR® Green PCR Master Mix' karışımı:	10 µL
10 µM forward primer:	1 µL
10 µM reverse primer:	1 µL
PCR kalitede su:	3 µL
Toplam hacim:	15 µL

1. Hazırlanan PCR karışımından 15 µL mikrolakanın her kuyucuğuna ilave edildi.

2. cDNA örnekleri steril su ile 1:5 oranında seyreltilti.

3. Hazırlanan cDNA örneklerinden 5 µL her bir kuyucuğa eklendi ve mikrolakanın üzeri mikrolaka filmi ile kapatıldı.

4. Mikrolaka 1500 x g'de 2 dk. santrifüj edildi. 6. Mikrolaka LightCycler 480 RT-PCR cihazına konularak ölçüm yapıldı. RTPCR protokolü Tablo 3-2'de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: RT-PCR protokolü.

Program adı	Siklus	Sıcaklık °C	Süre
Polimeraz aktivasyonu	1	95	2 dk.
Denatürasyon	40	95	5 sn.
Primerlerin hedef DNA'ya bağlanması	40	48-65	10 sn.
Uzama	40	72	5-20 sn.
Uzama	1	72	1 dk.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Tablo 3-1'de primer dizileri verilen genler ve referans gen olarak kullanılan β- aktin için spesifik RT-PCR kantitatif Ct değerleri belirlendi. Genlerin relatif ekspresyonu kontrol grubuna göre karşılaştırmalı Ct yöntemi ile değerlendirildi.

3.10. Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile Tayini

3.10.1. Protein İzolasyonu

Deney protokolü

1. 1×10^6 hücre 200 µL PBS (1x) içinde süspande edildi.

2. 4°C' de 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve üst faz pellete zarar verilmeden uzaklaştırıldı.

3. Aşağıda gösterildiği gibi 7 örnek için verilen uygun miktarlarda bileşenler temiz bir tüpte hazırlandı. Her bir örnek tüpüne 40 µL karışım eklenerek köpürene kadar karıştırıldı:

Lizis tamponu: 300 µL

Proteaz inhibisyon kokteyli: 15 µL

PMSF: 1,02 µL

4. Tüpler zaman kaybetmeden buz üstüne oturtuldu ve 30 dk. bekletildi. 30 dk. boyunca her 5 dk.'da bir vortekste karıştırıldı.

5. 4°C' de 13000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi ve üst faz temiz tüpe alındı. Elde edilen proteinler daha sonraki kullanımlar için 500 µL'lik tüplere bölündü ve -80 °C'de saklandı.

6. Bradford yöntemi ile protein miktar ölçümü yapılırken her bir örnek 1/100 sulandırılarak ölçüldü. Hesaplama yapılırken bulunan değer 100 ile çarpıldı.

3.10.2. Proteinlerin Miktar Tayini

İzole edilen protein ve histon proteinleri ekstratlarında protein miktarları Bio-Rad protein tayini II kiti ile Bradford prensibine göre ölçüldü (Bradford, 1976).

Yöntemin esası

Bio-Rad protein tayini, Bradford prensibine dayanır, basit ve doğrusallığı yüksek bir yöntem olup çözülmüş proteinlerin konsantrasyonlarını tayin eder. Asidik 'coomassie® brilliant blue G-250 boyasının, eklendiği protein çözeltisinde özellikle arginin olmak üzere, esas olarak basit ve aromatik aminoasit rezidülerine bağlanması sonucu oluşan rengin şiddeti 465-595 nm'de mikrolaka okuyuculu spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanır.

Kit içeriği

Protein tayini boya reaktifi konsantresi: 450 mL boya

Sığır serum proteini (BSA, standart): BSA standardı kit protokolüne uygun olarak 1,41 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 20 mL bidistile suda çözüldü.

BSA ana stok çözeltisi 500 μL 'lik tüplere bölünerek $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Protein standart çözeltileri

BSA ana stok çözeltisinden konsantrasyonları 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde BSA standart çözeltileri taze olarak hazırlandı ve bu çözeltiler protein tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı. Standartlar 3'er kere tekrarlı çalışıldı.

Deney protokolü

1. 1 hacim konsantre boya reaktifi, 4 hacim distile su ile seyreltildi.
2. 10'ar μL standart çözeltiler ve protein örneklerinden 96 kuyucukluluk mikropipla kuyucuklarına uygun konfigürasyonda konuldu.
3. Her kuyucuğa seyreltilmiş boya reaktifinden 200 μL eklendi.
4. Oda sıcaklığında en az 5 dk. inkübe edildi. Zaman geçtikçe absorbansartacağından dolayı örnekler 1 saatten fazla oda ısısında bekletilmemelidir.
5. Oluşan rengin şiddeti 595 nm'de mikropipla okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.
6. Protein miktarının hesaplanması
7. Ölçülen her bir örnek için protein miktarı, BSA standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisine göre hesaplandı. Protein ve histon proteinleri için ekstrelerdeki protein miktarı $\text{ng}/\mu\text{L}$ olarak hesaplandı.

3.10.3. Protein Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Tayini

İzole edilen proteinlerde CHOP proteininin tayini western blot tekniği kullanılarak gerçekleştirildi.

Kullanılan Çözeltiler

Yürütme Tamponu (5X): 15 g Tris (son konsantrasyon 0,025 M olacak şekilde), 72 g glisin (son konsantrasyon 0,192 M olacak şekilde) tartıldı ve 800 mL deiyonize su içerisinde çözündürüldü. Bu işlemin ardından 5 g SDS eklendi ve pH 8,3 olacak şekilde ayarlandıktan sonra hazırlanan çözeltiliye son hacmi 1000 mL olacak şekilde deiyonize su eklendi.

Yürütme Tamponu (1X):Yürütme tamponu (5X)'dan 1:5 oranında deiyonize su ile seyreltilerek hazırlandı.

Transfer Tamponu (10X): 60 g tris, 144 g glisin tartıldı ve 800 mL deiyonize su içerisinde çözündürüldü. Çözündürülme işleminden ardından pH 8,3 olacak şekilde ayarlandı ve hazırlanan çözeltiye son hacmi 1000 mL olacak şekilde deiyonize su eklendi. Hazırlanan transfer tamponu (10X)'ndan 100 mL alınarak deiyonize su ile son hacmi 1000 mL'ye tamamlandı. Bu şekilde elde edilen 1X transfer tamponundan 800 mL alınarak üzerine 200 mL HPLC kalitede metanol eklenerek deney aşamasında kullanıldı.

Tris-bufferd saline (TBS) Tamponu (10X):24 g tris baz, 88 g sodyum klorür tartıldı ve 900 mL deiyonize su içerisinde çözündürüldü. 6M HCl ile pH 7,6 olacak şekilde ayarlandı ve hazırlanan çözeltiye son hacim 1000 mL olacak şekilde deiyonoize su eklendi.

TBS (1X):TBS (10X)'den 100 mL alınarak deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

%0,1'lik TBS-T Tamponu:TBS (10X) tamponundan 100 mL alıp 900 mL ile deiyonize su ile hazırlanan TBS (1X) tamponu içerisine 1 mL Tween-20 eklendi.

%5'lik Yağsız Süt Tozu Çözeltisi: 5 g yağsız süt tozu tartıldı ve 100 mL %0,1'lik TBS-T tamponu içerisinde çözündürüldü.

PrimerAntikor Çözeltileri:Anti DDIT3/Chop (rabbit monoklonal) antikor(Boster bio, M00311) 1:500 oranında %5'lik yağsız süt tozu kullanılarak hazırlanan 5 mL %0,1'lik TBS-T tamponu içerisinde seyreltildi. Anti β -Aktin (rabbit monoklonal) birincil antikor (Sigma Aldrich, SAB 550000-1) 1:1000 oranında %5'lik yağsız süt tozu kullanılarak hazırlanan 5 mL %0,1'lik TBS-T tamponu içerisinde seyreltildi.

SekonderAntikor Çözeltisi:Sekonderantikor olarak kullanılan IgG anti-rabbit antikor (Boster bio, BA1039) 1:10000 oranında %5'lik yağsız süt tozu kullanılarak hazırlanan 5 mL %0,1'lik TBS-T tamponu içerisinde seyreltildi.

Deney protokolü

1. Örneklerin Bradford yöntemi ile protein miktar tayini yapıldıktan sonra tüm örneklerin protein miktarı 40 µg olacak şekilde hesaplandı ve uygun hacimlerde alınarak PCR tüplerine aktarıldı.

2. Jele yükleme yapılana kadar tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

3. PCR tüplerine alınan protein örneklerine 10 µL Laemeli tamponu (yükleme tamponu) eklendi ve tüplerdeki son hacim 20 µL olacak şekilde deiyonize su ilave edildi.

4. Protein örneklerine vorteks ve ardından spin işlemi uygulandı.

5. Örnekler blok ısıtıcıda 95°C'de 5 dk. denatüre edildikten sonra tekrardan buz üzerine alındı ve spin işlemi uygulandı.

6. Proteinlerin yürütülmesi için SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) poliakrilamid ayırma (%4'lük jel) ve SDS yükleme jelleri (%12'lik jel) TEMED ve APS en son eklenecek şekilde hazırlandı ve 10x10 cm'lik jel kalıplarına (Bio-Rad, Mini-PROTEAN®Tetra Cell) döküldü.

7. Jellerin hazırlanması aşamasında TEMED ve APS hariç diğer jel bileşenleri 2 tane ayrı 15 mL'lik falkon tüplere eklendi ve karışması sağlandı. TEMED ve APS akrimalid ve bis-akrilamid arasında polimerizasyonu başlattığı için ayırma jeli solüsyonu içerisine en son eklendi ve jel kalıbının ¾'lük kısmına hızlı bir şekilde pastör pipet yardımıyla döküldü. Bu işlemin ardından oluşan hava kabarcıklarının engellenmesi için bir miktar deiyonize su ilave edildi. 25 dk. jelin kuruması beklendi ve kurutma kâğıdı ile üst kısma ilave edilen su geri alındı. Daha sonra yürütme jeli de TEMED ve APS en son eklenecek şekilde hazırlanarak jel kalıbının üst bölümünün kalan 1/4'lük kısmına döküldü.

8. Yürütme jelinin dökülmesinin ardından taraklar yerleştirilerek protein içerikli karışımın ekleneceği kuyucukların oluşması sağlandı.

9. Yürütme jeli donduktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkartıldı ve soğuk (1x) yürütme tamponu dikey elektroforez tankı içerisine eklendi. Proteinlerin zarar görmemesi için tankın içerisine ayrıca buz kütlesi de yerleştirildi.

10. Jelde yer alan ilk kuyucuğa 7 µL ladder (Thermo Scientific™ Pageregular Plus Prestained Protein Ladder, Katalog no: 26619) diğer kuyucuklara aynı miktarlarda protein içeriğine sahip örneklerden 20 µL karışım SDS poliakrilamid jele yüklendi.

11. Jele yüklenen protein içerikli karışımlar 300 mA sabit tutularak 30 dk. 70 V; 45 dk. 100 V; 45 dk. 125 V olacak şekilde yürütüldü.

12. Poliviniliden diflorür (PVDF) membran jelin boyutuna uygun olacak şekilde kesildi ve 10 dk. boyunca %100 metanol ile çalkalayıcıda muamele edildi.

13. Yürümesi tamamlanan jel dikkatli bir şekilde kalıptan çıkarıldı ve membran ile 15 dk. boyunca soğuk 1X transfer tamponu ile muamele edildi.

14. Membran ve jel sandviç tekniğiyle western blot transfer aparatına yerleştirildi. Bu işlem için 2 adet sünger ve 2 adet kalın transfer kâğıdı (1x) transfer tamponu ile tamamının ıslatılması sağlandı. Sırasıyla sünger altta kalacak şekilde üzerine transfer tamponu ile ıslanmış kalın transfer kâğıdı yerleştirilir. Sünger ve transfer kâğıdının üzerine jel ve jelin üzerine de 0,45 µm PVDF membran düzgün bir şekilde koyulur. Üzerinde hava kabarcığı kalmaması için silindirik bir malzeme ile üzerinden geçilir. Daha sonra sırasıyla diğer kalın transfer kâğıdı ve sünger koyulur. Bu işlemlerin ardından sıkıştırma aparatına jel tarafı siyah tarafa, membran tarafı kırmızı tarafa gelecek şekilde yerleştirilir.

15. Tankın içine (1x) transfer tamponu ve buz kütlesi yerleştirilerek 70 V ve 350 mA'de 120 dk. transfer işlemi gerçekleştirildi.

16. Transfer işleminin ardından membran küçük kap içerisinde 5 mL %5'lik yağsız süt tozu çözeltisi (%0,1'lik TBST içinde) ile 1,5 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda blokladı.

17. Bloklama işleminin ardından 5 mL %5'lik yağsız süt tozu döküldü ve membran 2 kez 5'şer dk. 2 kez 10'ar dk. %0,1'lik TBST ile çalkalayıcıda yıkandı. Her yıkama sırasında bir öncesi TBST tamponu döküldü.

18. Membran, bloklama tamponu ile (TBST) ilgilenilen proteinlere özgü birincil antikor uygun oranda seyreltilerek oluşturulan 5 mL çözelti ile 12 saat +4°C'de gece boyunca çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

19. Membran, ertesi sabah 1 saat de oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından birincil antikor çözeltisi atılmadı ve tekrar kullanım için ayrı bir 15 mL'lik falkon tüpe alınarak -20°C'de saklandı.

20. Membran art arda 2 kez 5'şer dk. 2 kez 10'ar dk. %0,1'lik TBST ile çalkalayıcıda yıkandı. Her yıkama sırasında bir öncesi TBST tamponu döküldü.

21. Membran, bloklama tamponu ile (TBST) ilgilenilen proteinlere özgü ikincil antikor uygun oranda seyreltilerek oluşturulan 5 mL çözelti ile oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

22. Inkübasyon sonrasında membran art arda 2 kez 5'şer dk. 2 kez 10'ar dk. %0,1'lik TBST ile çalkalayıcıda yıkandı. Her yıkama sırasında bir öncesi TBST tamponu döküldü.

23. Membran, görüntüleme reaktiflerinin (SuperSignal West Femto Luminol/Enhancer Solution ve SuperSignal West Femto Stable Peroxide Solution) 1:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen çalışma solüsyonu ile 2 dk. boyunca muamele edildi ve ardından membran iki asetat arasında konularak görüntüleme cihazında görüntülendi.

24. Deneyler, her konsantrasyon için en az 3 tekrar ve aynı koşullarda farklı 2 günde çalışmak üzere toplam en az 6 tekrar olacak şekilde yapıldı.

3.11. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler “ortalama $\pm$ standart sapma” olarak verildi. Verilerin istatistiksel olarak “GraphPad Prism 6.01 Programı, Graphpad Software Inc, California, A.B.D” paket programı kullanılarak değerlendirildi. Tüm parametreler için öncelikle normalite testi ve varyansların homojenliği testi uygulandıktan sonra, normal dağılım gösteren veriler için ‘Tek Yönlü Varyans’ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi) analizi ile çoklu karşılaştırma uygulandı. $p<0,05$, $p<0,01$ ve $p<0,001$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Sonuçları

4.1.1. BPA, BPF ve BPS'nin PC-3Hücrelerinde Sitotoksosite Üzerine Etkileri

BPA, BPF ve BPS'nin PC-3hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, hücre canlılığının kantitatif ölçümüne dayanan MTT testi ile belirlendi. MTT testi için hücreler BPA, BPF ve BPS'ye 6 farklı konsantrasyonda ve 4'er tekrarlı olacak şekilde 48 saat maruz bırakıldı. Aynı zamanda, testler farklı bir günde ikinci kez tekrarlandı.

31,25-1000 μM konsantrasyonlarda 48saat BPA ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde MTT testi % ölüm ve standart sapma değerleri Tablo 4-1'de 250-1000 μM konsantrasyonlarda 48 saat BPF maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde MTT testi % ölüm ve standart sapma değerleri Tablo 4-2'de verilmiştir. BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrası konsantrasyona karşı MTT testi ile % hücre ölümü grafiği PC-3 hücrelerinde Şekil 4-1'de gösterilmiştir. PC-3 hücrelerinde MTT testine göre; BPA'nın 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 μM konsantrasyonlarındaki 48 saatlik maruziyet sonucu IC_{50} değeri 157,66 μM (Şekil 4-1); BPF'nin 250; 375; 500; 750; 800 ve 1000 μM konsantrasyonlarındaki 48saatlikmaruziyeti sonucu IC_{50} değeri 510,17 μM (Şekil 4-1) ve BPS'nin 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 μM konsantrasyonlarındaki 48 saatlik maruziyeti sonucu IC_{50} değeri 519,61 μM (Şekil 4-1) olarak belirlendi.

Tablo 4-1: 31,25-1000 μM konsantrasyonlarda 48 saat BPA ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde MTT testi % ölüm ve standart sapma değerleri.

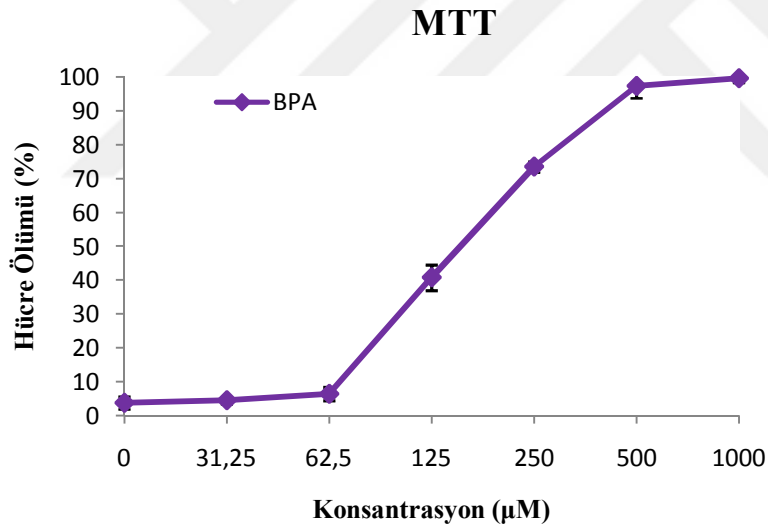
Maruziyet konsantrasyonları (PC-3)	BPA % Ölüm $\pm$ SD	BPS % Ölüm $\pm$ SD
0	3,75 $\pm$ 1,9	22,9 $\pm$ 1,7
31,25 μM	4,45 $\pm$ 1,06	35 $\pm$ 1,23
62,5 μM	6,42 $\pm$ 1,99	39,42 $\pm$ 1,31
125 μM	40,77 $\pm$ 3,78	41,14 $\pm$ 1,2
250 μM	73,53 $\pm$ 1,59	43,39 $\pm$ 3,17
500 μM	97,41 $\pm$ 3,6	48,98 $\pm$ 2,77
1000 μM	99,71 $\pm$ 1,28	63,01 $\pm$ 2,13

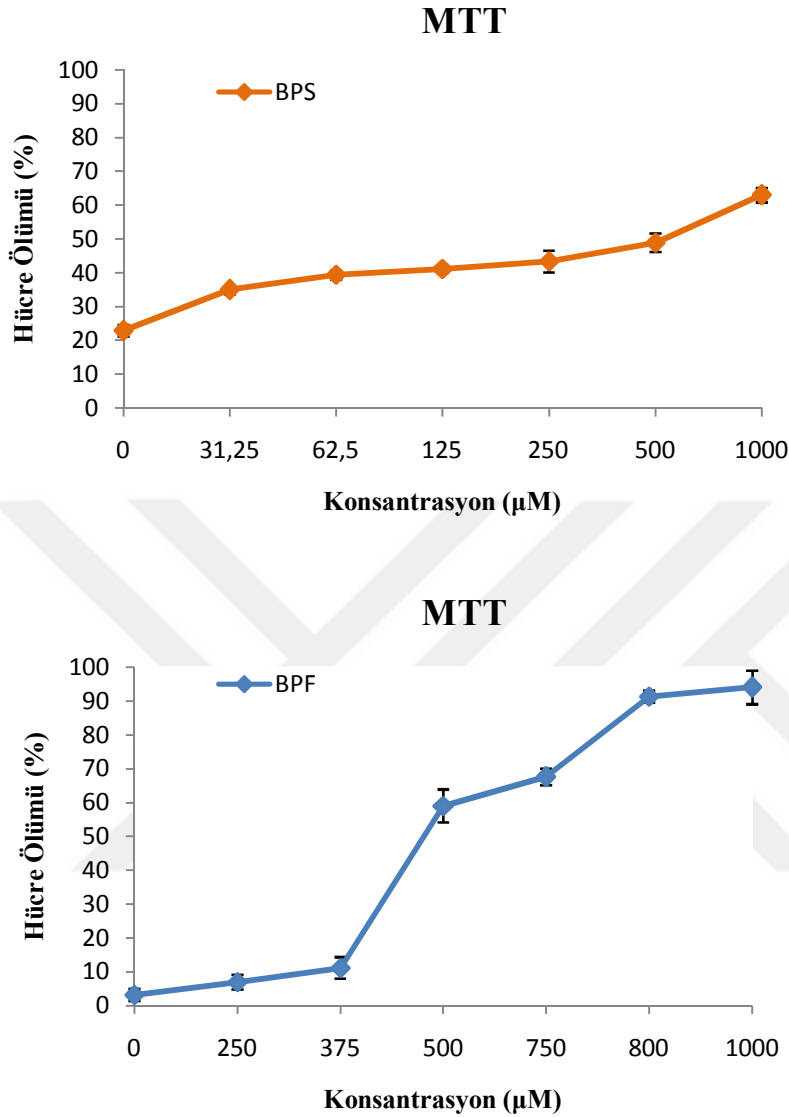
SD: Standart sapma ('standard deviation').

Tablo 4-2: 250-1000 μM konsantrasyonlarda 48 saat BPF maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde MTT testi % ölüm ve standart sapma değerleri.

Maruziyet konsantrasyonları (PC-3)	BPF % Ölüm $\pm$ SD
0	3,14 $\pm$ 1,8
250 μM	6,99 $\pm$ 2,2
375 μM	21,18 $\pm$ 3,2
500 μM	50,06 $\pm$ 4,9
750 μM	67,62 $\pm$ 2,5
800 μM	91,37 $\pm$ 1,78
1000 μM	94,11 $\pm$ 4,96

SD: Standart sapma ('standard deviation').





Şekil 4-1: PC-3 hücrelerine 48 saat 31,25-1000 µM konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonucu MTT testi sonuçları.

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

4.1.2. BPA, BPF ve BPS'nin PNT1A Hücrelerinde Sitotoksikite Üzerine Etkileri

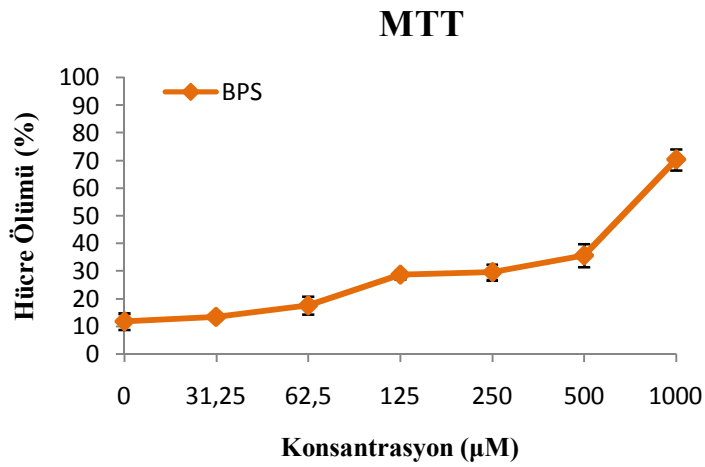
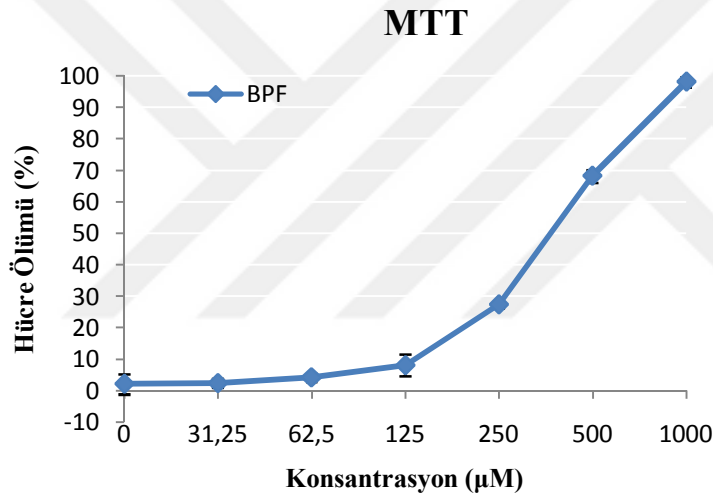
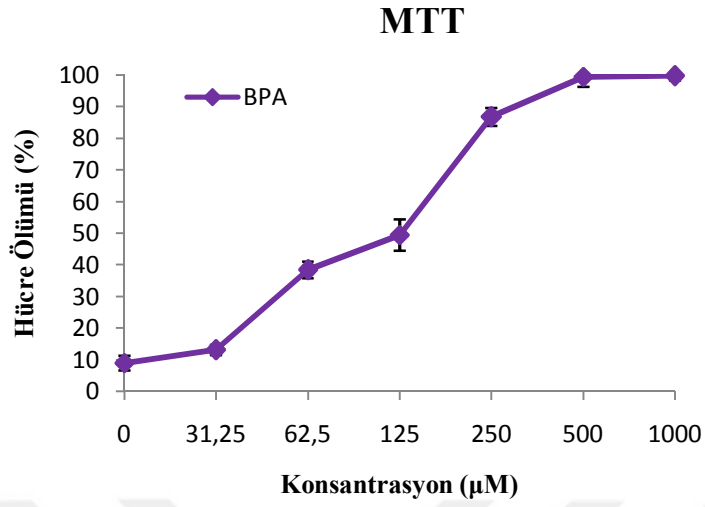
BPA, BPF ve BPS'nin PNT1A hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlendi. MTT testi için hücreler BPA, BPF ve BPS'ye 7 farklı konsantrasyonda ve 4'er tekrarlı olacak şekilde 48 saat maruz bırakıldı. Aynı zamanda, testler farklı bir günde ikinci kez tekrarlandı. 31,25-1000 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde MTT testi % ölüm ve standart sapma değerleri Tablo 4-3'te verilmiştir.

31,25-1000 μM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde, MTT testi % ölüm ve standart sapma değerleri Tablo 4-3'te verilmiştir. BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrası konsantrasyona karşı MTT testi ile % hücre ölümü grafiği PNT1A hücrelerinde Şekil 4-2'de gösterilmiştir. BPA, BPF ve BPS'nin 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 μM konsantrasyonlarındaki 48 saatlik maruziyeti sonucu PNT1A hücrelerinde MTT testine göre IC_{50} değerleri sırası ile 101,05 μM , 485,5 μM ve 659,24 μM olarak belirlendi (Şekil 4-2).

Tablo 4-3: 31,25-1000 μM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde MTT testi % ölüm ve standart sapma değerleri.

Maruziyet konsantrasyonları (PNT1A)	BPA % Ölüm $\pm$ SD	BPF % Ölüm $\pm$ SD	BPS % Ölüm $\pm$ SD
0	9,02 $\pm$ 2,3	2,16 $\pm$ 3,2	11,74 $\pm$ 3
31,25μM	13,15 $\pm$ 1,57	2,43 $\pm$ 1,4	13,38 $\pm$ 1,04
62,5 μM	38,45 $\pm$ 2,6	4,27 $\pm$ 1,25	17,63 $\pm$ 3,23
125 μM	52,52 $\pm$ 4,89	8,18 $\pm$ 3,4	28,64 $\pm$ 1,57
250 μM	86,84 $\pm$ 2,81	27,4 $\pm$ 1,04	29,64 $\pm$ 2,85
500 μM	99,42 $\pm$ 3,06	58,28 $\pm$ 2,04	35,66 $\pm$ 4,19
1000 μM	99,78 $\pm$ 1,28	98,28 $\pm$ 1,68	70,36 $\pm$ 3,8

SD: Standart sapma ('standard deviation').



Şekil 4-2: PNT1A hücrelerine 48 saat 31,25-1000 µM konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonucu MTT testi sonuçları.

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

4.2. BrdU Hücre Proliferasyonu Testi Sonuçları

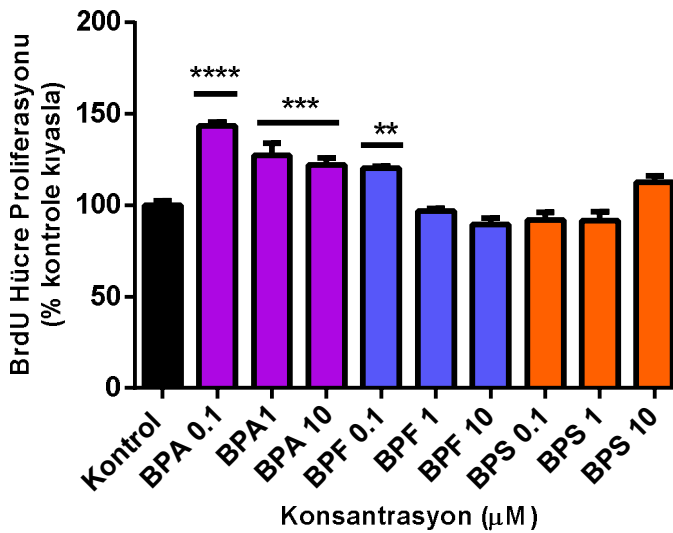
48 saat 0,1, 1 ve 10 μM konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde BrdU testi ile kontrole kıyasla hücre proliferasyonunda değişiklikler gözlenmiş olup (Tablo 4-4) 0,1,1 ve 10 μM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrası, sırasıyla, %41,85 ($p<0,001$), %22,69 ($p<0,01$) ve %19,61 ($p<0,01$) oranlarında ve 0,1 μM konsantrasyonda BPF maruziyeti sonrası, %19,38 ($p<0,05$) oranında anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-3).

Tablo 4-4: 48 saat 0-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde % hücre proliferasyonu ve standart sapma değerleri.

Maruziyet konsantrasyonları (PC-3)	BPA% Hücre proliferasyonu $\pm$ SD	BPF% Hücre proliferasyonu $\pm$ SD	BPS% Hücre proliferasyonu $\pm$ SD
Kontrol	100 $\pm$ 0,42	100 $\pm$ 0,42	100 $\pm$ 0,42
0.1 μM	141,85 $\pm$ 0,1****	119,38 $\pm$ 0,12**	89,13 $\pm$ 0,1
1 μM	122,69 $\pm$ 0,07***	95,85 $\pm$ 0,09	88,39 $\pm$ 0,08
10 μM	119,614 $\pm$ 0,071***	87,13 $\pm$ 0,13	110 $\pm$ 0,165

SD: Standart sapma ('standard deviation').

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=5). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** $p<0,05$; *** $p<0,01$; **** $p<0,0001$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).



Şekil 4-3: 48 saat 0-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde % hücre proliferasyonu (kontrole göre kıyasla) üzerine etkisi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=5). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** $p<0,05$; *** $p<0,01$; **** $p<0,0001$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

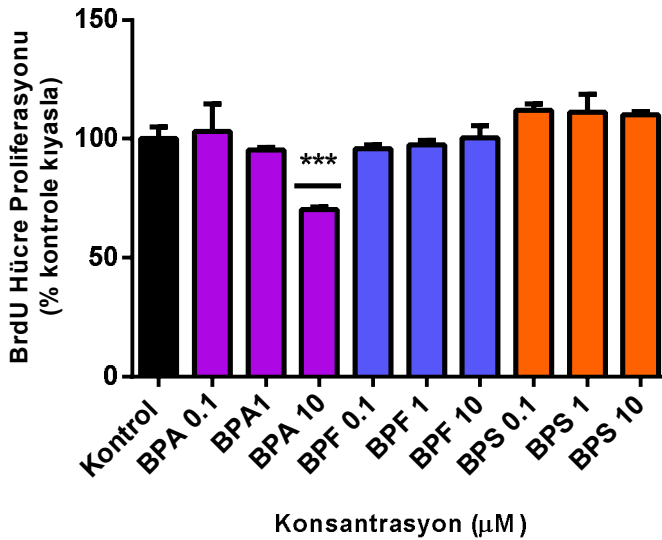
PNT1A hücrelerinde ise BrdU testi ile kontrole kıyasla hücre proliferasyonunda kontrole kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup (Tablo 4-5) yalnızca 10 μM konsantrasyonda BPAmaruziyeti sonrası, %29,7 ($p<0,01$) oranında anlamlı azalma tespit edilmiştir (Şekil 4-4).

Tablo 4-5: 48 saat 0-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde % hücre proliferasyonu ve standart sapma değerleri.

Maruziyet konsantrasyonları (PNT1A)	BPA % Hücre proliferasyonu $\pm$ SD	BPF % Hücre proliferasyonu $\pm$ SD	BPS % Hücre proliferasyonu $\pm$ SD
Kontrol	100 $\pm$ 1,28	100 $\pm$ 1,28	100 $\pm$ 1,28
0,1 μM	103,19 $\pm$ 1,1	95,99 $\pm$ 0,12	111,89 $\pm$ 0,65
1 μM	95,35 $\pm$ 0,08	97,38 $\pm$ 0,09	111,23 $\pm$ 0,08
10 μM	70,3 $\pm$ 0,076***	100,56 $\pm$ 0,78	110,09 $\pm$ 1,1

SD: Standart sapma ('standard deviation').

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=5). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: *** $p<0,01$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

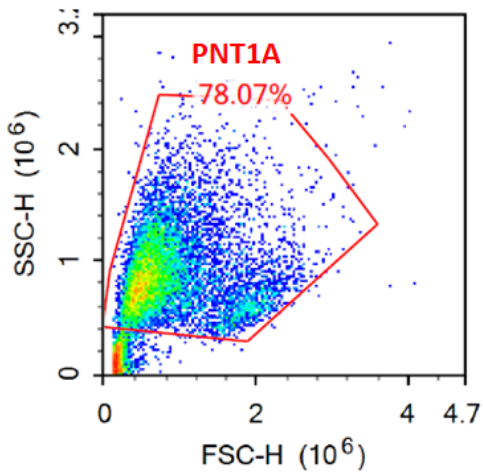


Şekil 4-4: 48 saat 0-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde % hücre proleferasyonu (kontrole göre kıyasla) üzerine etkisi.

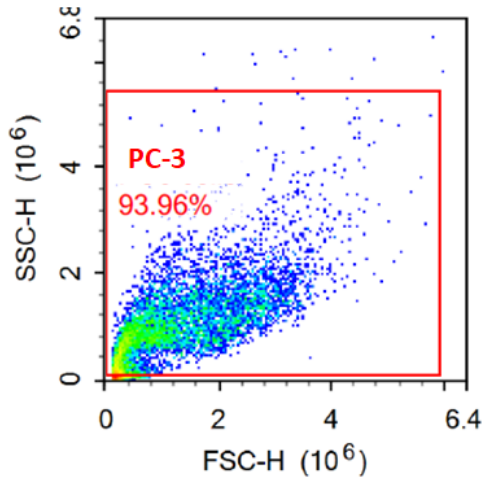
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=5). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı:*** $p<0,01$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

4.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Flow Sitometri Analizi ile Sonuçları

Analiz edilen hücreler FSC/SSC grafiğinde belirli alanlara düşer. Bu alandan incelenecek hücrelerin yeri belirlenerek kapılama yapılır. PNT1A hücrelerinin FSC/SSC grafiğindeki dağılımı Şekil 4-5'te gösterilmiştir. PC-3 hücrelerinin FSC/SSC grafiğindeki dağılımı Şekil 4-6'da gösterilmiştir.



Şekil 4-5: PNT1A hücrelerinin SSC-H/FSC-H kanalında dağılımı.



Şekil 4-6: PC-3 hücrelerinin SSC-H/FSC-H kanalında dağılımı.

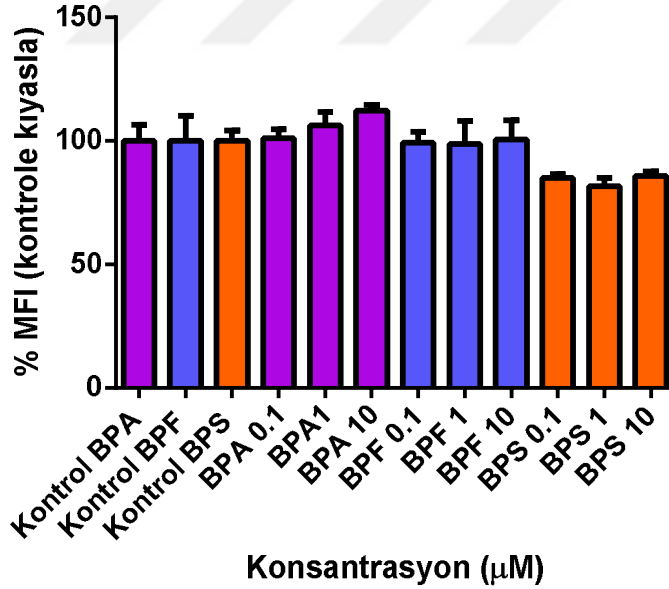
4.1.1. BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PC-3 Hücrelerinde ROS Sonuçları

48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup (Tablo 4-6); bu değişikliklerin kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 4-7).

Tablo 4-6: 48 saat 0-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde % MFI ve standart sapma değerleri

Maruziyet konsantrasyonları (PC-3)	BPA (%MFI $\pm$ SD)	BPF (%MFI $\pm$ SD)	BPS (%MFI $\pm$ SD)
Kontrol	100 $\pm$ 2,76	100 $\pm$ 4,95	100 $\pm$ 2,31
0.1 μM	101,02 $\pm$ 3,56	99,2 $\pm$ 4,52	84,98 $\pm$ 1,43
1 μM	106,06 $\pm$ 5,56	98,58 $\pm$ 9,3	81,59 $\pm$ 3,4
10 μM	112,19 $\pm$ 2,39	100,4 $\pm$ 7,93	85,74 $\pm$ 1,77

SD: Standart sapma ('standard deviation').



Şekil 4-7: 48 saat 0-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde %ortalama fluoresans şiddetine (%MFI, kontrole karşı) etkisi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4).

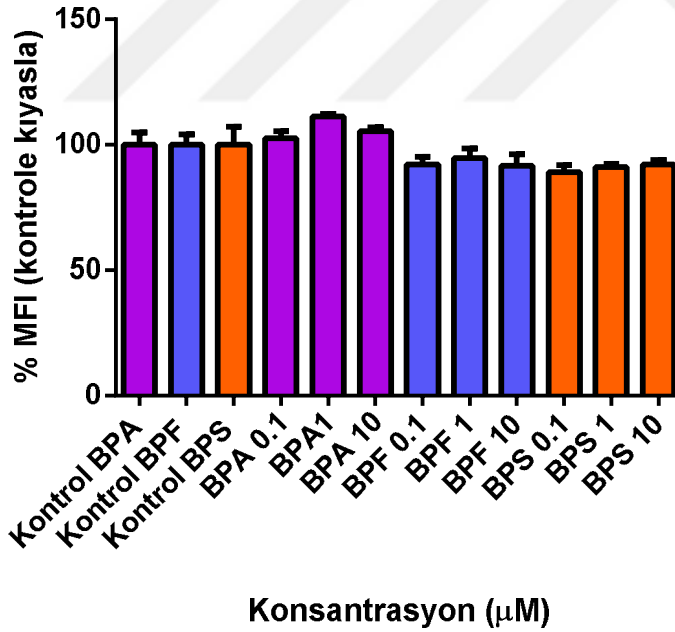
4.1.2. BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PNT1A Hücrelerinde ROS Sonuçları

48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PNT1A hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup (Tablo 4-7); bu değişikliklerin kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 4-8).

Tablo 4-7: 48 saat 0-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde % MFI ve standart sapma değerleri

Maruziyet konsantrasyonları (PNT1A)	BPA (%MFI $\pm$ SD)	BPF (%MFI $\pm$ SD)	BPS (%MFI $\pm$ SD)
Kontrol	100 $\pm$ 4,94	100 $\pm$ 4,24	100 $\pm$ 7,07
0.1 μM	102,52 $\pm$ 2,86	92,09 $\pm$ 2,96	88,99 $\pm$ 2,82
1 μM	111,12 $\pm$ 1,23	94,72 $\pm$ 3,85	91,08 $\pm$ 1,29
10 μM	105,42 $\pm$ 1,52	91,59 $\pm$ 4,53	92,18 $\pm$ 1,67

SD: Standart sapma ('standard deviation').



Şekil 4-8: 48 saat 0-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde %ortalama fluoresans şiddetine (%MFI, kontrole karşı) etkisi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4).

4.2. Annexin V- FITC/PI Analizi ile Apoptoz Sonuçları

4.2.1. BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PC-3 ve PNT1A Hücrelerinde Annexin V-FITC⁺/PI⁺ (Geç Apoptoz) Sonuçları

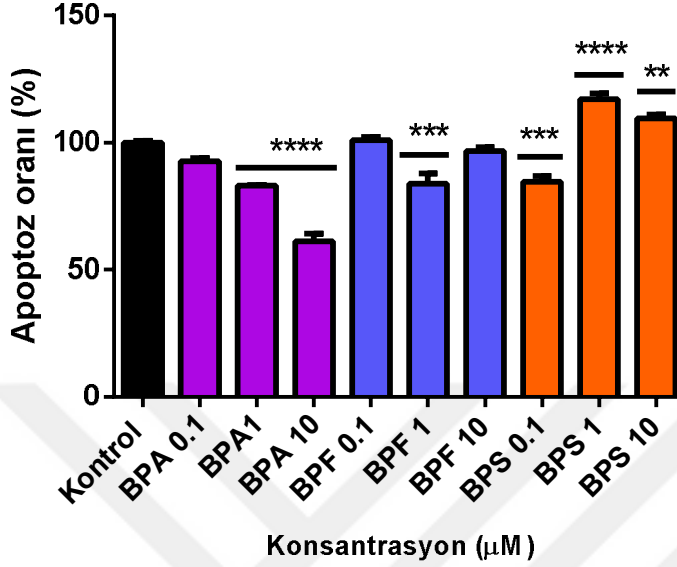
48 saat 0,1-10 μ M konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Tablo 4-8). 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 hücrelerinde kontrol grubu ile 1 ve 10 μ M konsantrasyondaki BPA maruziyet grubu kıyaslandığında, sırasıyla, %18 ($p<0,001$) ve %27 ($p<0,001$) azalma; 1 μ M konsantrasyondaki BPF maruziyet grubu kıyaslandığında %15 azalma ($p<0,01$); 0,1 μ M konsantrasyondaki BPS maruziyet grubu kıyaslandığında %14 azalma ($p<0,01$); 1 ve 10 μ M konsantrasyondaki BPS maruziyet grubu kıyaslandığında, sırasıyla, %22 ($p<0,001$) ve %16 artış ($p<0,05$) görülmüştür (Şekil 4-9).

Tablo 4-8: BPA, BPF ve BPS'nin PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri

Annexin V-FITC ⁺ /PI ⁺ (Geç Apoptoz)			
Maruziyet konsantrasyonları (PC-3)	BPA % Apoptoz oranı $\pm$ SD	BPF % Apoptoz oranı $\pm$ SD	BPS % Apoptoz oranı $\pm$ SD
Kontrol	100 $\pm$ 0,56	100 $\pm$ 0,56	100 $\pm$ 0,56
0.1 μ M	93,02 $\pm$ 0,9	100 $\pm$ 0,95	86,25 $\pm$ 2,82***
1 μ M	82,26 $\pm$ 0,83****	85,5 $\pm$ 0,88***	122,14 $\pm$ 1,65****
10 μ M	63,77 $\pm$ 1,01****	95,58 $\pm$ 1,32	116,20 $\pm$ 3,43**

SD: Standart sapma ('standard deviation'). Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=5). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** $p<0,05$; *** $p<0,01$; **** $p<0,001$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

Annexin V-FITC⁺/PI⁺



Şekil 4-9: 48 saat 0-10 µM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde % geç apoptoz oranı (kontrole kıyasla).

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** p<0,05; *** p<0,01; **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

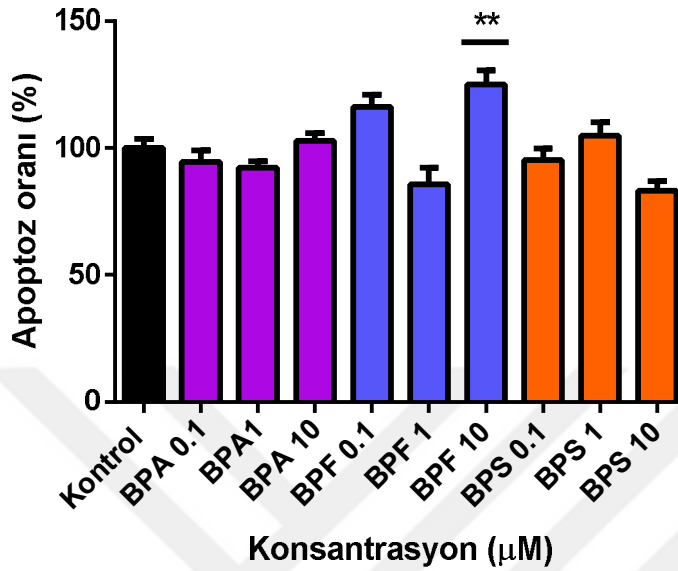
48 saat 0,1-10 µM konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS uygulanan PNT1A hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Tablo 4-9). 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PNT1A hücrelerinde kontrol grubu ile 10 µM konsantrasyondaki BPF maruziyet grubu kıyaslandığında %21 (p<0,05) artış görülmüştür (Şekil 4-10).

Tablo 4-9: BPA, BPF ve BPS'nin PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri

Annexin V-FITC ⁺ /PI ⁺ (Geç Apoptoz)			
Maruziyet konsantrasyonları (PNT1A)	BPA % Apoptoz oranı± SD	BPF % Apoptoz oranı ± SD	BPS % Apoptoz oranı ± SD
Kontrol	100±1,56	100±1,56	100±1,56
0.1 µM	97,76±1,9	112,67±2,56	92,30±182
1 µM	94,18±1,34	88,64±3,87	108,61±2,65
10 µM	100,67±1,45	121,27±3,41**	85,80±2,13

SD: Standart sapma ('standard deviation').Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.(n=5). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: **p<0,05 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

Annexin V-FITC⁺/PI⁺



Şekil 4-10: 48 saat 0-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde % geç apoptoz oranı (kontrole kıyasla).

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** p<0,05; *** p<0,01; **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

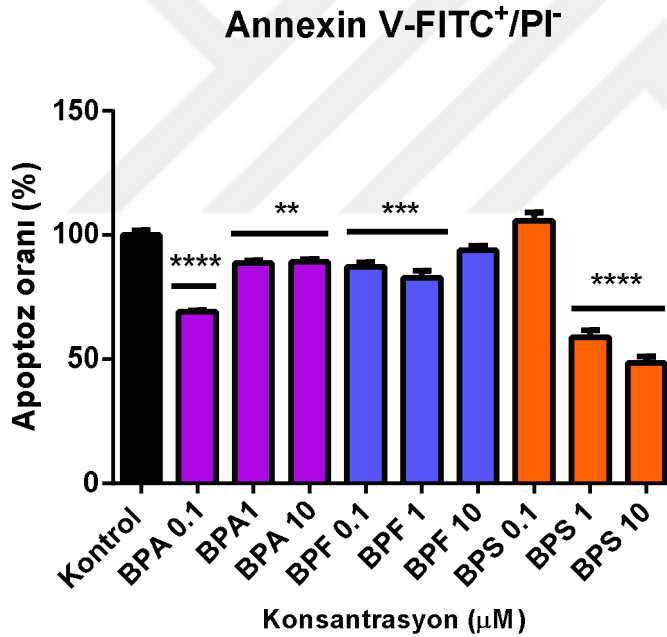
4.2.2. BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PC-3 ve PNT1A Hücrelerinde Annexin V-FITC⁺/PI⁺ (Erken Apoptoz) Sonuçları

48 saat 0,1-10 μM konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğugörölmüşdür (Tablo 4-10).48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 hücrelerinde kontrol grubu ile 0,1,1 ve 10 μM konsantrasyondaki BPA maruziyet grubu kıyaslandığında, sırasıyla, %31 (p<0,001), % 11 (p<0,05), % 12 azalma (p<0,05); 0,1 ve 1 μM konsantrasyondaki BPF maruziyet grubu kıyaslandığında, sırasıyla, %12 (p<0,01) ve %16 (p<0,01) azalma; 1 ve 10 μM konsantrasyondaki BPS maruziyet grubu ile kıyaslandığında, sırasıyla,%40 (p<0,001) ve %50 azalma (p<0,001)görölmüşdür (Şekil 4-11).

Tablo 4-10: BPA, BPF ve BPS'nin PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri

Annexin V-FITC ⁺ /PI ⁺ (Erken Apoptoz)			
Maruziyet konsantrasyonları (PC-3)	BPA % Apoptoz oranı $\pm$ SD	BPF % Apoptoz oranı $\pm$ SD	BPS % Apoptoz oranı $\pm$ SD
Kontrol	100 $\pm$ 0,76	100 $\pm$ 1,76	100 $\pm$ 0,76
0.1 μ M	69,6 $\pm$ 1,9****	88,38 $\pm$ 2,54***	103,27 $\pm$ 1,82
1 μ M	89,53 $\pm$ 2,8**	84,78 $\pm$ 2,87***	60,84 $\pm$ 0,65****
10 μ M	88,63 $\pm$ 1,21**	95,19 $\pm$ 3,01	50,31 $\pm$ 0,43****

SD: Standart sapma ('standard deviation'). Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=5). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: **p<0,05; *** p<0,01; **** p<0,001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)



Şekil 4-11: 48 saat 0-10 μ M konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde % erken apoptoz oranı (kontrole kıyasla).

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** p<0,05; *** p<0,01; **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

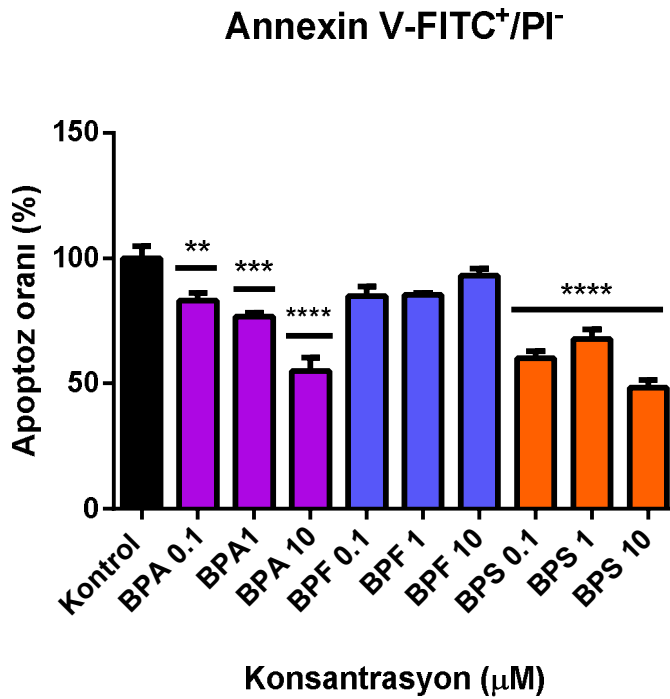
48 saat 0,1-10 μ M konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS uygulanan PNT1A hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Tablo 4-11). 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PNT1A hücrelerinde kontrol grubu ile 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyondaki

BPA maruziyet grubu kıyaslandığında, sırasıyla, %15 ($p<0,05$), %23 ($p<0,01$), ve %42 azalma ($p<0,001$); 0,1, 1 ve 10 μM konsantrasyondaki BPS maruziyet grubu kıyaslandığında, sırasıyla, %38 ($p<0,001$), %30 azalma ($p<0,001$) ve %50 ($p<0,001$) azalma görülmüştür (Şekil 4-12).

Tablo 4-11: BPA, BPF ve BPS'nin PNT1A hücrelerinde 0-10 μM konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri

Annexin V-FITC ⁺ /PI ⁺ (Erken Apoptoz)			
Maruziyet konsantrasyonları (PNT1A)	BPA % Apoptoz oranı $\pm$ SD	BPF % Apoptoz oranı $\pm$ SD	BPS % Apoptoz oranı $\pm$ SD
Kontrol	100 $\pm$ 2,95	100 $\pm$ 2,95	100 $\pm$ 2,95
0.1 μM	85,38 $\pm$ 1,9**	87,68 $\pm$ 2,8	62,19 $\pm$ 1,82****
1 μM	77,81 $\pm$ 0,8***	84,99 $\pm$ 0,72	70,43 $\pm$ 2,65****
10 μM	58,86 $\pm$ 4,01****	95,09 $\pm$ 0,93	50,62 $\pm$ 2,43****

SD: Standart sapma ('standard deviation'). Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=5). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** $p<0,05$; *** $p<0,01$; **** $p<0,001$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)



Şekil 4-12: 48 saat 0-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde % erken apoptoz oranı (kontrole kıyasla).

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** $p<0,05$; *** $p<0,01$; **** $p<0,0001$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

4.3. BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PNT1A ve PC-3 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Miktarları ve Saflıkları

0-10 μM konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrasında PC-3 ve PNT1A hücrelerinden izole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikroparka okuyucu spektrofotometrede de ölçüldü. RNA'ların miktarı ve saflığı sırasıyla Tablo 4-12 ve Tablo 4-13'te gösterilmiştir. İzole edilen RNA'ların A260/A280 oranlarında saflıklarının iyi olduğu görüldü ve RNA örnekleri ileri analizler için kullanıldı.

Tablo 4-12: 0-10 μM Konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrasında PC-3 hücrelerinden izole edilen RNA'ların miktar ve saflıkları.

Maruziyet süresi	Maruziyet konsantrasyonları	BPA		BPF		BPS	
		A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Miktarı (ng/ μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Miktarı (ng/ μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Miktarı (ng/ μL)
48 saat	0 μM	2,019	113,291	2,019	113,291	2,019	113,291
	0 μM	2,038	360,888	2,038	360,888	2,038	360,888
	0 μM	2,058	661,91	2,058	661,91	2,058	661,91
	0 μM	2,06	595,884	2,06	595,884	2,06	595,884
	0 μM	2,048	296,325	2,048	296,325	2,048	296,325
	0,1 μM	1,964	292,596	2,045	369,253	2,068	313,255
	0,1 μM	2,051	358,62	2,055	844,988	2,052	409,804
	0,1 μM	2,038	570,106	2,05	638,258	2,048	550,329
	0,1 μM	2,055	663,592	2,061	498,85	2,065	447,385
	0,1 μM	2,058	514,569	2,001	529,266	2,036	362,752
	1 μM	2,064	400,461	2,049	286,723	1,968	312,596
	1 μM	2,052	431,561	2,045	363,888	2,038	562,172
	1 μM	2,028	532,95	2,053	603,481	2,034	364,55
	1 μM	2,066	1005,38	2,056	340,46	2,056	431,818
	1 μM	2,042	442,546	2,054	601,946	2,039	404,848
	10 μM	2,054	441,861	2,05	647,206	2,05	460,855
	10 μM	2,051	965,6	2,053	671,932	1,979	335,39
	10 μM	2,07	1001,03	2,053	519,877	2,033	723,055
	10 μM	2,059	311,057	2,054	886,494	2,046	354,602
	10 μM	2,06	427,678	2,035	709,271	2,058	253,268

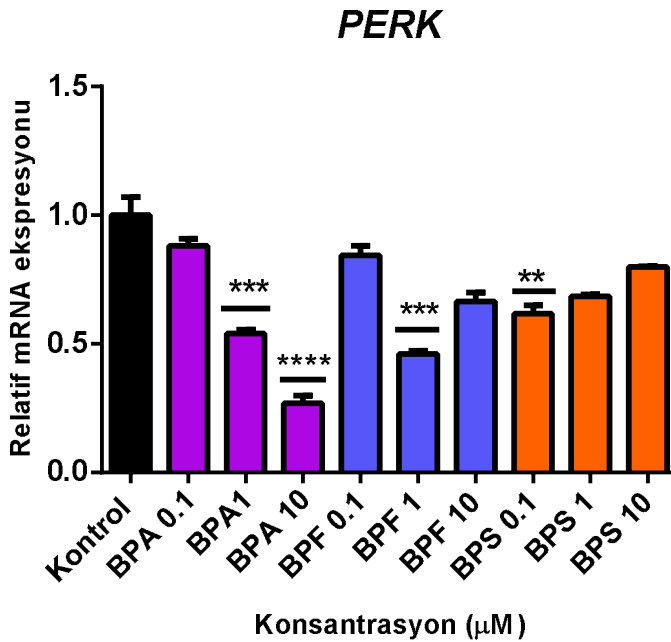
Tablo 4-13: 0-10 µM Konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrasında PNT1A hücrelerinden izole edilen RNA'ların miktar ve saflıkları.

Maruziyet süresi	Maruziyet konsantrasyonları	BPA		BPF		BPS	
		A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Miktarı (ng/µL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Miktarı (ng/µL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Miktarı (ng/µL)
48 saat	0 µM	2,032	155,3	2,032	155,3	2,032	155,3
	0 µM	2,042	132,944	2,042	132,944	2,042	132,944
	0 µM	1,947	108,912	1,947	108,912	1,947	108,912
	0 µM	2,05	145,436	2,05	145,436	2,05	145,436
	0,1 µM	2,03	118,883	1,941	46,179	1,918	127,265
	0,1 µM	1,986	189,139	2,024	134,861	1,952	140,504
	0,1 µM	2,054	117,394	2	115,893	1,968	140,099
	0,1 µM	2,022	120,455	2,097	176,045	1,956	178,004
	1 µM	1,969	85,519	1,966	137,166	2,028	135,843
	1µM	1,936	100,628	2,037	144,456	1,912	178,133
	1 µM	2,027	98,876	2,028	120,869	1,961	75,432
	1 µM	1,956	122,298	1,966	146,228	2,003	96,788
	10 µM	1,962	105,68	1,974	101,273	2,031	123,414
	10 µM	2,018	170,73	2,037	196,395	2,033	100,286
	10 µM	1,984	125,921	1,995	175,309	2,028	139,455
	10 µM	2,016	92,353	2,01	193,461	2,084	126,002
96 saat	0 µM	2,049	229,748	2,049	229,748	2,049	229,748
	0 µM	2,049	92,24	2,049	92,24	2,049	92,24
	0 µM	1,998	110,394	1,998	110,394	1,998	110,394
	10 µM	1,907	82,801	2,04	132,026	2,053	67,342
	10 µM	2,082	153,47	2,047	70,527	1,974	52,84
	10 µM	2,052	60,352	2,032	38,534	2,01	53,769
	10 µM	1,936	78,56	1,994	103,986	1,998	53,212

4.4. ER Stresi ile ilişkili Genlerin Gen İfadesi Sonuçları

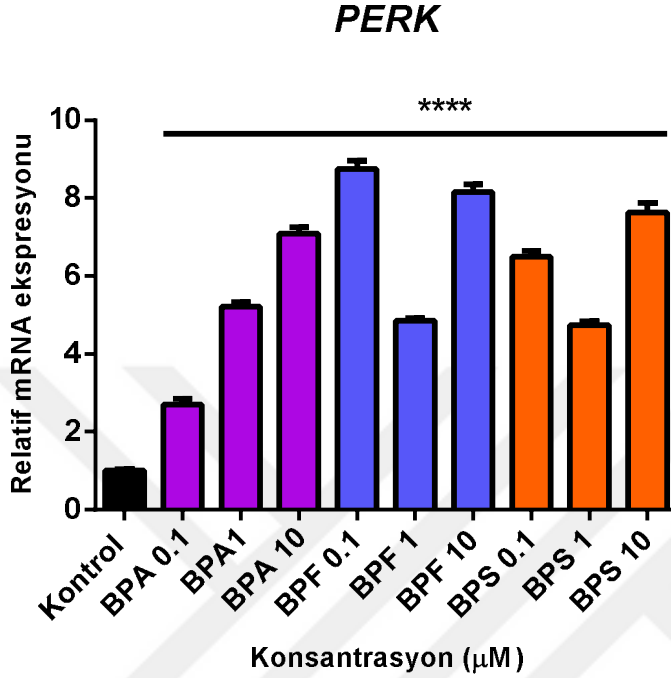
4.4.1. 48 saat BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PC-3 ve PNT1A Hücrelerinde ER Stresi ile İlişkili Genlerin Gen İfadesi Sonuçları

PERK geni: 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 ve PNT1A hücrelerinde *PERK* geninde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-13 ve Şekil 4-14). PC-3 hücrelerinde, *PERK* geninin ekspresyonunun 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,46 kat ($p<0,01$) ve 0,78 kat ($p<0,001$) azaldığı; 1 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,54 kat ($p<0,01$) kat azaldığı; 0,1 konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,39 kat ($p<0,05$) azaldığı görülmüştür (Şekil 4-13). PNT1A hücrelerinde, *PERK* geninin ekspresyonunun 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 1,58 kat ($p<0,001$), 4,1 kat ($p<0,001$), 5,97 kat ($p<0,001$) arttığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 7,58 kat ($p<0,001$), 3,78 kat ($p<0,001$), 7 kat ($p<0,001$) arttığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 5,41 kat ($p<0,001$), 3,67 kat ($p<0,001$), 6,46 kat ($p<0,001$) arttığı görülmüştür (Şekil 4-14).



Şekil 4-13: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *PERK* geni relatif ekspresyonu.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** p<0,05; *** p<0,01; **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

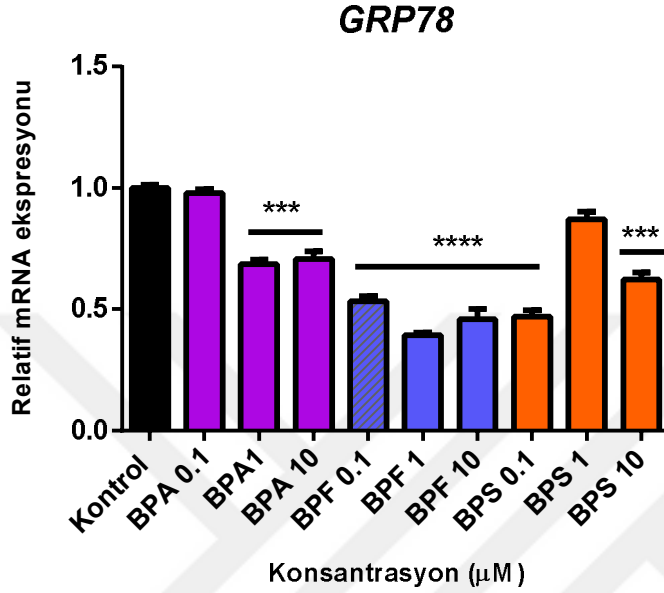


Şekil 4-14: PNT1A hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *PERK* geni relatif ekspresyonu.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

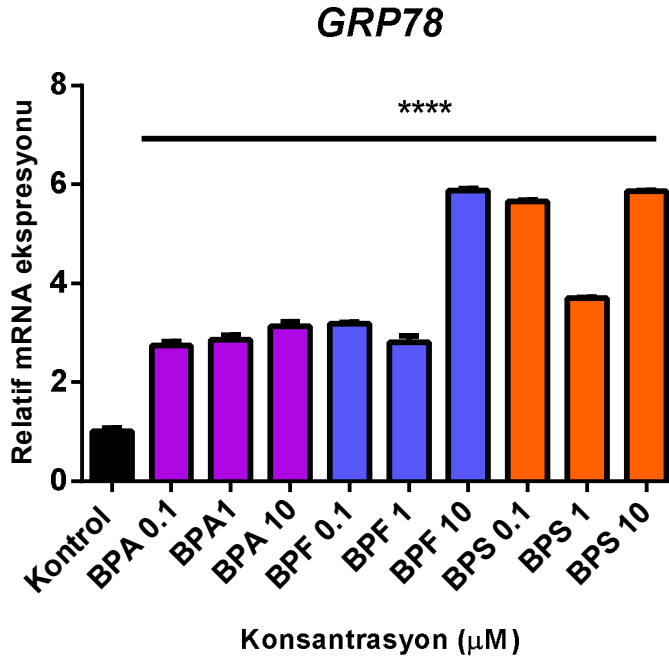
***GRP78(BiP)* geni:** 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 ve PNT1A hücrelerinde *GRP78* geninde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-15 ve Şekil 4-16). PC-3 hücrelerinde, *GRP78* geninin ekspresyonunun 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,31 kat (p<0,01) ve 0,3 kat (p<0,01) azaldığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,44 kat (p<0,001), 0,61 kat (p<0,001), 0,5 kat (p<0,001) azaldığı; 0,1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,5 kat (p<0,001) ve 0,34 kat (p<0,01) azaldığı görülmüştür (Şekil 4-15). PNT1A hücrelerinde *GRP78* geninin ekspresyonunun 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 1,69 kat (p<0,001), 1,92 kat (p<0,001), 2,36 kat (p<0,001) arttığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 2,16 kat

($p<0,001$) 1,71 kat ($p<0,001$), 4,85 kat ($p<0,001$) arttı; 0,1, 1 ve 10 μM konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 4,62 kat ($p<0,001$), 2,68 kat ($p<0,001$), 4,5 kat ($p<0,001$) arttığı görülmüştür (Şekil 4-16).



Şekil 4-15: PC-3 hücrelerinde 0-10 μM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *GRP78* geni relatif ekspresyonu.

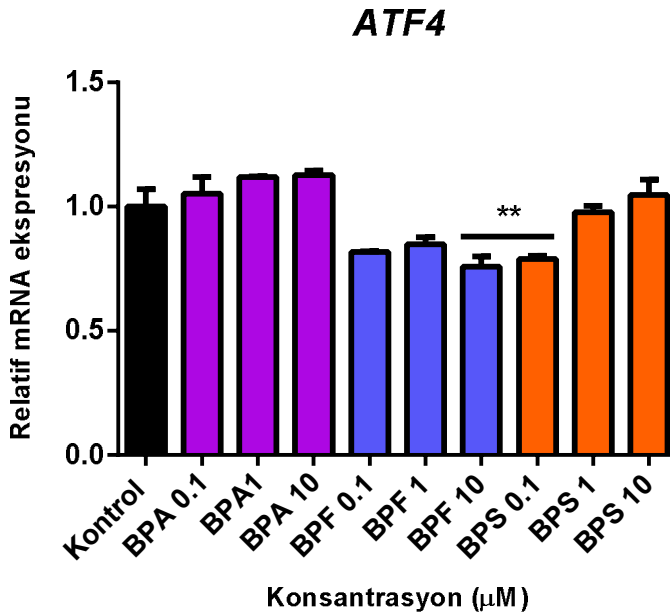
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: *** $p<0,01$; **** $p<0,0001$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)



Şekil 4-16: PNT1A hücrelerinde 0-10 μM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *GRP78* geni relatif ekspresyonu.

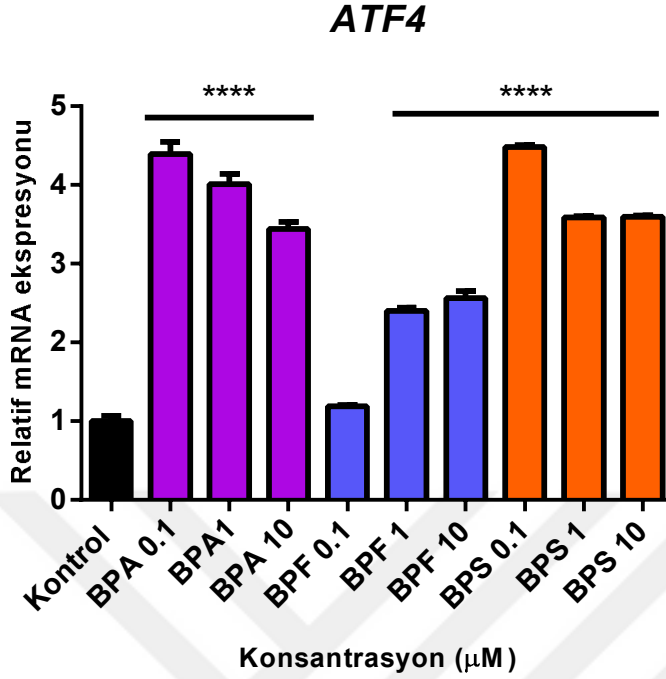
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

ATF4 geni: 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 ve PNT1A hücrelerinde *ATF4* geninde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-17 ve Şekil 4-18). PC-3 hücrelerinde, *ATF4* geninin ekspresyonunun 1 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, 0,33 kat (p<0,05) azaldığı ve 0,1 μ M konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 0,29 kat (p<0,05) azaldığı görülmüştür (Şekil 4-17).PNT1A hücrelerinde, *ATF4* geninin ekspresyonunun 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 3,29 kat (p<0,001), 2,91 kat (p<0,001), 2,37 kat (p<0,001) arttığı; 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla,1,37 kat (p<0,001) ve 1,62 kat (p<0,001) arttığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 3,46 kat (p<0,001), 2,57 kat (p<0,001), 2,58 kat (p<0,001) arttığı görülmüştür (Şekil 4-18).



Şekil 4-17: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *ATF4* geni relatif ekspresyonu.

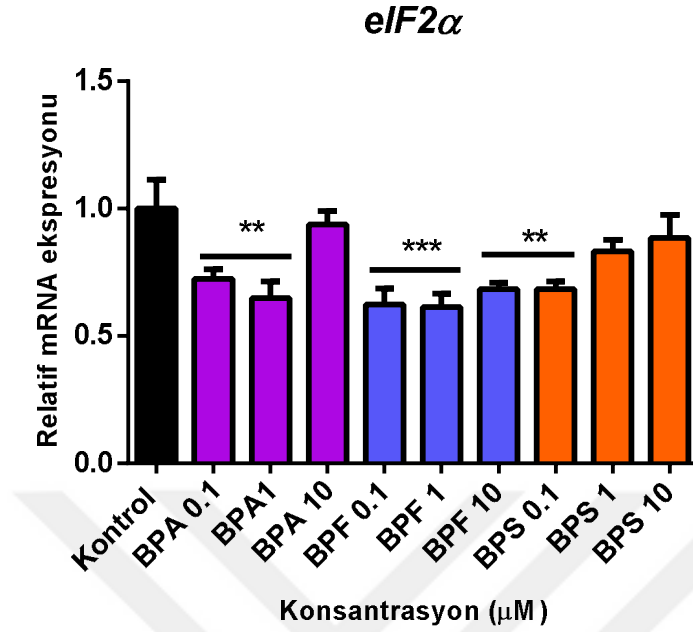
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** p<0,05; ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).



Şekil 4-18: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *ATF4* geni relatif ekspresyonu.

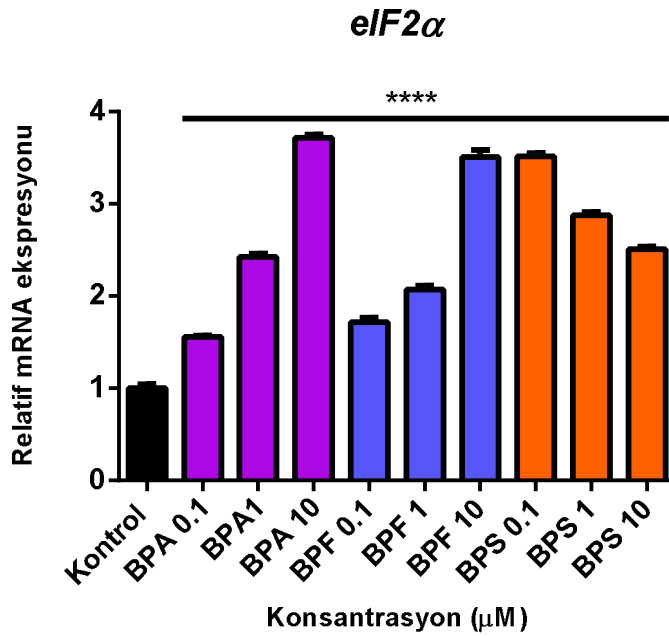
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

***eIF2α* geni:** 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 ve PNT1A hücrelerinde *eIF2α* geninde bölgesinde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-19 ve Şekil 4-20). PC-3 hücrelerinde, *eIF2α* geninin ekspresyonunun 0,1 ve 1 µM konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 0,3kat (p<0,05) azaldığı; 0,1, 1 ve 10µM konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, 0,33 kat (p<0,01), 0,42 kat(p<0,01), 0,3 kat (p<0,05) azaldığı ve 0,1 µM konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 0,29 kat (p<0,05) azaldığı görülmüştür (Şekil 4-19). PNT1A hücrelerinde, *eIF2α* geninin ekspresyonunun 0,1, 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,54 kat (p<0,001), 1,4 kat (p<0,001), 2,61 kat (p<0,001) arttığı; 0,1, 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 0,67 kat (p<0,001), 1,03 kat (p<0,001) 2,45 kat (p<0,001) arttığı;0,1, 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 2,48 kat (p<0,001), 1,85 kat (p<0,001), 1,49 kat (p<0,001) arttığı görülmüştür (Şekil 4-20).



Şekil 4-19: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *eIF2 α* geni relatif ekspresyonu.

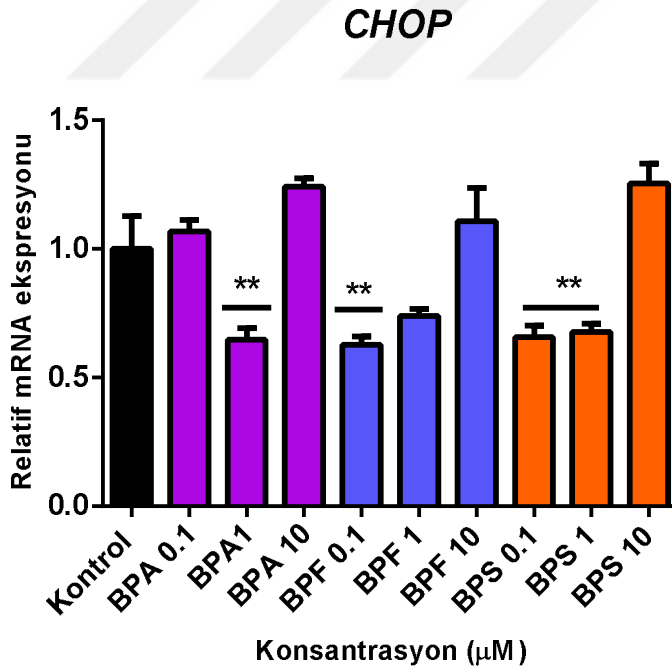
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: *** p<0,01ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).



Şekil 4-20: PNT1A hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *eIF2 α* geni relatif ekspresyonu.

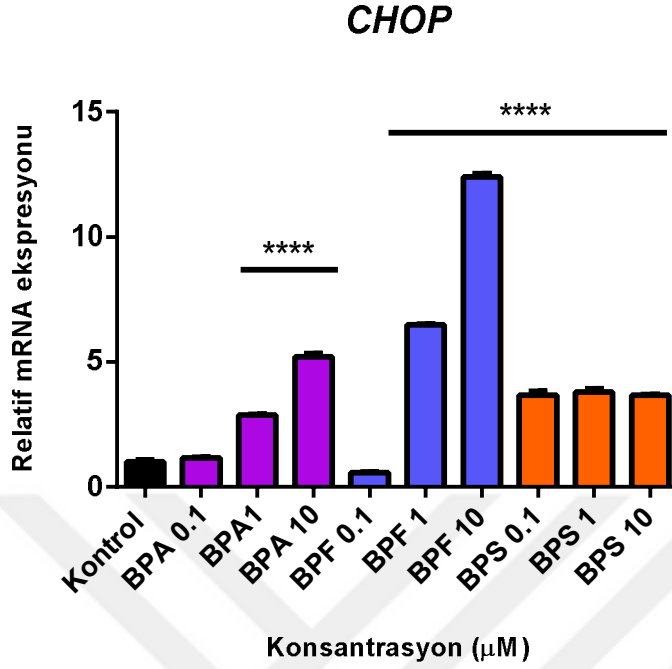
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

CHOP geni: 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 ve PNT1A hücrelerinde *CHOP* geninde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-21 ve Şekil 4-22). PC-3 hücrelerinde, *CHOP* geninin ekspresyonunun 1 μ M konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 0,38 kat ($p<0,05$) azaldığı; 0,1 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, 0,39 kat ($p<0,05$) azaldığı; 0,1 ve 1 μ M konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,34 kat ($p<0,05$) ve 0,34 kat ($p<0,05$) azaldığı görülmüştür (Şekil 4-21). PNT1A hücrelerinde, *CHOP* geninin ekspresyonunun 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 1,86 kat ($p<0,001$) ve 4,14 kat ($p<0,001$) arttığı; 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 5,46 kat ($p<0,001$) ve 11,3 kat ($p<0,001$) arttığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 2,56 kat ($p<0,001$), 2,71 kat ($p<0,001$), 2,66 kat ($p<0,001$) arttığı görülmüştür (Şekil 4-22).



Şekil 4-21: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *CHOP* geni relatif ekspresyonu.

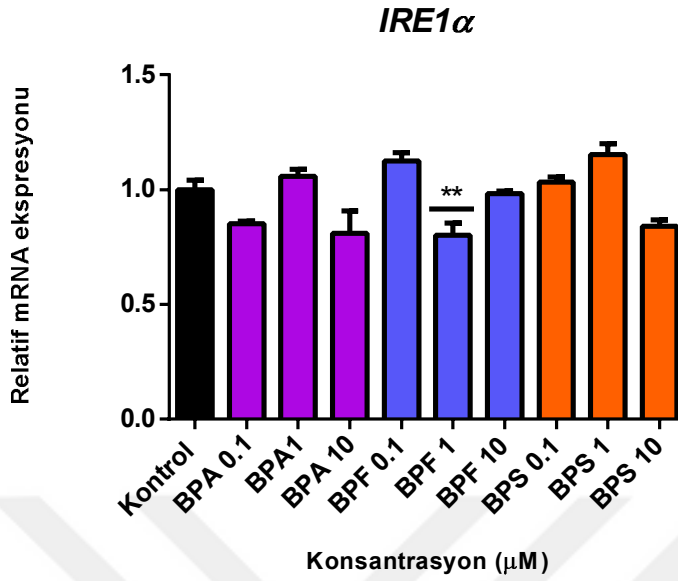
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** $p<0,05$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)



Şekil 4-22: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *CHOP* geni relatif ekspresyonu.

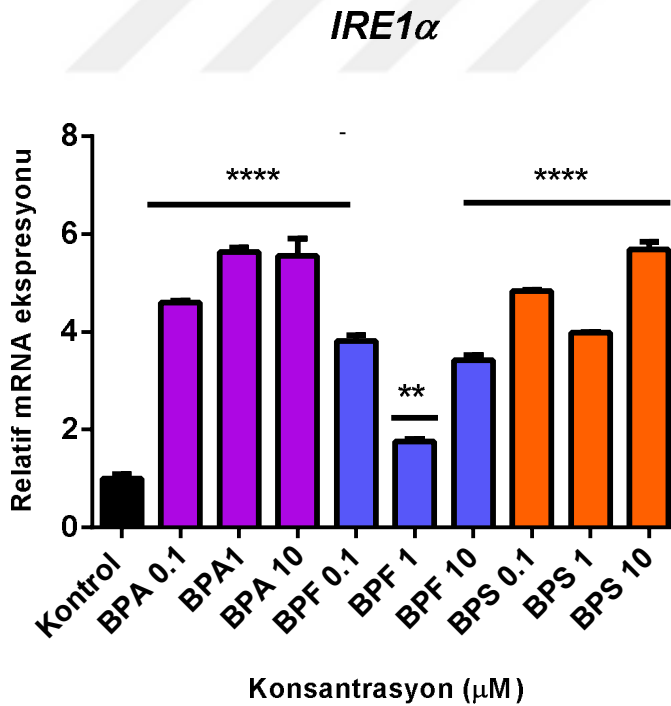
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

***IRE1α* geni:**48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 ve PNT1A hücrelerinde *IRE1α* geninde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-23 ve Şekil 4-24). PC-3 hücrelerinde, *IRE1α* geninin ekspresyonu, 1 µM konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 0,23 kat (p<0,05) azaldığı görülmüştür (Şekil 4-23). PNT1A hücrelerinde, *IRE1α* geninin ekspresyonunun 0,1, 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 3,57 kat (p<0,001), 4,55 kat (p<0,001), 4,31 kat (p<0,001) arttığı; 0,1, 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 2,71 kat (p<0,001), 0,71 kat (p<0,05), 2,34 kat (p<0,001) arttığı; 0,1, 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 3,81 kat (p<0,001), 2,97 kat (p<0,001), 4,56 kat (p<0,001) arttığı görülmüştür (Şekil 4-24).



Şekil 4-23: PC-3 hücrelerinde 0-10 μM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *IRE1α* geni relatif ekspresyonu.

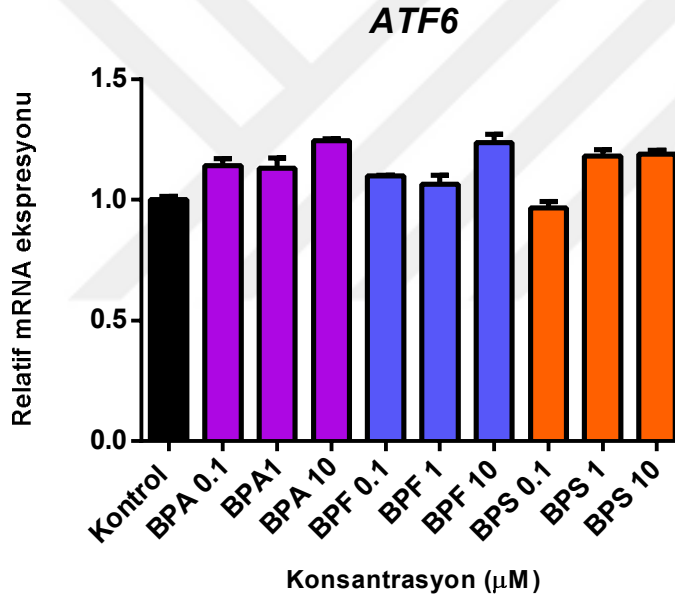
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** p<0,05 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)



Şekil 4-24: PNT1A hücrelerinde 0-10 μM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *IRE1α* geni relatif ekspresyonu.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** p<0,05; *** p<0,01; **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

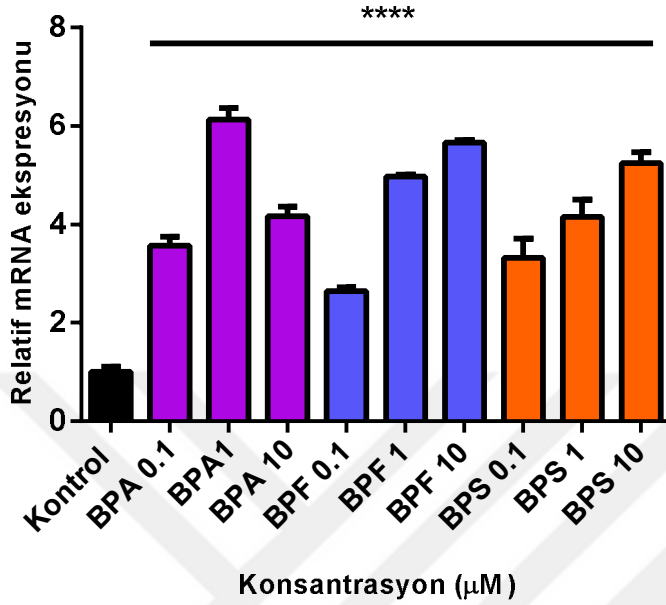
ATF6geni: 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 hücrelerinde *ATF6* geninde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 4-25). PNT1A hücrelerinde, *ATF6* geninin ekspresyonunun 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 2,43 kat ($p<0,001$), 4,97 kat ($p<0,001$), 3,03 kat ($p<0,001$) arttığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 1,59kat ($p<0,001$), 3,95 kat ($p<0,001$), 4,64 kat ($p<0,001$) arttığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 2,03 kat ($p<0,001$), 2,89 kat ($p<0,001$), 4,08 kat ($p<0,001$) arttığı görülmüştür (Şekil 4-26).



Şekil 4-25: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *ATF6* geni relatif ekspresyonu.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** $p<0,05$; *** $p<0,01$; **** $p<0,0001$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

ATF6



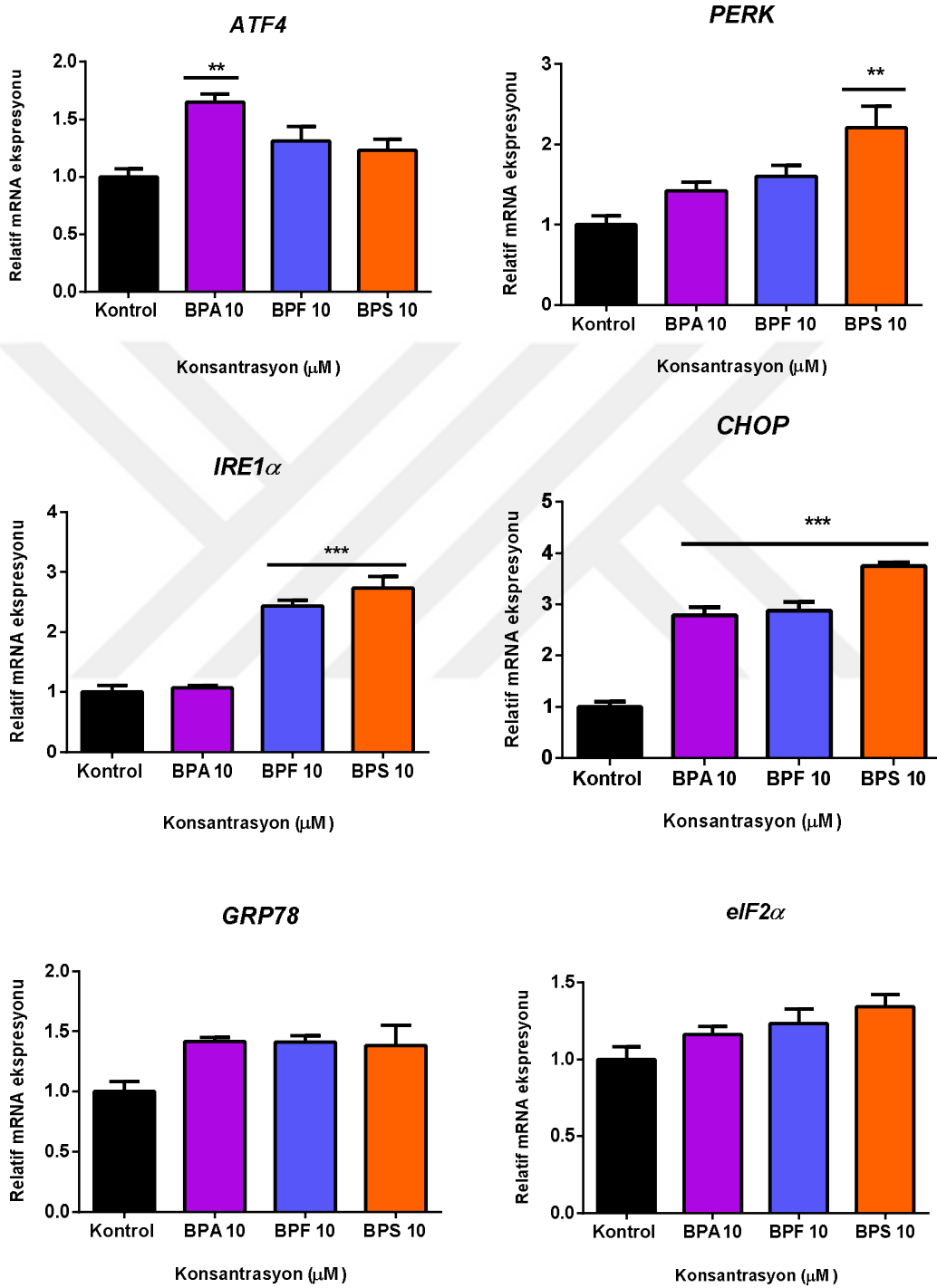
Şekil 4-26: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin ATF6 geni relatif ekspresyonu.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

4.4.2. 96 saat BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PNT1A Hücrelerinde Gen İfadesi Sonuçları

96 saat 10 µM konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS uygulanan PNT1A hücrelerinde *ATF4*, *PERK*, *IRE1α*, *CHOP*, *eIF2α* ve *GRP78* genlerinde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-27). *ATF4* geninin ekspresyonu, kontrol grubu ile kıyaslandığında, 10 µM BPA uygulanan maruziyet grubunda 0,61 kat artış (p<0,05); *PERK* geninin ekspresyonu, kontrol grubu ile kıyaslandığında, 10 µM BPS uygulanan maruziyet grubunda 1,05 kat artış (p<0,01); *IRE1α* geninin ifadesi, kontrol grubu ile kıyaslandığında, 10 µM BPF ve BPS uygulanan maruziyet gruplarında, sırasıyla, 1,36 ve 1,86 kat artış (p<0,01); *CHOP* geninin ekspresyonu, kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 µM BPA, BPF ve BPS uygulanan maruziyet gruplarında, sırasıyla, 1,67, 1,75 ve 2,69 kat artış (p<0,01) gözlenmiştir (Şekil 4-27). *GRP78* ve *eIF2α* genlerinin

ekspresyonlarında, kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4-27).

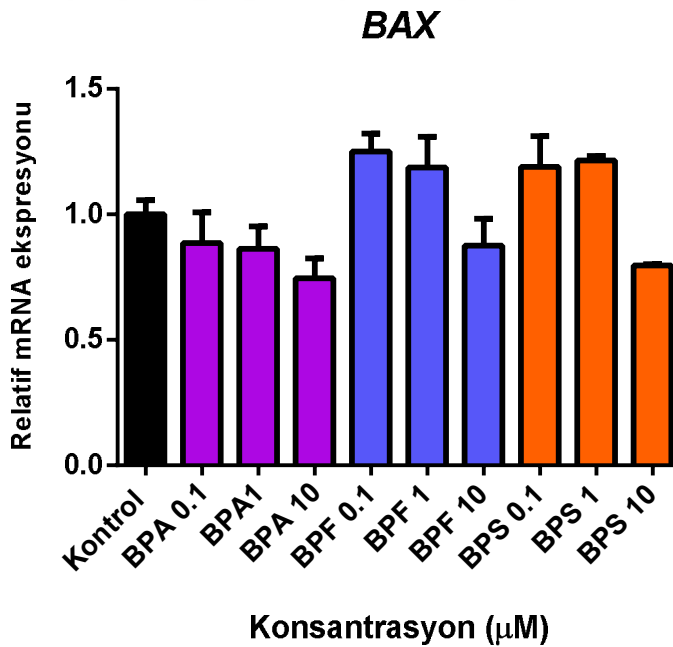


Şekil 4-27: PNT1A hücrelerinde 0-10 μM konsantrasyonlarda 96 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *ATF4*, *PERK*, *IRE1α*, *CHOP*, *eIF2α* ve *GRP78* genlerinin relatif ekspresyonu.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** p<0,05; *** p<0,01; **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

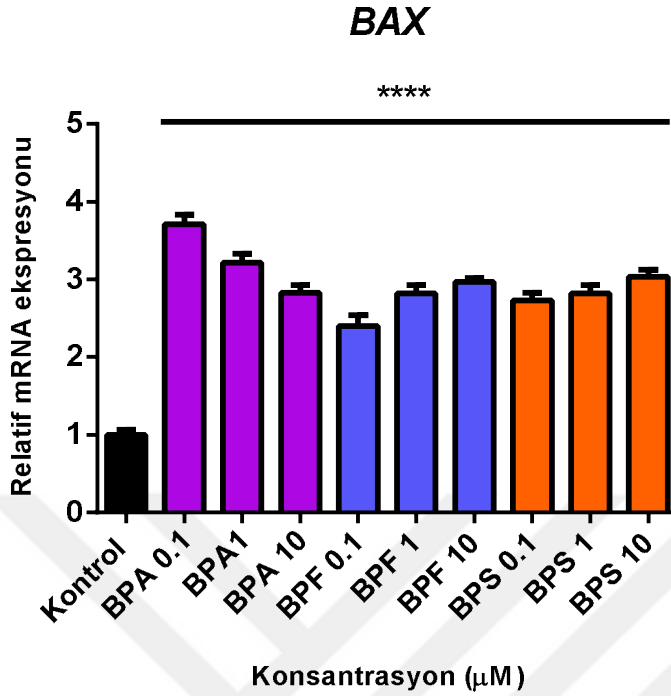
4.4.3. 48 saat BPA, BPF ve BPS'ye Maruz Bırakılmış PC-3 ve PNT1A Hücrelerinde Apoptoz ile İlişkili Genlerin Gen İfadesi Sonuçları

BAX geni: 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 hücrelerinde *BAX* geninde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 4-28). 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PNT1A hücrelerinde, *BAX* geninde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-29). PNT1A hücrelerinde, *BAX* geninin ekspresyonunun 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 2,62 kat (p<0,001), 2,13 kat (p<0,001), 1,76 kat (p<0,001) arttığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 1,3 kat (p<0,001), 1,74 kat (p<0,001), 1,93 kat (p<0,001) arttığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 1,6 kat (p<0,001), 1,74 kat (p<0,001), 1,96 kat (p<0,001) arttığı görülmüştür (Şekil 4-29).



Şekil 4-28: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *BAX* geni relatif ekspresyonu.

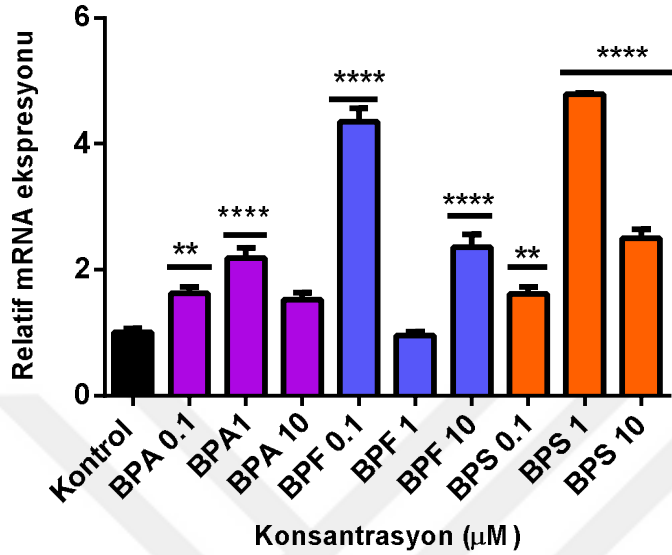
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: * p<0,1; ** p<0,05; *** p<0,01; **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)



Şekil 4-29: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *BAX* geni relatif ekspresyonu.

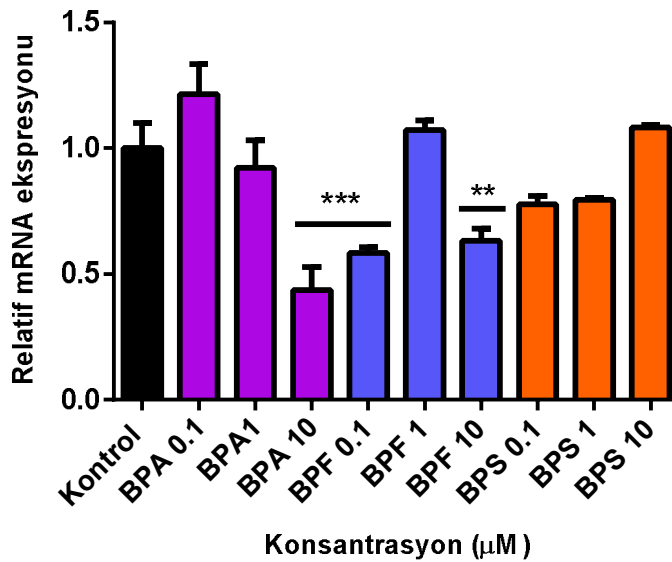
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

***BCL-2* geni:** 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 ve PNT1A hücrelerinde *BCL-2*geninde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-30 ve Şekil 4-31). PC-3 hücrelerinde, *BCL-2*geninin ekspresyonunun 0,1 ve 1 µM konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,55 kat (p<0,05), 1,06 kat (p<0,001), arttığı; 0,1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 3,2 kat (p<0,001) ve 1,22 kat (p<0,01) arttığı; 0,1, 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,53 kat (p<0,05), 3,77 kat (p<0,001), 1,4 kat (p<0,001) arttığı görülmüştür (Şekil 4-30). PNT1A hücrelerinde, *BCL-2*geninin ekspresyonunun 10 µM konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 0,63 kat (p<0,01) azaldığı; 0,1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,43 kat (p<0,01) ve 0,31 kat (p<0,05) azaldığı görülmüştür (Şekil 4-31).

BCL-2

Şekil 4-30: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *BCL-2* geni relatif ekspresyonu.

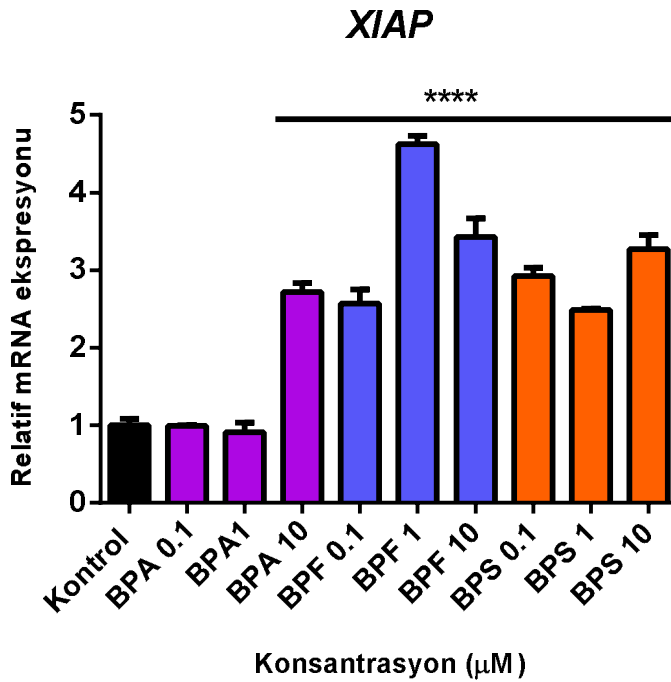
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** p<0,05; *** p<0,01; **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

BCL-2

Şekil 4-31: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *BCL-2* geni relatif ekspresyonu.

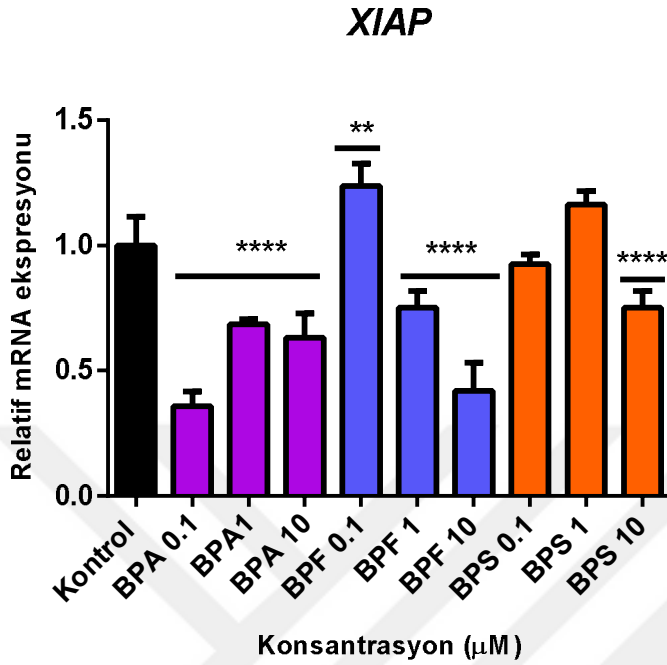
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** p<0,05; *** p<0,01 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

***XIAP* geni:** 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 ve PNT1A hücrelerinde *XIAP* geninde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-32 ve Şekil 4-33). PC-3 hücrelerinde, *XIAP* geninin ekspresyonunun 10 μ M konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, 1,64 kat ($p<0,001$) arttığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 1,44kat ($p<0,001$), 3,56 kat ($p<0,001$), 2,27 kat($p<0,001$) arttığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 1,85 kat ($p<0,001$), 1,47 kat ($p<0,001$), 2,15 kat($p<0,001$) arttığı görülmüştür (Şekil 4-32).PNT1A hücrelerinde, *XIAP* geninin ekspresyonunun 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla,0,68 kat ($p<0,001$), 0,33 kat ($p<0,001$), 0,43 kat ($p<0,001$) azaldığı; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla,0,17 kat ($p<0,05$), 0,29 kat ($p<0,001$), 0,65 kat ($p<0,001$) azaldığı;10 μ M konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, 0,29 kat ($p<0,001$) azaldığı görülmüştür (Şekil 4-33).



Şekil 4-32: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *XIAP* geni relatif ekspresyonu.

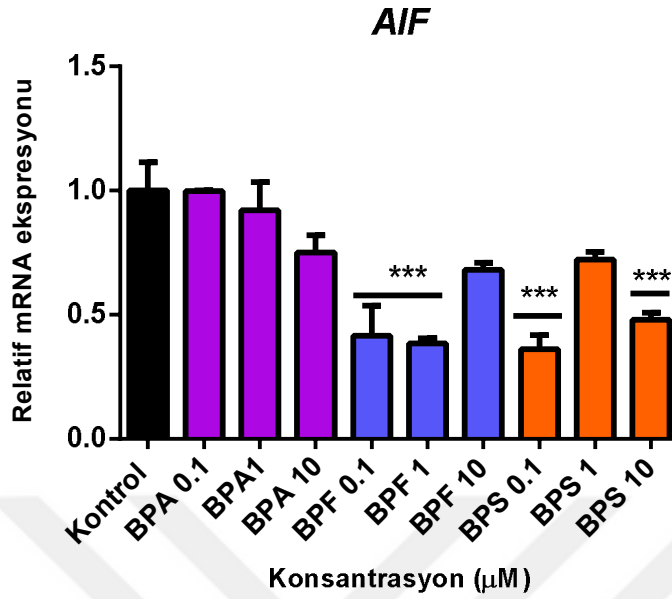
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: **** $p<0,0001$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)



Şekil 4-33: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *XIAP* geni relatif ekspresyonu.

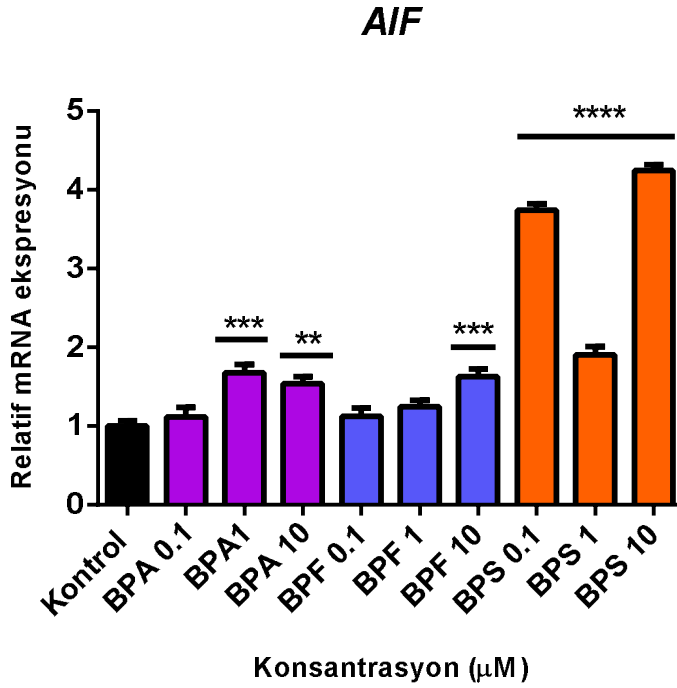
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** p<0,05; **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

***AIF* geni:** 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 ve PNT1A hücrelerinde *AIF* geninde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-34 ve Şekil 4-35). PC-3 hücrelerinde, *AIF* geninin ekspresyonunun, 0,1 ve 1 µM konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,72 kat (p<0,01), 0,68 kat (p<0,01), azaldığı; 0,1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,73 kat (p<0,01) ve 0,52 kat (p<0,01) azaldığı görülmüştür (Şekil 4-34). PNT1A hücrelerinde, *AIF* geninin ekspresyonunun 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,75 kat (p<0,01) ve 0,47 kat (p<0,05) arttığı; 10 µM konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 0,56 kat (p<0,01) arttığı; 0,1, 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 2,68 kat (p<0,001), 0,83kat (p<0,001), 3,19 kat (p<0,001) arttığı görülmüştür (Şekil 4-35).



Şekil 4-34: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *AIF* geni relatif ekspresyonu.

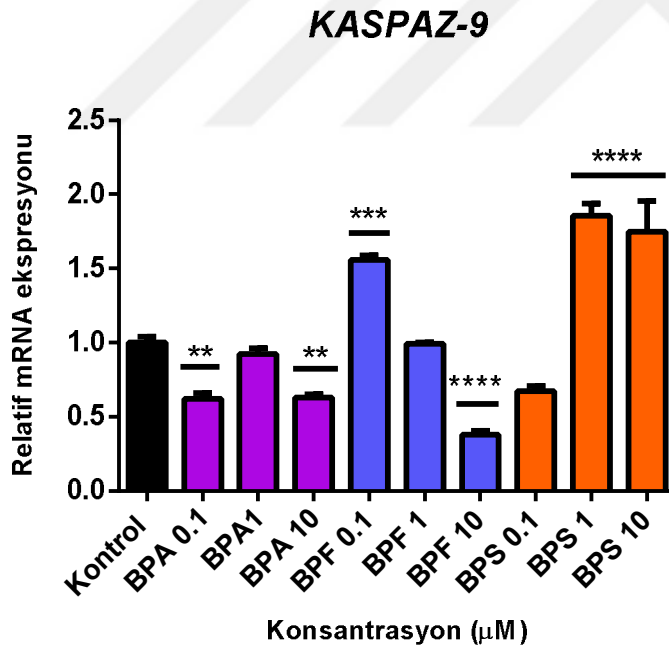
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: *** p<0,01 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)



Şekil 4-35: PNT1A hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *AIF* geni relatif ekspresyonu.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: *** p<0,01; **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

KASPAZ-9 geni: 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 hücrelerinde *KASPAZ-9* geninde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-36). *KASPAZ-9* geninin ekspresyonunun 0,1 ve 1 μ M konsantrasyonlarda BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,3 kat (p<0,05) ve 0,35 kat (p<0,05) azaldığı; 0,1 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 0,54 kat (p<0,01) arttığı, 10 μ M konsantrasyonlarda BPF uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 0,63 kat (p<0,001) azaldığı; 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla, 0,92 kat (p<0,001) ve 0,9 kat (p<0,001) arttığı görülmüştür (Şekil 4-36).

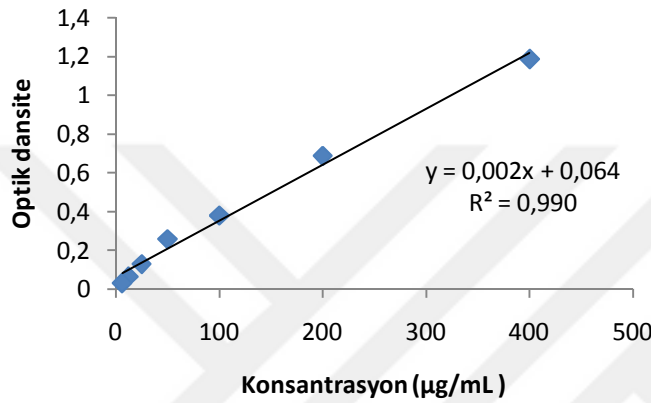


Şekil 4-36: PC-3 hücrelerinde 0-10 μ M konsantrasyonlarda 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyetinin *KASPAZ-9* geni relatif ekspresyonu.

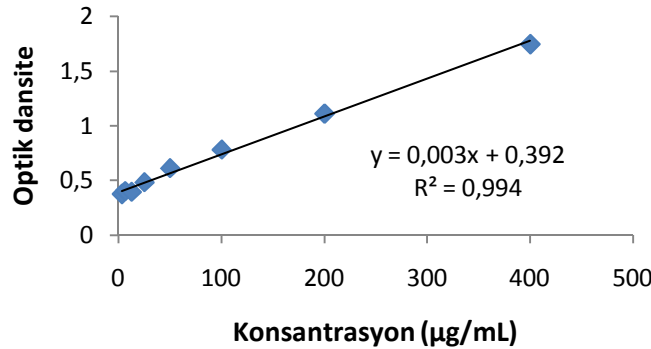
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.(n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** p<0,05; *** p<0,01; **** p<0,0001 ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

4.5. Protein Miktar Tayini Sonuçları

Protein ve histon proteinlerinin miktarı standart olarak BSA kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisi üzerinden hesaplandı. Bölüm 3.10.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanan konsantrasyonları 6,25,12,5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL olan BSA standart çözeltileri ile çizilen standart ölçü eğrisi PC-3 ve PNT1A hücreleri için sırasıyla, Şekil 4-37 ve Şekil 4-38’de verilmiştir.



Şekil 4-37: PC-3 hücrelerinde protein örneklerinin ölçümünde kullanılan protein standart ölçü eğrisi

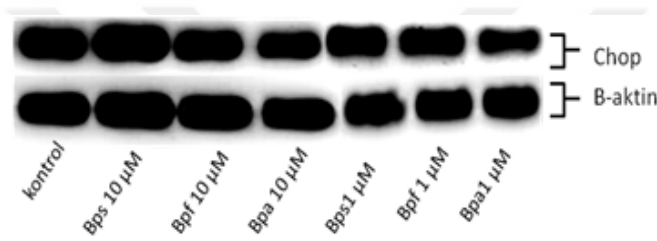


Şekil 4-38: PNT1A hücrelerinde protein örneklerinin ölçümünde kullanılan protein standart ölçü eğrisi.

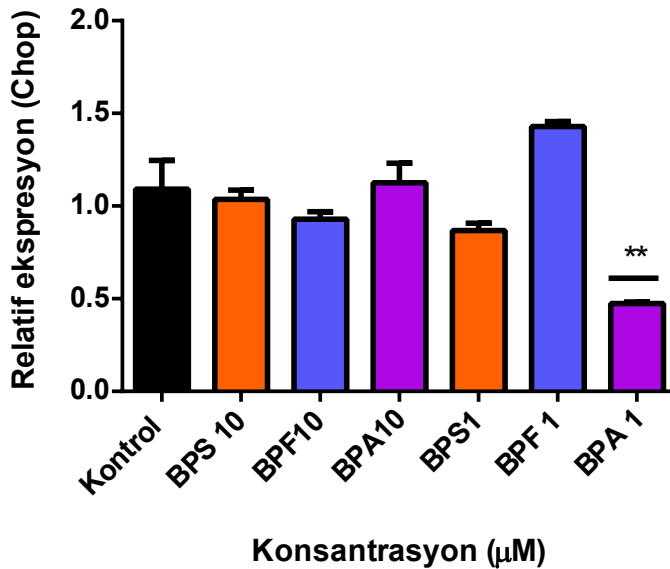
4.6. Western Blot Tekniği ile CHOP Proteininin Ekspresyon Sonuçları

0,1- 10 µM konsantrasyonlarda, BPA, BPF ve BPS uygulanan PC-3 ve PNT1A hücrelerinde, ER stresi ve apoptoz ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı değişiklikler tespit edilmiştir. Bu değişikliklerin ER stresinin indüklediği apoptoz yolları ile ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir. Bu sebeple, ER stresinin

indüklediği apoptoz yolağında önemli bir role sahip olan CHOP proteinin ekspresyon seviyeleri western blot tekniği kullanılarak belirlenmiştir. BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonucu CHOP proteini için western blot yöntemiyle yapılan protein analizinden elde edilen membran görüntüleri PC-3 ve PNT1A hücreleri için sırasıyla, Şekil 4-39 ve Şekil 4-41’de verilmiştir. 48 saat 1 ve 10 μM konsantrasyonlarında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan hücrelerinde CHOP protein ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; sadece 1 μM BPA konsantrasyonda 0,53 kat anlamlı azalma ($p<0,05$) gözlenmiştir (Şekil 4-40).



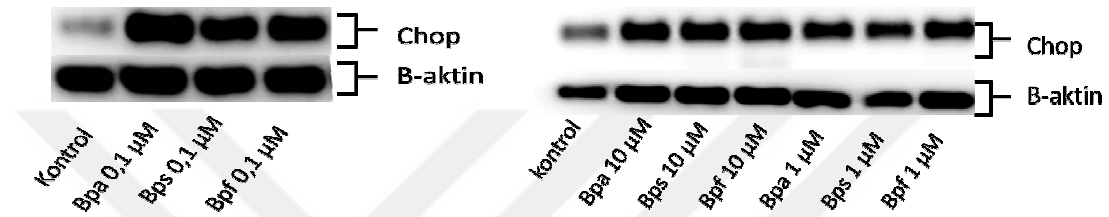
Şekil 4-39: 48 saat 1-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde CHOP proteini western blot membran görüntüleri.



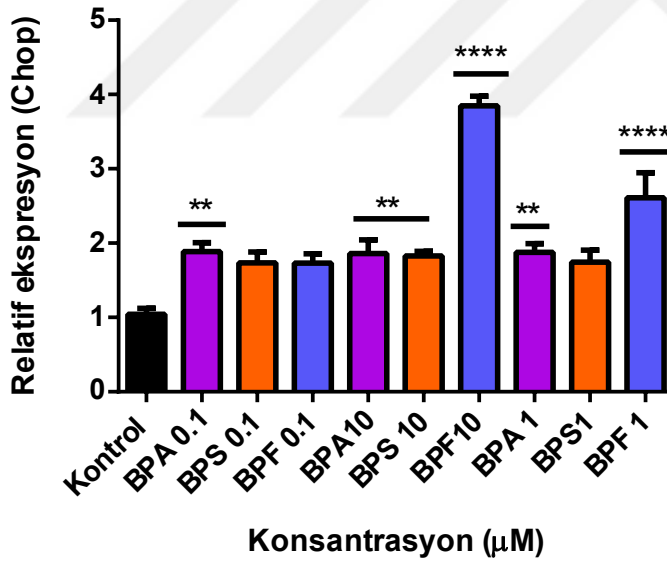
Şekil 4-40: 48 saat 1-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PC-3 hücrelerinde CHOP protein ekspresyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=4). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** $p<0,05$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

48 saat 0,1, 1 ve 10 μM konsantrasyonlarında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde CHOP protein ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış gözlenmiştir; 0,1, 1 ve 10 μM BPA konsantrasyonda, sırasıyla, 0,9 kat ($p<0,05$), 0,72 kat ($p<0,05$), 0,72 kat ($p<0,05$); 1 ve 10 μM BPF konsantrasyonda, sırasıyla, 1,37 kat ($p<0,001$), 2,75 kat ($p<0,001$); ve 10 μM BPS konsantrasyonda 0,78 kat ($p<0,05$) anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 4-42).



Şekil 4-41: 48 saat 0-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde CHOP proteinini western blot membran görüntüleri.



Şekil 4-42: 48 saat 0-10 μM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS maruziyeti yapılan PNT1A hücrelerinde CHOP protein ekspresyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. ($n=4$). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: ** $p<0,05$; **** $p<0,0001$ ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

5. TARTIŞMA

Endokrin bozucu kimyasallar (EDC), vücut homeostazının korunmasında, üreme, gelişim ve/veya davranış gibi yaşamsal fonksiyonlardan sorumlu vücuttaki doğal hormonların sentezine, salgılanmasına, taşınmasına, bağlanmasına veya ortadan kaldırılmasına etki eden, doğal ya da sentetik maddeler veya kimyasal karışımlardır (Kavlock ve ark., 1996; Choi ve Jeung, 2003; Kabir ve ark., 2015). EDC'ler, hem insanların hem de vahşi yaşamın endokrin sisteminin normal işleyişini değiştiren bileşiklerdir. Günümüzde çok sayıda kimyasal madde, EDC olarak tanımlanmıştır ve insanlar bu maddelere mesleki, diyet ve çevresel (su, toprak ve hava) yollar ile maruz kalabilmektedirler (Kabir ve ark., 2015). Bu maddeler oldukça düşük konsantrasyonlarda geri dönüşümsüz olabilen veya ömür boyu da gözlenebilen etkiler gösterebilmektedir. EDC'lerin esas olarak canlı sistemin hormonal ve homeostatik sistemini değiştirerek etki gösterdiği bilinmektedir. Bu sistemler metabolizma, cinsel gelişim, insülin üretimi ve kullanımı, büyüme, stres tepkisi, cinsiyet davranışı, üreme ve fetüs gelişimi gibi birçok önemli sürecin düzenlenmesinde yer aldıkları ve bu süreçlerdeki fonksiyon kayıplarının kansere, diyabete, obezite gibi metabolik sendromlara ve kısırlığa yol açabildikleri için birincil öneme sahip olabilecekleri düşünülmektedir (Borget ve ark., 2003; Daston ve ark., 2003; De Coster ve Van Larebeke, 2012; Kabir ve ark., 2015; Solomon ve Schettler, 2000). EDC'ler yapısal olarak östrojen ya da androjene benzerler ve östrojen ya da androjen reseptörlerine bağlanarak endojen steroid hormonların aktivitelerini değiştirirler (Borget ve ark., 2003; Daston ve ark., 2003; Hwang ve ark., 2011).

Önemli EDC'lerden biri olan BPA [2,2-bis (4-hidroksifenil) propan], 1950'lerden itibaren sentetik monomer olarak endüstride polikarbonat plastik ve epoksi reçinesinin üretiminde kullanılırken, polikarbonat plastik ürünlerde, termal kağıtlarda ve günlük hayatta sıkça kullanılan pek çok üründe bulunmaktadır (Ho ve ark., 2017; Olea ve ark., 1996; Wolstenholme ve ark., 2011). BPA günümüzde bebekler ve çocuklar için çok sayıda tüketici ürününde kısıtlanmıştır. Ne yazık ki, bu düzenlemeler BPA'nın benzer toksikolojik özelliklere sahip olabilecek diğer bisfenollerle artan bir şekilde değiştirilmesiyle sonuçlanmıştır. Bunlar, endüstriyel uygulamalarda BPA yerine tercih

edilen BPS (4,4'-sülfonilbisfenol) veya BPF'yi (4,4'-dihidroksidifenil-metan) içermektedir (Bousoumah ve ark., 2021). Ancak, bu alternatiflerin çeşitli sistemler üzerine toksik etkileri ile ilgili veriler oldukça kısıtlıdır. Sonuç olarak, BPA'ya alternatifler geliştirilmekte ve bu alternatifler giderek BPA'nın yerini almaktadır.EDC'lerin risk değerlendirilmesinde tehlikenin tanımlanması amacıyla toksisitelerinde rol oynayan mekanizmaların aydınlatılması, düzenleyici kurumlar tarafından hazırlanan regülasyonlar için gereklilik olarak ortaya çıkmaktadır.

Tez çalışmasında; BPA ve yasal düzenlemelerden dolayı BPA yerine oldukça sık kullanılan ve toksisite mekanizması hakkında verilerin sınırlı olduğu BPA analoglarının (BPF ve BPS) da endokrin bozucu etkileri göz önünde bulundurulduğunda toksik etkileri *in vitro* yöntemler kullanılarak aydınlatılması amaçlanmıştır. Daha önce yüksek lisans tezinde, insan prostat adenokarsinoma (PC-3) hücrelerinde, BPA'nın karsinogenez ile ilişkili olabileceği düşünülen bir takım yolaklar araştırılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen veriler, doktora tezinde de hücre kültürü maruziyet koşullarını belirlemede yardımcı olmuştur. Bu amaçla; endokrin sistem ile ilişkili PC-3 ve PNT1A hücrelerinde BPA, BPF ve BPS'nin ER stresi üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, BPA'ya göre henüz çok fazla veri bulunmayan BPS ve BPF'nin toksisite potansiyelleri BPA ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, tez çalışmasında PC-3 ve PNT1A hücre dizilerinde BPA, BPF ve BPS'nin belirli konsantrasyonlarda hücrelere maruziyeti sonucu; 1) sitotoksik etkileri, 2) hücre proliferasyonu üzerine etkiler, 3) apoptoz ve oksidatif hasar seviyeleri, 4) ER stresi ve apoptozda rol oynayan genlerde mRNA seviyeleri ve 5) CHOP proteininin ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri araştırıldı. Böylelikle, belirlenen genler aracılığıyla BPA, BPF ve BPS'nin prostat ile ilişkili olabileceği düşünülen ER stresi ile ilişkili yolaklar açıklanmaya çalışılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan tümörijenik olmayan PNT1A hücreleri, hücre dönüşümünün ilk aşamaları için iyi bir modeli temsil etmektedir. Ayrıca, gelişmiş PCa'nın yaygın olarak kullanılan bir deneysel modelini temsil eden ve PCa'nın lokalize metastazlarından izole edilen tümörijenik, androjenden bağımsız ve p53 negatif PC-3 hücreleri de tez çalışmasında kullanılmıştır (Rizzi ve ark., 2014).

Kimyasallara maruz kalan prostat hücrelerinde üreme toksisitesi hakkında yapılan çalışmalarda maruziyet süresi olarak genellikle 48 saatlik periyotlar seçilmiştir

(Yin ve ark., 2017). Başka bir çalışmada, Sprague-Dawley sıçanlarından elde edilen primer kültür Sertoli hücreleri, 24 saat boyunca 30, 50 ve 70 μM konsantrasyonlarda BPA'ya maruz bırakılmış, BPA'nın düşük konsantrasyonlu maruziyeti ve uzun vadeli etkileri göz önüne alındığında, 48 saat boyunca 50 μM 'den az veya daha uzun süreli maruz kalmanın Sertoli hücreleri üzerinde olumsuz etkileri olup olmadığının araştırılmasının gerekliliği önerilmiştir (Qi ve ark., 2014). Ek olarak, tez çalışmasında, PNT1A hücrelerinin, 10 μM konsantrasyonda, BPA, BPF ve BPS'ye 96 saatlik maruziyet sonucunda, ER stresi ile ilişkili genlerin ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler tespit edilmiş fakat bu değişikliklerin 48 saatlik maruziyet sonucu elde edilen verilere oranla daha az etkili olduğu gözlenmiştir. Bu veriler neticesinde, tez çalışmasında, PC-3 ve PNT1A hücrelerinde maruziyet süresi olarak 48 saat seçilmiştir.

Tez çalışmasında, MTT testi ile IC_{50} değerleri; PC-3 hücre dizisinde 48saat BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonucu sırasıyla 157,66, 510,17 ve 519,61 μM olarak; PNT1A hücre dizisinde 48 saat BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonucu, sırasıyla, 101,05, 485,5 ve 659,24 μM olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre, PC-3 hücrelerinde 24saatlik maruziyet sonucu; PNT1A hücrelerinde ise 48 saatlik maruziyet sonucu sitotoksosite potansiyelleri BPA>BPF>BPS olarak olarak gözlenmiştir. Tez çalışmasına benzer şekilde, Kose ve arkadaşlarının (2020) yaptıkları bir çalışmada normal insan prostat epitel hücreleri (RWPE-1), 24 saat boyunca 0-600 μM konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS için IC_{50} değerleri sırasıyla 113,74, 249 ve 380,9 μM olduğu rapor edilmiştir. Bu sonuçlara göre, sitotoksosite potansiyelleri BPA>BPF>BPS olarak sıralanmıştır (Kose ve ark., 2020). Russso ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları bir çalışmada ise, fare fibroblast (3T3-L1), insan meme kanseri (MCF-7), sıçan gliyoma (C6) ve insan servikal kanser (HeLa) hücre dizilerine BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrası IC_{50} değerleri 50 ± 5 -274,4 $\pm$ 4,6 aralığında belirlenmiş ve bu çalışmaya göre kullanılan hücre dizilerinde BPA'nın sitotoksosite potansiyelinin BPF ve BPS'den daha fazla olduğu gözlenmiştir (Russso ve ark., 2018). Fare Leydig tümör hücreleri (MA-10), fare spermatogonial kök hücreleri (C18-4 spermatogonial) ve insan yumurtalık granüloza tümör hücreleri (KGN) en düşük 0,001-100 μM konsantrasyonlarda 48 saatlik BPA, BPF ve BPS'ye maruz bırakıldığı ve maddelerin sitotoksik etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, BPA, BPF ve BPS'nin C18-4 hücrelerinde zayıf sitotoksik olduğu görülmüştür ($\text{IC}_{50}>100 \mu\text{M}$). Her üç hücre dizisinde BPA'nın, analogları olan BPM and BPTMC'ye göre, test edilen

en az sitotoksik potansiyele sahip kimyasallardan biri olduğu gözlenmiştir. İlginç bir şekilde, BPF ve BPS, yalnızca MA-10 hücrelerinde sitotoksik bulunmuştur. BPF, MA-10 hücrelerinde BPA'dan daha az sitotoksik bulunmuştur. BPF ve BPS'nin, test edilen en yüksek konsantrasyonda KGN hücrelerinde sitotoksik olmadığı bulunmuştur (Rajkumar ve ark., 2021). İnsan periferik kan mononükleer hücrelerine (PBMC) 4 saatlik BPA ve BPF maruziyeti sonrası LC_{50} değerleri sırasıyla 549,6 μ M ve 646,5 μ M olarak bulunmuştur (Michałowicz ve ark., 2015). Fare spermatozoid hücrelerinin (GC-2) 24 ve 48 saatlik 0-500 μ M konsantrasyonlarda BPA'ya maruz bırakıldığı bir çalışmada, IC_{50} değeri 160 μ M olarak bulunmuştur (Yin ve ark., 2017). Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ve yapılan çalışmalar BPA'nın sitotoksik potansiyelinin analogları olan BPF ve BPS'ye göre daha fazla olduğunu göstermektedir.

BPA, BPF ve BPS'nin hücre proliferasyonu üzerine etkilerini incelemek amacıyla PC-3 ve PNTA1 hücrelerinde 48 saat 0,1, 1, 10 μ M konsantrasyon aralığında maruziyet yapılarak BrdU testi uygulanmıştır. Kontrole kıyasla, relatif hücre proliferasyonunda PC-3 hücrelerinde BPA 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonda, sırasıyla, %44, %22 ve %10; BPF 0,1 μ M konsantrasyonda %19 ve BPS 10 μ M konsantrasyonda %10 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi; PNTA1 hücrelerinde ise; kontrole kıyasla, relatif hücre proliferasyonunda BPA 10 μ M maruziyet grubunda %29,7 oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir. Zang ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları bir çalışmada, BPA yüksek konsantrasyonlarda (10-50 μ M), maksimum 2,7 katlık bir artışla fare hipofiz tümörü hücreleri (GH3) hücre çoğalmasında önemli ölçüde arttırmıştır. Ayrıca, aynı konsantrasyon aralığındaki BPS ve BPF, sırasıyla maksimum 1,9 ve 2,0 kat artışla aynı hücrelerde hücre proliferasyonunu indüklemiştir (Zang ve ark., 2018). Ayrıca, düşük doz BPA'nın (10^{-9} mol/L=10 nM) insan meme karsinom hücrelerinin hücre proliferasyonunu uyardığı gözlenmiştir (Mlynarcikova ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ise; BPA, BPS ve BPF, kontrol ile kıyaslandığında insan meme karsinomu (MCF-7 CV) hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde indüklemiştir. Ayrıca, BPS ve BPF'nin, BPA'ya benzer ER'ye bağlı sinyal yolu yoluyla MCF-7 CV hücrelerinin proliferasyonunu teşvik ederek ksenoöstrojenler gibi davrandığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2017). Bir diğer çalışmada, HepG2 hücrelerinin 5, 10, 15 ve 20 μ g/mL konsantrasyonlarında BPA, BPF, BPS'ye 24 ve 72 saat maruz bırakılmasından sonra hücre canlılığı MTS testi kullanılarak

incelenmiştir. 24 saatlik maruziyetten sonra bu maddelerin hiçbiri hücre canlılığını etkilemezken; 72 saatlik maruziyetten sonra, 20µg/mL konsantrasyonda BPF ve BPS'nin hücre canlılığını yaklaşık %15 azalttığı gözlenmiştir (Hercog ve ark., 2019). Modifiye edilmiş insan osteosarkom hücreleri (U2OS) hücrelerinin 0,39–100 µM konsantrasyon aralığında BPA, BPF ve BPS ile 24 saatlik maruziyeti sonrası, hücre canlılığında belirgin ve konsantrasyona bağlı bir azalma görülmüştür. Sadece 10 µM'nin üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. 100 µM'lik bir konsantrasyonda, BPA, BPF ve BPS'nin U2OS hücrelerinin sağkalım oranlarını sırasıyla %7,6; 31,1 ve 57,5 oranlarında indüklediği gösterilmiş ve BPS ve BPF'nin sitotoksik aktivitelerinin BPA'nkinden daha düşük olduğu gösterilmiştir (Shao ve ark., 2021). BPF'nin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada, 0,01–1 µM konsantrasyonlarda 24 saatlik BPF maruziyetinin hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı arttırdığı; 25 ve 50 µM konsantrasyonlarda ise hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (Lei ve ark., 2018). Benzer şekilde tez çalışmasında, PC-3 hücrelerinde 48 saatlik 0,1 µM BPF maruziyeti sonrası hücre proliferasyonunda anlamlı artış gözlenirken; 1 ve 10 µM BPF maruziyeti sonrası hücre proliferasyonunda anlamlı olmayan azalmalar gözlenmiştir. Michałowicz ve ark. (2015) yüksek konsantrasyonlarda (1,1 mM ve özellikle 2,2 mM) BPA'nın ve BPS'nin (2 mM konsantrasyonda) 4 saatlik maruziyetten sonra PBMC hücrelerinin canlılığında güçlü bir düşüşe neden olduğunu bildirmiştir (Michałowicz ve ark., 2015). Daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmada, PC-3 hücrelerinde 96 saatlik 0,1, 1 ve 10 µM BPA maruziyeti sonrası hücre proliferasyonunda anlamlı değişiklik gözlenmediği görülmüştür (Karaman ve ark., 2019). Tez çalışmasında, 48 saatlik 0,1, 1 ve 10 µM BPA, BPF ve BPS maruziyet sonrası, PC-3 hücrelerinde 0,1, 1 ve 10 µM BPA; 0,1 µM BPF ve 10 µM BPS maruziyeti sonrası hücre proliferasyonunda meydana gelen anlamlı artışın maruziyet süresi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

ROS oluşumu, hücresel ağ ve yapıya zarar veren birçok toksik madde ile indüklenebilmektedir. Fenollerin toksik etkileri ROS oluşumuyla ilişkilidir. BPA, ROS oluşumunda ve vücuttaki birçok hücresel biyomolekülün oksidasyonunda önemli rol oynamaktadır (Ullah ve ark., 2018). ROS'un aşırı üretimi, indüklenebilir bir apoptoz faktörü olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, BPA maruziyetinin antioksidan enzimleri inhibe ederek, hücre içi kalsiyum seviyesini artırarak ROS ürettiği

gösterilmiştir. Bu nedenle, aşırı ROS üretiminin BPA kaynaklı ER stresinin bir tetikleyicisi olabileceğini düşündürmektedir. (Asahi ve ark., 2010). Tez çalışmasında PC-3 ve PNT1A hücrelerine 48 saatlik 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS maruziyeti sonrası ROS oluşumunda gözlenen değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. İki hücre dizisinde de benzer şekilde, BPA maruziyeti sonucu anlamlı olmayan artış; BPF ve BPS maruziyeti sonucu ise anlamlı olmayan azalma gözlenmiştir. Tez çalışmasından ve yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların kullanılan hücre dizisi ve maruziyet süresiyle ilişkili olarak değişiklik gösterebileceği düşünülmektedir.

ER stresinin geri döndürülemediği durumlarda, hücresel fonksiyonlar bozulur ve genellikle hücre ölümü ile sonuçlanır. UPR ile indüklenen çeşitli mekanizmalar ER stresini hafifletemezse, apoptoz için hem içsel hem de dışsal yollar aktive olabilir (Sano ve Reed, 2013). Tez çalışmasında, 48 saat BPA, BPF ve BPS uygulanan PNT1A ve PC3 hücrelerinde Annexin V ve PI boya ları kullanılarak flow sitometri cihazı ile %apoptoz oranına bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla maruziyet gruplarında değişiklikler gözlenmiş olup, erken apoptoz ve geç apoptoz oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler olduğu görülmüştür. PC-3 hücrelerinde, erken apoptoz, kontrol grubu ile kıyaslandığında, 0,1-10 μ M konsantrasyondaki BPA; 0,1 ve 1 μ M konsantrasyondaki BPF ve 1 ve 10 μ M konsantrasyondaki BPS maruziyet gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir. PC-3 hücrelerinde geç apoptoz, kontrol grubu ile kıyaslandığında 0,1-10 μ M konsantrasyondaki BPA, 1 μ M konsantrasyondaki BPF maruziyet gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma ve 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyondaki BPS maruziyet gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. PNT1A hücrelerinde, erken apoptoz oranı kontrol grubu ile kıyaslandığında, 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyondaki BPA maruziyet grubu; 0,1 ve 1 μ M konsantrasyondaki BPF maruziyet grubu; 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyondaki BPS maruziyet gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür. PNT1A hücrelerinde geç apoptoz oranı kontrol grubu ile kıyaslandığında, 0,1 ve 10 μ M konsantrasyondaki BPF maruziyet grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış; 10 μ M konsantrasyondaki BPS maruziyet grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir. Yin ve arkadaşlarının (2017) yaptıkları bir çalışmada, BPA'nın 20,40 ve 80 μ M'lık maruziyet sonrası flow sitometri cihazı ile annexin V-FITC/PI boyaması

yapılan hücrelerin kontrole kıyasla apoptoz oranlarındaki değişimler, maruziyet dozuna göre sırasıyla, %3,5, %7, %12,7 ve %17,9 oranlarında artış olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, BPA'nın GC-2 hücrelerinde apoptozu indüklediği gözlenmiştir (Yin ve ark., 2017). YO-PRO-1 ve PI boyaları kullanılarak PBMC hücrelerinde flow sitometri cihazı ile apoptozun değerlendirildiği bir çalışmada, BPA'nın 5 µg/mL konsantrasyonda apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olurken BPF ve BPS'nin ise 20 µg/mL konsantrasyonda apoptotik hücre sayısında değişikliklere yol açtığı gözlenmiştir. Ayrıca, 100 µg/mL konsantrasyonda BPA'nın apoptotik PBMC sayısını en güçlü şekilde arttırdığı bulunmuştur (kontrol değerinden %41,8 fazla). 100 µg/mL konsantrasyonda BPF ve BPS'nin apoptotik PBMC sayısını kontrol değerine kıyasla sırasıyla %22,2 ve %20,9 arttırdığı gösterilmiştir. 20 µg/mL'de BPS'nin çalışılan parametrede en güçlü apoptotik değişiklikleri indüklediği gözlenmiştir (Mokra ve ark., 2015). Tez çalışmasında, PC-3 hücrelerinde geç apoptozda BPS'nin 1 ve 10 µM'lik konsantrasyonlarındagüçlü apoptotik değişiklikler gözlenirken; PNT1A hücrelerinde ise geç apoptozda BPF'nin 0,1 ve 10 µM'lik konsantrasyonlarında güçlü apoptotik etkiler gözlenmiştir.

Üç ER transmembran sensörü PERK, IRE1α ve ATF6, UPR'ye aracılık etmektedir (Qin ve ark., 2020). Tez çalışmasında, 48 saat boyunca BPA, BPF ve BPS'ye maruz bırakılan PC-3 hücrelerinde kontrole kıyasla, *PERK* mRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma, *IRE1α* geninde anlamlı olmayan değişiklikler ve *ATF6* geninde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan değişiklikler gözlenirken; PNT1A hücrelerinde ise *PERK*, *IRE1α* ve *ATF6* istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. PNT1A hücrelerindeki bu üç transmembran sensöründeki artış, bu hücrelerde kimyasal maruziyeti sonucu ER stresinin oluşabileceğini düşündürmektedir. *PERK*'in, aktive olması durumunda, ER stres koşullarında *eIF2α*'nın fosforilasyonuna yol açtığı iyi bilinmektedir. *eIF2α*'nın fosforilasyonu, genel transkripsiyonu kapatmakta ve *ATF4*'ün ekspresyonunu seçici olarak arttırmaktadır (Tabuchi ve ark., 2006). Tez çalışmasında, PNT1A hücrelerinde *eIF2α* gen ekspresyonunda kontrole kıyasla artış gözlenirken; aksine, PC-3 hücrelerinde *eIF2α* gen ekspresyonunda kontrole kıyasla azalmalar gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, yumurtalıkları alınmış farelerin 3 ay boyunca 1 µg/mL dozlarda BPA'ya maruziyeti sonrası, ER stresi ile ilgili genlerin (*GRP170* ve *ATF6*) seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, BPA, *GRP78*, *GRP170*

ve *ATF6* genlerinin mRNA seviyelerini arttırarak farelerde hafif yağlanmaya neden olmuştur (Figueiredo ve ark., 2020). *ATF6* genlerinin ekspresyonları ise her iki hücre dizisinde de istatistiksel olarak anlamlı artışlar göstermiştir. Bu veriler doğrultusunda, PNT1A hücrelerinde *PERK*'in aktivasyonu sonucu *ATF4* ekspresyonunda artışın ER stresine yol açtığı düşünülebilir. Tez çalışmasında *ATF4* gen ekspresyonu PNT1A hücrelerinde artış gösterirken; aksine, PC-3 hücrelerinde azalma gözlenmiştir.

GRP78, anti-apoptotik mekanizmaları, UPR sensör aktivasyonunun önlenmesini ve hatalı katlanmış protein agregasyonunu sınırlayarak ER kalsiyum homeostazının ve şaperon aktivitesinin korunmasını sağlamaktadır (Vandewynckel ve ark., 2013). GRP78 seviyelerinin artması, ER stresinin varlığını göstermektedir (Asahi ve ark., 2010). GRP78, tümör oluşumunda önemli bir rol oynar ve hücre proliferasyonunun artması, apoptoza karşı direnç ve tümör anjiyogenezinin desteklenmesi gibi kanserin üç ana özelliğinde de rol oynamaktadır. *GRP78* mRNA ekspresyonundaki artışla UPR ve prostat tümörigenezi arasındaki bir bağlantıdan söz edilmektedir ve artmış *GRP78* mRNA ekspresyonu, hücrenin sağkalım oranının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Vandewynckel ve ark., 2013). Tez çalışmasında, 48 saatlik 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS'ye maruziyet sonucu PNT1A hücrelerinde *GRP78* gen ekspresyonunda kontrole göre anlamlı artışlar gözlenmiştir. Bu artışın PNT1A hücrelerinde, apoptotik, proapoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarındameydana gelen değişikliklerle tutarlı olduğu ve bu hücrelerde apoptozun indüklendiği düşünülmektedir. Bazı kanser türlerinde UPR seviyelerinde gözlenen artışın, protein katlama kapasitesini arttırarak ve ömrü uzatarak tümör hücreleri için faydalı olabilirken; aksine, UPR'nin prostat kanseri hücrelerinde azalması, onların apoptotik yoldan kaçmalarına ve tümörigenezi desteklemelerine izin verebilmektedir (So ve ark., 2009). Tez çalışmasında, 48 saatlik 0,1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS'ye maruziyet sonucu PC-3 hücrelerinde *GRP78* gen ekspresyonunda kontrole göre anlamlı azalma gözlenmiştir. Bu azalmanın, PC-3 hücrelerinde, apoptotik, proapoptotik ve antiapoptotik genlerin ekspresyonlarındagözlemlenen değişikliklerle tutarlı olduğu ve böylelikle, bu hücrelerin apoptozdan kaçmaya çalışarak ER stresine adaptasyon geliştirdiklerini düşündürmektedir. Ayrıca tez çalışmasında, PNT1A hücrelerine 96 saat boyunca tez çalışmasındaki en yüksek konsantrasyon olan 10 μ M konsantrasyonda BPA, BPF ve

BPS uygulanmış ve *ATF4*, *PERK*, *IRE1a*, *CHOP*, *eIF2a* ve *GRP78* genlerinin ekspresyonlarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. 96 saatlik maruziyet ile kıyaslandığında, 48 saatlik maruziyet sonrası belirtilen genlerin tümünün relatif gen ekspresyonundaki artışın daha güçlü olduğu gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişikliklerin maruziyet süresine bağlı olarak farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, *GRP78*, *PERK*, *IRE1* ve *ATF6*, *in vivo* ve *in vitro* BPA maruziyeti sonucu meydana gelen erkeklerde reproduktif toksisitenin oluşmasına yol açan ER stres ile ilişkili moleküler sensörlerdir (Yin ve ark., 2017).

PERK/*eIF2a*/*CHOP* yolu bir ER stres sinyal yoludur ve hücrel apoptozun regülasyonunda rol oynamaktadır (Yin ve ark., 2017). *CHOP*, *ATF4* ve *ATF6* tarafından yukarı regüle edilen proapoptotik bir transkripsiyon faktörüdür ve *BCL-2*'nin transkripsiyonunu baskılar (Asahi ve ark., 2010). Benzer şekilde, tez çalışmada, PNT1A hücrelerinde, *CHOP* ve *BAX* gen ekspresyonunda anlamlı artış gözlenirken; PC-3 hücrelerinde ise *CHOP* ve *BCL-2* gen ekspresyonunda anlamlı azalma gözlenmiştir. 100 µM konsantrasyonda BPA'ya maruz bırakılan fare hepatosit (parankimal olmayan) hücrelerinde (NCTC Klon 1469) *CHOP*, *KASPAZ-12* ve *GRP78* genlerinin ekspresyonlarında artışlar tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, BPA'nın ER stres ile ilişkili apoptozu indükleyebileceği ileri sürülmüştür (Asahi ve ark., 2010). Benzer şekilde tez çalışmada, *CHOP* geni ekspresyonunda 0-10 µM konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS'ye maruz bırakılan PC-3 hücrelerinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenirken PNT1A hücrelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Sertoli hücresi modeli olarak kullanılan fare fibroblast hücreleri (TTE3) ile yapılan bir çalışmada, BPA'nın 200 µM konsantrasyonda, ER stres belirteçlerinin (*GRP78* ve *CHOP*) artan ekspresyonu, hem Real-Time PCR hem de mikrodizi analizleri ile doğrulanmıştır (Tabuchi ve ark., 2006). Başka bir çalışmada, erkek zebra balıkları (*Danio rerio*) fertilizasyondan sonra 3 saat ile 120 gün süresince 1, 10 ve 100 µg/L BPS'ye maruz bırakılmış, BPS'ye uzun süreli maruz kalmanın karaciğer fibrozu ve inflamasyona yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca, 120 gün boyunca BPS'ye maruz kalma sonucu, ER stres (*PERK*, *GRP78*, *ATF4a* ve *CHOP*) genlerinin ekspresyonunu artmıştır (Qin ve ark., 2020). İnsan kök hücresinden türetilen hepatosit benzeri hücrelerde (HLC-H9 ve HCL-Man12) genom-çapında yapılan bir çalışmada hücreler farklılaşma süresi boyunca (8 gün) sırasıyla; 19, 29 ve 31 µM BPA,

BPF ve BPS'ye maruz bırakılmış ve mRNA ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. BPF'ye maruz kalma, kaspaz inhibitörü *XIAP*'nin ekspresyonunu azaltmıştır. BPA ve BPF'ye maruz kalan HLC-Man12 hücrelerinde proapoptotik genlerin ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. BPA'ya maruz kalan HCL-H9 hücrelerinde, pro- ve anti-apoptotik genler olan *TNFRSF1B*, *CD27* ve *BCL2A1*'in ekspresyonunda artış gözlenirken kaspaz inhibitörü *XIAP*'nin ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (Lucendo-Villarin ve ark., 2020). 100 μ M konsantrasyonlarda BPA'ya maruz bırakılan fare hepatosit (parankimal olmayan) hücrelerinde *BCL-2* mRNA'nın ekspresyonundahafif bir düşüş gözlenmiştir (Asahi ve ark., 2010). Tez çalışmasında, 48 saatlik 0,1,1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda BPA, BPF ve BPS'ye maruz bırakılan PC-3 ve PNT1A hücrelerinde kaspaz inhibitörü *XIAP*'nin ve apoptoz regülatörü bir gen olan *BCL-2*'nin, proapoptotik genler *AIF* ve *BAX*'in mRNA ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. PC-3 hücrelerinde kontrole kıyasla, *BAX* geni mRNA ekspresyonunda, anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. *AIF* geni mRNA ekspresyonunda, BPF 0,1 μ M ve BPS'nin tüm konsantrasyonlarında güçlü anlamlı artış gözlenmiştir. *XIAP* geni mRNA ekspresyonunda üç maddenin tüm konsantrasyonlarında (BPA 0,1 ve 1 μ M hariç) güçlü anlamlı artış gözlenmiştir. *BCL-2* geni mRNA ekspresyonunda ise üç maddenin tüm konsantrasyonlarında önemli derecede anlamlı azalmalar gözlenmiştir. PNT1A hücrelerinde ise, kontrole kıyasla, *BAX* geni mRNA ekspresyonunda, üç maddenin tüm konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. *AIF* geni mRNA ekspresyonunda BPA 1 μ M ve BPS'nin tüm konsantrasyonlarında anlamlı artış gözlenmiştir. *XIAP* geni mRNA ekspresyonunda BPA'nın tüm konsantrasyonlarında, BPF 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda ve BPS 10 μ M konsantrasyonlarda anlamlı azalma gözlenmiştir. *BCL-2* geni mRNA ekspresyonunda ise BPF 0,1 μ M ve BPF 0,1 ve 10 μ M konsantrasyonlarında anlamlı azalma gözlenmiştir. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre kaspaz inhibitörü olan *XIAP* geni, mRNA ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla PC-3 hücrelerinde artış gösterirken, tersine PNT1A hücrelerinde azalma göstermiştir. Proapoptotik bir gen olan *BAX*'in mRNA ekspresyon seviyeleri kontrole kıyasla PC-3 hücrelerinde azalma gösterirken, tersine PNT1A hücrelerinde artış göstermiştir. Apoptoz regülatörü bir gen olan *BCL-2*'nin mRNA ekspresyon seviyeleri kontrole kıyasla PC-3 hücrelerinde artış gösterirken, tersine PNT1A hücrelerinde azalma göstermiştir. Yine proapoptotik bir gen olan *AIF*'nin mRNA ekspresyon

seviyeleri PC-3 hücrelerinde azalma gösterirken, PNT1A hücrelerinde ise artış göstermiştir. CHOP, apoptoza dahil olan hedef genlerin promotörlerine bağlanan ve stresli ER'den gelen sinyaller tarafından indüklenen bir aşağı akış transkripsiyon faktörüdür (Ron ve Habener, 1992). Prostat kanserinde, BCL-2 ile ilişkili atanojen 5'in (*Bag5*) aşırı eksprese edildiği ve ER stresinin neden olduğu apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. *Bag5*'in aşırı ekspresyonu, yalnızca CHOP'un azalmasına değil, aynı zamanda *BAX*'ın azalmasına ve *BCL-2* gen ekspresyonunun artmasına neden olmuştur (Li ve ark., 2014). Benzer şekilde tez çalışmasında PC-3 hücrelerinde *CHOP* ve *BAX* genlerinin ekspresyonlarında azalmalar gözlenirken, *BCL-2* gen ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Kaspazlar apoptozun kritik enzimleridir (Mokra ve ark., 2015). Tez çalışmasında PC-3 hücrelerinde *KASPAZ-9* geninin mRNA ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla 1 μ M konsantrasyonda BPA; 10 μ M konsantrasyonlarda BPF ve 0,1 ve 10 μ M konsantrasyonda BPS maruziyeti sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. İnsan eritrositlerinin, 1-250 μ g/mL arasında değişen konsantrasyonlarda 24 saatlik BPA, BPF ve BPS'ye maruz bırakıldığı bir çalışmada, maruziyet sonrası kaspaz-3'ün aktive olarak apoptozu indüklediği florimetrik olarak ölçülmüş ve üç maddenin de 5 μ g/mL ve 50 μ g/mL konsantrasyonlarda maruziyeti sonrası, kaspaz-3 aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür (Maćczak ve ark., 2016).

CHOP, ER stresinin moleküler bir belirtecidir ve stresli olmayan hücrelerde protein ekspresyon seviyeleri çok düşüktür. ER stresinde, CHOP ekspresyonu, IRE1 ve PERK aracılı sinyalleşme ve ATF4 ve ATF6 transkripsiyon faktörlerinin aktiviteleri yoluyla güçlü bir şekilde uyarılmaktadır (Chen ve Brandizzi, 2013). Yetişkin 8 haftalık erkek Sprague Dawley sıçanları 8 hafta boyunca gavaj yoluyla BPA (0,5 veya 5 mg/kg/gün), DES (0,05 veya 0,5 μ g/kg/gün) ve ikisinin karışımı (0,5 mg/kg/gün BPA + 0,05 μ g/kg/gün DES) ve (5 mg/kg/d BPA + 0,5 μ g/kg/d DES) maddelerine maruz bırakılmıştır. BPA/DES'in etki mekanizmaları ve Sertoli ve Leydig hücrelerinde ER üzerindeki kombine maruziyeti hakkında bilgi edinmek için Western blot analizi ile ER stresi ile ilgili protein seviyeleri incelenmiştir. Sonuç olarak, BPA, DES ve bunların kombine maruziyetinin, ER stresinin moleküler belirteçlerinden biri olan CHOP proteininin ekspresyonunda önemli bir artışa yol açtığını bulunmuştur. Ayrıca, BPA ve DES'in kombine maruziyeti, ER stresinin birincil moleküler sensörü olan IRE1'in fosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açmıştır (Jiang ve ark., 2016). ROS üretiminin

inhibe olması, BPA maruziyeti sonucu artan GRP78, p-PERK, p-EIF2 α , CHOP ve ATF6'nın ekspresyonlarını aşağı regüle etmektedir (Yin ve ark., 2017). Tez çalışmasında, 48 saat 0-10 μ M konsantrasyonlarda BPS, BPF ve BPS uygulanan PNT1A hücrelerinde CHOP proteini ekspresyonu kontrole kıyasla tüm maruziyet gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artışa yol açmıştır. PC-3 hücrelerinde ise yalnızca 10 μ M BPA maruziyeti sonucu CHOP protein ekspresyonunda anlamlı azalma gözlenmiştir.

Sonuç olarak, tez çalışmasından elde edilen veriler de göz önüne alındığında BPA, BPF ve BPS'nin PC-3 ve PNT1A hücrelerindeki sitotoksik etki potansiyeleri kıyaslandığında, hem PC-3 hem de PNT1A hücrelerinde sitotoksik etki potansiyeli en yüksek olan kimyasalın BPA olduğu gözlenmiştir. BPA, BPF ve BPS'nin PC-3 hücrelerinde hücre proliferasyonunu tetiklerken, PNT1A hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. PNT1A ve PC-3 hücrelerinde ROS üretiminde anlamlı olmayan değişikliklere yol açmıştır. Hem PC-3 hem de PNT1A hücrelerinde, apoptoz oluşumunda rol oynayan genlerin (*BAX*, *BCL-2*, *KASPAZ-9*, *AIF*, *XIAP*) ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca, PC-3 ve PNT1A hücrelerinde gözlenen apoptoz oluşumunun PNT1A hücrelerinde tüm maruziyet gruplarında, ER stresinde rol oynayan genlerde *GRP78*, *IRE1 α* , *PERK*, *ATF4*, *ATF6*, *CHOP*, *eIF2 α* mRNA ekspresyonlarında gözlenen artışların BPA, BPF ve BPS'nin oluşturabileceği hücrel ER stresinin oluşumuyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasında, PC-3 hücrelerinde, ER stresinde rol oynayan genlerde *GRP78*, *IRE1 α* , *PERK*, *ATF4*, *ATF6*, *CHOP*, *eIF2 α* mRNA ekspresyonlarında gözlenen değişikliklerin, kanser hücrelerinde kimyasalların indüklediği hücrel ER stresi mekanizmalarının aydınlatılmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ek olarak, PNT1A hücrelerinde kimyasal maruziyet sonucu indüklenen apoptoz oluşumunun, UPR oluşumuna aracılık eden birçok mekanizmanın, ER stresini azaltmadığı ve böylelikle, apoptotik yolların aktif hale geçtiği sonucuna varılabileceği düşünülmektedir. PNT1A hücrelerinde, ER stresinin indüklediği apoptozun oluşumunda önemli role sahip olan CHOP proteininin yüksek oranda ekspresyonu, bu hücrelerde ER stresi varlığından söz edilebileceğini düşündürmektedir. UPR'nin hücre kaderini düzenleme yeteneği, araştırma odağı olarak vurgulanırken, bununla birlikte, hücrelerin hayatta kalması ve çoğalması üzerindeki paradoksal etkileri, UPR ile diğer yollar arasındaki etkileşimden,

ER stresinin standart bir tanımı olmamasından ve kanserdeki UPR dinamiklerinin değişiklik göstermesinden kaynaklanmaktadır. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, BPA ve analoglarının hücrel stres ve apoptotik mekanizmalar üzerinden toksik etki gösterebileceği ve BPA'nın BPF ve BPS'ye göre daha etkili olabileceği öne sürölmekte olup; bu çalışmanın EDC'lerin ER stress mekanizmaları üzerine etkileri konusunda literatüre katkı sağlaması beklenmektedir.



KAYNAKLAR

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, **37**(2), 163–176.

Akhbarizadeh, R., Moore, F., Monteiro, C., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2020). Occurrence, trophic transfer, and health risk assessment of bisphenol analogues in seafood from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, **154**, 111036.

Ali, A. G., Mohamed, M. F., Abdelhamid, A. O., & Mohamed, M. S. (2017). A novel adamantane thiadiazole derivative induces mitochondria-mediated apoptosis in lung carcinoma cell line. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **25**(1), 241–253.

Almeida, S., Raposo, A., Almeida-González, M., & Carrascosa, C. (2018). Bisphenol A: Food Exposure and Impact on Human Health. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **17**(6), 1503–1517.

Amm, I., Sommer, T., & Wolf, D. H. (2014). Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin–proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1843**(1), 182–196.

Arap, M. A., Lahdenranta, J., Mintz, P. J., Hajitou, A., Sarkis, A. S., Arap, W., & Pasqualini, R. (2004). Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer cell*, **6**(3), 275–284.

Asahi, J., Kamo, H., Baba, R., Doi, Y., Yamashita, A., Murakami, D., Hanada, A., & Hirano, T. (2010). Bisphenol A induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in mouse non-parenchymal hepatocytes. *Life sciences*, **87**(13–14), 431–438.

Asimakopoulou, A. G., Xue, J., De Carvalho, B. P., Iyer, A., Abualnaja, K. O., Yaghmoor, S. S., Kumosani, T. A., & Kannan, K. (2016). Urinary biomarkers of exposure to 57 xenobiotics and its association with oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia. *Environmental research*, **150**, 573–581.

Audebert, M., Dolo, L., Perdu, E., Cravedi, J. P., & Zalko, D. (2011). Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Archives of toxicology*, **85**(11), 1463–1473.

Avancès, C., Georget, V., Térouanne, B., Orio, F., Cussenot, O., Mottet, N., Costa, P., & Sultan, C. (2001). Human prostatic cell line PNT1A, a useful tool for studying androgen receptor transcriptional activity and its differential subnuclear localization in the presence of androgens and antiandrogens. *Molecular and cellular endocrinology*, **184**(1-2), 13–24.

Avrupa Birliği Komisyonu (2011). Commission Directive 2011/8/EU of 28 January 2011 amending Directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of Bisphenol A in plastic infant feeding bottles Text with EEA relevance.

Avrupa Birliği Komisyonu (2016). Regulation (EU) 2016/2235 to add Bisphenol A (BPA) to REACH Annex XVII restricted substances list. Erişim 10.10.2021, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R2235&rid=1>

Azad, A. A., Zoubeidi, A., Gleave, M. E., & Chi, K. N. (2015). Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nature reviews. Urology*, **12**(1), 26–36.

Baliga, B., & Kumar, S. (2003). Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow?. *Cell death and differentiation*, **10**(1), 16–18.

Becker, K., Göen, T., Seiwert, M., Conrad, A., Pick-Fuss, H., Müller, J., Wittassek, M., Schulz, C., & Kolossa-Gehring, M. (2009). GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *International journal of hygiene and environmental health*, **212**(6), 685–692.

Borgert, C.J., LaKind, J.S., Witorsch, R.J. (2003). A critical review of methods for comparing estrogenic activity of endogenous and exogenous chemicals in human milk and infant formula. *Environmental Health Perspectives*, **111**(8), 1020-1036.

Bousoumah, R., Leso, V., Iavicoli, I., Huuskonen, P., Viegas, S., Porras, S. P., Santonen, T., Frery, N., Robert, A., & Ndaw, S. (2021). Biomonitoring of occupational

exposure to bisphenol A, bisphenol S and bisphenol F: A systematic review. *The Science of the total environment*, **783**, 146905.

Brotons, J. A., Olea-Serrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V., & Olea, N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environmental health perspectives*, **103**(6), 608–612.

Cabaton, N., Chagnon, M. C., Lhuguenot, J. C., Cravedi, J. P., & Zalko, D. (2006). Disposition and metabolic profiling of bisphenol F in pregnant and nonpregnant rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, **54**(26), 10307–10314.

Cabaton, N., Dumont, C., Severin, I., Perdu, E., Zalko, D., Cherkaoui-Malki, M., & Chagnon, M. C. (2009). Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology*, **255**(1-2), 15–24.

Cabaton, N., Zalko, D., Rathahao, E., Canlet, C., Delous, G., Chagnon, M. C., Cravedi, J. P., & Perdu, E. (2008). Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **22**(7), 1697–1704.

Cain, K., Bratton, S. B., & Cohen, G. M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, **84**(2-3), 203–214.

Callis, J. (2014). The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, **12**.

Castellini, C., Di Giammarco, N., D'Andrea, S., Parisi, A., Totaro, M., Francavilla, S., Francavilla, F., & Barbonetti, A. (2021). Effects of bisphenol S and bisphenol F on human spermatozoa: An in vitro study. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, **103**, 58–63.

Castro, B., Sánchez, P., Torres, J. M., & Ortega, E. (2015). Bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S affect differently 5 α -reductase expression and dopamine-serotonin systems in the prefrontal cortex of juvenile female rats. *Environmental research*, **142**, 281–287.

Catenza, C. J., Farooq, A., Shubear, N. S., & Donkor, K. K. (2021). A targeted review on fate, occurrence, risk and health implications of bisphenol analogues. *Chemosphere*, **268**, 129273.

Changkhamchom, S., & Sirivat, A. (2010). Synthesis and properties of sulfonated poly (ether ketone ether sulfone)(S-PEKES) via bisphenol S: effect of sulfonation. *Polymer bulletin*, **65**(3), 265-281.

Chapin, R. E., Adams, J., Boekelheide, K., Gray, L. E., Jr, Hayward, S. W., Lees, P. S., McIntyre, B. S., Portier, K. M., Schnorr, T. M., Selevan, S. G., Vandenberg, J. G., & Woskie, S. R. (2008). NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. Birth defects research. Part B, *Developmental and reproductive toxicology*, **83**(3), 157–395.

Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y., & Widelka, M. (2016). Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review. *Environmental science & technology*, **50**(11), 5438–5453.

Chen, M. Y., Ike, M., & Fujita, M. (2002). Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol A and other bisphenols. *Environmental Toxicology*, **17**(1), 80-86.

Chen, Y., & Brandizzi, F. (2013). IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends in cell biology*, **23**(11), 547–555.

Choi, K.C., Jeung, E.B. (2003). The biomarker and endocrine disruptors in mammals. *Journal of Reproduction and Development*, **49**(5), 337-345.

Choi, S. I., Lee, J. S., Lee, S., Sim, W. S., Kim, Y. C., & Lee, O. H. (2020). Potentilla rugulosa Nakai Extract Attenuates Bisphenol A-, S- and F-Induced ROS Production and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes in the Absence of Dexamethasone. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, **9**(2), 113.

Cobellis, L., Colacurci, N., Trabucco, E., Carpentiero, C., & Grumetto, L. (2009). Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women. *Biomedical chromatography : BMC*, **23**(11), 1186–1190.

Corrales, J., Kristofco, L. A., Steele, W. B., Yates, B. S., Breed, C. S., Williams, E. S., & Brooks, B. W. (2015). Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, **13**(3), 1559325815598308.

Danzl, E., Sei, K., Soda, S., Ike, M., & Fujita, M. (2009). Biodegradation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in seawater. *International journal of environmental research and public health*, **6**(4), 1472–1484.

Daston, G.P., Cook, J.C., Kavlock, R.J. (2003). Uncertainties for endocrine disrupters: our view on progress. *Toxicological Sciences*, **74**(2), 245-252.

De Coster, S., & Van Larebeke, N. (2012). Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *Journal of environmental and public health*, **2012**, 713696.

De Souza Prestes, A., Dos Santos, M. M., Ecker, A., de Macedo, G. T., Fachinetto, R., Bressan, G. N., da Rocha, J., & Barbosa, N. V. (2019). Methylglyoxal disturbs the expression of antioxidant, apoptotic and glycation responsive genes and triggers programmed cell death in human leukocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **55**, 33–42.

Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, **22**(53), 8543–8567.

Dumont, C., Perdu, E., de Sousa, G., Debrauwer, L., Rahmani, R., Cravedi, J. P., & Chagnon, M. C. (2011). Bis(hydroxyphenyl)methane-bisphenol F-metabolism by the HepG2 human hepatoma cell line and cryopreserved human hepatocytes. *Drug and chemical toxicology*, **34**(4), 445–453.

ECHA (European Chemicals Agency) (2020). The use of bisphenol A and its alternatives in thermal paper in the EU during 2014-2022. Erişim 10.10.2021, https://echa.europa.eu/documents/10162/2564887/bpa_thermal_paper_report_2020_en.pdf/59eca269-c788-7942-5c17-3bd822d9cba0.

EFSA (European Food Safety Authority) (2006). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on

a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A). *The EFSA Journal*, **428**, 1-75.

EFSA(European Food Safety Authority)(2017). Testing the study appraisal methodology from the 2017 Bisphenol A (BPA) hazard assessment protocol. Erişim 10.10.2021, <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1732>.

EFSA (European Food Safety Authority). (2008). Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission on the toxicokinetics of Bisphenol A. *The EFSA Journal*, **759**, 1-10 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). (2012). EFSA advises on safety of bisphenol A and confirms review of opinion in 2012. Erişim 10.10.2021, <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/111201>.

EFSA Panel on Food Contact Materials Enzymes Flavourings and Processing Aids (CEF). (2010). Scientific Opinion on bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of bisphenol A. *EFSA Journal*, **8**(9):1829, 110 pp.

EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). (2015). Bisphenol A (BPA) in foodstuffs: PART II - Toxicological assessment and risk characterisation. *EFSA Journal*, **13**(1):3978.

Ehrlich, S., Williams, P. L., Missmer, S. A., Flaws, J. A., Ye, X., Calafat, A. M., & Hauser, R. (2012). Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Human Reproduction*, **27**(12), 3583–3592.

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., & Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and sterility*, **103**(1), 11–21.

Engin, F. (2016). ER stress and development of type 1 diabetes. *Journal of Investigative Medicine*, **64**(1), 2-6.

Fic, A., MLakar, S. J., Juvan, P., MLakar, V., Marc, J., Dolenc, M. S., Broberg, K., & Mašič, L. P. (2015). Genome-wide gene expression profiling of low-dose, long-term exposure of human osteosarcoma cells to bisphenol A and its analogs bisphenols AF and S. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **29**(5), 1060–1069.

Fic, A., Žegura, B., Sollner Dolenc, M., Filipič, M., & Peterlin Mašič, L. (2013). Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **64**(2), 189–200.

Figueiredo, L. S., Oliveira, K. M., Freitas, I. N., Silva, J. A., Jr, Silva, J. N., Favero-Santos, B. C., Bonfleur, M. L., Carneiro, E. M., & Ribeiro, R. A. (2020). Bisphenol-A exposure worsens hepatic steatosis in ovariectomized mice fed on a high-fat diet: Role of endoplasmic reticulum stress and fibrogenic pathways. *Life sciences*, **256**, 118012.

Fontana, F., Moretti, R. M., Raimondi, M., Marzagalli, M., Beretta, G., Procacci, P., Sartori, P., Montagnani Marelli, M., & Limonta, P. (2019). δ -Tocotrienol induces apoptosis, involving endoplasmic reticulum stress and autophagy, and paraptosis in prostate cancer cells. *Cell proliferation*, **52**(3), e12576.

Fu, J., Zhao, L., Wang, L., & Zhu, X. (2015). Expression of markers of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placenta of women with early and late onset severe pre-eclampsia. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, **54**(1), 19–23.

Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J. P., Goeyens, L., Lecomte, P., Maghuin-Rogister, G., Pironnet, A. M., Pussemier, L., Scippo, M. L., Van Loco, J., & Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, **50**(10), 3725–3740.

Germain, M., Mathai, J. P., McBride, H. M., & Shore, G. C. (2005). Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *The EMBO journal*, **24**(8), 1546–1556.

Goldinger, D. M., Demierre, A. L., Zoller, O., Rupp, H., Reinhard, H., Magnin, R., Becker, T. W., & Bourqui-Pittet, M. (2015). Endocrine activity of alternatives to BPA found in thermal paper in Switzerland. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, **71**(3), 453–462.

Goodman, J. E., Witorsch, R. J., McConnell, E. E., Sipes, I. G., Slayton, T. M., Yu, C. J., Franz, A. M., & Rhomberg, L. R. (2009). Weight-of-evidence evaluation of reproductive and developmental effects of low doses of bisphenol A. *Critical reviews in toxicology*, **39**(1), 1–75.

Gramec Skledar, D., & Peterlin Mašič, L. (2016). Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity?. *Environmental toxicology and pharmacology*, **47**, 182–199.

Gramec Skledar, D., Troberg, J., Lavdas, J., Peterlin Mašič, L., & Finel, M. (2015). Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, **45**(6), 511–519.

Grignard, E., Lapenna, S., & Bremer, S. (2012). Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **26**(5), 727–731.

Güleş, Ö., & Ülker, E. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **19**(2), 73-78.

Guzel, E., Arlier, S., Guzeloglu-Kayisli, O., Tabak, M. S., Ekiz, T., Semerci, N., & Kayisli, U. A. (2017). Endoplasmic reticulum stress and homeostasis in reproductive physiology and pathology. *International journal of molecular sciences*, **18**(4), 792.

Güzel, K., Nazıroğlu, M., & Ceyhan, D. (2020). Bisphenol A-Induced Cell Proliferation and Mitochondrial Oxidative Stress Are Diminished via Modulation of TRPV1 Channel in Estrogen Positive Breast Cancer Cell by Selenium Treatment. *Biological trace element research*, **198**(1), 118–13

Héliès-Toussaint, C., Peyre, L., Costanzo, C., Chagnon, M. C., & Rahmani, R. (2014). Is bisphenol S a safe substitute for bisphenol A in terms of metabolic function? An in vitro study. *Toxicology and applied pharmacology*, **280**(2), 224–235.

Hengstler, J. G., Foth, H., Gebel, T., Kramer, P. J., Lilienblum, W., Schweinfurth, H., Völkel, W., Wollin, K. M., & Gundert-Remy, U. (2011). Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A. *Critical reviews in toxicology*, **41**(4), 263–291.

Hercog, K., Maisanaba, S., Filipič, M., Sollner-Dolenc, M., Kač, L., & Žegura, B. (2019). Genotoxic activity of bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF and their mixtures in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *The Science of the total environment*, **687**, 267–276.

Ho, S.M., Tang, W.Y., de Frausto, J.B., & Prins, G.S. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research*, **66**(11), 5624-5632.

Hoekstra, E. J., & Simoneau, C. (2013). Release of bisphenol A from polycarbonate—a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, **53**(4), 386-402.

Hwang, J., & Qi, L. (2018). Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends in biochemical sciences*, **43**(8), 593–605.

Hwang, K.A., Park, S.H., Yi, B.R., & Choi, K.C. (2011). Gene alterations of ovarian cancer cells expressing estrogen receptors by estrogen and bisphenol a using microarray analysis. *Laboratory Animal Research*, **27**(2), 99-107.

Ijaz, S., Ullah, A., Shaheen, G., & Jahan, S. (2020). Exposure of BPA and its alternatives like BPB, BPF, and BPS impair subsequent reproductive potentials in adult female Sprague Dawley rats. *Toxicology mechanisms and methods*, **30**(1), 60–72.

Ike, M., Chen, M. Y., Danzl, E., Sei, K., & Fujita, M. (2006). Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, **53**(6), 153–159.

Iso, T., Futami, K., Iwamoto, T., & Furuichi, Y. (2007). Modulation of the expression of bloom helicase by estrogenic agents. *Biological & pharmaceutical bulletin*, **30**(2), 266–271.

Ji, K., Hong, S., Kho, Y., & Choi, K. (2013). Effects of bisphenol s exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental science & technology*, **47**(15), 8793–8800.

Jiang, X., Chen, H. Q., Cui, Z. H., Yin, L., Zhang, W. L., Liu, W. B., Han, F., Ao, L., Cao, J., & Liu, J. Y. (2016). Low-dose and combined effects of oral exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on the male reproductive system in adult Sprague-Dawley rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, **43**, 94–102.

Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental toxicology and pharmacology*, **40**(1), 241–258.

Kamrin M. A. (2004). Bisphenol A: a scientific evaluation. *MedGenMed : Medscape general medicine*, **6**(3), 7.

Kanev, M., & Muranlı, F. G. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **20**(1), 33-38.

Karaman, E. F., Caglayan, M., Sancar-Bas, S., Ozal-Coskun, C., Arda-Pirincci, P., & Ozden, S. (2019). Global and region-specific post-transcriptional and post-translational modifications of bisphenol A in human prostate cancer cells. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, **255**(Pt 2), 113318.

Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E., & Frennesson, C. I. (2010). What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochemical Journal*, **428**(2), 183-190.

Karrer, C., Roiss, T., von Goetz, N., Gramec Skledar, D., Peterlin Mašič, L., & Hungerbühler, K. (2018). Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of the Bisphenols BPA, BPS, BPF, and BPAF with New Experimental Metabolic Parameters: Comparing the Pharmacokinetic Behavior of BPA with Its Substitutes. *Environmental health perspectives*, **126**(7), 077002.

Kaufman R. J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & development*, **13**(10), 1211–1233.

Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T., & Tilson, H. A. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental health perspectives*, **104** Suppl 4(Suppl 4), 715–740.

Kim, J. Y., Choi, H. G., Lee, H. M., Lee, G. A., Hwang, K. A., & Choi, K. C. (2017). Effects of bisphenol compounds on the growth and epithelial mesenchymal transition of MCF-7 CV human breast cancer cells. *Journal of biomedical research*, **31**(4), 358–369.

Kinch, C. D., Ibahazehiebo, K., Jeong, J. H., Habibi, H. R., & Kurrasch, D. M. (2015). Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**(5), 1475–1480.

Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., & Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences*, **84**(2), 249–259.

Kose, O., Rachidi, W., Beal, D., Erkekoglu, P., Fayyad-Kazan, H., & Kocer Gumusel, B. (2020). The effects of different bisphenol derivatives on oxidative stress, DNA damage and DNA repair in RWPE-1 cells: A comparative study. *Journal of applied toxicology : JAT*, **40**(5), 643–654

Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Cabaton, N., Dolo, L., Grimaldi, M., Balaguer, P., Perdu, E., Debrauwer, L., Brion, F., & Zalko, D. (2015). Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-s in zebrafish and human in vitro models used for toxicity and estrogenicity screening. *Environmental science & technology*, **49**(6), 3860–3868.

Lee, S. H., Kang, S. M., Choi, M. H., Lee, J., Park, M. J., Kim, S. H., ... & Chung, B. C. (2014). Changes in steroid metabolism among girls with precocious puberty may not be associated with urinary levels of bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, **44**, 1–6.

Lee, S., Liao, C., Song, G. J., Ra, K., Kannan, K., & Moon, H. B. (2015). Emission of bisphenol analogues including bisphenol A and bisphenol F from wastewater treatment plants in Korea. *Chemosphere*, **119**, 1000-1006.

Lee, S., Liu, X., Takeda, S., & Choi, K. (2013). Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: a comparison study employing chicken DT40 cells. *Chemosphere*, **93**(2), 434-440.

Lee, S., Suk, K., Kim, I. K., Jang, I. S., Park, J. W., Johnson, V. J., Kwon, T. K., Choi, B. J., & Kim, S. H. (2008). Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor-kappaB. *Journal of neuroscience research*, **86**(13), 2932–2942.

Lee, Y. M., Seong, M. J., Lee, J. W., Lee, Y. K., Kim, T. M., Nam, S. Y., Kim, D. J., Yun, Y. W., Kim, T. S., Han, S. Y., & Hong, J. T. (2007). Estrogen receptor independent neurotoxic mechanism of bisphenol A, an environmental estrogen. *Journal of veterinary science*, **8**(1), 27–38.

Lei, B., Sun, S., Xu, J., Feng, C., Yu, Y., Xu, G., Wu, M., & Peng, W. (2018). Low-concentration BPAF- and BPF-induced cell biological effects are mediated by ROS in MCF-7 breast cancer cells. *Environmental science and pollution research international*, **25**(4), 3200–3208.

Lenie, S., Cortvrindt, R., Eichenlaub-Ritter, U., & Smitz, J. (2008). Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **651**(1), 71–81.

Li, Y. J., Song, T. B., Cai, Y. Y., Zhou, J. S., Song, X., Zhao, X., & Wu, X. L. (2009). Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and

caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **108**(2), 427–436.

Li, Y., Guo, Y., Tang, J., Jiang, J., & Chen, Z. (2014). New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, **46**(8), 629–640.

Liao, C., & Kannan, K. (2013). Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *Journal of agricultural and food chemistry*, **61**(19), 4655–4662.

Liao, C., Liu, F., & Kannan, K. (2012a). Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environmental science & technology*, **46**(12), 6515–6522.

Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V. D., Mohd, M. A., Moon, H. B., & Kannan, K. (2012b). Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environmental science & technology*, **46**(12), 6860–6866.

Lucendo-Villarin, B., Nell, P., Hellwig, B., Filis, P., Feuerborn, D., O'Shaughnessy, P. J., Godoy, P., Rahnenführer, J., Hengstler, J. G., Cherianidou, A., Sachinidis, A., Fowler, P. A., & Hay, D. C. (2020). Genome-wide expression changes induced by bisphenol A, F and S in human stem cell derived hepatocyte-like cells. *EXCLI journal*, **19**, 1459–1476.

Maćczak, A., Cyrkler, M., Bukowska, B., & Michałowicz, J. (2016). Eryptosis-inducing activity of bisphenol A and its analogs in human red blood cells (in vitro study). *Journal of hazardous materials*, **307**, 328–335.

Maćczak, A., Cyrkler, M., Bukowska, B., & Michałowicz, J. (2017). Bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce different oxidative stress and damage in human red blood cells (in vitro study). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **41**, 143–149.

Machtinger, R., Combelles, C. M., Missmer, S. A., Correia, K. F., Williams, P., Hauser, R., & Racowsky, C. (2013). Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. *Human Reproduction*, **28**(10), 2735–2745.

Mandon, E. C., Trueman, S. F., & Gilmore, R. (2013). Protein translocation across the rough endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **5**(2), a013342.

Martinou, J. C., & Youle, R. J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental cell*, **21**(1), 92–101.

Matsushima, A., Liu, X., Okada, H., Shimohigashi, M., & Shimohigashi, Y. (2010). Bisphenol AF is a full agonist for the estrogen receptor ERalpha but a highly specific antagonist for ERbeta. *Environmental health perspectives*, **118**(9), 1267–1272.

Michałowicz J. (2014). Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environmental toxicology and pharmacology*, **37**(2), 738–758.

Michałowicz, J., Mokra, K., & Bąk, A. (2015). Bisphenol A and its analogs induce morphological and biochemical alterations in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **29**(7), 1464–1472.

Mlynarcikova, A., Macho, L., & Fickova, M. (2013). Bisphenol A alone or in combination with estradiol modulates cell cycle- and apoptosis-related proteins and genes in MCF7 cells. *Endocrine regulations*, **47**(4), 189–199.

Mokra, K., Kocia, M., & Michałowicz, J. (2015). Bisphenol A and its analogs exhibit different apoptotic potential in peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, **84**, 79–88.

Molina-Molina, J. M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J. M., Real, M., Fernández, M. F., ... & Olea, N. (2013). In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicology and applied pharmacology*, **272**(1), 127-136

Morgan, J. J., & Crawford, L. J. (2021). The Ubiquitin Proteasome System in Genome Stability and Cancer. *Cancers*, **13**(9), 2235.

Mutlu, E., & Gültekin, M. (2016). Akım sitometride veri analizi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyet Dergisi*, **45**(4), 155-159.

Naderi, M., Wong, M. Y., & Gholami, F. (2014). Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, **148**, 195–203.

Nagesh, P., Hatami, E., Chowdhury, P., Kashyap, V. K., Khan, S., Hafeez, B. B., Chauhan, S. C., Jaggi, M., & Yallapu, M. M. (2018). Tannic Acid Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis in Prostate Cancer. *Cancers*, **10**(3), 68.

Nakamura, S., Tezuka, Y., Ushiyama, A., Kawashima, C., Kitagawara, Y., Takahashi, K., Ohta, S., & Mashino, T. (2011). Ipso substitution of bisphenol A catalyzed by microsomal cytochrome P450 and enhancement of estrogenic activity. *Toxicology letters*, **203**(1), 92–95.

Newbold, R. R., Jefferson, W. N., & Padilla-Banks, E. (2009). Prenatal exposure to bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environmental Health Perspectives*, **117**(6), 879.

Oh, J., Choi, J. W., Ahn, Y. A., & Kim, S. (2018). Pharmacokinetics of bisphenol S in humans after single oral administration. *Environment international*, **112**, 127–133.

Okuda, K., Fukuuchi, T., Takiguchi, M., & Yoshihara, S. (2011). Novel pathway of metabolic activation of bisphenol A-related compounds for estrogenic activity. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **39**(9), 1696–1703.

Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M., Sonnenschein, C. (1996). Estrogenicity of Resin-Based Composites and Sealants Used in Dentistry. *Environmental Health Perspectives*, **104**, 298-305

Osowski, C. M., & Urano, F. (2011). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods in enzymology*, **490**, 71.

Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., & Haanen, C. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, **3**(2), 115-121.

Ozcan, L., & Tabas, I. (2012). Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annual review of medicine*, **63**, 317–328.

Pootrakul, L., Datar, R. H., Shi, S. R., Cai, J., Hawes, D., Groshen, S. G., Lee, A. S., & Cote, R. J. (2006). Expression of stress response protein Grp78 is associated with the development of castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **12**(20 Pt 1), 5987–5993.

Porter, K. R., & Kallman, F. L. (1952). Significance of cell particulates as seen by electron microscopy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **54**(6), 882-891.

Porter, K. R., Claude, A., & Fullam, E. F. (1945). A study of tissue culture cells by electron microscopy: methods and preliminary observations. *Journal of Experimental Medicine*, **81**(3), 233-246.

Provencher, G., Bérubé, R., Dumas, P., Bienvenu, J. F., Gaudreau, E., Bélanger, P., & Ayotte, P. (2014). Determination of bisphenol A, triclosan and their metabolites in human urine using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, **1348**, 97–104.

Qi, S., Fu, W., Wang, C., Liu, C., Quan, C., Kourouma, A., Yan, M., Yu, T., Duan, P., & Yang, K. (2014). BPA-induced apoptosis of rat Sertoli cells through Fas/FasL and JNKs/p38 MAPK pathways. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, **50**, 108–116.

Qin, J., Ru, S., Wang, W., Hao, L., Ru, Y., Wang, J., & Zhang, X. (2020). Long-term bisphenol S exposure aggravates non-alcoholic fatty liver by regulating lipid metabolism and inducing endoplasmic reticulum stress response with activation of unfolded protein response in male zebrafish. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, **263**(Pt B), 114535.

Qiu, W., Shao, H., Lei, P., Zheng, C., Qiu, C., Yang, M., & Zheng, Y. (2018). Immunotoxicity of bisphenol S and F are similar to that of bisphenol A during zebrafish early development. *Chemosphere*, **194**, 1–8.

Rajkumar, A., Luu, T., Beal, M. A., Barton-Maclaren, T. S., Robaire, B., & Hales, B. F. (2021). Elucidation of the Effects of Bisphenol A and Structural Analogs on Germ and Steroidogenic Cells Using Single Cell High-Content Imaging. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **180**(2), 224–238.

Rezg, R., El-Fazaa, S., Gharbi, N., Mornagui, B. (2014). Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment International*, **64**, 83–90.

Rizzi, F., Naponelli, V., Silva, A., Modernelli, A., Ramazzina, I., Bonacini, M., Tardito, S., Gatti, R., Uggeri, J., & Bettuzzi, S. (2014). Polyphenon E(R), a standardized green tea extract, induces endoplasmic reticulum stress, leading to death of immortalized PNT1a cells by anoikis and tumorigenic PC3 by necroptosis. *Carcinogenesis*, **35**(4), 828–839.

Rochester, J. R., & Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environmental health perspectives*, **123**(7), 643–650.

Ron, D., & Habener, J. F. (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes & development*, **6**(3), 439–453.

Rosa, S. C., Gonçalves, J., Judas, F., Mobasheri, A., Lopes, C., & Mendes, A. F. (2009). Impaired glucose transporter-1 degradation and increased glucose transport and oxidative stress in response to high glucose in chondrocytes from osteoarthritic versus normal human cartilage. *Arthritis Research & Therapy*, **11**(3), R80.

Rosenmai, A. K., Dybdahl, M., Pedersen, M., Alice van Vugt-Lussenburg, B. M., Wedebye, E. B., Taxvig, C., & Vinggaard, A. M. (2014). Are structural analogues

to bisphenol a safe alternatives?. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **139**(1), 35–47.

Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J. A., & Majsterek, I. (2016). The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Current molecular medicine*, **16**(6), 533–544.

Russo, G., Capuozzo, A., Barbato, F., Irace, C., Santamaria, R., & Grumetto, L. (2018). Cytotoxicity of seven bisphenol analogues compared to bisphenol A and relationships with membrane affinity data. *Chemosphere*, **201**, 432–440.

Sano, R., & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*, **1833**(12), 3460–3470.

Sanvictores, T., & Davis, D. D. (2021). Histology, Rough Endoplasmic Reticulum. In StatPearls. StatPearls Publishing.

Schmidt, J., Kotnik, P., Trontelj, J., Knez, Ž., & Mašič, L. P. (2013). Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **27**(4), 1267–1276.

Segawa, T., Nau, M. E., Xu, L. L., Chilukuri, R. N., Makarem, M., Zhang, W., Petrovics, G., Sesterhenn, I. A., McLeod, D. G., Moul, J. W., Vahey, M., & Srivastava, S. (2002). Androgen-induced expression of endoplasmic reticulum (ER) stress response genes in prostate cancer cells. *Oncogene*, **21**(57), 8749–8758.

Senyildiz, M. (2016). Bisfenol A'nın Farklı Hücre Kültürlerinde DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonları Üzerine Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Shao, Y., Zhu, L., Chen, Z., Thalmann, B., Zhou, S., Hollert, H., & Seiler, T. B. (2021). Evidence of increased estrogenicity upon metabolism of Bisphenol F - Elucidation of the key metabolites. *The Science of the total environment*, **787**, 147669.

Sheng, X., Arnoldussen, Y. J., Storm, M., Tesikova, M., Nenseth, H. Z., Zhao, S., Fazli, L., Rennie, P., Risberg, B., Wæhre, H., Danielsen, H., Mills, I. G., Jin, Y., Hotamisligil, G., & Saatcioglu, F. (2015). Divergent androgen regulation of unfolded protein response pathways drives prostate cancer. *EMBO molecular medicine*, 7(6), 788–801.

Sicari, D., Delaunay-Moisan, A., Combettes, L., Chevet, E., & Igbaria, A. (2020). A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems. *The FEBS journal*, 287(1), 27–42.

Siracusa, J. S., Yin, L., Measel, E., Liang, S., & Yu, X. (2018). Effects of Bisphenol A and its Analogs on Reproductive Health: A Mini Review. *Reproductive Toxicology*, 79, 96-123.

Skledar, D. G., Schmidt, J., Fic, A., Klopčič, I., Trontelj, J., Dolenc, M. S., Finel, M., & Mašič, L. P. (2016). Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S. *Chemosphere*, 157, 152–159.

Smith, M., Love, D. C., Rochman, C. M., & Neff, R. A. (2018). Microplastics in seafood and the implications for human health. *Current environmental health reports*, 5(3), 375-386.

So, A. Y., de la Fuente, E., Walter, P., Shuman, M., & Bernales, S. (2009). The unfolded protein response during prostate cancer development. *Cancer metastasis reviews*, 28(1-2), 219–223.

Solomon, G.M., Schettler, T. (2000). Environment and health:6. Endocrine disruption and potential human health implications. *Canadian Medical Association or its Licensors*, 163(11), 1471-1476.

Song, S., Song, M., Zeng, L., Wang, T., Liu, R., Ruan, T., & Jiang, G. (2014). Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China. *Environmental pollution*, 186, 14-19.

Stahlhut, R. W., van Breemen, R. B., Gerona, R. R., Taylor, J. A., Welshons, W. V., & vom Saal, F. S. (2016). Comment on "Optimal Exposure Biomarkers for Nonpersistent Chemicals in Environmental Epidemiology". *Environmental health perspectives*, 124(4), A66.

Storm, M., Sheng, X., Arnoldussen, Y. J., & Saatcioglu, F. (2016). Prostate cancer and the unfolded protein response. *Oncotarget*, 7(33), 54051–54066.

Stossi, F., Bolt, M. J., Ashcroft, F. J., Lamerdin, J. E., Melnick, J. S., Powell, R. T., & Mancini, M. A. (2014). Defining estrogenic mechanisms of bisphenol A analogs through high throughput microscopy-based contextual assays. *Chemistry & biology*, 21(6), 743-753.

Stroheker, T., Chagnon, M. C., Pinnert, M. F., Berges, R., & Canivenc-Lavier, M. C. (2003). Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reproductive toxicology*, 17(4), 421-432.

Suiko, M., Sakakibara, Y., & Liu, M. C. (2000). Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases. *Biochemical and biophysical research communications*, 267(1), 80–84.

T.C. Resmi Gazete, 17 Temmuz 2013. Sayı:28710. Türk Gıda Kodeksi Gıda İle Temas Eden Plastik Madde Ve Malzemeler Tebliği.

T.C. Resmi Gazete, 25 Aralık 2019. Sayı:30989. Türk Gıda Kodeksi Gıda İle Temas Eden Plastik Madde Ve Malzemeler Tebliği.

T.C. Resmi Gazete, 31 Ekim 2013. Sayı: 28807. Emzik, Biberon, Biberon Başlığı, Ağız Barı, Ağız Barı Kapağı Ve Benzeri Ürünlerin Üretimi, İthalatı, Piyasa Gözetimi Ve Denetimi İle Bildirim Esaslarına Dair Tebliğ.

T.C. Resmi Gazete, 7 Şubat 2011. Sayı: 27839. Emzik, Biberon, Biberon Başlığı, Ağız Barı, Ağız Barı Kapağı ve Benzeri Ürünlerin Üretimi, İthalatı ve Bildirim Esaslarına Dair Tebliğ.

Tabuchi, Y., Takasaki, I., & Kondo, T. (2006). Identification of genetic networks involved in the cell injury accompanying endoplasmic reticulum stress induced by bisphenol A in testicular Sertoli cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 345(3), 1044–1050.

Taneli, F. (2007). Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 5(2), 75-82.

Tang, W. Y., Morey, L. M., Cheung, Y. Y., Birch, L., Prins, G. S., & Ho, S. M. (2012). Neonatal exposure to estradiol/bisphenol A alters promoter methylation and expression of *nsbp1* and *hpcal1* genes and transcriptional programs of *dnmt3a/b* and *mbd2/4* in the rat prostate gland throughout life. *Endocrinology*, **153**(1), 42–55.

Teeguarden, J. G., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., & Doerge, D. R. (2016). Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens I: Bisphenol A in pregnant women. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, **92**, 129–142.

Thayer, K. A., Doerge, D. R., Hunt, D., Schurman, S. H., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Garantziotis, S., Kissling, G. E., Easterling, M. R., Bucher, J. R., & Birnbaum, L. S. (2015). Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environment international*, **83**, 107–115.

Tiwari, D., Kamble, J., Chilgunde, S., Patil, P., Maru, G., Kawle, D., Bhartiya, U., Joseph, L., & Vanage, G. (2012). Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: an endocrine disruptor. *Mutation research*, **743**(1-2), 83–90.

Tsujimoto Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, **3**(11), 697–707.

Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Shaheen, G., Rehman, H., Siddiqui, M. F., & Butt, M. A. (2018). Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere*, **209**, 508–516.

Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, **24**(2), 139–177.

Vandewynckel, Y. P., Laukens, D., Geerts, A., Bogaerts, E., Paridaens, A., Verhelst, X., Janssens, S., Heindryckx, F., & Van Vlierberghe, H. (2013). The paradox of the unfolded protein response in cancer. *Anticancer research*, **33**(11), 4683–4694.

Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G. A., Filser, J. G., & Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chemical research in toxicology*, **15**(10), 1281–1287.

Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science (New York, N.Y.)*, **334**(6059), 1081–1086.

Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R., & Lee, A. S. (2009). Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxidants & redox signaling*, **11**(9), 2307–2316.

Wang, Q., Bailey, C. G., Ng, C., Tiffen, J., Thoeng, A., Minhas, V., Lehman, M. L., Hendy, S. C., Buchanan, G., Nelson, C. C., Rasko, J. E., & Holst, J. (2011). Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased amino acid transport during prostate cancer progression. *Cancer research*, **71**(24), 7525–7536.

Wang, W., Abualnaja, K. O., Asimakopoulos, A. G., Covaci, A., Gevao, B., Johnson-Restrepo, B., & Nakata, H. (2015). A comparative assessment of human exposure to tetrabromobisphenol A and eight bisphenols including bisphenol A via indoor dust ingestion in twelve countries. *Environment international*, **83**, 183–191.

Willhite, C. C., Ball, G. L., & McLellan, C. J. (2008). Derivation of a bisphenol A oral reference dose (RfD) and drinking-water equivalent concentration. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, **11**(2), 69–146.

Wolff, M. S., Teitelbaum, S. L., Pinney, S. M., Windham, G., Liao, L., Biro, F., & Calafat, A. M. (2010). Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. *Environmental Health Perspectives*, **118**(7), 1039.

Wolstenholme, J. T., Rissman, E. F., & Connelly, J. J. (2011). The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Hormones and behavior*, **59**(3), 296–305.

Wu, J. H., Jiang, X. R., Liu, G. M., Liu, X. Y., He, G. L., & Sun, Z. Y. (2011). Oral exposure to low-dose bisphenol A aggravates testosterone-induced benign hyperplasia prostate in rats. *Toxicology and Industrial Health*, **27**(9), 810–819.

Wu, L. H., Zhang, X. M., Wang, F., Gao, C. J., Chen, D., Palumbo, J. R., & Zeng, E. Y. (2018). Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. *Science of the Total Environment*, **615**, 87-98.

Xu, J., Osuga, Y., Yano, T., Morita, Y., Tang, X., Fujiwara, T., Takai, Y., Matsumi, H., Koga, K., Taketani, Y., & Tsutsumi, O. (2002). Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **292**(2), 456–462.

Xue, J., Wu, Q., Sakthivel, S., Pavithran, P. V., Vasukutty, J. R., & Kannan, K. (2015). Urinary levels of endocrine-disrupting chemicals, including bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers, benzophenones, parabens, and triclosan in obese and non-obese Indian children. *Environmental research*, **137**, 120–128.

Yadav, R. K., Chae, S. W., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2014). Endoplasmic reticulum stress and cancer. *Journal of cancer prevention*, **19**(2), 75.

Yamazaki, E., Yamashita, N., Taniyasu, S., Lam, J., Lam, P. K., Moon, H. B., Jeong, Y., Kannan, P., Achyuthan, H., Munuswamy, N., & Kannan, K. (2015). Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India. *Ecotoxicology and environmental safety*, **122**, 565–572.

Yang, Y., Guan, J., Yin, J., Shao, B., & Li, H. (2014). Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China. *Chemosphere*, **112**, 481-486.

Ye, X., Kuklenyik, Z., Needham, L. L., & Calafat, A. M. (2005). Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **383**(4), 638–644.

Ye, X., Zhou, X., Hennings, R., Kramer, J., & Calafat, A. M. (2013). Potential external contamination with bisphenol A and other ubiquitous organic environmental chemicals during biomonitoring analysis: an elusive laboratory challenge. *Environmental health perspectives*, **121**(3), 283–286.

Yin, D., Wang, N., Zhang, S. L., Jiang, Y., Lu, Y. M., Wei, H., Huo, N. C., Xiao, Q., & Ou, Y. L. (2015). Specific siRNA inhibits XIAP expression in human endometrial carcinoma cell apoptosis. *Cell biochemistry and biophysics*, **71**(1), 161–165.

Yin, L., Dai, Y., Cui, Z., Jiang, X., Liu, W., Han, F., Lin, A., Cao, J., & Liu, J. (2017). The regulation of cellular apoptosis by the ROS-triggered PERK/EIF2 α /chop pathway plays a vital role in bisphenol A-induced male reproductive toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, **314**, 98–108.

Yu, X., Xue, J., Yao, H., Wu, Q., Venkatesan, A. K., Halden, R. U., & Kannan, K. (2015). Occurrence and estrogenic potency of eight bisphenol analogs in sewage sludge from the US EPA targeted national sewage sludge survey. *Journal of hazardous materials*, **299**, 733–739.

Zang, Y. S., Zhong, Y. F., Fang, Z., Li, B., & An, J. (2012). MiR-155 inhibits the sensitivity of lung cancer cells to cisplatin via negative regulation of Apaf-1 expression. *Cancer gene therapy*, **19**(11), 773–778.

Zhang, Y. F., Ren, X. M., Li, Y. Y., Yao, X. F., Li, C. H., Qin, Z. F., & Guo, L. H. (2018). Bisphenol A alternatives bisphenol S and bisphenol F interfere with thyroid hormone signaling pathway in vitro and in vivo. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, **237**, 1072–1079.

Zhou, D. (2018). Ecotoxicity of bisphenol S to *Caenorhabditis elegans* by prolonged exposure in comparison with bisphenol A. *Environmental toxicology and chemistry*, **37**(10), 2560–2565.

Zhou, X. T., Pu, Z. J., Liu, L. X., Li, G. P., Feng, J. L., Zhu, H. C., & Wu, L. F. (2019). Inhibition of autophagy enhances adenosine-induced apoptosis in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Oncology reports*, **41**(2), 829–838.

Zhu, X., Wu, G., Xing, Y., Wang, C., Yuan, X., & Li, B. (2020). Evaluation of single and combined toxicity of bisphenol A and its analogues using a highly-sensitive micro-biosensor. *Journal of hazardous materials*, **381**, 120908.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

BİSFENOL A VE ANALOGLARININ ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% **8**

BİNERLİK ENDEKSİ

% **7**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **3**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

İLİNCİL KAYNAKLAR

1

www.mdpi.com

İnternet Kaynağı

% **1**

2

www.chemtrust.org

İnternet Kaynağı

% **1**

3

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

% **1**

4

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

% **1**

5

www.gecekitapligi.com

İnternet Kaynağı

<% **1**

6

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

<% **1**

7

cdn.istanbul.edu.tr

İnternet Kaynağı

<% **1**

8

acikerisim.akdeniz.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<% **1**

www.eatforhealth.gov.au

- Karaman, EF., **Caglayan, M.**, Sancar-Bas, S., Ozal-Coskun, C., Arda-Pirincci, P., & Ozden, S., Global and region-specific post-transcriptional and post-translational modifications of bisphenol A in human prostate cancer cells, *Environmental Pollution*, 2019, 0269-7491, 255.
- **Senyildiz, M.**, Kilinc, A., & Ozden, S. (2018). Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. *Toxicology and Industrial Health*, 34(6) 375–383.
- **Senyildiz M**, Karaman EF, Sancar Baş S, Arda Pirincci P, Ozden S. 2017. Effects of BPA on Global DNA Methylation and Global Histone 3 Lysine Modifications in SH-SY5Y Cells: An Epigenetic Mechanism Linking the Regulation of Chromatin Modifying Genes. *Toxicology in Vitro*, 44:313-321.
- **Senyildiz M**, Alpertunga B, Ozden S. 2017. DNA methylation analysis in rat kidney epithelial cells exposed to 3-MCPD and glycidol. *Drug Chem Toxicol*. 40(4):432-439.
- **Senyildiz M**, Karaman EC, Sancar-Bas S, Arda-Pirincci P, Ozden S. 2016. Alteration on global and gene-specific DNA Methylation and global Histone Modifications in HepG2 Cells in Response to BPA. *Journal of Faculty of Pharmacy, Istanbul University*. 46(2), 97-114.
- **Senyildiz M**, Ozden S. 2015. Alteration in Global DNA Methylation after Bisphenol A Exposure in MCF-7 Cells. *Journal of Faculty of Pharmacy, Istanbul University*. 45(2):153-164.

Kongre Sözlü/Poster Bildiri

Sözlü Bildiri

- **Senyildiz M**, Karaman EF, Sancar-Bas S, Arda-Pirincci P, Ozden S. Effects of BPA on Global DNA Methylation and Global Histone 3 Lysine Modifications in SH-SY5Y Cells: An Epigenetic Mechanism Linking the Regulation of Chromatin Modifying Genes. 10th Congress of Toxicology in Developing Countries. 18-21 Nisan 2018. Belgrad, Srbistan.

Poster

- Karaman EF, **Senyildiz M**, Zeybel M, Ozden S. Effects of Zearalenone on the Metabolic Pathways and its relation to the Epigenetic Mechanisms in HepG2 Cells. 53th Congress of the European Societies of Toxicology, 10-13 Eylül 2017, Bratislava, Slovakia.
- Omerustaoglu-Bayoglu S, Karaman EF, **Senyildiz M**, Ozden S. Effects of Fumonisin B1 on Global DNA Methylation in HK-2 Cells. 53th Congress of the European Societies of Toxicology, 10-13 Eylül 2017, Bratislava, Slovakia.
- Karaman EF, **Senyildiz M**, Ozden S. Effects of Zearalenone on Metabolism related Pathways and its Association with the Epigenetic Mechanisms in MCF-7 and MCF-10F Cells. 53th Congress of the European Societies of Toxicology, 10-13 Eylül 2017, Bratislava, Slovakia.
- Karaman EF, **Senyildiz M**, Sancar Bas S, Arda-Pirincci P, Ozden S. Alteration on DNA Methylation of *Rassf1*, *CyclinD2* and *p16* Genes and Global DNA Methylation and Histone Modifications in Human Hepatocarcinoma Cells in Response to BPA. 52th Congress of the European Societies of Toxicology, 4-7 Eylül 2016, Sevilla, İspanya.
- **Senyildiz M**, Kilinc A, Ozden S. Effects of Neonicotinoid Insecticides on Cytotoxicity and DNA Damage in HepG2 and SH-SY5Y Cells. 52th Congress of the European Societies of Toxicology, 4-7 Eylül 2016, Sevilla, İspanya. (İ.Ü. BAP, BEK-2016-22289 projesi desteği ile).
- **Senyildiz M**, Karaman EF, Sancar Bas S, Ozal C, Arda-Pirincci P, Ozden S. Global and Region-Specific Post-Transcriptional and Post-Translational Modifications of Bisphenol A in Human Prostate Cancer Cells. 52th Congress of the European Societies of Toxicology, 4-7 Eylül 2016, Sevilla, İspanya.
- **Senyildiz M**, Karaman EC, Ozden S. Global and gene-specific promoter DNA methylation profiles of bisphenol A in HepG2 cells. 9th Congress of the Turkish Society of Toxicology with the participation of the Hellenic Society of Toxicology, TurkHelTox (TurkHelttox). 21-24 Ekim 2015. İzmir-Türkiye (Poster 1. lik Ödülü).
- Ozhan G, **Senyildiz M**, Ozden S. DNA Methylation Profiles of Bisphenol A in Human Neuroblastoma Cells. 13th European ISSX Meeting. 22-25 Haziran 2015, Glasgow, İskoçya.
- **Senyildiz M**, Ozden S. Does DNA Methylation From Epigenetic Mechanisms Play A Role in Personalized Medicine? International Symposium on Advances in Predictive & Personalized Medicine (APPM2015). 2-3 Nisan 2015, İstanbul-Türkiye.
- **Senyildiz M**, Ozden S. Epigenetic mechanisms and endocrine disrupting chemicals. 4th International Meeting on Pharmacy & Pharmaceutical Sciences (IMPPS-4). 18-21 Eylül 2014, İstanbul, Türkiye.
- Alpertunga B, **Senyildiz M**, Ozden S. The role of DNA methylation alterations in 3-MCPD and Glycidol induced toxicity in rat kidney epithelial cells. 50th Congress of the European Societies of Toxicology, 7-10 Eylül 2014, Edinburg, İngiltere.
- **Senyildiz M**, Alpertunga B, Ozden S. Alteration in Global DNA Methylation after Bisphenol A Exposure in MCF-7 cells. 50th Congress of the European Societies of Toxicology, 7-10 Eylül 2014, Edinburg, İngiltere.

Ödüller

- Ozden S., **Senyildiz M.**, Karaman E. F. Global and gene-specific promoter DNA methylation profiles of bisphenol A in HepG2 cells. 9th Congress of the Turkish Society of Toxicology with the participation of the Hellenic Society of Toxicology, TurkHelTox (TurkHelttox). 21-24 Ekim 2015. İzmir-Türkiye. Poster 1. lik ödülü.

Burslar

- Bisfenol A ve Analoglarının Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Hücre Kültüründe İncelenmesi, TÜBİTAK Projesi, 2211-C, Doktora, Bursiyer, 2018-2021.
- Bisfenol A'nın Nöroblastoma ve Prostat Kanseri Hücrelerinde Gen-Spesifik DNA Metilasyonu Ve Histon Modifikasyonları Üzerine Etkisi, TÜBİTAK Projesi (1001), 115S357, Bursiyer, Mart 2016-Aralık 2017.
- Bisfenol A'nın Farklı Hücre Kültürlerinde DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonları Üzerine Etkilerinin Araştırılması, TÜBİTAK Projesi, 2210-C, Y. Lisans, Bursiyer, 2015-2016.

Araştırma Projeleri

- Bisfenol A ve Analoglarının Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Hücre Kültüründe İncelenmesi, BAP Doktora, 31614, Yürütücü, 2018-2021.
- Endokrin Sistem Üzerine Etkili Kimyasalların Toksisitelerinde Histon Modifikasyonlarının Rolü. İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği (NP-49518), Yardımcı Araştırmacı, Kasım 2014-Nisan 2016.
- Endokrin Bozucu Kimyasalların Toksisitelerinde Epigenetik Mekanizmaların Rolü, BAP Araştırma Projesi, Önap-37505, Araştırmacı, Ekim 2013-Kasım 2015.
- Bisfenol A'nın Nöroblastoma ve Prostat Kanseri Hücrelerinde Gen-Spesifik DNA Metilasyonu Ve Histon Modifikasyonları Üzerine Etkisi, TÜBİTAK Projesi (1001), 115S357, Bursiyer, Mart 2016-Aralık 2017.
- Bisfenol A'nın Farklı Hücre Kültürlerinde DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonları Üzerine Etkilerinin Araştırılması, BAP Y.Lisans, 49182, Yürütücü, 2014-2016.
- Bisfenol A maruziyetinin meme kanseri ve prostat kanseri hücrelerinde DNA metilasyonundaki değişiklikler üzerindeki rolü, BAP Diğer, 46016, Araştırmacı, 2015
- Effects of neonicotinoid insecticides on cytotoxicity and DNA damage in HepG2 and SHSY5Y cells, BAP Diğer, BEK-2016-22289, Araştırmacı, 2016.

Katıldığı Seminer ve Eğitimler

- Principles of Toxicology Kursu ,4 -8 Nisan 2016, Zagreb, Hırvatistan.
- İstinye Üniversitesi Moleküler Kanseri Zirvesi, 25 Mart 2017, İstinye Üniversitesi Topkapı Kampüsü.
- İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İntihal ve Yayın Etiği Çalıştayı, 12 Nisan 2017, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi.
- Abcam semineri. Introduction and optimization of ChIP, Optimization of ELISA. 14.05.2015, İstanbul Bilim Üniversitesi.
- xCELLigence Sistemleri Kullanıcı Toplantısı. 16.05.2016, Green Park Bostancı Hotel.
- Deneysel Tasarım ve Ön Biyoistatistik Sempozyumu. 'Experimental design and planning and biostatistics'. 29.09.2014-30.09.2014, İstanbul University.
- TÜBA Akademi. "Epigenetic Diet". 27.05.2015. İstanbul.
- TÜBA Akademi. "Kimyasal Kanserojenez ve Bazı Gıdaların Kanseri Önleyici Etki Mekanizmaları". 28.01.2015. İstanbul Teknik Üniversitesi, Maçka Kampüsü, İstanbul.
- Karaköy Otofaji Sempozyumu. 22.10.2014. İstanbul.
- Mini Sempozyum. Drug Induced Liver Injury: Genomic Approaches and Risk Assessment. 25.11.2015, İstanbul Üniversitesi.
- Yeni Nesil Psikoaktif Maddeler Sempozyumu, 26.11.2013, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Arthouse filmler, gastronomi, müzik, uzakdoğu kültürleri, arkeoloji, genel kültür yarışmaları, kaligrafi, resim yapmak.