



**BİSFENOL A'NIN NÖROTOKSİK ETKİLERİNE KARŞI
TİMOKİNONUN POTANSİYEL NÖROPROTEKTİF ETKİSİ**

Ezgi KARAASLAN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet GÜL**

Yüksek Lisans Tezi- 2025

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

**BİSFENOL A'NIN NÖROTOKSİK ETKİLERİNE KARŞI TİMOKİNONUN
POTANSİYEL NÖROPROTEKTİF ETKİSİ**

Ezgi KARAASLAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet GÜL**

**Tez Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Nigar VARDI
Prof. Dr. Mehmet GÜL
Dr. Öğr. Üyesi Emrah ZAYMAN**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL-2024-3724.Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2025**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. Mehmet GÜL” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Bisfenol A'nın Nörotoksik Etkilerine Karşı Timokinonun Potansiyel Nöroprotektif Etkisi” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

16 / 07 / 2025

Ezgi KARAASLAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Merkezi Sinir Sistemi	3
2.1.1. Beyin Anatomisi	3
2.1.2. Beyin Gelişimi	4
2.1.3. Sinir Sistemi Histolojisi	7
2.1.4. Beyin Histolojisi	9
2.2. Bisfenol A	13
2.2.1. Genel Özellikleri	13
2.2.2. BPA'nın Küresel Üretimi ve Kullanım Alanları	13
2.2.3. BPA Maruziyeti	14
2.2.4. BPA'nın Beyin Üzerine Etkisi	16
2.3. Timokinon	18
3. MATERYAL ve METOT	21
3.1. Deney Hayvanları	21
3.2. Deneysel Tasarım ve Kimyasalların Hazırlanışı	21
3.3. Deneyin Sonlandırılması ve Doku/Kan Örneklerinin Alınması	21
3.4. Histolojik Yöntemler	22
3.4.1. Doku Takibi ve Kesit Alma	22
3.4.2. Mayers'in Hematoksilen & Eozin Yöntemi	22
3.4.3. Cresyl Violet Yöntemi	23
3.4.4. Luxol Fast Blue Yöntemi	24
3.4.5. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	25
3.5. Histolojik Değerlendirmeler	26
3.5.1. Histopatolojik Değerlendirme	26
3.5.2. Cresyl Violet Değerlendirmesi	26
3.5.3. Luxol Fast Blue Değerlendirmesi	26

3.5.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	27
3.6. Biyokimyasal Analiz Yöntemleri ve Değerlendirilmeleri.....	27
3.6.1. MDA Tayini	27
3.6.2. Redükte GSH Tayini	28
3.6.3. TAS Tayini	28
3.6.4. TOS Tayini	28
3.7. İstatistiksel Yöntem	29
4. BULGULAR	30
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	30
4.1.1. K Grubu	30
4.1.2. TQ Grubu.....	38
4.1.3. BPA Grubu	45
4.1.4. BPA+TQ Grubu.....	53
4.2. Biyokimyasal Bulgular	62
5. TARTIŞMA.....	65
5. SONUÇ.....	77
KAYNAKLAR.....	79
EKLER	89
EK-1. Özgeçmiş	89
EK-2. Etik Kurul Kararı	90

TEŐEKKÖR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi birikimi, tecrübeleri ve yol göstericiliğiyle beni destekleyen; sadece akademik anlamda değil, araştırma motivasyonumu da artırarak bana ilham veren değerli danışmanım Prof. Dr. Mehmet GÖL'e,

Tez çalışmam boyunca görüş ve önerileriyle katkı sağlayan, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nigar VARDI 'ya ve Anabilim Dalı'mızın öğretim üyeleri Prof. Dr. Aslı TAŐLIDERE, Prof. Dr. Elif KARACA ve Doç. Dr. Azibe YILDIZ'a,

Biyokimyasal analizlerim sırasında çalışmama katkı sağlayan Prof. Dr. Mehmet Erman ERDEMLİ'ye ve istatistiksel analizini gerçekleştiren Prof. Dr. Harika Gözde GÖZÖKARA BAĞ'a,

Desteklerini gördüğüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli asistanlarına ve lisansüstü eğitim gören arkadaşlarıma, biyoloğumuz Leyla YURTSEVEN'e, tez çalışmamı birlikte yürüttüğüm arkadaşım Betöl LEVENT'e,

TYL-2024-3724 nolu projeme maddi katkılarından dolayı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Her zaman beni destekleyen ve yanımda olan başta canım annem olmak üzere aileme,

Ve son olarak her daim yanımda olan ve desteklerini benden esirgemeyen sevgili nişanlım Ali KURUÇAY'ya teőekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Bisfenol A'nın Nörotoksik Etkilerine Karşı Timokinonun Potansiyel Nöroprotektif Etkisi

Amaç: Bisfenol A'nın beyin dokusu üzerinde oluşan nörotoksik hasarlarına karşı timokinonun potansiyel koruyucu ve tedavi edici etkilerini histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirmek.

Materyal ve Metot: 32 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan K, TQ, BPA ve BPA+TQ olmak üzere 4 gruba ayrıldı. K grubu ad libitum beslendi, TQ grubu 50 mg/kg oral gavaj ile TQ, BPA grubuna 50 mg/kg oral gavaj ile BPA, BPA+TQ grubuna ise yarım saat aralıkla 50 mg/kg BPA ve 50 mg/kg TQ verildi. 30 günlük deney süresinin sonlanmasıyla sıçanlardan anestezi altında intravenöz kan ve beyin doku örnekleri alındı. Beyin dokuları, histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelendi.

Bulgular: Biyokimyasal sonuçlara göre BPA verilen grupta MDA seviyesinin arttığı, GSH seviyelerinin azaldığı izlendi. K ve TQ gruplarında benzer histolojik yapı gözlenirken, BPA grubunda heterokromatik-piknotik nükleuslu nöronlar, glial hücre infiltrasyonu, bazı nöronlarda kromatolizis ve karyolizis görünümü dikkat çekti. Perinöronal alanda ödem ve nöropil doku yoğunluğunda azalma izlendi. BPA+TQ grubunda iyileşmenin olduğu gözlemlendi. BPA grubunda BDNF, MBP ve NF immünreaktiviteleri en düşük, Cas-3 en yüksektir.

Sonuç: Beyin dokusunda BPA'nın nörotoksik etkilerine karşı timokinonun koruyucu ve tedavi edici etkisi bulgularımız ile kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Beyin, Bisfenol A, Nörotoksisite, Timokinon

ABSTRACT

Potential Neuroprotective Effect of Thymoquinone Against the Neurotoxic Effects of Bisphenol A

Aim: To evaluate the potential protective and therapeutic effects of thymoquinone against the neurotoxic damage caused by Bisphenol A on brain tissue using histochemical, immunohistochemical, and biochemical methods.

Materials and Methods: A total of 32 male Wistar albino rats were divided into four groups: Control (K), TQ, BPA, and BPA+TQ. The control group was fed ad libitum. The TQ group received 50 mg/kg thymoquinone via oral gavage. The BPA group was administered 50 mg/kg BPA orally, and the BPA+TQ group received 50 mg/kg BPA followed by 50 mg/kg TQ at a 30-minute interval. At the end of the 30-day experimental period, blood and brain tissue samples were collected from the rats under anesthesia. Brain tissues were examined using histochemical, immunohistochemical, and biochemical techniques.

Results: Biochemical analysis revealed increased MDA levels and decreased GSH levels in the BPA group. While the K and TQ groups exhibited similar histological structures, the BPA group showed neurons with heterochromatic-pyknotic nuclei, glial cell infiltration, chromatolysis and karyolysis in some neurons, perineuronal edema, and reduced neuropil density. Improvement was observed in the BPA+TQ group. Among all groups, the BPA group had the lowest BDNF, MBP, and NF immunoreactivities and the highest Cas-3 expression.

Conclusion: Our findings demonstrate that thymoquinone has protective and therapeutic effects against the neurotoxic impact of BPA on brain tissue.

Keywords: Brain, Bisphenol A, Neurotoxicity, Thymoquinone

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

BDNF	: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
BPA	: Bisfenol A
BPA+TQ	: Bisfenol A + Timokinon
CA	: Cornu Ammonis
Cas-3	: Caspase-3
CAT	: Katalaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
H-E	: Hematoksilen Eozin
K	: Kontrol
MDA	: Malondialdehit
MBP	: Miyelin Basic Protein
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NF	: Nörofilament
OSI	: Oksidatif Stres İndeksi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAS	: Total Antioksidan Kapasite
TCA	: Trikarboksilik asit
TOS	: Total Oksidan Kapasite
TQ	: Timokinon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1.1. Gelişimin 32. gününden sagittal kesit ile üç beyin vezikülünün gösterimi (6).	6
Şekil 1.2. Beyin korteksinin tabakaları. Luxol fast blue boyanması ile gösterimi.	11
Şekil 2.1. Fenol ve aseton tepkimesi sonucunda BPA oluşumu (19).	13
Şekil 2.2. Timokinonun potansiyel etkileri (58).	19
Şekil 4.1. K grubu genel histopatolojik değerlendirme.	30
Şekil 4.2. K grubu beyin korteksi nöronların histopatolojik değerlendirmesi.	31
Şekil 4.3. K grubu beyin korteksi nöronların histopatolojik değerlendirmesi.	32
Şekil 4.4. K grubu beyin hipokampüsün histopatolojik değerlendirmesi.	33
Şekil 4.5. K grubu beyin hipokampüsün cresyl violet ile değerlendirilmesi.	34
Şekil 4.6. K grubu beyin hipokampüsdeki nöronların cresyl violet ile değerlendirilmesi.	34
Şekil 4.7. K grubu LFB ile değerlendirilmesi.	35
Şekil 4.8. K grubu Cas-3 immünreaktivite ile değerlendirme.	36
Şekil 4.9. K grubu BDNF immünreaktivite ile değerlendirme.	36
Şekil 4.10. K grubu MBP immünreaktivite ile değerlendirme.	37
Şekil 4.11. K grubu NF immünreaktivite ile değerlendirme.	38
Şekil 4.12. TQ grubu histopatolojik değerlendirme.	38
Şekil 4.13. TQ grubu beyin korteksi histopatolojik değerlendirme.	39
Şekil 4.14. TQ grubu korteksinde nöronların histopatolojik değerlendirmesi.	39
Şekil 4.15. TQ grubu hipokampüs bölgesinde histopatolojik değerlendirme.	40
Şekil 4.16. TQ grubu hipokampüs bölgesinde cresyl violet ile değerlendirmesi.	41
Şekil 4.17. TQ grubu beyin korteksinde cresyl violet ile değerlendirme.	41
Şekil 4.18. TQ grubu luxol fast blue ile histopatolojik değerlendirme.	42
Şekil 4.19. TQ grubu Cas-3 immünreaktivite ile değerlendirme.	43
Şekil 4.20. TQ grubu BDNF immünreaktivite ile değerlendirme.	43
Şekil 4. 21. TQ grubu MBP immünreaktivite ile değerlendirme.	44
Şekil 4. 22. TQ grubu NF immünreaktivite ile değerlendirme.	45
Şekil 4.23. BPA grubu histopatolojik değerlendirme.	46
Şekil 4.24. BPA grubu beyin korteksi histopatolojik değerlendirme.	46
Şekil 4.25. BPA grubu beyin korteksi nöronların histopatolojik değerlendirme.	47

Şekil 4.26. BPA grubu hipokampus bölgesi histopatolojik değerlendirme.....	48
Şekil 4.27. BPA grubu hipokampus cresyl violet ile histopatolojik değerlendirme.....	48
Şekil 4.28. BPA grubu beyin korteksi cresyl violet ile histopatolojik değerlendirme. ..	49
Şekil 4.29. BPA grubu luxol fast blue ile histopatolojik değerlendirme.	50
Şekil 4.30. BPA grubu Cas-3 immünreaktivite ile değerlendirme.	50
Şekil 4.31. BPA grubu BDNF immünreaktivite ile değerlendirme.....	51
Şekil 4.32. BPA grubu MBP immünreaktivite ile değerlendirme.	52
Şekil 4. 33. BPA grubu NF immünreaktivite ile değerlendirme.	53
Şekil 4.34. BPA+TQ grubu histopatolojik değerlendirme.	54
Şekil 4.35. BPA+TQ grubu beyin korteksi histopatolojik değerlendirme.	54
Şekil 4.36. BPA+TQ grubu beyin korteksi nöronların histopatolojik değerlendirmesi. ..	55
Şekil 4.37. BPA+TQ grubu hipokampus bölgesi histopatolojik değerlendirme.	55
Şekil 4.38. BPA+TQ grubu hipokampus bölgesi Cresyl violet ile histopatolojik değerlendirme.....	56
Şekil 4. 39. BPA+TQ grubu beyin korteksi cresyl violet ile histopatolojik değerlendirme.....	57
Şekil 4.40. BPA+TQ grubu luxol fast blue ile histopatolojik değerlendirme.	58
Şekil 4.41. BPA+TQ grubu Cas-3 immünreaktivite değerlendirme.	59
Şekil 4.42. BPA+TQ grubu BDNF immünreaktivite değerlendirme.	59
Şekil 4.43. BPA+TQ grubu MBP immünreaktivite değerlendirme.	60
Şekil 4.44. BPA+TQ grubu NF immünreaktivite değerlendirme.....	61
Şekil 4.45. Biyokimyasal parametrelerin grafiği.....	64

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. Mayers'in Hematoksilen&Eozin Prosedürü	22
Tablo 3.2. Cresyl violet çözeltilerinin hazırlanması	23
Tablo 3.3. Cresyl violet boyama prosedürü	24
Tablo 3.4. Luxol fast blue çözeltilerinin hazırlanması.....	24
Tablo 3.5. Luxol fast blue boyama prosedürü.....	24
Tablo 3.6. İmmünohistokimya boyama prosedürü	25
Tablo 3.7. Antikorlar ve dilüsyon oranları.....	26
Tablo 4. 1. Histolojik hasar skoru	61
Tablo 4.2. Cresyl violet ve luxol fast blue histokimyasal boyanma skoru	61
Tablo 4.3. İmmünohistokimya Cas-3, BDNF, MBP, NF immünreaktivite H skorları ..	62
Tablo 4.4. Biyokimyasal parametreler	63

1. GİRİŞ

Bisfenol A (BPA), plastik ve epoksi reçine üretiminde yaygın olarak kullanılan endokrin bozucu fenolik kimyasaldır. BPA, gıdaların plastik ambalaj teması veya ısı işlemlere maruz kalması sonucu kolayca gıdaya geçebilir ve insan vücuduna gıda tüketimi veya temas yoluyla girerek dokularda birikebilir. BPA'nın endokrin sistem üzerindeki bozucu etkileri, uzun süredir bilinen bir durum olmakla birlikte, son yıllarda sinir sistemi üzerinde de önemli toksik etkileri olduğu bildirilmiştir. BPA'nın nörotoksik etkileri üzerine yapılan araştırmalar, bu kimyasalın özellikle oksidatif stres, inflamasyon, hücre hasarı ve ölümü ile nörodejeneratif süreçleri tetikleyerek merkezi sinir sistemi hücrelerinde ciddi hasarlara yol açabileceğini göstermektedir.

BPA'nın nörotoksik etkisi, büyük ölçüde hücre ve dokularda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak oksidatif stres yoluyla ortaya çıkar. Oksidatif stres, hücrelerin antioksidan savunma sistemlerini aşarak protein, lipid ve DNA gibi biyomoleküllerde hasara yol açar. BPA'ya maruz kalan nöronlarda, mitokondriyal işlev bozukluğu ve hücre membranında lipid peroksidasyonun arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, BPA'nın beyindeki nöroinflamatuvar yanıtları tetiklediği ve glial hücreler, özellikle mikroglialar ve astrositler aracılığıyla sinir dokusunda kronik inflamasyona neden olduğu bilinmektedir. Bu inflamatuvar süreçler, nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynayarak öğrenme, hafıza ve diğer bilişsel işlevlerde bozulmalara da yol açabilir. BPA, aynı zamanda dopamin ve glutamat gibi nörotransmitterlerin dengesini bozarak sinaptik iletimi olumsuz etkiler. Sonuç olarak, BPA maruziyetinin sinir sisteminde meydana getirdiği hücresel hasara bağlı olarak davranışsal değişiklikler, bilişsel bozukluklar ve nörodejeneratif süreçlerin ortaya çıkmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

Timokinon (TQ), *Nigella sativa* (çörek otu) bitkisinin ana biyolojik aktif bileşeni olup, antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik özellikleriyle bilinir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, TQ'nun oksidatif stresin ve inflamasyonun neden olduğu nörotoksositeye karşı koruyucu bir ajan olabileceğini göstermektedir. TQ'nun nöroprotektif etkileri, serbest radikalleri nötralize etme yeteneği ve antioksidan savunma sistemlerini aktive etme kapasitesi ile ilişkilendirilir. TQ, lipid peroksidasyonunu inhibe ederek hücre zarlarının oksidatif strese karşı korunmasını sağlar. Aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonların düzeltilmesi, kalsiyum

homeostazının düzenlenmesi ve apoptozu inhibe etme yoluyla sinir hücrelerinin yaşam süresini artırabilir.

Sonuç olarak, BPA'nın merkezi sinir sistemi üzerindeki nörotoksik etkileri ciddi bir sağlık sorunu teşkil etmekte olup, bu zararlı etkilerin önlenmesi için nöroprotektif ajanların araştırılması büyük önem taşımaktadır. TQ, antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri sayesinde BPA'nın neden olduğu nörotoksositeye karşı potansiyel bir koruyucu ajan olarak öne çıkmaktadır. Ancak, TQ'nun BPA'ya karşı koruyucu etkilerinin daha iyi anlaşılması için daha fazla *in vivo* ve *in vitro* çalışmaya ihtiyaç vardır. TQ'nun beyin hücrelerinde spesifik moleküler mekanizmalar üzerindeki etkilerinin ve uzun vadeli kullanım güvenliğinin araştırılması, bu bileşiğin gelecekte nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyelini ortaya koyabilir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Merkezi Sinir Sistemi

Merkezi sinir sistemi (MSS), insan ve diğer omurgalı canlıların sinir sisteminin ana bileşenlerinden biri olup beyin ile omurilikten oluşur. MSS organizmanın çevresine uygun tepki vermesini sağlamak için duyuşal bilgiler toplar, işler, kararlar alır ve uygun motor yanıtları oluşturur. MSS, vücudun birçok hayati fonksiyonunu düzenleyen, aynı zamanda bilinç, öğrenme, hafıza ve düşünce gibi yüksek bilişsel işlevlerin merkezidir (1).

Beyin, MSS'nin bir parçası olup kranium içinde yer alır ve bağ dokusundan oluşan üç katmanlı meninks adı verilen zarlarla çevrilidir. Bu zarlar, dıştan içe doğru dura mater, araknoid mater ve pia mater olarak sıralanır. Bu zarlar arasında bulunan beyin omurilik sıvısı (BOS) beyni travmalara karşı korur ve destek sağlar. Beynin dış yüzeyi girus ve sulkuslara sahip olduğu için kıvrımlı yapıdadır. Nöron gövdelerinden oluşan gri cevher, beynin dış kısmında yer alırken, miyelinli aksonlardan oluşan beyaz cevher ise iç kısımda bulunur. Glia hücreleri hem gri cevher hem de beyaz cevherde bulunur (2).

2.1.1. Beyin Anatomisi

Beyin (encephalon), kafatası kemikleri içinde yerleşmiş, vücuttaki en karmaşık ve en büyük anatomik yapılardan biri olup farklı loblara ayrılarak birçok kritik görevden sorumludur. Vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturan insan beyni, yeni doğanda yaklaşık 350 gram iken yetişkin bireylerde yaklaşık 1300-1500 gram arasında bir ağırlığa sahiptir (3). İnsan beyninin gelişimi, gebeliğin üçüncü haftasından itibaren başlayarak hızla devam eder ve doğumdan sonraki ilk 1.5 yıl içinde büyük oranda tamamlanır. Fetal hayatta ve prenatal dönemde beyin gelişim oranı en yüksek seviyededir (4).

Yapısal olarak, omurilikten başlayarak yukarı doğru sıralanan üç temel bölümden oluşur: rombensefalon (arka beyin), mezensefalon (orta beyin) ve prosensefalon (ön beyin). Gelişimin ilerleyen evrelerinde üç birincil kesecikten telensefalon, diensefalon, mezensefalon, metensefalon ve miyelensefalon olmak üzere beş ikincil beyin vezikülü oluşur. Gelişen bu veziküller yetişkin sinir sisteminde belirli bileşenleri oluşturacaktır (3).

Prosensefalon (Ön Beyin)

Prosensefalon, embriyolojik gelişim sırasında beynin en ön bölgesini oluşturan yapıdır. Merkezi sinir sisteminin en karmaşık bölümü olup, ileri düzey bilişsel ve duygusal işlevlerden sorumludur. Gelişim sürecinde iki ana bölüme ayrılır:

Telensefalon: Beynin en büyük bölümüdür ve iki hemisferden oluşur. Her bir beyin hemisferi, beyin korteksi milyarca nöron içeren gri maddeden, nöron uzantılarının bulunduğu beyaz cevherden ve beyaz cevher içine yerleşmiş bazal ganglionlardan oluşur. Beyin korteksi, bazal ganglionlar, hipokampus ve limbik sistem gibi üst düzey bilişsel işlevleri yöneten yapıları içerir.

Diensefalon: Talamus, hipotalamus, epitalamus ve subtalamus gibi duysal iletim, hormon kontrolü ve otonom sinir sistemi işlevlerinde kritik rol oynayan yapılardan oluşur. Ayrıca, nörohipofiz ve optik sinir de diensefalon kökenli olup farklılaşarak belirli işlevleri yerine getirir (3).

Mezensefalon (Orta Beyin)

Üç ana vezikülden ortada yerleşen mezensefalon, beynin en küçük parçası olup tektum ve tegmentum adı verilen bölümlerine farklılaşır. Duyusal-motor entegrasyonu, refleks kontrolü ve bilinç düzeyinin düzenlenmesi gibi kritik işlevlere sahip bir beyin bölgesidir. Üçüncü ve dördüncü ventrikülleri birbirine bağlayan aquaeductus cerebri mezensefalonun ortasından geçer. Mezensefalon pons ve bulbus ile birlikte beyin sapı olarak adlandırılır (2).

Rombensefalon (Arka Beyin)

Rombensefalon, embriyonik gelişim sürecinde beynin en arka kısmında yer alan ve omurilik ile bağlantılı olan bir bölgedir. Bu yapı, iki ana bölüme ayrılır: metensefalon ve miyelsefalon. Miyelsefalon, gebeliğin yaklaşık 20. haftasında medulla oblongata'yı oluştururken; metensefalon, pons ve serebellum gelişiminden sorumludur. Metensefalon, istemli hareketlerin düzenlenmesi ve motor koordinasyonun sağlanması gibi işlevleri yerine getirir (2, 3).

2.1.2. Beyin Gelişimi

İnsan beyninin gelişimi karmaşık ve uzun bir süreçtir. Gebeliğin üçüncü haftasında nöral tüp oluşumu ile başlayan bu süreç, beyin yapılarının şekillenmesi, nörogenez, nöron göçü ve farklılaşması, sinaptogenez ve miyelinizasyon gibi birçok aşamadan geçer. Beyin gelişimi doğumla sona ermeyen, yaşam boyu devam eden ve çevresel etkenlere duyarlı bir süreçtir (5). Tüm sinir sistemi ektodermal kökenli bir yapı

olup nöral plak adı verilen ektodermal kalınlaşmadan gelişir. Bu süreç, nörolasyon olarak adlandırılır ve 4. haftanın başlarında (22-23. günlerde) başlar. Nöral plak, nöral katlantıları, nöral tüpü ve nöral kristayı oluşturur. Nöral tüpten merkezi sinir sistemine ait beynin bölümlerini meydana getirecek olan beyin vezikülleri, medulla spinalis ve merkezi glial hücreler gelişir (6).

3. haftanın sonuna gelindiğinde, nöral plağın yan kenarları yukarı doğru yükselerek nöral katlantıları meydana getirir. Gelişimin ileri aşamalarında, bu katlantılar orta hatta birleşir ve nöral tüpü oluşturacak şekilde kaynaşır. Birleşme servikal bölgede başlar zamanla kraniyal ve kaudal yönlerde ilerleyerek tamamlanır. Embriyonun uç kısımlarında kaynaşma daha geç gerçekleştiğinden, bu aşamada nöral tüp ile amniyon boşluğu arasında geçici bir bağlantı korunur. Kraniyal nöroporların kapanması iki yönlüdür; ilki servikal bölgeden yukarı ve aşağı doğru ilerlerken, ikincisi ön beyinden başlayarak hem kraniyal hem de kaudal yönde ilerler. Kraniyal nöropor 25. günde, kaudal nöropor ise 27. günde kapanarak gelişimini tamamlar. Bu kapanma süreci ile birlikte, nöral tüp içindeki damar ağı da gelişimini tamamlamış olur. Nöral tüpün duvarları kalınlaşarak beyin ve omuriliği şekillendirirken, iç boşluk kısmı ise beynin ventriküler sistemini ve omuriliğin santral kanalını oluşturur. 4. somit çiftinin kraniyal kısmında yer alan daha geniş nöral tüp bölümü, ilerleyen süreçte beyin yapılarına dönüşür. Dördüncü haftada embriyonal beyinde üç temel bükülme oluşturur: sefalik fleksür, servikal fleksür ve pontin fleksür. Bu bükülmeler, beyin yapısında değişikliklere yol açarak gri ve beyaz madde konumlarını etkiler. Başlangıçta omurilik ile benzer yapıdayken, gelişim sürecinde bazal ve alar plakların dağılımı farklılaşır. Gelişiminin 4. haftasında nöral tüpün sefalik kısmında dilatasyonlar ile üç primer beyin vezikülü gelişir: Prosensefalon, mezensefalon ve rombensefalon (Şekil 1.1) (3, 6).

Prosensefalon 5. haftaya ulaşıldığında, iki ayrı yapıya dönüşür; telensefalon ve diensefalon. Telensefalonun duvarından beyin hemisferleri ve serebral korteks oluşurken boşluğundan lateral ventrikül gelişir. Nöroblastların subpial göçü ile gri ve ak maddenin yerleşimi belirlenir. Diensefalon ise bir tavan iki alar plaktan oluşur ve boşluğundan 3.ventrikül gelişir. Optik veziküllerin büyümesiyle birlikte talamus, hipotalamus, epifiz, hipofiz ve retinanın gelişmesini sağlar (6). Mezensefalon, en ilkel beyin vezikülüdür ve bölünmeden gelişimine devam eder. Gelişim sürecinde mezensefalonun bazal plaklarından tegmentum oluşur. Alar plaklarından ayrılan nöroblastlar, tektum bölgesine göç ederek görme ve işitme refleksleriyle ilgili olan çekirdekleri oluşturur. Bu çekirdekler, başlıca anterior (superior) colliculi ve posterior

(inferior) colliculi olarak iki gruba ayrılır. Anterior kollikulus, göz hareketleri ve görme refleksleriyle ilişkiliyken, posterior kollikulus işitme sinyallerinin işlendiği bir ara istasyon olarak görev yapar (7).

Rombensefalon ise iki ayrı sekonder beyin vezikülüne dönüşür; metensefalon ve miyensefalon. Metensefalon, serebellum ve ponsun oluşumunu sağlar. Bazal plakların marjinal tabakasında genişleyerek serebral ve serebellar korteksi medulla spinalisi bağlayacak liflerle birlikte köprü olan ponsa ayrıca alar plaklardan göç eden hücrelerin oluşturduğu nuclei pontis bulunur. Miyelensefalon, medulla oblongatayı oluşturur. Kaudal kısmı medulla spinalise benzerken, bazal ve alar plakların dışa açılması ile medulla spinalisten ayrılır. Bazal plak somatik, özel viseral ve genel viseral eferent nükleusları içerirken, alar plak afferent nükleusları barındırır. Sulcus limitans ile bazal ve alar plakları ayıran bir oluktur. Rombensefalonun içinde kalan nöral tüp 4. ventrikülü oluşturur (3, 6).



Şekil 1.1. Gelişimin 32. gününden sagittal kesit ile üç beyin vezikülünün gösterimi (6).

Gelişimin 5. haftası itibariyle, beyin korteksi katmanları şekillenmeye başlar ve sinir sisteminin temel yapıları belirgin hale gelir. Bu süreçler, merkezi sinir sisteminin gelişimi boyunca beynin ve omuriliğin farklılaşmasını yönlendiren kritik aşamaları oluşturur. 5. haftada beyin yapılarına paralel olarak beyin korteksinin katmanları da şekillenmeye başlar. Bu süreç, nöronların göçü ile birlikte korteksin çok katmanlı yapısının oluşumunu sağlar (8).

2.1.3. Sinir Sistemi Histolojisi

Sinir sistemi, yapısal ve işlevsel karmaşıklığıyla organizmanın ileri düzeyde örgütlenmiş biyolojik sistemlerinden biridir. Sinir dokusu hücreleri iki ana gruba ayrılır: Nöronlar ve nöroglia hücreleri. Nöronlar, milyonlarca bağlantıdan oluşan ağlar aracılığıyla sinyallerin oluşturulmasını ve iletimini sağlarken; sayıca nöronlardan yaklaşık on kat fazla olan nöroglia hücreleri ise bu iletişimi destekleyen ve sinir dokusunun bütünlüğünü koruyan hücresel bir altyapı oluşturur. Bu hücreler birbirleri ile çok sayıda ara bağlantılar kurarak karmaşık bir iletişim ağı üzerinden vücudun iç ve dış ortamları arasında etkileşimini sağlar ve bu etkileşimin dengesini korur (9).

Nöronlar

Nöronlar, nörotransmitter üretebilen uyarılabilme ve uyarıları iletme yeteneğine sahip sinir sisteminin morfolojik ve fonksiyonel birimidir. Sinir sistemindeki sayıları on milyarı aşmaktadır. İç veya dış ortamlardan stimulusları alıp ve analiz ederek uygun cevaplar üretmekle görevlidirler. İşlevsel görevleri, morfolojik özellikleri ve boyutları bakımından çeşitlilik gösterse de temel yapısal olarak hücre gövdesi (perikaryon), dentritler ve akson olmak üzere üç ana bölümden oluşurlar: (9).

Hücre gövdesi; poligonal veya oval şekilli yaklaşık 5-150 µm çapında, nükleus ve perinüklear sitoplazmayı içeren kısımdır. Nöronların metabolik merkezi olan hücre gövdesi, protein sentezi ve organel açısından zengindir. Sitoplazmasında genellikle merkezi yerleşimli ökromatik nükleus, Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri, mikrotübül ve nörofilamentlerin yanı sıra granüllü endoplazmik retikulumdan oluşan Nissl cisimcikleri yer alır (3).

Dentritler; hücre gövdesinden çıkan çok sayıda ağaç dallarına benzeyen reseptör uzantıdır. Diğer nöronlardan veya dış ortamdan gelen uyarıları hücre gövdesine iletmekle görevlidirler. Dentrit dallarının tüm yüzeyi dentrit dikenleri (spin) adı verilen küçük çıkıntılarla örtülüdür. Dentreplazma içeriği Golgi kompleksi hariç hücre gövdesindeki perinüklear sitoplazma içeriğine benzerdir (10).

Aksonlar; hücre gövdesinden diğer bir nörona veya kas hücresi gibi efektör hücrelere uyarıları iletmekle görevlidir. Hücre gövdesinden akson tepeciği adı verilen kısımdan uzanırlar (10). Aksoplazma bölgesinde agranüler endoplazmik retikulum, mitokondri, mikrotübül ve mikrofilamentler yer alırken Golgi aygıtı, ribozom ve Nissl cisimcikleri bulunmaz; bu nedenle gerekli protein ve enzimler hücre gövdesinde

sentezlenerek aksona taşınır (9). Merkezi sinir sisteminde oligodendrositler, periferik sinir sisteminde ise Schwann hücreleri tarafından oluşturulan miyelin kılıf, birçok aksonun etrafını sararak izolasyonu sağlar ve iletim hızını artırır. Bu yapıya sahip olan aksonlar miyelinli aksonlar olarak sınıflandırılır. Miyelin kılıf içermeyen aksonlar ise miyelinsiz akson olarak sınıflandırılır (3).

Nöronların Sınıflandırılması

Nöronlar hücre gövdesinden çıkan uzantı sayısına göre ve fonksiyonlarına göre iki gruba ayrılır. Uzantı sayılarına göre; unipolar (psödounipolar), bipolar ve multipolar nöronlar olarak sınıflandırılır.

Unipolar nöron, nöron gövdesinden uzanan tek bir aksonu vardır. Bu akson hücre gövdesinden ayrıldıktan sonra periferik ve merkezi olmak üzere iki dala ayrılır. Unipolarların büyük bir kısmı MSS'ne yakın yer alan duyuşal nöronlardır. Kranial ve spinal sinirlerin duyuşal gangliyonlarında bulunur (1).

Bipolar nöron, bir akson ve bir dentrit içerirler. Özellikle özel duyu reseptörlerinde bulunurlar.

Multipolar nöron, bir aksonu, en az iki ya da daha fazla sayıda dentrite sahiptir. En yaygın bulunan nöron türüdür (11).

Fonksiyonlarına göre; duyuşal, motor ve ara nöronlar olmak üzere üçe ayrılır.

Duyuşal nöronlar, reseptörlerden gelen uyarıları MSS'ye iletirler.

Motor nöronlar, MSS'den gelen ya da gangliyonlardan efektör hücrelere implus iletmekle görevlidirler.

Ara nöronlar, duyuşal ve motor nöronlar arasında iletişimi sağlar. Nöronların %99'unu oluşturarak tamamı MSS yer alır (9) (11).

Merkezi Sinir Sistemi Nöroglia Hücreleri

MSS'de nöronlar arasında yer alan özel dokuya nöroglia dokusu ve bu dokuyu oluşturan hücrelere nöroglia hücreleri denir. Bölünme özelliğine sahip olan bu hücreler nöronlara yapısal ve fonksiyonel destek sağlar. Dört tip merkezi nöroglia hücresi bulunur; astrositler, oligodendrositler, mikrogliya ve ependim hücreleri (1).

Astrositler; nöroglial hücrelerin en büyüğüdür. MSS'de homeostazın korunmasında, sinaptik aktivitenin düzenlenmesinde ve kan-beyin bariyerinin desteklenmesinde rol oynayan yıldız şeklindeki nöroglial hücrelerdir. Sitoplazmaları uzun ve dallı uzantılar içerir; bu sayede hem nöronlarla hem de kan damarlarıyla temas

kurarak iyon dengesinin sağlanması, nörotransmitterlerin geri alımı ve metabolizması gibi görevlerde bulunurlar (1, 9).

Oligodendrositler; MSS’de miyelin kılıfın oluşumundan sorumlu hücrelerdir. Astrositlere kıyasla daha küçük hücrelerdir. Her bir oligodendrosit aksonlara uzanarak çevresinde spiral şeklinde döner ve miyelin kılıfı oluşturur. Miyelin kılıf ile bağlantılı bazal lamina bulunmaz. Oligodendrositlerin her bir sitoplazmik uzantısı tarafından oluşturulan miyelin kılıf segmenti, internod olarak adlandırılır. Miyelin kılıf, aksonu kesintisiz bir şekilde sarmalamaz, düzenli aralıklarla kesintiye uğrar ve kesintiye uğradığı bu bölümlere Ranvier boğumu adı verilir. Bu boğumlar sayesinde implusların sıçrama hareketi yaparak hızlı iletilmesi sağlanır (12).

Mikroglialar; en küçük nöroglia hücresidir. Nükleusları küçük mekik şekilli hücrelerdir. Fagositöz yapma yetenekleri nedeniyle mononükleer fagositik sisteminin bir üyesi kabul edilirler (9).

Ependim hücreleri; beyin ventriküllerinin ve spinal kanalı döşeyen kübik veya prizmatik şekilli hücrelerdir. Apikal yüzeyler inde mikrovilus ve silyum bulunur. Beyin omur ilik sıvısının emiliminde ve hareketinde rol alırlar. Eritelden farklı olarak alt sınırında bazal lamina bulunmaz (11).

2.1.4. Beyin Histolojisi

Beyin bilginin değerlendirilmesi, hafıza, öğrenme ve istemli motor cevabının başlatılmasından sorumludur. Pons üzerine yerleşmiş iki serebral hemisferden oluşur. Hemisferlerin içlerinde lateral ventriküller olarak bilinen boşluklar bulunur. Hemisferlerin yüzeyinde bulunan derin yarıklarla loblara ayrılmıştır. Her lobun yüzeyinde sulkuslarla sınırlanmış giruslar bulunur.

Gri Madde (Substantia Grisea)

Nöron hücre gövdesi, dentritler, mikroglia, astrositten ve kan damarlarından zengin serebral korteks bölgesidir. Bu bölgede çok farklı boyut ve şekilde nöron tipi bulunur. Bunlardan piramidal nöron, yıldız veya granüler hücreler, horizontal hücreler ve fuziform hücreler korteksin ana nöron çeşididir.

Piramidal nöronlar, hücre gövdesi piramit şeklindedir. En büyük piramidal nöronlar Betz hücreleri olarak adlandırılır. Korteksin derinliklerine doğru hücrenin büyüklüğü artar. Duyusal bilginin uyumu ve istemli motor yanıtlarının oluşmasında

görev alırlar. Büyük piramidal nöronların arasında farklı boyutlarda küçük nöronlar da bulunur.

Yıldız hücreler, uzantıları nedeniyle yıldız şeklindedir. Korteksin her tabakasında bulunurlar. Küçük hücre gövdelerinden her yöne seyreden birçok dentrit ve kısa aksonları vardır.

Horizontal hücreler, hücre gövdeleri mekik şeklinde olan bu hücreler genellikle korteksin en dış tabakasında bulunur.

Fuziform hücreler, mekik biçimli morfolojileriyle karakterize olup, hücre gövdeleri korteks yüzeyine dik bir eksenle konumlanmıştır. Hücre gövdesinin lateral yüzeyinden çıkan akson yüzeye doğru ilerlerken üst ve alt yüzlerden çıkan dentritleri dallanarak yüzeye ve korteksin derinliklerine doğru seyreder.

Serebral Korteks Tabakalanması

Serebral korteksin tabakalı yapısı, farklı büyüklük ve şekillerdeki nöron gövdelerinin belirli düzenlerde konumlanması ve sinir liflerinin yüzeyden derine doğru organize olması sonucu oluşur. Bu organizasyon sayesinde korteks, yüzeyden derine doğru histolojik olarak altı tabakaya ayrılır (Şekil 1.2).

1. Moleküler tabaka (lamina molekölare): Pia materin hemen altında yer alır. Hücresel açıdan fakir ve az sayıda iş şeklinde horizontal hücreler bulunur.

2. Dış granüler tabaka (lamina granülaris eksterna): Granüler hücreler, küçük piramidal nöronlar ve yıldız şekilli nöronlar bulunur.

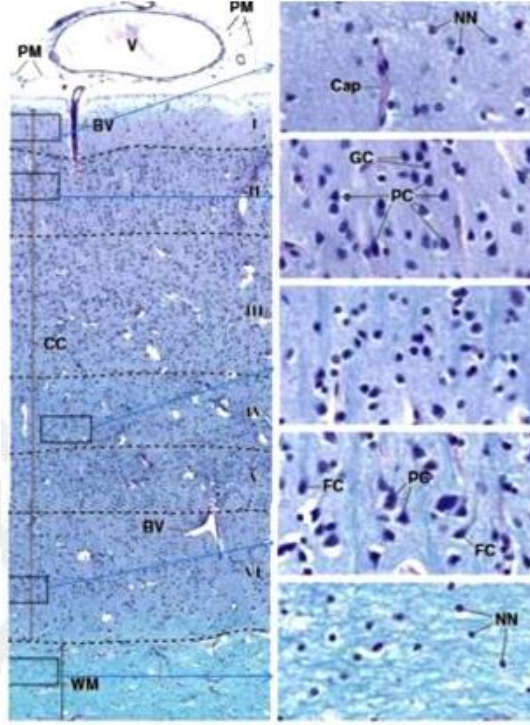
3. Dış piramidal tabaka (lamina piramidalis eksterna): Orta büyüklükte piramidal nöronlar ile iki tabaka arasında konumlanan küçük piramidal nöronların yanı sıra hem horizontal hem de vertikal düzlemde uzanan fuziform nöronlar bu alanda yer alır.

4. İç granüler tabaka (lamina piramidalis interna): Küçük yıldız şeklinde granüler nöronlar ile glial hücreler bu tabakada hakimdir. Serebral korteksin en ince tabakası olmakla beraber en fazla hücre yoğunluğunun olduğu tabakadır.

5. İç piramidal tabaka (lamina piramidalis interna): Başlıca orta ve büyük piramidal nöronlardan oluşur. Motor merkezlerde Betz hücreleri adı verilen büyük piramidal hücreler bulunur. Serebral korteksin en az hücre yoğunluğunun olduğu tabakadır.

6. Multiform tabaka (lamina multiformis): Serebrumun beyaz maddesine komşu olan polimorfik hücre tabakasıdır. Bu tabakada fuziform, piramidal, yıldız ve

çok kutuplu çeşitli nöronlar bulunur. Hücreler düzensiz bir şekilde yerleşmiştir ve yapı itibariyle diğer katmanlardan farklılık gösterir. Martinotti nöronları en belirgin nöron tipidir (3, 9).



PM: pia mater, V: ven, BV: kan damarları, CC: Cortex cerebri, WM: Substantia alba, NN: Nöroglial hücreler, GC: Granül hücreler, PC: Piramidal hücreler, FC: Fuziform hücreler (1).

Şekil 1.2. Beyin korteksinin tabakaları. Luxol fast blue boyanması ile gösterimi.

Beyaz Madde (Substantia Alba)

Serebral korteksin altında miyelinli miyelinsiz sinir liflerinden, nöroglia ve kan kapillerlerinden oluşur. Farklı yönlerde seyreden sinir demetlerinin bir kısmı serebral korteksin çeşitli bölgeleri ile karşılıklı hemisfer korteksleri arasında bağlantı kuran demetlerdir. Diğer bir kısmı ise serebral korteksi serebrumun diğer parçalarına ve medulla spinalise bağlayan inen eferent ve çıkan afferent demetlerdir. Hemisferlere giren ve hemisferlerden çıkan bu demetler subkortikal nükleuslar arasından geçerek bir araya gelerek capsula interna ve eksternayı oluşturur (3, 9).

Subkortikal- Bazal Nükleuslar

Serebral hemisferler ile talamusun birleşim bölgesinde, beyaz madde içerisinde yer alan gri madde kümeleri bazal nükleuslar olarak adlandırılır. Bu yapılar topluca korpus striatum terimi ile ifade edilir ve başlıca nükleus kaudatus, lentiform nükleus (alt birimleri olan putamen ve globus pallidus) ile klaustrumdan oluşur. Bazal nükleuslar, ekstrapiramidal sistemin bir parçası olup istemsiz motor hareketlerin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Histolojik olarak, bu bölgeler yoğun nöron gövdeleri, bunlara ait uzantılar, nöroglia hücreleri ve kapiller damar yapıları ile karakterizedir (3, 9).

Hipokampüs

Hipokampüs, lateral ventrikülün temporal boynuzu boyunca uzanan laminar bir gri madde yapısıdır. Yaşam boyunca süregelen nöral plastisite kapasitesi sayesinde, öğrenme ve bellek mekanizmalarının düzenlenmesinde merkezi bir rol üstlenir. Hipokampüs, iki temel anatomik bileşenden oluşur: Cornu Ammonis (CA) ve dentat girus. Embriyonik gelişim sırasında dentat girusun iç bükey yüzeyi, CA'nın iç yüzeyine yerleşir. Gelişim süreci tamamlandığında bu iki yapı, hipokampal sulkusla birbirinden ayrılır ve karakteristik U biçimli bir morfoloji kazanır (13). CA, vestijiyal hipokampal sulkustan başlayarak ventrikül boşluğuna doğru uzanır ve mikroskobik düzeyde yedi tabakaya ayrılarak incelenebilir:

1. Alveus, hipokampüsün ventriküler yüzeyini örten bu tabaka, başta piramidal nöronlara ait aksonlar olmak üzere subikulumdan çıkan nöronal uzantılarından oluşur.

2. Stratum oriens, piramidal hücrelerin bazal dendritlerini ve sepet hücre tipi internöronları içeren, stratum piramidale ile sınırları tam belirgin olmayan bir katmandır.

3. Stratum piramidale, hipokampal piramidal nöronların yoğun olarak bulunduğu tabakadır. Bu üçgen şekilli büyük nöronlar, dendritlerini komşu tabakalara, aksonlarını ise alveus yönünde uzatır.

4. Stratum lucidum, hipokampüsün en ince tabakalarından biridir ve yalnızca CA3 bölgesinde yer alır. Hücresel yoğunluğu oldukça fazladır ve büyük oranda motor özellik gösteren piramidal nöronlardan oluşur.

5. Stratum radiatum, yapısal ve işlevsel olarak stratum oriens tabakasına benzerlik gösterir. Bu katman, hipokampüse gelen septal ve komissural aferent lifleri içerir.

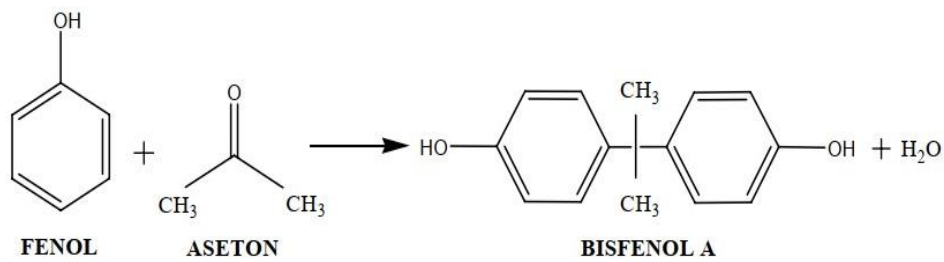
6. Stratum lakunosum, hipokampusün ince yapılı tabakalarından biridir. Bu katman, CA3 bölgesinden CA1'e uzanan Schaffer kollateral liflerini içerir.

7. Stratum molekülare hipokampusün en yüzeyde yer alan tabakasıdır. Bu katmanda, entorhinal korteksten gelen perforan yol lifleri ile piramidal hücrelerin apikal dendritleri yer alır (14) (15).

2.2. Bisfenol A

2.2.1. Genel Özellikleri

Endokrin bozucu kimyasallar sınıfına ait kimyasal bir ajan olarak tanımlanan bisfenol A (BPA), kimyasal formülü 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan olan ve iki fenol ile polikarbonat moleküllerinin birleşiminden meydana gelen bir organik bileşiktir (16). İlk kez 1891 yılında Rus kimyager Aleksandr Dianin tarafından tanımlanmış olup, 1905 yılında Zincke tarafından iki molekül fenol ile asetonun düşük pH yüksek sıcaklık ile yoğunlaştırılması ile sentezlenmiştir. $C_{15}H_{16}O_2$ formülüne sahip (Şekil 2.1) katı, fenolik kokulu, krem-beyaz renkte, kristal yapıdadır (17). BPA, aseton, etanol ve dimetilsülfoksit gibi çözücülerde iyi çözünür. Moleküler ağırlığı 228.9 g/mol olan BPA, 153-156 °C arasında erimekte ve 0.5 kPa basınç altında 220 °C'de kaynamaktadır. Alevlenme sıcaklığı 270 °C olup, 1 atm basınçta 193 °C'de uçucu hâle gelir. Lipofilik düzeyini gösteren log Kow ve log Pow değerleri 3.32'dir. Suda çözünürlüğü ise 25 °C'de 120 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu fizikokimyasal özellikler, BPA'nın çevresel yayılımı, biyolojik sistemlerdeki hareketi ve toksikolojik etkileri açısından önem arz etmektedir (18).



Şekil 2.1: Fenol ve aseton tepkimesi sonucunda BPA oluşumu (19).

2.2.2. BPA'nın Küresel Üretimi ve Kullanım Alanları

BPA, 1891'de ilk kez sentezlenmesinin ardından 1940'tan bu yana endüstriyel üretimde geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Günümüzde BPA, polikarbonat plastikler, epoksi reçineler ve çeşitli polimer malzemelerin sentezinde yaygın olarak

kullanılmaktadır (20). Çeşitli uygulamalarda küresel BPA kullanım hacminin, 2015 yılında yaklaşık 7.69 milyon metrik ton olduğu ve 2016'da 7.7 milyon metrik tona ulaşmasının beklendiği kaydedilmiştir. 2016 ile 2022 yılları arasında yıllık ortalama %4.8'lik bir bileşik büyüme oranı gözlemlenmektedir (21). BPA'nın en geniş pazarı Asya Pasifik bölgesinde bulunmakta ve bu bölge küresel pazarın yaklaşık %52'sini oluşturmaktadır. Üretimin %36'sı ise ABD ve Batı Avrupa tarafından gerçekleştirilmektedir (22).

BPA ile üretilen polikarbonat plastikler, yüksek mukavemet, sertlik, termal dayanıklılık ve asitler ile yağlara karşı direnç gibi üstün kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle alternatif kimyasallar mevcut olmasına rağmen tüm endüstriyel uygulamalar için tek bir alternatif çözüm yoktur. Bu sebeple geniş bir kullanım alanına sahiptir (23). Endüstride üretilen BPA'nın yaklaşık %70'i polikarbonat üretiminde, %25'i ise epoksi reçinelerin yapımında kullanılır. Geriye kalan %5'lik kısım ise fenoplast ve fenolik reçineler, doymamış polyester reçineleri, gıda kutularının iç kaplamaları, etoksillenmiş BPA, termal kağıt katkı maddeleri, bazı dental malzemeler, polioller, modifiye poliamidler, otomobil lastikleri için bileşenler, tıbbi cihazlar, optik malzemeler, içme suyu boruları ve oyuncaklar dahil çeşitli materyallerde küresel boyutta kullanılır (24-26).

2.2.3. BPA Maruziyeti

BPA'nın geniş bir kullanım alanına sahip olması, insanların günlük yaşamda BPA ile temas etme riskini artırmaktadır. BPA, plastiklerde ve epoksi reçinelerde kullanılan bir endüstriyel kimyasal olarak hem gıda temas yüzeyleri hem de çeşitli tüketici ürünleri aracılığıyla insan vücuduna su, hava, toprak, gıda ve doğrudan temas ile geçebilmektedir (25).

BPA'ya en sık maruz kalınan yol, BPA içeren ambalajlardan gıda ve içeceklere geçen BPA ile bebek biberonları ve yeniden kullanılabilir su şişeleri gibi polikarbonat kaplardan BPA geçişi olduğu düşünülmektedir. Günümüzde gıda ambalaj malzemeleri, konserve kutularının iç kaplamaları ve su şişeleri gibi birçok üründe BPA bulunmaktadır. Özellikle yüksek sıcaklık veya asidik ortamlar, BPA'nın plastik materyallerden gıdaya geçiş hızını artırmaktadır. Örneğin, mikrodalga fırında ısıtılan BPA içeren plastik kaplar veya asidik yiyeceklerin saklandığı kaplar, BPA geçişinin daha yoğun olduğu durumlardır (27). BPA maruziyeti, polikarbonat plastikten yapılmış bebek biberonlarının kullanımıyla doğrudan ilişkilidir. Özellikle sıcak sıvı veya gıdalar

biberona konulduğunda, BPA'nın çözünme olasılığı artmaktadır. Biberonların mikrodalgada ısıtılması veya sıcak suyla sterilize edilmesi, BPA'nın çözünmesini hızlandırabilir. Araştırmalar, bebeklerin ve küçük çocukların kilo başına daha yüksek düzeyde BPA maruziyetine sahip olduklarını göstermektedir; bunun nedeni, vücut ağırlıklarının düşük ve besin alım oranlarının yüksek olmasıdır, bu da BPA'nın onlara daha hızlı geçmesine yol açmaktadır (20).

BPA'nın su içinde çözünürlüğü 120 ila 300 µg/ml aralığında değişiklik göstermektedir. Atık su arıtma süreçleri BPA'yı tamamen ortadan kaldıramadığı için, bu bileşik onu üreten sanayi tesislerinin atık sularında tespit edilebilir (28). BPA, deniz suyunda nehir suyuna kıyasla daha uzun süre (yaklaşık 30 gün) bozulmaya uğramadan kalabilmektedir. Bu nedenle, deniz organizmalarında BPA kontaminasyonu riski, tatlı su organizmalarına göre daha yüksek olabilir. Bu sebeple, BPA ile kirlenmiş tatlı su balıkları veya deniz ürünlerinin tüketimi, insanlar için başlıca kontaminasyon yollarından biri olarak kabul edilmektedir (29).

Atmosferik Oksidasyon Programı kullanılarak yapılan bir çalışmada, BPA'nın foto-oksidasyon yarı ömrünün 0.74 ila 7.4 saat arasında olduğu hesaplanmıştır. Rudel ve arkadaşlarının yaptığı son çalışmada, yedi hava örneğinden üçünde (bir plastik işyeri, bir konut ve bir ofis binası) BPA konsantrasyonlarının 2 ila 208 ng/m³ arasında değiştiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, genel olarak havadaki yüksek BPA seviyelerine maruz kalma ve BPA'yı soluma olasılığı oldukça düşüktür (30, 31). Ancak sanayi sektörü çalışanlarının, BPA'ya hem solunum hem de cilt teması yoluyla daha yüksek düzeyde maruz kalmaktadır (32).

BPA ile temas sonucu ortaya çıkabilecek sağlık tehlikelerinden biri, mesleki bir durum olarak tanımlanan alerjik kontakt dermatittir; ancak bu durumun gelişim mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Alerjik kontakt dermatitin büyük bir kısmı, plastik ürün üretiminde çalışan işçiler, epoksi yapıştırıcı bant ve köpüklere maruz kalanlar ile diş hekimi asistanları gibi BPA içeren ürünlerle düzenli olarak temas eden çalışanlarda gözlemlenmektedir (33).

BPA'nın toprakta adsorpsiyon katsayısı değeri, 120 ng/l çözünürlük ve 3.32 oktanol-su bölüşüm katsayısı kullanılarak 314-1524 arasında hesaplanmıştır. Bu, BPA'nın yeraltı veya yüzey suyuna salındığında toprak veya tortularda birikebileceğini göstermektedir. Tortulardaki BPA seviyeleri yüzey sularına göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, yapılan bir çalışmada, topraktaki BPA'nın yarı ömrünün 3 günden kısa olduğu ve ana dağılma yolunun kalıntı bağlanması olduğu belirlenmiştir (34).

BPA maruziyeti, etnik köken, yaş, sosyoekonomik durum, sigara kullanımı ve yaşam tarzı gibi faktörlerle ilişkilidir. Gençler, düşük gelirli ve sigara içen bireyler daha fazla BPA'ya maruz kalmaktadır. Vücuda farklı yollarla alınan BPA'nın tükürük, idrar, serum, amniyotik sıvı ve foliküler sıvı gibi çeşitli vücut sıvılarında bulunduğu, ayrıca akciğer, böbrek, karaciğer, beyin ve plasenta gibi pek çok doku birikebildiği belirlenmiştir (35). Bu durum, BPA'nın vücutta birikerek uzun vadede potansiyel sağlık riskleri oluşturabileceğini göstermektedir.

BPA'nın bilinen toksik etkilerine karşın Avrupa Birliği, 19 Aralık 2024 tarihinde kabul edilen ve 31 Aralık 2024 tarihinde Resmi Gazete'de yayımlanan (AB) 2024/3190 sayılı Komisyon Tüzüğü ile BPA'nın gıda ve içeceklerle temas eden ürünlerde kullanımını yasaklamıştır. Bu yasak, metal kutuların kaplamaları, yeniden kullanılabilir plastik içecek şişeleri, su dağıtım soğutucuları ve diğer mutfak gereçleri gibi ürünleri kapsamaktadır (36).

2.2.4. BPA'nın Beyin Üzerine Etkisi

BPA, MSS'ne zarar veren endokrin bozucu nörotoksik bir ajandır. İn vitro ve in vivo çalışmaların yanı sıra deney hayvanları ve epidemiyolojik araştırmalardan elde edilen bulgular, BPA maruziyetinin doku ve organlar üzerinde doğrudan toksik etkilere yol açabileceği gibi endokrin yolakları etkileyerek çeşitli organ sistemlerinde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara yol açma potansiyeline sahip olduğuna işaret etmektedir (37).

BPA, beyinde sinaptik plastisiteyi azaltarak öğrenme ve hafıza süreçlerini olumsuz etkiler. Sinaptik bağlantıların gücünü ve esnekliğini bozarak nöronlar arası iletişimi zayıflatır ve sinaptik proteinlerin ekspresyonunu baskılar (38). Ayrıca, prenatal ve postnatal dönemde nörojenezini inhibe ederek yeni nöron oluşumunu engeller ve özellikle hipokampus gibi öğrenme ile ilgili beyin bölgelerinde nöronal yenilenmeyi kısıtlar (39, 40).

BPA oksidatif strese neden olarak, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak nöronlara zarar verir ve antioksidan savunma mekanizmalarını zayıflatır. Bu süreç, nöronal hücre hasarına ve dejenerasyona yol açarak nörolojik fonksiyonların bozulmasına neden olabilir (41). Bunun yanı sıra, BPA'nın otofajiyi ve apoptozu indükleyerek hücrelerde yapısal ve fonksiyonel mekanizmaları bozduğu gösterilmiştir. Otofajinin aşırı aktivasyonu hücresel işlev kaybına sebep olurken, apoptozun artışı nöronal hücre ölümüne yol açarak beyin dokusunda nöron ve kaybı ile glial hücre artışı ve glial hücre profilinde değişikliğe neden olabilir. Tüm bu süreçler birlikte

değerlendirildiğinde, BPA'nın bilişsel bozukluklara, öğrenme güçlüklerine ve nörodejeneratif hastalıkların (örneğin Alzheimer ve Parkinson) gelişimine katkıda bulunabileceği görülmektedir (42) (43).

Prenatal dönemde beyin gelişimini olumsuz etkilediği bilinen BPA üzerine yapılan araştırmalar, bu maddenin yetişkin dönemde de nörotoksik etkiler gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Uzun süreli maruziyet sonucu oluşan düşük doz BPA birikimi Alzheimer ile ilişkili proteinlerdeki artışa neden olarak nöronal hasara yol açabilir (44).

Östrojen ve progesteron, beyin gelişiminde önemli rol oynayan temel hormonlardandır. Yapılan birçok hayvan çalışması, BPA'nın östrojen benzeri etkiler göstererek beyin gelişimi sırasında cinsel farklılaşmadan sorumlu bölgelerde yapısal ve işlevsel değişikliklere yol açtığını ortaya koymuştur. Ayrıca, BPA maruziyetinin öğrenme kapasitesinde azalma ve hafıza bozukluklarına neden olabileceği de çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (45) (46).

Maternal BPA maruziyeti, tanıma belleğini olumsuz etkileyebilir; bu etki, Beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF) sinyal yolunun inhibisyonu yoluyla gerçekleşir. BDNF ve reseptörü tropomiyosin reseptör kinaz B, nöron gelişimi, sinaptik olgunlaşma ve nöronal plastisite için kritik öneme sahiptir. Bu yolak, siklik AMP-yanıt elemanı bağlayıcı protein ve CREB bağlayıcı protein gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek gen ifadesini düzenler. Ancak BPA'nın nörit oluşumu ve sinaptik işlev üzerindeki zararlı etkilerinin moleküler ayrıntıları hâlâ tam olarak açıklanamamıştır (47).

BPA maruziyeti, aksonal dejenerasyon ve demiyelinizasyon gibi nörotoksik etkilerle ilişkilendirilmektedir. Bu tür yapısal bozulmalar, nörofilamentlerin stabilitesini ve işlevini olumsuz etkileyebilir. Nöronların iskelet yapısını oluşturan ve aksonal bütünlük ile elektriksel iletimin korunmasında kritik rol oynayan nörofilamentler (NF'ler), özellikle akson hasarı durumlarında hücre dışına salınan ağır, orta ve hafif zincirli protein alt birimlerinden oluşur. BPA maruziyeti, bu nörofilament proteinlerinin gen ve protein düzeylerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir. Bu artış, BPA'nın aksonal yapılarda hasara neden olabileceğini ve aksonal dejenerasyon süreçlerini tetikleyebileceğini düşündürmektedir (48).

BPA'nın uzun süreli düşük doz maruziyeti, oligodendrositlerde dejenerasyon ve aksonal miyelin kaybına yol açabilir. Özellikle Myelin Basic Protein (MBP), miyelin kılıfının yapısında yer alan ve aksonların elektriksel iletimini sağlayan temel

proteinlerden biridir. Araştırmalar, BPA'ya maruziyetin MBP gen ekspresyonunu azalttığını, bu durumun da miyelin bütünlüğünün bozulmasına ve demiyelinizasyon süreçlerinin başlamasına neden olabileceğini göstermektedir. MBP düzeyindeki azalma, oligodendrositlerin hasarına, aksonların korunmasında bozulmaya ve sonuç olarak sinir iletiminde aksamalara yol açabilir (48).

BPA maruziyeti, yalnızca yapısal nöronal bozulmalarla sınırlı kalmayıp aynı zamanda hücreölüm mekanizmalarını da etkileyebilmektedir. Özellikle apoptoz sürecinin temel yürütücü enzimlerinden biri olan Caspase-3 (Cas-3), BPA'nın nörotoksik etkilerinde merkezi bir rol oynamaktadır. Çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalar, BPA'nın oksidatif stres oluşturmak suretiyle mitokondriyal yıkımı tetiklediğini ve bunun sonucunda Cas-3 aktivasyonunu artırarak programlanmış hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir. Bu süreç, hem nöronlarda hem de glial hücrelerde apoptoza neden olabilir (49).

2.3. Timokinon

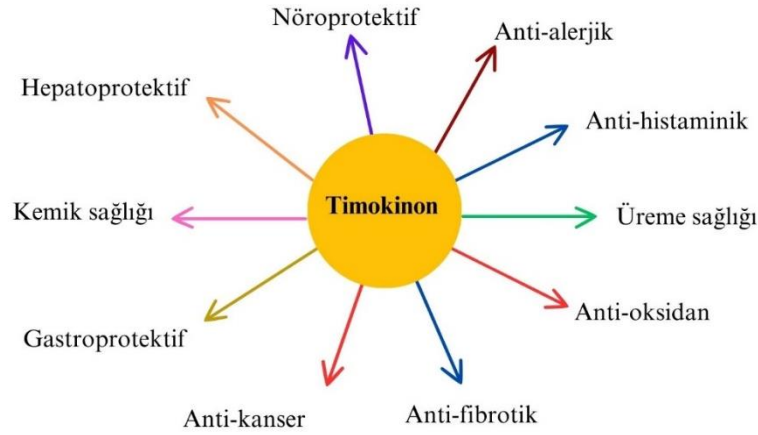
Günümüzde çok sayıda çalışmalardan elde edilen bulgular tıbbi bitkilerin ve bu bitkilerden elde edilen etken maddelerin çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde direkt veya dolaylı yollardan olumlu etkilerinin olduğunu göstermektedir. Tıbbi bitkiler arasında yer alan, Ranunculaceae familyasına ait *Nigella sativa* (*N. sativa*), birçok araştırmada geniş farmakolojik potansiyeliyle dikkat çeken bir bitki olarak öne çıkmaktadır. Yaygın olarak "siyah tohum" adıyla bilinen *N. sativa*, Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve Güneybatı Asya'da sıklıkla kullanılmaktadır (50).

N. sativa tohumları ve bunlardan elde edilen yağlar, yüzyıllardır dünya genelinde geleneksel tıp sistemlerinde çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır (51). *N. sativa* tohumlarının geleneksel kullanımını destekleyen modern bilimsel çalışmalar antioksidan, anti-inflamatuar, immünomodülatör, antikanser, nöroprotektif, antimikrobiyal, antihipertansif, kardiyoprotektif, antidiyabetik, gastroprotektif, nefroprotektif ve hepatoprotektif gibi çok yönlü farmakolojik etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur (52).

Timokinon (TQ), *Nigella sativa* tohumlarında bulunan en önemli biyoaktif bileşenlerden biridir. Düşük toksisite profili ve minimal yan etki potansiyeli sayesinde çeşitli terapötik faydalara sahip olan doğal tedavi yaklaşımlarında önemli bir bileşik olarak öne çıkmaktadır (53). TQ'nun başlıca farmakolojik özellikleri arasında nöroprotektif, kardiyoprotektif, antiinflamatuar ve antikanserojenik yer alır. Preklinik

çok sayıdaki çalışmada, terapötik etkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiş olup güçlü antioksidan aktivitesi sayesinde birçok hastalıkta inflamasyonun kontrolünde faydalı bir rol oynadığını gösterilmiştir (54, 55). TQ'nun geniş bir terapötik pencereye sahip olmasıyla birlikte toksik etkisinin olup olmadığı gündeme gelmiş ancak fizyolojik doz aralıklarında uygulandığında toksik etki oluşturmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte az sayıdaki bazı çalışmalarda hemoglobin metabolizmasında değişiklikler meydana geldiği ve lökosit ile trombosit sayılarında azalma görüldüğü bildirilmiştir. Ancak, söz konusu hematolojik etkilerin oluşumuna neden olan mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Mevcut bu bulgunun dışında, literatürde TQ ile ilişkili başka bir olumsuz etki veya toksisite rapor edilmemiştir (56).

TQ, 164.204 g/mol moleküler ağırlığında, monoterpen diketon yapısında olup, lipofilik özellik gösterir. Lipofilik olması ve düşük moleküler ağırlığa sahip olması kan-beyin bariyerini (BBB) geçme kapasitesini kolaylaştırır. Bu özellikleri sayesinde merkezi sinir sistemini hedef alan potansiyel terapötik bir ajan olarak değerlendirilmektedir (57).



Şekil 2.2. Timokinonun potansiyel etkileri (58).

TQ güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleriyle dikkat çeken bir bileşiktir. Serbest radikalleri doğrudan süpürme kapasitesi sayesinde hücreleri oksidatif hasardan korur. Bununla birlikte, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi başlıca antioksidan enzimlerin aktivitesini ve sentezini artırarak endojen savunma sistemini destekler (59).

TQ'nun serbest radikal ve süperoksit radikal süpürücü özellikleri üzerine yapılan çalışmalar, bu bileşiğin oksidatif stresin önlenmesinde potansiyel bir rol oynayabileceğini göstermektedir (60).

Nörodejeneratif hastalıkların temelinde oksidatif stres önemli bir etkidir. Artmış oksidatif stres sonucu ortaya çıkan serbest radikaller, sinir hücrelerinde lipit peroksidasyonu, DNA hasarı ve protein oksidasyonuna neden olarak nöron ve glia hücrelerinde geri dönüşümsüz hasarlara sebep olur. Ayrıca mitokondriyal işlev bozukluğu ve hücresel enerji metabolizmasını bozarak apoptozu tetikler ve bu süreçler genetik mutasyonlarla birleştiğinde nöron kaybını hızlandırır. Bir diğer faktör, hücrelerde aşırı glutamat birikimi sonucu nöronların kalsiyum dengesinin bozulması ve mitokondriyal hasarın artmasıdır. Bunların dışında, doğuştan gelen bağışıklık sistemi inflamatuvar yanıtı, mikroglia hücrelerinin aşırı aktivasyonu ve kronik inflamasyon sinir hücrelerinde hasara neden olabilir. Bu faktörlerin birbiriyle bağlantılı olduğu ve nörodejeneratif hastalıkların çok faktörlü bir yapıya sahip olduğu göz önünde bulundurularak, gelecekteki tedavi stratejileri oksidatif stresin önlenmesi, mitokondriyal fonksiyonun desteklenmesi, glutamat dengesinin korunması ve nöroinflamasyonun azaltılması üzerine yoğunlaşmaktadır (53, 61).

TQ Alzheimer, Parkinson, iskemik inme, akut serebral hasar, anksiyete, depresyon, epilepsi ve şizofreni gibi çeşitli nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik hastalıklara karşı terapötik potansiyele sahip olan bir maddedir. Literatürde yer alan deneysel çalışmalardan elde bulgular, farklı kimyasal nörotoksisite modellerinde belirgin nöroprotektif etkileri olduğunu göstermektedir. Bu koruyucu etkilerin temelinde ise TQ'nun güçlü antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikleri yatmaktadır (62).

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, 200-250 g ağırlığında ve 10-12 haftalık toplam 32 adet *Wistar albino* cinsi erkek sıçan kullanıldı. Çalışma, İnönü Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 21332 HAYBİS numarası ile onaylan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2024-3724 proje kodu ile finanse edilmiştir.

3.2. DeneySEL Tasarım ve Kimyasalların Hazırlanışı

Sıçanlar her grupta 8 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı ve havalandırması bulunan, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklığa sahip ve mevsimsel gün ışığı ritmine uygun aydınlatılan odalarda bağıl nem (%50-55) koşullarında bulunan temiz plastik kafeslerde barındırıldı.

Çalışmada kullanılan BPA (Macklin Biochemical, Çin) ve TQ (AmBeed, ABD) 50 mg/kg/gün olacak şekilde mısır yağı içerisinde homojen bir şekilde çözülerek hazırlandı.

Kontrol (K) Grubu: Su ve standart sıçan yemi ile 30 gün boyunca *ad libitum* olarak beslenerek hiçbir uygulama yapılmadı.

TQ Grubu: Mısır yağında çözünmüş TQ 50 mg/kg/gün gastrik gavaj ile 30 gün boyunca verildi.

BPA Grubu: Mısır yağında çözünmüş BPA 50 mg/kg/gün gastrik gavaj ile 30 gün boyunca verildi.

BPA+TQ Grubu: Mısır yağında çözünmüş BPA ve TQ yarım saat aralıkla 50 mg/kg/gün gastrik gavaj ile 30 gün boyunca verildi.

3.3. Deneyin Sonlandırılması ve Doku/Kan Örneklerinin Alınması

30 gün süren deneyin sonunda, sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü. Ketamin/ksilazin ile genel anestezi uygulanarak, batın bölgesinden bir insizyon ile sıçanların karınları açıldı ve Vena Cava'dan kan örnekleri alındı. Kan örnekleri 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan serum örnekleri santrifüj tüplerine alınarak biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -80°C 'de saklandı. Dekapite edilen sıçanlardan alınan beyinlerin sağ lobu histolojik incelemeler için %10'luk

tamponlanmış formaldehit içine alınırken, sol loblar biyokimyasal incelemelerde kullanmak üzere -80°C’de muhafaza edildi.

3.4. Histolojik Yöntemler

3.4.1. Doku Takibi ve Kesit Alma

Beyin dokuları histopatolojik değerlendirmeler amacıyla %10’luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Fiksasyonun 72 saatlik süresinin tamamlanmasının ardından, dokular trimlenerek plastik doku takip kasetlerine yerleştirildi ve Tissue-Tek VIP/SAKURA marka tam otomatik doku takip cihazında standart doku takip protokolünden geçirildi. Bu protokol kapsamında:

Dehidrasyon aşamasında, dokulardaki suyun uzaklaştırılması amacıyla örnekler sırasıyla %70, %80, %96 ve %99 etanol serilerinde alınmış; birer saat süreyle bekletildi.

Şeffaflaştırma aşamasında, dokular absolüt alkolden çıkarılarak üç aşamalı ksilen serisinden geçirildi ve her ksilen aşamasında 1’er saat inkübe edilerek dokuların saydamlaşması sağlandı.

İnfiltrasyon aşamasında ise, ksilenden çıkarılan beyin doku örnekleri erimiş parafin (62°C) dört aşamalı parafin serisinde birer saat süreyle bekletilerek ve parafin infiltrasyonu sağlandı.

İnfiltrasyon işlemi tamamlanan beyin dokuları, Leica EG1160 marka doku bloklama cihazı kullanılarak parafin bloklar içerisine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan Leica HistoCore MULTICUT marka mikrotom cihazı ile 7 ve 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitlerden 7 µm kalınlığında olanlara hematoksilin-eozin (H-E), cresyl violet ve luxol fast blue histokimyasal boyamalar uygulandı. İmmünohistokimyasal analizler için polilizin kaplı pozitif yüklü lamlara alınan 4 µm kalınlığındaki kesitlere anti-Cas-3, anti-BDNF, anti-MBP ve anti-NF immünohistokimyasal boyamalar uygulandı.

3.4.2. Mayers’in Hematoksilen & Eozin Yöntemi

Mayers’in Hematoksilen ve Eozin boyama yöntemi, doku kesitlerinin histolojik değerlendirilmesinde kullanılmak üzere, Tablo 3.1’de belirtilen prosedür doğrultusunda uygulanmıştır.

Tablo 3.1. Mayers'in Hematoksilen&Eozin Prosedürü

Adım No	İşlem Açıklaması
1	Kesitler 65 C'de etüvde 1 saat bekletildi.
2	5 dk 3'er defa ksilende bekletildi.
3	Absolüt etanolde 3 dk bekletildi.
4	%96'lık etanolde 3 dk bekletildi.
5	%80'lik etanolde 3 dk bekletildi.
6	%70'lik etanolde 3 dk bekletildi.
7	1 dk distile suda bekletildi.
8	Mayers'in Hematoksilende 12 dk bekletildi.
9	Çeşme suyunda 3 defa 5 dk yıkandı.
10	Eozinde 5 dk bekletildi.
11	%70 etanolde 3dk bekletildi.
12	%80 etanolde 3dk bekletildi.
13	Absolüt etanolde 3dk bekletildi.
14	3 ksilen serisinde 5'er dakika bekletilerek boyama işlemi tamamlandı.

3.4.3. Cresyl Violet Yöntemi

Cresyl violet boyama yöntemi, doku kesitlerinin histolojik değerlendirilmesinde kullanılmak üzere, çözeltiler Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Cresyl Violet çözeltilerinin hazırlanması

Çözelti Adı	İçeriği
%2 Cresyl Violet Stok Solüsyonu	- 2 g cresyl violet - 100 mL distile su
Sodyum Asetat Tamponu	- 2 g sodyum asetat - 1000 mL distile su - 3 mL Asetik asit

Cresyl Violet (Echt) Boyama Solüsyonu	- 1 mL %2 cresyl violet stok solüsyonu - 100 mL sodyum asetat tamponu
--	--

Cresyl violet boyama yöntemi, doku kesitlerinin histolojik değerlendirilmesinde kullanılmak üzere, prosedür Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Cresyl Violet boyama prosedürü

Adım No	İşlem Açıklaması
1	Kesitler parafinden arındırılır.
2	Kesitler 2 saat boyunca absolüt etil alkolde bekletilir.
3	Preparatlar 40–60 dakika boyunca cresyl violet (echt) boyama solüsyonunda inkübe edilir.
4	%95'lik etil alkol ile yıkama yapılır.
5	Etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon gerçekleştirilir.
6	Ksilen serilerinden geçirilerek şeffaflaştırma sağlanır.
7	Preparatlar entellan ile kapatılır.

3.4.4. Luxol Fast Blue Yöntemi

Luxol fast blue boyama yöntemi, doku kesitlerinin histolojik değerlendirilmesinde kullanılmak üzere, çözeltiler Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Luxol fast blue çözeltilerinin hazırlanması

Çözelti Adı	İçeriği
%0.1 Luxol Fast Blue Solüsyonu	- 0.1 g Luxol fast blue - 100 ml %95 etil alkol
%0.1 Cresyl Echt Solüsyonu	-0.1 g cresyl violet -100 ml distile su
%0.05 Lityum Karbonat	- 0.05 g lityum karbonat - 100 ml distile su

Luxol fast blue boyama yöntemi, doku kesitlerinin histolojik değerlendirilmesinde kullanılmak üzere, prosedür Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Luxol fast blue boyama prosedürü

Adım No	İşlem Açıklaması
1	Kesitler parafinden arındırıldı.
2	Lamlar 1 gece 56°C etüvde LFB solüsyonuna bekletildi.
3	%95 etil alkol ile yıkandı.
4	Distile su ile yıkandı.
5	30 sn lityum karbonatta bekletildi.

6	%70'lik etil alkolde berraklaşana kadar bekletildi.
7	Farklılaşma başladığında distile su ile yıkandı.
8	6 dk cresyl echt solüsyonunda bekletildi.
9	2 kez %95'lik etil alkol ile yıkandı.
10	2x2 dk absolü etil alkol ile yıkandı.
11	2x2 dk ksilenden geçirildi.
12	Entellan ile kapatıldı.

3.4.5. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

İmmünohistokimyasal analizler için, formalin ile fıkse edilen beyin dokularından 4 µm kalınlığında kesitler alınmış ve BDNF, MBP, NF ve Casp-3 antikorları kullanılarak boyama işlemi gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. İmmünohistokimya boyama prosedürü

Adım No	İşlem
1	Deparafinizasyon
2	Antijenik bölgelerin belirginleştirilmesi amacıyla lamlar sitrat tamponu (pH 6.0) içinde 2100 Retriever marka otoklav cihazında 121°C'de 15 dakika süreyle kaynatılarak antijen geri kazanım (retrieval) işlemi uygulandı. Lamlar soğumaya bırakıldı.
3	Lamlar distile su ve fosfat tamponlu saline (PBS) ile yıkandı.
4	PBS'ten çıkarılan lamların etrafı hidrofobik kalem ile çizilerek platforma dizildi.
5	Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe ederek antikor kaynaklı yanlış pozitifliklerin önlenmesi amacıyla, hidrojen peroksit damlatılarak 10 dk bekletildi.
6	PBS ile yıkanan lamlara protein blok damlatıldı ve 5 dakika bekletildikten sonra uzaklaştırıldı. Lamlar PBS solüsyonunda yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi.
7	Üretici firma tarafından sağlanan protokole göre dilüe edilen primer antikor, doku kesitleri üzerine damlatılarak ve yaklaşık 1.5 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda lamlar PBS ile yıkanarak bir sonraki aşamaya geçildi.
8	Sekonder antikor, doku kesitleri üzerine damlatılarak 15 dakika süreyle inkübe edildi ve lamlar PBS ile yıkandı.
9	AEC kromojen uygulaması, peroksidaz enziminin varlığında kırmızı renkli bir reaksiyon ürünü oluşturarak hedef antijenin görselleştirilmesini sağlar. Kromojen damlatıldıktan sonra gerekli inkübasyon süresi sonunda lamlar PBS'e alınarak yıkandı.

10	PBS'ten alınan lamlar hematoksilen solüsyonunda 5 dakika süreyle bekletildi ve önce çeşme suyu altında, ardından distile suda 2 dakika süreyle yıkandı. Lamlar su bazlı kapatıcı ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda görüntülemeye hazır hale getirildi.
-----------	--

İlgili antikörler, üretici firma tarafından sağlanan protokollerde belirtilen oranlarda antikör diluenti ile seyreltilerek uygulanmıştır (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Antikörler ve dilüsyon oranları

Primer Antikör	Marka	Dilüsyon Oranı
BDNF	Elabscience (E-AB-18244)	1:75
MBP	Elabscience (E-AB-60400)	1:75
Caspase-3	Santa Cruz	1:100
Nörofilament	Thermo Fisher Scientific	Kullanıma hazır formda

3.5. Histolojik Değerlendirmeler

3.5.1. Histopatolojik Değerlendirme

İncelenen H-E ile boyanan beyin kesitlerinde korteks alanlarında nörogial infiltrasyon (0 = yok, 1 = nadir/minimal düzeyde, 2 = şiddet/yaygınlık orta derecede, 3 = yaygın/şiddetli), nöronal hasar ve dejeneratif değişiklikler (sitoplazmik eozinofili artışı ve yoğunlaşma, intrasitoplazmik ödem ve vakuolizasyon, nükleus kromatin yoğunlaşması-piknoz, eksantrik nükleus yerleşimi) x20 objektif büyütme alanında değerlendirildi (yok = 0, 1-5 nöron = 1, 6-10 nöron = 2, 11- > nöron =3) ve perivasküler ödem (yok = 0, minimal = 1, orta derece =2, şiddetli = 3) bulguları skorlaması yapıldı (Maksimum total skor 9).

3.5.2. Cresyl Violet Değerlendirmesi

Cresyl violet ile boyanan kesitlerde korteks ve hipokampus alanlarında nöron sitoplazmasındaki Nissl cisimciklerinin yoğunluğu X10 ve X40 objektif büyütme ile değerlendirildi (kromatolizis yok = 0, minimal kromatolizis = 1, orta derecede kromatolizis = 2, total chromatolysis = 3) değerlendirildi.

3.5.3. Luxol Fast Blue Değerlendirmesi

Luxol fast blue ile boyanan kesitlerde Substantia alba alanlarında pozitif boyanma yoğunluğu değerlendirildi. (boyanma yok = 0, minimal yoğunlukta ve

granüler boyanma = 1, orta yoğunlukta ve granüler/fibriler boyanma = 2, yoğun ve fibriler = 3) değerlendirildi.

3.5.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimyasal boyama yapılan beyin dokusundaki Cas-3, BDNF, antikorları için pozitif immünoreaktivite derecesi H-skor yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu semi-kantitatif immünohistokimyasal skorumda H-skoru = $P_i (i + 1)$ formülü ile hesaplanarak elde edildi. Bu formülde Pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi, ağırlıklı boyama yoğunluğu ile çarpılır: H-skoru = $P_i (i + 1)$, burada P_i her yoğunluk grubundaki (%0-100) boyanmış hücrelerin yüzdesidir. Spesifik boyanma yoğunluğu şu şekilde belirlenmiştir: yok (0), zayıf ancak tespit edilebilir (1), belirgin (2) ve çok güçlü (3). MBP ve NF antikorları için pozitif immünoreaktivite H-skoru yöntemi modifiye edilerek tüm görüntü alanında pozitif boyanma izlenen alanların yüzdesi ağırlıklı boyanma yoğunluğu ile çarpılarak H-skoru hesaplanmıştır.

3.6. Biyokimyasal Analiz Yöntemleri ve Değerlendirilmeleri

-80°C'deki saklama koşulunda bekletilen beyin dokuları çözünmeleri beklenmeden hızlı bir şekilde tartıldı. Her bir doku örneğine, kendi ağırlığının 9 katı hacminde fosfat tamponu ilave edilerek +4 °C'de 15000 rpm'de 1 dakika süreyle homojenizasyon işlemi uygulandı (IKA, Almanya). Elde edilen homojenatlardan malondialdehit (MDA) düzeyleri analiz edildi. Ardından, homojenatlar 4000 rpm'de, +4 °C'de 23 dakika santrifüj edilerek süpernatant faz ayrıldı. Bu süpernatant örnekleri kullanılarak Glutatyon (GSH), Total Oksidan Kapasite (TOS), Total Antioksidan Kapasite (TAS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI) düzeyleri ölçüldü.

3.6.1. MDA Tayini

Doku homojenatlarından 0.25 mL örnek, 1.5 mL %1 $H_3 PO_4$ ve 0.5 mL %0.6 tiyobarbitürik asit (TBA) ile karıştırıldı. TBA'nın tamamen çözünmesini sağlamak için karışım 30 °C'de ön ısıtmaya tabi tutuldu. Ardından, numuneler 100 °C'de 40 dakika inkübe edildi. Reaksiyon sonunda oluşan kırmızı renkli komplekslerin sabitlenmesi için tüpler çeşme suyunda soğutuldu ve her birine 2 mL n-bütanol eklendi. Karışımlar 5 dakika boyunca vortexlenerek homojenize edildi. Takiben 25 °C'de 4500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek üst fazdaki n-bütanol ekstraktı ayrıldı. Bu fazdan 250 µL alınarak kuvars mikropalak kuyucuklarına transfer edildi ve absorbans değerleri 535 nm

dalga boyunda okundu. Kontrol olarak yalnızca n-bütanol, standart eğri için ise tetraetoksipropan kullanıldı. Bulgular nanomol/gram yaş doku cinsinden raporlandı (63).

3.6.2. Redükte GSH Tayini

GSH düzeylerinin belirlenmesi için süpernatant örnekleri trikarboksilik asit (TCA) ile proteinlerden arındırıldı. Bunun için 125 µL süpernatanta 125 µL TCA ilave edilerek vortexlendi ve +4 °C’de 4500 rpm’de 25 dakika santrifüj edildi. Elde edilen berrak süpernatanttan 29 µL alınarak mikropalak kuyucuklarına yerleştirildi. Her kuyucuğa ayrıca 29 µL DTNB ve 235 µL Na₂ HPO₄ eklendi. Hafifçe karıştırılan karışımlar 5 dakika bekletildikten sonra 410 nm dalga boyunda absorbens değerleri ölçüldü. Sonuçlar nanomol/gram yaş doku olarak hesaplandı (64).

3.6.3. TAS Tayini

Toplam antioksidan kapasitenin tayininde Rel Assay Diagnostics (Gaziantep, Türkiye) tarafından üretilen TAS kiti kullanıldı. Ölçümler, antioksidanların kromojenik substratı renksizleştirme prensibine dayandırıldı. Cihaz, 37 °C sıcaklıkta, 7 saniye karıştırma, 23 saniye bekleme ve 660 nm’de okuma yapacak şekilde ayarlandı. Her kuyucuğa 12 µL numune, kontrol ve standart örnekler üçer tekrar halinde yerleştirildi. Sonrasında 200 µL Reaktif 1 eklenerek 1. ölçüm gerçekleştirildi. Ardından 30 µL Reaktif 2 ilave edilerek cihaz 37 °C’de 10 saniye karıştırma ve 4.30 dakika bekleme ardından ikinci ölçüm yapıldı. Sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L olarak ifade edildi (65).

3.6.4. TOS Tayini

Total oksidan kapasite tayini için Rel Assay Diagnostics (Gaziantep, Türkiye) TOS kiti kullanıldı. Numunedeki oksidan bileşiklerin ferroz iyon-şelatör komplekslerini ferrik iyonlara oksitlemesi sonucu ferrik iyonların kromojenik reaktifle renkli kompleks oluşturması esasına dayanan bu yöntem, 25 °C’ye ayarlanmış spektrofotometrede 530 nm’de absorbens ölçümüyle gerçekleştirildi. Hesaplamalar kit talimatlarına göre yapıldı ve sonuçlar µmol H₂ O₂ eşdeğeri/L cinsinden raporlandı (66).

3.7. İstatistiksel Yöntem

Sayısal verilerin özetlenmesinde medyan ve çeyrekler arası genişlik kullanıldı. İkiiden fazla bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi ve sonrasında ikili karşılaştırmalarda Conover yöntemi uygulandı. Tablolarda farklılık bulunan grupların gösteriminde APA (American Psychological Association) stiline göre üst indis kullanıldı. Tüm analizlerde iki-yönlü anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.



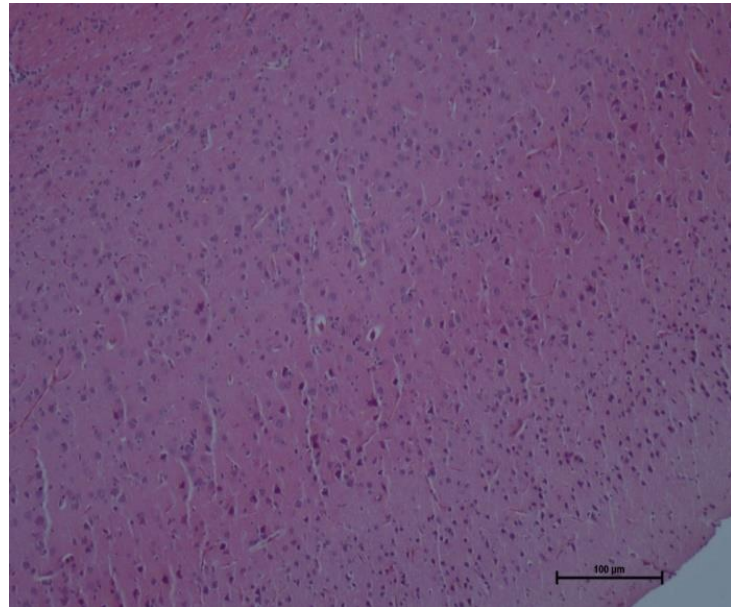
4. BULGULAR

Bu çalışmada, dört farklı deney grubu (K, BPA, TQ ve BPA+TQ) arasında gerçekleştirilen histolojik ve biyokimyasal analizler doğrultusunda; BPA'nın potansiyel nörotoksik etkileri, TQ'nun olası koruyucu özellikleri ve birlikte uygulandıklarında TQ'nun BPA kaynaklı hasarlar üzerindeki koruyucu ve iyileştirici etkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.1.1. K Grubu

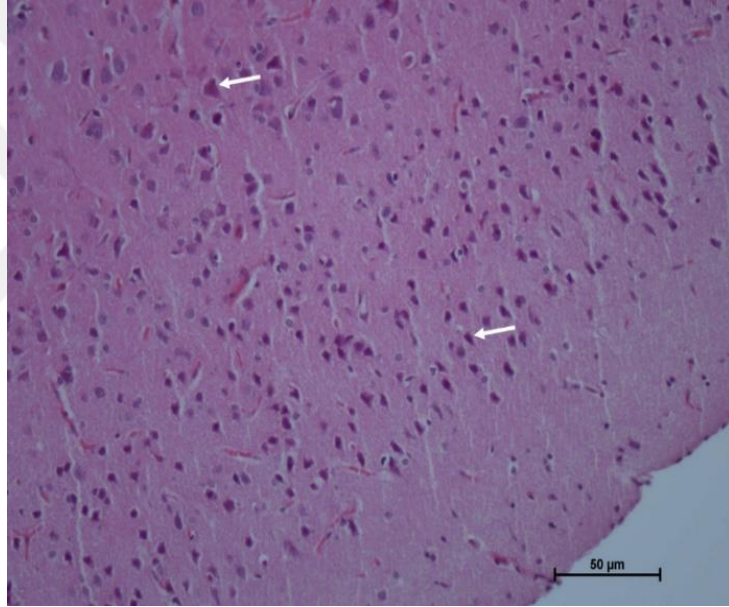
H-E ile boyanmış kontrol grubu sıçan beyin dokusu kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, dıştan pia mater bağ dokusu ile örtülü olarak izlendi. İncelenen kesitlerde beyin korteksi izokorteks alanları 6 laminanın (L. Molekularis, L. Granularis eksterna, L. Piramidalis eksterna, L. Granularis interna, L. Piramidalis interna, L. Multiformes), allokorteks alanları 3 laminanın (L. Molekölare, L. Granularis, L. Piramidalis) ayırt edilebileceği sitoarkitektürde olup normal histolojik görünümde değerlendirildi (Şekil 4.1).



K grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi. X10, H&E.

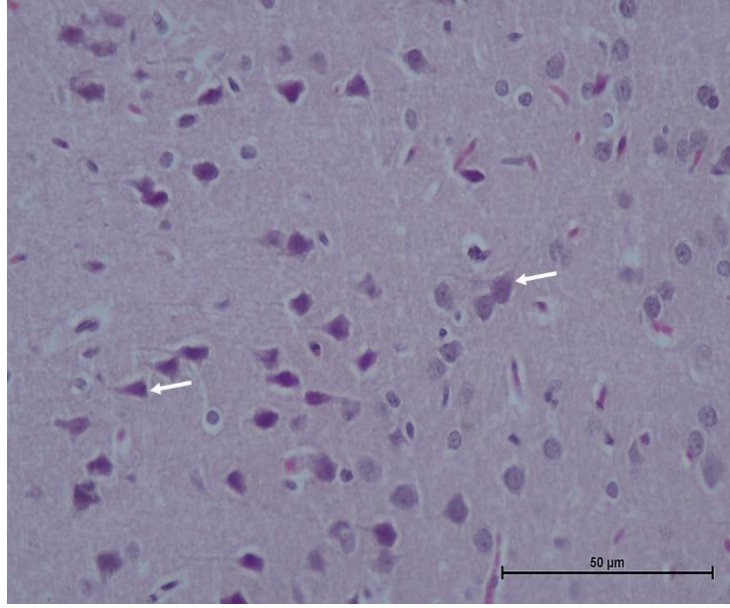
Şekil 4.1. K grubu genel histopatolojik değerlendirme.

Korteks tabakaları arası sınırlar net olmasa da nöronal dağılım ve hücre morfolojileri ile ayırt edilebilen bir düzen gözlenmiştir. Lamina molekularis (I. tabaka) hücre açısından en fakir; lamina piramidalis (III. ve V. tabakalar) ise büyük piramidal nöronların bulunduğu tabakalar olarak izlendi. Tüm korteks alanlarında nöronal perikaryon ve glial hücre yoğunluğu olağan görünümde değerlendirildi. Korteks içerisinde piramidal, granüler ve fuziform şekilli nöronlar olmak üzere farklı nöron tipleri ayırt edilebiliyordu. Piramidal nöronlar dışındaki nöron nükleusları yuvarlak oval şekilli, belirgin nükleusu içeren, ökromatik ve nükleus konturları düzgün görünümündü. Piramidal nöronların sitoplazmaları diğer nöronlara göre daha yoğun eozinofilik, nükleusları ise daha heterokromatin görünümde olup normal histolojik görünümde değerlendirildi (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).



K grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi, piramidal nöron (ok) X20, H-E.

Şekil 4.2. K grubu beyin korteksi nöronların histopatolojik değerlendirmesi.

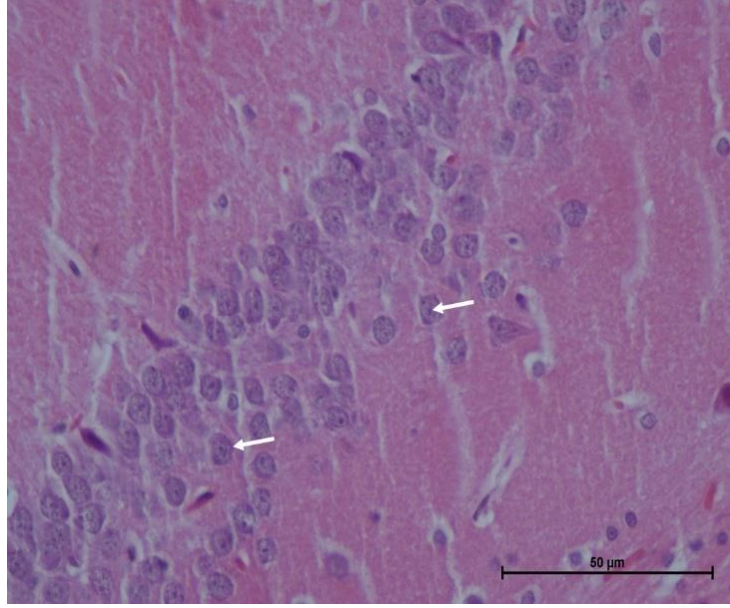


K grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi, piramidal nöron (ok) X40, H-E. K grubu.

Şekil 4.3. K grubu beyin korteksi nöronların histopatolojik değerlendirmesi.

Beyin korteks alanları içerisinde izlenen kapıllar ve diğer vasküler yapılar merkezi sinir sistemi vasküler yapısı ile uyumlu olarak normal histolojik yapıda izlendi. Beyin korteks dokusunda izlenen glia hücreleri (astrositler, oligodendrositler ve mikroglialar) olağan morfoloji ve yoğunlukta değerlendirildi. Glia hücre nükleusları, nöron nükleuslarına göre daha küçük heterokromatik ve uniform görünüme sahipti. Kortikal tabakaların nöropil doku alanları homojen ve olağan yoğunlukta olup belirgin heterojenite, boşluk veya ekstraselüler materyal birikimi gözlenmedi.

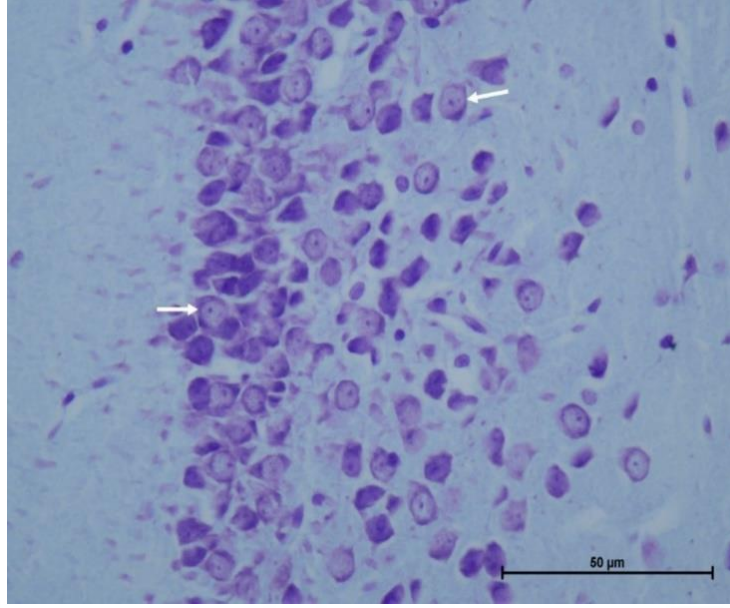
Hipokampus alanlarında izlenen nöronların sitoplazmaları olağan eozinofilik yoğunlukta ve ince bazofilik granülasyon içeren yapıda izlendi (Şekil 4.4). Nükleusları ökromatik, nükleolusları belirgin, oval-dairesel şekilli, konturları düzgün izlenmekte olup normal histolojik görünümde değerlendirildi. Nöronal doku ve glial doku alanları ve hücreleri normal histolojik yapı ve yoğunlukta değerlendirildi.



K grubu. Normal histolojik görünümde beyin hipokampus, nöron nükleusu (ok). X40, H-E.

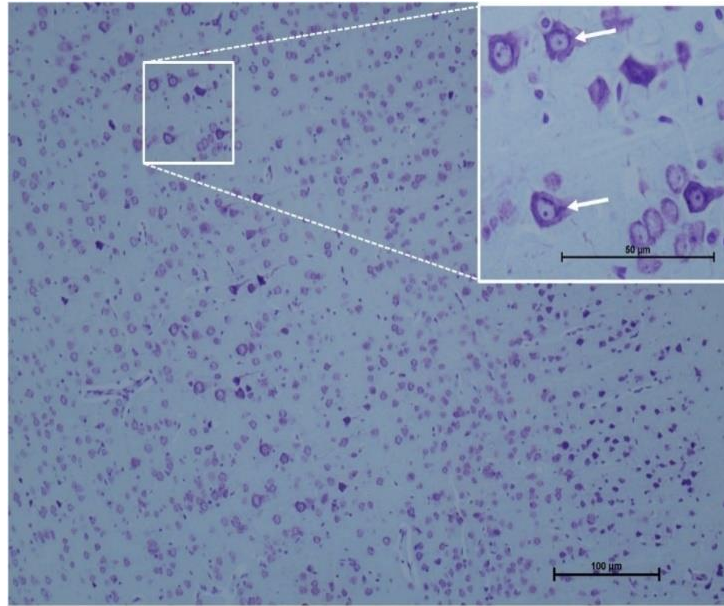
Şekil 4.4. K grubu beyin hipokampusün histopatolojik değerlendirmesi.

Kontrol grubuna ait cresyl violet ile boyanmış beyin dokusu kesitlerinde, korteks tabakaları ve hipokampus alanlarındaki nöronlarda nükleusların ökromatik, nükleolusların ise belirgin ve koyu boyanma gösterdiği saptandı. Nöronal sitoplazmada belirgin bazofilik granüller şeklinde izlenen Nissl cisimcikleri, nöronal metabolik aktivitenin sürdüğüne işaret etmekte olup, histolojik olarak normal yapıda değerlendirildi (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Kontrol grubu, cresyl violet histokimyasal boyanma skoru açısından 3 puan ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.2).



K grubu. Normal histolojik görünümde beyin hipokampus, cresyl violet yoğun pozitif boyanma gösteren nöronlar (ok) X40, cresyl violet.

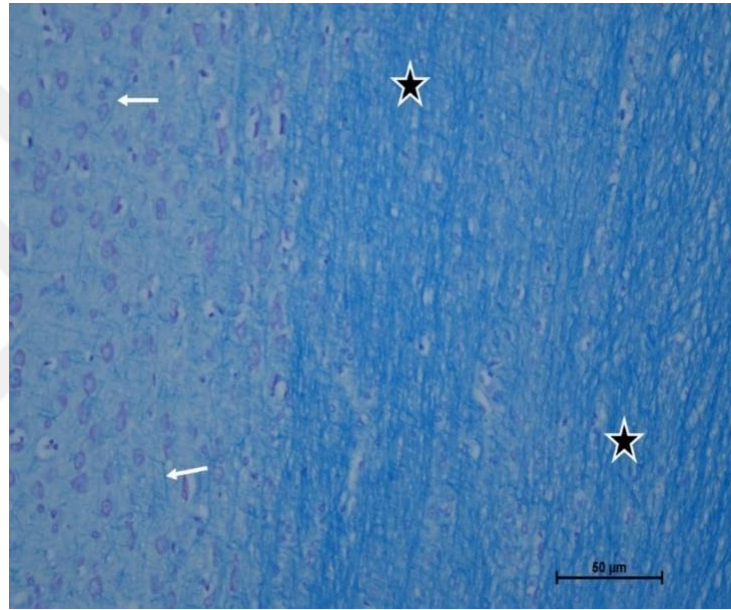
Şekil 4.5. K grubu beyin hipokampusün Cresyl violet ile değerlendirilmesi.



Normal histolojik görünümde beyin korteksi, cresyl violet yoğun pozitif boyanma gösteren nöronlar (ok), X10, X40, cresyl violet.

Şekil 4.6. K grubu beyin hipokampusdeki nöronların cresyl violet ile değerlendirilmesi.

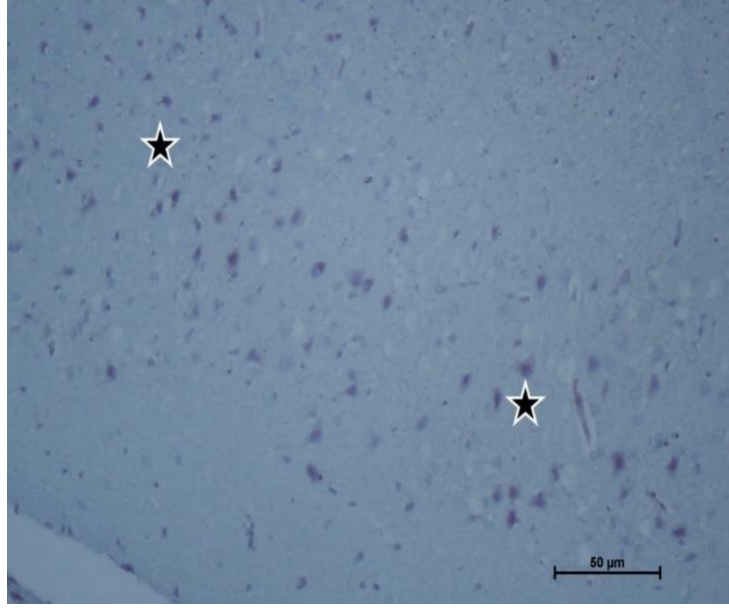
Kontrol (Şekil 4.7) grubunda luxol fast blue ile boyanmış beyin kesitlerinde benzer olarak miyelinli sinir lifleri kompakt mavi renkte ve fibriler yapıda gözlemlendi. Beyin gri cevher alanlarında pozitif boyanmış miyelinli sinir lifleri fibriler ağsı yapıda, beyaz cevher alanlarında ise düzenli seyirli fibriler demetler halinde görüldü. Ayrıca nöronal perikaryonlarda mor renkte granüler boyanma belirgin olarak izlendi. Nöron nükleusları ökromatik, nükleoluslar koyu boyanmış ve belirgin olarak izlendi. Beyin gri cevher ve beyaz cevher alanlarında miyelinli sinir lifleri normal histolojik ve histokimyasal yapıda değerlendirildi. Kontrol grubu Luxol fast blue histokimyasal boyanma skoru 3 olarak belirlendi (Tablo 4.2).



K grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi substantia grizea (ok) ve beyaz cevher alanlarında luxol fast blue pozitif boyanma gösteren, fibriler yapıda sinir lifleri (yıldız). X40.

Şekil 4.7. K grubu LFB ile değerlendirilmesi.

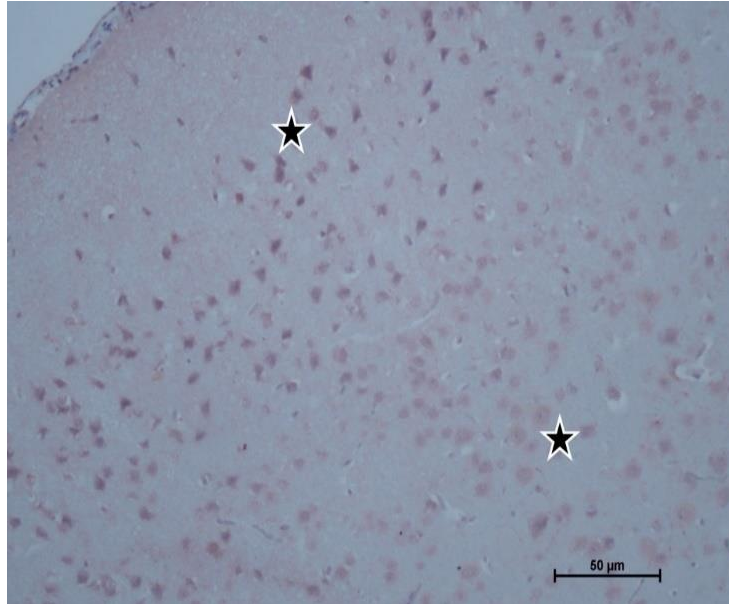
Kontrol (Şekil 4.8) grubunda anti Cas-3 immünohistokimyasal boyama yapılan beyin kesitlerinde korteks alanlarında Cas-3 immünreaktivite pozitifliği saptanmadı. Anti Cas-3 immünreaktivite H skoru kontrol grubunda 1 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



K grubu. Caspase-3 immünreaktivesi izlenmeyen beyin korteksi (yıldız). X20, İHK, Caspase-3.

Şekil 4.8. K grubu Cas-3 immünreaktivite ile değerlendirme.

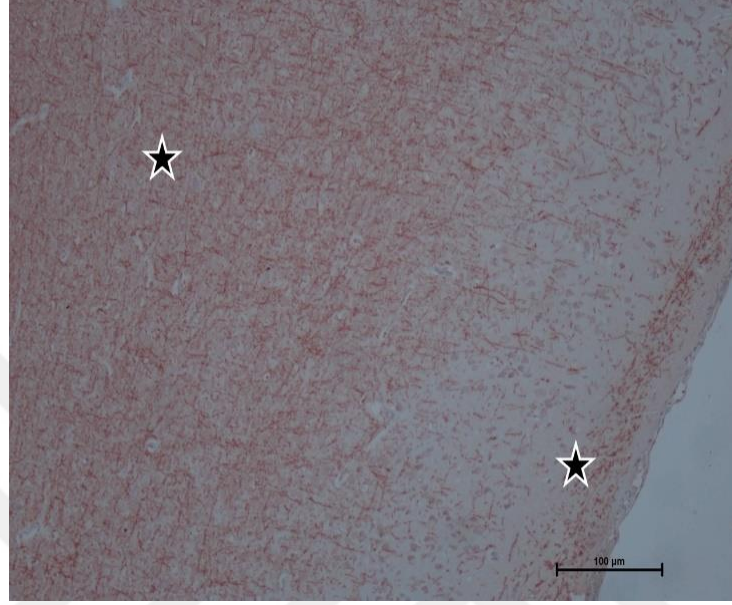
Kontrol anti-BDNF immünohistokimyasal boyama yapılan beyin kesitlerinde korteks alanlarındaki nöronlarda ve nöropil dokusunda immünreaktivite pozitifliği izlendi (Şekil 4.9). Anti BDNF immünreaktivite H skoru kontrol grubunda 160 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



Kontrol grubu. BDNF immünreaktivesi pozitif izlenen beyin korteksi (yıldız). X20, İHK, BDNF.

Şekil 4.9. K grubu BDNF immünreaktivite ile değerlendirme.

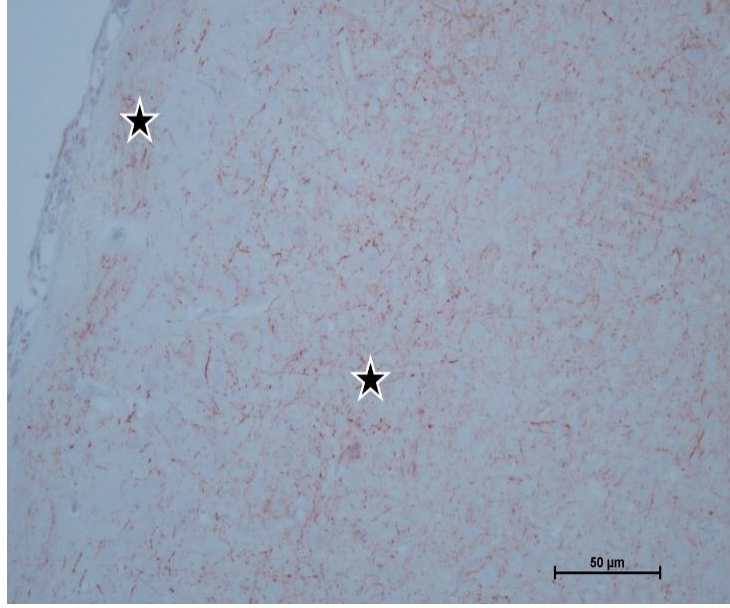
Kontrol (Şekil 4.10) grubunda Anti-MBP immünohistokimyasal boyama yapılan beyin kesitlerinde korteks alanlarında diffüz, kuvvetli immünreaktivite pozitifliği izlendi. Anti-MBP immünreaktivite H skoru kontrol grubunda 240 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



Kontrol grubu. MBP immünreaktivesi pozitif izlenen beyin korteksi (yıldız). X20, İHK, MBP.

Şekil 4.10. K grubu MBP immünreaktivite ile değerlendirme.

Kontrol (Şekil 4.11) grubunda Anti-NF immünohistokimyasal boyama yapılan beyin kesitlerinde korteks alanlarındaki immünreaktivite pozitifliği izlendi. Anti-NF immünreaktivite H skoru kontrol grubunda 120 olarak belirlendi (Tablo 4).

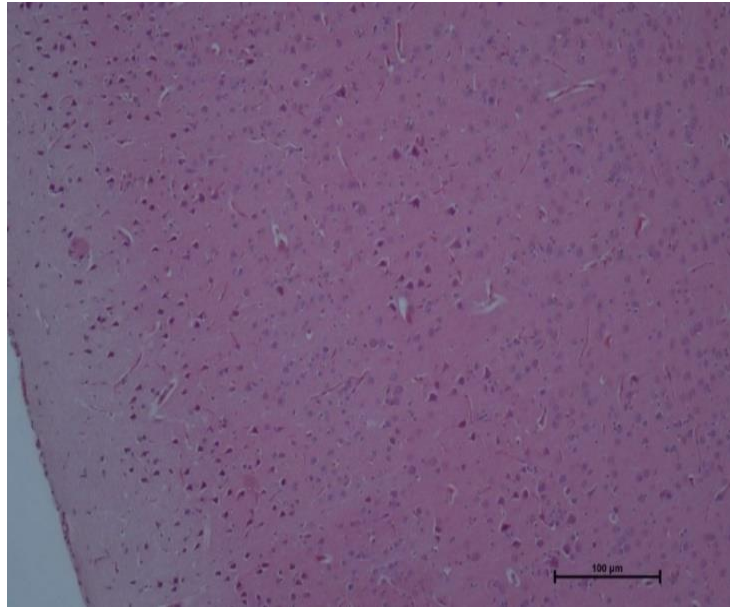


Kontrol grubu. NF immünreaktivesi pozitif izlenen beyin korteksi (yıldız). X20, İHK, NF.

Şekil 4.11. K grubu NF immünreaktivite ile değerlendirme.

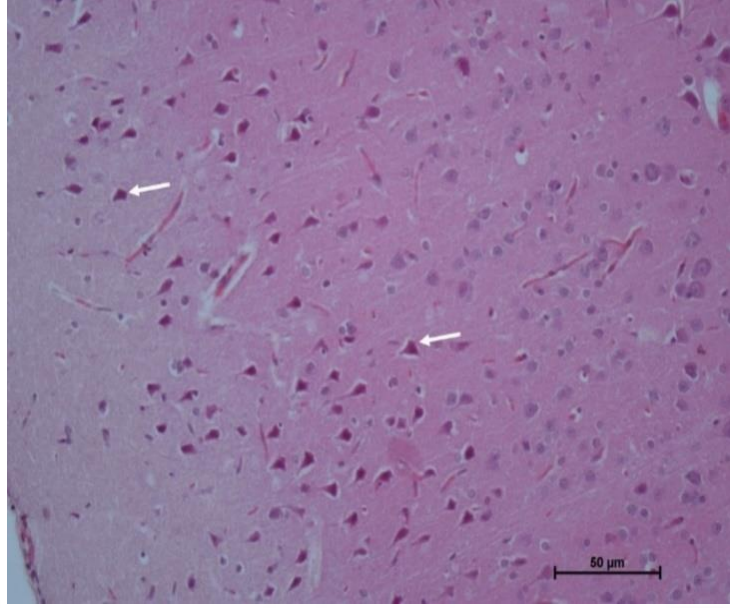
4.1.2. TQ Grubu

TQ grubuna ait H-E ile boyanmış beyin dokusu kesitlerinde, K grubuna benzer şekilde kortikal tabakalaşma, nöronal ve glial hücre morfolojisi ile dağılımı normal histolojik yapıda izlendi (Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).



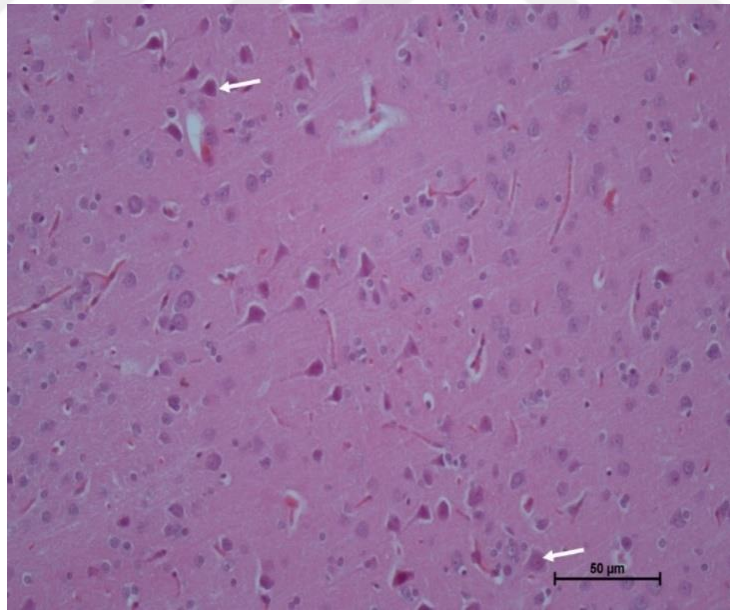
TQ grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi. X10, H-E.

Şekil 4.12. TQ grubu histopatolojik değerlendirme.



TQ grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi, piramidal nöron (ok) X20, H-E.

Şekil 4.13. TQ grubu beyin korteksi histopatolojik değerlendirme.

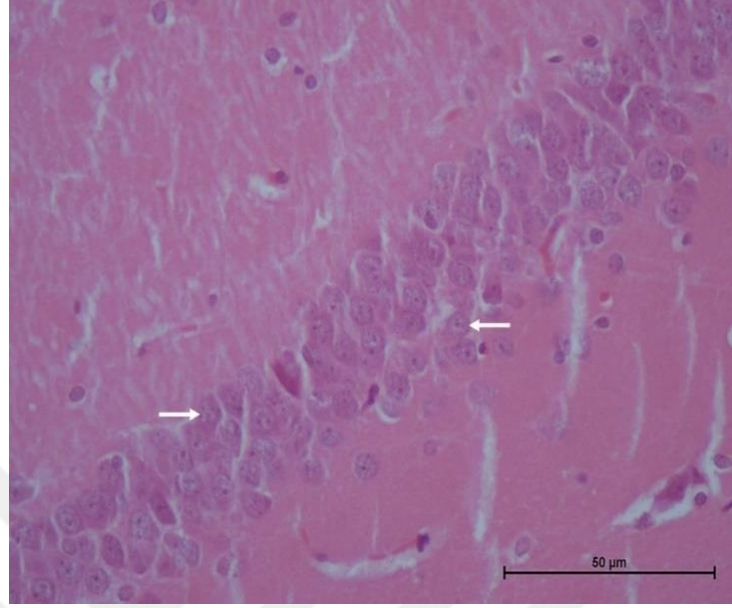


TQ grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi, piramidal nöron (ok) X40, H-E.

Şekil 4.14. TQ grubu korteksinde nöronların histopatolojik değerlendirmesi.

Nöronal perikaryonlar, glial hücreler ve nöropil alanlar normal histolojik görünümde değerlendirildi. Hipokampus bölgesinde sitoplazmik eozinofili ve nükleus

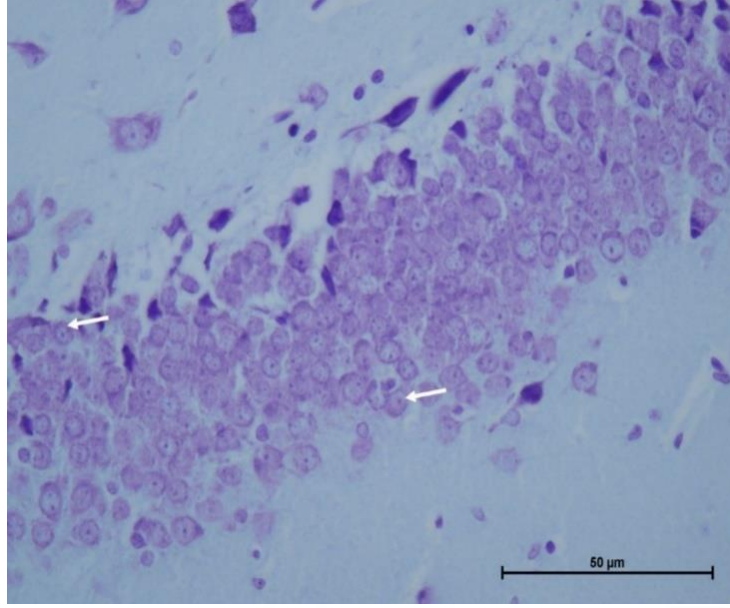
morfolojisi kontrol grubuyla benzer görünümde olup normal histolojik yapıda izlendi (Şekil 4.15).



TQ grubu. Normal histolojik görünümde beyin hipokampus, nöron nükleusu (ok) X40, H-E.

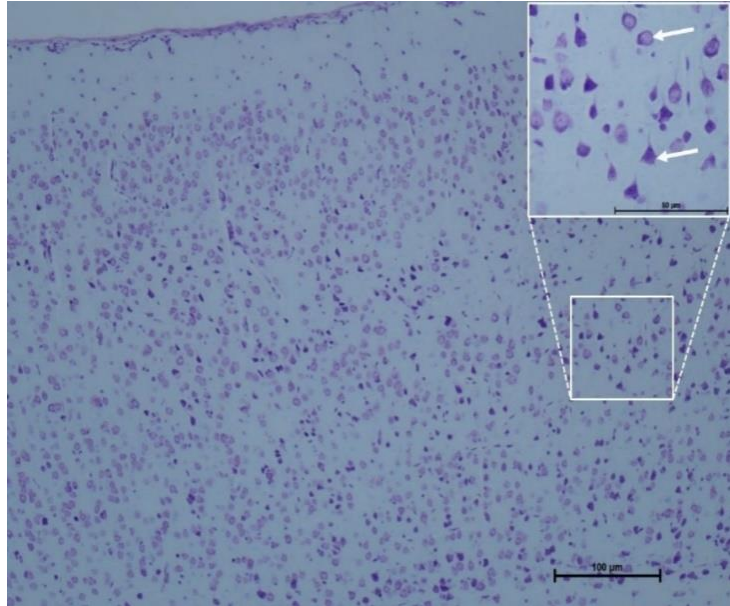
Şekil 4.15. TQ grubu hipokampus bölgesinde histopatolojik değerlendirme.

TQ grubunda cresyl violet ile boyanan beyin kesitlerinde, hipokampus (Şekil 4.16) ve korteks (Şekil 4.17) bölgelerindeki nöronlarda ökromatik nükleus ve belirgin nükleolus yapıları gözlemlendi. Sitoplazmada yer alan Nissl cisimcikleri bazofilik granüller şeklinde belirgin olup, hücresel morfolojinin normal histolojik yapıda olduğu değerlendirildi. Bu gruba ait cresyl violet boyanma skoru 3 olarak belirlendi (Tablo 4.2).



TQ grubu. Normal histolojik görünümde beyin hipokampus, cresyl violet yoğun pozitif boyanma gösteren nöronlar (ok). X40, cresyl violet.

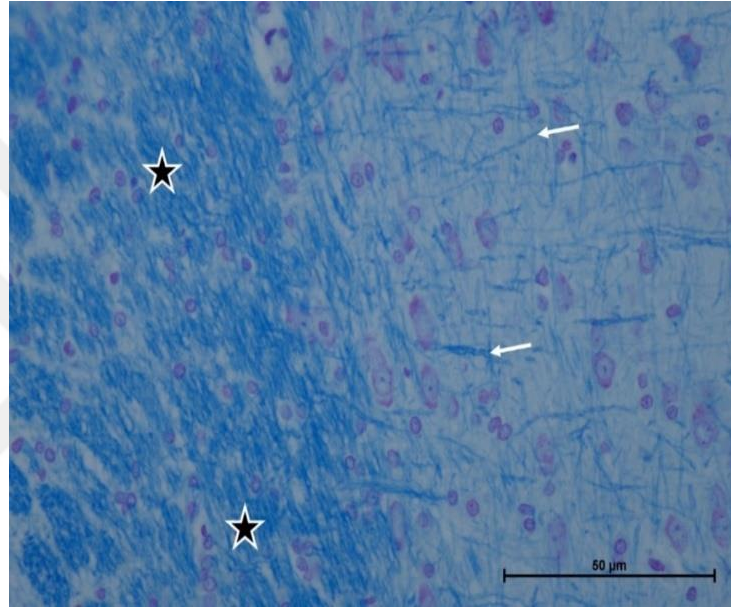
Şekil 4.16. TQ grubu hipokampus bölgesinde cresyl violet ile değerlendirme.



TQ grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi, cresyl violet yoğun pozitif boyanma gösteren nöronlar (ok), X10, X40, cresyl violet.

Şekil 4.17. TQ grubu beyin korteksinde cresyl violet ile değerlendirme.

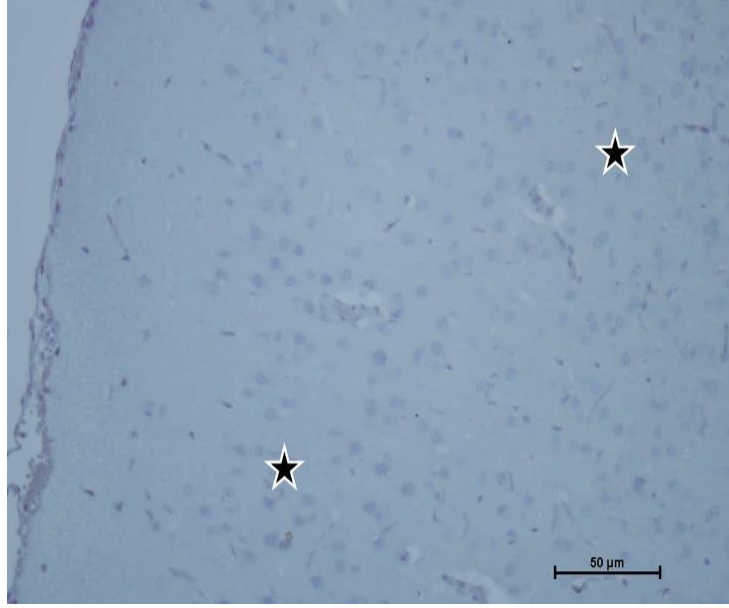
TQ grubunda luxol fast blue ile boyanan beyin kesitlerinde (Şekil 4.18), miyelinli sinir liflerinin kompakt, mavi renkte ve fibriler düzen içinde yer aldığı gözlemlendi. Gri cevherde ağsı, beyaz cevherde ise organize demetler şeklinde dağılım gösterdiği saptandı. Nöron sitoplazmik alanlarında mor renkte granüler boyanma ile birlikte ökromatik nükleus ve belirgin nükleolus yapıları izlendi. Gri ve beyaz cevher alanlarındaki miyelin yapıları, genel olarak normal histolojik görünümde değerlendirildi. Bu gruba ait Luxol fast blue boyanma skoru 3 olarak kaydedildi (Tablo 4.2).



TQ grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi substantia grizea (ok) ve substantia alba alanlarda luxol fast blue pozitif boyanma gösteren, fibriler yapıda sinir lifleri (yıldız). X40, luxol fast blue.

Şekil 4.18. TQ grubu luxol fast blue ile histopatolojik değerlendirme.

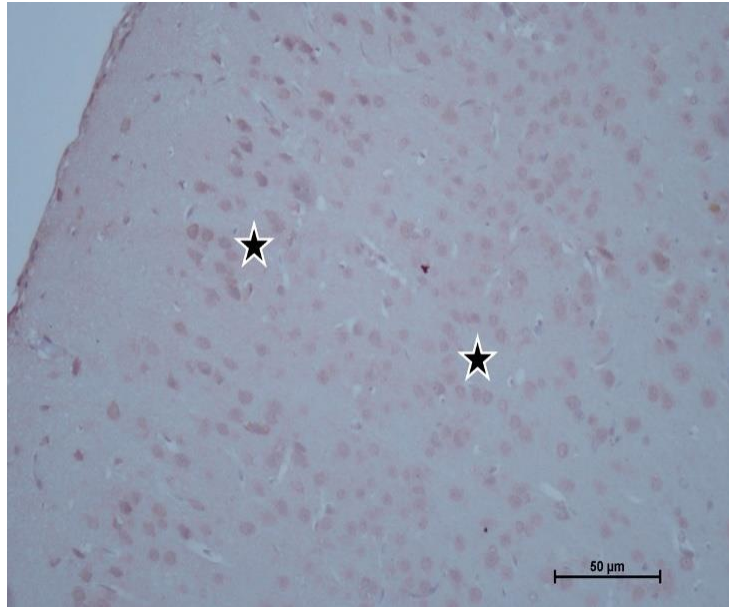
Timokinon grubunda, anti-Cas-3 ile boyanan beyin korteks kesitlerinde pozitif immünreaktivite izlenmedi (Şekil 4.19). Cas-3 immünreaktivite H skoru bu grup için 1 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



TQ grubu. Caspase-3 immünreaktivesi izlenmeyen beyin korteksi (yıldız). X20, İHK, Cas-3.

Şekil 4.19. TQ grubu Cas-3 immünreaktivite ile değerlendirme.

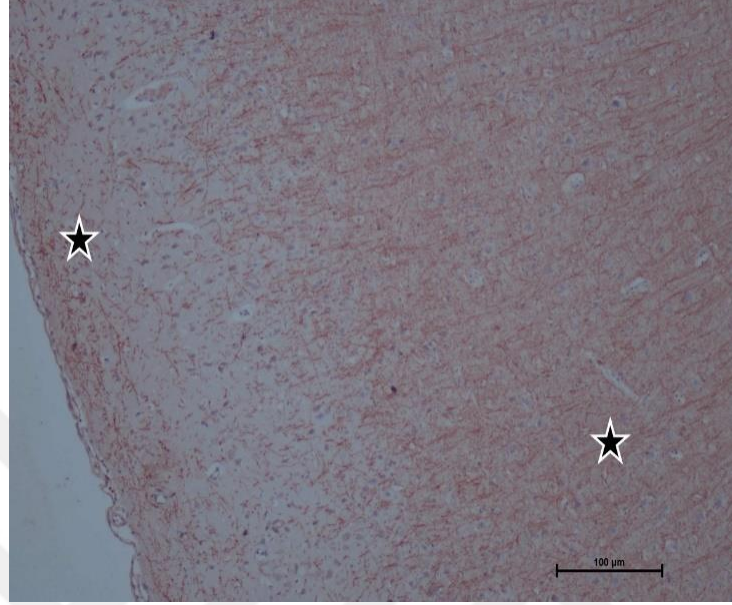
Anti-BDNF ile yapılan boyamada, TQ grubunun korteks bölgesindeki nöronlar ve nöropil dokuda belirgin pozitif immünreaktivite gözlendi (Şekil 4.20). Bu grubun BDNF immünreaktivite H skoru 160 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



TQ grubu. BDNF immünreaktivesi pozitif izlenen beyin korteksi (yıldız). X20, İHK, BDNF

Şekil 4.20.. TQ grubu BDNF immünreaktivite ile değerlendirme.

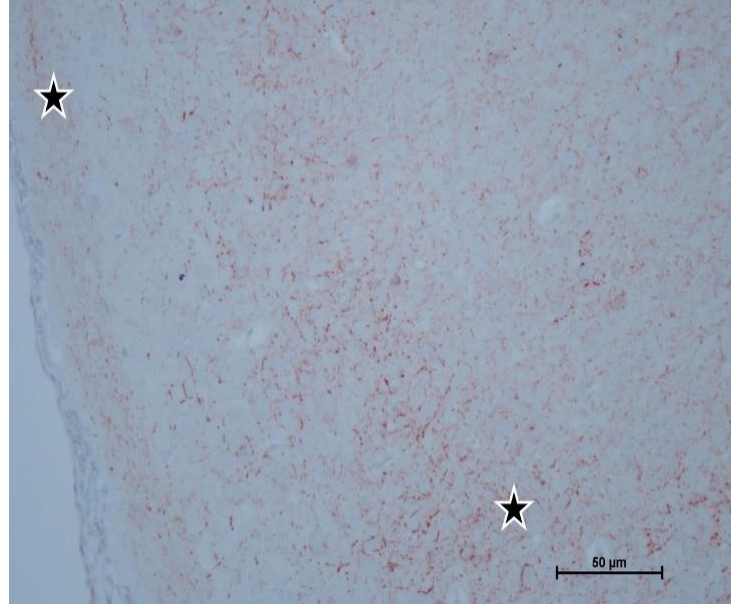
TQ grubunda, anti-MBP immünohistokimyasal boyama yapılan kesitlerde korteks alanlarında yaygın ve yoğun pozitif immünreaktivite tespit edildi (Şekil 4.21). Bu grubun MBP immünreaktivite H skoru 240 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



TQ grubu. MBP immünreaktivesi pozitif izlenen beyin korteksi (yıldız). X20, İHK, MBP.

Şekil 4. 21. TQ grubu MBP immünreaktivite ile değerlendirme.

TQ grubunda, anti-NF immünohistokimya boyama yapılan kesitlerde beyin korteks bölgelerinde immünreaktivite pozitifliği saptandı (Şekil 4.22). Bu gruba ait anti-nörofilament immünreaktivite H skoru ise 120 olarak kaydedildi (Tablo 4.3).

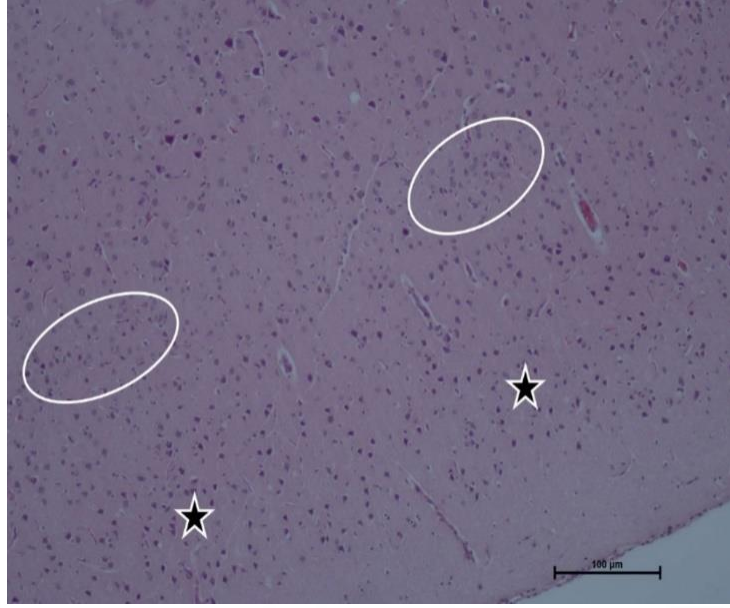


TQ grubu. NF immünreaktitesi pozitif izlenen beyin korteksi (yıldız). X20, İHK, NF.

Şekil 4. 22. TQ grubu NF immünreaktivite ile değerlendirme.

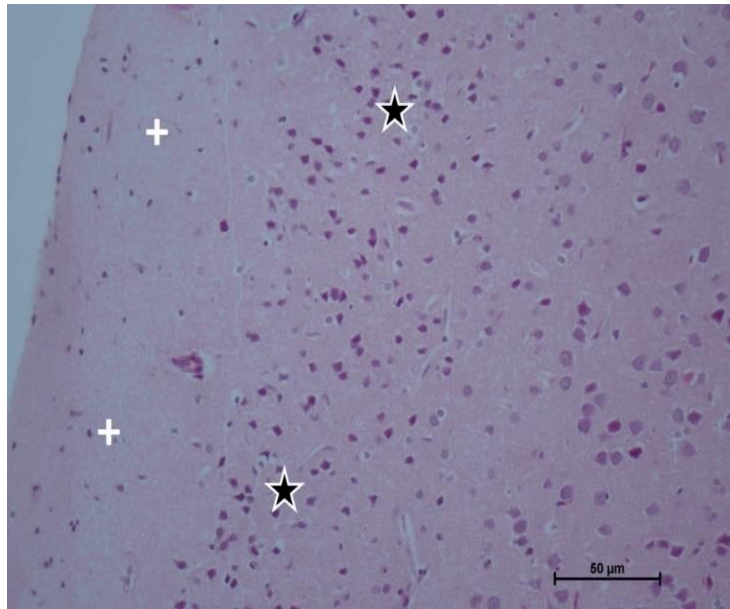
4.1.3. BPA Grubu

BPA grubu sıçanların beyin dokusu kesitlerinde dıştan pia mater ile örtülü korteks sitoarkitektür tabakalanması çoğu alanda normal görünümde izlendi. Ancak bazı korteks alanlarında L. molekularis tabakasının yoğunluğunda azalma, vakuolizasyon ve gevşek ağısı görünüm dikkati çekti. Korteks içerisinde fokal alanlarda yer yer glial hücre infiltrasyonu saptandı. Ayrıca glial hücre nükleuslarının kontrol ve TQ gruplarındakine göre daha heterokromatik boyanmış olduğu dikkati çekti. Başta piramidal nöronlar olmak üzere tüm korteks tabakalarında yerleşik bazı nöronlarda heterokromatik-piknotik nükleus, sitoplazmada eozinofilik yoğunlaşma, düzensiz sitoplazma sınırı, büzüşme ve şekli bozukluğu saptandı. Ayrıca yer yer dejenere nöronlar görüldü. Beyin korteksi içerisinde bazı alanlarda farklı derecelerde perivasküler ödem izlendi (Şekil 4.23, Şekil 4.24 ve Şekil 4.25). Bu gruba ait total histolojik hasar skoru 4 olarak belirlendi (Tablo 4.1).



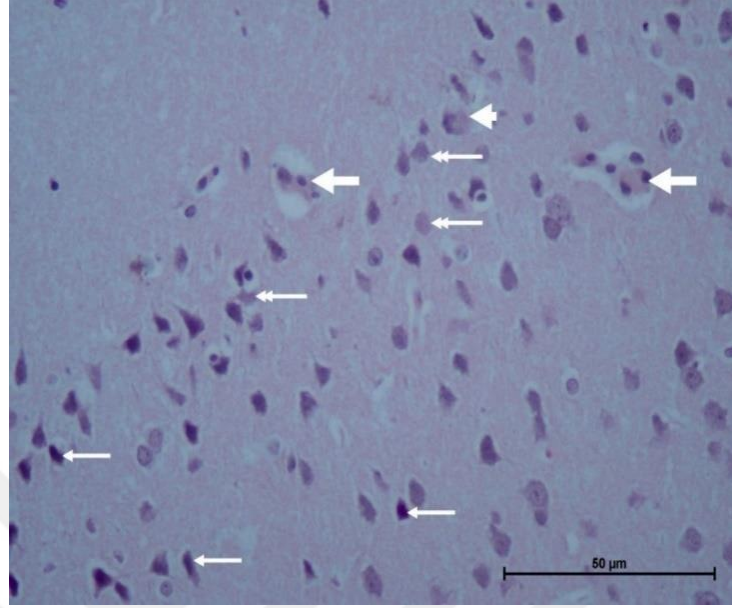
BPA grubu. Beyin korteksi, heterokromatik-piknotik nükleuslu piramidal nöronlar (yıldız), glial hücre infiltrasyonu (elips alanı). X10, H-E.

Şekil 4.23. BPA grubu histopatolojik değerlendirme.



BPA grubu. Beyin korteksi, lamina moleküler tabakası yoğunluğunda azalma ve ağsı görünüm (+), heterokromatik-piknotik nükleuslu piramidal nöronlar (yıldız). X20, H-E.

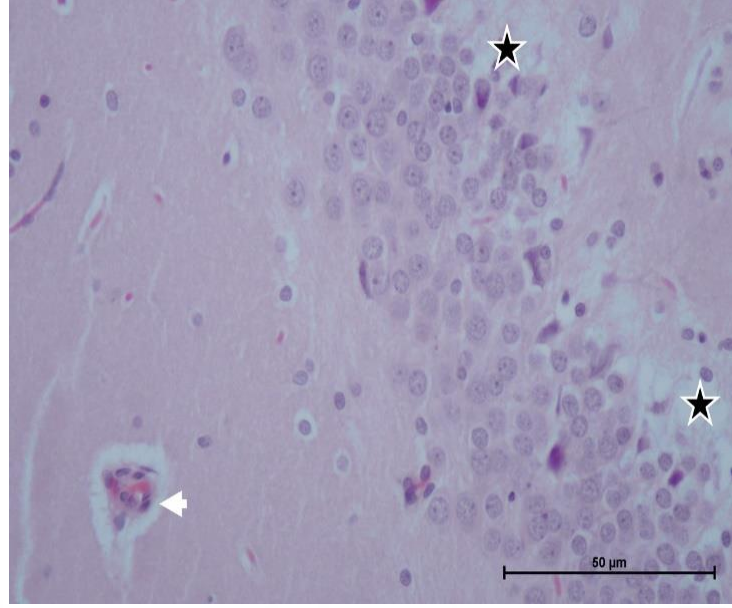
Şekil 4.24. BPA grubu beyin korteksi histopatolojik değerlendirme.



BPA grubu. Beyin korteksi, nöronal dejenerasyon (ok başı), nöronlarda eozinofilik sitoplazma yoğunlaşması ve eksantrik yerleşimli nükleus, perinöronal ödem (kalın ok), nöronlarda karyolizis (çift başlı ok), piramidal nöronlarda heterokromatik-piknotik nükleus ve sitoplazmik yoğunluk artışı (ince ok). X40, H-E.

Şekil 4.25. BPA grubu beyin korteksi nöronların histopatolojik değerlendirme.

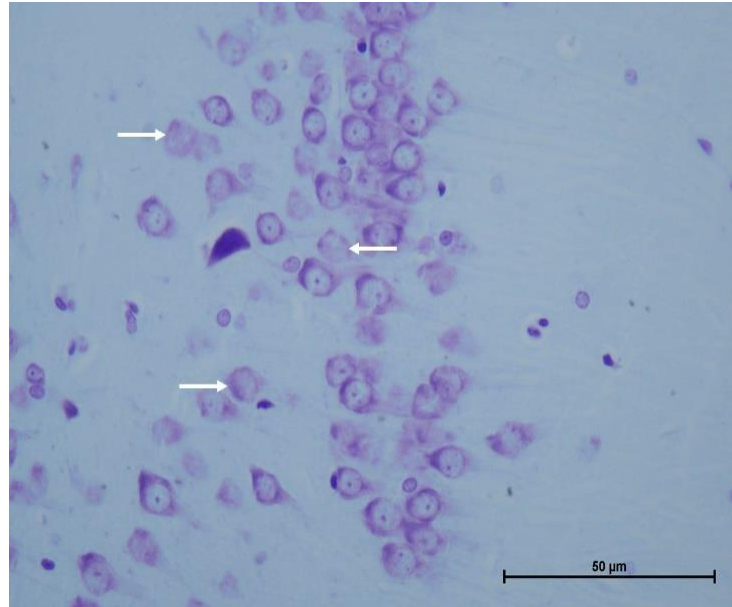
BPA grubuna ait H-E ile boyanan kesitlerde hipokampus alanlarında yerleşik bazı nöronlarda kromatolizis ve karyolizis görünümü dikkati çekti. Perinöronal alanda ödematöz görünüm ve nöropil doku yoğunluğunda azalma izlendi. Ayrıca kesit alanında izlenen vasküler yapılar etrafında perivasküler ödem saptandı (Şekil 4.26).



BPA grubu. Beyin hipokampus, perivasküler ödem (ok başı), perinöronal ödem ve nörofibriler yoğunluğunda azalma (yıldız), X40, H-E.

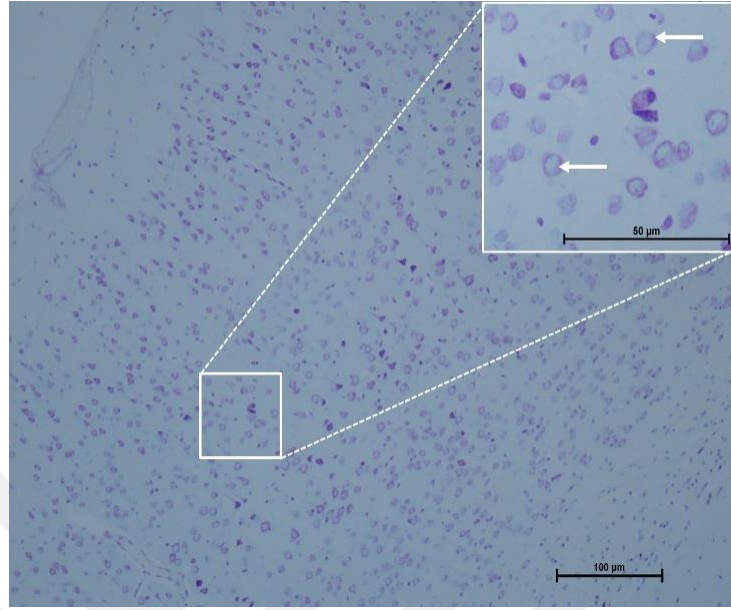
Şekil 4.26. BPA grubu hipokampus bölgesi histopatolojik değerlendirme.

BPA grubundaki sıçanlara ait cresyl violet ile boyanan kesitlerde beyin korteks tabakaları ve hipokampus alanlarında izlenen nöronlarda belirgin sitoplazmik kromatolizis ve nükleuslarda karyolizis dikkati çekti (Şekil 4.27 ve Şekil 4.28). Bu gruba ait Cresyl violet histokimyasal boyanma skoru 2 olarak belirlendi (Tablo 4.2).



BPA grubu. Beyin hipokampus, nöronlarda karyolizis ve kromatolizis (ok). Cresyl violet, X40.

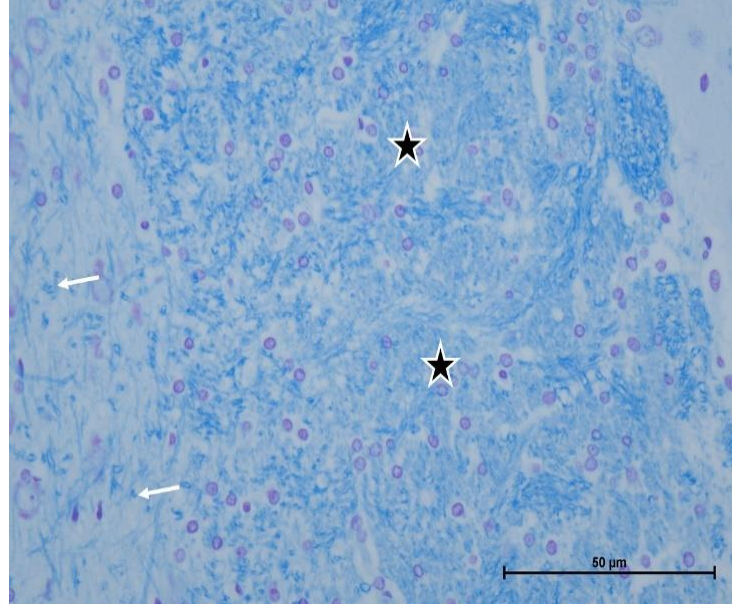
Şekil 4.27. BPA grubu hipokampus cresyl violet ile histopatolojik değerlendirme.



BPA grubu. Beyin korteksi, kortikal nöronlarda karyolizis ve kromatolizis (ok). X10, X40, cresil violet.

Şekil 4.28. BPA grubu beyin korteksi cresil violet ile histopatolojik değerlendirme.

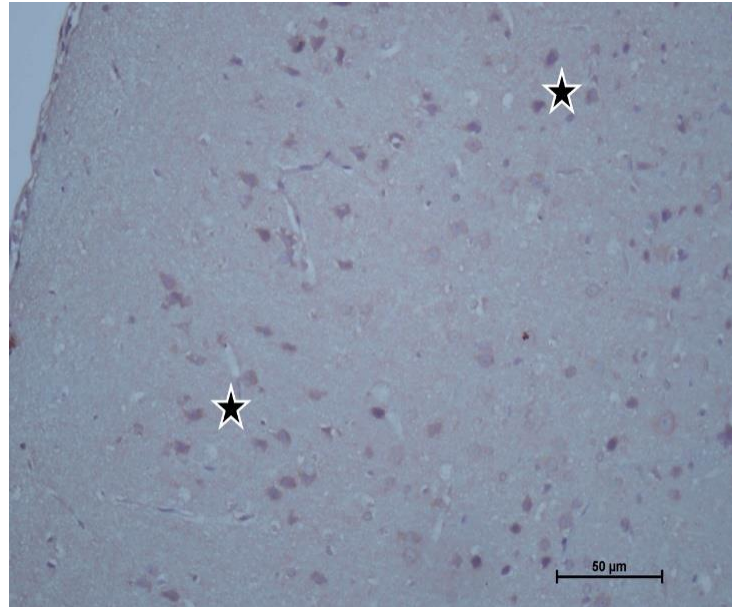
BPA grubundaki sıçanlara ait luxol fast blue ile boyanan beyin kesitlerde miyelinli sinir liflerinde kompakt mavi renkli boyanmanın zayıf ve yer yer kaybolduğu görüldü. Pozitif boyanma gösteren miyelinli sinir liflerinde fibriler yapının fragmente olarak bozulduğu ve daha çok granüler yapıda olduğu izlendi. Gri cevher ve beyaz cevher alanlarında miyelinli sinir liflerinin luxol fast blue boyanma yoğunluğu zayıf, fibriler fragmentasyon ve granüler görünüm belirgindi. Beyaz cevher alanlarında miyelinli fibriller heterojen soluk boyanmış, düzensiz granüler kümelenmeler şeklinde izlendi. Miyelin boyanma yoğunluğunda azalma, fibriler düzensizlik, fragmentasyon ve granüler görünüm miyelin hasarı ve kaybı yönünde değerlendirildi (Şekil 4.29). BPA grubun luxol fast blue histokimyasal boyanma skoru 2 olarak belirlendi (Tablo 4.2).



BPA grubu. Beyin korteksi substantia grisea (ok) ve substantia alba alanlarda luxol fast blue pozitif boyanma yoğunluğunda azalma ve sinir liflerinde granüler görünüm (yıldız). X40, Luxol fast blue.

Şekil 4.29. BPA grubu luxol fast blue ile histopatolojik değerlendirme.

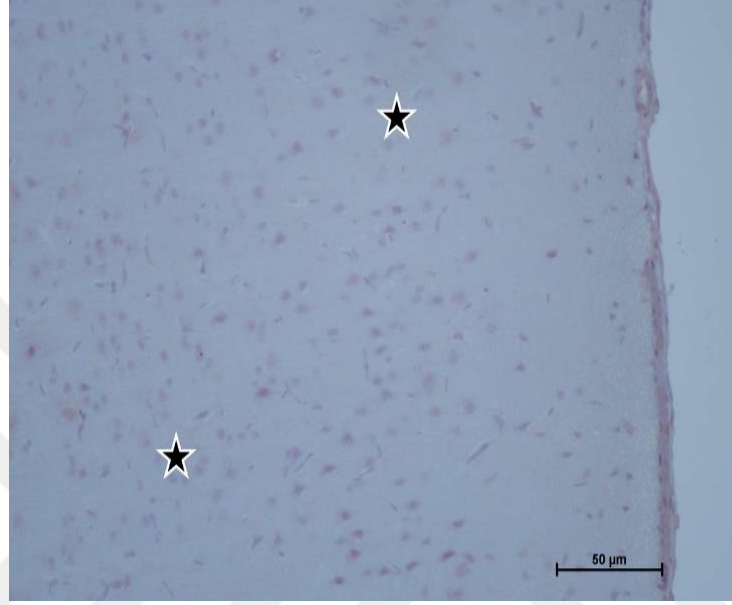
İmmünohistokimyasal anti Cas-3 boyama yapılan BPA grubu sıçanlara ait beyin kesitlerinde korteks alanlarında nöron ve nöropil dokusunda yaygın olarak Cas-3 immünreaktivite pozitifliği saptandı (Şekil 4.30). Anti Cas-3 immünreaktivite H skoru BPA grubunda 140 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



BPA grubu. Beyin korteksi, pozitif Caspase-3 immünreaktivesi (yıldız). X20, İHK, Caspase-3.

Şekil 4.30. BPA grubu Cas-3 immünreaktivite ile değerlendirme.

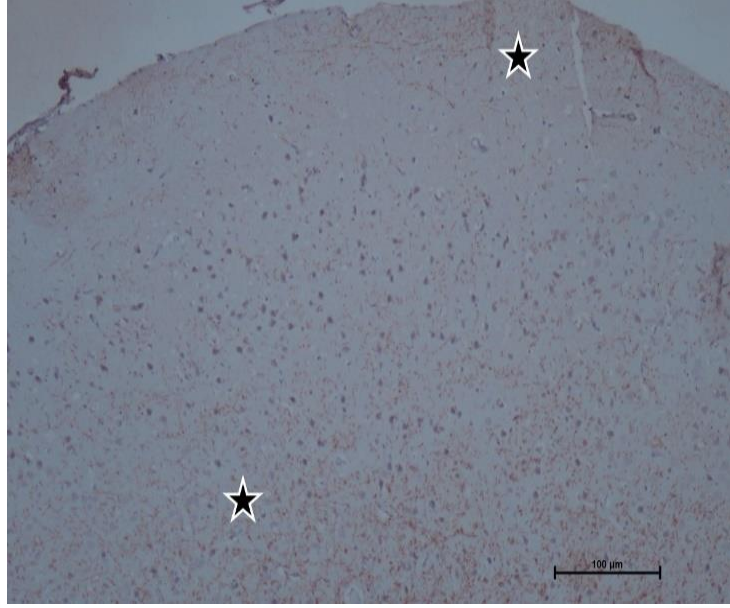
İmmünohistokimyasal anti-BDNF boyama yapılan BPA grubu sıçanlara ait beyin kesitlerinde korteks alanlarındaki nöron perikaryonlarında BDNF immünreaktivite pozitifliği zayıf olarak izlendi (Şekil 4.31). Nöropil alanlarda BDNF immünreaktivite pozitifliği izlenmedi. Anti BDNF immünreaktivite H skoru BPA grubunda 75 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



BPA grubu. Beyin korteksi, zayıf pozitif BDNF immünreaktivesi (yıldız). X20, İHK, BDNF.

Şekil 4.31. BPA grubu BDNF immünreaktivite ile değerlendirme.

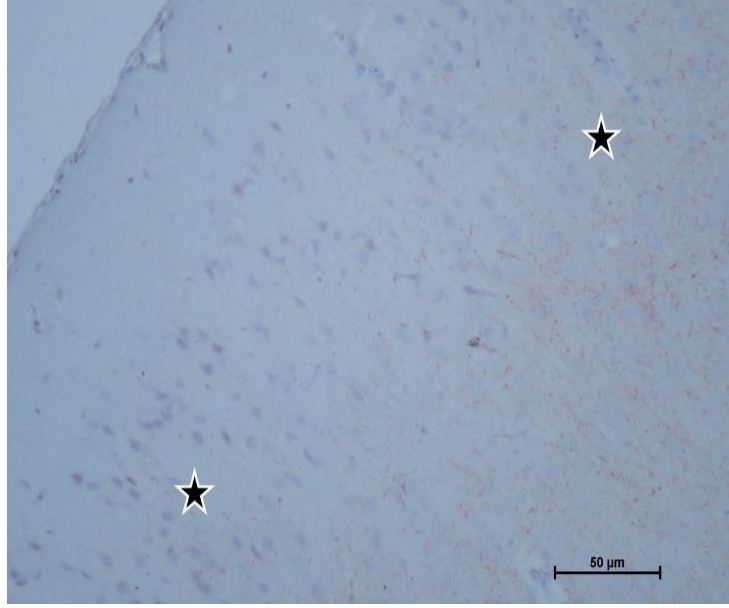
İmmünohistokimyasal anti-MBP boyama yapılan BPA grubu sıçanlara ait beyin kesitlerinde korteks alanlarında MBP immünreaktivite pozitifliği zayıf olarak izlendi. Özellikle korteksin $\frac{1}{2}$ dış alanlarında MBP immünreaktivite pozitifliğinin daha düşük yoğunluk ve yaygınlıkta olduğu dikkati çekti (Şekil 4.32). Anti-MBP immünreaktivite H skoru BPA grubunda 225 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



BPA grubu. Beyin korteksi, zayıf pozitif MBP immünreaktivesi (yıldız). X20, İHK, MBP.

Şekil 4.32. BPA grubu MBP immünreaktivite ile değerlendirme.

İmmünohistokimyasal anti-NF boyama yapılan BPA grubu sıçanların korteks alanlarında nörofilament immünreaktivite pozitifliği zayıf yoğunluk ve düşük yaygınlıkta izlendi. Korteksin dış alanlarında nörofilament immünreaktivite pozitifliğinin çok zayıf olduğu ve yer yer pozitiflik izlenmeyen alanlar olduğu saptandı (Şekil 4.33). Anti-NF immünreaktivite H skoru BPA grubunda 60 olarak belirlendi (Tablo 4.3).

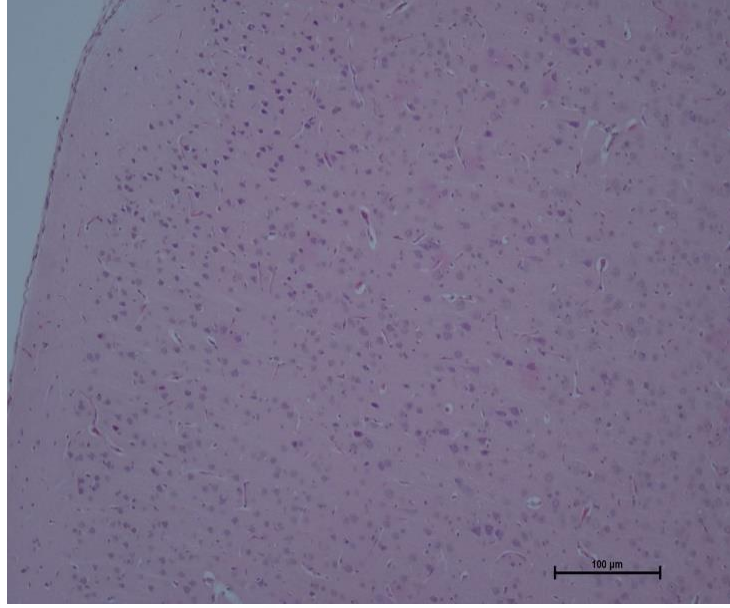


BPA grubu. Beyin korteksi, zayıf pozitif NF immünreaktivesi (yıldız). X20, İHK, NF.

Şekil 4. 33. BPA grubu NF immünreaktivite ile değerlendirme.

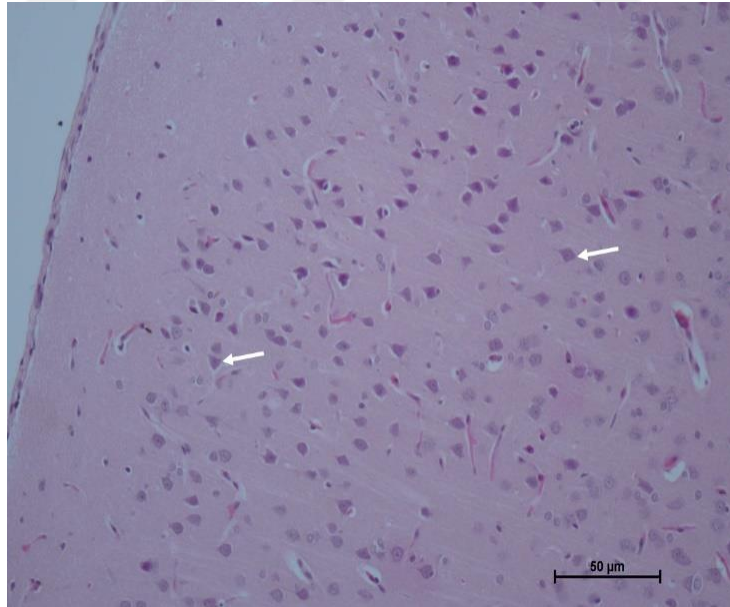
4.1.4. BPA+TQ Grubu

BPA+TQ grubundaki sıçanlara ait H-E ile boyanan kesitlerde dıştan pia mater ile örtülü olan korteks sitoarkitektür tabakaları normal histolojik yapı ve düzende izlendi. Nöropil dokusu ve nöron sitoplazma alanları olağan yoğunlukta eozinofilik boyanmış olarak görüldü. Nöron nükleusları genel olarak konturları düzenli, ökromatik görünümlü, nükleolusları belirgin olup normal histolojik yapıda değerlendirildi. Ancak beyin korteks alanları içerisinde yer yer heterokromatik nükleuslu ve düzensiz şekilli, eozinofilik boyanma artışı gösteren nöronlar saptandı. Kesitlerde izlenen vasküler yapılar normal histolojik yapıda izlendi (Şekil 4.34, Şekil 4.35 ve Şekil 4.36). Bu gruba ait total histolojik hasar skoru 0 olarak belirlendi (Tablo 4.1).



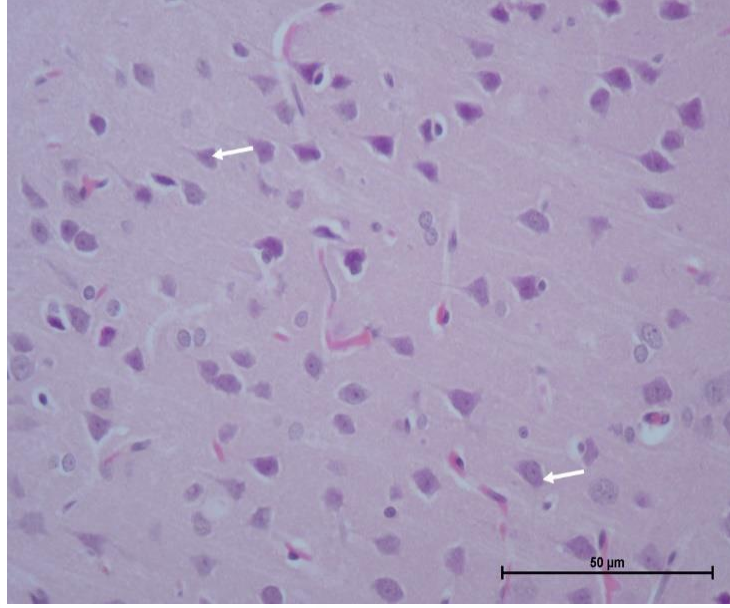
BPA+TQ grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi. X10, H-E.

Şekil 4.34. BPA+TQ grubu histopatolojik değerlendirme.



BPA+TQ grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi, piramidal nöron (ok) X20, H-E.

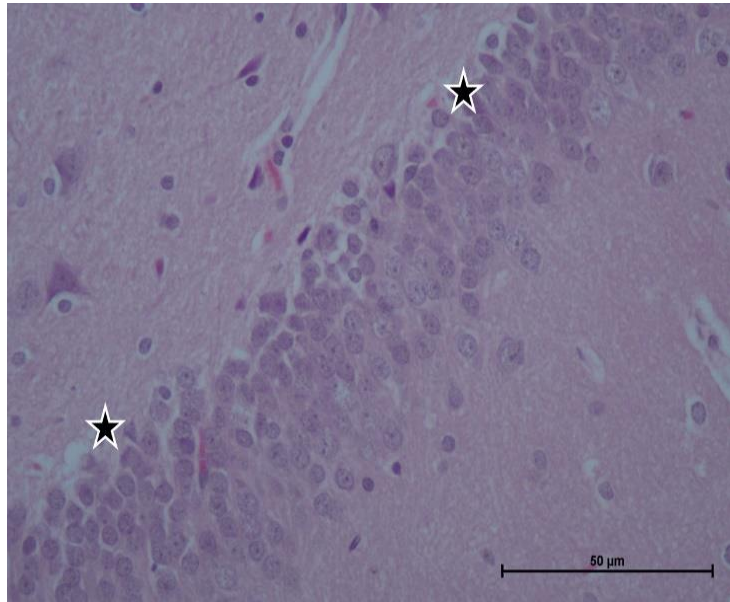
Şekil 4.35. BPA+TQ grubu beyin korteksi histopatolojik değerlendirme.



BPA+TQ grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi, piramidal nöron (ok) X40, H-E.

Şekil 4.36. BPA+TQ grubu beyin korteksi nöronların histopatolojik değerlendirmesi.

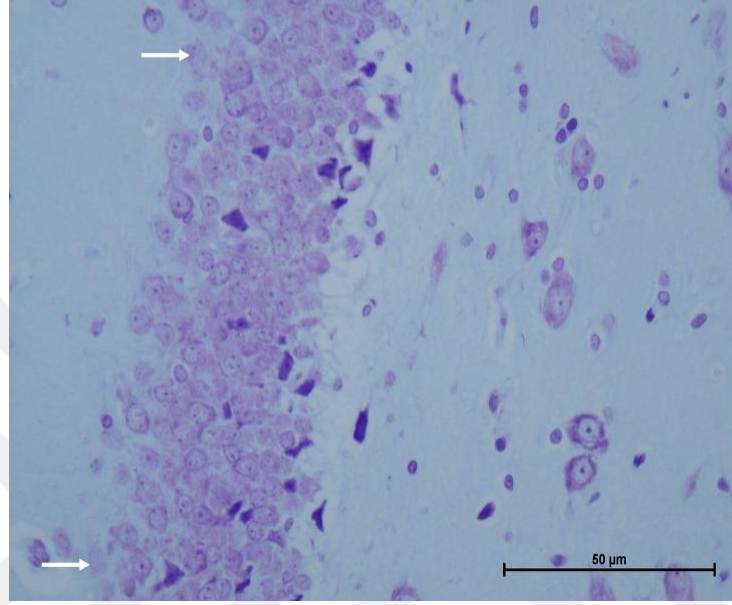
BPA+TQ grubuna ait H-E ile boyanan kesitlerde hipokampus alanlarında genel olarak nöron sitoplazma ve nükleusları normal histolojik yapıda değerlendirildi. Ancak nadir olarak bazı nöronların nükleuslarında minimal düzeyde karyolizis bulgusu izlendi. Bazı kesitlerde perinöronal alanda minimal düzeyde ödem ve nöropil doku yoğunluğunda azalma dikkati çekti (Şekil 4.37).



BPA+TQ grubu. Beyin hipokampus, perinöronal alanda minimal ödem (yıldız), X40, H-E

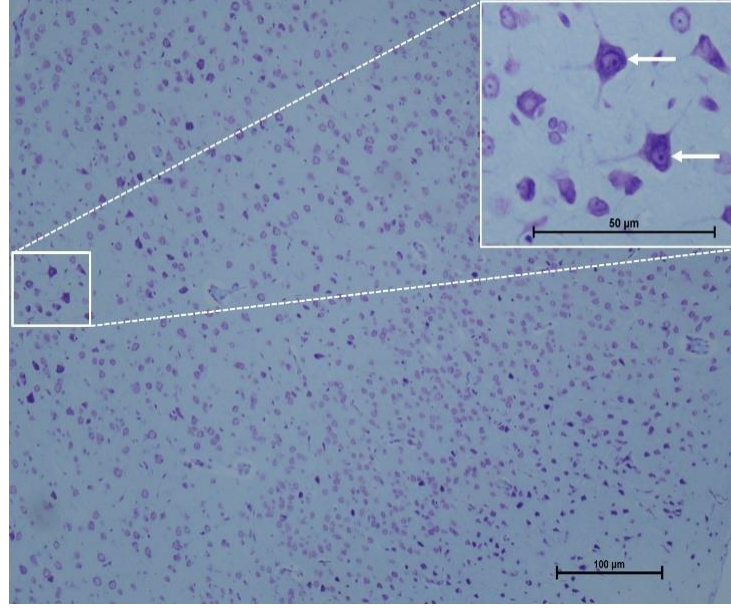
Şekil 4.37. BPA+TQ grubu hipokampus bölgesi histopatolojik değerlendirme.

BPA+TQ grubundaki sıçanlara ait cresyl violet ile boyanan kesitlerde beyin korteks tabakaları ve hipokampus alanlarında izlenen nöronların sitoplazmasında belirgin bazofilik granüller halinde Nissl cisimcikleri ile ökromatik nükleus ve belirgin nükleolus yapısı izlendi (Şekil 4.38 ve Şekil 4.39). Bu gruba ait cresyl violet histokimyasal boyanma skoru 3 olarak belirlendi (Tablo 4.2).



BPA+TQ grubu. Beyin hipokampus, bazı nöronlarda karyolizis ve kromatolizis (ok). Cresyl violet, X40.

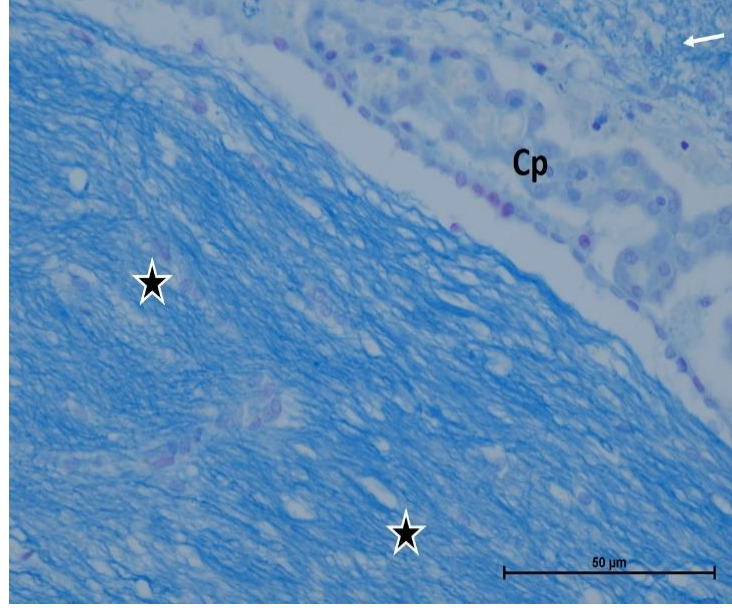
Şekil 4.38. BPA+TQ grubu hipokampus bölgesi cresyl violet ile histopatolojik değerlendirmesi.



BPA+TQ grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi, cresyl violet yoğun pozitif boyanma gösteren nöronlar (ok), X10, X40, cresyl violet.

Şekil 4. 39. BPA+TQ grubu beyin korteksi cresyl violet ile histopatolojik değerlendirmesi.

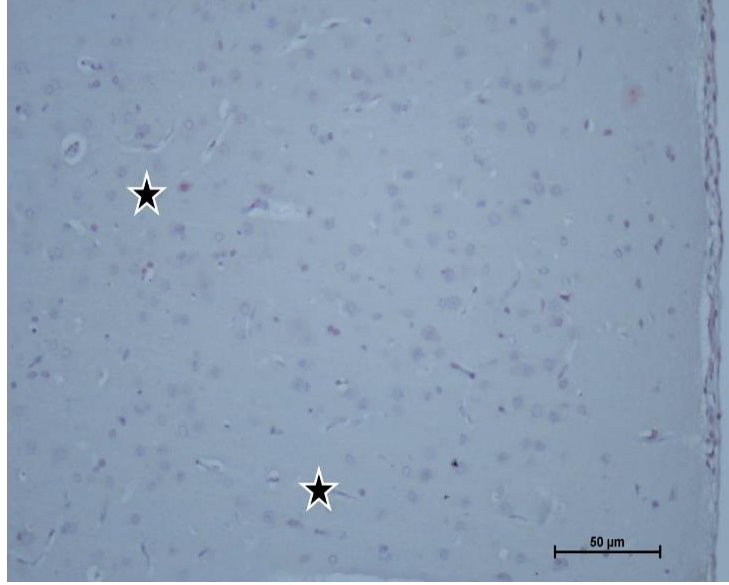
BPA+TQ grubundaki sıçanlara ait luxol fast blue ile boyanmış beyin kesitlerinde gri cevher ve beyaz cevher alanlarında miyelinli sinir lifleri kontrol ve TQ gruplarındakine bezer şekilde kompakt mavi renkte ve fibriler yapıda gözlendi. Gri cevher alanlarında pozitif boyanmış miyelinli sinir lifleri fibriler ağısı yapıda, beyaz cevher alanlarında ise düzenli seyirli fibriler demetler şeklinde izlendi. Nöron nükleusları ökromatik, nükleoluslar koyu boyanmış ve belirgin olarak görüldü (Şekil 4.40). Beyin gri cevher ve beyaz cevher alanlarında miyelinli sinir lifleri normal histolojik ve histokimyasal yapıda değerlendirildi. BPA+TQ grubu luxol fast blue histokimyasal boyanma skoru 3 olarak belirlendi (Tablo 4.2).



BPA+TQ grubu. Normal histolojik görünümde beyin korteksi substantia grisea (ok) ve substantia alba alanlarda luxol fast blue pozitif boyanma gösteren, fibriler yapıda sinir lifleri (yıldız), koroid pleksus (Cp). X40, luxol fast blue.

Şekil 4.40. BPA+TQ grubu luxol fast blue ile histopatolojik değerlendirme.

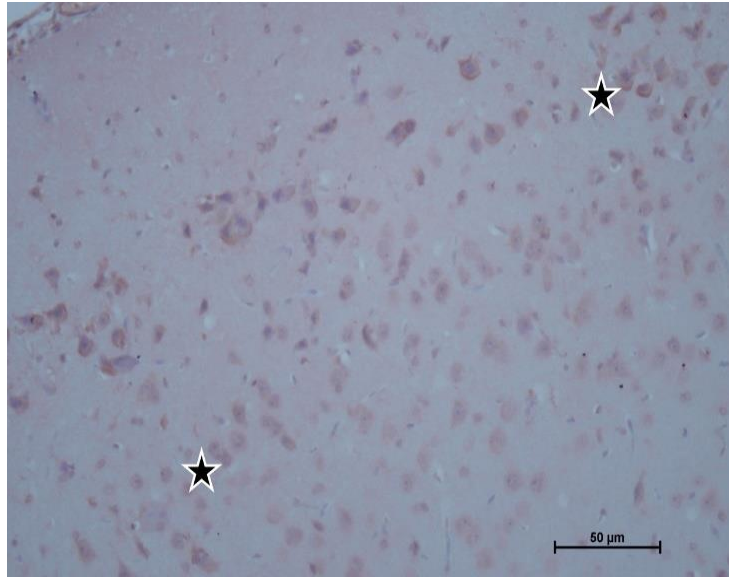
İmmünohistokimyasal anti Cas-3 boyama yapılan BPA+TQ grubu sıçanlara ait beyin kesitlerinde korteks alanlarında nöron ve nöropil dokusunda Cas-3 immünreaktivite pozitifliği zayıf yoğunluk ve nadir yaygınlıkta saptandı (Şekil 4.41). Anti Cas-3 immünreaktivite H skoru BPA+TQ grubunda 10 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



BPA+TQ grubu. Beyin korteksi, nadir alanlarda zayıf pozitif Cas-3 immünreaktivesi (yıldız). X20, İHK, Cas-3.

Şekil 4.41. BPA+TQ grubu Cas-3 immünreaktivite değerlendirme.

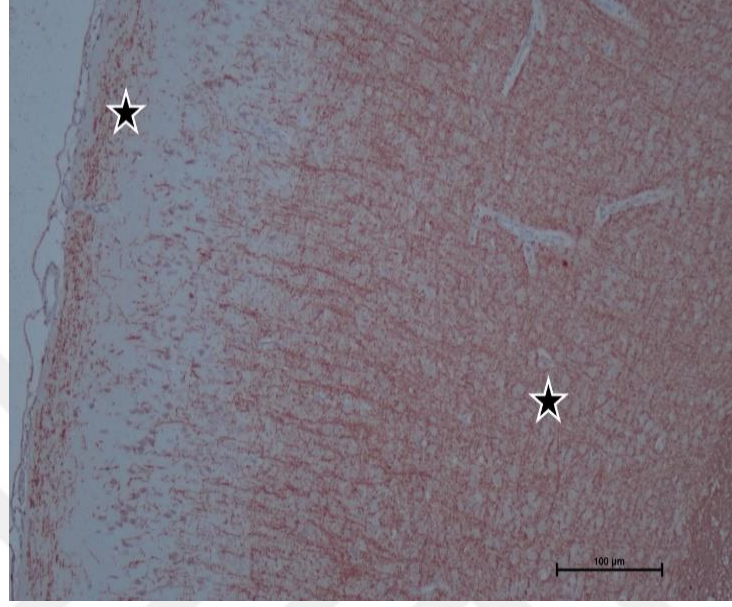
İmmünohistokimyasal anti-BDNF boyama yapılan BPA+TQ grubu sıçanlara ait beyin kesitlerinde korteks alanlarındaki nöron perikaryonlarında ve nöropil doku alanlarında BDNF immünreaktivite pozitifliği orta derece-yer yer kuvvetli yoğunlukta ve yaygın olarak izlendi (Şekil 4.42). Anti BDNF immünreaktivite H skoru BPA+TQ grubunda 150 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



BPA+TQ grubu. BDNF immünreaktivesi pozitif izlenen beyin korteksi (yıldız). X20, İHK, BDNF.

Şekil 4.42. BPA+TQ grubu BDNF immünreaktivite değerlendirme.

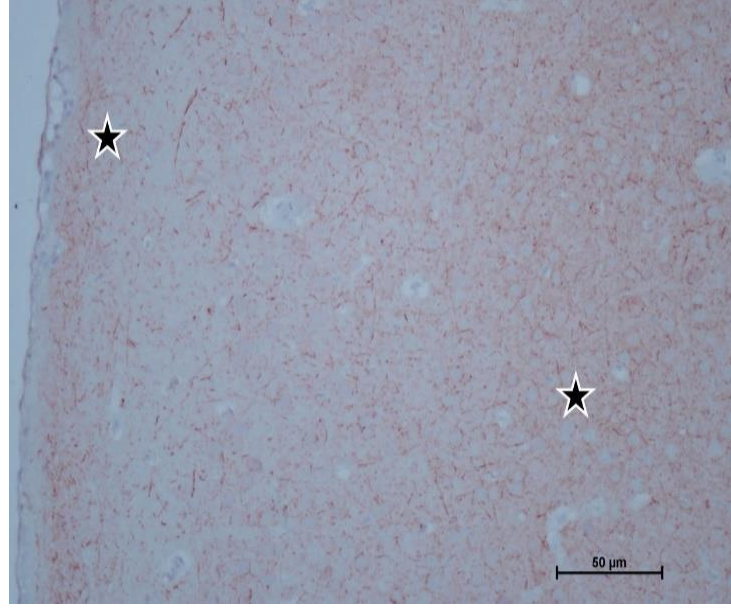
İmmünohistokimyasal anti-MBP boyama yapılan BPA+TQ grubu sıçanlara ait beyin kesitlerinde korteks alanlarında MBP immünreaktivite pozitifliği kuvvetli ve yaygın görünümde izlendi (Şekil 4.43). Anti-MBP immünreaktivite H skoru BPA+TQ grubunda 225 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



BPA+TQ grubu. MBP immünreaktivesi pozitif izlenen beyin korteksi (yıldız). X20, İHK, MBP.

Şekil 4.43. BPA+TQ grubu MBP immünreaktivite değerlendirme.

İmmünohistokimyasal anti-NF boyama yapılan BPA+TQ grubu sıçanlara ait beyin kesitlerinde korteks alanlarında NF immünreaktivite pozitifliği orta derece yoğunlukta ve yaygın olarak izlendi (Şekil 4.44). Anti-NF immünreaktivite H skoru BPA+TQ grubunda 140 olarak belirlendi (Tablo 4.3).



BPA+TQ grubu. NF immünreaktivesi pozitif izlenen beyin korteksi (yıldız). X20, İHK, NF.

Şekil 4.44. BPA+TQ grubu NF immünreaktivite değerlendirme.

Tablo 4. 1. Histolojik hasar skoru

	Nöroglial İnfiltrasyon	Nöronal Hasar ve Dejeneratif	Perivasküler Ödem	Total Hasar Skoru
Kontrol (n=8)	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a
BPA (n=8)	1 (0) ^b	2 (2) ^b	1 (1) ^b	4 (2) ^b
TQ (n=8)	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a
BPA+ TQ (n=8)	0 (0) ^a	0 (1) ^a	0 (1) ^a	1 (1) ^a
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Tablo 4.2. Cresyl violet ve luxol fast blue histokimyasal boyanma skoru

	Cresyl Violet	Luxol Fast Blue
Kontrol (n=8)	3 (0.5) ^a	3 (1) ^a
BPA (n=8)	2 (0.5) ^b	2 (1) ^b
TQ (n=8)	3 (0) ^a	3 (0.5) ^a
BPA+TQ(n=8)	3 (0.5) ^a	3 (0) ^a
p	0.005	0.001

Tablo 4.3. İmmünohistokimya Cas-3, BDNF, MBP, NF immünreaktivite H skorları

	Cas-3	BDNF	MBP	NF
Kontrol (n=8)	1 (0) ^a	160 (30) ^a	240 (30) ^a	120 (20) ^a
BPA (n=8)	140 (30) ^b	75 (15) ^b	100 (20) ^b	60 (20) ^b
TQ (n=8)	1 (0) ^a	160 (20) ^c	240 (30) ^a	120 (20) ^{ac}
BPA+ TQ (n=8)	10 (5) ^c	150 (20) ^a	225 (45) ^a	140 (20) ^c
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Bu çalışmada değerlendirilen biyokimyasal parametreler oksidatif stres düzeylerini ve antioksidan savunma kapasitesini ortaya koymaktadır (Şekil 4.45 ve Tablo 4.4). Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre:

MDA düzeyleri, BPA grubunda (3376.83 ± 371.1 nmol/g yaş doku) kontrol grubuna (2861.25 ± 138.89 nmol/g yaş doku) göre anlamlı olarak artmış; TQ grubunda (1966.45 ± 210.52 nmol/g yaş doku) en düşük düzeyde saptanmıştır. BPA+TQ grubunda ise MDA düzeyi (2693.43 ± 420.61 nmol/g yaş doku) K grubuna göre anlamlı yüksek, BPA grubuna göre ise düşüktür.

GSH düzeyleri, BPA grubunda (1046.09 ± 58.97 nmol/g yaş doku) K grubuna (1500.18 ± 41.67 nmol/g yaş doku) kıyasla anlamlı şekilde azalmış; TQ grubunda (1934.55 ± 49.59 nmol/g yaş doku) en yüksek düzeyde gözlenmiştir. BPA+TQ grubunda GSH düzeyi (1628.14 ± 105.55 nmol/g yaş doku), hem BPA grubuna göre hem de kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir.

TOS düzeyleri, BPA grubunda (33.13 ± 4.01 μ mol/L) K grubuna (20.55 ± 3.53 μ mol/L) göre anlamlı düzeyde artış göstermiştir. TQ grubunda (18.85 ± 4.99 μ mol/L) en düşük TOS değeri saptanırken, BPA+TQ grubunda (25.45 ± 6.15 μ mol/L) bu değer BPA grubuna göre düşük olduğu gözlenmiştir.

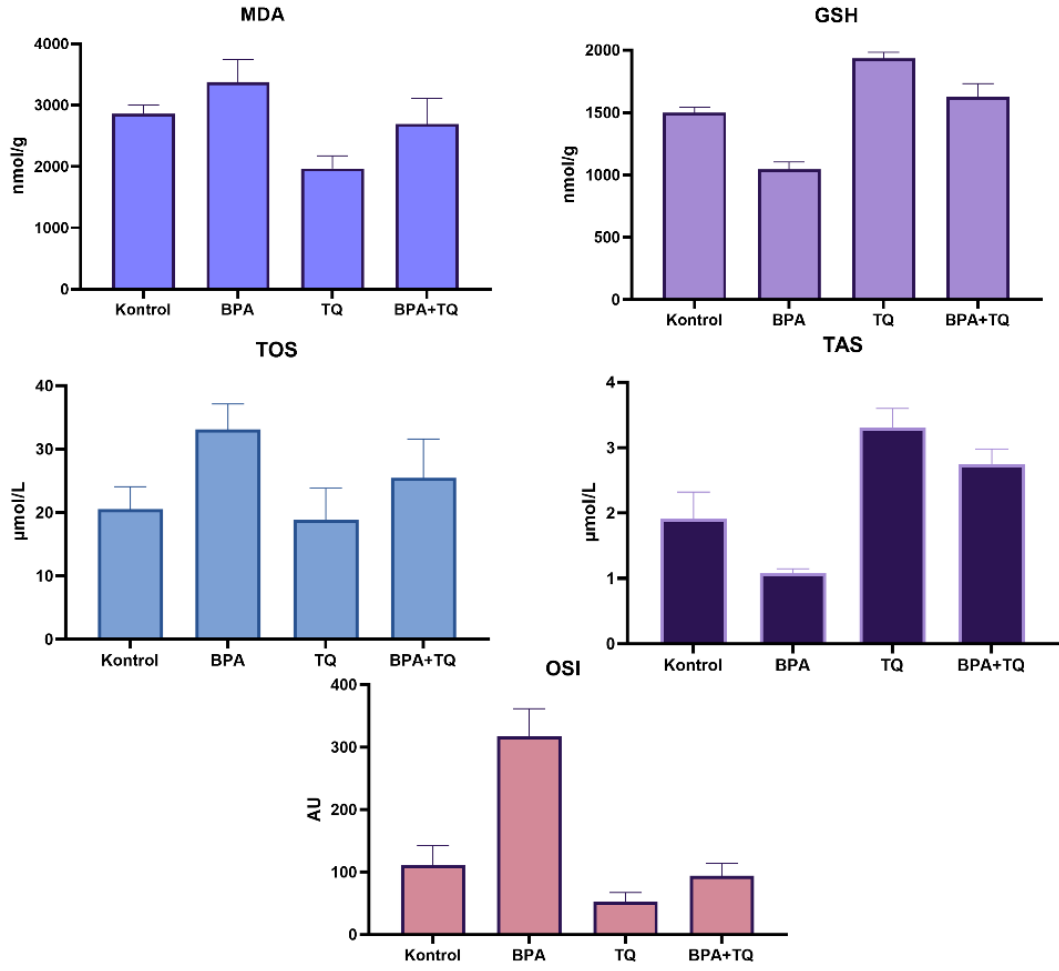
TAS düzeyleri, BPA grubunda (1.08 ± 0.07 mmol/L) K grubuna (1.91 ± 0.41 mmol/L) göre azalmıştır. TQ grubunda (3.31 ± 0.29 mmol/L) en yüksek TAS değeri elde edilmiş; BPA+TQ grubunda (1.25 ± 0.23 mmol/L) bu değer BPA grubuna göre daha yüksek sonuç bulunmuştur.

OSI değerleri, BPA grubunda (317.67 ± 43.98 AU) en yüksek seviyede saptanmıştır. K grubunda (110.64 ± 31.81 AU) orta düzeyde, TQ grubunda ($52.66 \pm$

14.86 AU) en düşük düzeyde, BPA+TQ grubunda ise (94.28 ± 19.74 AU) BPA grubuna göre anlamlı düşüş gözlenmiştir.

Tablo 4.4. Biyokimyasal parametreler

	MDA (nmol/g yaş doku)	GSH (nmol/g yaş doku)	TOS (μ mol/L)	TAS (mmol/L)	OSI (AU)
K (n=8)	2861.25 (138.88) ^a	1500.18 (41.67) ^a	20.55 (3.53) ^a	1.91 (0.41) ^a	110.64 (31.81) ^a
BPA (n=8)	3376.83 (371) ^b	1046.09 (58.97) ^b	33.13 (4.01) ^b	1.08 (0.07) ^b	317.67 (43.98) ^b
TQ (n=8)	1966.45 (210.52) ^c	1934.55 (49.59) ^c	18.85 (4.99) ^a	3.31 (0.29) ^c	52.66 (14.86) ^c
BPA+ TQ (n=8)	2693.43 (420.61) ^d	1628.14 (105.55) ^d	25.45 (6.15) ^c	2.75 (0.23) ^d	94.28 (19.74) ^d
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001



Şekil 4.45. Biyokimyasal parametrelerin grafiği.

5. TARTIŞMA

BPA günümüzde endüstriyel kullanımı yaygın, özellikle deniz canlıları olmak üzere birçok canlı organizmanın ve insanların bünyesine geçebilen toksik bir maddedir. İnsan biyolojik sıvıları ve dokularında da yaygın olarak tespit edilen endokrin bozucu bu toksik organik molekül insan sağlığı açısından giderek artan bir tehlike oluşturmaktadır (67-69). Farklı analitik tekniklerle serum, kan ve plazma örneklerinde yapılan ölçümler sonucunda vücutta bulunan BPA miktarının coğrafya ve popülasyona bağlı olarak 0.2–20 ng/ml arasında değiştiği bildirilmiştir. Ayrıca gebelik döneminde hem anne hem de fetus dolaşımında ölçülebilir düzeylerde bulunabileceği de gösterilmiştir. Genel olarak elde edilen bu bulgular, BPA'nın yaşamın her döneminde insan vücudunda bulunabileceği ve özellikle gelişimsel süreçlerde yüksek bir risk oluşturabileceği ön görülmektedir (70). İnsan maruziyetinin günde <1 ila 5 µg/kg arasında olduğu tahmin edilse de farmakokinetik modellemeler, kanda saptanan BPA düzeylerini açıklamak için günde 100 mg'a kadar oral alım gerekebileceğini öne sürmektedir. Bu durum iki olasılığı gündeme getirmektedir: gerçek BPA alımı tahmin edilenden daha yüksek olabilir veya düzenli günlük maruziyet BPA'nın vücutta birikmesine neden olabilir (25).

Antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip doğal bileşikler, çeşitli nörolojik hastalıklar için potansiyel terapötik hedefler olarak önemli ilgi görmektedir. Çörek otunun ana biyoaktif bileşeni olan TQ, antiinflamatuvar, antioksidan, anti-nörodejeneratif ve anti-tümör özelliklere sahiptir ve beyinde oksidatif stresin azaltılmasında ve bilişsel bozuklukların iyileştirilmesinde etkili olduğu birçok çalışma ile rapor edilmiştir (71). Mansour ve arkadaşları, TQ'un farklı konsantrasyonlarda yaptığı bir araştırmada (25, 50 ve 100 mg/kg) güçlü bir serbest radikal ve süperoksit radikal süpürücüsü olarak hareket edebildiğini bildirmiştir (60). Beyin iskemisine maruz bırakılan ratlara TQ uygulanması sonucunda, oksidatif stres göstergesi olan MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma saptanmıştır. Buna karşın, glutatyon GSH, SOD ve CAT gibi başlıca antioksidan enzimlerin aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. Bu bulgular, TQ'nun yalnızca nörotoksik etkilerle sınırlı kalmadan, iskemik doku hasarına karşı da hücrel savunma mekanizmalarını güçlendirdiğini ortaya koymaktadır. TQ'nun bu koruyucu etkisinin, oksidatif hasara karşı hücre direncini artıran antioksidan bileşenleri aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (72).

Literatürde yer alan bu verilere dayanarak çalışmamızda TQ'nun antioksidan antiinflamatuvar, immün ve endokrin modülatör ve sitoprotektif etkilerinin BPA'nın beyin dokusunda neden olduğu hasarı engelleme ve iyileştirme potansiyeli biyokimyasal, histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir.

Hücrelerde, sağlıklı metabolik süreçler sırasında ROS açığa çıkar, açığa çıkar, açığa serbest radikaller oksidatif strese neden olurlar. Oluşan bu oksidatif stresin antioksidan mekanizmalarla dengede tutulması, hücresel gelişim ve hayatta kalım için kritik öneme sahiptir. Düşük düzeyde ROS'lar hücresel sinyal iletiminde rol oynarken, aşırı seviyeleri hücre yapılarına zarar verebilir. Ancak bu denge, ağır metaller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve BPA gibi endokrin bozucu çevresel toksinlerin etkisiyle oksidatif stresin artışı yönünde bozulabilir (73). BPA, enzimatik ve enzimatik olmayan yollardan fenoksi radikalleri oluşturarak ROS seviyelerini artırır. Bu radikaller, NADPH veya GSH gibi hücresel bileşenlerle reaksiyona girerek süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleri gibi zararlı oksidan türlerin oluşumuna neden olur. BPA'nın farklı dozlarının hem in vitro hem de in vivo ortamlarda DNA hasarı, sitotoksikite ve mitokondriyal disfonksiyona yol açtığı gösterilmiştir (74).

Oksidatif stres düzeyini ve antioksidan savunma kapasitesini değerlendirmek amacıyla çalışmada oksidatif stresin değerlendirilmesinde, savunma ve hasar düzeylerini birlikte yansıtabilen duyarlı ve uygulanabilir biyobelirteçlerini olması nedeniyle GSH ve MDA parametreleri tercih edilmiştir. Bunun yanında TOS, TAS ve OSI gibi biyokimyasal parametreler kullanılmıştır. Literatürde BPA ve TQ'un bu parametrelerdeki etkilerine bakılmıştır. Literatürde BPA maruziyetinin antioksidan savunma sistemlerini zayıflattığını ve oksidatif stresi artırarak çeşitli dokularda hasara yol açtığını gösteren çalışmalar mevcuttur.

BPA'nın beyin dokusu üzerine nörotoksik etkileri ile ilgili çalışmalar bu maddenin farklı dozlarda uygulanmasının beyinde oksidatif stres parametrelerinin düzeyinde artışa neden olduğu, MDA düzeylerini artırıp GSH düzeylerini azalttığı bildirilmektedir. Acaröz ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada oral yolla 25 mg/kg/gün BPA verilen sıçanlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında BPA uygulamasının, beyin dokularında glutatyon düzeylerini anlamlı şekilde azalttığı ve MDA düzeylerini arttırdığı ($p<0.001$) bildirilmiştir. Aynı çalışmada BPA maruziyeti, beyin ($p<0.05$) dokusu başta olmak üzere akciğer, karaciğer, böbrek, kalp ve testis dokularında da GSH düzeylerini anlamlı biçimde azalttığı raporlanmıştır (68). Aydoğan ve ark., 45 gün boyunca erkek sıçanlara oral yolla 25 mg/kg dozunda BPA uygulaması çalışmada beyin

dokusundaki MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı ($p<0.05$) ve GSH düzeylerinin ise anlamlı şekilde azaldığı ($p<0.05$) rapor edilmiştir (75). Poormoosavi ve ark. ise erkek sıçanlara 8 hafta boyunca 10 mg/kg BPA uygulanmış ve uygulanan BPA dozunun serumda MDA'yı artırıp GSH'yi ve total antioksidan kapasiteyi düşürdüğünü göstermiştir (76). Bolat ve ark. beyin dokusunda 14 gün 50 mg/kg BPA uygulaması sonrası kontrole kıyasla MDA düzeyinin arttığını, GSH düzeyini ise azaldığını bildirmiştir (77).

Bizim çalışmamızda BPA uyguladığımız grubun MDA düzeyleri kontrol ve TQ grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış, GSH düzeyleri ise azalmış olarak tespit edildi. Elde ettiğimiz MDA ve GSH düzeyleri BPA maruziyetinin beyin dokularında reaktif oksijen türleri üretimi arttırdığı ve oksidatif strese neden olduğunu bildiren çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir. Ancak BPA+TQ uygulanan grupta beyin dokusunda MDA ve GSH düzeylerinin BPA uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu saptanmıştır. Gruplar arasında MDA ve GSH düzeylerinin farklılık profili TQ'nun güçlü bir serbest radikal ve süperoksit radikal süpürücüsü olarak hareket ettiğini, BPA'nın beyin doku ve hücrelerinde artmış oksidatif stres yolu üzerinden neden olduğu lipid peroksidasyonu ve antioksidan kapasite düşüşünü engellediğini ortaya koymaktadır.

Fazalyar ve ark. serum bazlı yapmış oldukları bir çalışmada 6 hafta boyunca 50 mg/kg BPA uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna göre TAS düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olarak düştüğünü, TOS düzeyinin ise iki katına kadar yükseldiğini bildirmiştir (78).

Çalışmamızda biyokimyasal olarak belirlenen TAS ve TOS düzeyleri BPA grubunda sırasıyla 1.08 mmol/L ve 33.13 μ mol/L, OSI değeri ise 317.67 AU olarak tespit edilmiştir. BPA+TQ grubunda ise TAS 2.41 mmol/L, TOS 2.56 μ mol/L ve OSI 94.28 AU olarak saptanmıştır. Çalışmamızda, BPA uygulanan grupta TOS ve OSI düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenirken, TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Çalışmamızın TAS, TOS ve OSI indeksi verileri ilgili literatürdeki serum ve dokuda belirlenerek bildirilmiş olan bulgularla paralellik göstermektedir. BPA'nın serbest radikal oluşumunu artırarak TOS düzeyinin yükselmesi, TAS düzeyinin ise düşmesine neden olarak oksidatif stres ve antioksidan kapasitenin oksidatif stres yönünde bozulmasına neden olduğu açıktır. Bununla birlikte BPA+TQ uygulanan grubun sonuçlarına bakıldığında TQ'nun antioksidan kapasiteyi güçlü bir şekilde arttırdığı söylenebilir.

BPA'nın kan beyin bariyerini aşarak nörogenezi bozduğu ve nörodejenerasyonu neden olduğu ve bu yolla nöropsikiyatrik hastalıklara zemin hazırlayabileceği gösterilmiştir (47). BPA'nın dokularda bulunması, özellikle artmış oksidatif strese bağlı olarak DNA/RNA hasarına neden olmasıyla ilişkilidir. Ayrıca BPA endokrin reseptörleri etkileyerek hormonal dengeyi bozabilir, germ hücre gelişimini engelleyip östrojene duyarlı kanser riskini artırabilir (79, 80). BPA'nın nörotoksik etkileri, sistemik dolaşıma giren serbest (konjuge olmayan) formunun biyoyararlanımına ve biyotransformasyonuna bağlıdır. Diyet yoluyla vücuda alınan BPA, glukuronidasyon ve sülfatlama gibi metabolik yollarla hızla detoksifiye edilse de bu süreç başlamadan önce serbest BPA, oral alımdan sonra ortalama 1–2 saat boyunca serumda tespit edilebilmektedir (81). Bu süre zarfında BPA, nörotoksik etkilerini başlatabilecek düzeyde kanda dolaşabilir. BPA'nın glukuronid formu, özellikle karaciğer, böbrek ve plasentada bulunan β -glukuronidaz enzimi tarafından tekrar BPA'ya dönüştürülerek yeniden aktif hale gelebilir (82).

Çalışmamızda her ne kadar serum ve beyin doku örneklerinde BPA düzeyi tespiti yapmamış olsak da BPA uygulanan gruptaki sıçanların biyokimyasal bulguları bu grupta artmış oksidatif stres ve antioksidan kapasitedeki düşüşü net bir şekilde ortaya koymuştur. Ayrıca histolojik, histokimyasal ve immünohistokimyasal bulgularımız da BPA'nın beyin dokusunda önemli hasarlar oluşturduğunu göstermiştir. Konuyla ilgili yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu, BPA'nın toksik etkilerini endokrin sistem üzerindeki bozulmalar üzerinden incelemiştir (83-86). Ancak bizim araştırmamız, 50 mg/kg dozunda BPA uygulamasının beyinde sinir dokusu hasarı ve oksidatif stresle ilişkili parametreleri olumsuz yönde etkilediğini ve bu etkileri hafifletmede TQ'nun potansiyel koruyucu ve iyileştirici bir ajan olduğunu ortaya koymuştur.

BPA'nın beyin dokusunda nörotoksik etkilerini inceleyen çalışmalar arasında bulunan Habibi ve ark. 2021 yılında yaptığı bir çalışmada 14 gün boyunca 1.0 μ g/kg BPA intraperitoneal olarak uygulanmış ve beyin korteks dokusunda nöron sayısını azalttığını, prefrontal korteks hacmini küçülttüğü ve glia hücresi sayısını artırdığını bildirmişlerdir (87). Benzer şekilde, başka bir çalışmada ise 30 gün boyunca 25 mg/kg BPA uygulamasının ile beyin dokusunda fokal gliosis ve nöronal dejenerasyona sebep olduğu bildirilmiştir (68). Elaziz ve ark. 2018 yılında yaptığı çalışmada 3 hafta boyunca 1.2mg/kg BPA intraperitoneal yol ile verilmiş ve hipokampus bölgesinde dejenerasyona uğrayan sinir hücrelerinin, büzüşmüş sitoplazmalı ve piknotik nükleuslarla karakterize nöronların sayısında belirgin şekilde artış olduğunu göstermişlerdir (88). Perinatal BPA

maruziyetinin nörotoksik etkilerini göstermek amacıyla yapılan bir çalışmada hamile Sprague–Dawley sıçanlara gebeliğin 6. gününden itibaren postnatal 21. güne kadar içme suyu yoluyla 1 ve 10 µg/mL BPA verilmiştir. Hipokampus bölgesinde piramidal nöronların bulunduğu katmanların daraldığı ve nöron sayısında azalmaya yol açtığı; internöronal alanların genişleyerek nöronların dağınık ve düzensiz bir şekilde yerleştiği görülmüştür (38). Yine başka bir çalışmada gebeliğin 6. gününden itibaren doğuma ve emzirme döneminin sonuna kadar (doğum sonrası 3. hafta), günde 200 µg/kg BPA verilen sıçanların beyin dokularında kortikal tabakalarda belirgin yapısal bozulmalar ve düzensizlikler gözlenmiştir. Özellikle beyin korteksi içerisindeki tüm tabakalarda yerleşik piramidal nöronlarda; hücre büzüşmesi, piknotik nükleuslar, vakuoler dejenerasyon ve silik, tanımlanamayan hücre yapıları ile birlikte belirgin perinöronal boşluk artışı saptanmıştır. Nöroglia hücrelerinde de dejenerasyon ve belirgin perisellüler boşluklar görülmüştür. Nöropil içinde konjesyona uğramış damarlar ve genişlemiş perivasküler alanlar izlenmiştir (89).

Sıçan hipokampusundan elde edilen birincil kültür nöronlarına 5 ve 10 µM konsantrasyonlarında BPA uygulanmış ve nörit çıkıntıları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, BPA'nın nörit uzantılarını anlamlı düzeyde azalttığını göstermiştir (90). BPA'nın nörotoksik etkilerini in vitro olarak inceleyen başka bir çalışmada ise 24 saat boyunca 50, 100, 150 ve 200 µM dozlarında BPA'ya maruz bırakılan Neuro-2a hücrelerinin hücreSEL ve sinaptik bütünlüğü bozarak ve nöronal hücre iskeleti hasarına neden olduğu; nöronların boyutlarının küçüldüğü, yuvarlaklaştığı ve daha az sayıda sinaps yapılarına sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada sinaptik morfolojinin düzenlenmesinde rol oynayan drebrin, MAP2 ve Tau proteinlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu bildirilmiştir (91). 150 µM BPA'ya 12, 24 veya 36 saat maruz bırakılan Neuro-2a hücrelerinin morfolojik analizinde, BPA'ya maruz bırakılan gruptaki hücrelerin kontrol gruplarındakilere kıyasla küçüldüğünü ve çöktüğünü ortaya koydu. Transmisyon elektron mikroskop ile yapılan ultrastrüktürel incelemede hücrelerde nükleoluslarda dilatasyon, nükleus ve mitokondriyal membranlarda hasar-dejenerasyon ve kısmi mitokondriyal yoğunlaşma bulguları rapor edilmiştir (92).

Bu çalışmalardan elde edilen bulgular BPA maruziyetinin, nöronal bütünlüğü bozarak glial yanıtları artırdığını ve bu yolla nöroinflamatuvar süreçleri tetikleyebileceğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda BPA'nın nörotoksik etkilerini histopatolojik olarak değerlendirmek amacıyla H-E boyaması yapılmıştır. Bu yöntem

hematoksilen ile hücre nükleusunu eozin ile hücre sitoplazmalarının seçici olarak boyanmasını sağlamaktır. Kontrol ve TQ gruplarındaki sıçanlara ait beyin dokusu kesitlerinde serebral korteks ve hipokampus bölgelerinde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmazken, BPA uygulanan gruptaki sıçanlara ait beyin kesitlerinin serebral korteks ve hipokampus bölgelerinde histopatolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. BPA uygulanan grupta, korteks boyunca özellikle piramidal nöronlarda gözlemlenen heterokromatik piknotik nükleuslar, nöronların sitoplazmasında eozinofilik sitoplazmik yoğunlaşmalar, membran düzensizlikleri ve büzüşme, BPA'nın belirgin sitotoksik etkilerinin nöron morfolojisine yansımaları olduğu değerlendirilmiştir. Nöronlarda izlenen bu morfolojik değişiklikler, bazı nöronların hasarlandığını, hücresel bütünlüğün bozulduğunu ve hücre ölüm sürecinin başladığına işaret etmektedir. Hipokampus bölgesindeki bazı nöronlarda kromatolizis ve karyolizis bulgularının gözlenmesi, nöronal dejenerasyonun açık bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Bu değişiklikler, BPA'nın nöronal çekirdek bütünlüğünü bozarak programlanmamış hücre ölümünü tetikleyebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca perinöronal alanda ödem oluşumu ve nöropil dokuda gözlenen yoğunluk azalması hem hücreler arası bağlantıların zayıfladığını hem de hücre dışı matrikste belirgin bir bozulma meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Kesitlerde saptanan vasküler yapılar çevresindeki perivasküler ödem ise, BPA'nın damar geçirgenliğini artırarak ve damar yapısını bozarak hipokampal mikrosirkülasyonu olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir. Bu bulgular, daha önce yapılan çalışmalarla da örtüşmekte olup, BPA'nın hipokampus gibi bellek ve öğrenme süreçlerinde kritik rol oynayan beyin bölgelerinde hem hücresel hem de mikrovasküler düzeyde hasara yol açabileceği yönündeki bulguları desteklemektedir.

Yapılan bir çalışmada normal sağlıklı sıçanların hepatik, kardiyak ve böbrek dokularında farklı konsantrasyonlarda (25, 50 ve 100 mg/kg) TQ uygulanmış ve tüm dozlarda TQ'nun güçlü bir serbest radikal ve süperoksit radikal süpürücüsü olarak etki ettiği bildirilmiştir (60). TQ'nun antioksidatif etkilerinin beyin dokusunda da nöronlarda sitoprotektif etki edebileceği kuvvetli bir ihtimaldir. Bir diğer çalışmada beyin iskemisine maruz bırakılan sıçanlarda TQ uygulanması sonucunda, artmış oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan MDA düzeyinde de istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalma olduğu, buna karşın glutatyon GSH, SOD ve CAT gibi başlıca antioksidan enzimlerin aktivitelerinin düzeyinde ise belirgin artış bildirilmiştir. Bu bulgular, TQ'nun yalnızca nörotoksik etkilerle sınırlı kalmadan, iskemi ve diğer hasarlayıcı durumlarda da

oluşabilecek doku ve hücre hasarına karşı hücresel savunma mekanizmalarını güçlendirdiğini ortaya koymaktadır (72).

Çalışmamızda BPA+TQ uygulanan gruptaki sıçan beyin kesitlerinde korteks ve hipokampus alanlarında genel olarak normal histolojik yapının korunmuş olduğu görülmüştür. Nöronlar çoğunlukla normal görünümde olup, yalnızca sınırlı sayıda hücrede hafif dejenerasyon bulguları (minimal heterokromazi, karyolizis, ödem) gözlenmiştir. Bu bulgular, BPA maruziyeti sonucu oluşan histopatolojik değişikliklerin TQ uygulamasıyla büyük ölçüde iyileştiğini, TQ'nun nöronal dokuda geniş bir skalada nöroprotektif etkiye sahip olduğunu göstermektedir. TQ, antioksidan savunma sistemlerini güçlendirerek, proinflamatuvar sinyalleme baskılayarak ve hücre ölümü yollarını düzenleyerek BPA'nın nörotoksik etkilerine karşı koruyucu bir ajan rolü üstlenmiştir.

Cresyl Violet boya yöntemi, nöronal perikaryonda bulunan ve ribozomlardan zengin endoplazmik retikulum yapıları olan Nissl cisimciklerini göstermek amacıyla uygulanır. Bu nedenle bu teknik, literatürde 'Nissl boyaması' olarak da adlandırılmaktadır. Boyama sonucunda Nissl granülleri erguvanî menekşe-mor, hücre perikaryon sitoplazma alanları yoğun şekilde mor renkte boyanır. Literatürde BPA'nın nörotoksik etkilerini cresyl violet boyama yöntemiyle ortaya koyan çalışmalardan birinde, 28 gün boyunca 50 mg/kg BPA uygulanan Wistar sıçanların serebral korteksinde, soluk boyanan nöronal sitoplazma, büzüşmüş-heterokromatik nükleus yapısı ile dejenerasyona uğramış çok sayıda granüler hücrenin tespit edildiği bildirilmiştir (93). Pradhan ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, zebra balıkları 7, 14 ve 21 gün boyunca 17.52 µM BPA konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır. Çalışma sonunda BPA maruziyetinin balıkların beyinlerinin periventriküler gri cevher bölgesinde nöronal piknoz ve nöronlarda nükleer kromatin yoğunlaşması, Cresyl violet boyama yöntemi uygulanan kesitlerde gösterilmiştir (94).

K ve TQ gruplarındaki sıçanlara ait cresyl violet boyaması uyguladığımız beyin kesitlerinde, korteks ve hipokampus bölgelerinde yer alan nöronlarda düzgün konturlu ökromatik nükleuslar, belirgin koyu boyanmış nükleolus yapıları ve sitoplazmada bazofilik granüller şeklinde yoğun Nissl cisimcikleri saptanmış ve normal histolojik görünümde değerlendirilmiştir. Kontrol grubunun aksine BPA grubunda, korteks ve hipokampus bölgelerindeki nöronlarda belirgin sitoplazmik kromatolizis ve nükleer karyolizis dikkati çekmiştir. Bu değişiklikler, nöronal yapının bozulduğunun açık bir göstergesi olup nöronal metabolik aktivite ve fonksiyonlarının da bozulmuş

olabileceğinin güçlü bir göstergesidir. Ayrıca, Nissl cisimciklerinin kromotolizise uğrayarak dağılmış, silik ve düzensiz görünümde olduğu, bazı nöronlarda nükleus sınırlarının düzensiz olduğu ev farklı derecelerde karyolizis olduğu gözlemlenmiştir. BPA+TQ grubunda ise, nöronlarda bazofilik granüller şeklinde belirgin Nissl cisimcikleri, ökromatik nükleuslar ve belirgin nükleolus yapıları izlenmiştir. Bu görünüm, TQ'nun BPA kaynaklı nöron nükleusları ve Nissl cisimciklerindeki hasar bulgularını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Bu bulgular toksik ajanlara maruziyet durumunda nöronlarda özellikle nükleus yapısının ve Nissl cisimciklerinin, dolayısıyla protein sentez fonksiyonun düzenlenmesinde ve korunmasında TQ'nun önemli derecede etkili bir ajan olduğuna işaret etmektedir.

LFB boyama yöntemi, sinir dokusundaki miyelin yapılarını göstermek amacıyla kullanılan özel bir histokimyasal boyama yöntemidir. Özellikle merkezi sinir sisteminde beyaz madde ile gri madde arasındaki ayrımı yapmak için tercih edilir. Çalışmamızda BPA maruziyetinin miyelin kılıf üzerindeki etkisini histokimyasal olarak göstermek için bu boyama yöntemi tercih edilmiştir. Literatürde BPA maruziyetinde miyelinli sinir liflerini LFB boyaması ile değerlendirildiği bir çalışma olmamakla birlikte LFB boyası kullanılarak yapılan miyelin hasarı değerlendirmesini içeren bir çalışmada, global serebral iskeminin özellikle corpus callosum gibi beyaz cevher bölgelerinde belirgin demiyelinizasyona yol açtığı gösterilmiştir. İskemi sonrası 7. günden itibaren LFB boyanmasında belirgin azalma, vakuolizasyon ve artmış optik transparanlık tespit edilmiş; bu değişikliklerin 14. ve 28. günlerde de devam ettiği raporlanmıştır. Semikantitatif analizlerde, bu zaman noktalarında miyelin boyanmasında anlamlı azalmalar saptanmıştır (95). Travmatik beyin hasarı sonrası LFB boyaması ile yapılan bir çalışmada, corpus callosum, external kapsül ve fimbria bölgelerinde miyelin kaybı belirgin şekilde artmıştır. LFB boyanmasında düzensizlik ve boyanmayan alanların yüzdesinde anlamlı artış saptanmış; bu durum miyelin bütünlüğünün bozulduğunu göstermektedir. Bulgular, travmatik beyin hasarı sonrası beyaz cevherde yaygın demiyelinizasyona yol açtığını ve LFB boyasının bu hasarı ortaya koymada etkili olduğunu göstermektedir (96). Kontrol ve TQ gruplarındaki LFB ile boyanmış beyin kesitlerinde benzer şekilde gri ve beyaz cevher alanlarında kompakt, düzenli ve fibriler yapıda mavi renkte boyanmış miyelinli sinir lifleri izlenmiştir, bu görünüm miyelinli sinir liflerinin histolojik bütünlüğü, yoğunluğu ve histokimyasal yapısının sağlıklı olduğunu göstermektedir. BPA grubunda, miyelinli sinir liflerinde kompakt mavi boyanmanın zayıfladığı, yer yer kaybolduğu ve fibriler yapıların bozulduğu

saptanmıştır. Özellikle beyaz cevherde, heterojen, soluk, granüler kümelenmeler ve fibriler fragmentasyon dikkati çekmiştir. Bu bulgular, BPA'nın miyelin yapılarında dejenerasyona ve kayba neden olduğunu göstermektedir. BPA'nın merkezi sinir sistemi miyelin yapılarında oluşturduğu hasara karşı TQ'nun koruyucu ve iyileştirici etkilerinin incelendiği bir çalışma olmamakla birlikte vincristine ile yapılan bir çalışmada vincristine uygulanan grupta LFB boyama ile belirgin demyelinizasyon saptanmış; bu durum miyelin yapılarında ciddi hasara işaret etmektedir. TQ uygulaması ise vincristine grubuna kıyasla demyelinizasyonun şiddetini azaltmış, ancak miyelin bütünlüğünün tam olarak korunamadığını bildirmiştir (97). Bizim çalışmamızda BPA+TQ grubunda, gri ve beyaz cevher bölgelerinde miyelinli sinir liflerinin kompakt, düzenli ve fibriler yapıda boyandığı gözlenmiştir; bu görünüm, TQ'un BPA kaynaklı miyelin hasarını azalttığına veya önlediğine işaret etmektedir.

Sağlıklı bir beyin dokusunda kaspazlar (özellikle kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9) genellikle düşük düzeydedir. Bu enzimler, esas olarak apoptoz sürecinde görev aldıkları için sağlıklı dokularda yüksek düzeyde aktif olmaları beklenmez. Sağlıklı beyin dokusunda Cas-3 pozitifliği genellikle saptanmaz ya da minimal düzeydedir. Zebra balıkları ile yapılan bir çalışmada balıklar kronik olarak (56 gün boyunca) su yoluyla 1.0 mg/L ve 4.0 mg/L dozlarında BPA'ya maruz bırakılmıştır. BPA'ya kronik maruziyetten sonra zebra balıklarının beyinlerinde diensefalik ve telensefalik bölgelerde aktive edilmiş Cas-3 ekspresyonunda önemli bir artış olduğu gösterilmiştir (98). El-Missiry ve ark. sıçanlarda 6 hafta boyunca haftada üç kez 50 mg/kg dozunda BPA uygulamış ve bunun sonucunda akış sitometrik analizi ile cas-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunun arttığını, bu durumun da serebral hücrelerde apoptoza yol açtığını bildirmiştir (99). Wang ve ark., insan nöroblastoma hücre hatlarını 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM ve 100 µM konsantrasyonlarda 24 saat boyunca BPA'ya maruz bırakmışlardır. BPA maruziyetinden sonra Cas-3 protein ekspresyon seviyelerinin yukarı düzenlendiğini göstermişlerdir (100). Çağlayan ve ark., sıçanlara 14 gün boyunca 250 mg/kg dozunda BPA uygulayarak yapmış oldukları çalışmanın sonucunda ve Cas-3 mRNA transkripsiyon düzeyinin yukarı düzenlendiği göstermişlerdir (101). El Mursi ve ark. sıçanlara haftada 3 gün ve 42 gün boyunca 50 mg/kg BPA vererek yapmış oldukları çalışmada hipokampus bölgesinde Cas-3proapoptotik protein ekspresyonunun artmış olduğunu bildirmişlerdir (102). Çalışmamızda, BPA grubundaki sıçanlara ait beyin kesitleri korteks bölgesindeki nöronlar ve nöropil dokuda yaygın Cas-3 pozitifliği saptanması, BPA'nın apoptotik yolağı aktive ettiğini ortaya koymaktadır. Buna karşılık,

kontrol ve sadece TQ uygulanan gruplarda Cas-3 pozitifliği izlenmemesi, normal şartlar altında apoptozun olmadığını varsa bile immünohistokimyasal yöntemle kolorometrik olarak pozitiflik oluşturamayacak şekilde minimal düzeyde olabileceğine işaret etmektedir. BPA+TQ grubunda ise Cas-3 immünreaktivitesinin zayıf yoğunlukta ve sınırlı yaygınlıkta saptanması, TQ'nun anti-apoptotik ve nöroprotektif etkileriyle BPA'nın indüklediği Cas-3 ekspresyonu ve immünreaktivitesini önemli ölçüde engellediği bu yolla apoptotik hücre ölümünü engelleyebileceği veya azaltılabileceğini göstermektedir.

BDNF, nörotrofik faktörler ailesinin bir üyesi olup, özellikle gelişim döneminde nöronal popülasyonların hayatta kalması ve farklılaşmasının düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (103). Ancak sadece gelişimsel süreçlerle sınırlı kalmayıp, çalışmalar BDNF'nin yaşam boyunca farklı nöronal devrelerin yapısını ve işlevlerini düzenlemeye devam ettiğini de ortaya koymuştur (104). Embriyonik gün (E)15 farelerden elde edilen kortikal nöronlar 3 gün boyunca kültürlenerek yapılan bir çalışmada 24 saat veya 48 saat boyunca değişen dozlarda BPA (0.01-1000 μ M) uygulanmıştır. BPA uygulanan nöronlarda Western blot yöntemi ile BDNF düzeyi ölçülmüş ve %57 oranında azaldığı tespit edilmiştir (105). Başka bir çalışmada ise genç erkek farelere 8 hafta boyunca 0.1 μ g/mL ve 0.2 μ g/mL BPA uygulanmış deney sonunda immünohistokimyasal ve Western blot yöntemi ile belirlenen BDNF düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (106). Çalışmamızda sıçan beyin dokusundaki anti-BDNF immünohistokimyasal boyama sonuçları değerlendirildiğinde, kontrol grubundaki sıçanlara ait beyin kesitlerinde korteks alanlarındaki nöronlar ve nöropil dokuda BDNF immünreaktivitesi belirgin düzeyde pozitif olarak saptanmıştır. TQ uygulanan grupta ise, kontrol grubuna benzer biçimde, korteks bölgesinde yer alan nöronlar ve nöropil dokuda güçlü BDNF immünreaktivite pozitifliği izlenmiştir. Bu durum, TQ'nun nörotrofik destekleyici etkiler göstererek BDNF düzeylerini artırıcı veya en azından koruyucu rol oynayabileceğini göstermektedir. BPA uygulanan gruptaki sıçanlara ait beyin kesitlerinde, kortikal nöronların perikaryonlarında BDNF immünreaktivite pozitifliği zayıf düzeyde belirlenmiştir. Bu sonuca göre, BPA'nın BDNF ekspresyonunu baskılayarak nöronal trofizmi olumsuz etkilediğini söylemek mümkündür. BPA+TQ grubunda ise, BDNF pozitifliği nöron perikaryonlarında ve nöropil bölgelerde orta derece, yer yer kuvvetli ve yaygın olarak gözlenmiştir. Bu durumda BPA maruziyetine bağlı olarak BDNF ekspresyon ve immünreaktivitesinin baskılanmasına karşı TQ'nun kısmen de olsa BDNF ekspresyonu ve

immünreaktivitesini arttırarak nörotrofik aktivitenin yeniden düzenlenmesine katkıda bulunduğu söylenebilir.

Miyelin kılıf, MSS ve periferik sinir sistemindeki miyelinli aksonlarda sinir uyarılarının hızlı iletimini sağlamak açısından hayati bir rol üstlenmiştir. Lipit bakımından zengin olan bu yapı, çok katmanlı ve sıkıca paketlenmiş bir kılıf şeklinde düzenlenerek elektriksel bir yalıtkan görevi görür. Miyelin kılıfın kompakt yapısının oluşumunda MBP kritik bir bileşen olup, sitozolik yüzeylerin birbirine yapışmasını sağlayarak çok katmanlı kompakt miyelinin bütünlüğünün oluşmasını sağlar ve korur (107). Yapılan bir çalışmada gebelik ve emzirme döneminde 200 µg/kg dozunda BPA'ya maruz bırakılan erkek sıçanların beyin dokularında, 1., 3. ve 6. postnatal haftalarda MBP immünreaktivitesi negatif olarak belirlenmiştir. Buna karşılık, kontrol gruplarında miyelin liflerinde güçlü MBP pozitifliği gözlemlenmiştir (89). Bir başka çalışmada 21. günde sütten kesilen sıçanlara 90. gününe kadar 40 µg/kg BPA oral yol ile uygulanmış ve dorsal hipokampusun koronal kesitlerinde MBP immünoreaktivite düzeyinin ve miyelinli liflerin yoğunluğunu azaldığı bildirilmiştir (108). Xu ve ark. 2017'de yaptığı çalışmada, BPA maruziyeti gebeliğin son gününden itibaren doğum sonrası 21. güne kadar annelere 0.1 mg/L konsantrasyonunda içme suyu yoluyla verilerek sağlanmıştır. Anne sütü ile beslenen ve süt yoluyla BPA'ya maruz kalan yavrularda postnatal beyin gelişiminin erken döneminde MBP ekspresyonun azaldığı immüno Floresan boyama ve ELISA analizleri ile hem kalitatif hem kantitatif olarak gösterilmiştir (109). Anti-MBP immünohistokimyasal boyama sonuçlarımız, yetişkin sıçanlarda BPA maruziyetinin MBP immünreaktivitesini önemli ölçüde azalttığını dolayısıyla da miyelin yapısında bozulmaya yol açtığına işaret etmektedir. K ve TQ gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitleri kortikal alanlarda kuvvetli ve yaygın MBP pozitif immünreaktivitesi belirlenmiştir. Buna karşılık, BPA grubunda MBP pozitifliğinde azalma ve özellikle korteksin dış yarısında belirgin MBP immünreaktivite kaybı tespit edilmesi, BPA'nın miyelin yapısı üzerine olumsuz etkisini işaret etmektedir. BPA+TQ grubundaki sıçanlara ait beyin kesitlerinde MBP immünreaktivite pozitifliğinin yaygın ve kuvvetli olması, TQ'nun BPA'ya bağlı miyelin hasarını önleyici bir etki göstermiş olduğunun kuvvetli kanıtıdır. Bu bulgular, TQ'nun antioksidan ve nöroprotektif etkileriyle miyelin bütünlüğünü koruma potansiyeline sahip olabileceğine işaret etmektedir.

Nörofilamentler, nöronların sitoplazmasında bulunan ara filamentler sınıfına ait protein yapılarından oluşur. Hücre iskeletinin bir parçasıdır ve özellikle aksonlarda

bol miktarda bulunurlar (110). Khan ve ark. tarafından yürütülen çalışmada, erkek farelere 60 gün boyunca oral yoldan 40 µg/kg ve 400 µg/kg dozlarında BPA uygulanmıştır. Nöral hücre iskeleti proteinlerin değerlendirilmesi amacıyla serebral korteks dokularında Western blot analizi ile NF düzeyleri ölçülmüştür. Analiz sonucunda, 400 µg/kg BPA uygulanan grupta NF protein ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.01$). Öte yandan, 40 µg/kg BPA uygulanan grupta gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (48). Tiwari ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada BPA uygulamasının NF'ler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Gebe Wistar sıçanlara gebeliğin 6. gününden postnatal 21. güne kadar ve ayrı bir grup olarak da erişkin sıçanlara postnatal 21. günden 90. güne kadar 40 µg/kg/gün BPA oral yolla uygulanmıştır. BPA uygulanan sıçanların hipokampus bölgesinde NF immüno Floresan yoğunluğu anlamlı şekilde azalmıştır (108). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında BPA maruziyetinin NF immünreaktivitesi üzerindeki etkisini artış ve azalma yönünde olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. BPA maruziyetine bağlı olarak gelişen NF hasarına karşı nöronlardaki NF sentezinin sekonder bir yanıt olabileceği muhtemeldir. Ayrıca bu her iki yönlü NF immünreaktivite sonuçlarının doz ve uygulama süresine bağlı olarak gelişebileceği de ihtimal dahilindedir. Çalışmamızda, BPA uygulanan gruptaki sıçanlara ait beyin kesitlerinde NF immünreaktivite düzeyinin belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Buna karşılık, K ve TQ gruplarında NF ekspresyonu benzer düzeyde korunmuş ve BPA grubundakinden daha yüksek olarak tespit edilmiştir. BPA+TQ grubunda ise NF immünreaktivite düzeyi K ve TQ gruplarındakinden daha düşük tespit edilmekle birlikte BPA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, BPA'nın nöron hücre iskeleti yapı ve bütünlüğünü bozduğunu, TQ uygulamasının ise BPA'nın NF'ler üzerindeki bu olumsuz etkisini engelleyebileceğini ve nöronlarda hücre iskeletinin korunması için potansiyel önemli etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, endokrin bozucu bir ajan olan BPA beyin dokusu üzerindeki nörotoksik etkileri biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal düzeyde değerlendirilmiş; çörek otunun biyoaktif bileşeni olan TQ'nun potansiyel koruyucu ve iyileştirici etkileri incelenmiştir. Bulgularımız, BPA maruziyetinin oksidatif stres düzeylerini artırarak GSH düzeyini düşürdüğünü, MDA, TOS ve OSI değerlerini ise anlamlı şekilde yükselttiğini ortaya koymuştur. Aynı zamanda, antioksidan kapasiteyi yansıtan TAS düzeyinde düşüş saptanmıştır. Histopatolojik olarak korteks ve hipokampus bölgelerinde dejeneratif nöronal değişiklikler, miyelin kaybı, Nissl cisimciklerinin kaybı, apoptoz belirteci olan Cas-3 immünreaktivitesinde artış ve BDNF, NF ve MBP nörotrofik hücre iskeleti belirteçlerinin immünreaktivite düzeylerinde belirgin azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar BPA'nın sinir dokuda özellikle nöronlar üzerinde çok yönlü hasarlayıcı etkisine işaret etmektedir.

BPA+TQ uygulanan grupta ise biyokimyasal parametreler olan MDA, GSH, TAS, TOS ve OSI değerlerinin kontrol grubuna yaklaşma yönünde değişim gösterdiği belirlenmiştir. Bu grupta histolojik görünümün K grubuna daha yakın olduğu, Cas-3 immünreaktivite düzeyinin azaldığı, BDNF, NF ve MBP immünreaktivite düzeylerinde belirgin artış göstererek K grubundaki değerlere yaklaşma yönünde iyileşmelerin olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, TQ'nun oksidatif hasarı baskılayarak, anti-apoptotik, antiinflamatuvar ve nörotrofik mekanizmalar yoluyla BPA'nın beyin üzerindeki zararlı etkilerini azalttığını göstermektedir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre BPA'nın MSS üzerindeki olumsuz etkileri göz önünde bulundurularak, insan maruziyetinin mümkün olduğu kadar azaltılması yönünde düzenlemeler yapılması, özellikle gebeler ve gelişim çağındaki bireylerin BPA'ya maruziyetinden korunması yönünde sıkı tedbirler alınması gerektiği açıktır.

TQ gibi doğal antioksidanların nöroprotektif potansiyelleri üzerine yapılacak ileri çalışmalar hem tedavi edici hem de önleyici yaklaşımlar açısından gerekli ve önemlidir. Yapılacak çalışmalarla farklı doz, süre ve uygulama yolları kullanılarak TQ'nun sinir sistemi üzerindeki potansiyel nöroprotektif etkileri daha kapsamlı şekilde değerlendirilmelidir. Bütün bu çalışmaların sonucunda TQ'nun siniri sistemi üzerine koruyucu ve düzenleyici bir ajan olarak kullanılma potansiyeli oldukça yüksek

gözükmektedir. Bu amaca yönelik olarak TQ kullanımı klinik düzeye taşınmadan önce, toksikolojik profilleri ve farmakokinetik özellikleri ayrıntılı şekilde ortaya konmalıdır.



KAYNAKLAR

1. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas, Baykal B. (Çeviren). 7. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2014: 784-829.
2. Taner D. Fonksiyonel Nöroanatomi, 21. Baskı. Ankara, ODTÜ Yayıncılık; 2002: 49-88.
3. Yakıncı C, Tanrıverdi LH. (editörler) Temelden Kliniğe Sinir Sistemi, 1. Baskı. Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri, 2023:2-41.
4. Zhang L, Thomas KM, Davidson MC, Casey BJ, Heier LA, Ulug AM. MR quantitation of volume and diffusion changes in the developing brain. AJNR Am J Neuroradiol. 2005;26(1):45-9.
5. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. Neuropsychol Rev. 2010;20(4):327-48.
6. Sadler TW, Thomas W. Langman Medikal Embriyoloji. Başaklar AC (Çeviren). 13. Baskı, Ankara: Palme Yayınevi, 2022:306-42.
7. Eşrefoğlu M. Embriyoloji. 1.Baskı. Ankara, Ema Tıp Kitabevi; 2022:301-20.
8. Carlson BM. Human Embryology And Developmental Biology. 5th ed. Philadelphia, Elsevier, 2014:95-6.
9. Vardi N, Soylu Karadağ N., Gökçe H., Yakıncı C. (editörler). Histoloji ve Patoloji, 2.Baskı. Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri; 2023:634-54.
10. L. Kierszenbaum A. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R (Çeviren). 4. Baskı. Ankara, Palme Yayınevi; 2021:239-70.
11. Eşrefoğlu M. Genel Histoloji, 1. Baskı. Ankara, Ema Tıp Kitabevi; 2022:299-330.
12. Garman RH. Histology of the central nervous system. Toxicol Pathol. 2011;39(1):22-35.
13. İzci Y, Erbaş YC. Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları. Türk Nöroşirürji Dergisi. 2015;25(3):287-295.
14. Kalkan Y. Sıçan Yenidoğan ve Erişkinlerde Hippokampus Gelişiminde Nöron Sayısının Cinsiyete ve Dönemlere Bağlı Olarak Hesaplanması (Bir Stereolojik Ve Histolojik Çalışma) [Doktora tezi]. Erzurum: Atatürk Üniversitesi; 2009.
15. Kütük T. Radyasyona Bağlı Hipokampal Nörogenез İnhibisyonunda Tianeptinin Etkisi. [Tıpta uzmanlık tezi] Ankara: Ankara Üniversitesi; 2017.

16. Ma Y, Liu H, Wu J, Yuan L, Wang Y, Du X, et al. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environ Res.* 2019;176:108575.
17. Jalal N, Surendranath AR, Pathak JL, Yu S, Chung CY. Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicol Rep.* 2018;5:76-84.
18. Masuno H, Iwanami J, Kidani T, Sakayama K, Honda K. Bisphenol a accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicol Sci.* 2005;84(2):319-27.
19. Prokop Z, Hanková L, Jerábek K. Bisphenol A synthesis -: modeling of industrial reactor and catalyst deactivation. *React Funct Polym.* 2004;60:77-83.
20. Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett.* 2008;176(2):149-56.
21. Manzoor MF, Tariq T, Fatima B, Sahar A, Tariq F, Munir S, et al. An insight into bisphenol A, food exposure and its adverse effects on health: A review. *Front Nutr.* 2022;9:1047827.
22. Almeida S, Raposo A, Almeida-Gonzalez M, Carrascosa C. Bisphenol A: Food Exposure and Impact on Human Health. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2018;17(6):1503-17.
23. Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology.* 2006;226(2-3):79-89.
24. Goodson A, Summerfield W, Cooper I. Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Addit Contam.* 2002;19(8):796-802.
25. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol.* 2007;24(2):139-77.
26. Chen MY, Ike M, Fujita M. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environ Toxicol.* 2002;17(1):80-6.
27. Cwiek-Ludwicka K. Bisphenol A (BPA) in food contact materials - new scientific opinion from EFSA regarding public health risk. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2015;66(4):299-307.
28. Furhacker M, Scharf S, Weber H. Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere.* 2000;41(5):751-6.
29. Kang JH, Kondo F. Bisphenol A degradation in seawater is different from that in river water. *Chemosphere.* 2005;60(9):1288-92.

30. Hanaoka T, Kawamura N, Hara K, Tsugane S. Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occup Environ Med.* 2002;59(9):625-8.
31. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere.* 1998;36(10):2149-73.
32. Geens T, Roosens L, Neels H, Covaci A. Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere.* 2009;76(6):755-60.
33. Kanerva L, Jolanki R, Estlander T, Henriks-Eckerman M, Tuomi M, Tarvainen K. Airborne occupational allergic contact dermatitis from triglycidyl-p-aminophenol and tetraglycidyl-4,4'-methylene dianiline in preimpregnated epoxy products in the aircraft industry. *Dermatology.* 2000;201(1):29-33.
34. Bolz U, Hagenmaier H, Korner W. Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Wurttemberg, south-west Germany. *Environ Pollut.* 2001;115(2):291-301.
35. Michalowicz J. Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014;37(2):738-58.
36. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı. Bisfenol A (BPA) kullanımının yasaklanması. Genel Duyurular. 24 Ocak 2025. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L_202403190.
37. Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, et al. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;142(1-2):203-14.
38. Wu D, Wu F, Lin R, Meng Y, Wei W, Sun Q, et al. Impairment of learning and memory induced by perinatal exposure to BPA is associated with ERalpha-mediated alterations of synaptic plasticity and PKC/ERK/CREB signaling pathway in offspring rats. *Brain Res Bull.* 2020;161:43-54.
39. Nesan D, Feighan KM, Antle MC, Kurrasch DM. Gestational low-dose BPA exposure impacts suprachiasmatic nucleus neurogenesis and circadian activity with transgenerational effects. *Sci Adv.* 2021;7(22).
40. Komada M, Nagao T, Kagawa N. Prenatal and postnatal bisphenol A exposure inhibits postnatal neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus. *J Toxicol Sci.* 2020;45(10):639-50.

41. Meng L, Liu J, Wang C, Ouyang Z, Kuang J, Pang Q, et al. Sex-specific oxidative damage effects induced by BPA and its analogs on primary hippocampal neurons attenuated by EGCG. *Chemosphere*. 2021;264(Pt 1):128450.
42. Zhao H, Fu X, Zhang Y, Chen C, Wang H. The Role of Pyroptosis and Autophagy in the Nervous System. *Mol Neurobiol*. 2024;61(3):1271-81.
43. Park SJ, Jang JW, Moon EY. Bisphenol A-induced autophagy ameliorates human B cell death through Nrf2-mediated regulation of Atg7 and Beclin1 expression by Syk activation. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2023;260:115061.
44. Kobayashi K, Liu Y, Ichikawa H, Takemura S, Minamiyama Y. Effects of Bisphenol A on Oxidative Stress in the Rat Brain. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(3).
45. MacLusky NJ, Hajszan T, Leranth C. The environmental estrogen bisphenol a inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environ Health Perspect*. 2005;113(6):675-9.
46. Suresh S, Singh SA, Vellapandian C. Bisphenol A exposure links to exacerbation of memory and cognitive impairment: A systematic review of the literature. *Neurosci Biobehav Rev*. 2022;143:104939.
47. Costa HE, Cairrao E. Effect of bisphenol A on the neurological system: a review update. *Arch Toxicol*. 2024;98(1):1-73.
48. Khan J, Salhotra S, Goswami P, Akhter J, Jahan S, Gupta S, et al. Bisphenol A triggers axonal injury and myelin degeneration with concomitant neurobehavioral toxicity in C57BL/6J male mice. *Toxicology*. 2019;428:152299.
49. Cinar R, Naziroglu M. Bisphenol A Induces Neuronal Apoptosis and Oxidative Stress Through TRPV4 Channel Signaling Pathways: Protective Role of Alpha-Lipoic Acid. *Environ Toxicol*. 2025.
50. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(5):337-52.
51. Khan MA. Thymoquinone, a constituent of prophetic medicine-black seed, is a miracle therapeutic molecule against multiple diseases. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2019;13(1):1-2.

52. Yimer EM, Tuem KB, Karim A, Ur-Rehman N, Anwar F. *Nigella sativa* L. (Black Cumin): A Promising Natural Remedy for Wide Range of Illnesses. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019;2019:1528635.
53. Pottoo FH, Ibrahim AM, Alammam A, Alsinan R, Aleid M, Alshehhi A, et al. Thymoquinone: Review of Its Potential in the Treatment of Neurological Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(4).
54. Malik S, Singh A, Negi P, Kapoor VK. Thymoquinone: A small molecule from nature with high therapeutic potential. *Drug Discov Today*. 2021;26(11):2716-25.
55. Rathod S, Agrawal Y, Sherikar A, Nakhate KT, Patil CR, Nagoor Meeran MF, et al. Thymoquinone Produces Cardioprotective Effect in beta-Receptor Stimulated Myocardial Infarcted Rats via Subsiding Oxidative Stress and Inflammation. *Nutrients*. 2022;14(13).
56. Dedeoğlu M. Trimetobenzamid Uygulanmış Gebe Sıçanlara, Timokinonun Yeni Doğan Karaciğer Dokusu Üzerine Etkisi [Yüksek lisans tezi]: Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi; 2016.
57. Jakaria M, Cho DY, Ezazul Haque M, Karthivashan G, Kim IS, Ganesan P, et al. Neuropharmacological Potential and Delivery Prospects of Thymoquinone for Neurological Disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1209801.
58. Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacol Res*. 2015;95-96:138-58.
59. Cobourne-Duval MK, Taka E, Mendonca P, Bauer D, Soliman KF. The Antioxidant Effects of Thymoquinone in Activated BV-2 Murine Microglial Cells. *Neurochem Res*. 2016;41(12):3227-38.
60. Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell Biochem Funct*. 2002;20(2):143-51.
61. Abbas F, Eladl MA, El-Sherbiny M, Abozied N, Nabil A, Mahmoud SM, et al. Celastrol and thymoquinone alleviate aluminum chloride-induced neurotoxicity: Behavioral psychomotor performance, neurotransmitter level, oxidative-inflammatory markers, and BDNF expression in rat brain. *Biomed Pharmacother*. 2022;151:113072.

62. Hannan MA, Rahman MA, Sohag AAM, Uddin MJ, Dash R, Sikder MH, et al. Black Cumin (*Nigella sativa* L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. *Nutrients*. 2021;13(6).
63. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351-8.
64. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1):70-7.
65. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103-11.
66. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37(4):277-85.
67. Abraham A, Chakraborty P. A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Rev Environ Health*. 2020;35(2):201-10.
68. Acaroz U, Ince S, Arslan-Acaroz D, Gurler Z, Demirel HH, Kucukkurt I, et al. Bisphenol-A induced oxidative stress, inflammatory gene expression, and metabolic and histopathological changes in male Wistar albino rats: protective role of boron. *Toxicol Res (Camb)*. 2019;8(2):262-9.
69. Czarny-Krzyszewska K, Krawczyk B, Szczukocki D. Bisphenol A and its substitutes in the aquatic environment: Occurrence and toxicity assessment. *Chemosphere*. 2023;315:137763.
70. Mishra A, Goel D, Shankar S. Bisphenol A contamination in aquatic environments: a review of sources, environmental concerns, and microbial remediation. *Environ Monit Assess*. 2023;195(11):1352.
71. Baghcheghi Y, Hosseini M, Beheshti F, Salmani H, Anaeigoudari A. Thymoquinone reverses learning and memory impairments and brain tissue oxidative damage in hypothyroid juvenile rats. *Arq Neuropsiquiatr*. 2018;76(1):32-40.
72. Al-Majed AA, Al-Omar FA, Nagi MN. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol*. 2006;543(1-3):40-7.
73. Gassman NR. Induction of oxidative stress by bisphenol A and its pleiotropic effects. *Environ Mol Mutagen*. 2017;58(2):60-71.

74. Babu S, Uppu S, Claville MO, Uppu RM. Prooxidant actions of bisphenol A (BPA) phenoxyl radicals: implications to BPA-related oxidative stress and toxicity. *Toxicol Mech Methods*. 2013;23(4):273-80.
75. Aydogan M, Korkmaz A, Barlas N, Kolankaya D. The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats. *Toxicology*. 2008;249(1):35-9.
76. Poormoosavi SM, Najafzadehvarzi H, Behmanesh MA, Amirgholami R. Protective effects of *Asparagus officinalis* extract against Bisphenol A- induced toxicity in Wistar rats. *Toxicol Rep*. 2018;5:427-33.
77. Bolat M, Laçin BB, Fikret Ç. Investigation of the Effects of Hesperidin on Bisphenol-A Induced Neurotoxicity in Rats. *Veterinary Sciences and Practices*. 2024;19(1): 17 - 24.
78. Najiullah Fazalyar SEP, Doğançan Dörücü , Göksel Şener , Tuğba Tunalı Akbay. The Effects of *Panax ginseng* on Serum Oxidative Stress Following Bisphenol A Exposure. *Experimed* 2024; Volume: 14 (2): 68-72.
79. Li C, Sang C, Zhang S, Zhang S, Gao H. Effects of bisphenol A and bisphenol analogs on the nervous system. *Chin Med J (Engl)*. 2023;136(3):295-304.
80. Mangla A, Goswami P, Sharma B, Suramya S, Jindal G, Javed M, et al. Obesity aggravates neuroinflammatory and neurodegenerative effects of bisphenol A in female rats. *Toxicol Mech Methods*. 2024;34(7):781-94.
81. Thayer KA, Doerge DR, Hunt D, Schurman SH, Twaddle NC, Churchwell MI, et al. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environ Int*. 2015;83:107-15.
82. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*. 2002;15(10):1281-7.
83. Maniradhan M, Calivarathan L. Bisphenol A-Induced Endocrine Dysfunction and its Associated Metabolic Disorders. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2023;23(4):515-29.
84. Mundstock Dias GR, Freitas Ferreira AC, Miranda-Alves L, Graceli JB, Pires de Carvalho D. Endocrine Disruptors Chemicals: Impacts of Bisphenol A, Tributyltin and Lead on Thyroid Function. *Mol Cell Endocrinol*. 2025;599:112467.

85. Yadav SK, Bijalwan V, Yadav S, Sarkar K, Das S, Singh DP. Susceptibility of male reproductive system to bisphenol A, an endocrine disruptor: Updates from epidemiological and experimental evidence. *J Biochem Mol Toxicol*. 2023;37(4):e23292.
86. Frenzilli G, Martorell-Ribera J, Bernardeschi M, Scarcelli V, Jonsson E, Diano N, et al. Bisphenol A and Bisphenol S Induce Endocrine and Chromosomal Alterations in Brown Trout. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:645519.
87. Habibi Farid MS, Saeinia Amirhossein, Nazarnejad Mohammad Mahdi, Abdi Shabnam. The Effect of Bisphenol A on the Histological Parameters of Male Rat Prefrontal Area. *Nutrition and Food Sciences Research*. 2021;Vol 8:51-6.
88. Abd Elaziz, H. O., Laag, E. M. Histological study of the possible protective action of omega-3- fatty acids on the injurious effect induced by Bisphenol A on rat hippocampus. *Egyptian Journal of Histology*. 2018; 41(1), 39-54.
89. Morsy MM, Ahmad MM, Hassan NH. Maternal exposure to low-dose bisphenol A and its potential neurotoxic impact on male pups: A histological, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Tissue Cell*. 2024;90:102.
90. Kobayashi Y, Oguro A, Yagi E, Mitani A, Kudoh SN, Imaoka S. Bisphenol A and rotenone induce S-nitrosylation of protein disulfide isomerase (PDI) and inhibit neurite outgrowth of primary cultured cells of the rat hippocampus and PC12 cells. *J Toxicol Sci*. 2020;45(12):783-94.
91. Yin Z, Hua L, Chen L, Hu D, Li J, An Z, et al. Bisphenol-A exposure induced neurotoxicity and associated with synapse and cytoskeleton in Neuro-2a cells. *Toxicol In Vitro*. 2020;67:104911.
92. Wang S, Ning H, Wang X, Chen L, Hua L, Ren F, et al. Exposure to bisphenol A induces neurotoxicity associated with synaptic and cytoskeletal dysfunction in neuro-2a cells. *Toxicol Ind Health*. 2023;39(6):325-35.
93. Temitope Owoeye Michael, Eghoghosa Akhigbe Roland, Omoyeni Lawal Ebenezer, James Onaolapo Olakunle, Adejoke YO. Neuroprotective Effects of Coenzyme Q10 on Bisphenol-A-Induced Neuroinflammation, Oxidative Stress and Cerebellar Cortex Toxicity In Wistar Rats. *Acta Bioscientia*. 2025;1(1):30-7.
94. Pradhan LK, Sarangi P, Sahoo PK, Kundu S, Chauhan NR, Kumar Das S. Bisphenol A-induced neurobehavioral transformation is associated with augmented monoamine oxidase activity and neurodegeneration in zebrafish brain. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2023;97:104027.

95. Chen Y, Yi Q, Liu G, Shen X, Xuan L, Tian Y. Cerebral white matter injury and damage to myelin sheath following whole-brain ischemia. *Brain Res.* 2013;1495:11-7.
96. Flygt J, Djupsjo A, Lenne F, Marklund N. Myelin loss and oligodendrocyte pathology in white matter tracts following traumatic brain injury in the rat. *Eur J Neurosci.* 2013;38(1):2153-65.
97. Taghyan R.M, Omar H, Abd-Elzaher M, Elghaffar SA. Ameliorative effects of erythropoietin and thymoquinone on vincristine-induced brain toxicity in albino rats. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 2022;68(173), 43-56.
98. Sahoo PK, Aparna S, Naik PK, Singh SB, Das SK. Bisphenol A exposure induces neurobehavioral deficits and neurodegeneration through induction of oxidative stress and activated caspase-3 expression in zebrafish brain. *J Biochem Mol Toxicol.* 2021;35(10):e22873.
99. El-Missiry MA, Othman AI, Al-Abdan MA, El-Sayed AA. Melatonin ameliorates oxidative stress, modulates death receptor pathway proteins, and protects the rat cerebrum against bisphenol-A-induced apoptosis. *J Neurol Sci.* 2014;347(1-2):251-6.
100. Wang C, He J, Xu T, Han H, Zhu Z, Meng L, et al. Bisphenol A(BPA), BPS and BPB-induced oxidative stress and apoptosis mediated by mitochondria in human neuroblastoma cell lines. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;207:111299.
101. Caglayan C, Kandemir FM, Ayna A, Gur C, Kucukler S, Darendelioglu E. Neuroprotective effects of 18beta-glycyrrhetinic acid against bisphenol A-induced neurotoxicity in rats: involvement of neuronal apoptosis, endoplasmic reticulum stress and JAK1/STAT1 signaling pathway. *Metab Brain Dis.* 2022;37(6):1931-40.
102. El Morsy EM, Ahmed M. Protective effects of lycopene on hippocampal neurotoxicity and memory impairment induced by bisphenol A in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2020;39(8):1066-78.
103. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.
104. Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology.* 2014;76 Pt C:677-83.

105. Hyun SA, Ko MY, Jang S, Lee BS, Rho J, Kim KK, et al. Bisphenol-A impairs synaptic formation and function by RGS4-mediated regulation of BDNF signaling in the cerebral cortex. *Dis Model Mech.* 2022;15(7).
106. Li J, Wu D, Mu Y, Wang Y, Zhai L, Jia L. The combined damage of bisphenol A and high fat diet to learning and memory in young male mice: the regulatory effect of BDNF/TrkB/PI3K/AKT pathway on autophagy. *Environ Res.* 2025;276:121538.
107. Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(17):1945-61.
108. Tiwari SK, Agarwal S, Chauhan LK, Mishra VN, Chaturvedi RK. Bisphenol-A impairs myelination potential during development in the hippocampus of the rat brain. *Mol Neurobiol.* 2015;51(3):1395-416.
109. Xu XB, Fan SJ, He Y, Ke X, Song C, Xiao Y, et al. Loss of Hippocampal Oligodendrocytes Contributes to the Deficit of Contextual Fear Learning in Adult Rats Experiencing Early Bisphenol A Exposure. *Mol Neurobiol.* 2017;54(6):4524-36.
110. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(4).

EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Kararı

