

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

**PRENATAL BİSFENOL A VE/VEYA Dİ-2-ETİL HEKZİL
FTALAT MARUZİYETİNİN NÖROENDOKRİN BOZUCU
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Anıl YİRÜN

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2018

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

**PRENATAL BİSFENOL A VE/VEYA Dİ-2-ETİL HEKZİL
FTALAT MARUZİYETİNİN NÖROENDOKRİN BOZUCU
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Anıl YİRÜN

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Belma KOÇER GÜMÜŞEL**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU**

ANKARA

2018

ONAY SAYFASI

PRENATAL BİSFENOL A VE/VEYA Dİ-2-ETİL HEKZİL FTALAT MARUZİYETİNİN NÖROENDOKRİN BOZUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Anıl YİRÜN

Danışman: Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL

İkinci Danışman: Doç. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU

Bu tez çalışması 05.09.2018 tarihinde jürimiz tarafından “ Farmasötik Toksikoloji Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN

Hacettepe Üniversitesi



Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL

Lokman Hekim Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Aylin GÜRBAY

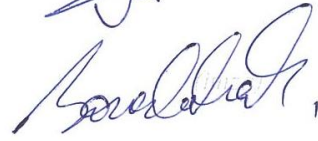
Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Doç. Dr. Gonca ÇAKMAK

Gazi Üniversitesi



Üye:

Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU

Hacettepe Üniversitesi



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

05 Eylül 2018



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir.
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

05/09./2018


Anıl Yirün

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

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



Ecz. Anıl Yirün



TEŞEKKÜR

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

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

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

Deneylerim sırasında bilimsel birikimleri ile yanımda olan ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan Dr. Aylin Balcı ve Dr. Gizem Özkemahlı'ya,

Hayatımın her aşamasında sevgi ve destekleriyle yanımda oldukları ve bana güç verdikleri için Annem, Babam ve Ağabeyime,

Teşekkür ederim.

ÖZET

Anıl, Y. Prenatal Bisfenol A ve/veya Di-2-Etil Hekzil Ftalat Maruziyetinin Nöroendokrin Bozucu Etkilerinin Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018. Bisfenol A (BPA) ve di-2-etil hekzil ftalat (DEHP) çevrede oldukça yaygın olarak bulunan ve endokrin bozucu özellikleri oldukları bilinen kimyasal maddelerdir. Son yıllarda, bu kimyasal maddelere teması bilişsel eksiklikler, yavaş nörogelişim, agresyon ve depresyon insidansında artış, hiperaktivite ve dikkat sorunlarını ilişkilendiren çalışmalar yapılmıştır. Özellikle anne karnındaki maruziyet ile çocukluk dönemindeki maruziyetin etkilerinin çok daha önemli olabileceği ve ciddi sonuçlara yol açabileceği üzerinde durulmaktadır. Ayrıca, gözlenen belirtiler çoğunlukla birden fazla mekanizmanın birlikte etkilenmesiyle ortaya çıkabilir ve özellikle karışım halinde endokrin bozucu kimyasal maddeler (EBK'ler)'e maruziyet sonucunda daha belirgin etkiler oluşabileceği öngörülebilir. Bu tez çalışmasında prenatal ve erken postnatal (laktasyon) dönemde BPA ve/veya DEHP'e maruziyetin (tekli maruziyet ve kontrol grubuna kıyasla) santral sinir sistemi ve nöroendokrin sistem üzerindeki toksik etkileri değerlendirilmiştir. Sprague-Dawley türü gebe sıçanlar kontrol, BPA (50 mg/kg/gün), DEHP (30 mg/kg/gün), BPA ve DEHP (BPA;50 mg/kg/gün, DEHP; 30 mg/kg/gün) olmak üzere dört gruba ayrılmış; gebelik ve laktasyon döneminde oral gavaj yolu ile dozlanmışlardır. Dozlama yapılan gebelerin doğan erkek yavruları randomize olarak seçilmiş; erişkin döneme (12.hafta) ulaştıklarında beyin dokusunda serebrum bölgesindeki nörotransmitter sistemler üzerindeki etkileri ve hipokampus bölgesindeki histopatolojik değişiklikler ve apoptoz oluşumu değerlendirilmiştir. Ayrıca, bu istenmeyen etkilere neden olabilecek mekanizmalardan biri olarak oksidatif stres oluşumu değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular EBK'lere prenatal ve neonatal dönemde maruziyetin beyindeki nörotransmitter sistemler üzerinde dengesizliğe yol açtığını göstermektedir. Ayrıca BPA ve/veya DEHP'e maruziyetin hipokampus bölgesinde apoptoza ve histopatolojik değişimlere neden olduğu belirlenmiştir. Özellikle kombine maruziyetin etkilerinin çok daha belirgin olduğu saptanmıştır. Çalışma gruplarında oksidatif stres oluşumunun da indüklendiği görülmüştür. Bu bulgular, oksidatif stresin EBK'lerin nörogelişimsel etkilerinin altında yatan mekanizmalardan biri olduğunu düşündürmektedir. Tüm sonuçlar, prenatal ve laktasyon döneminde BPA ve/veya DEHP maruziyetinin erkek sıçan yavrularında santral sinir sistemi ve nöroendokrin sistem üzerindeki ters etkilerine işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Bisfenol A, ftalat, nöroendokrin sistem, prenatal maruziyet, oksidatif stres

Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir.
Proje no: TYL-2018-17006

ABSTRACT

Anıl, Y. Evaluation of Neuroendocrine Disrupting Effects of Prenatal Exposure to Bisphenol A and/or di(2-ethylhexyl) phthalate. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Pharmaceutical Toxicology Program, Master Thesis, Ankara, 2018. Bisphenol A (BPA) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) are chemical substances that are widely present in the environment and known to have endocrine disrupting properties. In the recent years, studies have been conducted showing the exposure to this chemical is related to cognitive deficits, slow neurodevelopment, increases in the incidences of aggression and depression, hyperactivity and attention problems. It can be emphasized that the effects of maternal and childhood exposure may be of particular interest and lead to serious consequences. In addition symptoms are often the consequences of multiple mechanisms being affected together, and it can be anticipated that symptoms may be more significant, particularly as a result of exposure to endocrine disrupting chemicals (EDCs) as mixtures. In this thesis, toxic effects of prenatal and lactational exposure to BPA and DEHP mixture (vs. single exposures and vs. control group) on central nervous system and neuroendocrine system have been evaluated. Pregnant Sprague-Dawley rats were divided into four groups as control, BPA (50 mg/kg/day), DEHP (30 mg/kg/day) and BPA plus DEHP (BPA;50 mg/kg/day, DEHP; 30 mg/kg/day) and dosed by oral gavage during pregnancy and lactation periods. The male offspring of born from those rats were chosen randomly and assessed for the effects on the neurotransmitter systems in the cerebrum region, the histopathologic changes and apoptosis formation in the hippocampus region when they reach to adulthood (twelfth week). In addition, the occurrence of oxidative stress was evaluated as one of the mechanisms that could be an underlying factor for these harmful effects. The findings showed that prenatal and neonatal exposure to EDCs led to imbalance of neurotransmitter systems. It was also detected that exposure to BPA and/or DEHP caused apoptosis and histopathologic changes in the hippocampus. In particular, the effects of combined exposures were found to be more significant. Oxidative stress was also induced in the study groups. Therefore, it can be suggested that oxidative stress can be considered as one of the underlying mechanisms for neurodevelopmental effects of EDCs. All results indicate adverse effects of prenatal and lactational exposure to BPA and/or DEHP on the central nervous system and neuroendocrine system in male rat offspring.

Keywords: Bisphenol A, phthalate, neuroendocrine system, prenatal exposure, oxidative stress

This thesis is supported by Hacettepe University Scientific Projects Coordination Unit.

Project no: TYL-2018-17006

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLOLAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler	4
2.1.1. Bisfenol A	7
2.2.2. Ftalatlar	9
2.2. Merkezi Sinir Sistemi	12
2.2.1. Beyin	13
2.3. Nöroendokrin Sistem	15
2.3.1. Hipotalamus	16
2.3.2. Hipofiz	18
2.3.3. Hipotalamus-Hipofiz-Hedef Organ Aksları	18
2.4. Nörotransmitter Sistemler	19
2.4.1. Dopaminerjik Sistem	22
2.4.2. Serotonerjik Sistem	29
2.4.3. Kolinерjik Sistem	31
2.5. Oksidatif Stres	34
2.5.1. Oksidatif Stresin Biyogöstergeleri	35
2.6. Konu ile İlgili Çalışmalar	37
2.6.1. Bisfenol A ile İlgili Çalışmalar	37
2.6.2. Ftalat ile İlgili Çalışmalar	42
2.6.3. Kombine Maruziyet ile İlgili Çalışmalar	43

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	44
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	44
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	45
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	46
3.3.1. Dozlamada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	46
3.3.2. Histopatolojik Analizlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	46
3.3.3. Dopamin Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	47
3.3.4. Dopamin Taşıyıcı Protein Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	48
3.3.5. Serotonin Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	49
3.3.6. Monoamin Oksidaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	49
3.3.7. Asetilkolinesteraz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	50
3.3.8. Lipit Peroksidasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	51
3.3.9. Glutasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	51
3.3.10. Protein Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	52
3.3.11. Doku Homojenatı Hazırlanırken Kullanılan Çözeltiler	52
3.3.12. Apoptotik İncelemelerde Kullanılan Çözeltiler	53
3.4. Deneysel İşlemler ve Yöntemler	53
3.4.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	53
3.4.2. Vücut ve Organ Ağırlıklarının Belirlenmesi	55
3.4.3. Biyolojik Örneklerin Hazırlanması	55
3.4.4. Doku Homojenatlarının Hazırlanması	55
3.4.5. Histopatolojik Analizler	56
3.4.6. Lipid Peroksidasyon Düzeylerinin Ölçümü	57
3.4.7. Total Glutasyon Düzeylerinin Ölçümü	59
3.4.8. Dopamin Düzeylerinin Ölçümü	60
3.4.9. Dopamin Taşıyıcı Protein Ölçümü	62
3.4.10. Serotonin Düzeylerinin Ölçümü	64
3.4.11. Monoamin Oksidaz Aktivite Ölçümü	65
3.4.12. Asetilkolinesteraz Aktivite Ölçümü	66
3.4.13. Protein Miktar Tayini	68
3.4.14. Apoptotik Analizler	69
3.4.15. Verilerin Değerlendirilmesi	70

4. BULGULAR	71
4.1. Beyin-Vücut Ağırlığı Oranı	71
4.2. Histopatolojik Analizler	73
4.2.1. Kontrol Grubu	73
4.2.2. Bisfenol A Grubu	77
4.2.3. Di-2-Etil Hekzil Ftalat Grubu	79
4.2.4. Bisfenol A ve Di-2-Etil Hekzil Ftalat Grubu	82
4.3. Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri	84
4.4. Total Glutasyon Düzeyleri	85
4.5. Dopamin Düzeyleri	86
4.6. Dopamin Taşıyıcı Protein Düzeyleri	87
4.7. Monoamin Oksidaz Aktivitesi	88
4.8. Serotonin Düzeyleri	90
4.9. Asetilkolinesteraz Aktivitesi	91
4.10. Apoptoz Tayini	92
5. TARTIŞMA	101
5.1. Beyin Ağırlıkları	102
5.2. Histopatolojik Analizler	103
5.3. Nöroendokrin Parametreler	104
5.3.1. Monoamin Düzeyleri	104
5.3.2. Dopamin Taşıyıcı Protein Düzeyleri	107
5.3.3. Monoamin Oksidaz Aktivitesi	108
5.3.4. Asetilkolinesteraz Aktivitesi	109
5.4. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi	110
5.5. Apoptotik Analizler	112
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	113
7. KAYNAKLAR	117
8. EKLER	
EK-1: Etik Kurul Onayı	
EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler	
EK-3: Orjinallik Ekran Çıktısı	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-HİAA	5-Hidroksi-indol Asetik Asite
5-HT	Serotonin
ACh	Asetikolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AR	Androjen Reseptörleri
BPA	Bisfenol A
ChAT	Kolin Asetiltransferaz
COMT	Kateşol-O-metiltransferaz
CYP450	Sitokrom P450 Enzimleri
DA	Dopamin
DAT	Dopamin Taşıyıcı Protein
DBP	Di-Bütil Ftalat
DCHP	Disikloheksil ftalat
DEHB	Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu
DEHP	Di(2-etilheksil) Ftalat
DEP	Di-etil Ftalat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DOPAC	3,4-Dihidroksifenil Asetik Asit
EBK'ler	Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler
EPA	Amerika Çevre Koruma Ajansı
ER	Östrojen Reseptörleri
ERα	Östrojen Reseptörü Alfa
ERβ	Östrojen Reseptörü Beta
GSH	Glutatyon
GSK3	Glikojen Sentaz Kinaz 3
HPA	Hipotalamus-Hipofiz-Adrenal Bez
HPG	Hipotalamus-Hipofiz-Gonad
HPT	Hipotalamus-Hipofiz-Tiroit
HVA	Homovanilik asit
LOAEL	Ters Etki Gözlenen En Düşük Doz Düzeyi

LP	Lipit Peroksidasyon
MAO	Monoamin Oksidaz
MDA	Malondialdehit
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NET	Norepinefrin Taşıyıcıları
NMDR	Monotonik Olmayan Doz Cevap İlişkisi
NOAEL	Hiçbir Ters Etki Gözlenmeyen Doz Düzeyi
NSS	Sodyum Simport Taşıyıcı
NTP	Ulusal Toksikoloji Programı
PBB	Polibromlu Bifeniller
PCB	Poliklorlu Bifeniller
RfD	Referans Doz
RNT	Reaktif Azot Bileşikleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SD	Sprague Dawley
SERT	Serotonin Taşıyıcı Protein
SSRI	Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörü
TCDD	Tetraklorodibenzo-p-dioksin
UGT	Üridin Difosfat Glukuronosiltransferaz
VACht	Veziküller Asetilkolin Taşıyıcı
VMAT	Veziküler Monoamin Taşıyıcılar
VTA	Ventral Tegmental Alan

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1	Bisfenol A'nın kimyasal yapısı.	7
2.2.	Ftalatların genel kimyasal yapısı.	10
2.3.	Ftalatların genel biyotransformasyonu.	11
2.4.	Nörotransmitterler ve nöroendokrin sistem arasındaki ilişki.	18
2.5.	Dopaminin kimyasal yapısı.	22
2.6.	Dopaminin biyotransformasyonu.	28
2.7.	Serotonin kimyasal yapısı.	29
2.8.	Kolinerjik nörotransmisyon.	33
2.9.	Asetilkolinin hidrolizi.	34
3.1.	MDA-TBA kompleksinin oluşumu.	58
3.2.	MDA standart eğrisi.	58
3.3.	GSH döngüsü.	59
3.4.	GSSG standart eğrisi.	60
3.5.	Dopamin standart eğrisi.	62
3.6.	DAT standart eğrisi.	63
3.7.	Serotonin standart eğrisi.	65
3.8.	Hidrojen peroksit standart eğrisi.	66
3.9.	Kolin standart eğrisi.	68
3.10.	Protein standart eğrisi.	69
4.1.	Beyin ağırlıkları.	71
4.2.	Rölatif beyin ağırlıkları	72
4.3.	Kontrol grubuna ait hipokampus dokusu ışık mikrofrafı I.	73
4.4.	Kontrol grubuna ait hipokampus dokusu ışık mikrofrafı II.	74
4.5.	Kontrol grubuna ait hipokampusta CA1 bölgesi I.	74
4.6.	Kontrol grubuna ait hipokampusta CA1 bölgesi II.	75
4.7.	Kontrol grubuna ait hipokampusta CA2 bölgesi.	75
4.8.	Kontrol grubuna ait hipokampusta CA3 bölgesi I.	76
4.9.	Kontrol grubuna ait hipokampusta CA3 bölgesi II.	76
4.10.	BPA grubuna ait hipokampus dokusu ışık mikrofrafı.	77
4.11.	BPA grubuna ait hipokampusta CA1 bölgesi.	78
4.12.	BPA grubuna ait hipokampusta CA2 bölgesi.	78

4.13.	BPA grubuna ait hipokampusta CA3 bölgesi.	79
4.14.	DEHP grubuna ait hipokampus dokusu ışık mikrosafı.	80
4.15.	DEHP grubuna ait hipokampusta CA31 bölgesi.	80
4.16.	DEHP grubuna ait hipokampusta CA2 bölgesi.	81
4.17.	DEHP grubuna ait hipokampusta CA3 bölgesi.	81
4.18.	BPA+DEHP grubuna ait hipokampus dokusu ışık mikrosafı.	82
4.19.	BPA+DEHP grubuna ait hipokampusta CA1 bölgesi.	83
4.20.	BPA+DEHP grubuna ait hipokampusta CA2 bölgesi.	83
4.21.	BPA+DEHP grubuna ait hipokampusta CA3 bölgesi.	84
4.22.	Malondialdehit düzeyleri.	85
4.23.	Glutasyon düzeyleri.	86
4.24.	Dopamin düzeyleri.	87
4.25.	Dopamin taşıyıcı protein düzeyleri.	88
4.26.	Monoamin oksidaz-A aktivite düzeyleri.	89
4.27.	Monoamin oksidaz-B aktivite düzeyleri.	90
4.28.	Serotonin düzeyleri.	91
4.29.	Asetilkolinesteraz aktivitesi.	92
4.30.	Hipokampus CA1 bölgesi apoptotik nöron yüzdesi.	94
4.31.	Hipokampus CA1 bölgesi apoptotik hücresi glia yüzdesi.	95
4.32.	Hipokampus CA2 bölgesi apoptotik nöron yüzdesi.	96
4.33.	Hipokampus CA2 bölgesi apoptotik glia hücresi yüzdesi.	97
4.34.	Hipokampus CA3 bölgesi apoptotik nöron yüzdesi.	98
4.35.	Hipokampus CA3 bölgesi apoptotik glia hücresi yüzdesi.	99
4.36.	Deney gruplarında hipokampus dokusuna ait apoptotik inceleme.	100

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
4.1. Ortalama beyin ağırlıkları.	71
4.2. Rölatif beyin ağırlıkları.	72
4.3. Malondialdehit düzeyleri.	84
4.4. Total glutasyon düzeyleri.	85
4.5. Dopamin düzeyleri.	86
4.6. Dopamin taşıyıcı protein düzeyleri.	87
4.7. Monoamin oksidaz-A aktivitesi.	88
4.8. Monoamin oksidaz-B aktivitesi.	89
4.9. Serotonin düzeyleri.	90
4.10. Asetilkolinesteraz aktivitesi.	91
4.11. Hipokampus CA1 bölgesi apoptotik nöron yüzdesi.	93
4.12. Hipokampus CA1 bölgesi apoptotik glia hücresi yüzdesi.	94
4.13. Hipokampus CA2 bölgesi apoptotik nöron yüzdesi.	95
4.14. Hipokampus CA2 bölgesi apoptotik glia hücresi yüzdesi.	96
4.15. Hipokampus CA3 bölgesi apoptotik nöron yüzdesi.	97
4.16. Hipokampus CA3 bölgesi apoptotik glia hücresi yüzdesi.	98

1. GİRİŞ

Endokrin bozucu kimyasal maddeler (EBK'ler), hormonların sentezini ve/veya biyotransformasyonunu değiştirmek, hormon reseptörlerini aktive/antagonize etmek gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla vücudun normal endokrin işlevlerini bozan kimyasal maddelerdir. Bu maddeler altta yatan mekanizma ne olursa olsun sonuçta maruz kalan bireyin endokrin fenotipini değiştirir (1). EBK'ler doğada doğal halde bulunabilecekleri gibi (ör: fitoöstrojenler) endüstriyel kullanım için üretilen birçok farklı sentetik türleri de mevcuttur (2). Bisfenol A (BPA) ve di(2-etilhekzil) ftalat (DEHP) plastizer olarak kullanılan ve çevrede oldukça yaygın olarak bulunan EBK'lerdir (3). Bu maddelerin santral sinir sistemine, özellikle de öğrenme ve hafıza üzerine ters etkileri olduğu bildirilmiştir (4). Son yıllarda, EBK'lere temas ile bilişsel eksiklikler, yavaş nörogelişim, agresyon ve depresyon insidansında artış, hiperaktivite ve dikkat eksikliği sorunlarını ilişkilendiren çalışmalar bulunmaktadır (5-8).

Endokrin bozucu kimyasal maddelerin, beyin gelişimi üzerinde geniş bir aralıkta etki gösterebileceği ve bu etkilerin altında birçok farklı mekanizmanın rol oynayabileceği bildirilmektedir. Bu etkilerin bazılarını nöroendokrin sistem üzerinden gösterebilecekleri üzerinde durulmaktadır (9). Nöroendokrin sistem, fizyolojik ve davranışsal süreçleri düzenlemek için entegre bir şekilde işlev gören nöronlar, bezler, endokrin olmayan dokular ve bunların ürettikleri humoral sinyaller, hormonlar ve nörokimyasalları içeren karmaşık yapıları bir sistemdir (10). Antropojenik kimyasalların nöroendokrin sistem üzerine etki ettiği ve meydana getirdikleri değişikliklerin periferik organ sistemlerini ve fizyolojik süreçleri etkileyebileceğine dair giderek artan sayıda kanıt bulunmaktadır (11-13). Santral sinir sistemi ve nöroendokrin sistem tüm nörotransmitter, nöropeptit ve nörohormon sistemleri ile denge durumunda işlemektedir. EBK'ler mevcut denge durumunu bozarak duygusal, sosyal, davranışsal değişimlere veya nörodejeneratif hasarlara, öğrenme ve hafıza bozukluklarına neden olabilirler (14). Ayrıca santral nöroendokrin sistemin bileşenleri birbiriyle iletişim kurar ve ortaya çıkan çapraz iletişim maruziyetin birden fazla homeostatik sistem üzerinden etkisini arttırabilir. Bu bileşenler hem hormonal sinyalleri kontrol edip hem de bu sinyallere cevap vermeleri nedeniyle EBK'ler için önemli hedeflerdir (15). Çevresel kirleticiler birçok nörokimyasal yolağın işleyişini bozarak bir canlının

üremesini, gelişimini ve büyümesini veya stres ve diğer zorluklarla başa çıkma kapasitesini etkileyebilirler (16).

Maruziyetin sonuçları maruz kalınan doza, maruziyet zamanına ve maruz kalınan maddeye göre değişim göstermektedir. Nöronal hasarlar özellikle sinir sisteminin gelişme dönemlerinde meydana gelen maruziyetlerde daha belirgin olmaktadır (17). EBK'lerin beyinde birden fazla mekanizma üzerinden etki gösterebileceği düşünülebilir. Gözlenen belirtiler (öğrenme güçlüğü, otizm, dikkat eksikliği, hiperaktivite, nörodejeneratif hastalıklar) çoğunlukla birden fazla mekanizmanın birlikte etkilenmesinin ürünüdür ve özellikle karışım halinde EBK'lere maruziyet sonucunda net etkinin değişebileceği düşünülebilir. EBK'lerin toksik etkileri üzerinde çalışırken birden fazla mekanizmanın varlığı ve nöroendokrin eksenin her seviyesindeki çapraz ilişkiler göz önüne alınmalıdır (18). BPA ve ftalat maruziyetinin ayrı ayrı nöroendokrin bozucu etkilerine ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte, aynı anda maruziyetin etkilerini değerlendiren çalışmaların olmadığı saptanmıştır. Özellikle sinir sisteminin gelişme dönemi olan, prenatal ve neonatal dönemde maruziyetin etkilerinin çok daha önemli olabileceği öngörülmektedir.

Bu tez çalışmasında, yaygın kullanılan çevresel kirleticiler olarak tanımlanan ve endokrin bozucu etkileri ile ön plana çıkan BPA ve DEHP'e prenatal dönem ve postnatal (laktasyon) dönemde tek tek ve karışım halinde maruziyetin nöroendokrin bozucu etkilerinin,

- Serebrum bölgesinde dopaminerjik, serotonerjik ve kolinerjik sistem üzerindeki etkilerinin incelenmesi;
- Oksidatif stres parametrelerinin değerlendirilmesi,
- Hipokampus bölgesinde ise histopatolojik incelemeler ve apoptoz oluşumunun irdelenmesi

ile sıçanlarda değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu sayede EBK'lerin etkilerine en duyarlı olduğu bilinen fetal ve neonatal dönemde olası maruziyetin beyin üzerindeki etkileri detaylı olarak incelenebilecektir. Ayrıca BPA ve DEHP'e aynı anda maruz kalınması durumunda ortaya çıkabilecek istenmeyen etkilerin gerek kontrol grubu gerekse tekli maruziyet grupları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi ile fetal ve neonatal dönemde kombine

maruziyetin nöroendokrin bozucu etkileri ve bu etkilerin altında yatan olası mekanizmalar ayrıntılı olarak değerlendirilebilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler

Hormonlar, iç salgı bezleri veya özelleşmiş hücreler tarafından kana salgılanan ve vücudun başka bir bölgesindeki hücrelerin organların işlevlerini düzenleyen, fizyolojik etkisi olan maddelerdir. Endokrin sistem, vücuttaki bu hormon sistemleri, metabolizma, büyüme ve gelişme, su ve elektrolit dengesi, üreme ve davranış gibi hemen tüm vücut işlevlerinin düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Endokrin hormonlar dolaşım sistemi aracılığı ile, bazı durumlarda sinir sistemi de dahil olmak üzere tüm vücut hücrelerine taşınır; burada reseptörlere bağlanarak çeşitli reaksiyonları başlatır. Bazı endokrin hormonlar birden fazla hücre tiplerini etkilerken, diğer hormonlar sadece belirli hedef dokuları etkiler; çünkü sadece bu dokularda hormona özgül reseptörler bulunur (19).

Endokrin bozucu kimyasal maddeler vücutta bulunan ve homeostaz, üreme ve gelişim süreçlerinden sorumlu olan doğal hormonların sentezini ve/veya biyotransformasyonunu değiştirmek, hormon reseptörlerini aktive/antagonize etmek gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla vücudun normal endokrin fonksiyonunu bozan kimyasal maddelerdir. Endokrin işlevlerin bozulması sürecinde altta yatan mekanizmalar ne kadar çeşitli olursa olsun sonuçta bu maddeler maruz kalan bireyin doğal endokrin fenotipini değiştirir (1).

Endokrin bozucu kimyasal maddeler doğada doğal halde bulunabilecekleri gibi (örneğin; fitoöstrojenler) endüstriyel kullanım için üretilen birçok farklı sentetik türleri de mevcuttur. Sentetik EBK'lere örnek olarak poliklorlu bifeniller (PCB), polibromlu bifeniller (PBB), dioksinler, ftalatlar, BPA, pestisitler, fungusitler, bazı ilaç ve farmasötik ürünler gibi farklı kimyasal yapılara ve çok geniş kullanım alanlarına sahip bileşikler verilebilir (2,3).

Endokrin bozucu kimyasal maddelerden bazıları, kullanımlarının üstünden uzun yıllar geçse dahi çevrede ve canlı vücudunda tespit edilebilir. Bu şekilde uzun yarılanma ömrüne sahip kimyasal maddeler insan sağlığı açısından daha uzun süre risk oluşturabilmektedir (20). Uzun yarılanma ömrüne sahip olması bu maddelerin dayanıklılığını artırır ve maddeler akümüle olarak besin zinciri ile aktarılabilir. Ftalat

ve BPA gibi kimyasal maddelerin de kullanımlarının yaygınlığı, yüksek kontaminasyon riski meydana getirmektedir (21,22).

Endokrin bozucu kimyasal maddeler vücudun endokrin homeostazını bozarak canlıların çevreleriyle uyum sağlama yeteneğini değiştirir ve birçok yaşamsal fonksiyonu (metabolizma, büyüme, sıvı dengesinin kontrolü, kardiyovasküler fonksiyonlar, fertilité, nöroendokrin fonksiyonlar vb.) etkilerler. EBK'lerin başlıca nükleer hormon reseptörleri (östrojen reseptörleri (ER), androjen reseptörleri (AR), tiroid reseptörleri vb.), retinoid reseptörler ve diğer hormon reseptörleri aracılığı ile etki gösterdiği düşünülmektedir (4,23,24).

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

Endokrin bozucu kimyasal maddelere maruziyet sonucu görülebilecek etkiler maruz kalma yaşına (fetüs, yeni doğan, çocuk veya yetişkin), maruz kalınan doz ve süreye, maruziyet yoluna (oral, dermal, inhalasyon vb.), aynı anda birden fazla kimyasal maddeye maruz kalma durumuna (kombine maruziyet), gecikmiş etkilere ve bu etkilerin epigenetik modifikasyonlar sonucu sonraki nesillere aktarılabilmesine bağlı olarak değişim gösterirler (2,25).

Maruz Kalınan Doz

Maruz kalınan doz miktarı, tüm ekzojen maddelere maruziyette önemli olduğu gibi EBK'lerin etkilerinin belirlenmesi açısından da oldukça önemlidir. Ancak EBK'lere maruziyet sonucunda ortaya çıkan profil her zaman geleneksel doz yanıt eğrileri (monotonik) şeklinde olmamaktadır. Bu nedenle bazı EBK'ler için düşük dozlarda maruziyet, hedef doku üzerinde yüksek dozlardan daha fazla etki gösterebilmekte ve doz yanıt eğrisi (monotonik olmayan [NMDR], U, ters U gibi) çok farklı şekillerde olabilmektedir. Bu da EBK'lerin etkilerinin anlaşılabilmesini, öngörülebilmesini ve EBK'ler için risk değerlendirmesi yapılmasını zorlaştırmaktadır (26,27).

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

Hormonların düşük dozlarda dahi etki gösterebilmesi, hormon reseptörlerinin düşük dozlardaki hormonları dahi bağlayıp etki oluşturabilecek kadar yüksek affiniteye sahip olmaları ile ilişkili olabilir. Ayrıca reseptör seçiciliği, desensitizasyon ve endokrin sistem içindeki negatif geri bildirim döngülerinin monotonik olmayan doz yanıt ilişkisinin oluşmasında etkili mekanizmalar olduğu düşünülmektedir (29,30).

Maruz Kalma Yaşı

Endokrin bozucu kimyasal maddelere maruz kalınan yaş, ortaya çıkabilecek ters etkiler açısından oldukça önemlidir. Gelişmekte olan organizmalar üzerinde, yetişkinlerde etki gözlenmeyen maruziyet dozlarında dahi olumsuz etkiler gözlenebileceği görülmüştür (1). Embriyonik gelişim döneminde organogenez, doku farklılaşması, biyokimyasal ve moleküler düzeyde ciddi değişiklikler olmaktadır. Bu değişiklikler sayesinde organizma işlevlerini yerine getirebilecek şekilde olgunlaşmaktadır. Dolayısıyla bu dönemde meydana gelebilecek küçük değişiklikler bile çok ciddi sonuçlar doğurabilmektedir (2). Ayrıca, fetüs ve yeni doğanlarda DNA onarım mekanizmalarının, bağışıklık sisteminin, enzim sistemlerinin ve karaciğer metabolizmasının tam gelişmemiş olması nedeniyle yetişkinlere oranla daha hassas oldukları bilinmektedir. Bu fizyolojik durumlar göz önünde bulundurulduğunda erken dönemde EBK’lere maruziyetin toksisiteyi arttırabileceği düşünülebilir (15,31).

Kombine Maruziyet

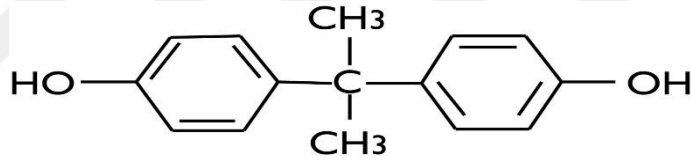
Endokrin bozucu kimyasal maddelere dünya genelinde çok farklı kaynaklardan ve çok yaygın bir şekilde maruziyet söz konusudur. Endüstriyel alanlarda çevresel kontaminasyon sonucu birçok kimyasal madde karışımının yeraltı sularını, toprağı ve havayı kirletmesi mümkün olabildiği gibi, bu kimyasal maddelerin kullanıldığı ürünler ile temasın gerçekleşmesi de insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler meydana

getirebilmektedir. Kullanım alanları ve sıklığı göz önüne alındığında birden fazla kimyasal maddeye aynı anda temasın kaçınılmaz olduğu da açıktır (22,32).

Aynı anda maruziyet ile ortaya çıkan etkinin bu maddelere ayrı ayrı maruziyetle ortaya çıkan etkilerden farklı olacağı öngörülmektedir. Kimyasal maddeler birbirlerinin etkilerini arttırabilir veya azaltabilir. Ayrıca iki madde karışım halinde verildiğinde bu maddelere tekli maruziyet sonucunda görülmeyen farklı etkiler gözlenebilir (33,34). Bu etkilerin mekanizmalarının anlaşılması ve EBK'ler için uygun risk değerlendirme yöntemlerinin uygulanabilmesi için bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.1.1. Bisfenol A

Bisfenoller, polikarbonat ve epoksi reçineleri üretmek için kullanılan geniş bir kimyasal ailesidir. En sık kullanılan türevleri BPA'dır. BPA iki fonksiyonel metil grubu içeren bir metil köprüsü ile birbirine bağlanmış iki fenol halkasından oluşan bir bileşiktir (35). BPA'nın kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı.

BPA, plastik monomeri olarak yemek kapları, bebek biberonları, yapıştırıcılar, boya tozları ve diş hekimliğinde dolgu maddesi olarak kullanılan östrojenik etkili bir endokrin bozucu kimyasal maddedir. 1930'ların başında BPA'nın yapay östrojen olarak kullanımı düşünülmüş, ancak daha etkili olduğu düşünülen dietilstilbesterol (DES) farmasötik kullanımda BPA'ya tercih edilmiştir. BPA, günümüzde dünya genelinde en çok üretilen kimyasal maddelerden biridir. BPA'nın çevrede yaygın olarak bulunduğu bilinmekte ve başlıca maruziyetin diyet ve su ile olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, otomobil, elektronik eşya, spor malzemeleri, CD ve DVD kaplama işlerinde çalışanlarda mesleki maruziyetin de söz konusu olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan, BPA'ya solunum ve deri yoluyla maruziyet de söz konusudur (36). BPA'nın polikarbonat plastikler, epoksi reçineler, gıdalar ve

içeceklerle temas halindeki diğ er ürünlerden sızabildiğı ve bunun sonucunda toplumun genelinin BPA'ya sürekli olarak maruz kaldığı gösterilmiştir. Özellikle BPA içeren gıda kaplama materyalleri ya da yiyecek kapları yanlış kullanım sonucunda yüksek oranda kontaminasyon riski taşır. Ayrıca, mekanik aşınma, sürtme veya yüksek sıcaklığa maruz bırakma gibi eylemler de bu maddelerden BPA salınım riskinde artışa neden olmaktadır (37).

BPA'nın Biyotransformasyonu

Oral yoldan maruz kalınan BPA gastrointestinal sistemden hızla emilmekte, karaciğ er ve bağırsakta ilk geçiş etkisine uğramaktadır. İnhalasyon ya da dermal yol maruziyette ise BPA'nın ilk geçiş etkisine uğramadığı ve daha yavaş atıldığı bildirilmektedir (38).

BPA oral absorpsiyonu takiben, insan karaciğ erinde hızla esas olarak CYP2C18 ve daha az olarak CYP2C19 ve CYP2C9 enzimleri ile metabolize edilir (39). BPA karaciğ erde ve böbrekte faz II reaksiyonları ile aktif olmayan glukronit konjugatları haline dönüşmektedir. BPA glukronit oluşumu üridin difosfat glukuronosiltransferazlar (UGT) tarafından yönlendirilir. UGT enzim aktivitesi yeni doğanlarda erişkinlere göre düşük seviyededir. İnsanlarda ve diğ er birçok türde BPA için ana detoksifikasyon yolu glukuronidasyon olduğundan erken dönemde BPA maruziyetinin erişkin dönemdeki maruziyete göre daha ciddi sonuçlar doğurabileceğı düşünülebilir (40).

Karaciğ erde konjugatlarına dönüşen BPA kana geçmekte ve idrarla atılmaktadır. BPA'nın eliminasyon yarı ömrünün 2-6 saat olduğı ve yaklaşık 42 saatte tamamına yakınının idrarla atıldığı belirlenmiştir (40).

BPA'nın Toksik Etkileri

BPA'nın östrojen reseptörü alfa (ER ) ve östrojen reseptörü beta (ER ) reseptörlerini bağılayarak zayıf östrojenik aktivite gösterdiği bilinmektedir. BPA'nın ER 'ya afinitesi ER 'ya göre 10 kat daha fazladır. Ayrıca bu östrojen reseptörlerine bağılanma kapasitesi estradiole göre 10.000 kat daha düşüktür (41).

Yapılan *in vitro*, *in vivo* ve insan alışmaları BPA'nın insan sağılığı üzerinde çok çeşitli ters etkileri olabileceğini göstermiştir. Bu etkiler arasında BPA'nın

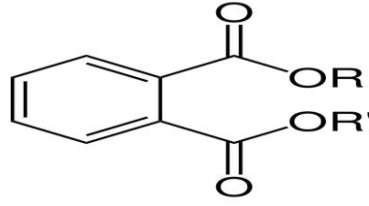
östrojenik ve antiandrojenik etkilerine bağlı olarak görülen üreme ve gelişme problemleri, diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklar, tiroid hormon bozuklukları, oksidatif strese bağlı çeşitli organ hasarları, estradiol düzeyinde artış, sperm motilitesinde azalma, gebelikte maruziyete bağlı düşük doğum ağırlığı, davranış bozuklukları, beyin dokusu hasarı ve otizm gibi çok çeşitli bozukluklar sayılabilir (29, 42-44).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi tarafından geçmişte yapılan çalışmaların verilerine göre, BPA için NOAEL düzeyi 5 mg/kg/gün, üreme sistemi için ters etki gözlenen en düşük doz (LOAEL) değeri ise 50 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir ve bu değer yapılan sonraki çalışmalarla da desteklenmiştir. Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak çocuklar gibi hassas popülasyonlar dahil olmak üzere, yaşam boyu herhangi bir ters etki oluşturmada alınabilecek günlük oral alım düzeyi olan RfD, EPA tarafından 0,0016 mg/kg olarak belirlenmiştir (36,45). BPA'nın sınır düzeylerinin altındaki dozlarda bile ters etkiler gözlenebildiğini gösteren çalışmalar vardır. BPA'nın ters etkilerinin anlaşılması açısından geleneksel doz yanıt eğrilerinin çizilmesi mümkün olmadığından sınır değerlerin belirlenmesi daha zor bir hale gelmektedir (27,46).

2.2.2. Ftalatlar

Ftalatlar, fitalik asit olarak da bilinen 1,2-benzendikarboksilik asitin dialkil veya aril/alkil grupları ile esterleştirilmesi sonucu oluşturulan, ortak bir kimyasal yapıya sahip endüstriyel bileşiklerdir. Kimyasal yapıları Şekil 2.2'de gösterilmiştir (21). Ftalatların fiziksel özellikleri ve bu nedenle uygulama alanları, dialkil veya alkil/aril yan zincirlerinin (esterin alkol kısmı) uzunluğuna ve dallanmasına bağlıdır. Alkil yan zincirlerinin uzunluğuna göre uzun ve kısa zincirli ftalatlar olarak iki sınıfa ayrılırlar. İlk sentezlendikleri 1930'lardan bu yana endüstride çok çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmışlardır (47).

Ftalatlar plastik üretiminde ürünün esnekliğini ve dayanıklılığını arttırmak amacıyla kullanılırlar. Bununla birlikte polivinil klorür (PVC) kaplamalar, gıda ambalajı, boyalar, kişisel bakım ürünleri, tıbbi malzemeler ve farmasötik ürünleri içeren geniş kullanım alanları vardır (48).



Şekil 2.2. Ftalatların genel kimyasal yapısı.

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

Maruziyet

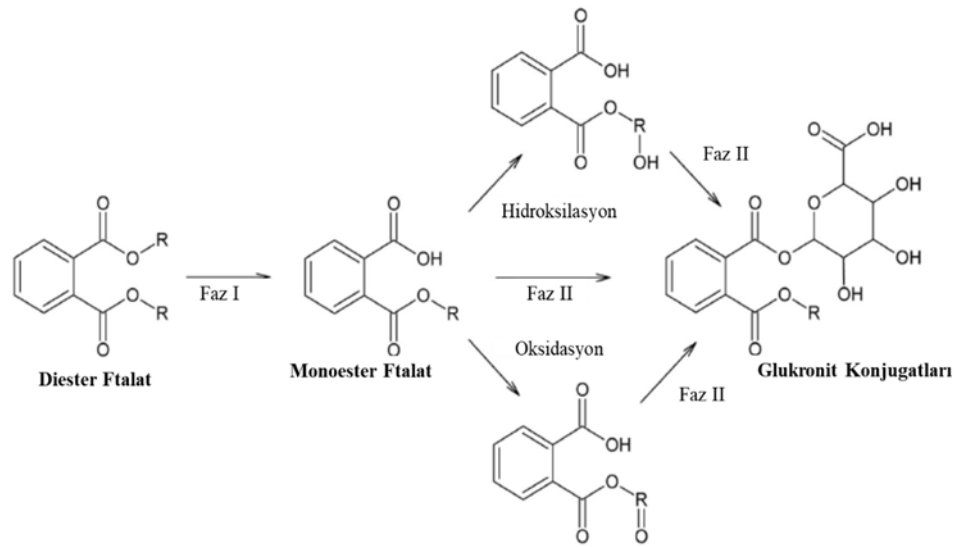
Ftalatlar plastik polimerlerine kovalent olarak bağlı değildir. Bu yüzden kullanıldıkları ürünlerden kolayca çevreye yayılabilirler (49). Yüksek üretim hacimleri, yaygın kullanımları ve çevre kirliliği nedeniyle bu bileşikler oral, dermal ve inhalasyon yollarıyla insanlara ulaşır. Dermal yolla maruziyetin sabun, şampuan ve saç kremi gibi kişisel bakım ürünlerinde bulunan di-etil ftalat (DEP) gibi türler için ana maruziyet yolu olduğu düşünülmektedir. Aksine, esas olarak DEHP gibi plastizör olarak kullanılan ftalatlar için oral maruziyet yolu daha baskındır (47).

Di(2-etilhekzil) ftalat plastizör olarak en yaygın kullanılan ftalat türevidir. 2-etilhekzanolün ftalik anhidrid ile reaksiyonu ile elde edilir. ABD’de popülasyonun DEHP’e maruziyetinin 3–30 µg/kg/gün düzeyinde olduğu tahmin edilmekte, bunun çok önemli bir kısmının besinler yoluyla olması nedeniyle kronik temasın tolere edilebilir düzeyleri aşabileceğinden endişe edilmekte ve maruziyet kaynaklarını ve düzeylerini en aza indirmek için tedbir alınmaya çalışılmaktadır. Nitekim çocukların olası zararlı etkilerden korunması amacıyla oyuncaklarda ve çocuk bakım ürünlerinde DEHP’nin kullanımına, Avrupa Birliğinde ve ABD’de son yıllarda yasak getirilmiştir. DEHP için diğer bir önemli maruziyet yolu ise medikal malzemeler yoluyla parenteral maruziyettir. DEHP, torba esnekliğini, kırmızı kan hücrelerinin sağ kalımını ve trombositlerin depolanması için oksijen geçirgenliğini arttırmak amacıyla plastik kan torbalarına eklenir (50).

Ftalatların Biyotransformasyonu

Ftalatlar vücuda alındıktan sonra hızlı bir şekilde metabolize edilirler. İki adımlı bir metabolik yolu takip ederler. Birinci aşamada diester halinde olan ana

bileşik estrazlar ve lipazlar ile birincil monoester metabolitlerine hidroliz edilirler. Normalde metabolizmadaki bu ilk adım detoksifikasyon amacıyla yapılır, ancak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar monoester ftalatların birçoğunun ana bileşiğe oranla daha aktif olduğunu göstermiştir. Kısa zincirli ftalatlar monoester metabolitleri olarak idrarla atılırken, daha uzun zincirli olanlar farklı biyotransformasyon basamaklarından geçerler. Öncelikle sitokrom P450 enzimleriyle (CYP450) lipofilik alifatik yan zincirlerin oksidasyonuna uğrarlar ve monoester okside metabolitler oluşur. Okside metabolitler daha sonra Faz II reaksiyonları ile glukuronat ya da sülfat konjugatlarına dönüştürülür. Glukuronidasyon sadece ftalat metabolitlerinin idrar atılımını kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda biyolojik olarak aktif olan türün serbest metabolit olması durumunda biyolojik aktivite potansiyelini de azaltır. Bu konjugatlar daha sonra idrar veya feçes yoluyla elimine edilir. Ftalatların biyotransformasyon basamakları Şekil 2.3'te gösterilmiştir (51).



Şekil 2.3. Ftalatların genel biyotransformasyonu.

Ftalatların Toksik Etkileri

Ftalatların toksik etkileri yıllardır incelenmektedir. Akut toksisiteyi oldukça düşüktür ve toksisite profili maruz kalan ftalatın türüne, temas yolu ve temas yaşına göre değişiklik gösterir. Kronik toksisitelerinde ise hedef organlar karaciğer, böbrek, tiroid ve testisler (52-54). En belirgin yan etkilerini üreme sistemi ve normal gelişim süreçleri üzerinde göstermektedirler. Çalışmalarda DEHP maruziyetinin testiküler

disgenез sendromu, anogenital açıklıkta azalma, sperm kalitesinde ve testosteron düzeylerinde düşüş, endometriozis, erken ya da gecikmiş ergenlik gibi çeşitli problemlere neden olduğu gösterilmiştir (55-57). DEHP toksisitesinin altında yatan mekanizmalardan birinin oksidatif stresi indüklemesi olduğu düşünülmektedir (58).

Bu etkilerden farklı olarak ftalat maruziyetinin astım, dikkat bozukluğu, hiperaktivite, meme kanseri, düşük IQ, nörogelişimsel problemler, davranış bozuklukları ve otizm ile ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (17,59-61). Cinsiyet hormonları ve tiroid hormonlarının merkezi sinir sistemi gelişiminde ve cinsiyete bağlı farklılaşmasındaki önemi bilindiğinden ftallatlara ve diğer EBK'lere maruziyetin önemli nörogelişimsel sonuçlar doğurabileceği düşünülebilir (4,15).

2.2. Merkezi Sinir Sistemi

Sinir sistemi, canlının iç ve dış çevresini algılamasına yardımcı olan, bilginin edinilmesini ve edinilen bilginin işlenip depolanmasını sağlayan ve vücut içerisindeki hücreler ağı sayesinde sinyallerin farklı bölgelere iletimini sağlayarak organların ve kasların aktivitelerini düzenleyen bir sistemdir (62). Sinir sistemi morfolojik olarak bütün halinde olsa da anatomik olarak merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki alt bölüme ayrılarak incelenebilir. MSS vücudun kontrol merkezidir ve sinir sisteminin büyük bir bölümünü oluşturur. Organ işlevlerini, bilişsel fonksiyonları ve bedenin hareketlerini düzenler. Beyin ve omurilik olmak üzere iki ana kısımdan oluşur (63). MSS'ni oluşturan yapılar şu şekilde sıralanabilir:

- *Prosensefalon* (Ön beyin)
 - Telensefalon* (Serebrum)
 - Diensefalon* (Ara beyin)
- *Mesensefalon* (Orta beyin)
- *Rombensensefalon* (Arka beyin)
 - Metensefalon* (Pons ve beyincik)
 - Myelensefalon* (Omurilik soğanı)
- Omurilik

2.2.1. Beyin

Beyin canlılarda sinir sisteminin merkezi olarak işlev görür. Omurgalıların vücudundaki en karmaşık organdır. Fizyolojik olarak beynin fonksiyonu vücudun diğer organlarının merkezi kontrolünü sağlamaktır. Ayrıca hafıza, öğrenme, duygusal algılama, hareket, duyguların oluşması, davranışlar ve vücut fonksiyonlarının devamı gibi işlevlerin yerine getirilmesine hizmet eder. Beyin fizyolojik olarak farklı bölümlerden oluşur. Bu bölümlerin çoğu birbiriyle geniş oranda bağlantı halindedir. Bu kısımlardan bazıları aşağıda başlıklar şeklinde işlenmiştir (19,63).

Serebrum

Serebrum beynin en büyük parçasıdır. En dışta bulunan kısım serebral kortekstir ve serebrumun büyük bir bölümünü oluşturur. Bu yapı birbirine simetrik iki ana hemisferden oluşmaktadır ve hemisferler de frontal, parietal, oksipital ve temporal olmak üzere dört loba ayrılır. Birbirinden ayrı bu iki hemisfer *korpus kallozum* isimli beyin bölgesi ile birbirlerine bağlanır. Bu yapı iki hemisfer arasında köprü görevi görür ve sürekli veri akışı sağlar. Ayrıca bazı limbik bölgeler ve bazal gangliyonlar da serebrum yapısı içinde yer alır. İçerdiği fonksiyonel birimler bakımından serebrum, çoğu beyin fonksiyonunun düzenlendiği merkez konumundadır (63,64).

Limbik Sistem

Limbik sistem, *diensefalon* ve *telensefalon* arasında yer alan bazı yapıların oluşturduğu bir sistemdir (63). Eskiden limbik terimi beynin bazal bölgelerinin çevresindeki sınır yapıları tanımlamak için kullanılmıştır. Ancak, limbik sistemin işlevleri daha iyi öğrenildikçe, duygusal davranışları ve motivasyon güdülerini kontrol eden nöron devrelerinin tümünü kapsayan bir anlam kazanmıştır. Bu nedenle limbik sistem serebrumun sağ altında bulunan kortikal doku kısımlarını ve talamusun her iki yanında bulunan amigdala ve hipokampus gibi birbiriyle ilişkili yapıların tümünü tanımlamak için kullanılır (65,66).

Duygular hem fiziksel hem de zihinsel süreçleri içerir. Limbik yapılar, özellikle afektif duyguların (duygudurum) doğasıyla ilişkilidir. Belirli limbik alanların elektriksel yolla uyarılması canlıya doyum sağlarken, başka bölgelerin uyarılması korku, kaçma reaksiyonları veya diğer cezalanma davranışlarını doğurur (19,62).

Limbik sistem sadece duygusal davranışlardan değil, anıların öğrenilmesi ve oluşumu gibi daha yüksek zihinsel işlevlerden de sorumludur. Nörogelişimsel bozukluklar, travmatik beyin hasarı ve nörodejenerasyon dahil olmak üzere beyinde meydana gelen hasarlardan etkilenir. Çoğu psikiyatrik durumda duygu düzenleme, sosyal etkileşim ve davranışla ilgili limbik yapıların işlev bozukluğu söz konusudur (67,68).

Bazal Gangliyonlar

Bazal gangliyonlar, beynin her iki yarısındaki beyin hemisferinin derininde yer alan beş çift çekirdek grubundan oluşur. Bunlar; kaudat çekirdek, putamen, *globus pallidus*, *substansia nigra* ve subtalamik çekirdekleri içerir. Putamen ve kaudat çekirdek birlikte striatumu oluştururlar. Bunlar çoğunlukla talamusun her iki tarafında, serebrumun alt kısmında geniş bir alanı kaplayacak şekilde yerleşmişlerdir (69,70).

Bazal gangliyonların primer etkisi motor fonksiyonlar üzerinedir. Serebral korteks ve omurilik arasındaki ilişkiyi sağlayan pek çok motor sinir lifi bazal gangliyonlarda striatumun arasından geçmektedir. Bu alana beynin internal kapsülü denir (19). Bazal gangliyonlar Parkinson hastalığı patofizyolojisinde de önemli bir yere sahiptir. Orta beyinden köken alan birçok dopaminerjik nöron striatum ile geniş bağlantı kurar. Bunun dışında bazal gangliyonların mental ve duygusal fonksiyonlarla da ilgisi olduğu bilinmektedir (68,71).

Ventral Tegmental Alan

Ventral tegmental alan (VTA) orta beynin tabanında, orta hatta yakın yer alan bir grup nöronlardan oluşmaktadır. VTA nöronları dopaminerjik sistemin önemli bir parçasıdır. Frontal korteksten beyin sapına kadar birçok beyin bölgesi ile bağlantı kurarlar. Bu nedenle motivasyon, bilişsel fonksiyonlar ve bağımlılık patofizyolojisinde etkilidirler ve çeşitli psikiyatrik bozukluklarda önemli rol oynayabilirler. Ayrıca, amigdaladan gelen çeşitli sinyallerin işlenmesini sağlar ve bu sayede ödül ve ceza davranışlarının işlenmesinde de rol alırlar (63,68).

Rafe Çekirdekleri

Rafe çekirdekleri, beyin sapında bulunan orta boyutta bir çekirdek kümesidir. Bu çekirdek kümesi beyinde serotonerjik sistemin köken aldığı yerdir. Seçici serotonin

geri alım inhibitörü antidepresanların bu bölgeyi hedef aldığı düşünülmektedir. Raf çekirdeklerinin MSS üzerinde büyük bir etkisi vardır. Bu çekirdekler beyin hemen hemen her ilgili kısmı ile etkileşime geçer. Omuriliğe inen serotonerjik aksonlar da rafe çekirdeklerinden köken alır. Ayrıca rafe çekirdekleri *suprakiazmatik* çekirdeklerle bağlantı sağlar, böylece canlılarda sirkadiyen ritimlerin oluşmasına katkıda bulunur (72,73).

2.3. Nöroendokrin Sistem

Vücudun üç farklı düzenleyici sistemi vardır; sinir sistemi, endokrin sistem ve bağışıklık sistemi. Bu sistemlerden her biri kendi tipinde kimyasal haberci kullanır. Bu üç sistem bağımsız değildir ve her biri diğer ikisiyle etkileşime girer. Bu sebeple nöroendokrin, nöroimmün ve nöroimmunoendokrin gibi terimler kullanılmaya başlanmıştır (74). Beynin bir endokrin organ olarak işlev gösterdiğinin anlaşılmasıyla birlikte nöroendokrin bilimi gelişmiştir. Hem beyinde hormon salgılarının kontrolü hem de hormonların beyin fonksiyonu üzerindeki etkileri olmak üzere her iki işlev birlikte modern nöroendokrin biliminin kapsamını oluşturmaktadır (10).

Motor nöronların salgıladığı nörotransmitterlerden farklı olarak hormon yapısındaki maddeler (nörohormonlar) sentezleyen ve bu maddeleri sinaptik terminal benzeri yapılar aracılığı ile etkilerini daha uzak bölgelerde gösteren nöronlar vardır. Nöroendokrin hücreler olarak da adlandırılan bu nöronlardan salgılanan maddelerden bazıları hormonların salgılanmasını düzenler; bazıları ise doğrudan hormon olarak işlev gösterir (63). Nöroendokrin sistem, nöronlar, salgı bezleri ve endokrin olmayan dokular ile bunların ürettikleri nörokimyasallar, hormonlar ve humoral sinyaller olarak tanımlanabilir. Bunlar fizyolojik ve davranışsal süreçleri düzenlemek için entegre bir şekilde işlev görür (10). Nöroendokrin entegrasyon sayesinde nöroendokrin sistemler iç ve dış ortamdaki önemli sinyalleri kaydeder, yorumlar, transdüksiyonunu sağlar ve daha sonra fizyolojik ve davranışsal durumları doğrudan bu değişikliklere göre uyarlar. Nöroendokrin sistem, uyaranlara çok hızlı yanıt verebilir ve bu yanıtlar saatler, günler ve haftalar süresince uzayabilir (18).

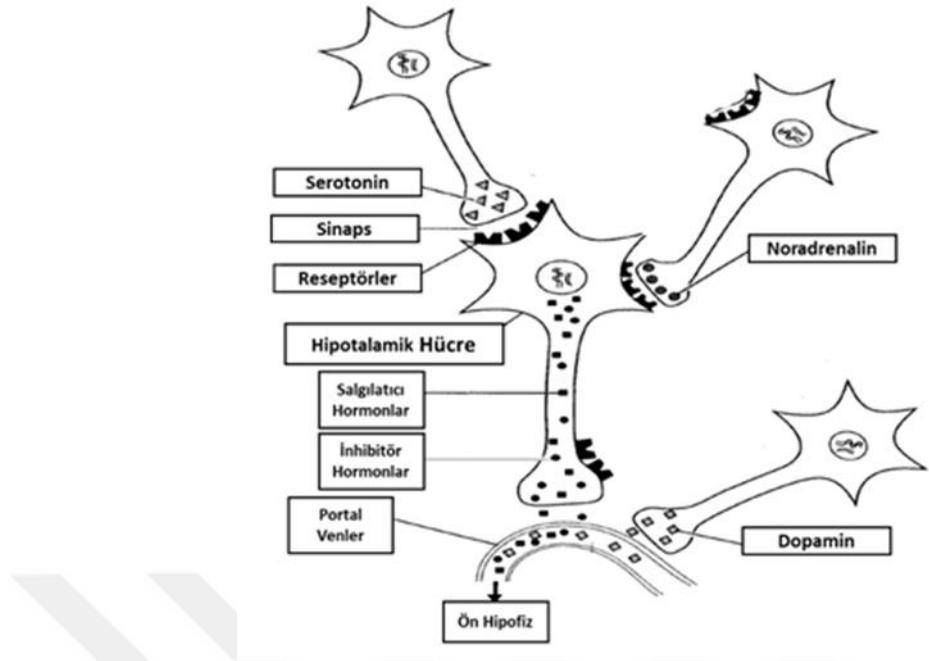
Nöroendokrin sistem, beyin ve periferal endokrin sistem arasında bağlantılar kurarak bir organizmanın normal koşullar altında kendi çevresine yanıt verme yeteneğinde kritik rol oynamaktadır. Homeostaz değişen iç ve dış koşullara karşı

vücudun içsel dengesinin korunmasıdır. Çevreye yönelik endokrin, immün ve sinir sistemi tepkileri üzerinde koordinasyon gerektirir. Nöroendokrin sistem homeostazın korunması konusunda düzenleyici sistemlerden biridir. Nöroendokrin homeostatik sistemler öncelikli olarak hipotalamus, hipofiz ve bir aks üzerinde birlikte çalışan hedef dokuları içerir (14,15).

2.3.1. Hipotalamus

Hipotalamus, hipofiz bezinin endokrin fonksiyonlarını yönetebildiği ve aynı zamanda periferden hormonal sinyaller aldığı *diensefalonun* ön ucunda bulunur. Bu yapı çok çeşitli çekirdek bölgelerine ayrılır. Hipotalamik çekirdeklerin birçoğu nöroendokrin sistemin temel bileşenleri olan, spesifik bütünleştirici ve efektör fonksiyonlara hizmet eden nörohormon ve nörotransmitterleri üreten hücre grupları içerir (62). Hipotalamus ve bunun içinde yer alan nöroendokrin sistem homeostatik işlevlere aracılık etmek için önemli bir entegrasyon merkezi olarak rol üstlenmek üzere gelişmiştir. Hipotalamusun homeostatik fonksiyonları, duyuşal işlem, hafıza ve duyuş ile ilgili beyin bölgeleri tarafından üretilen sinyallerinin işlenip humoral sinyallerle entegre edilmesini gerektirir. Hipotalamusun hipokampus gibi öğrenme ve bellek ile ilişkili veya amigdala gibi duyuşal durumda kritik derecede önemli olduğu bilinen subkortikal limbik yapıların bir halkası ile bağlanan, efferent ve afferent yollar yoluyla nöral sinyalleri alıp gönderdiği bilinmektedir (10,15). Beyin kütlelerinin %1'den daha azını temsil etmesine rağmen, limbik sistemin kontrol yollarının en önemlilerinden biridir. Vücudun endokrin ve vejetatif işlevlerinin çoğunu ve aynı zamanda pek çok duyuşal davranışı kontrol eder. Hipotalamusun, vejetatif ve endokrin işlevlerinin yanı sıra canlılarda duyuşal davranışlar üzerinde de önemli etkileri vardır. Hipotalamusun ön kısmı genel olarak parasempatik fonksiyonlar, arka kısmı ise sempatik fonksiyonlar ile ilgilidir. Hipotalamustaki otonomik merkezlerin stimülasyonu dolaşım, solunum ve sindirim sistemlerini etkiler. Bu etkiler hipotalamusun uyarılması veya lezyonlarıyla ortaya çıkar. Örneğin, lateral hipotalamusun çift taraflı lezyonları yeme içme dürtülerini azaltır ve aktivitelerin çoğunun kaybına neden olarak aşırı pasifliğe yol açar. Hipotalamusun ventromedyal alanlarının çift taraflı lezyonu ise tam tersi etkiler göstererek aşırı yeme ve içme dürtüleri ile birlikte hiperaktivite görülmesine yol açar (19).

Hipotalamik hormonların salınması, beyindeki sinir hücrelerinden salınan nörotransmitterler tarafından düzenlenir. Nörotransmitterler ayrıca davranışları kontrol eder ve nörotransmitterlerin salınımı dolaşımdaki spesifik hormonlar tarafından kontrol edilir. Böylece, nörotransmitter salınımını kontrol eder, hem de hormonlar nörotransmitterlerin salınımını etkiler (74). Asetilkolin, dopamin, noradrenalin ve serotonin salgılayan sinir hücreleri hipotalamusa bağlantı kurarlar. Bu nörotransmitterlerin hepsi, hipotalamik hücreler üzerindeki reseptörleri uyarır. Merkezi nörotransmitter reseptörlerinin uyarılması, hormonların salınımını düzenler. Böyle bir hormonun dolaşım konsantrasyonunun analizi, dolaylı olarak merkezi reseptör fonksiyonunun bir ölçümü olarak işlev görebilir. Anterior hipofiz bezinden birkaç hormonun salınması, aktivitesi klasik nörotransmitterlerin etkisi ile modifiye edilen hipotalamus içindeki nükleuslar tarafından düzenlenir. Adrenalin salgılayan nöronların hücreleri ara beyindedir ve aksonları ventral hipotalamusta sonlanır (75). Dopamin salgılayan nöronların oluşturduğu intrahipotalamik sistemde ise nöron gövdeleri hipotalamusun arkuat çekirdeğindedir (76). Serotonin salgılayan nöronlar rafe çekirdeklerinden hipotalamusa uzanır (77). Muhtemelen tek bir nörotransmitter spesifik bir hipotalamik hormonun salınımını kontrol etmemektedir. Nörotransmitterler arasındaki etkileşimler, hipotalamik hormonların sentezini ve salınmasını uyarmak için gereklidir. Nörotransmitterlerin nöroendokrin sistem ile ilişkisi Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Nörotransmitterler ve nöroendokrin sistem arasındaki ilişki.

2.3.2. Hipofiz

Hipofiz, beyin tabanında, hipotalamus altında bir çıkıntı şeklinde uzanan endokrin bir bezdir. Beyni örten *dura mater* zarı ile çevrelenmiştir. Hipofiz bezi vücutta çeşitli fonksiyonların yerine getirilmesini sağlayan hormonları üretip salgılayarak vücudun işlevlerini ve homeostazını düzenler. Hipofiz bezinin fonksiyonlarını yerine getirmesi hipotalamus aracılığı ile olmaktadır. Ön hipofiz ve arka hipofiz olmak üzere iki ana bölümden oluşur. Her iki lob da hipotalamus ile bağlantılıdır ve hipotalamustan gelen sinyaller ile fonksiyonları kontrol edilir (62,63).

2.3.3. Hipotalamus-Hipofiz-Hedef Organ Aksları

Hipotalamus ve hipofiz bezinden salgılanan hormonlar portal damarlar yoluyla hedef organlara ulaşır ve bu organların ve periferik endokrin bezlerin fonksiyonlarını düzenler. Hedef organdan ise hipofiz ve hipotalamusa geri dönüşler olur. Tüm bu eksenlerde, deneysel analizler, negatif geri besleme regülasyonunun, sistem içindeki baskın kontrol özelliği olarak işlev gördüğünü ortaya çıkarmıştır (70,74).

Nöroendokrin sistemde başlıca işlev gören hipotalamus- hipofiz-hedef organ aksları şunlardır;

1. Hipotalamus-Hipofiz-Gonad (HPG) Aksı
2. Hipotalamus-Hipofiz-Adrenal Bez (HPA) Aksı
3. Hipotalamus-Hipofiz-Tiroit (HPT) Aksı

Bu aksların işleyişi de nörotransmitterlerin fonksiyonları ile geniş ölçüde bağlantılıdır. Kanıtlar, dopaminerjik, adrenerjik, kolinerjik ve serotonerjik sistemleri içeren beyin nörotransmitter sistemlerinin, bu aksların aktivasyonunda ve / veya inhibe edilmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir;

- Glukokortikoid hormonlar, rafe çekirdeklerinde serotonerjik nöronlarla etkileşir ve birçok kanıt, serotonerjik sistemlerin HPA aksının glukokortikoid negatif geri besleme inhibisyonuna katkıda bulunduğunu ileri sürer.
- Ayrıca, VTA'daki dopaminerjik nöronların ve serebral kortekste de dopamin reseptörü bulunduran birçok nöronun glukokortikoid reseptörü eksprese ettiği gözlenmiştir.
- Bunun dışında düşük serotonin düzeyleri ile ilişkili majör depresif bozukluk ile düşük tiroid hormonu düzeylerinin doğrudan ilişkili olduğu bulunmuştur. Tiroid hormon düzeyleri doğrudan trombosit serotonin düzeyleri ile ilişkilidir. Serotonin, TSH'yi hipofizden serbest bırakmak için bir elçi olarak kullanılır.
- Graves hastalığı ve myastina gravis arasındaki ilişkileri gösteren çalışmalar da HPT aksının işleyişinin asetilkolin düzeyleri ile bağlantılı olduğunu ortaya koymaktadır (78-82).

Santral nöroendokrin organlar ve nörotransmitterler arasındaki bu kuvvetli ilişkiler nöroendokrin sistemin işleyişi açısından nörotransmitterlerin önemini ortaya koymaktadır. Bu ilişki, nöroendokrin sistem fonksiyonun değerlendirilmesi için nörotransmitterlerin incelenmesini gerekli kılmaktadır.

2.4. Nörotransmitter Sistemler

Sinir sistemi hücreleri, elektriksel ve kimyasal sinyallerin hücresel iletimi için anatomik ve fonksiyonel olarak uzmanlaşmıştır. Nöronlar girdileri alır, bilgiyi işler ve bu sayede duyuların algılanması, öğrenme, hafıza, motor ve duygusal cevapların

oluşturulması gibi fonksiyonların yerine getirilmesini sağlar. Nöronlarda meydana gelen stimülasyonlar sonucunda nöronun transmembran potansiyelinde değişim olur ve bu aksiyon potansiyeli olarak iletilir. Bir akson boyunca ilerleyen aksiyon potansiyeline sinir impulsu denir (63). Aksonlar uzunlukları boyunca diğer nöronların dendritleri, hücre gövdeleri veya aksonlarıyla bağlantı kurarlar. İki nöron arasındaki bu bağlantı noktalarına sinaps denir. Bir sinaps presinaptik nöron, postsinaptik nöron ve sinaps aralığı olmak üzere üç elemandan oluşur. Sinir impulsunun geldiği nörona presinaptik nöron, iletilen nörona ise postsinaptik nöron adı verilir (68). Sinapslar nöronlar arasındaki iletim tipine göre kimyasal veya elektriksel olarak adlandırılır. Elektriksel sinapslarda sinaps aralığı küçüktür ve aksiyon potansiyeli presinaptik nörondan doğrudan postsinaptik nörona hücreler arası özel bağlantı yollar (Gap junction) yoluyla iletilir (83). Kimyasal sinapslarda ise sinaps aralığı daha geniştir. Kimyasal iletim, sinyalin bir nörondan diğerine iletildiği en önemli araçtır. Bu tür sinapslarda iletim nörotransmitter olarak adlandırılan kimyasal maddeler tarafından sağlanır. Nörotransmitterler, kimyasal sinaps boyunca bir nörondan başka bir hedef nöron, kas hücresi veya salgı hücresine sinyaller iletirler (19). MSS’de sinyal iletimi için kullanılan sinapsların hemen hepsi kimyasal sinapstır. Bu nedenle nörotransmitterler beyin fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (84).

Bir kimyasal maddenin nörotransmitter olarak kabul edilmesi için dört kriteri yerine getirmesi gerekir (68,75,83-85). Bu kriterler;

1.Nörotransmitterler nöronlarda sentezlenmelidir. Birçok durumda bu presinaptik nöronun nörotransmitter sentezi için gerekli enzimleri içermesi gerektiği anlamına gelir. Birçok nörotransmitter diyetten kolayca elde edilebilen ve dönüşüm için az sayıda biyosentez aşaması gerektiren amino asitler gibi basit prekürsörlerden sentezlenir. Nörotransmitterler genellikle presinaptik nöron terminallerinde sentezlenmekle birlikte peptit yapılı transmitterler gibi bazıları hücre gövdesinde sentezlenir ve sinir terminallerine aktarılır. Bu nöronlar nörotransmitterleri hücre gövdesinden aksonun ucuna taşıyan mikrotübülleri içerir.

2.Maddenin nörotransmisyonunda kullanılacağı zamana kadar presinaptik nöron terminallerinde depolanması gerekir. Bunun için terminal bölgesi nörotransmitterlerin depolandığı vezikülleri içerir. Buna ek olarak nörotransmitterler presinaptik

depolarizasyona tepki olarak, ekzositoz ile, kimyasal veya farmakolojik olarak tanımlanabilir bir formda sinaptik aralığa salınmalıdır. Presinaptik nöron membranı çok miktarda voltaj-bağımlı kalsiyum kanalına sahiptir. Bir aksiyon potansiyeli presinaptik zarı depolarize ettiği zaman, bu kalsiyum kanalları açılır ve kalsiyum iyonu nöron içerisine girer. Kalsiyum iyonları nöron içerisine girdiğinde özel protein moleküllerine bağlanırlar ve nörotransmitterlerin sinaptik aralığa salınmasını sağlar. Sinaptik açıklığa salgılanan nörotransmitter miktarı, giren kalsiyum iyonları sayısı ile doğru orantılıdır.

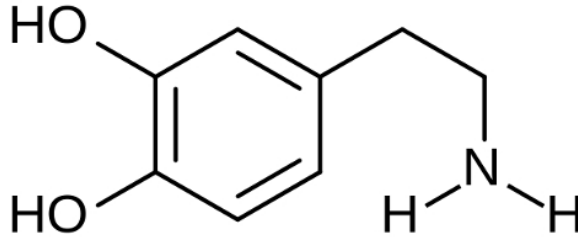
3.Madde için özel reseptörler postsinaptik nöron üzerinde bulunmalıdır. Nörotransmitterler postsinaptik membran üzerindeki özgün reseptörlere bağlanarak nöronun membran potansiyelini değiştirir ve uyarılmasını sağlarlar. Sinaptik reseptörler iyonotropik ve metabotropik reseptörler olmak üzere iki tiptedir. İyonotropik reseptörler, iyon kanallarını doğrudan açarlarken, metabotropik reseptörler iyon kanalları üzerinde dolaylı etki gösterirler. Diğer bir deyişle, iyonotropik reseptörlerde spesifik nörotransmitterlerin tanınması ve efektör moleküllerin aktivasyonu tek bir molekül üzerinden fonksiyon gösterirken; metabotropik reseptörlerde bu iki olay farklı moleküller üzerinden olmaktadır. Bu moleküller G-proteini ile eşleşmiş reseptörler ve tirozin kinaz reseptörleri olmak üzere iki grupta toplanabilir.

4.Söz konusu nörotransmitterlerin etkilerini sonlandırmak için uygun, aktif mekanizmalar mevcut olmalıdır. Bu mekanizmalar enzimatik degradasyon veya maddenin spesifik moleküller aracılığı ile presinaptik nöron veya glialar içine geri alınmasıdır.

Nörotransmitterlerin tam sayısı bilinmemekle birlikte günümüzde 40'tan fazla nörotransmitter madde tam olarak tanımlanmıştır. Dopamin, serotonin ve asetilkolin küçük moleküllü nörotransmitterlerdir ve beyin fonksiyonları açısından en önemli nörotransmitter maddeler arasında kabul edilmektedirler (86).

2.4.1. Dopaminerjik Sistem

Dopamin (DA) ve benzer moleküler yapılar sahip diğer bileşikler (norepinefrin ve epinefrin), kateşolaminler grubuna aittirler ve nörobiyolojide sıklıkla biyojenik aminler veya monoamin nörotransmitterler olarak isimlendirilirler. DA (3,4-dihidroksifenilalanin), iki hidroksil süstitüsüyonu bulunan bir benzen halkası (kateşol çekirdeği) ve bu halkaya bağlanmış bir aminoetil grubu içeren endojen bir bileşiktir. Dopaminin kimyasal yapısı Şekil 2.5'te gösterilmiştir (86).



Şekil 2.5. Dopaminin kimyasal yapısı.

3,4-dihidroksifenilalanin

Dopamin, MSS'nde önemli rol oynayan bir nörotransmitterdir ve bilişsel fonksiyonlar, motor aktivite, öğrenme, dikkat, ruh hali, motivasyon ve ödül sistemi dahil olmak üzere bir dizi fizyolojik düzenlemeye aracılık eder (87). Birçok çalışma DA'nın hayvanlarda ödüllendirici davranışlarla ilgili uyaranlara tepki olarak arttığını ve bunun sonucunda oluşan motivasyon ve dikkat süreçlerinde etkili olduğunu göstermiştir (88-90). Ek olarak DA doğal ve yapay ödül yanıtlarının entegrasyonunu sağlaması nedeniyle bağımlılık ve ilaç suistimali patofizyolojilerinde önemli rol oynar (91,92). Dopaminerjik sistemin beyin bölgelerindeki kapsamlı lokalizasyonu ve sahip olduğu geniş fonksiyon yelpazesi nedeniyle, dopaminerjik nörotransmisyonunda meydana gelen işlev bozuklukları, şizofreni, duygudurum bozuklukları, obsesif kompulsif bozukluk, otizm spektrum bozukluğu, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB), Tourette sendromu, Parkinson hastalığı, madde bağımlılığı ve diğer pek çok hastalığın patofizyolojisinde rol oynamaktadır (93).

Dopaminerjik nörotransmisyon çeşitli proseslerin aynı anda işlevini gerektirir ve bu süreçler birbirine sistematik olarak bağlı olduğundan bir işlemde meydana gelen

değişiklik dopaminerjik nörotransmisyon ve buna bağlı fizyolojik süreçler üzerinde etkili olabilir (85,86). Bu süreçler;

- 1) DA'nın öncül moleküllerden sentezi ve sinaptik veziküller içinde depolanması
- 2) Dopaminerjik nöronların uyarılmasını takiben DA'nın sinaptik veziküllerden nöron dışına salınması
- 3) Hedef reseptör veya proteinlerle etkileşmesi ve sinyal iletiminin düzenlenmesi
- 4) DA'nın sinaptik proteinler yardımıyla geri alınması veya biyotransformasyon yoluyla etkinin sonlandırılmasıdır.

Dopaminerjik nöronların büyük çoğunluğu tek bir embriyolojik hücre grubundan gelişir (88). MSS'de üretilen DA'nın çoğunluğu orta beyinde (*mezensefalon*) üretilir. Dopaminerjik nöronlar beynin bu bölümünde *retrobulbar* bölge (A8), substansiya nigra (A9), ventral tegmental alan (A10) civarında konsantre durumdadırlar. Bu nöronlar ön beyinde kaudat/putamen çekirdeğinin bulunduğu dorsal striatum, nükleus akkümbens, ventral striatum, limbik bölgeler (amigdala, hipokampus) ve çeşitli kortikal bölgelere doğru geniş bağlantılar kurmaktadır (68,94). Beyinde dört adet büyük dopaminerjik yolak vardır (91,95,96). Bunlar;

•**Nigrostriatal yolak:** Bu yolak ekstrapiramidal sinir sisteminin bir parçası olarak motor hareketleri kontrol eder. Substantia nigra'da bulunan nöronlar tarafından üretilen DA dorsal striatuma gönderilir. Bu yolda meydana gelen dejenerasyonlar rijidite, bradikinezi ve tremor ile karakterize Parkinson hastalığının başlıca nedenidir. Yolağın hiperaktivitesi ise kore, diskinezi ve tikler gibi çeşitli hiperkinetik bozukluklara neden olur.

•**Mezolimbik yolak:** Ventral tegmental bölgedeki dopaminerjik nöronlardan başlar ve amigdala, prefrontal korteks ve *nükleus akkümbens*'e doğru yayılır. Bu yolda DA'nın ödül sistemi ve duygudurum üzerinde fonksiyonu vardır. Mezolimbik yoldaki DA'nın ödüllendirici uyarıların hedonik yönlerine aracılık ettiği ve davranışsal pekiştirme için bir öğrenme sinyali olarak davrandığı öne sürülmüştür.

•**Mezokortikal yolak:** Ventral tegmental alandaki hücre gövdelerinden köken alan dopaminerjik nöronlar frontal korteks ve hipokampal bölgelere doğru yayılır. Bu

yolak bilişsel fonksiyonlar ve duygusal davranışlar üzerine etki eder. Frontal korteksin *dorsolateral* bölgesine uzanan dalların bilişsel ve yürütücü işlevleri kontrol ettiği varsayılırken, ventromedyal kısmına uzanan dalların duyguları ve afekti düzenlediği düşünülmektedir. Bu bölgelerdeki dopamin seviyeleri, çalışma belleğinin, hafızanın ve dikkatin geliştirilmesine yardımcı olur. Bununla birlikte beyinde dopamin hassas bir denge durumundadır ve seviyelerin fazla artması veya azalması durumunda hafıza dahil olmak üzere tüm bilişsel fonksiyonlarda gerileme gözlenir.

•**Tuberoinfundibular Yolak:** Hipotalamustaki arkuat çekirdekten orijin alır ve hipofiz bezine doğru yayılır. Bu yolakta DA hipofizden prolaktin salınımını inhibe eder. DA, ön hipofiz bezinden prolaktin salınımının ana nöroendokrin inhibitörüdür. Bu yolaktaki nöronların çalışması bozulursa prolaktin seviyeleri yükselerek galaktore, amenore ve cinsel işlevlerde bozulma gibi sorunlara neden olabilir.

Dopaminerjik nöronlar, hücre dışı boşluktan ve kandan nöron içerisine bir tirozin pompası kullanarak alınan tirozin aminoasidinden hareketle DA sentezler ve kullanırlar. Tirozin hidroksilaz enzimi tirozinin meta pozisyonundan hidroksil grubu eklenmesini katalize ederek L-DOPA oluşturur. Fizyolojik tirozin konsantrasyonunda genellikle tirozin hidroksilaz enzimi doymuş durumdadır ve tirozin konsantrasyonunun artması DA sentezini arttırmaz. Bu sebeple tirozin hidroksilaz enzimi DA sentezinde hız kısıtlayıcı basamaktır. Tirozin hidroksilaz enzimi orta düzeyde substrat spesifitesine sahiptir. Sadece tirozini değil fenilalanini de hidroksiller. Bu sebeple fenilalanin hidroksilaz enziminin baskılandığı fenilketonüri gibi durumlarda DA sentezinde azalma meydana gelir. Dopaminerjik nöronların aktivasyonu tirozin hidroksilaz aktivitesinde artışa neden olur ve dopaminerjik nörotransmisyon yükselir. Tirozin hidroksilazın kısa süreli regülasyonu, translasyonel seviyeler boyunca gerçekleşirken, tirozin hidroksilaz aktivitesinin uzun süreli regülasyonu, genin transkripsiyonel regülasyonu yoluyla gerçekleşebilir. Tirozinden meydana gelen L-DOPA daha sonrasında dopa dekarboksilaz olarak da anılan aromatik L-amino asit dekarboksilaz enzimi ile DA'ya dönüştürülür. DA kan-beyin bariyerini daha zor aştığından özellikle Parkinson hastalığı tedavisinde hastalara L-DOPA verilir (75,86,95).

Veziküler Monoamin Taşıyıcılar (VMAT)

Monoaminerjik nöronlarda sitozolik monoaminlerin sinaptik veziküllerde depolanmasından veziküler monoamin taşıyıcılar (VMAT) sorumludur. DA sentez sonrasında VMAT ile sinaptik veziküllere alınır ve nörotransmisyonunda kullanılabilmek için depolanır (97). VMAT, SLC-18 gen ailesine aittir ve VMAT 1 ve VMAT 2 olmak üzere iki tip taşıyıcı belirlenmiştir. VMAT 1 genellikle nöroendokrin hücrelerde, VMAT 2 ise MSS'de eksprese edilir. VMAT'ın substratlarına afiniteleri oldukça yüksektir ve sitozolik monoamin konsantrasyonları çok düşük olsa bile vezikülleri etkin bir şekilde doldurabilir (86). Bütün klasik nörotransmitterlerin sinaptik veziküllere taşınması veziküler H⁺/ATPaz tarafından oluşturulan elektrokimyasal gradyanın itici gücüne ($\Delta\mu H^+$) bağlıdır. VMAT dopaminerjik nörotransmisyonun sürekliliği açısından önemli bir yere sahiptir. Sinaptik iletimin hızı ve gücü, aksonal uyarı geldiği anda, yüksek konsantrasyonda nörotransmitter ile doldurulmuş sinaptik veziküllerin mevcudiyetine bağlıdır (97). Ek olarak VMAT 2'nin, hem orta beyin nöronları ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında hem de farelerde nöronal hasara karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Rezerpin ve ilgili bileşikler depolama keseciklerine DA alımını inhibe ederler ve mevcut DA depolarını tüketirler. Bu şekilde nöronal olarak depolanmış DA'nın tükenmesi nedeniyle insanda depresyona neden olurlar (98).

Dopamin Taşıyıcı Protein (DAT)

Dopamin taşıyıcı protein (DAT) dopaminerjik nöron terminallerinin plazma membranından bulunan ve DA'yı membrandan içeri taşıyan proteindir (99). DA'nın sinaptik etkisi bu pompayla, bir başka nörotransmisyonunda kullanılacağı presinaptik sinir terminaline geri alınmak ve depolanmak suretiyle sonlandırılır. Bu DA'nın sinaptik etkisini ortadan kaldıran mekanizmalardan biridir (95). DAT protein moleküler düzeyde 620 aminoasitten 12 transmembran bölgeden oluşur. DAT proteinini kodlayan ve eksprese edilen protein miktarını etkileyen DAT 1 geni insanda 5. kromozom üzerinde bulunur ve 15 kodlama ekzonundan oluşur. Bu gen genetik olarak polimorfiktir ve VNTR olarak bilinen bu polimorfizm tipinde DAT ekspresyonu azalmıştır. DAT işlevi, plazma üzerinde DAT ekspresyonunu sıkı bir

şekilde modüle eden protein kinaz A, protein kinaz C, tirozin kinazlar, fosfatazlar, kalsiyum bağımlı kinazlar dahil bir dizi hücrel sinyal yolu ile düzenlenir (100).

Dopamin taşıyıcı protein, diğer klasik nörotransmitter taşıyıcılar gibi nörotransmitter sodyum simport taşıyıcı (NSS) grubuna dahildir. DA'nın taşınması sodyum gradyanına bağlı olarak gerçekleşir ve süreç *Michaelis-Menten* kinetiğine uygun olarak gerçekleşir. Alım süreci enerjiye bağlı olduğundan düşük sıcaklıkta veya metabolik inhibitörlerle inhibe edilebilir (86,101).

Dopamin taşıyıcı protein sinaptik DA'ı nöronlara alarak DA'nın nörotransmisyonunu sonlandırmada ve MSS'nde DA homeostazını sürdürmede kritik rol oynar (99). MSS'de normal nörolojik fonksiyonu korur. Dopaminerjik nörotransmisyondaki yaşlanmaya bağlı değişikliklerin, azalan DAT ekspresyonunun bir sonucu olabileceği düşünülmektedir (102). Ayrıca DAT sadece hücre dışı DA sinyalinin büyüklüğünü ve süresini kontrol etmekle kalmaz, aynı zamanda hücre içi DA seviyelerini de korur. DAT ekspresyonunun baskılandığı farelerde DA sentezinde bir artışa rağmen depolanmış DA seviyelerinde %95 azalma olduğu görülmüştür (103).

Dopamin taşıyıcı protein bipolar bozukluk, DEHB, klinik depresyon ve alkolizm de dahil olmak üzere bir dizi DA ile ilişkili bozuklukta rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar, DAT geni baskılanmış farelerde hiperdopaminerjiyi takiben DA reseptör regülasyonunun bozulduğunu göstermiştir ve bunun DEHB patofizyolojisinde rol oynayabileceği düşünülmüştür (104). Sitolik DA uygun bir şekilde veziküllerde depolanmayıp uzun süre sinaptik aralıkta kalması durumunda enzimatik reaksiyonlar yoluyla toksik ara maddeler üretebilir. Bu yönde yapılan çalışmalar sinaptik aralıkta DA birikiminin oksidatif stres ve nörotoksiteyi tetikleyebileceğini ileri sürmüştür (105,106). DAT ayrıca bağımlılık yapan ilaçlar ve daha az ölçüde antidepresan ilaçlar için moleküler bir hedeftir. Kokain gibi bileşikler DAT tarafından taşınmazlar, fakat taşıyıcıya bağlanarak bloke ederler. Amfetaminler ise DAT etrafındaki elektrokimyasal gradyanı değiştirerek taşınma yönünü değiştirir. Bu sayede DAT sinaptik boşluktaki DA'yı geri almak yerine veziküllerdeki DA'nın salınmasına neden olur (99).

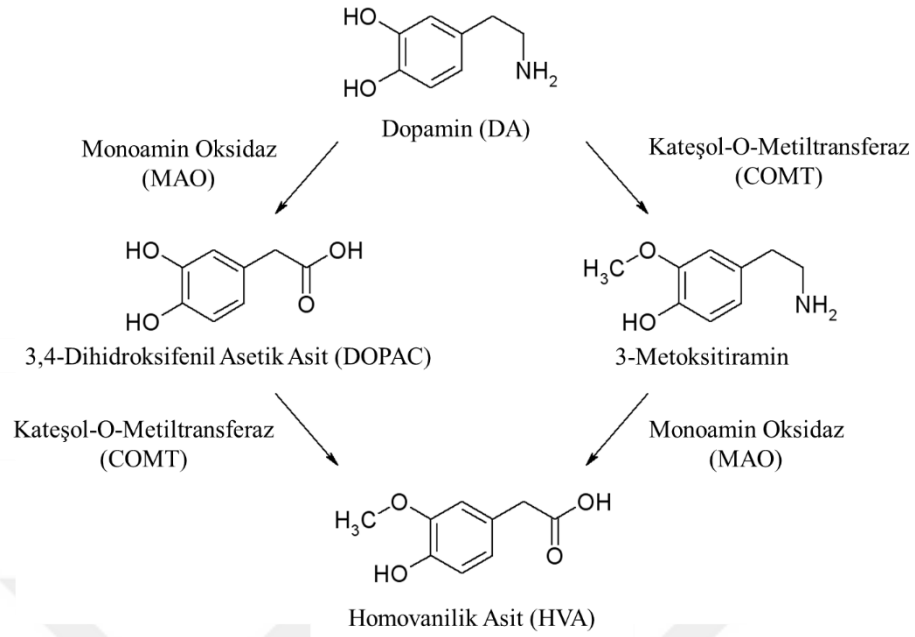
Ayrıca DAT sadece dopaminerjik nöronlarda eksprese edildiği için dopaminerjik nöron yoğunluğunu gösteren özgül bir belirteçtir. Her dopaminerjik

nöronun akson uçlarında DAT'lar aynı yoğunlukta bulunmamaktadır. Örneğin prefrontal kortekste DAT yoğunluğu göreceli olarak azdır ve DA ya enzimatik yollarla inaktive edilir ya da sinapsların uzağına sızan DA norepinefrin taşıyıcıları (NET) tarafından bir yalancı substrat olarak kabul edilerek geri alınır (95).

Monoamin Oksidaz (MAO)

Dopamin katabolizmasında monoamin oksidaz (MAO) ve kateşol-O-metiltransferaz (COMT) olmak üzere iki majör enzim rol oynar (86). MAO enzimleri beyinde kateşolaminler gibi biyojenik aminlerin parçalanmasında rol oynayan birincil enzimdir. Hem endojen hem de ekzojen aminlerin oksidasyonunu sağlar (107). MAO'ların inhibitör duyarlılığına ve substrat spesifitesine göre MAO-A ve MAO-B olmak üzere iki izoformu vardır. Her iki izoform da nöronlarda mitokondrinin dış membranı ile bütünleşik olarak bulunur. MAO-A ve MAO-B %70 oranında benzer amino asit dizilimi taşır ve her iki enzim de izoaloksazin halkasının 8 α -metileni yoluyla enzimdeki sistein grubuna kovalent olarak bağlanmış bir flavin adenin nükleotit (FAD) kofaktörü içerir (108). Her iki enzimin beyinde dağılımları değişim gösterir. MAO-A kateşolaminerjik nöronlarda bolca bulunurken, MAO-B serotonerjik nöronlar, astrositler ve glialarda bulunur. Beyinde MAO-A'nın en yüksek konsantrasyonda bulunduğu bölüm *loqus serelus*, MAO-B'nin en yüksek konsantrasyonda bulunduğu yer ise rafe çekirdekleridir (109).

Dopaminin MAO ile oksidasyonu sonucunda 3,4-Dihidroksifenil asetik asit (DOPAC) oluşur. DOPAC daha sonra aldehit dehidrogenaz ve COMT ile girdiği reaksiyonlar sonucunda homovanilik aside (HVA) dönüşür. DA'nın biyotransformasyonu Şekil 2.6'da gösterilmiştir. DOPAC'in DA'ya oranı DA metabolizmasının hızını gösterirken DA metabolitleri (DOPAC ve HVA) düzeylerindeki değişiklikler MAO aktivitesindeki değişiklikleri yansıtmaktadır. Dopaminerjik nöronal aktivite, DOPAC+HVA/DA oranının hesaplanması ile bulunabilir. DA devir hızındaki değişimleri gösteren bu oranın, bir takım patolojik durumlarda veya ilaç tedavisi esnasında değiştiği bulunmuştur (86).



Şekil 2.6. Dopaminin biyotransformasyonu.

Dopamin Reseptörleri

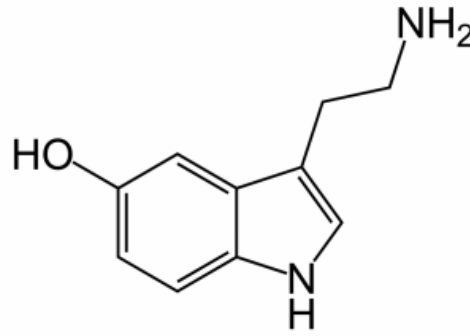
Enzimatik olarak yıkılmayan ve presinaptik hücreye geri taşınmayan DA reseptörleri aktive edebilir. DA reseptörleri DA'nın ve DA bileşenlerinin etkilerini farklı sinyal iletimi mekanizmaları ile düzenlerler. Bunlar içerisinde en önemlisi siklik AMP'nin uyarılması veya baskılanması ile sonuçlanan adenilat siklaz aktivitesinin düzenlenmesidir (110).

Beş farklı DA reseptörü alt tipi (D1, D2, D3, D4, D5) vardır. Bunların hepsi G-protein bağlı reseptör ailesinin bir üyesidir (111). 1979'da DA'in etkinin birden çok reseptör alt tipi ile oluştuğu gösterilmiş ve D1, D2 olmak üzere iki ana reseptör tipi tanımlanmıştır. Bu iki reseptör farklı bağlanma afinitesine, etki mekanizmalarına ve sinir sistemindeki dağılımlarına göre birbirlerinden ayrılmışlardır. Daha sonra keşfedilen D3 ve D4 reseptörleri yapı, farmakoloji ve birincil etki mekanizmalarına göre "D2-benzeri" olarak, D5 reseptörü ise "D1-benzeri" olarak adlandırılmıştır (110).

Dopaminin hedef nörona etkisi hedef nöronun membranından hangi tip reseptörlerin olduğuna bağlıdır. D2-benzeri reseptörler limbik sistemde duygudurum, motivasyon ve duygusal istikrarı ve bazal gangliyonda hareket kontrolünü düzenler. D1-benzeri reseptörler ise hafıza ve dikkat gibi kognitif fonksiyonlarda etkilidir. Genel olarak D1-benzeri reseptörler adenilat siklaz aktivitesini ve cAMP oluşumunu uyarırken, D2-benzeri reseptörler baskılar (111).

2.4.2. Serotonerjik Sistem

Serotonin (5-Hidroksitriptamin, 5-HT) indolamin yapısında bir bileşiktir ve monoamin nörotransmitterlerden biridir. Serotoninin kimyasal yapısı şekil 2.7’de verilmiştir (86). MSS’de serotonerjik nöronların hücre gövdeleri beyin sapındaki rafe çekirdeklerinde bulunmakta ve buradan çıkan sinir lifleri yukarı doğru talamus, hipotalamus, limbik sistem ve neokortekse doğru yayılmaktadır (62). Ayrıca, serotonerjik nöronlar aşağı doğru omuriliğe uzanırlar ve ağrı başta olmak üzere duyuşal sinyallerin inhibisyonunu kontrol ederek regülasyonunu sağlarlar (19).



Şekil 2.7. Serotonin kimyasal yapısı.

5-hidroksi triptamin

Serotonerjik nörotransmisyon belirli prosesleri içerir ve bu prosesler dopaminerjik nörotransmisyon ile büyük oranda benzerlik gösterir. Serotonerjik nörotransmisyonda etkili olan süreçler;

1) Öncelikle serotoninin öncül moleküllerden sentezi ve sinaptik veziküller içinde depolanması gereklidir. 5-HT, triptofan amino asitinden hareketle sentezlenir. Triptofan bir plazma membran taşıyıcısı ile serotonerjik nöronlara alınır ve triptofan hidroksilaz enzimi tarafından katalize edilen bir reaksiyon ile 5-HT’ye dönüştürülür (85,112). Triptofan hidroksilaz enzimi 5-HT sentezi için hız kısıtlayıcı basamaktır, ancak DA sentezinden farklı olarak triptofan hidroksilaz enzimi genellikle fizyolojik triptofan konsantrasyonlarında doygun durumda değildir. Bu nedenle beyin triptofan düzeyindeki değişiklikler 5-HT üretiminde değişime neden olur (113). Triptofandan meydana gelen 5-HT daha sonra aromatik-L-amino asit

dekarboksilaz enzimi ile serotonine dönüştürülür (75). Serotonerjik nöronlarda sentezlenen 5-HT daha sonra dopaminerjik nöronlarda olduğu gibi veziküler monoamin taşıyıcılar ile alınarak sinaptik veziküllerde depolanır. MSS'de bulunan serotonerjik nöronlarda VMAT 2 eksprese edilirken, gastrointestinal sistemdeki serotonin salgılayan enterokromafin hücrelerde çoğunlukla VMAT 1 eksprese edilir (85,97).

2) Serotonerjik nöronların uyarılmasını takiben serotonin sinaptik veziküllerden nöron dışına salınır ve hedef reseptör ve proteinler ile etkileşerek sinyal iletimini düzenler. Serbest bırakıldıktan sonra 5-HT, 15 üyeli serotonin reseptör ailesindeki reseptörlere bağlanarak etki gösterir. Bu reseptörler içinde 5-HT₃ reseptörü haricinde hepsi G-proteini bağımlı membran reseptörüdür (114,115).

3) Nörotransmisyonunda işi biten 5-HT'in etkisi serotonin taşıyıcı protein (SERT) tarafından sinaps içine geri taşınmak suretiyle sonlandırılır. SERT, serotonerjik sistemde hayati öneme sahiptir. Seçici serotonin geri alım inhibitörü (SSRI) antidepresan ilaçlar, SERT fonksiyonunu bloke ederek serotoninin nörotransmisyonunda kalış süresini uzatırlar (86,112).

4) Sinaps içerisine geri alınmayan 5-HT'in etkisinin sonlandırılması biyotransformasyon yoluyla olur. Serotonin biyotransformasyonu başlıca MAO enzimleri, özellikle de MAO B izoformu ile gerçekleşir (109). Serotonin oksidasyon sonucu 5-hidroksi indol asetaldehite dönüşür. Oluşan bu molekül daha sonra aldehit dehidrogenaz enzimi ile serotoninin ana metaboliti olan 5-hidroksi-indol asetik asite (5-HIAA) dönüşür (112).

Serotonin, nöroenez ve olgunlaşma ile ilgili erken gelişimsel olaylardan, hücre ölümünün altında yatan apoptoza ve nörodejenerasyona kadar uzanan, insan yaşamının merkezinde yer alan birçok biyolojik süreçte yer alır. Serotonerjik sistemin erken dönemde embriyogenez sırasında oluştuğu ve ilk oluşan serotonerjik nöronlar tarafından sürdürülen serotonin nörotransmisyonunun beyin gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (112).

Bir nörotransmitter olarak serotonin vücut ısısının kontrolü, uykunun düzenlenmesi, iştah, ağrı ve motor aktivite gibi birçok önemli fizyolojik süreci düzenler. Aynı zamanda biliş ve duygusal davranışlar da dahil olmak üzere, beyin

fonksiyonlarına yardımcı olur (115-117). 5-HT 2A reseptörünün frontal kortekste ve hipokampustaki miktarı yaşla birlikte azalmakta ve bu durum bilişsel bozuklukları da beraberinde getirmektedir (118). Dopaminerjik ve serotonerjik sistemlerin, limbik sistemi kişiye haz verecek, mutluluk yaratacak ve psikomotor dengeyi sağlayacak doğrultuda uyardıkları varsayılmaktadır (19). Serotonin anksiyolitik etkisi olduğu bilinmektedir. Hipokampustaki 5-HT 1A reseptörlerinin aktive edilmesinin anksiyeteyi azalttığı bulunmuştur (119). Serotonin alışkanlıkların (habitüasyon) oluşumunda etkilidir. Duyusal nöronlarda potasyumun hücre dışına çıkmasını engelleyerek aksiyon potansiyelinin uzamasına neden olur. Bu sayede alışkanlığın kazanılmasına yardımcı olur. Serotonin ayrıca normal uyku döngülerinin sürdürülmesinde önemlidir. Serotonin üretimini baskılayan moleküller, etki süreleri boyunca uykusuzluğa sebep olurlar. Ayrıca rafe çekirdeklerinin farklı lezyonları patolojik uykusuzluğa neden olmaları bakımından ölümcül olabilmektedir (19). Bunlara ek olarak serotonerjik işlev bozukluğunun şizofreni, madde bağımlılığı, Parkinson hastalığı, majör depresyon, alzheimer ve otizm gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir (120-123).

2.4.3. Kolinergik Sistem

Asetikolin (ACh) ilk keşfedilen ve merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunan bir nörotransmitterdir. 1921 yılında Loewi tarafından vagus sinir liflerinin uyarılmasıyla birlikte kalbin atmasını yavaşlatan bir kimyasal maddenin salgılandığının görülmesi ile birlikte keşfedilmiştir (75).

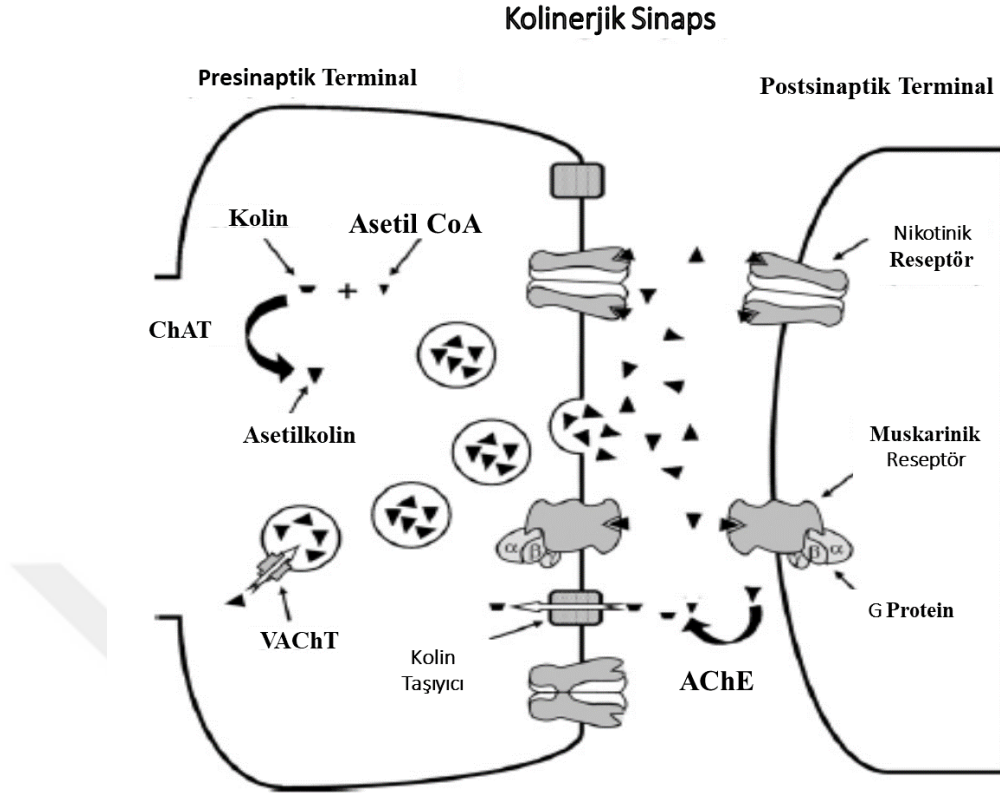
Asetilkolin, kolinergik sinir liflerinin uç kısmında, sitozolde sentezlenir. Kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimi tarafından, kolin ve asetil CoA'dan sentezlenir ve presinaptik veziküller içerisinde saklanır. Veziküller ACh taşıyıcı (VACHT), asetilkolinin sinaptik veziküller içine alınmasından sorumludur (86). Kolin asetiltransferaz enzimi kolinergik nöronların spesifik bir markörü olarak kullanılmasına rağmen bu enzim hemen hemen bütün canlı hücrelerde bulunmaktadır. Sinir sistemi hücreleri haricindeki hücrelerde ACh küçük miktarlarda üretilir ve hücrel homeostazın sağlanması, mitoz bölünme, hücre farklılaşması, hücre iskeletinin organizasyonu, hücre-hücre etkileşmesi ve immün fonksiyonun regülasyonu gibi bazı temel hücrel fonksiyonların yürütülmesini sağlar (124).

Kolinerjik nöronlar sinir sistemindeki nöronların yüzde birinden daha azını oluşturur, ancak, anatomik organizasyonları ve konumu nedeniyle, kolinerjik ağlar, temel kas hareketlerinden bilinç, hafıza ve öğrenme de dahil olmak üzere en yüksek beyin fonksiyon seviyelerindeki aktivitelere kadar çeşitli fonksiyonlarda rol oynamaktadır (125).

Asetilkolin, periferik ve merkezi sinir sistemi boyunca nöronal aktivitenin güçlü bir düzenleyicisidir. Bir nörotransmitter olarak tüm serebral korteks boyunca aktivite paternlerinin tonusunu düzenleyerek bilinç durumuna aracılık eder (126). ACh öğrenme ve kısa süreli hafıza işlevlerinde rol oynamaktadır. Bununla birlikte, daha yeni çalışmalar dikkat, çaba ve yönlendirici ACh nörotransmisyonunun rol oynadığını göstermiştir. Sürekli dikkat gerektiren performanslar sırasında kortikal ACh salınımı artmaktadır (127,128). ACh dış uyaranlara karşı kortikal duyarlılığı azaltır ve odaklanmayı artırır. Şizofreni hastalarında azalmış dikkat ve çalışma belleği dahil olmak üzere bilişsel rahatsızlıklar sıklıkla mevcuttur. Genellikle bu etkilerin ortaya çıkmasında ACh nörotransmisyonunda dengesizliğin de etkisi olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte beyinde belirli bölgelerde ACh artışı anksiyete ve depresyon ile ilgili semptomlara yol açabilir. (126,129).

Kolinerjik sistem diğer tüm klasik nörotransmitterler gibi, MSS'deki diğer nörotransmitter sistemler ile geniş ilişki içerisindedir. Özellikle dopaminerjik ve kolinerjik sistemler geniş ölçüde birbiri ile bağlantılıdır. Beynin farklı bölümlerinde dopamin ve ACh arasındaki dengenin bozulması farklı etkiler meydana getirebilmektedir. Striatumdaki DA ve ACh sistemleri arasındaki dengenin bozulmasının, nörotoksin ile indüklenen Parkinson hastalığının patogenezinde kritik bir rol oynadığına inanılmaktadır. Ayrıca, Parkinson hastalarında asetilkolinesteraz enzim miktarında azalmanın dopaminerjik nöronlarda apoptozu azalttığı görülmüştür (85,130). Nükleus akkumbens bölgesinde ekstraselüler ACh konsantrasyonunda artış ile birlikte DA salınımında azalmanın anksiyete, yeme bozukluğu ve bağımlılık patofizyolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir (131).

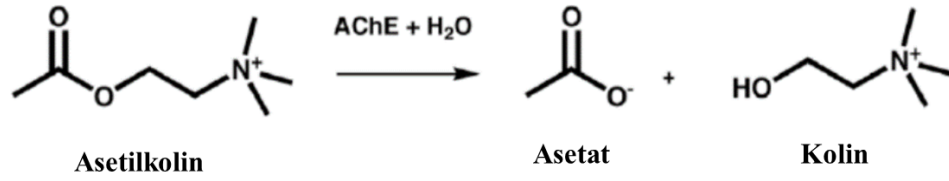
Kolinerjik sistemin her bir bileşeni MSS'de karakteristik bir gelişim planına göre düzenlenir. Kolinerjik nörotransmisyon Şekil 2.8'de gösterilmiştir (124).



Şekil 2.8. Kolinerjik nörotransmisyon.

Asetilkolinesteraz

Diğer birçok küçük moleküllü nörotransmitterin aksine, pek çok kolinerjik sinapta ACh'in post-sinaptik etkileri presinaptik nörona geri alım ile değil, enzimatik yolla sonlandırılır (85). Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi esas olarak nöromusküler kavşaklarda ve beyindeki kolinerjik sinapslarda bulunan serin hidrolaz türevi bir enzimdir (131). AChE çok yüksek katalitik aktiviteye sahiptir (saniyede AChE çok yüksek katalitik aktiviteye sahiptir (saniyede AChE molekülü başına yaklaşık 5000 asetilkolin molekülü) ve ACh'i asetat ve koline hidroliz eder. ACh hidrolizi Şekil 2.9'da gösterilmiştir. Hidroliz sonucu oluşan kolinin büyük bölümü yüksek afiniteli kolin taşıyıcı tarafından sinaps içerisine geri alınır ve böylece ACh üretimi ve salınımı devam eder (132).



Şekil 2.9. Asetilkolinin hidrolizi.

Asetilkolinesteraz enziminin sinir sistemindeki hücre farklılaşması, sinaptogenez, hücre adezyonu ve apoptotik yollarda etkili olduğu gösterilmiştir. Nöronal hücrelerde ve aynı zamanda astrositler ve fibroblastlarda, AChE'in morfolojik olarak düzenleyici etkileri vardır (133). Artan AChE aktivitesinin, hücresel çoğalma, göç, iltihap ve bağışıklık gibi olaylarda pro-inflamatuar sitokin ve interlökin üretimi de dahil olmak üzere, çeşitli protein kinazlar aracılığıyla adaptif değişiklikler, hücre çoğalması, ve hücre içi sinyal yollarını etkileyerek glukoz regülasyonu ve apoptoz başta olmak üzere hem periferde hem de merkezi sinir sisteminde etkili olan Glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3)'ü harekete geçirerek apoptozla ilişkili proteinlerin (kaspaz3 ve kaspaz 9) artışına sebep olduğu ve hücreleri apoptoza sürüklediği de gösterilmiştir (134).

2.5. Oksidatif Stres

Serbest radikal, yapısında bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip olan atom veya molekül olarak tanımlanabilir. Serbest radikaller bu elektronu eşleyerek kararlı duruma geçebilmek amacıyla diğer bileşiklerle hızla tepkimeye girme eğilimindedir (135).

Reaktif oksijen türleri (ROT) yapılarında oksijen bulunduran son derece yüksek reaktiviteye sahip organik veya inorganik serbest radikaller veya peroksidlerdir. ROT canlı hücreler tarafından normal hücresel metabolizmanın bir sonucu olarak üretilir ve biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikallerdendir (136). ROT ve reaktif azot bileşikleri (RNT), normal hücre metabolizmasının ürünleridir. Hücrelerin oksijen tüketmesi ve ROT üretmesi, oluşan ilk aerobik hücre ile başlamıştır. Mitokondriyal solunum prosesi, peroksizomal oksidasyon, mikrozomal sitokrom P450 metabolizması, nötrofil, eozinofil, makrofaj hücreleri ve inflamator sitokinlerin aktivasyonu, ksantin oksidaz ve aldehit oksidaz gibi çok sayıda enzimin

katalitik etkisi, tiyoller, katekolaminler, flavinler gibi bazı hücre içi küçük moleküllerin oksidasyonu ya da araşidonik asidin lipooksijenaz ve siklooksijenazlarla oksidasyonu esnasında endojen kaynaklı olarak üretilebilmektedir. Ayrıca, genotoksik olmayan karsinojenlerin de dahil olduğu çevresel kirleticiler, barbitüratlar, klorlu bileşikler gibi ksenobiyotikler ve bazı metal iyonları, sigara, UV ışınları, iyonize radyasyon gibi etmenler aracılığı ile ekzojen kaynaklı üretimleri de mevcuttur. Hücreler bu bileşikleri sahip oldukları enzimlerle ve antioksidan öğelerle indirger. Bu durum, organizmanın belirli bir redoks dengesini oluşturmasını sağlar (137-139).

Hücresin normal redoks durumu bazı durumlarda bozulur. Oksidatif stres, ROT ve RNT üretiminin artması veya antioksidan koruma kapasitesinin düşmesi ve buna bağlı olarak vücudun endojen sistemlerinin kendini oksidatif hasara karşı koruyamaması durumu olarak tanımlanabilir. Bu durumda hücresel indirgeme potansiyeli bozulmuş, hasara uğramış veya doyumluğa ulaşmış ve GSH gibi hücresel indirgemeyi sağlayan öğeler baskılanmış olabilir. Bu dengesizlik sonucu oluşan peroksitler ve serbest radikaller hücresel proteinlere, lipitlere ve DNA'ya hasar verir. Ortaya çıkan oksidatif stresin büyüklüğü hücresel indirgeme mekanizmalarında ortaya çıkan değişimlerin boyutuna bağlıdır (140,141). Eğer hücre ortaya çıkan değişimlerin düzelmesini sağlayabiliyorsa ve normal haline geri dönebiliyorsa, hücrede hasar ya görülmez ya da küçük, genelde onarılabilen bir hasar ortaya çıkar. Ancak, hücre onarımı sağlayamıyorsa ve ATP depleksyonu da varsa, hücre ölümü gerçekleşir. Hasar orta düzeyde ise, hücre apoptoza gider; hasar büyükse nekroz gerçekleşir. Oksidatif stres yaşlanma, karsinogenez, iskemik hasarlar, ateroskleroz, kas defektleri, nörodejeneratif hastalıklar ve inflamatuvar hasarlar gibi çok çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir. Oksidatif stresin patolojik durumların nedeni mi olduğu veya patolojik durumlar nedeniyle mi ortaya çıktığı tartışmalı bir konudur (142-145).

2.5.1. Oksidatif Stresin Biyogöstergeleri

Oksidatif stres kompleks bir süreçtir ve nicel olarak tespit edilmesi zor olmakla birlikte, oksidatif stresin değerlendirilmesinde çeşitli biyogöstergeler kullanılabilir. Bu biyogöstergelerden en sık kullanılanlar aşağıda sıralanmıştır (146).

- Doğrudan ROT/RNT'nin ölçümü
- Total antioksidan kapasite

- Antioksidan enzim aktiviteleri (Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, tiyoredoksin redüktaz, glutatyon redüktaz)
- Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (Vit-C, E, glutatyon, flavonoidler ve karetenoidler)
- Redükte/okside glutatyon (GSH/GSSG) oranı
- Lipit oksidasyon ürünleri
- Protein oksidasyon ürünleri (karbonil grupları, nitrözaminler)
- DNA Oksidasyonu (8-hidroksi-2-deoksi guanozin ve 8-hidroksi guanin düzeyleri)

Glutatyon

Glutatyon organizmada bulunan en önemli antioksidan moleküllerden biridir. “ γ - Glutamil Sisteinil Glisin” yapısında atipik bir tripeptittir. Vücutta L-glutamik asit, L-sistein ve glisinden sentezlenir. Hayvan dokularında, bitkilerde ve bakterilerde bulunur. Yaşayan hücrelerin karakteristik bir bileşenidir. Vücutta redükte GSH ve okside glutatyon halinde bulunabilir. Sıçan karaciğerinde 5-10 mM düzeylerinde bulunmaktadır. GSH’daki sisteinin tiyol grubu stabil olmayan (ROT gibi) molekülleri redükleyebilir. Bu durumda kendisi de reaktif hale gelir ve iki reaktif GSH birleşerek glutatyon disülfiti (GSSG) oluşturur. GSSG daha sonra glutatyon redüktaz ile tekrar GSH’a dönüşür. GSH vücutta başta karaciğer hücreleri olmak üzere farklı hücrelerde bulunur. Oksidatif stresin arttığı durumlarda hücrenin GSSG’yi GSH’a indirmeye özelliği azalır ve böylece GSSG hücrede akümüle olur. Okside GSH, hücrelerde birikebilir ve GSH/GSSG oranı oksidatif stresin önemli bir ölçüsü olarak değerlendirilir (147-149).

Glutatyon molekülünün oksidatif strese karşı başlıca koruyucu rolleri şöyle sıralanabilir:

1. Glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon s-transferaz (GST) gibi oksidatif strese karşı detoksifikasyonda yer alan enzimlerin kofaktörüdür. Vücudun tüm elektrofilik, halojenli yapılar, epoksitlere karşı korunmasında rol oynar.
2. Plazma membranından aminoasit taşınımına katılır.
3. Hidroksil radikali ve singlet oksijeni doğrudan süpürür. GPx’ın kofaktörü olması nedeniyle H_2O_2 ve lipit peroksitlerin detoksifikasyonuna katkıda bulunur.

4. Vitamin C ve vitamin E gibi enzimatik olmayan antioksidanların yeniden aktif formuna dönüştürme kapasitesine sahiptir.
5. Diğer taraftan, apoptoza karşı hücreleri korur. Bu koruyucu etki, detoksifikasyon ve hücre redoks durumunu kapsayan çok faktörlü mekanizmalardan kaynaklanmaktadır (150-152).

Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu (LP), membran lipitlerinin oksidatif hasarla bozulması olayı olarak tanımlanabilir. Genellikle oksidanların karbon-karbon bağı içeren membran lipitlerinden (özellikle doymamış yağ asitlerinin) bir elektron koparılması sonucu oluşur. LP sonucunda membran yapı ve fonksiyonlarında değişiklikler meydana gelir. LP'nin biyolojik membranlardaki sonuçları, membran akışkanlığının değişmesi, membran potansiyelinin düşürülmesi, H^+ ve diğer iyonlara permeabilitesinin artması ve membranın lize olarak hücre içeriğinin ve lizozomal hidrolitik enzimlerin dışarıya salınması şeklinde görülür. LP sonucu oluşan malondialdehit (MDA) başta olmak üzere 4-hidroksialkanellerin de toksik etkilere sahip oldukları gösterilmiştir (153). MDA, hücre membranında yer alan hidroperoksitleri etkileyerek iyon geçirgenliğini bozar ve enzim aktivitelerini değiştirebilir. Ayrıca, DNA gibi makromolekülleri etkileyerek ciddi hasarlara neden olabilir. Bakteri ve memeli hücrelerinde mutajen özellik gösterdiği bilinen MDA uzun yıllardır LP'nin belirlenmesinde önemli bir biyogösterge olarak kullanılmaktadır (154). LP'nin önemli bir diğer aldehit ürünü 4-hidroksi-2-nonenal (HNE)'dir. HNE, zayıf bir mutajendir ve LP'nin en önemli toksik ürünlerinden biridir (155).

Yapılan birçok çalışma LP'nin; inflamasyon, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve böbrek dejenerasyonunda önemli rol oynadığını göstermiştir (154,155).

2.6. Konu ile İlgili Çalışmalar

2.6.1. Bisfenol A ile İlgili Çalışmalar

Prenatal ve erken postnatal gibi hassas dönemlerde BPA maruziyetinin sonraki nesillerde çok önemli ters etkilere neden olabileceğini gösteren çeşitli *in vivo* çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Hem DA, hem de serotonin üretiminin estrojen bağlı mekanizmalar tarafından düzenlenmesi bu sistemleri EBK'lerin ters etkilerine açık hale getirmektedir. Honma ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada Sprague Dawley (SD) türü sıçanlara gebeliğin 6. gününden başlanarak laktasyon bitimine kadar gavaj yardımı ile BPA (4, 40, 400 mg/kg/gün) uygulanmıştır. 400 mg/kg BPA uygulanan gebelerden doğan yavruların doğumdan sonraki 2. günde hayatlarını kaybettiği görülmüştür. BPA'ya maruz kalan diğer dişi yavruların 3 haftalık olduklarında beyin dokularında DA, DA metabolitleri (DOPAC, HVA), serotonin ve 5-HIAA düzeyleri araştırılmıştır. BPA maruziyeti ile ön beyinde HVA ve DOPAC düzeylerinin arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu durum BPA'nın DA'nın sinir uçlarından salınımını ve metabolitlerine dönüşüm hızını arttırdığını düşündürmektedir (156). Nakamura ve ark. (2010) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ICR/Jcl türü gebe farelere gebeliğin ilk gününden laktasyon sonuna kadar subkütan enjeksiyon ile BPA (20 µg/kg/gün) uygulanmıştır. Doğan farelerde 14-15. haftalar arasında kaudat/putamen çekirdekte dopamin ve DOPAC konsantrasyonlarında (DA, $p<0,01$; DOPAC, $p<0,05$) ve dorsal rafe çekirdeklerinde serotonin ve 5-HIAA düzeylerinde (5-HT, $p<0,001$; 5-HIAA, $p<0,01$) artış gözlenmiştir (157).

Matsuda ve ark. (2010) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, SD türü iki günlük erkek sıçanlar dört gruba ayrılmış ve sırasıyla 0, 0,1, 1 ve 10 µg/kg BPA intrakraniyal olarak tek doz uygulanmıştır. Ardından tüm çalışma grupları ikiye ayrılmış ve ilk yarısının dozlamadan sonraki 7. günde diğer yarısının ise dozlamadan sonraki 28. günde beyin dokularında üç farklı bölgede (hipokampus, beyin sakı ve striatum) monoamin nörotransmitterler ve metabolit konsantrasyonları ölçülmüştür. Yapılan ölçümlerde 0,1 µg/kg BPA maruziyetinin dozlamadan sonraki 7. günde beyin sapındaki, 1 µg/kg BPA maruziyetinin ise dozlamadan sonraki 28. günde striatumdaki DA ve DOPAC konsantrasyonlarını arttırdığı bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca 1 µg/kg BPA maruziyetinin dozlamadan sonraki 28. günde hipokampusta serotonin konsantrasyonunu arttırdığı ve 5-HIAA/5-HT oranını düşürdüğü gözlenmiştir ($p<0,05$). BPA'nın düşük dozlarda da dopaminerjik metabolizmada bir artışa neden olabileceği düşünülmüştür (158).

Nörotransmitter sistemler; sentez, depolama, salınım, geri alım, reseptör aktivasyonu ve metabolizma ve geri alım gibi çeşitli işlemlerin hep beraber işlevini

gerektirir. Birbirine bağılı süreçler nedeniyle tek bir işlemde meydana gelen değişiklikler, nörotransmitter ile ilişkili süreçler üzerinde etkili olabilir (87). Matsuda ve ark. (2012) nörotransmitter metabolizmasını göz önüne alarak BPA'nın MAO seviyeleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Hamileliğin 10. gününden laktasyon dönemi sonuna kadar subkütan olarak BPA (250 ng/kg/gün) uygulanan gebe farelerden doğan erkek yavrularda beynin üç farklı bölümünde (hipokampus, amigdala ve omurilik soğanı) MAO düzeyleri ölçülmüştür. Omurilik soğanında MAO-B aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı bulunmuştur ($p<0,05$). Beynin diğer bölgelerinde ise herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu çalışmanın bulguları perinatal BPA maruziyeti ile indüklenen anksiyetenin beyinde DA metabolitlerindeki azalmayla ilişkili olabileceğini ve BPA'nın etkilerinde cinsiyet farklılıkları olabileceğini işaret etmektedir (159).

Ishido ve ark. (2004) yaptığı çalışmada, 5 günlük Wistar türü sıçanlara tek doz BPA (0,02, 0,2, 2 ve 20 $\mu\text{g/kg}$) intrasisternal olarak enjekte edilmiştir. Sıçanlar 5 haftalık olduklarında yapılan ölçümlerde 2 ve 20 $\mu\text{g/kg}$ BPA'ya maruz kalan sıçanlarda hiperaktivitenin kontrol grubuna kıyasla arttığı ve artışın doza bağılı olarak gerçekleştiği gözlemlenmiştir ($p<0,001$). Buna ek olarak sıçanlar 8 haftalık olduklarında beyin dokularında yapılan ölçümlerde 20 $\mu\text{g/kg}$ BPA'ya maruz kalan sıçanlarda DA reseptör D4 ve DAT genlerinin ekspresyonunda 2 kattan daha fazla azalma olduğu bulunmuştur ($p<0,05$) (160). Tekrardan Ishido ve ark. (2014) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, 5 günlük Wistar türü sıçanlara önceki çalışmadaki verilere dayanarak tek doz BPA (20 μg) intrasisternal olarak enjekte edilmiştir. Sıçanlar 8 haftalık olduklarında yapılan ölçümlerde BPA'ya maruz kalan sıçanlarda beynin substansiya nigra bölgesinde nörodejenerasyon meydana geldiği ve tirozin hidroksilaz aktivitesi gösteren nöronlarda azalma olduğu görülmüştür (161). Ishido ve ark. (2007) yaptıkları diğer bir çalışmada ise uygulama yolunun sonuçlara olan etkisini araştırmıştır. Bu çalışmada, 5 günlük Wistar türü sıçanlara 3 haftalık olana kadar 600 $\mu\text{g/kg/gün}$ dozda BPA oral olarak uygulanmıştır. Sıçanlar 5 haftalıkken yapılan ölçümlerde BPA'ya maruz kalan sıçanlarda hiperaktivitenin kontrol grubuna kıyasla arttığı gözlemlenmiştir ($p<0,005$). Ayrıca sıçanlar 7 haftalık olduklarında beyin dokularında yapılan analizlerde, orta beyin dokusunda tirozin hidroksilaz aktivitesi gösteren nöronlarda azalma olduğu ve apoptotik hücrelerin arttığı belirlenmiştir

($p<0,05$) (162). Bu durum farklı maruziyet yolları ile benzer etkiler gözlenebildiğini göstermektedir.

Başta dopamin ve serotonin olmak üzere nörotransmitter sistemlerin bağımlılık patofizyolojisi üzerinde etkileri bilindiğinden, bu sistemler üzerine ters etkileri bulunan EBK'lere maruziyetin bağımlılık ve ilaç suiistimaline neden olabileceği düşünülebilir. Bu konuyla ilgili Narita ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada ddY türü gebe fareler implantasyon (GD0-7), organogenez (GD7-14), parturisyon (GD14-20) ve laktasyon (PND1-21) olmak üzere 4 farklı dönemde oral olarak, 2 mg/kg dozda BPA'ya maruz bırakılmıştır. Yavrular 7-9 haftalık olduklarında her yavruya 10 mg/kg dozda morfin uygulanıp limbik sistemdeki hareketlilikleri ve DA ile indüklenen G-protein aktivasyonu ölçülmüştür. Organogenez ve laktasyon döneminde BPA'ya maruz kalan yavrularda limbik sistemde yüksek hareketlilik (hiperlokomosyon) olduğu ve G-protein aktivasyonunun arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Bu durumun morfinin ödüllendirici etkisini artırdığı ve bağımlılık gelişmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. İmplantasyon ve parturisyon dönemindeki maruziyette ise bu değişimler gözlenmemiştir. Bu durum maruziyet zamanının önemini göstermektedir (163).

Suzuki ve ark. (2003) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ddY türü gebe fareler 0,002, 0,5 ve 2 mg/gram yem konsantrasyonlarında BPA içeren yem ile beslenmişlerdir. Bu farelerden doğan yavrulara 2 mg/kg metamfetamin verildiğinde doza bağlı olarak limbik sistemlerinde hareketliliğin arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca, aynı farelere metamfetamin ile birlikte bir DA D1-reseptör antagonisti verildiğinde bu etkinin kaybolduğu gözlenmiştir. Farelerden elde edilen limbik sistem dokularına uygulanan western-blott analizi sonucunda da limbik bölgede DA D1 reseptör mRNA ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Bu durum gözlenen etkilerin dopaminerjik sistemin hiperaktivasyonu ile bağlantılı olabileceğini göstermektedir (164).

Luo ve ark. (2013) yaptığı bir çalışmada 35 günlük CD-1 türü erkek farelere ergenlik dönemleri boyunca (PND 35-70), oral olarak BPA (50 mg/kg/gün) uygulamışlardır. Ardından farelerin anksiyete seviyeleri yükseltilmiş, artı labirenti testi ve aydınlık/karanlık kutusu testi kullanılarak ölçülmüştür. BPA'ya maruz kalan farelerin kontrole kıyasla açık kollarda geçirdiği zamanın ($p=0,0015$), açık kollara

giriş miktarının ($p=0,0171$) ve aydınlık kutuda geçirdikleri zamanın azaldığı ($p=0,0131$) gözlenmiştir. Davranış testlerinden sonra farelerin beyinlerinin farklı bölgelerindeki (frontal korteks, hipokampus, hipotalamus ve beyincik) asetilkolinesteraz aktiviteleri ölçülmüştür. BPA uygulan grupta hipokampustaki asetilkolinesteraz aktivitesinin azaldığı görülmüştür ($p<0,05$) (165).

BPA'nın asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine etkilerini araştıran diğer bir çalışmada Fan ve ark. (2013) paternal maruziyetin etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, Wistar türü erkek sıçanlar çiftleşmeden önce 10 hafta boyunca oral olarak 50 $\mu\text{g/kg/gün}$ dozunda BPA'ya maruz bırakılmışlardır. F0 jenerasyonu erkek sıçanlar çiftleşmeden hemen sonra, F1 jenerasyonu yavrular ise PND 56. günde önce Morris su labirenti testine tabi tutulmuş ardından hipokampus dokularındaki asetilkolinesteraz aktiviteleri ölçülmüştür. F0 jenerasyonu erkek sıçanlarda BPA maruziyeti ile birlikte uzaysal hafızanın gerilediği ve hipokampustaki asetilkolinesteraz aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir ($p=0,01$). F1 jenerasyonunda ise paternal olarak BPA maruziyetinin her iki cinsiyette de hafızanın gerilemesine ve hipokampustaki asetilkolinesteraz seviyelerinde cinsiyetler arası farkın ortadan kalkmasına sebep olduğu görülmüştür. Genel olarak bu veriler, düşük dozda paternal BPA maruziyetinin epigenetik etkileri olabileceğini göstermektedir (166).

Nörodejeneratif hastalıkların temelinde yatan diğer bir mekanizma eksitotoksisitedir. Khadrawy ve ark. (2016) yaptığı çalışmada 5 aylık Wistar türü erkek sıçanlara 6 ve 10 hafta boyunca 10 mg/kg/gün BPA veya 6 hafta boyunca 25 mg/kg/gün BPA uygulanmıştır. Yapılan bu çalışmada BPA'nın, beynin korteks ve hipokampus bölgelerinde eksitator aminoasitler (glutamat ve aspartat), inhibitör amino asitler (GABA, glisin ve taurin), AChE aktivitesi ve oksidatif stres parametreleri (LP ve GSH) üzerine etkilerinin farklı doz ve zaman aralıklarındaki BPA maruziyetleri ile karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır. Sonuçta 10 hafta boyunca 10 mg/kg/gün ve 6 hafta boyunca 25 mg/kg/gün dozda BPA'ya maruz kalan sıçanların korteks bölgesinde glutamat miktarındaki artışa karşılık inhibitör nörotransmitterlerin seviyelerinde azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca, korteks ve hipokampusta LP ve GSH düzeylerinde artış belirlenmiştir ($p<0,05$). Kortekste meydana gelen mevcut değişiklikler, BPA'nın glutamat ile indüklenen eksitotoksisiteyi arttırdığını ve oksidatif stres düzeylerini yükselttiğini düşündürmektedir. Ayrıca bütün çalışma

gruplarında, hipokampus bölgesindeki asetilkolinesteraz aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla arttığı bulunmuştur ($p<0,05$) (167). El-Missiry ve ark. (2014) tarafından yapılan bir diğer çalışmada da 6 hafta boyunca, haftada 3 kez oral olarak 50 mg/kg/gün dozda BPA'ya maruz kalan SD türü erkek sıçanların serebrum bölgesinde LP düzeylerinde belirgin artış görüldüğü rapor edilmiştir ($p<0,05$) (168).

2.6.2. Ftalat ile İlgili Çalışmalar

Literatürde ftalat maruziyetinin nörotransmitter sistemler üzerindeki etkilerini araştıran çok az sayıda hayvan çalışması mevcuttur.

Ishido ve ark. (2004) yaptığı çalışmada 5 günlük Wistar türü sıçanlara tek doz disiklohekzil ftalat (DCHP) (87 nmol/10 µl) intrasisternal uygulanmıştır. Bu sıçanlar 4-5 haftalık olduklarında kontrol grubuna kıyasla belirgin ölçüde hiperaktivite artışı göstermişlerdir ($p<0,001$). Bununla birlikte, sıçanların orta beyin bölgesinde DA D4 reseptör ve DAT seviyelerinin düştüğü, substansiya nigra bölgesindeki dopaminerjik nöronlarda apoptozun arttığı bulunmuştur (169). Yine dopaminerjik sistem ve ilgili davranışların incelendiği başka bir çalışmada Wang ve ark. (2016), ICR türü dişi farelere ergenlik döneminde iki hafta boyunca gavaj yardımı ile oral olarak DEHP (1, 10, 50 ve 200 mg/kg/gün) vermiştir. Ergenlik döneminde DEHP maruziyetinin farelerin striatum bölgesindeki DA D2 reseptör yoğunluğunu doza bağlı olarak azalttığı bulunmuştur ($p<0,01$). Ayrıca maruz kalan farelerde kontrol grubuna kıyasla sosyal etkileşimin azaldığı gözlenmiştir (170).

Li ve ark. (2013)'nın yaptığı çalışmada SD türü gebe sıçanlara hamileliğin 6. gününden itibaren laktasyon dönemi sonuna kadar 500 mg/kg/gün dozda dibütil ftalat (DBP) oral olarak verilmiştir. Farklı dönemlerde (Doğumdan sonraki 5, 21 ve 60. günler) sıçanların beyin dokuları inceleme için çıkarılmıştır. Histolojik incelemeler sonucunda doğumdan sonraki 5. ve 21. günlerde, DBP'a maruz kalan sıçanların hipokampus bölgesinde kontrol grubuna kıyasla nöronların azaldığı ve yapısal anormallikler olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yapılan analizlerde DBP'a maruz kalan sıçanların hipokampal nöronlarında apoptotik hücre sayısında ve kaspaz-3 düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,01$). Benzer değişimler doğumdan sonraki 60. günde yapılan incelemelerde bulunamamıştır (171). Yan ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada yetişkin Kumming türü farelere 28 gün boyunca, farklı dozlarda oral

olarak DBP (5, 25 ve 125 mg/kg/gün) vermişlerdir. 28 gün sonunda farelere uygulanan yükseltilmiş artı labirenti testinde anksiyetenin doza bağlı olarak arttığını göstermiştir ($p<0,01$). Davranış testinden sonra farelerin beyin dokusu oksidatif stres parametrelerinin ölçülmesi ve histopatolojik incelemelerin yapılması için çıkarılmıştır. Yüksek dozda (125 mg/kg/gün) DBP'a maruz kalan farelerde ROS ve MDA düzeylerinde kontrole oranla artış olduğu bulunmuştur ($p<0,01$). Ayrıca, yapılan histopatolojik incelemelerde yine yüksek doz DBP maruziyetinin beyin dokusunda hücre sıklığını azalttığı, hücrelerin yerleşiminde düzensizlik meydana getirdiği, apikal dendritlerde deformasyon ve kısaltmalar meydana getirdiği gözlenmiştir (172).

2.6.3. Kombine Maruziyet ile İlgili Çalışmalar

Genel popülasyonun endokrin bozucu kimyasal maddelere karışım halinde maruz kaldığı bilinmektedir. Kombine ve tekrarlanan maruziyetler sinerjik etkiye sahip olabileceği gibi, parsiyel agonistik veya antagonistik etkilere de sahip olabilir. Bu durumda, karışım halinde maruziyetin araştırıldığı *in vivo* çalışmaların genel popülasyondaki maruziyetin sonuçlarını anlamakta daha yararlı olacağı düşünülebilir. Literatürde kombine maruziyetin nöroendokrin sistem üzerine etkilerinin incelendiği çok az çalışma vardır.

Tanida ve ark. (2009) yaptığı çalışmada BPA (5 mg/kg/gün), DEHP (1 mg/kg/gün) ve tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD)'ye (8 ng/kg) tek tek ve karışım halinde maruziyetin beyin gelişimi ve dopaminerjik sistem üzerindeki etkileri araştırılmıştır. ICR türü gebe farelere gebeliğin 8-17. günleri arasında oral yoldan bu kimyasal maddeler uygulanmıştır. TCDD sadece gebeliğin 8. gününde tek doz olarak verilmiştir. Hem BPA hem de DEHP maruziyeti sonucunda 4 haftalık farelerde orta beyindeki A9 ve A10 dopaminerjik çekirdeklerde dopaminerjik nöron seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca bu gebelerden doğan 6 haftalık farelerde beyin ağırlığının BPA, DEHP ve TCDD gruplarının hepsinde azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Ancak, karışım halindeki maruziyette aynı etkiler görülmemiştir (173). Bu çalışma, literatürde karışım halinde BPA ve DEHP maruziyetinin nörotransmitter sistemler üzerindeki etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

AChE Aktivite Tayin Kiti	BioVision
Apoptoz kiti (In Situ Cell Death Detection Kit)	Roche
BPA	Sigma-Aldrich
DA Kiti	Cusabio
DAT Kiti	Elabscience
DEHP	Sigma-Aldrich
Digitonin	BDH Chemicals
Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (D-PBS)	Biowest
EDTA	Sigma-Aldrich
Eozin Yellowish (Eozin Y)	H&E
Etil Alkol (%96)	Alkomed
GSH Ölçüm Kiti	Cayman Chemical
Hematoksilen kristali	Merck
Heparin (Nevparin)	Mustafa Nevzat
HEPES	Biowest
Hidrojen peroksit	Merck
Koyun serumu	A.Ü. Veterinerlik Fakültesi'nden alınmıştır.
Mannitol	Sigma-Aldrich
MAO Aktivite Tayin Kiti	OxiSelect
Proteaz İnhibitör Kokteyli	Sigma – Aldrich
Protein Miktar Tayini kiti (BCA kiti)	Sigma – Aldrich
Serotonin Kiti	Lifespan

Serum Fizyolojik	Osel İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma-Aldrich
TBARS Deney kiti	Cayman Chemical
Tris	Merck

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

96 kuyucuklu plak	Orlab
Buz makinası	Scotsman AF100
Buzdolabı	Arçelik, 2 kapılı
Çok kanallı mikropipet (150-1200 µl)	Finnpipette
Deiyonize su cihazı	Barnstead
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik, Tek kapılı
Derin dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Distile su cihazı	MES, mes08/Thermo Scientific,
Doku Prosesleme Aleti	Leica EM Tissue Processor
Etüv	Dedeoğlu
Hassas terazi	Mettler Toledo
Homojenizatör	Thomas Scientific
Işık mikroskopu	Leica DM 6000, Leica TP1020
Lam	Isolab
Lamel	Isolab
Mikro Santrifüj	Heraeus, Hettich, Mikro22
Mikropipet (10 – 100 µl, 100–1000 µl, 1–5 ml)	Eppendorf, Finnpiquette, Labsystems

Parafin İstasyonu	Leica Eg1150H
pH metre	Isolab
Pipet ucu (0,5–10, 10–200 µl, 100– 000 µl’lik)	Eppendorf, Top-Line
Santrifüj	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
Spektrofotometre / Spektroflorometre	Molecular Devices, SpektraMax M2
Su Banyosu	Memmert
Terazi	XS105 Dual Range
Ultrasonik Banyo	Transsonic 460/H
Vida kapaklı deney tüpü	Isolab
Vida kapaklı şişe	Isolab
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX-3000L
Yüklü Adezivli Lam	Thermofisher

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

3.3.1. Dozlamada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

DEHP (15 mg/ml): 3,75 g DEHP tartılır, 250 ml mısır özü yağı içinde çözülür.

BPA (25 mg/ml): 6,25 g BPA tartılır, 1ml etil alkol içinde çözülür. Mısır özü yağı ile 250 ml’ye tamamlanır.

3.3.2. Histopatolojik Analizlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Bouin Fiksasyon Çözeltisi: 75 ml doymuş pikrik asit çözeltisi, 25 ml formaldehit çözeltisi (%40, h/h) ve 5 ml glasiyal asetik asit karıştırılarak hazırlanır.

Doymuş Pikrik Asit Çözeltisi: Pikrik asidin deiyonize sudaki doymuş çözeltisidir.

%90’lık alkol çözeltisi: 100 ml %96’lık alkole 7 ml distile su eklenerek hazırlanır.

%80'lik alkol çözeltisi: 100 ml %96'lık alkole 20 ml distile su eklenerek hazırlanır.

%70'lik alkol çözeltisi: 100 ml %96'lık alkole 37 ml distile su eklenerek hazırlanır.

Mayer's Hematoksilen Boyası: 1 g hematoksilen kristali, 50 gr alüminyum potasyum sülfat ve 0,2 gr sodyum iyodat 1000 ml distile suda çözülür. Daha sonra 50 gr kloral hidrat ve 1 gr sitrik asit karışıma eklenir. Karışım kaynatılıp soğumaya bırakılır. Soğuyan karışım (gerekirse) süzülür.

Amonyaklı su: 500 ml distile suya 3 damla amonyak eklenir.

Eozin Boyası: 3 g eozin Y, 1000 ml distile suda çözülerek, üzerine 125 ml etanol çözeltisi (%96, h/h) eklenir. 375 ml distile su ve 2 damla glasiyal asetik asit eklenerek hazırlanır.

3.3.3. Dopamin Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi (1X): Ticari kit içinde bulunan konsantre haldeki 20 ml (25X) çözelti 500 ml'ye distile su ile tamamlanarak seyreltilir. Eğer çözelti içinde kristaller mevcutsa oda sıcaklığına getirilir ve kristaller çözününceye kadar yavaşça karıştırılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. İçerik bilgisi yok mu??

Standart Çözelti: Ticari kit içinde standart vial içinde liyofilize halde bulunur. Kullanmadan önce vial 30 sn.10000 devir/dakika santrifüj edilir. Ardından vial içeriği 1 ml Standart/Numune seyreltici çözelti ile çözülür. Bu çözelti 10 ng/ml konsantrasyonda standart içerir. Hazırlanan bu çözeltiden hareketle 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156 ng/ml'lik konsantrasyonda standart çözeltiler taze olarak hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, biyotinlenmiş deteksiyon seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır. Vial içeriği kullanılmadan önce 30 sn 6000 devir/dakika santrifüj edilmelidir. İçerik bilgisi??

HRP Konjugat Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, HRP konjugat seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır. Vial içeriği kullanılmadan önce 30 sn 6000 devir/dakika santrifüj edilmelidir.

Substrat Reaktifi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.3.4. Dopamin Taşıyıcı Protein Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: Kit içerisinde konsantre halde bulunan 30 ml yıkama çözeltisi distile su ile 750 ml'ye tamamlanır. Çözelti içindeki kristallerin su banyosunda 40 °C'de çözünmesi sağlanır ve oda sıcaklığına geldikten sonra kullanılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde liyofilize halde bulunmaktadır. Kullanmadan önce vial 1 dk 10000 devir/dakika santrifüj edilir. Ardından vial içeriği 1 ml Standart/Numune seyreltici çözelti ile çözülür. Çözünmesi için 10 dk boyunca birkaç defa alt üst edilerek bekletilir. Bu çözelti 20 ng/ml konsantrasyonda standart içerir. Hazırlanan bu çözeltiden hareketle 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,31 ng/ml'lik konsantrasyonda standart çözeltiler taze olarak hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, biyotinlenmiş deteksiyon seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır. Vial içeriği kullanılmadan önce 30 sn 6000 devir/dakika santrifüj edilmelidir.

HRP Konjugat Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, HRP konjugat seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

Substrat Reaktifi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.3.5. Serotonin Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: Kit içerisinde konsantre halde bulunan 10 ml yıkama çözeltisi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Eğer çözelti içinde kristaller mevcutsa oda sıcaklığına getirilir ve kristaller çözününceye kadar yavaşça karıştırılır.

Standart Çözeltiler: 50, 100, 250, 500, 1000 pg/ml konsantrasyonda standart çözeltiler kit içerisinde hazır halde mevcuttur.

Denge Solüsyonu: Kit içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi: Kit içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Substrat Reaktifi A: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Substrat Reaktifi B: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.3.6. Monoamin Oksidaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu: Kit içerisinde konsantre halde (10X) bulunmaktadır. 1:10 oranında deiyonize su ile seyreltilerek kullanılır.

MAO-A İnhibitör Çözeltisi: Kit içerisinde 20 mM konsantrasyonda klorjilin bulunmaktadır. Kullanmadan hemen önce 1X PBS ile 100 µM konsantrasyona seyreltilerek kullanılır.

MAO-B İnhibitör Çözeltisi: Kit içerisinde 20 mM konsantrasyonda rasajilin bulunmaktadır. Kullanmadan hemen önce 1X PBS ile 100 µM konsantrasyona seyreltilerek kullanılır.

HRP Çözeltisi: Kit içerisinde gliserol içerisinde çözünmüş 100 U/ml konsantrasyonda çözelti kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Hidrojen Peroksit Standart Çözeltisi: Kit içerisinde 8,82 M konsantrasyonda bulunmaktadır. Bu çözeltiden 8,8 mM konsantrasyonda ara stok distile su ile hazırlanır. Ardından ara stoktan 1 mM konsantrasyonda stok çözelti hazırlanır. Stok

çözeltilerden hareketle 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 μ M konsantrasyonda standart çözeltiler taze olarak hazırlanır.

Tiramin Çözeltisi (100X): Çalışma çözeltisi hazırlamak için kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Benzilamin Çözeltisi (100X): Çalışma çözeltisi hazırlamak için kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Kolorimetrik Çözelti: Çalışma çözeltisi hazırlamak için kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Çalışma Çözeltisi: Kullanmadan hemen önce hazırlanmalıdır. Toplamda 5 ml çalışma çözeltisi hazırlamak için 50 µl kolorimetrik çözelti, 10 µl HRP çözeltisi, 100 µl benzilamin veya tiramin ve 4840 ml deney tamponu karıştırılır.

3.3.7. Asetilkolinesteraz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

ACHe Probu: Kit içerisinde bulunan çözelti DMSO içermektedir ve kullanıma hazırdır. -20°C’de muhafaza edilmelidir.

Deney Tamponu: Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Substrat Çözeltisi: Liyofilize haldedir. 100 µl deiyonize su ile çözülerek 50 mM konsantrasyonda çözelti hazırlanır. Hazırlandıktan sonra buz üzerinde tutulmalıdır.

Kolin Standardı: Kit içerisinde liyofilize haldedir. 100 µl deney tamponu ile çözülerek 50 mM konsantrasyonda stok standart hazırlanır. Stok çözelti deney tamponu ile 1:1000 oranında seyreltilerek 0,5 mM konsantrasyonda kolin standart çözeltisi hazırlanır.

Kolin Oksidaz Enzim Karışımı: Kit içerisinde liyofilize haldedir. 220 µl deney tamponu ile çözülerek hazırlanır.

Pozitif Kontrol Çözeltisi: Kit içerisinde liyofilize haldedir. 100 µl deney tamponu ile çözülerek hazırlanır.

Reaksiyon Karışımı: Kullanmadan hemen önce hazırlanmalıdır. 5 ml reaksiyon karışımı hazırlamak için 100 µl substrat çözeltisi, 200 µl AChE probu, 200 µl kolin oksidaz enzim karışımı, 4500 µl deney tamponu karıştırılır.

3.3.8. Lipit Peroksidasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

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

Asetik Asit: Kit, 20 ml konsantre asetik asit içermektedir. 40 ml asetik asit 160 ml distile su ile seyreltilir ve renk reaktifi hazırlamak için kullanılır.

Sodyum Hidroksit (10X): 20 ml NaOH çözeltisi 180 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir ve renk reaktifi hazırlamak için kullanılır.

Malondialdehit Stok ve Standart Çözeltileri: Kit, 500 µM MDA stok çözeltisi içermektedir. 250 µl MDA stok çözeltisi 750 µl distile su ile seyreltilerek ve 125 µM ara stok çözeltisi elde edilir. Ara stok çözeltisi ve distile su kullanılarak 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50 ve 75 µM konsantrasyonlarında MDA standartları hazırlanır.

Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

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

3.3.9. Glutasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Metafosforik Asit Çözeltisi (0,1 g/ml): 5g metafosforik asitin 50 ml distile suda çözülmesi ile metafosforik asit çözeltisi hazırlanır.

2-(N-morfolin) etansülfonik Asit Tamponu: Kit içinde konsantre halde bulunan 60 ml MES tamponu, 60 ml distile su ile ½ oranında seyreltilerek hazırlanır.

Okside Glutasyon Stok ve Standart Çözeltileri: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunan 25 µM GSSG stok çözeltisinden hesaplanan miktarlarda alınır ve MES tampon çözeltisi kullanılarak 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 µM konsantrasyonlarında GSSG standartları hazırlanır. Taze mi??

Ko-Faktör Karışımı: Kit, içinde liyofilize toz karışımı halinde bulunan NADP⁺ ve glikoz-6-fosfat, 0,5 ml distile suda çözülür. 0-4°C’de saklandığında 2 hafta dayanıklıdır.

Enzim Karışımı: Kit içinde bulunan tampon çözelti, GR ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz içerir. MES tampon çözeltisinden 2 ml eklenerek seyreltilir. 0-4°C’de saklandığında 2 hafta dayanıklıdır.

5,5’-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit: Kit, liyofilize toz halinde 5,5’-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit (DTNB) içerir. Kullanmadan önce 0,5 ml distile suda çözülerek hazırlanır. Reaktif çözeltisi hazırlandıktan itibaren 10 dakika içerisinde kullanılmalıdır.

3.3.10. Protein Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

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

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

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

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

3.3.11. Doku Homojenatı Hazırlanırken Kullanılan Çözeltiler

Tris/PMSF/DTPA Tamponu: 10 mM Tris, 1 mM fenil metil sülfonil florid (PMSF) ve 1 mM dietilen triamin penta asetik asit (DTPA) içerir ve deney öncesi taze hazırlanır. Çözelti hazırlanırken 302,85 mg Tris, 348,4 mg PMSF ve 98,325 mg DTPA tartılır ve deiyonize suda çözülür. (pH=7,4)

Fosfat Tamponu: 1X PBS çözelti içerisinde %0,1 proteaz inhibitörü olacak şekilde hazırlanır.

Mitokondri İzolasyon Tamponu: 125 mM sukroz, 250 Mm mannitol, 10 Mm HEPES, 3 Mm EDTA, %0,01 BSA, %1 proteaz inhibitörü içerir. Çözelti hazırlanırken 5,562 g sukroz, 5,92 g mannitol, 113,97 mg EDTA, 13mg BSA tartılır. Mannitol, sukroz ve EDTA bir miktar distile su içerisinde çözülür. Mezüre aktarılır. Üzerlerine 1,3 ml HEPES, 1,3 ml proteaz inhibitörü ve BSA eklenir. Çözeltinin pH'sı potasyum hidroksit (KOH) tamponu ile 7,2'ye ayarlanır.

3.3.12. Apoptotik İncelemelerde Kullanılan Çözeltiler

Hidrojen peroksit çözeltisi (%3): %30'luk hidrojen peroksit çözeltisinden 200 µl alınarak 900 µl distile su ve 900 µl metanol karışımında seyreltilir.

Triton X-100 çözeltisi (%0,1): 0,01 gr trisodyum sitrat 10 ml distile suda çözülür ve 10 µl Triton X-100 eklenir.

PBS tampon çözeltisi: 40 ml PBS 960 ml distile su eklenerek seyreltilir (pH: 7,6).

PBS-BSA çözeltisi (%2,5): 2.5 ml BSA (Bovine Serum Albumin), 100 ml PBS ile seyreltilir.

Koyun serumu çözeltisi (1/20): 100 µl koyun serumu 1900 µl %2,5'luk PBS-BSA ile seyreltilir.

DAB çözeltisi: 40 µl DAB kromojen 2 ml DAB substrast ile seyreltilir ve filtre edilir.

3.4. Deneysel İşlemler ve Yöntemler

3.4.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada yer alan çalışma grupları, Farmasötik Toksikoloji Doktora programı öğrencisi Dr. Aylin Balcı'nın doktora tez çalışması ve Prof.Dr. Belma Gümüşel yürütücülüğünde Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi desteği ile gerçekleştirilen **THD-2017-12150** numaralı **PRENATAL ve LAKTASYON DÖNEMİNDE BİSFENOL A ve/veya Dİ2ETİL HEKZİL FTALAT MARUZİYETİNİN ERKEK ÜREME SİSTEMİ ÜZERİNE**

ETKİLERİNİN İNCELENMESİ isimli araştırma projesi kapsamında oluşturulan deney gruplarıdır. Bu deney gruplarından elde edilen beyin dokuları bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından **G.Ü.ET-18.043** kod numaralı ve “**Prenatal ve Laktasyon Döneminde Bisfenol A Ve/Veya Di-2-Etil-Hekzil Ftalat Maruziyetinin Nöroendokrin Bozucu Etkilerinin Değerlendirilmesi**” başlıklı araştırma kapsamında **21/06/2018** tarihli ve **E.26012** sayılı etik kurul kararı ile onay alınmıştır.

Çalışma gruplarının oluşturulmasına ilişkin bilgiler aşağıda sunulmuştur:

Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden alınan Sprague-Dawley gebe sıçanlar rastgele yöntemle her grupta 3 gebe olacak şekilde 4 gruba ayrılmış ve deney grupları, doğan erkek yavrulardan aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur.

1. Kontrol Grubu: Gebeliğinin 6-21. günü ve takiben 3 haftalık (21 gün) laktasyon döneminde oral gavajla mısır özü yağı uygulanan gebe sıçanların (n=3) doğan erkek yavrularından rastgele seçilen sıçanlardan (n=6) oluşturulmuştur.

2. DEHP Grubu: Gebeliğinin 6-21. günü ve takiben 3 haftalık laktasyon döneminde oral gavajla 30 mg/kg/gün DEHP uygulanan gebe sıçanların (n=3) doğan erkek yavrularından rastgele seçilen sıçanlardan (n=6) oluşturulmuştur.

3. BPA Grubu: Gebeliğinin 6-21. günü ve takiben 3 haftalık laktasyon döneminde oral gavajla 50 mg/kg/gün BPA uygulanan gebe sıçanların (n=3) doğan erkek yavrularından rastgele seçilen sıçanlardan (n=6) oluşturulmuştur.

4. DEHP ve BPA Grubu: Gebeliğinin 6-21. günü ve takiben 3 haftalık laktasyon döneminde oral gavajla kombine 50 mg/kg/gün BPA ve 30 mg/kg/gün DEHP uygulanan gebe sıçanların (n=3) doğan erkek yavrularından rastgele seçilen sıçanlardan (n=6) oluşturulmuştur.

Dozlama sadece gebelik ve laktasyon dönemindeki dişi sıçanlara yapılmıştır. Doğan yavrulara herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Tüm gruplarda yer alan erkek yavrular laktasyon dönemi (3 hafta) sonrası 21. günde süten kesilmiştir. Erkek üreme sisteminin gelişiminin tamamlandığı postnatal 12. haftada ötenazi (derin anestezi altında intrakardiyak kan alınması) yöntemi ile hayatları sonlandırılmıştır.

3.4.2. Vücut ve Organ Ağırlıklarının Belirlenmesi

Doğumun ilk günü henüz cinsiyet ayırımı yapılamadığı için gebe dişilerden doğan tüm yavruların (dişi ve erkek yavrular) doğum ağırlıkları tartılmış ve tüm yavrular için ortalama doğum ağırlıkları bulunmuştur. Laktasyon dönemi sonunda erkek yavrular randomize olarak seçilip ayrılmış ve gruplar oluşturulmuştur, bu sırada yavrular tekrar tartılmıştır. Çalışma gruplarında yer alan erkek sıçanların vücut ağırlıklarındaki değişimler haftalık olarak izlenmiş ve 12. haftada, ötenazi öncesi de kaydedilmiştir. Hayvanların ötenazisini takiben beyin ağırlıkları hassas terazi ile saptanmıştır.

3.4.3. Biyolojik Örneklerin Hazırlanması

Doku Örnekleri: Sıçanların ötenazisini takiben çıkarılan beyin dokusunun bir hemisferi fizyolojik ve deiyonize suda yıkamayı takiben üç parçaya bölünmüştür (serebrum, orta beyin, arka beyin). Parçalar sıvı azota atılarak dondurulmuştur. Sıvı azottan çıkarılan serebrum dokusu oksidatif stres ve nöroendokrin parametrelerin analizine kadar -80°C 'de saklanmış; diğer hemisfer ise histopatolojik analiz ve apoptoz tayini için kullanılmıştır.

3.4.4. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Tris/DTPA/PMSF Tamponu ile Homojenizasyon Yönteminin Uygulanışı:

1. Tartılan beyin doku örneklerine (serebrum) 1:6 (a/h) olacak şekilde Tris/DTPA/PMSF tamponu eklenir.
2. Homojenizasyonu takiben homojenat 10 dk 4000 devir/dakika hızda ve 4°C 'de santrifüj edilir.
3. Süpernatant kısmı alikotlarına ayrılarak analize dek üzere -80°C derin dondurucuda saklanır. Elde edilen süpernatant LP ve GSH ölçümlerinde kullanılır.

PBS Tamponu ile Homojenizasyon Yönteminin Uygulanışı:

1. Tartılan beyin doku örneklerine (serebrum) 1:6 (a/h) olacak şekilde %0,1 proteaz inhibitörü içeren 1X PBS tamponu eklenir.

2. Homojenizasyonu takiben homojenat 2 kez -80 °C'de dondurup-çözme işlemine tabi tutulur.
3. Ardından homojenat 10 dk 4000 devir/dakika hızda ve 4 °C'de santrifüj edilir.
4. Süpernatant kısmı alikotlarına ayrılarak analize dek üzere -80 °C derin dondurucuda saklanır. Elde edilen süpernatant dopamin, DAT, serotonin ve AChE aktivitesi ölçümü için kullanılır.

Mitokondri İzolasyon Yönteminin Uygulanışı:

1. Beyin dokuları (kısmı) 80 mg olacak şekilde tartılır. Tartılan beyin dokuları üzerine 1 ml soğuk ekstraksiyon tamponu eklenerek homojenize edilir. Homojenizasyon sırasında köpük oluşumundan kaçınılmalıdır.
2. Homojenat buz üzerinde bekletilen soğuk santrifüj tüplerine alınır ve hacim ekstraksiyon tamponu ile 3 ml'ye tamamlanır.
3. Tüpler 900 devir/dakika hızda 10 dk 4 °C'de santrifüj edilir. Süpernatant soğuk bir tüpe alınıp buz üzerinde bekletilir.
4. Pellet 500 µl ekstraksiyon tamponu ile yeniden süspande edilir ve 900 devir/dakika hızda 10 dk 4 °C'de santrifüj edilir. Süpernatant önceki süpernatant ile birleştirilir. Pellet atılır.
5. Birleştirilen süpernatantlar tekrar 900 devir/dakika hızda 10 dk 4 °C'de santrifüj edilir. Süpernatant iki ayrı eppendorfa bölünür. Pellet atılır.
6. Süpernatantlar 13000 devir/dakika hızda 15 dk 4 °C'de santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Pellet son konsantrasyonu %0,02 (g/ml) digitonin içeren 250 µl ekstraksiyon tamponu ile yeniden süspande edilir.
7. Yeniden süspande edilen çözelti 13000 devir/dakika hızda 15 dk 4 °C'de santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Pellet 50 µl ekstraksiyon tamponu ile süspande edilir. MAO-A ve B aktivitelerinin tayininde kullanılıncaya kadar -80 °C derin dondurucuda saklanır.

3.4.5. Histopatolojik Analizler

Bouin Çözeltisi ile Doku Örneklerinin Fiksasyonu ve Doku Takibi

1. Alınan beyin dokuları Bouin fiksasyon çözeltisi içinde 18 saat süreyle fikse edilir.

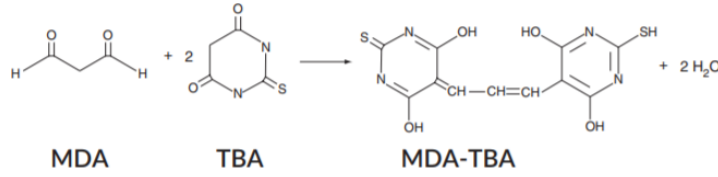
2. Takiben beyin doku örnekleri Leica TP 1020 ışık mikroskobu takip cihazına alınır.
3. Takip cihazında dehidratasyonu sağlamak için sırayla %70, %80, %90, %96'lık ve mutlak alkollerde birer saat bekletilir.
4. Şeffaflandırma için doku örnekleri 1'er saat süreyle 2 kez ksilol'den geçirilir.
5. Parafine alıştırma evresi: Örnekler 2,5 saat saf parafinde bekletilir.
6. Gömme: Doku takip cihazından alınan örnekler Leica Eg1150H parafin istasyonunda saf parafine gömülür.
7. Elde edilen parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınır.

Hematoksilen-Eozin ile Boyama

1. Alınan kesitler bir gece 60⁰C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 3x15 dk. olmak üzere toplamda 45 dk. ksilolde tutularak deparafinize edilir.
2. Ksilolden sonra kurutulan kesitler, %96'lık alkolde 2x10dk. olmak üzere toplamda 20 dk. ve %80'lik alkolde 10 dk. tutularak rehidrate edilir.
3. Çeşme suyunda yıkama yapıldıktan sonra, Mayer's Hematoksilen ile 15 dk. boyama yapılır.
4. Çeşme suyunda yıkanan kesitler amonyaklı suya batırıp çıkarılarak tekrar çeşme suyu ile yıkanır.
5. Eozin ile 1 dk. boyama yapılır.
6. Kesitler, %80'lik ve 2 kere %96'lık alkollere batırılıp çıkartılarak dehidrate edilir.
7. Ksilol ile en az 45 dk. şeffanlandırma işleminden sonra, kesitler entellan ile kapatılır.
8. Kesitler DC490 dijital kameraya bağlı Leica DM6000B mikroskop ile incelenir ve fotoğraf çekimi yapılır.

3.4.6. Lipid Peroksidasyon Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası: Lipid peroksidasyonu ile doğal olarak meydana gelen MDA ve TBA'nın yüksek sıcaklık ve asidik koşullar altında reaksiyonu ile oluşan MDA-TBA kompleksinin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. (Şekil 3.1)

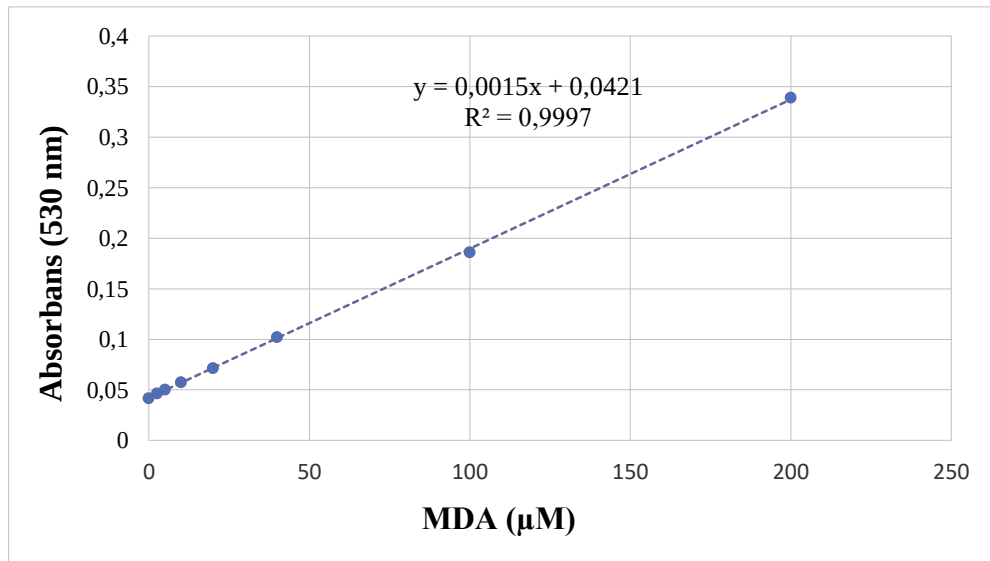


Şekil 3.1. MDA-TBA kompleksinin oluşumu.

Yöntemin Uygulanışı:

1. 100 µl standart çözelti veya beyin dokusu homojenatı 10ml'lik cam tüplere eklenir.
2. Her tüpe 100 µl SDS çözeltisi eklenerek hızlıca karıştırılır.
3. Her cam tüpe 4 ml renk reaktifi eklenir ve yavaşça alt-üst edilerek karıştırılır.
4. Tüpler su banyosunda (100°C) bir saat boyunca bekletilir ve bir saatin sonunda tüpler su banyosundan hızlıca alınarak 10 dk. süre ile buz üzerinde inkübe edilir.
5. Tüpler daha sonra 3500 devir/dakika hızda 10 dakika süre ile santrifüj edilir.
6. Santrifüj sonrası tüplerden 150 µl alınarak 96 kuyucuklu plaklara eklenir.
7. Örneklerin absorbans değerleri 530 nm'de ölçülür.

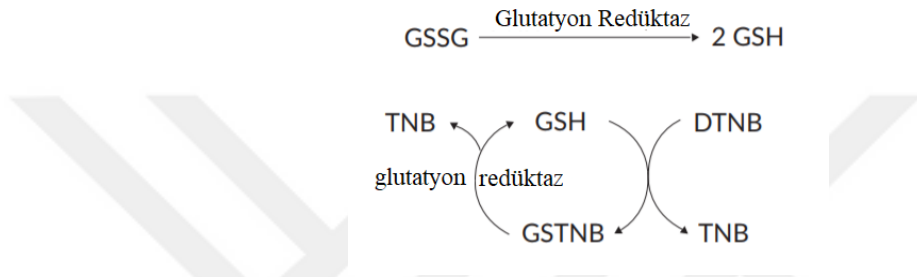
MDA Düzeylerinin Hesaplanması: Standart çözeltilere ait absorpsiyon değerlerinden hareketle elde edilen standart eğri (Şekil 3.2) kullanılarak örneklerin MDA düzeyleri hesaplanır. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.2.MDA standart eğrisi.

3.4.7. Total Glutasyon Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası: Yöntem, DTNB'nin GR ile katalizlenen bir reaksiyonla, sarı renkli 5-tiyo- 2-nitrobenzoik asit (TNB)'ye dönüşmesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Üretilen disülfür GSTNB (GSH ve TNB arasında), GSH'yi geri dönüştürmek ve daha fazla TNB üretmek amacıyla GR tarafından indirgenmektedir (Şekil 3.3). Üretilen TNB oranı doğrudan bu geri dönüşüm reaksiyonu ve dolayısıyla örnekteki GSH konsantrasyonu ile orantılıdır. TNB'nin absorbansının 414 nm'de ölçülmesi ile örnekteki GSH düzeyi belirlenebilmektedir.



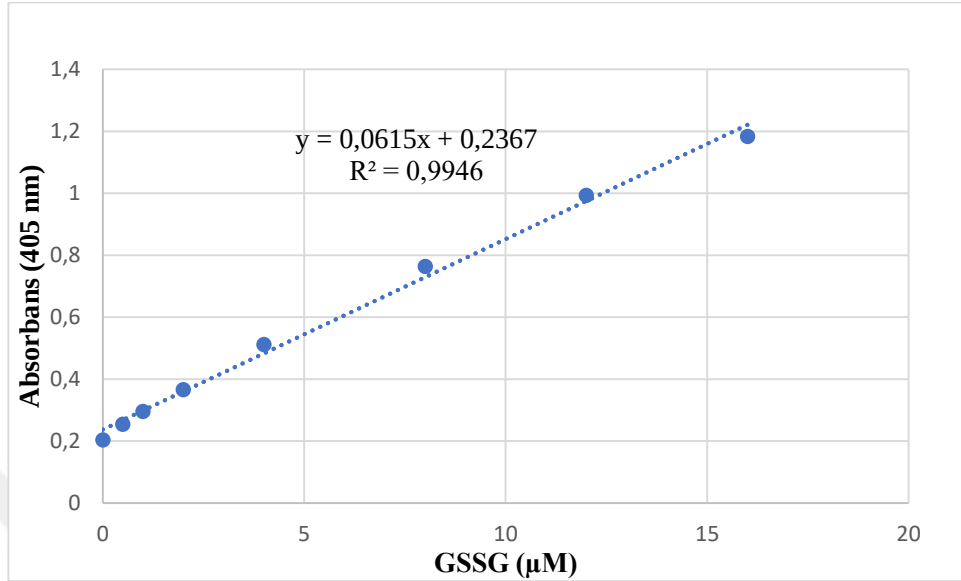
Şekil 3.3. GSH döngüsü.

Yöntemin Uygulanışı:

1. 0,5 ml beyin dokusu homojenatı örneğine, 0,5 ml 0,1 g/ml metafosforik asit çözeltisi eklenir ve vortekslenir.
2. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilen bu örnekler 5000 devir/dakika hızda 2 dakika santrifüj edilir.
3. Süpernatant kısımları temiz mikrosantrifüj tüpüne alınır ve üzerine 50 µl 4M tirtanolamin çözeltisi eklenir. Örnekler bu aşamadan sonra hemen kullanılır.
4. Kuyucuklara 50 µl GSSG standart çözeltisi veya örnek çözeltisi eklenir.
5. Bu aşamada taze hazırlanan, MES tamponu (11,25 ml), ko-faktör karışımı (0,45 ml), enzim karışımı (2,1 ml), distile su (2,3 ml) ve DTNB (0,45 ml) deney karışımından kuyucuklara 150 µl eklenir.
6. Plak yatay çalkalayıcıda ışıktan korunarak 25 dakika karıştırılır.
7. Örneklerin ve standartların absorbans değerleri 405 nm'de ölçülür.

Total Glutasyon Düzeylerinin Hesaplanması: GSSG standartlarının konsantrasyonlarına karşı standartlara ait absorbans değerleri ile oluşturulan standart

eğrisinden (Şekil 3.4) örneklerdeki total GSH konsantrasyonları hesaplanmıştır. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.4. GSSG standart eğrisi.

3.4.8. Dopamin Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak DA'ya özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan DA'nın spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra DA için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm ve 540 nm'de ölçülür. DA düzeyleri hesaplanırken 540 nm'de okunan absorbans değeri 450 nm'de okunan absorbans değerinden çıkartılarak hesap yapılır.

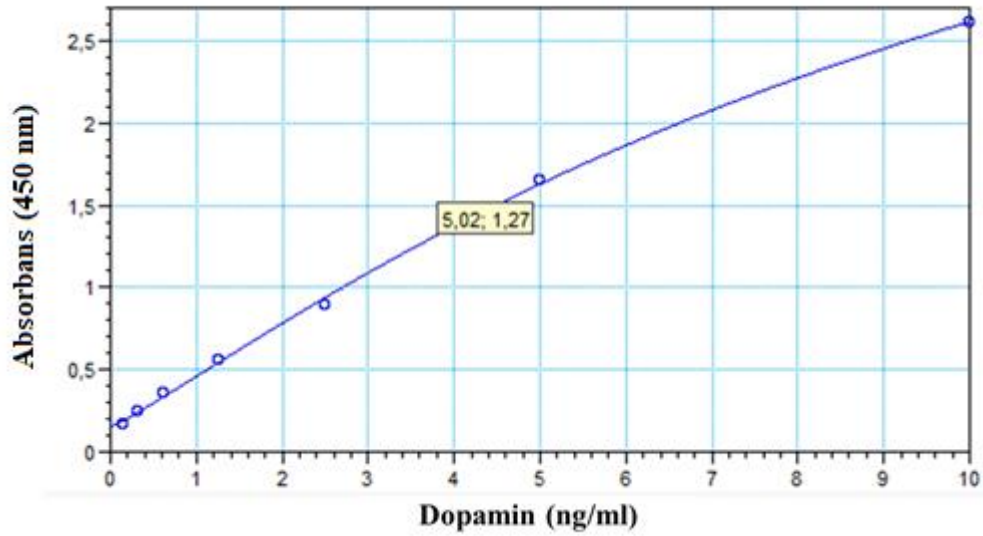
Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalıdır.

1. Kit içerisinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 100µL standart, kör veya PBS ile homojenize edilerek hazırlanan beyin dokusu homojenat örneği eklenir. Kör çözelti olarak standart/örnek seyreltme çözeltisi

kullanılır. Örnek/standart/kör eklendikten sonra plak yavaşça çalkalanır ve üzeri kapatılarak 37 °C'ye ayarlanmış etüvde 2 saat inkübe edilir.

2. Kuyucuklardaki sıvı mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara çoklu mikropipetle hızlıca 100µL biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edilir.
3. Kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 200 µl yıkama çözeltisi eklenir 1-2 dakika bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti çekilir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak adsorban kâğıt yardımıyla iyice kurutulur.
4. Her kuyucuğa 100µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üstü kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edilir.
5. 3. Basamakta yapılan yıkama işlemi 5 kez tekrarlanır.
6. Her kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklenir. Plağın üstü kapatılır ve ışık almayacak şekilde 15-30 dakika 37 °C'de inkübe edilir. Reaksiyon süresi renk oluşumuna bağlı olarak değiştirilebilir.
7. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50 µl durdurma çözeltisi eklenir.
8. Kuyucukların absorbansı spektrofotometre ile 450 nm ve 540 nm'de ölçülür.

Dopamin Düzeylerinin Hesaplanması: DA düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan 4-parametre algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.5). Örneklerdeki dopamin düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar ng/ml cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.5. Dopamin standart eğrisi.

3.4.9. Dopamin Taşıyıcı Protein Ölçümü

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak sıçan DAT özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart veya numune çözeltileri uygun koşullarda spesifik antikorlarla kombine edilir. Daha sonra oluşan sıçan DAT ve Avidin-HRP konjugatına spesifik biyotinlenmiş deteksiyon antikorları eklenir ve inkübe edilir. Substrat reaktifi eklenerek sıçan DAT, Avidin-HRP konjugatı ve biyotinlenmiş deteksiyon antikorlarını içeren kuyucuklarda mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm’de ölçülür.

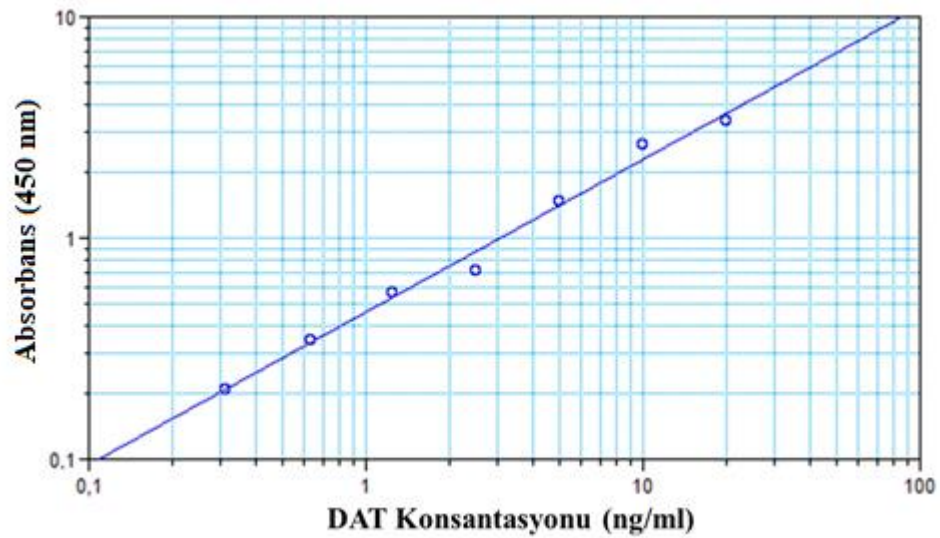
Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalıdır.

1. Kit içerisinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 100µL standart, kör veya PBS ile homojenize edilerek hazırlanan beyin dokusu homojenat örneği eklenir. Kör çözelti olarak standart/örnek seyreltme çözeltisi kullanılır. Örnek/standart/kör eklendikten sonra plak yavaşça çalkalanır ve üzeri kapatılarak 37 °C’ye ayarlanmış etüvde 90 dakika inkübe edilir.
2. Kuyucuklardaki sıvı mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara çoklu mikropipetle hızlıca 100µL biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi eklenir.

Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edilir.

3. Kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 350 µl yıkama çözeltisi eklenir 1-2 dakika bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti çekilir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak adsorban kâğıt yardımıyla iyice kurutulur.
4. Her kuyucuğa 100µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üstü kapatılarak 37 °C’de 30 dakika inkübe edilir.
5. 3. Basamakta yapılan yıkama işlemi 5 kez tekrarlanır.
6. Her kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklenir. Plağın üstü kapatılır ve ışık almayacak şekilde 15 dakika (reaksiyon süresi 15-30 dk arasında ayarlanabilir) 37 °C’de inkübe edilir.
7. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50 µl durdurma çözeltisi eklenir.
8. Kuyucukların absorbansı spektrofotometre yardımı ile 450 nm’de belirlenir.

Dopamin Taşıyıcı Protein Düzeylerinin Hesaplanması: DAT düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.6). Örneklerdeki dopamin taşıyıcı düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar nmol/ mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.6. DAT standart eğrisi.

3.4.10. Serotonin Düzeylerinin Ölçümü

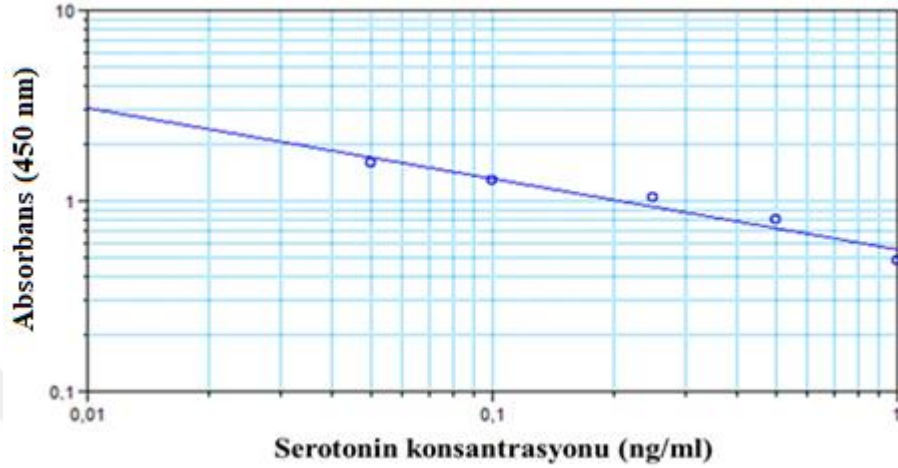
Yöntemin Esası: Yöntem kompetitif-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içerisinde bulunan plağın her bir kuyucuğu serotonine spesifik antikör ile kaplanmıştır. Standartlar veya örnekler kuyucuklara HRP-antijen konjugatı ile birlikte eklenir. Örneklerdeki serbest antijen kuyucukların tabanında bulunan antikörle bağlanmak için HRP-antijen konjugatıyla yarışır. TMB substrat reaktifi eklenir ve HRP enzimi varlığında renk oluşumu gözlenir. Sülfirik asit içeren durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan renkli bileşiğin absorbansı 450 nm’de ölçülür. Kompetitif-ELISA yönteminde normal Sandviç-ELISA yönteminden farklı olarak örnek içerisindeki antijen miktarı ne kadar yüksekse renk yoğunluğu o kadar düşük olur.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalıdır.

1. Kit içerisinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 100 µl standart, kör veya PBS ile homojenize edilerek hazırlanan beyin dokusu homojenat örneği eklenir. Kör çözelti olarak 1X PBS çözeltisi kullanılır. Örnek kuyucuklarına 10 µl denge solüsyonu konulur. Standart ve kör kuyucuklarına denge solüsyonu eklenmez.
2. Kör hariç tüm kuyucuklara 50 µl HRP-konjugatı eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edilir.
3. Kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 350 µl yıkama çözeltisi eklenir 15 saniye bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti çekilir. Bu yıkama işlemi 5 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak adsorban kâğıt yardımıyla iyice kurutulur.
4. Tüm kuyucuklara 50 µl Substrat A ve 50 µl Substrat B eklenir. Plak yavaşça çalkalanır ve üzeri kapatılarak karanlıkta 10-15 dk 37 °C’de inkübe edilir.
5. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50 µl durdurma çözeltisi eklenir.
6. Kuyucukların absorbansı spektrofotometre yardımı ile 450 nm’de belirlenir.

Serotonin Düzeylerinin Hesaplanması: Serotonin düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan 4-parametre

algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.7). Örneklerdeki dopamin taşıyıcı düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar pg/ml protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.7. Serotonin standart eğrisi.

3.4.11. Monoamin Oksidaz Aktivite Ölçümü

Yöntemin Esası: Yöntem biyolojik örneklerde MAO aktivitesinin analiz edilmesini sağlayan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. Örneklerdeki MAO kit prosedüründe eklenen substrat ile reaksiyona girerek hidrojen peroksit oluşturur. HRP varlığında kolorimetrik prob ile reaksiyona giren hidrojen peroksit pembe/kırmızı renk oluşturur. Oluşan bu renkli bileşiğin absorbansı 540-570 nm’de ölçülür. Örnekler spesifik MAO-A veya MAO-B inhibitörü eklenerek istenen MAO izoformunun aktivite ölçümü yapılabilir.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalıdır.

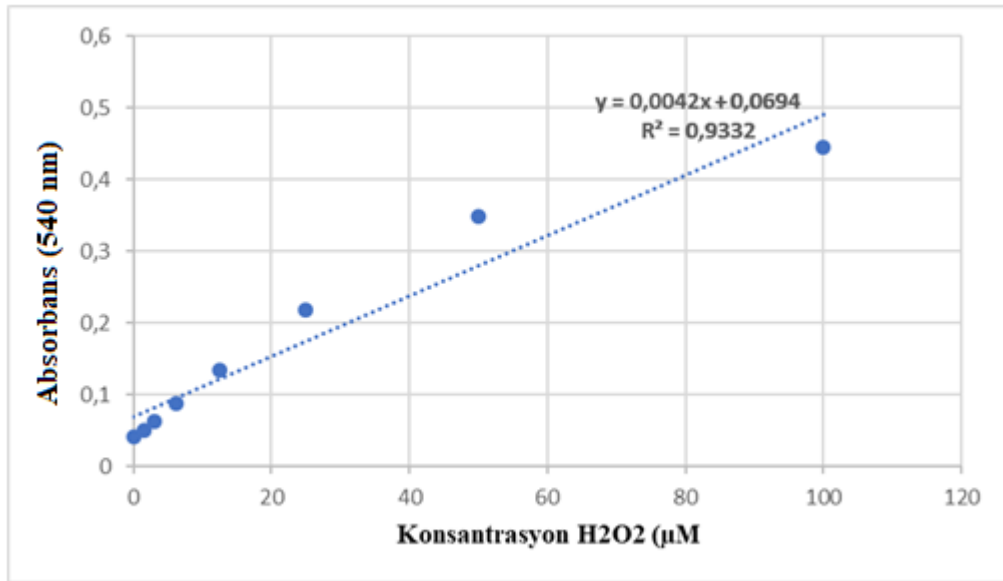
1. 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 50 µl standart, kör veya beyin dokusundan hazırlanan mitokondri örneği eklenir. Kör çözelti olarak deney tamponu çözeltisi kullanılır.
2. İnhibitör ile çalışılması durumunda kuyucuklara 5 µl 100 µM inhibitör çözeltisi eklenir. Aksi durumda 5 µl deney tamponu eklenir. MAO-A aktivitesini ölçmek için rasajilin, MAO-B aktivitesini ölçmek için klorjilin inhibitör olarak kullanılır.

3. İnhibitörün enzimle reaksiyona girmesi için plağın üzeri film ile kapatılıp 30 dk. oda sıcaklığında inkübe edilir.
4. Her kuyucuğa 50 µl çalışma çözeltisi (1 µl benzilamin 100X, 0,1 µl HRP, 0,5 µl kolorimetrik prob ve 48,4 µl deney tamponu içeren) eklenir. Plağın üzeri kapatılır ve karanlıkta, yatay karıştırıcı üzerinde 45-60 dk inkübe edilir.
5. Oluşan bileşiğin absorbansı 540-570 nm’de okunur.

MAO Aktivitesinin Hesaplanması: Her standart, kontrol ve numune için ortalama absorbans değerleri hesaplanır. Standart çözeltilere ait absorpsiyon değerlerinden hareketle elde edilen standart eğri (Şekil 3.8) kullanılarak örneklerin içinde MAO tarafından dönüştürülen hidrojen peroksit miktarı hesaplanır. Daha sonra aşağıdaki formül yardımıyla örnekler içerisindeki MAO aktivitesi mU/ mg protein olarak belirlenir.

$$\text{Spesifik MAO Aktivitesi (mU/mg protein)} = [\text{H}_2\text{O}_2 (\mu\text{M})/\text{reaksiyon zamanı}] \times [(\text{dilüsyon faktörü}) / \text{protein (mg/ml)}]$$

Dilüsyon faktörü: 60



Şekil 3.8. Hidrojen peroksit standart eğrisi.

3.4.12. Asetilkolinesteraz Aktivite Ölçümü

Yöntemin Esası: Yöntem AChE aktivitesinin sürekli olarak kolorimetrik ölçülmesine izin verir. Yöntemde örneklerin içinde bulunan AChE enzimi eklenen ACh substratını koline dönüştürür. Kolin, kolin oksidaz enzimi ile ara ürün oluşturmak

üzere oksitlenir. Oluşan bu ara ürün kolorimetrik prob ile etkileşerek renkli bileşik oluşturur. Oluşan bu renkli bileşiğin absorbansı 570 nm’de belirli dakikalar arasında kinetik olarak ölçülerek asetilkolinesteraz enzim aktivitesi ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalıdır.

1. 96 kuyucuklu plak içerisine PBS ile homojenize edilerek hazırlanan beyin dokusu homojenat örnekleri 1-5 µl hacimde konulur. 0,5 mM konsantrasyondaki kolin standardından kuyucuklara sırasıyla 2, 4, 6, 8 ve 10 µl eklenir. Tüm kuyucuklara toplam hacim 50 µl’ye tamamlanacak şekilde deney tamponu eklenir. Böylece 1, 2, 3, 4 ve 5 nmol konsantrasyonda standartlar elde edilir. Kör çözelti olarak kuyucuğa 50 µl deney tamponu konulur.
2. Pozitif kontrol olarak kuyucuğa 1-10 µl pozitif kontrol solüsyonundan eklenir ve hacim 50 µl’ye deney tamponu ile tamamlanır.
3. Her kuyucuğa 50 µl reaksiyon karışımı (45 µl deney tamponu, 2 µl kolin oksidaz enzim karışımı, 2 µl kolorimetrik prob, 1 µl kolin substratı içerir) eklenir.
4. Plak yavaşça çalkalanır. 20-30 dk arasında 37 °C’de karanlıkta inkübe edilir. İnkübasyon süresi örnek içerisindeki asetilkolinesteraz miktarına bağlı olarak değişebilir.
5. İnkübasyon süresinin sonunda iki zaman noktası belirlenir ve bu zaman aralığı arasında kuyucukların absorbansı 570 nm’de kinetik olarak ölçülür.

Asetilkolinesteraz Aktivitesinin Hesaplanması: Her standart, kontrol ve numune için iki zaman noktasındaki (T1 ve T2) ortalama absorbans değerleri hesaplanır. T2 zamanındaki absorbans değerlerinden (A2) T1 zamanındaki absorbans değerleri (A1) çıkartılır. Kör çözeltilisinin absorbansı kendi değerinden ve diğer absorbans değerlerinden (standartlar) çıkartılarak absorbans değerleri elde edilir. Standart çözeltilere ait absorpsiyon değerlerinden hareketle elde edilen standart eğri (Şekil 3.9) kullanılarak örneklerin içinde AChE tarafından dönüştürülen kolin miktarı hesaplanır. Daha sonra aşağıdaki formül yardımıyla örnekler içerisindeki AChE aktivitesi mU/ mg protein olarak belirlenir.

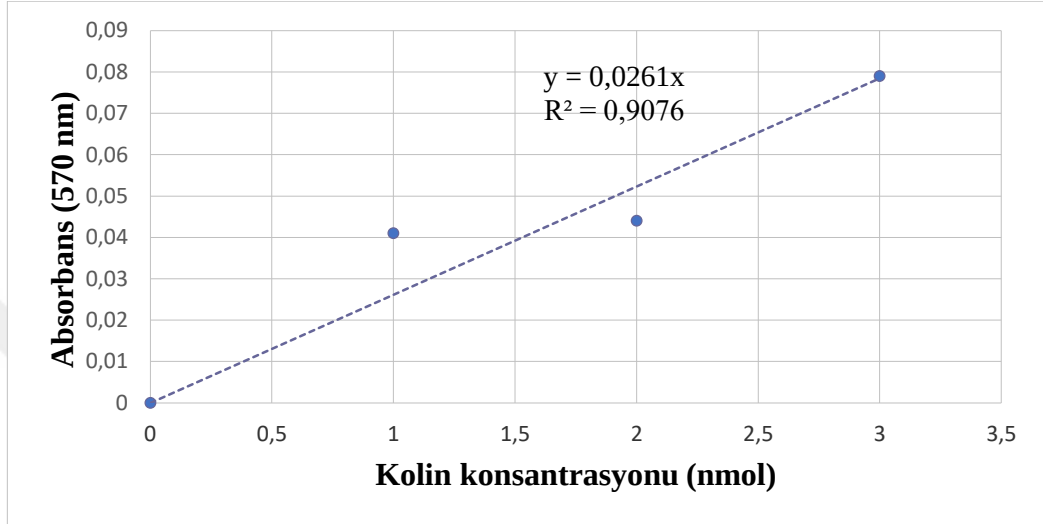
AChE Aktivitesi (mU/ mg protein) = [B / ($\Delta T \times V$) $\times D$] / protein (mg/ml)

B: Standart eğriden hesaplanan kolin değeri (nmol)

ΔT : Reaksiyon zamanı

V: Kuyucuklara eklenen örnek hacmi (2,5 μ l)

D: Dilüsyon faktörü: 20



Şekil 3.9. Kolin standart eğrisi.

3.4.13. Protein Miktar Tayini

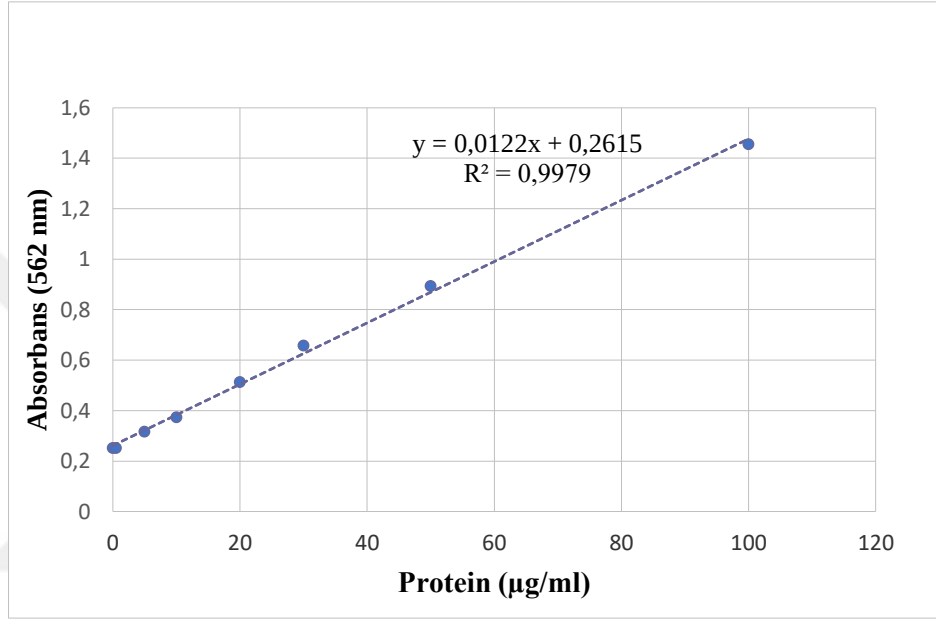
Yöntemin Esası: Bişinkoninik asit (BCA) deneyinin esası, alkali koşullar altında Cu^{+2} – protein kompleksinin oluşumuna, ardından Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesine dayanmaktadır. İndirgenme miktarı mevcut protein ile orantılıdır. Sistein, triptofan, sistin, tirozin ve peptid bağlarının Cu^{+2}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

Yöntemin Uygulanışı:

1. Doku homojenatları distile su ile 1/100 oranında seyreltilir.
2. 5 ml QA tamponu, 5 ml QB tamponu ve 200 μ l bakır (II) sülfat içeren çalışma çözeltisi hazırlanır.
3. Kuyucuklara 150 μ l standart veya örnek eklenir.
4. Daha sonra bu kuyucuklara çok kanallı mikropipet yardımıyla 150 μ l çalışma çözeltisi eklenir.

5. Plak, yatay çalkalayıcıda 5 dakika ve takiben etüvde 37°C’de 2 saat inkübe edilir.
6. Örneklerin absorbens değerleri 562 nm’de ölçülür.

Protein Miktarının Hesaplanması: Standart konsantrasyonlarına karşı absorbens değerleri ile elde edilen standart eğrilerinden (Şekil 3.10) hareketle protein miktarları hesaplanır. Sonuçlar µg/ml cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.10. Protein standart eğrisi.

3.4.14. Apoptotik Analizler

Kontrol ve deney grubundan elde edilen beyin dokularındaki apoptotik hücreler, In Situ Cell Death Detection Kit, POD kiti kullanılarak TUNEL (terminal deoksinnükleotidil transferaz dUTP çentik uç işaretleme) yöntemi ile belirlenmiştir.

Kontrol ve deney grubundan beyin dokuları fiksasyon ve doku takibi aşamalarından sonra parafin bloklara gömüldü ve 5 mikron kalınlıktaki kesitler pozitif yüklü lama alınmıştır. Kesitlerin deparafinizasyonu, kesitlerin öncelikle 60 0C’de 1 gece inkübe edilmesi ve ardından 3x5 dk olmak üzere ksilende bekletilmesi ile sağlanmıştır. Dokuların rehidratasyonu için kesitler azalan alkol serilerinden (%100, 96, 80,70) geçirilmiştir. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivasyonunu bloke etmek için %3’lük H₂O₂’de 10 dk. bekletilmiştir. PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra taze olarak hazırlanan %0,1 Triton X-100 ile kesitler 8 dk. buz üzerinde muamele edilerek permeabilizasyon sağlanmıştır. Kesitler PBS ile 3 kez

yıkandıktan sonra işaretleme basamağına geçilmiştir. İlk olarak non-spesifik boyanmayı engellemek için kesitler 1/10 oranında koyun serumu ile 45 dk inkübe edildi ve işaretleme için reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı için 450 µl işaretleme çözeltisi, 50 µl enzim çözeltisi konularak karıştırılmıştır. Blokaj sonrası yıkama yapılmadan hazırlanan karışımdan her örneğe 75 µl ve negatif kontrol için enzim solüsyonu konmamış olan işaretleme çözeltisinden 75 µl kesitlere homojen bir şekilde dağıtılmıştır. Preparatlar 37 °C’de karanlık ve nemli ortamda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası preparatlar 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Son basamak olan sinyal dönüşüm aşamasına geçildi. Bu basamakta her kesite %2 sıçan serumu 75 µl converter-peroksidaz (solüsyon PBS içinde hazırlanmış %2,5 BSA ile 2:1 (v/v) oranında dilüe edilmiştir) homojen bir şekilde dağıtıldı ve kesitler 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Yıkama işleminden sonra kesitler DAB (3,3'-Diaminobenzidine) ile 5 dk muamele edilmiştir. Distile su ile yıkanan kesitler çekirdek boyaması için 45 sn Mayer’s Hematoksilen ile boyandı. Yıkama ile boya uzaklaştırıldıktan sonra, kesitler ksilende 15 dk. bekletildi ve entellan ile kapatılarak Leica DM 6000 mikroskobu ışık mikroskobunda görüntülenmiştir.

Her gruptaki kesitlerden X20’lik büyütme ile hipokampus C1, CA2 ve CA3 bölgelerindeki TUNEL ile pozitif boyanan apoptotik hücre sayısı ve normal hücre sayısı belirlenmiştir. Apoptotik indeks apoptotik hücre sayısı/toplam hücre sayısı x100 şeklinde hesaplandı ve gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır.

3.4.15. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizde SPSS 17 (Chicago IL.) programı kullanılmıştır. Tüm gruplardan elde edilen sonuçların karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Student t testi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM (Standart hata) olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

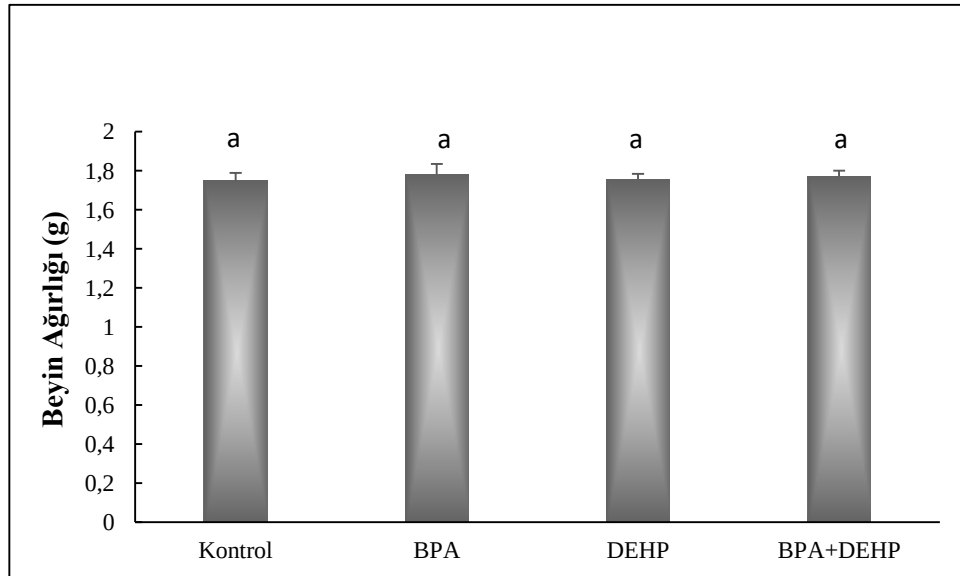
4.1. Beyin-Vücut Ağırlığı Oranı

Çalışma grubunda yer alan sıçanların ötenazisini takiben beyin ağırlıkları saptanmış, Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de verilmiştir. Ortalama beyin ağırlığı yönünden gruplarda kontrole kıyasla anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.1. Ortalama beyin ağırlıkları.

Çalışma Grupları	Beyin Ağırlığı (g)
Kontrol	$1,75 \pm 0,1^a$
BPA	$1,78 \pm 0,13^a$
DEHP	$1,76 \pm 0,07^a$
BPA+DEHP	$1,77 \pm 0,08^a$

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



Şekil 4.1. Beyin ağırlıkları.

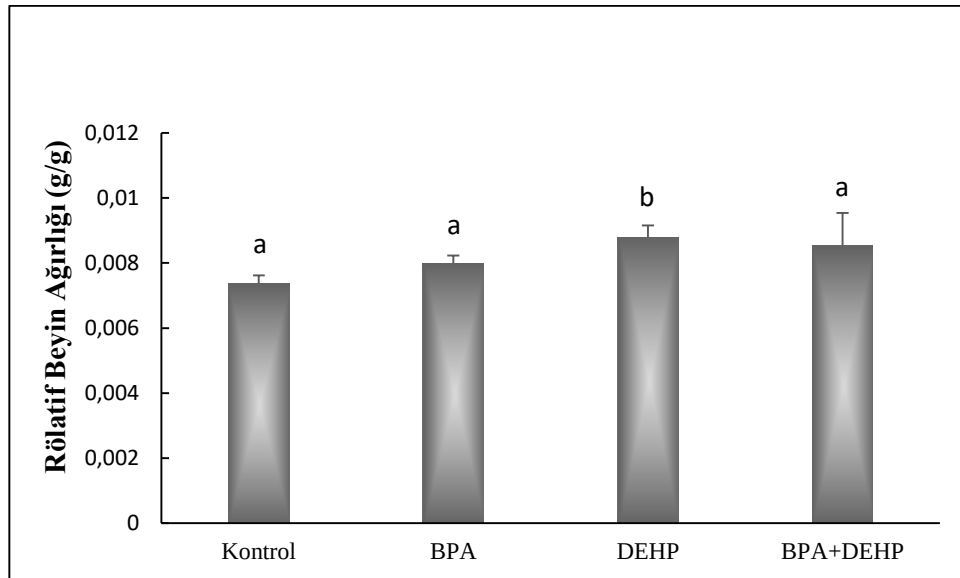
Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.
^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

Çalışma gruplarında yer alan sıçanlara ait beyin ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranlanmasıyla elde edilen rölatif beyin ağırlıkları Tablo 4.2 ve Şekil 4.2’de verilmiştir. DEHP grubundaki rölatif beyin ağırlığının kontrol grubuna oranla %18 arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). BPA+DEHP grubunda da kontrol grubuna oranla ~%15 bir artış gözlenmekle birlikte, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

Tablo 4.2. Rölatif beyin ağırlıkları.

Çalışma Grupları	Rölatif Beyin Ağırlığı
Kontrol	0,007±0,004 ^a
BPA	0,008±0,005 ^a
DEHP	0,009±0,003 ^b
BPA+DEHP	0,009±0,003 ^a

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



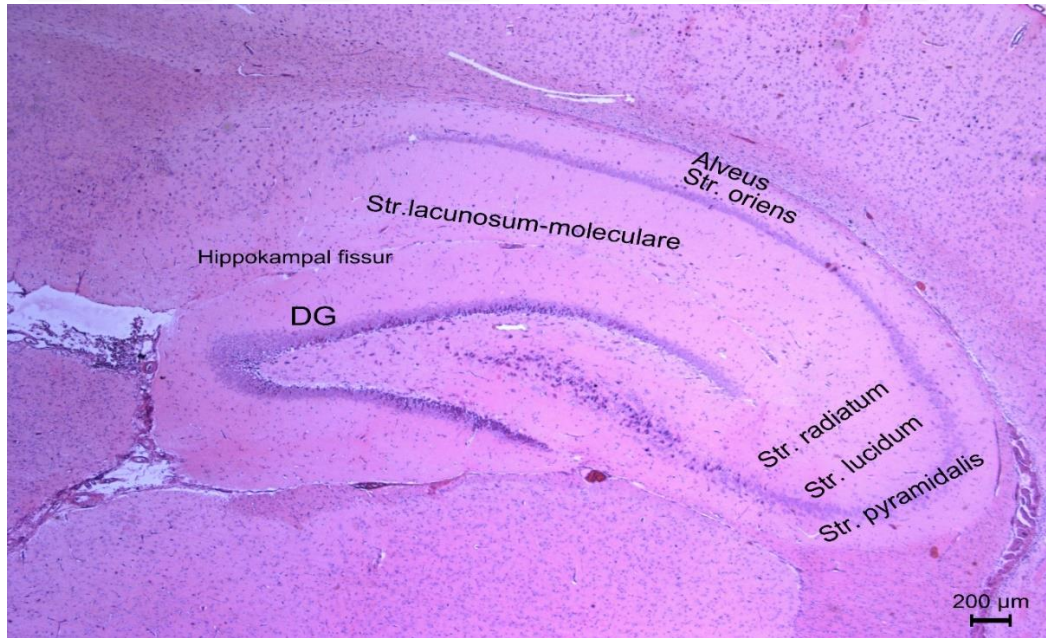
Şekil 4.2. Rölatif beyin ağırlıkları.

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

4.2. Histopatolojik Analizler

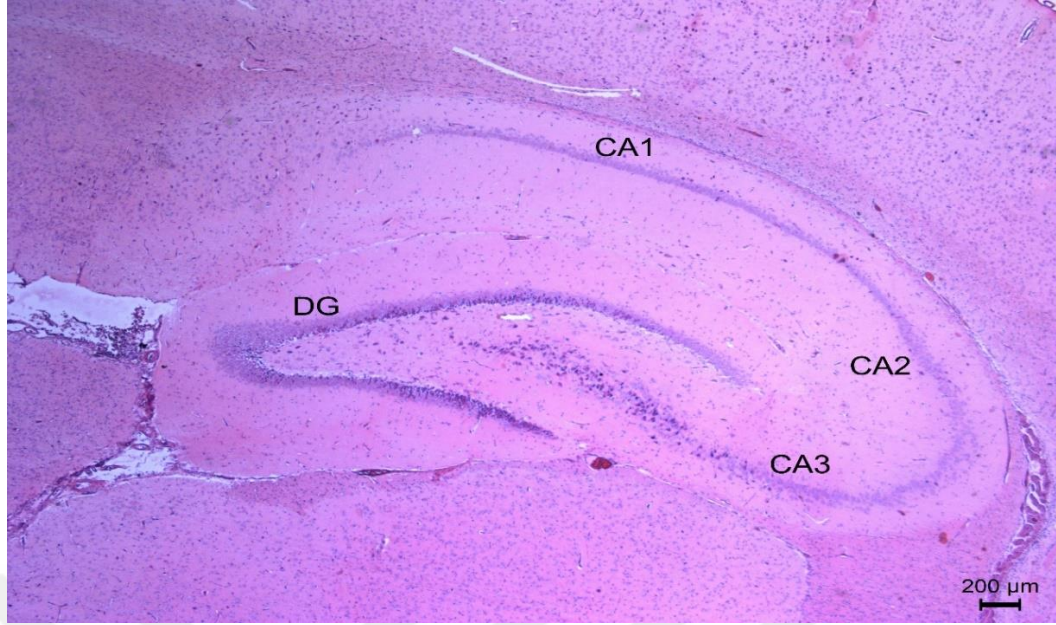
4.2.1. Kontrol Grubu

Deney gruplarına ait hipokampus kesitlerinde Dentat girus, hipokampal fissur, hipokampusu oluşturan alveus, stratum oriens, stratum pyramidalis, stratum radiatum, stratum lucidum (sadece CA3 bölgesinde), stratum lacunosum tabakaları izlenmiştir (Şekil 4.3.). Büyük piramidal nöronlar, Golgi tip II nöronlar ve internöronları içeren stratum pyramidalisin CA1, CA2, CA3 bölgeleri ayırt edilmiştir (Şekil 4.4.). Kontrol grubunda CA1 bölgesinde büyük ökramatik çekirdek, belirgin çekirdekçik ve perinükleer ince sitoplazmaları ile piramidal nöronlar hücre sınırları belirgin ve düzenli olarak izlenmiştir (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.). CA2 bölgesinin büyük büyütmede incelenmesinde ökromatik çekirdek, belirgin çekirdekçik ve ince sitoplazmaları ile nöronlar aralarında daha küçük çekirdekli birkaç glia hücresi gözlenmiştir (Şekil 4.7.). CA3 bölgesinde de nöronlar ve aralarında yerleşmiş glia hücrelerinin normal histolojik görünümünü koruduğu saptanmış (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9); kesitlerde endotel ile döşeli damar kesitleri gözlenmiştir.



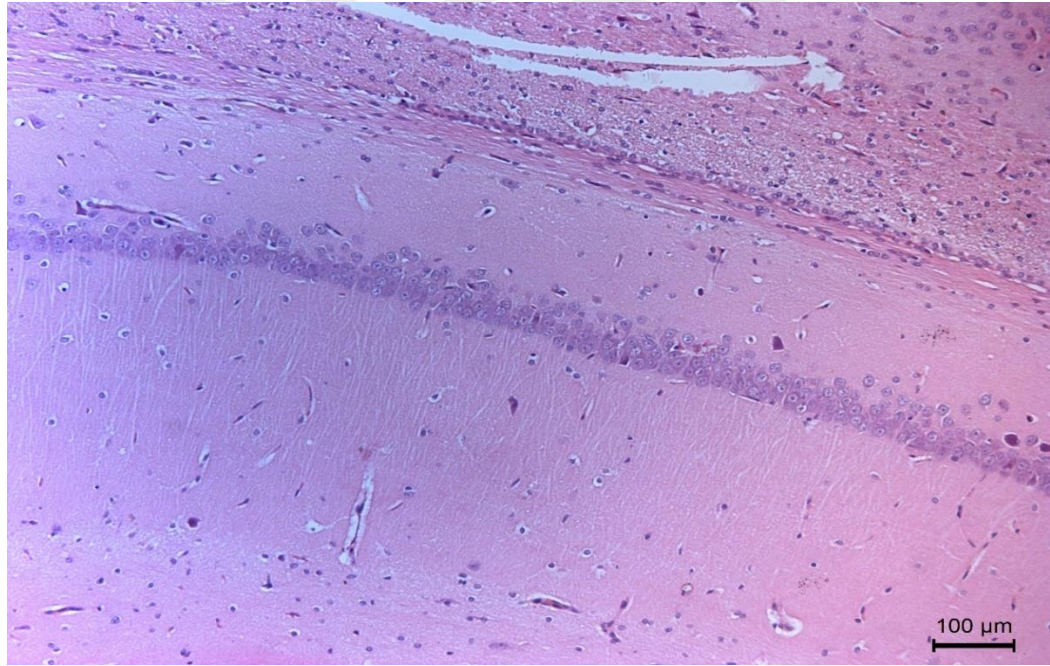
Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait hipokampus dokusu ışık mikrofrafı I.

Hipokampus kesitinde hipokampusun histolojik tabakaları, dentate girus (DG) izlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X25).



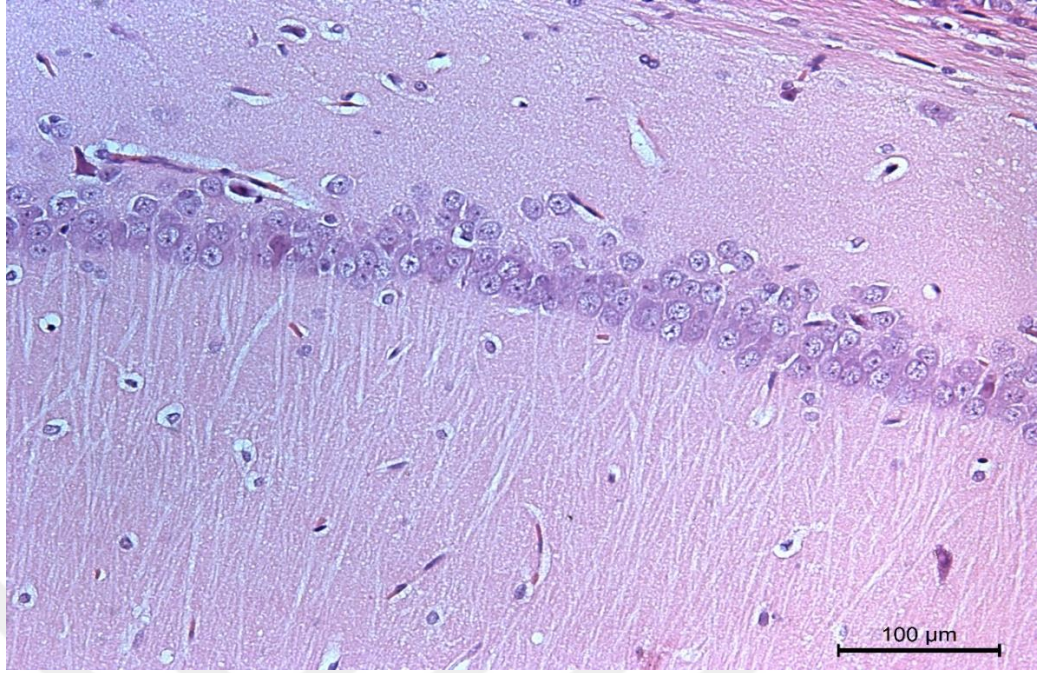
Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait hipokampus dokusu ışık mikrofrafı II.

Kontrol grubuna ait hipokampus kesitinde stratum pyramidalisın CA1, CA2, CA3 bölgeleri ve dentate girus gözlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X25).



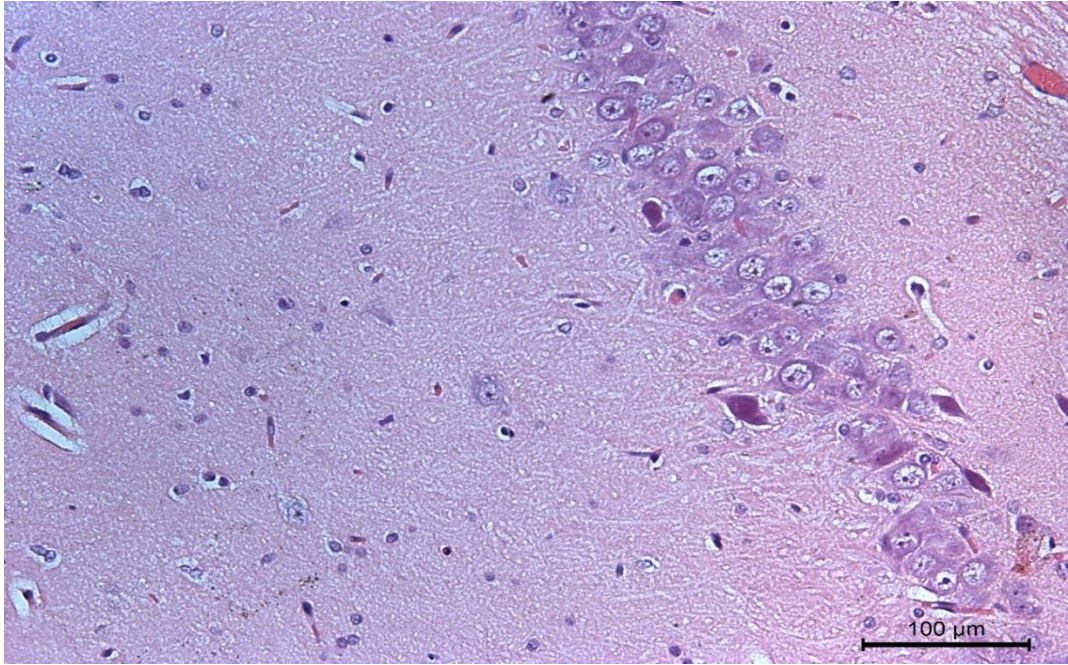
Şekil 4.5. Kontrol grubuna ait hipokampusta CA1 bölgesi I.

CA1 bölgesinin üstünde pyramidal nöronların bazal dendritlerini ve internöronları içeren str. oriens, üstünde aksonları içeren alveus izlenmiş; CA1 bölgesi altında str. radiatum gözlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X100).



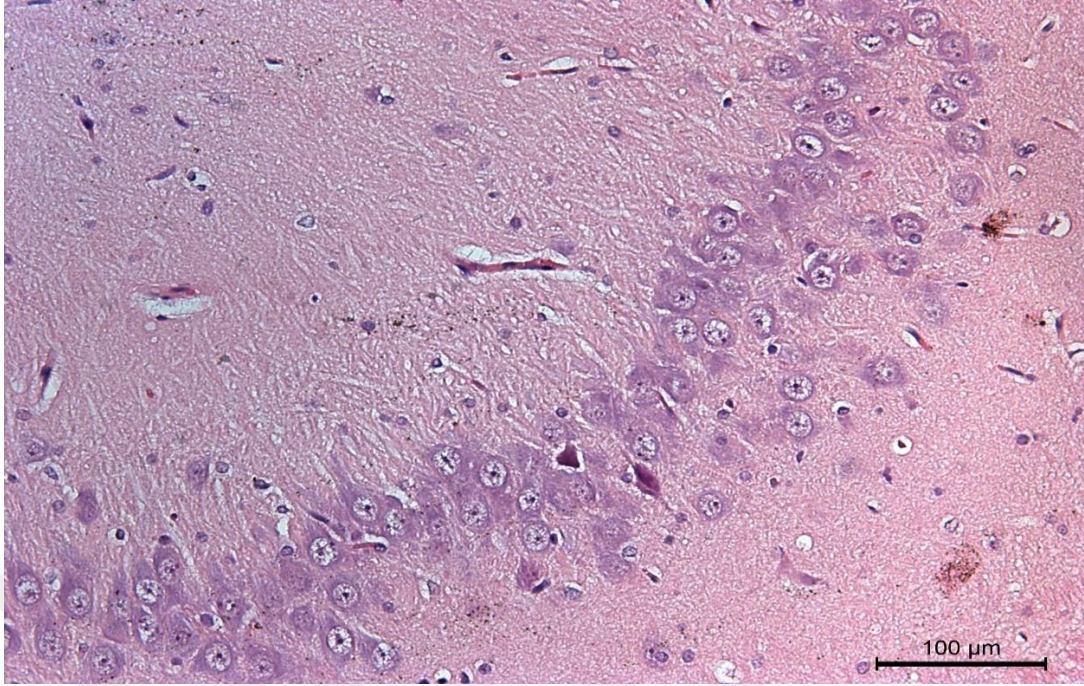
Şekil 4.6. Kontrol grubuna ait hipokampusta CA1 bölgesi II.

CA1 bölgesinde ökramatik çekirdek, belirgin çekirdekçik ve perinükleer ince sitoplazmaları ile piramidal nöronlar düzgün sınırları ile izlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).



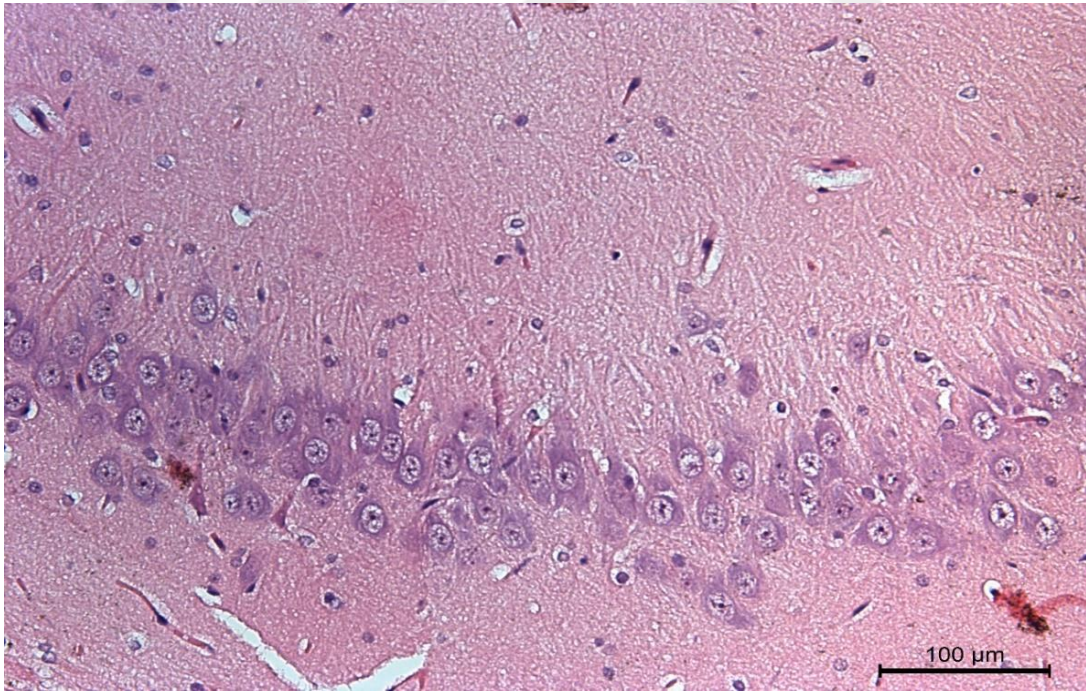
Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait hipokampusta CA2 bölgesi.

Kontrol grubuna ait hipokampusun CA2 bölgesinde ökramatik çekirdek, belirgin çekirdekçik ve sitoplazmaları ile piramidal nöronlar ve aralarda glia hücreleri izlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).



Şekil 4.8. Kontrol grubuna ait hipokampusta CA3 bölgesi I.

Kontrol grubuna ait hipokampusun CA3 bölgesinde pyramidal nöronlar ve aralarda glia hücreleri izlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).

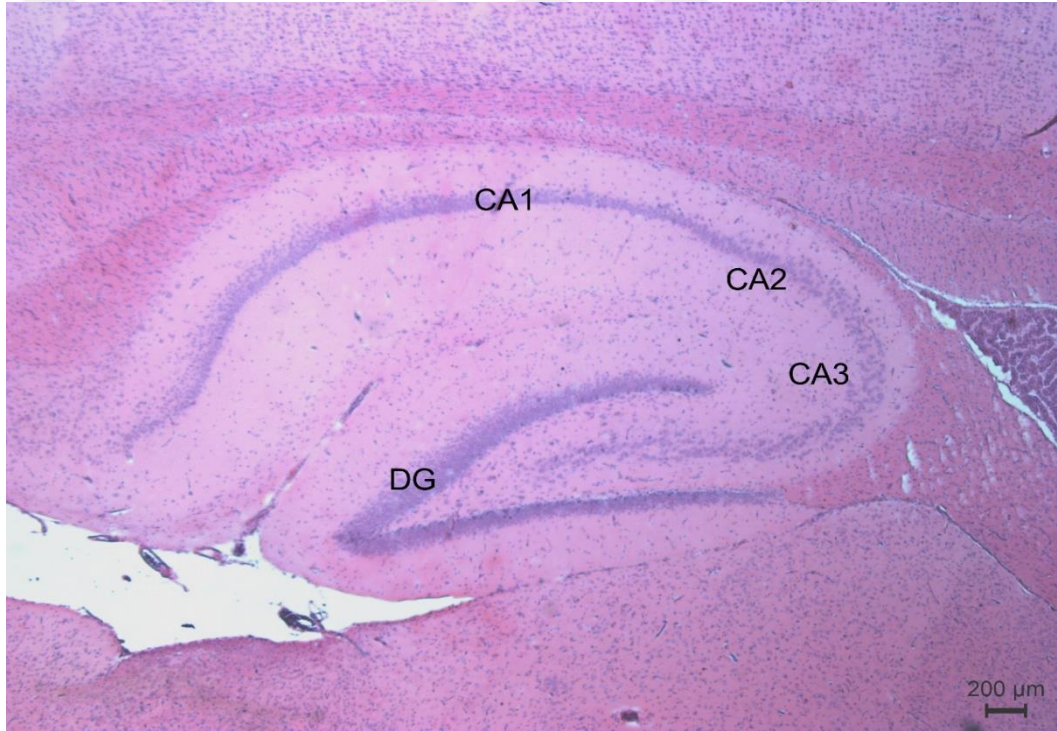


Şekil 4.9. Kontrol grubuna ait hipokampusta CA3 bölgesi II.

Kontrol grubuna ait hipokampusun CA3 bölgesinde pyramidal nöronlar ve aralarda glia hücreleri izlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).

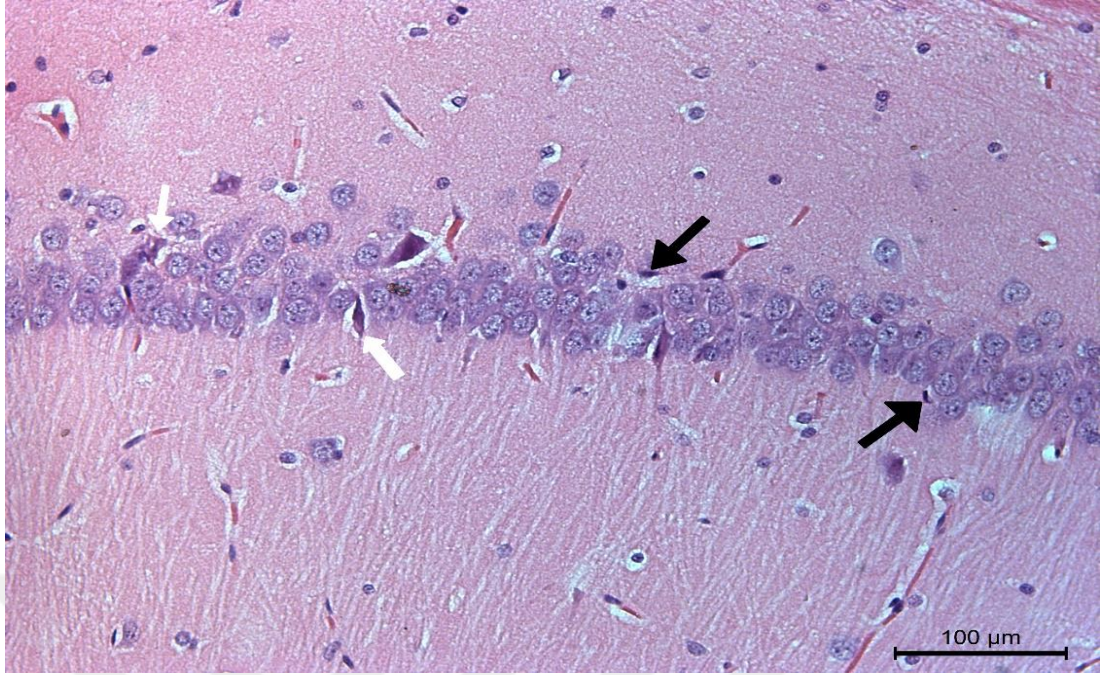
4.2.2. Bisfenol A Grubu

BPA uygulanan grubun CA1 bölgesinde piramidal nöronların korunduğu saptanmıştır. Piramidal nöronlar büyük ökramatik çekirdek, belirgin çekirdekçik ve perinükleer ince sitoplazmaları ile sınırları belirgin ve düzenli olarak izlenmiştir. Piramidal nöronların arasında çevresi boşalmış birkaç dejenere nöron ve yassı çekirdekleri ile mikroglia gözlenmiştir (Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.). CA2 bölgesinin incelenmesinde ökromatik çekirdek, belirgin çekirdekçik ve ince sitoplazmaları ile nöronlar aralarında daha küçük çekirdekli birkaç glia hücresi ve kondanse çekirdekli hücreler izlenmiştir (Şekil 4.12.). CA3 bölgesinde nöronlar ve aralarında yerleşmiş glia hücreleri gözlenmiştir (Şekil 4.13.).



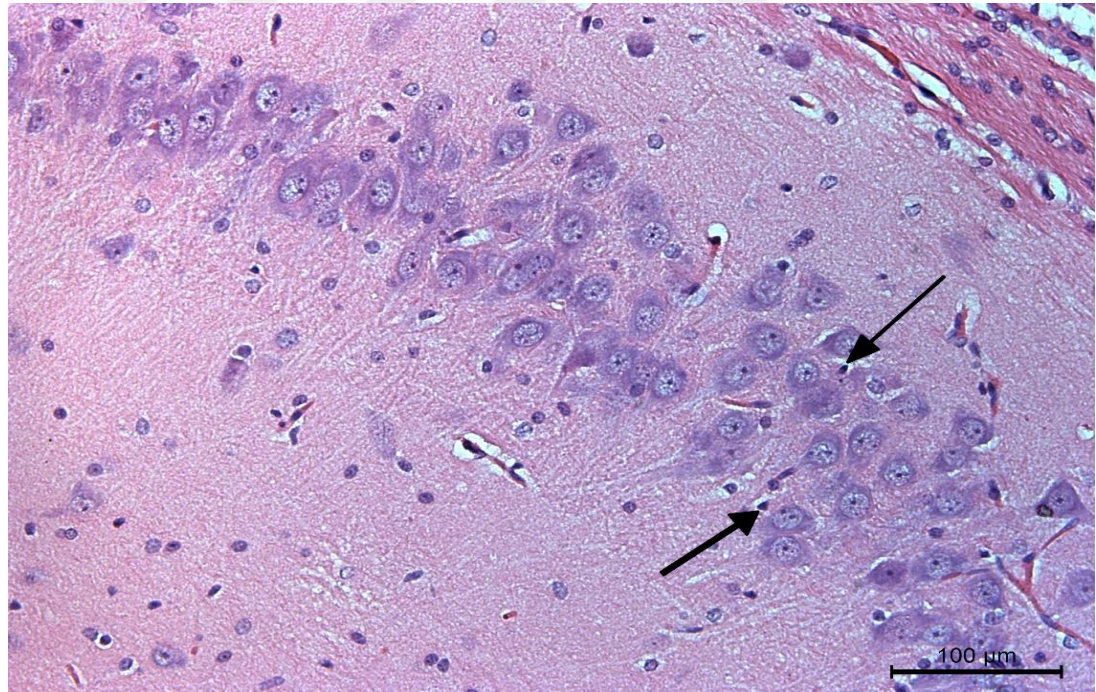
Şekil 4.10. BPA grubuna ait hipokampus dokusu ışık mikrosafı.

BPA uygulanan gruba ait hipokampus kesitinde CA1, CA2, CA3 bölgeleri ve dentate gyrus gözlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X25).



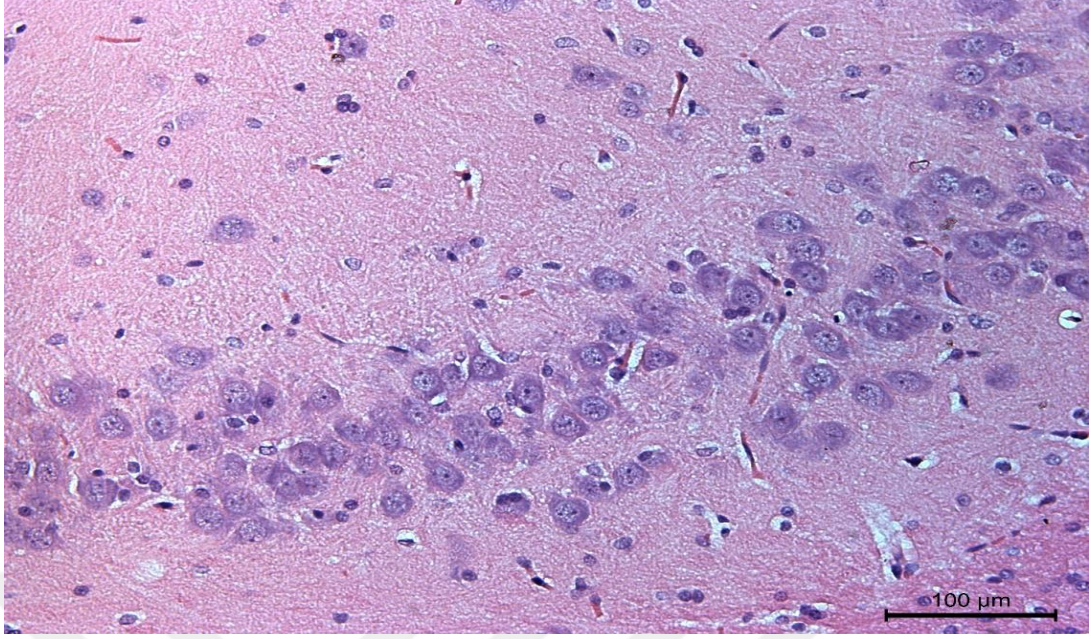
Şekil 4.11. BPA grubuna ait hipokampusta CA1 bölgesi.

BPA uygulanan grupta CA1 bölgesinde pyramidal nöronlar aralarında dejenere nöronlar (beyaz ok) ve yassı çekirdekleri ile mikroglia hücreleri (siyah ok) gözlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).



Şekil 4.12. BPA grubuna ait hipokampusta CA2 bölgesi.

BPA uygulanan grupta CA2 bölgesinde ökromatik çekirdek ve ince sitoplazmaları ile pyramidal nöronlar, glia hücreleri ve kondanse çekirdekli hücreler (siyah ok) izlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).

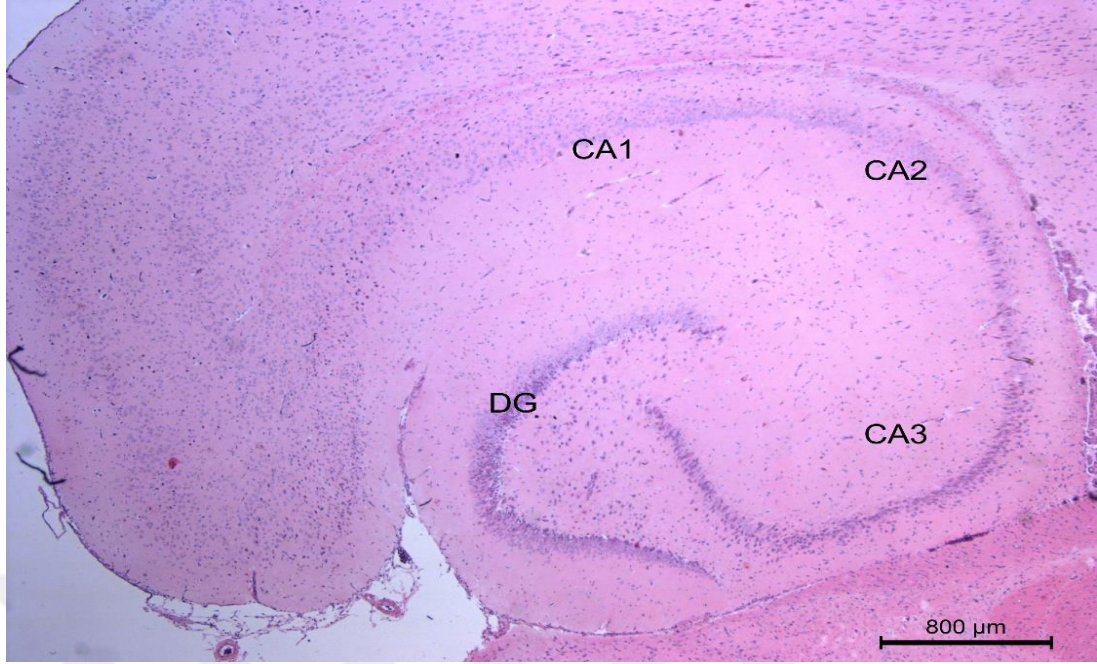


Şekil 4.13. BPA grubuna ait hipokampusta CA3 bölgesi.

BPA uygulanan grupta CA3 bölgesinde piramidal nöronlar, glia hücreleri ve kondanse çekirdekli hücreler izlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).

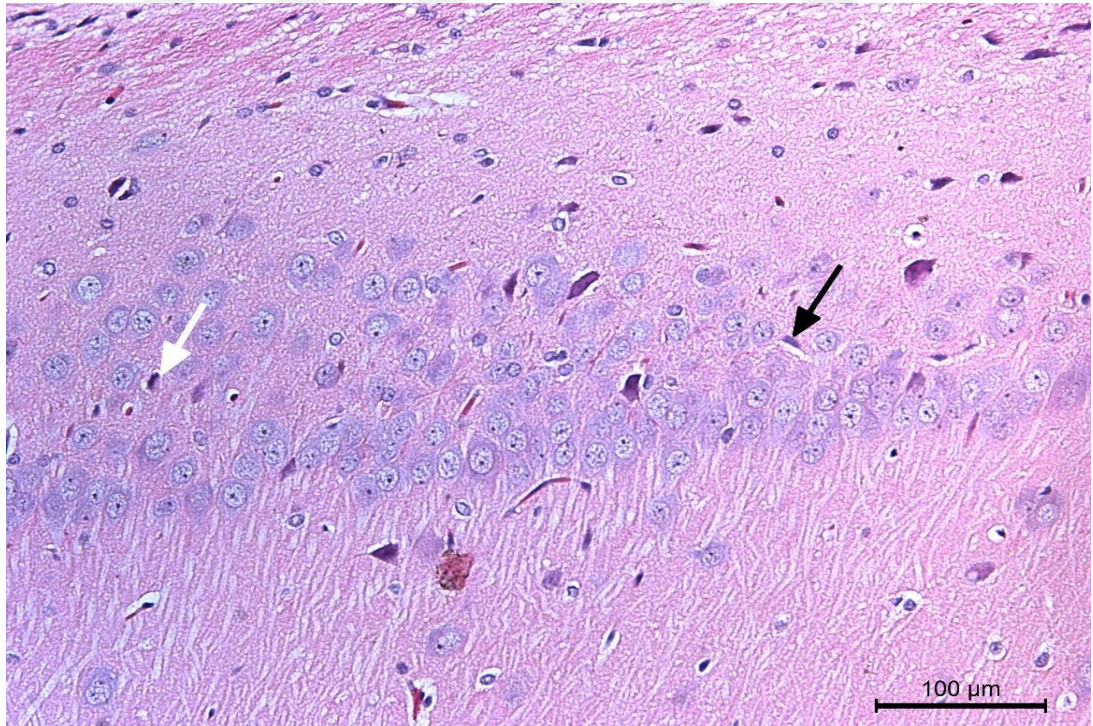
4.2.3. Di-2-Etil Hekzil Ftalat Grubu

Di(2-etilhekzil) ftalat uygulanan grupta CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri ayırt edilmiştir (Şekil 4.14.). Bu grupta belirgin perivasküler ödem izlenmiştir. CA1 bölgesinde piramidal nöronlar, aralarında çevresi boşalmış birkaç dejenere nöron ve yassı çekirdekleri ile mikroglia hücreleri gözlenmiştir (Şekil 4.15.). CA2 bölgesinin incelenmesinde ökromatik çekirdek, belirgin çekirdekçik ve ince sitoplazmaları ile nöronlar aralarında daha küçük çekirdekli birkaç glia hücresi izlenmiş (Şekil 4.16.); CA3 bölgesinde bazofilik sitoplazmalı, bazal dendritleri belirgin piramidal nöronlar ve aralarında yerleşmiş glia hücreleri gözlenmiştir. Piramidal nöronların yer yer sitoplazması büzüşmüş buna bağlı çevreleri boş alan olarak izlenmiş; piramidal hücrelerin bazal dendritleride normal görüntüsünden farklı olarak daha düz ve aralıklı saptanmıştır (Şekil 4.17.).



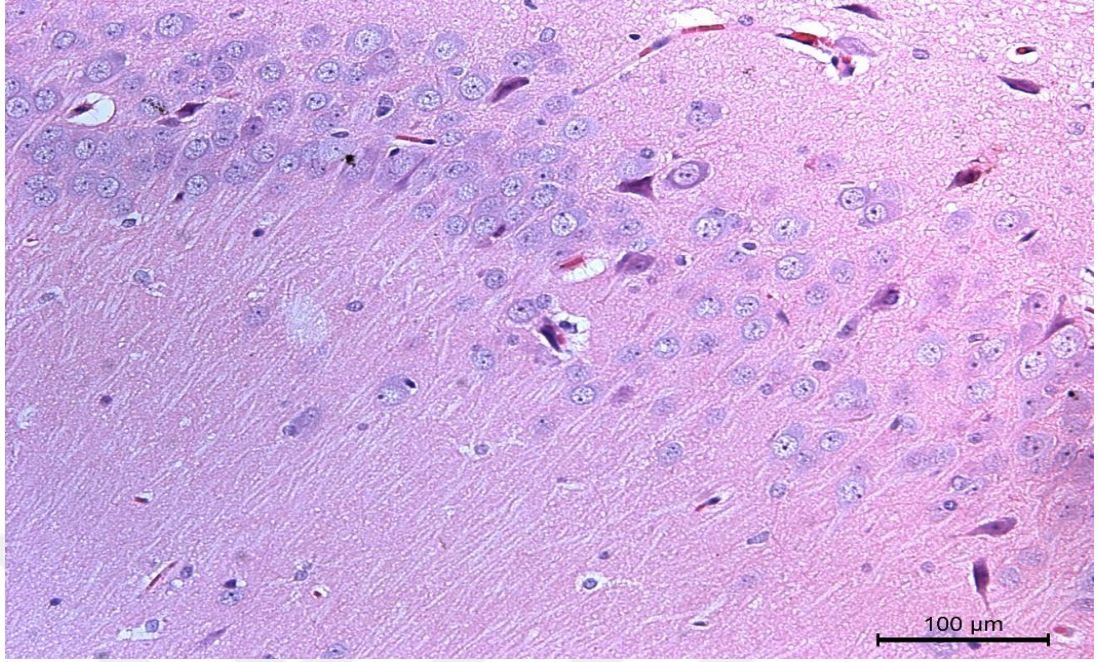
Şekil 4.14. DEHP grubuna ait hipokampus dokusu ışık mikrografı.

DEHP uygulanan grupta CA1, CA2, CA3 bölgeleri ve dentate girus gözlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X25).



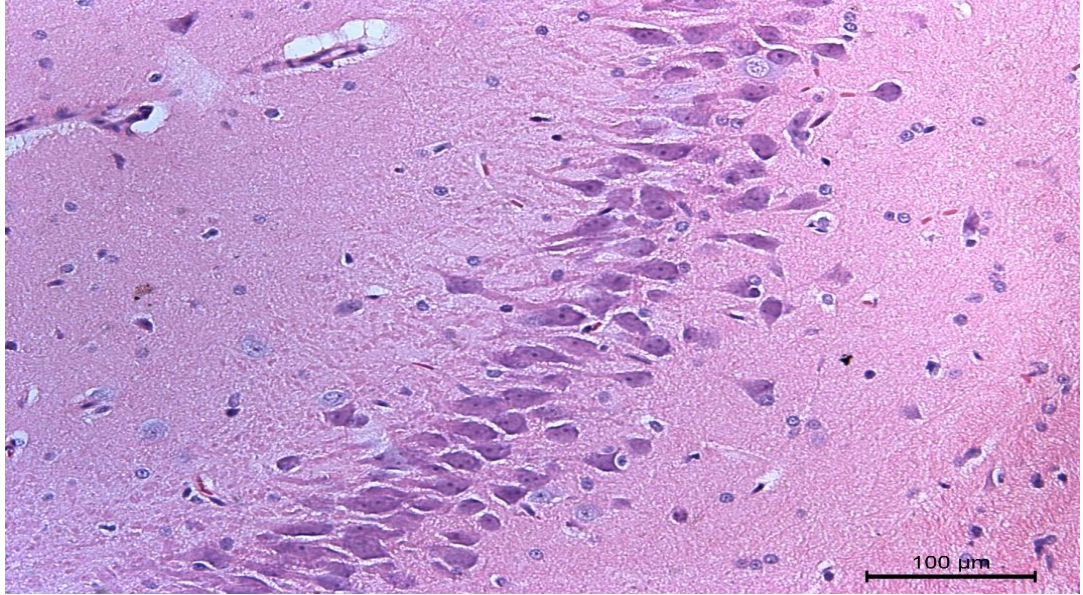
Şekil 4.15. DEHP grubuna ait hipokampusta CA1 bölgesi.

DEHP uygulanan grubun CA1 bölgesinde pyramidal nöronlar, aralarında glia hücreleri, mikroglia hücreleri (siyah ok) ve çekirdekleri kondanse sitoplazma büzülmüş dejenere hücreler (beyaz ok) izlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).



Şekil 4.16. DEHP grubuna ait hipokampusta CA2 bölgesi.

DEHP uygulanan grubun CA2 bölgesinde pyramidal nöronlar, aralarında glia hücreleri izlenmiş; perivasküler ödem gözlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).



Şekil 4.17. DEHP grubuna ait hipokampusta CA3 bölgesi.

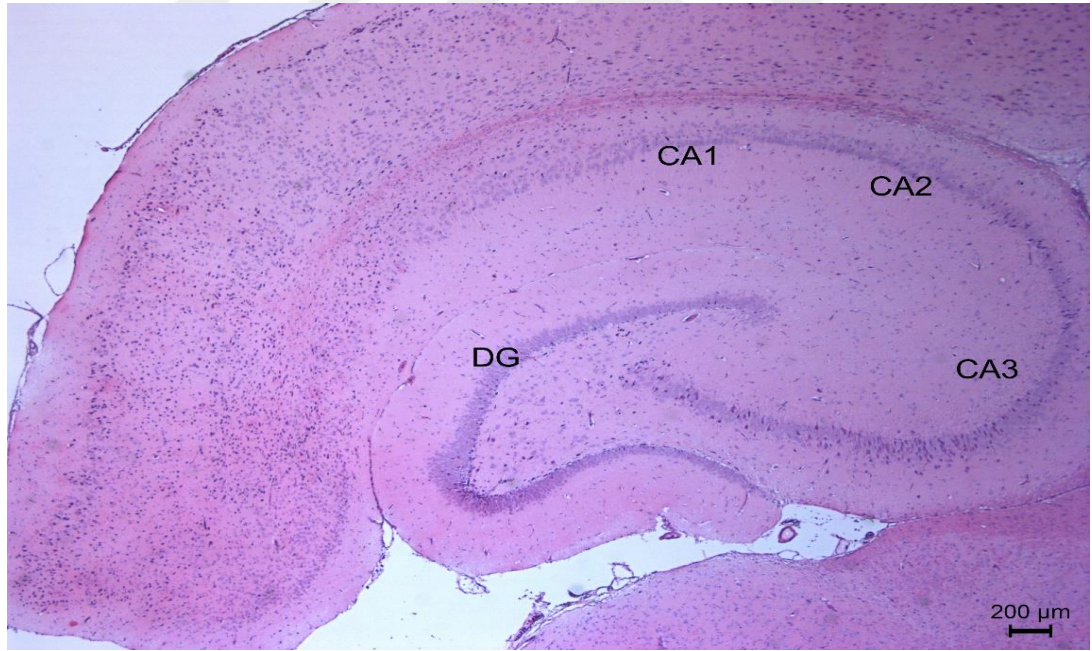
DEHP uygulanan grubun CA3 bölgesinde bazofilik sitoplazmalı, sitoplazmanın büzüşmesine bağlı çevreleri boşalmış, bazal dendritleri belirgin pyramidal nöronlar ve aralarında yerleşmiş glia hücreleri gözlenmiştir. Piramidal hücrelerin bazal dendritleride normal görüntüsünden farklı olarak daha düz ve aralıklı izlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).

4.2.4. Bisfenol A ve Di-2-Etil Hekzil Ftalat Grubu

Bisfenol A ve di(2-etilhekzil) ftalat uygulanan grupta da CA1, CA2, CA3 ve dentate gyrus ayırt edilmiştir (Şekil 4.18). CA1 bölgesinde normal histolojik yapıya sahip piramidal nöronlar arasında kondanse çekirdek ve koyu boyalı sitoplazmaya sahip büzüşmüş nöronlar, yer yer nöron içermeyen alanlar ve kondanse çekirdekli glia hücreleri izlenmiştir (Şekil 4.19.).

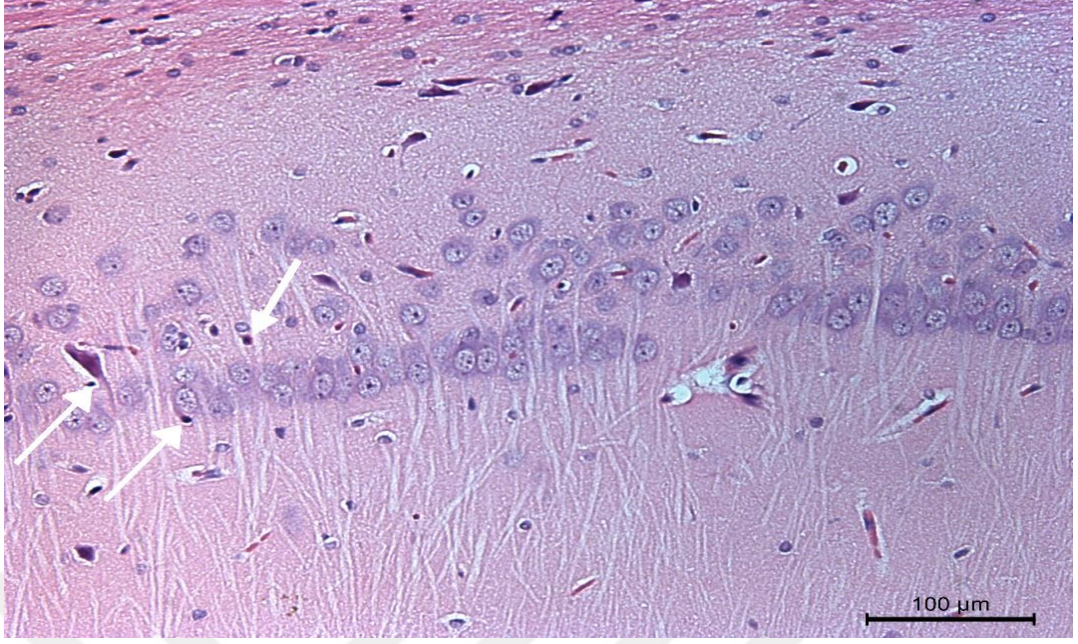
CA2 bölgesinde ökromatik çekirdek ince sitoplazmaya sahip nöronlar arasında kondanse çekirdek ve koyu boyalı sitoplazmaya sahip büzüşmüş nöronlar gözlenmiştir (Şekil 4.20.).

CA3 bölgesinde ökromatik çekirdek, belirgin çekirdekçik ve bazofilik sitoplazmaları ile piramidal nöronlar yanında birkaç kondanse çekirdek ile belirgin dejenere nöron izlenmiş; aralarında yerleşmiş glia hücreleri gözlenmiştir. Piramidal hücrelerin bazal dendritleride normal görüntüsünden farklı olarak daha düz ve aralıklı olarak saptanmıştır (Şekil 4.21.).



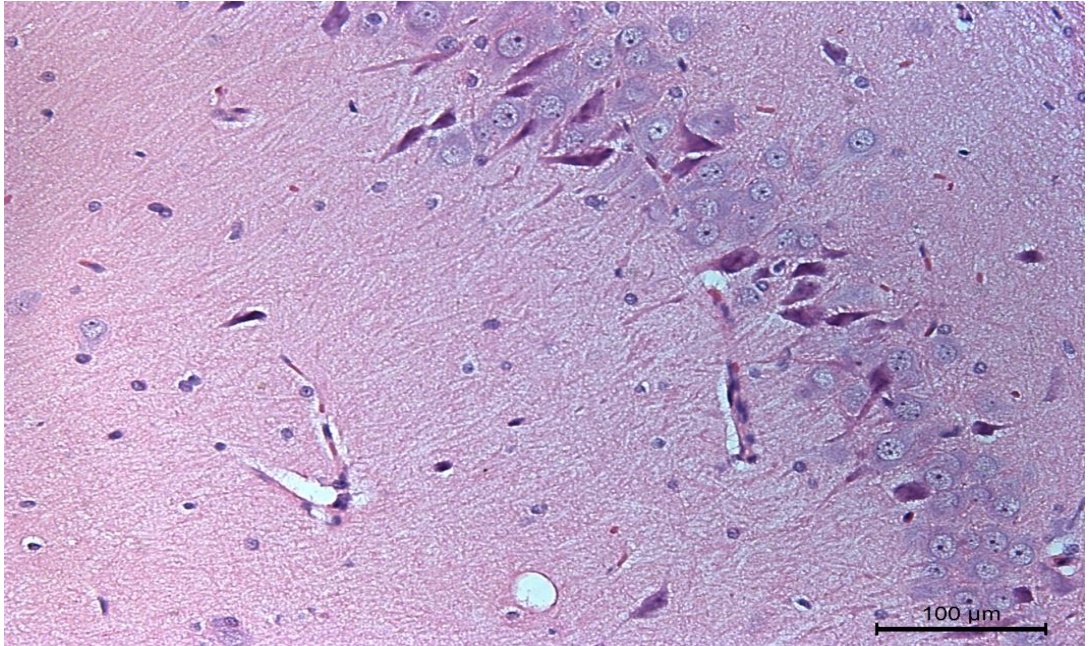
Şekil 4.18. BPA+DEHP grubuna ait hipokampus dokusu ışık mikrofrafı.

BPA+DEHP uygulanan grupta CA1, CA2, CA3 bölgeleri ve dentate girus (DG) gözlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X25).



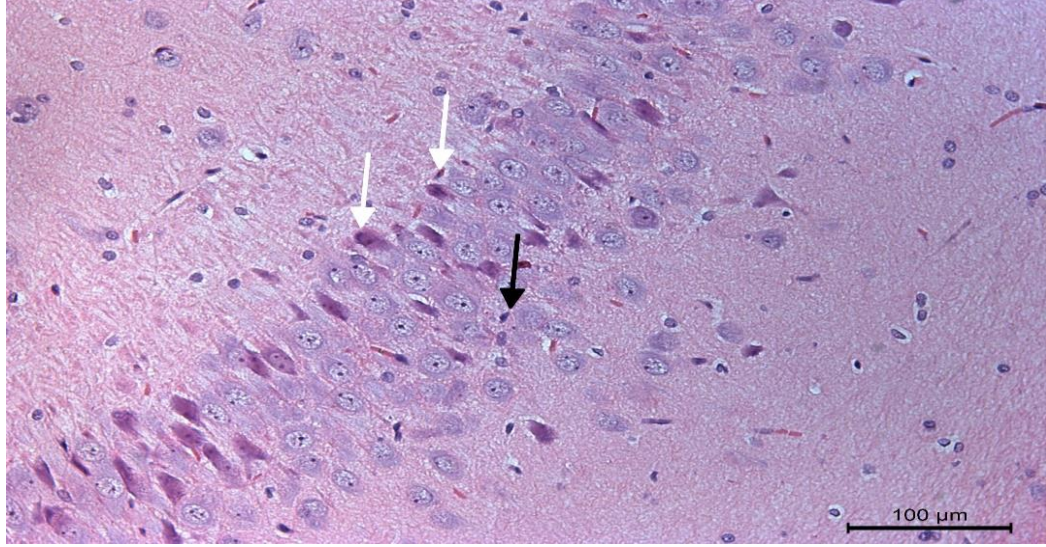
Şekil 4.19. BPA+DEHP grubuna ait hipokampusta CA1 bölgesi.

BPA+DEHP uygulanan grubun CA1 bölgesinde pyramidal nöronlar, aralarında glia hücreleri ve çekirdekleri kondanse sitoplazma büzülmüş dejenere hücreler (beyaz ok) izlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).



Şekil 4.20. BPA+DEHP grubuna ait hipokampusta CA2 bölgesi.

BPA+DEHP uygulanan grubun CA2 bölgesinde ökromatik çekirdek ince sitoplazmaya sahip nöronlar arasında kondanse çekirdek ve koyu boyalı sitoplazmaya sahip büzüşmüş nöronlar izlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).



Şekil 4.21. BPA+DEHP grubuna ait hipokampusta CA3 bölgesi.

BPA+DEHP uygulanan grubun CA3 bölgesinde bazal dendritleri belirgin pyramidal nöronlar ve aralarında yerleşmiş glia hücreleri gözlenmiştir. Kondanse çekirdek ile belirgin dejenere nöron (beyaz ok) ve yassı çekirdeği ile ayırt edilen mikrogliya hücresi (siyah ok) izlenmektedir. Piramidal hücrelerin bazal dendritleride normal görüntüsünden farklı olarak daha düz ve aralıklı izlenmiştir (Hematoksilen-Eozin X200).

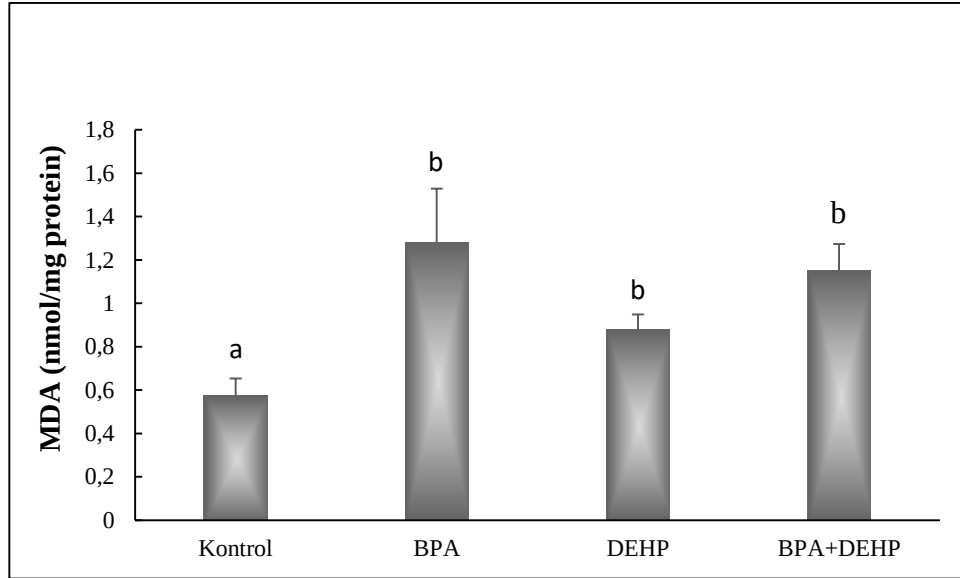
4.3. Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait beyin dokusu MDA düzeyleri Tablo 4.3 ve Şekil 4.22’te verilmiştir. MDA düzeylerinde tüm çalışma gruplarında kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış (BPA grubu: %122; DEHP grubu: %52,2; BPA+DEHP grubu: %99,3) gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.3. Malondialdehit düzeyleri.

Çalışma Grupları	MDA Düzeyleri (nmol/mg protein)
Kontrol	$0,58 \pm 0,076^a$
BPA	$1,28 \pm 0,25^b$
DEHP	$0,88 \pm 0,07^b$
BPA+DEHP	$1,15 \pm 0,12^b$

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



Şekil 4.22. Malondialdehit düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

4.4. Total Glutasyon Düzeyleri

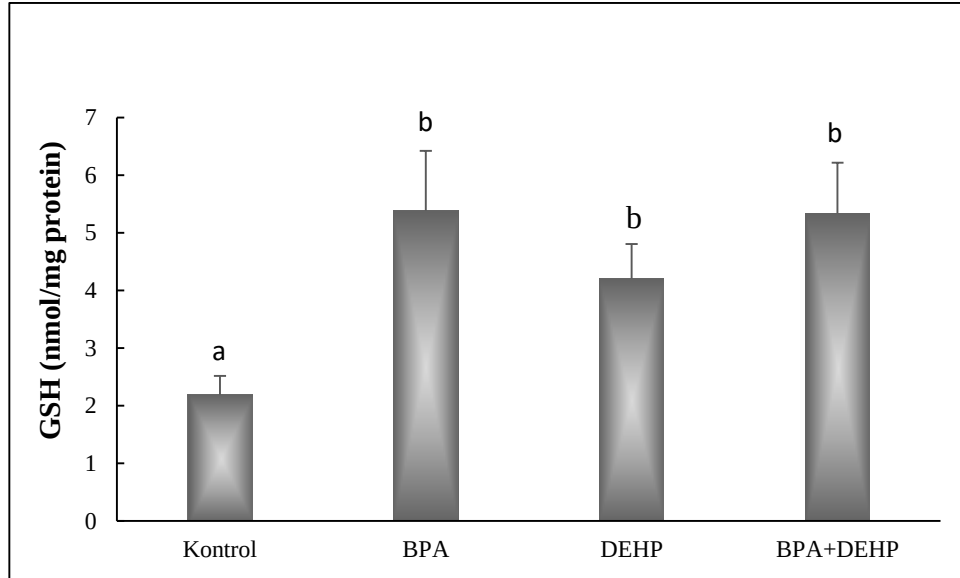
Çalışma gruplarına ait beyin dokusu total GSH düzeyleri Tablo 4.4 ve Şekil 4.23'te verilmiştir. BPA, DEHP ve BPA+DEHP gruplarında total GSH düzeylerinin kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde arttığı (BPA grubu: %146,1; DEHP grubu: %92,2; BPA+DEHP grubu: %144) bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 4.4. Total glutasyon düzeyleri.

Çalışma Grupları	Total GSH Düzeyleri ($\mu\text{mol/mg protein}$)
Kontrol	$2,19 \pm 0,32^a$
BPA	$5,39 \pm 1,03^b$
DEHP	$4,21 \pm 0,60^b$
BPA+DEHP	$5,34 \pm 0,87^b$

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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



Şekil 4.23. Glutatyon düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

4.5. Dopamin Düzeyleri

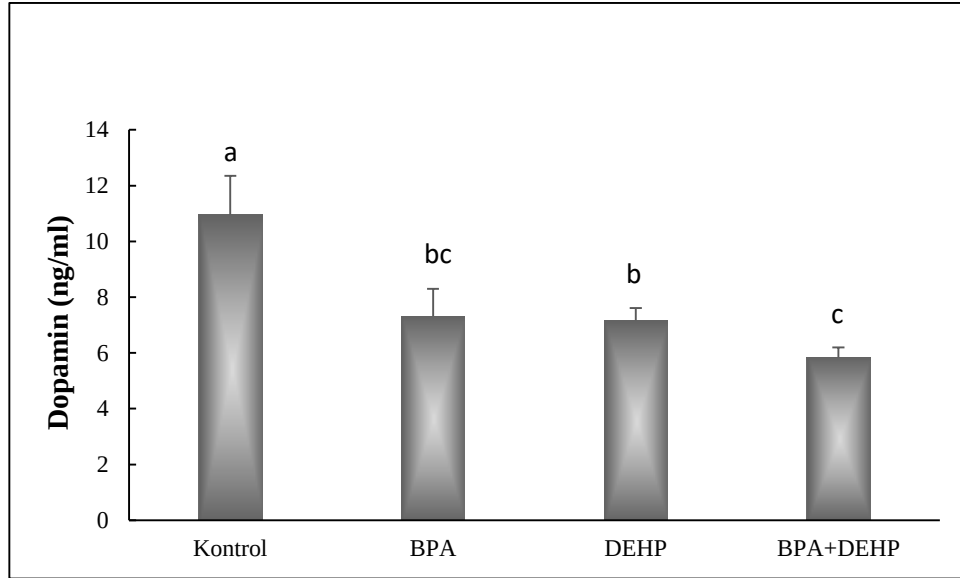
Çalışma gruplarına ait beyin dokusu DA düzeyleri Tablo 4.5 ve Şekil 4.24’te verilmiştir. BPA, DEHP ve BPA+DEHP gruplarında kontrol grubuna oranla DA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma (BPA grubu: %40,5; DEHP grubu: %34,6; BPA+DEHP grubu: %47) gözlenmiştir ($p < 0,05$). BPA+ DEHP grubunda azalma oranının daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.5. Dopamin düzeyleri.

Çalışma Grupları	DA Düzeyleri (ng/ml)
Kontrol	10,97 $\pm$ 1,38 ^a
BPA	6,52 $\pm$ 0,60 ^{bc}
DEHP	7,17 $\pm$ 0,44 ^b
BPA+DEHP	5,85 $\pm$ 0,35 ^c

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. a, b

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



Şekil 4.24. Dopamin düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

4.6. Dopamin Taşıyıcı Protein Düzeyleri

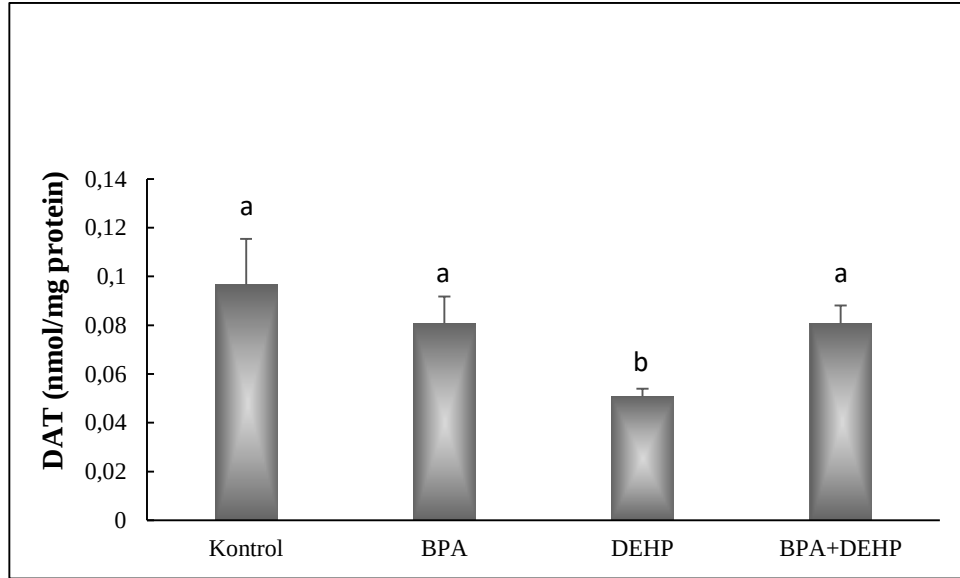
Çalışma gruplarına ait beyin dokusu DAT düzeyleri Tablo 4.6 ve Şekil 4.25 'de gösterilmiştir. DEHP grubunda DAT düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla %47,4 oranında azaldığı ($p < 0,05$) görülmüştür. BPA ve BPA+DEHP gruplarında kontrole göre %16 azalma gözlenmekle birlikte, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p > 0,05$) saptanmıştır.

Tablo 4.6. Dopamin taşıyıcı protein düzeyleri.

Çalışma Grupları	Dopamin Taşıyıcı Protein (nmol/mg protein)
Kontrol	0,097 $\pm$ 0,019 ^a
BPA	0,081 $\pm$ 0,011 ^a
DEHP	0,051 $\pm$ 0,003 ^b
BPA+DEHP	0,081 $\pm$ 0,007 ^a

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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



Şekil 4.25. Dopamin taşıyıcı protein düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

4.7. Monoamin Oksidaz Aktivitesi

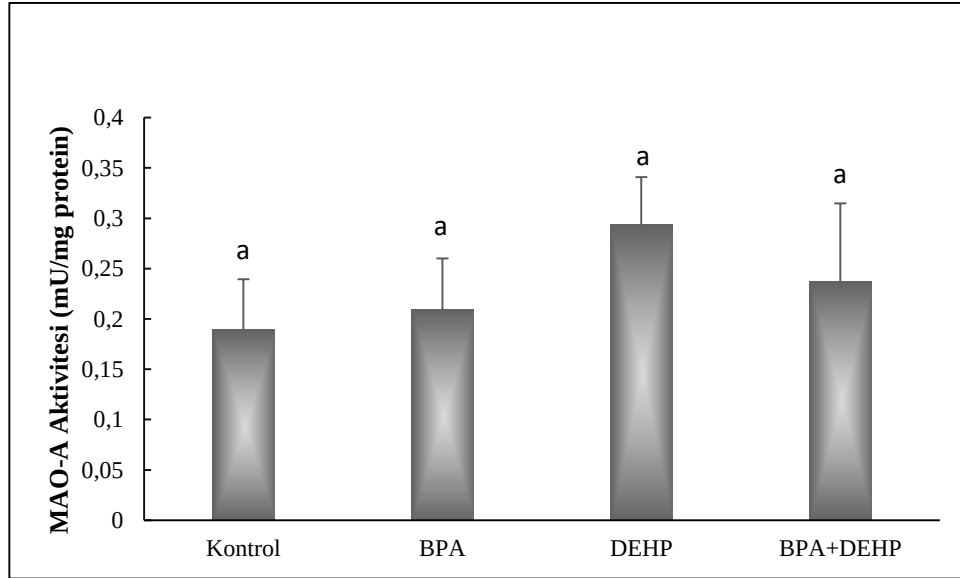
Çalışma gruplarına ait beyin dokusu MAO aktivite düzeyleri Tablo 4.7, 4.8. ve Şekil 4.26., 4.27.'de yer almaktadır. MAO-A aktivitesi BPA grubunda kontrol grubuna oranla bir değişim gözlenmemiş, DEHP ve BPA+DEHP gruplarında ise kontrol grubuna oranla artmıştır (sırasıyla %52,6, %26,3). Ancak, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.7. Monoamin oksidaz-A aktivitesi.

Çalışma Grupları	MAO-A (mU/mg protein)
Kontrol	0,19 $\pm$ 0,05 ^a
BPA	0,21 $\pm$ 0,05 ^a
DEHP	0,29 $\pm$ 0,04 ^a
BPA+DEHP	0,24 $\pm$ 0,08 ^a

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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



Şekil 4.26. Monoamin oksidaz-A aktivite düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

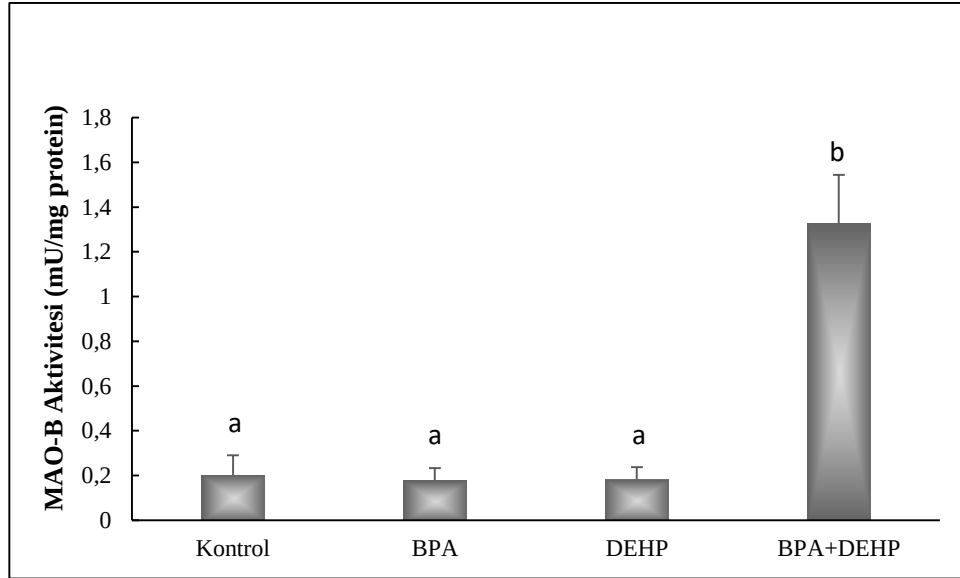
Beyin MAO-B aktivitesi düzeyleri BPA ve DEHP gruplarında kontrol grubuna kıyasla değişmezken, BPA+DEHP grubunda aktivitenin 6,7 kat (%565) arttığı gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.8. Monoamin oksidaz-B aktivitesi.

Çalışma Grupları	Monoamin Oksidaz B (mU/mg protein)
Kontrol	0,20 $\pm$ 0,09 ^a
BPA	0,18 $\pm$ 0,05 ^a
DEHP	0,18 $\pm$ 0,06 ^a
BPA+DEHP	1,33 $\pm$ 0,22 ^b

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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



Şekil 4.27. Monoamin oksidaz-B aktivite düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

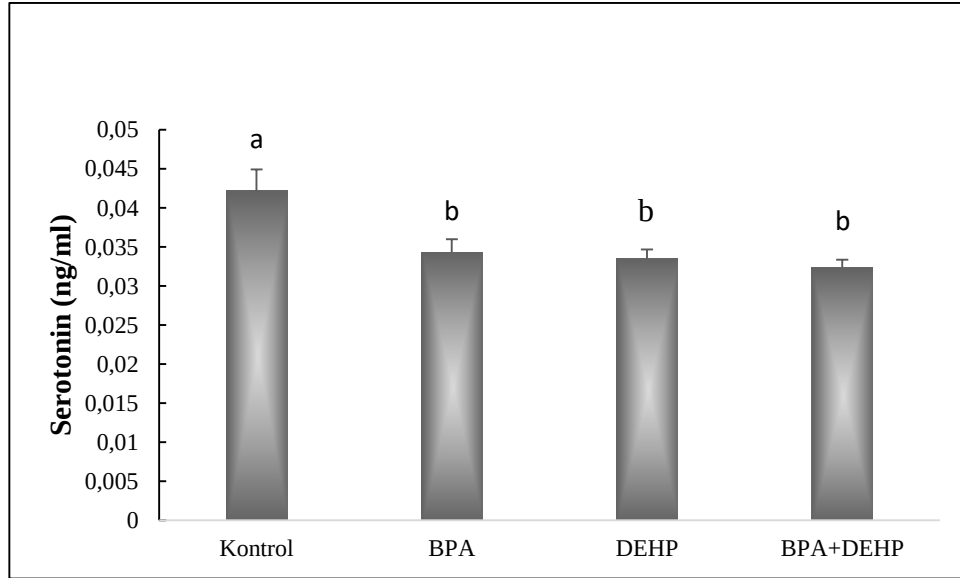
4.8. Serotonin Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait beyin dokusu serotonin düzeyleri Tablo 4.9 ve Şekil 4.28'de verilmiştir. Tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna oranla serotonin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma (BPA grubu: %19; DEHP grubu: %19; BPA+DEHP grubu: %23,8) gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.9. Serotonin düzeyleri.

Çalışma Grupları	Serotonin Düzeyleri (ng/ml)
Kontrol	0,042 $\pm$ 0,003 ^a
BPA	0,034 $\pm$ 0,002 ^b
DEHP	0,034 $\pm$ 0,001 ^b
BPA+DEHP	0,032 $\pm$ 0,001 ^b

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



Şekil 4.28. Serotonin düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

4.9. Asetilkolinesteraz Aktivitesi

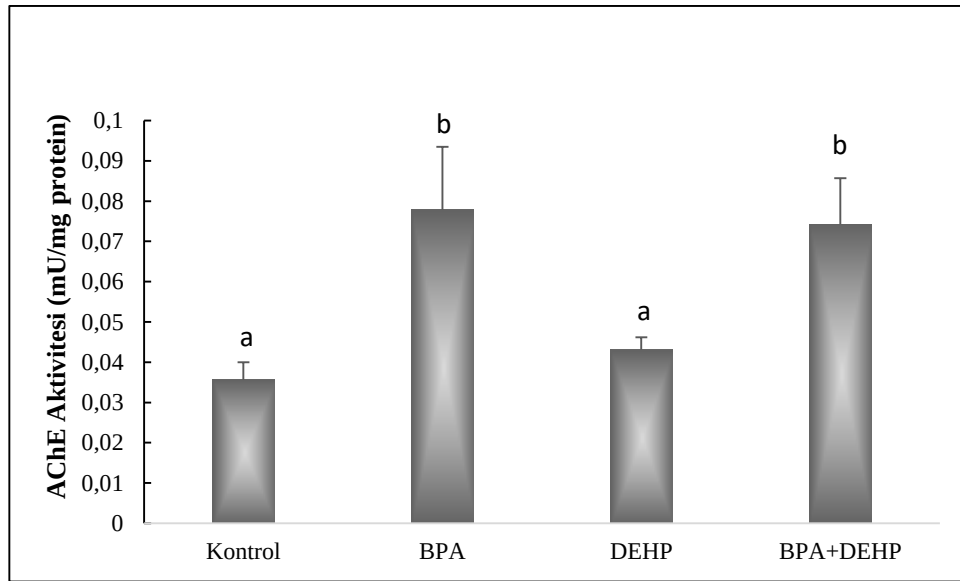
Çalışma gruplarına ait beyin AChE aktivite düzeyleri Tablo 4.10 ve Şekil 4.29'da verilmiştir. BPA ve BPA+DEHP gruplarında AChE aktivitesinin kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde arttığı (BPA %117; BPA+DEHP %106) bulunmuştur ($p < 0,05$). DEHP grubunda kontrol grubuna oranla saptanan %19 düzeyindeki artış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.10. Asetilkolinesteraz aktivitesi.

Çalışma Grupları	AChE (mU/mg protein)
Kontrol	0,036 $\pm$ 0,004 ^a
BPA	0,078 $\pm$ 0,015 ^b
DEHP	0,043 $\pm$ 0,003 ^a
BPA+DEHP	0,074 $\pm$ 0,011 ^b

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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



Şekil 4.29. Asetilkolinesteraz aktivitesi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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

4.10. Apoptoz Tayini

Deney gruplarında apoptotik hücre sayısını belirlemek için TUNEL işaretlemesi yapılmıştır. TUNEL analizinde deney gruplarında CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde nöron ve glia hücrelerinde apoptotik hücrelerin ortalama yüzdesi değerlendirilmiştir. Apoptotik hücre sayıları Tablo 11-16. ve Şekil 30-35.'te verilmiştir.

Kontrol grubunda CA1 bölgesinde nöronların %49'unun, glia hücrelerinin %51'inin TUNEL pozitif olduğu saptanmıştır. CA2 bölgesinde nöronların %49'unun, glia hücrelerinin %53'ünün TUNEL pozitif olduğu belirlenmiştir. CA3 bölgesinde ise nöronların %47'sinin, glia hücrelerinin %52'sinin TUNEL pozitif olduğu saptanmıştır.

Bisfenol A uygulanan grupta CA1 bölgesinde nöronların %85'inin ve glia hücrelerinin %66'sının apoptotik olduğu saptanmıştır. CA2 bölgesinde nöronların %73'ünün, glia hücrelerinin %78'inin TUNEL pozitif olduğu belirlenmiştir. CA3 bölgesinde ise nöronların %69'unun, glia hücrelerinin %67'sinin TUNEL pozitif olduğu gözlenmiştir. BPA uygulanan grupta CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde apoptotik nöron ve glia yüzdeleri kontrole göre artmıştır ve bu artışın CA1 ve CA2 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$).

DEHP uygulanan grupta CA1 bölgesinde %88 nöronun apoptotik olduğu, %64 glia hücrelerinin apoptoz gösterdiği saptanmıştır. CA2 bölgesinde nöronların %76'sının, glia hücrelerinin %52'sinin TUNEL pozitif olduğu belirlenmiştir. CA3 bölgesinde nöronların %74'ünün, glia hücrelerinin %54'ünün TUNEL pozitif olduğu gözlenmiştir. DEHP uygulanan grupta CA1 ve CA2 bölgelerinde apoptotik nöron yüzdeleri kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0.05$).

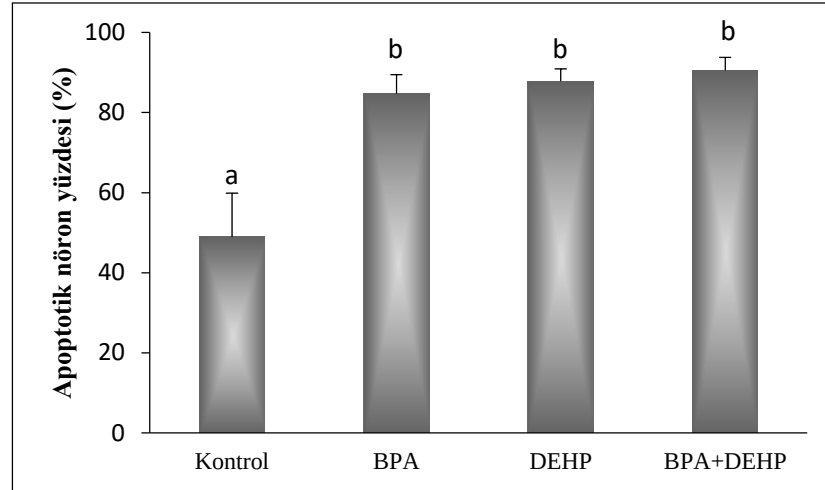
BPA+DEHP uygulanan grupta CA1 bölgesinde %91 nöronun apoptotik olduğu, %69 glia hücrelerinin apoptoz gösterdiği saptanmıştır. CA2 bölgesinde nöronların %73'ünün, glia hücrelerinin %60'ının TUNEL pozitif olduğu belirlenmiştir. CA3 bölgesinde nöronların %73'ünün, glia hücrelerinin %75'inin TUNEL pozitif olduğu saptanmıştır. BPA+DEHP uygulanan grupta her üç bölgede de apoptotik nöron yüzdesinin kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Apoptotik glia yüzdesinde CA1 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır ($p<0.05$). CA3 bölgesinde de kontrol grubuna oranla artış gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p=0,051$). Hipokampus dokularına ait görüntüler Şekil 4.36.'da verilmiştir.

Tablo 4.11. Hipokampus CA1 bölgesi apoptotik nöron yüzdesi.

Çalışma Grupları	Apoptotik nöron yüzdesi (%)
Kontrol	49±10,96 ^a
BPA	85±4,73 ^b
DEHP	88±3,07 ^b
BPA+DEHP	91±3,31 ^b

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

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



Şekil 4.30. Hipokampus CA1 bölgesi apoptotik nöron yüzdesi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

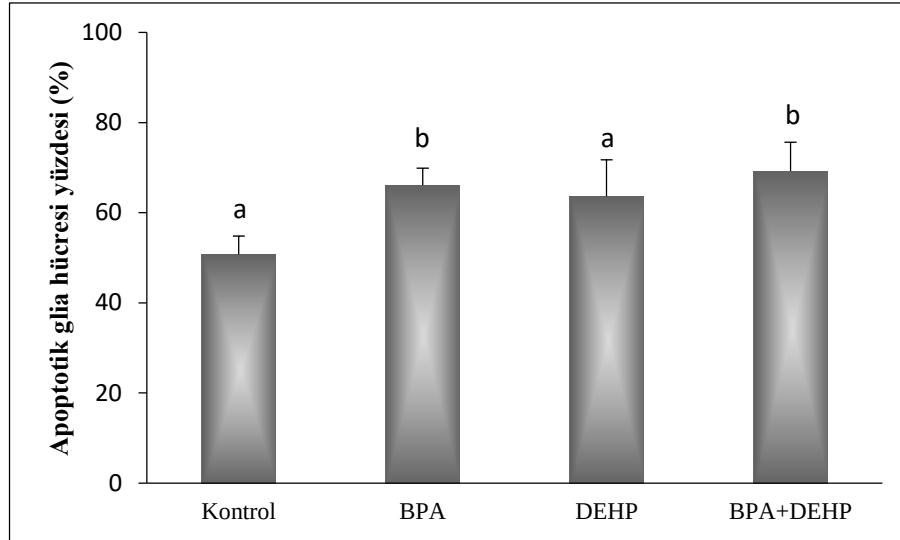
^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

Tablo 4.12. Hipokampus CA1 bölgesi apoptotik glia hücresi yüzdesi.

Çalışma Grupları	Apoptotik glia hücresi yüzdesi (%)
Kontrol	$51 \pm 4,10^a$
BPA	$66 \pm 3,76^b$
DEHP	$64 \pm 8,09^a$
BPA+DEHP	$69 \pm 6,38^b$

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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



Şekil 4.31. Hipokampus CA1 bölgesi apoptotik hücresi glia yüzdesi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

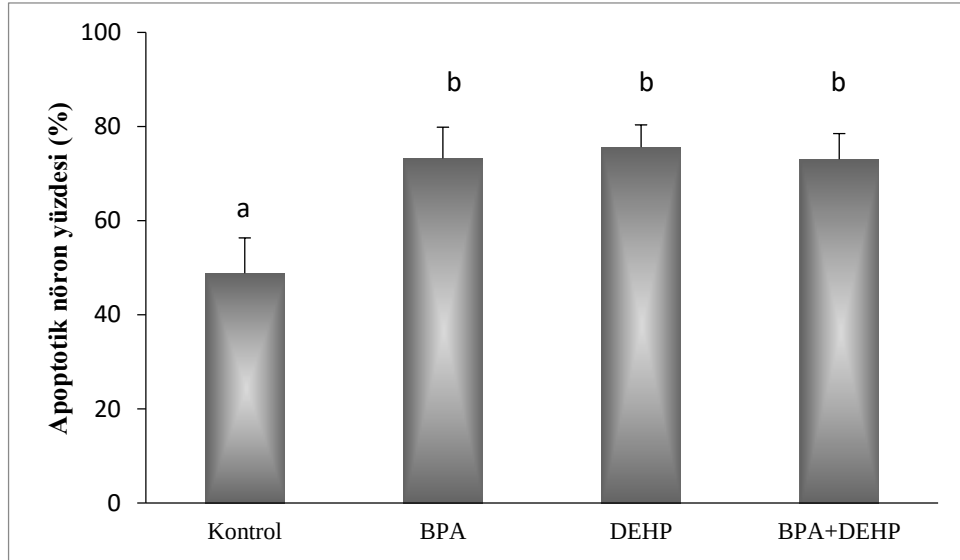
^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

Tablo 4.13. Hipokampus CA2 bölgesi apoptotik nöron yüzdesi.

Çalışma Grupları	Apoptotik nöron yüzdesi (%)
Kontrol	49 $\pm$ 7,46 ^a
BPA	73 $\pm$ 6,60 ^b
DEHP	76 $\pm$ 4,70 ^b
BPA+DEHP	73 $\pm$ 5,48 ^b

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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



Şekil 4.32. Hipokampus CA2 bölgesi apoptotik nöron yüzdesi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

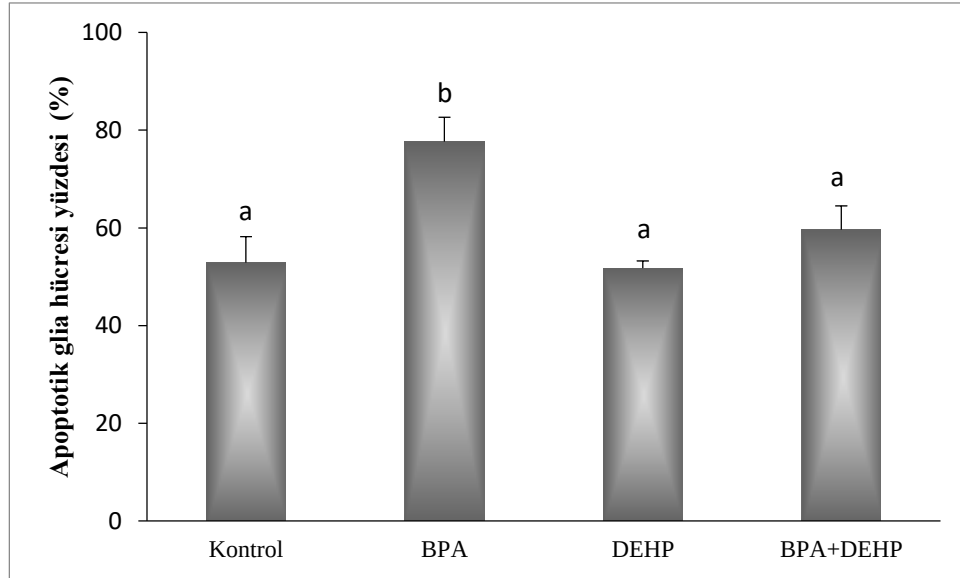
^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

Tablo 4.14. Hipokampus CA2 bölgesi apoptotik glia hücresi yüzdesi.

Çalışma Grupları	Apoptotik glia hücresi yüzdesi (%)
Kontrol	53 $\pm$ 5,31 ^a
BPA	78 $\pm$ 5,00 ^b
DEHP	52 $\pm$ 1,46 ^a
BPA+DEHP	60 $\pm$ 4,83 ^a

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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



Şekil 4.33. Hipokampus CA2 bölgesi apoptotik glia hücresi yüzdesi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

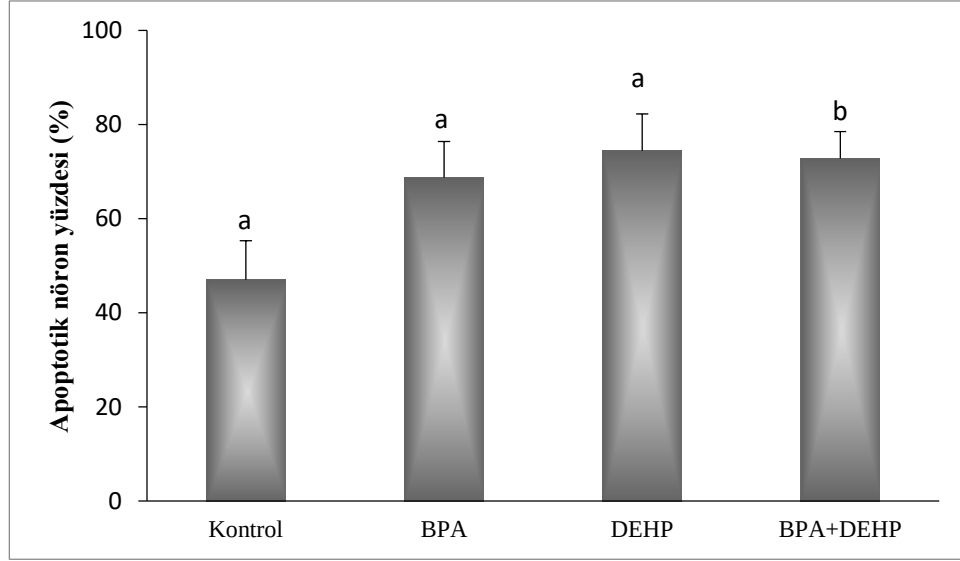
^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

Tablo 4.15. Hipokampus CA3 bölgesi apoptotik nöron yüzdesi.

Çalışma Grupları	Apoptotik nöron yüzdesi (%)
Kontrol	47 $\pm$ 8,28 ^a
BPA	69 $\pm$ 7,67 ^a
DEHP	74 $\pm$ 7,80 ^a
BPA+DEHP	73 $\pm$ 5,75 ^b

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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



Şekil 4.34. Hipokampus CA3 bölgesi apoptotik nöron yüzdesi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

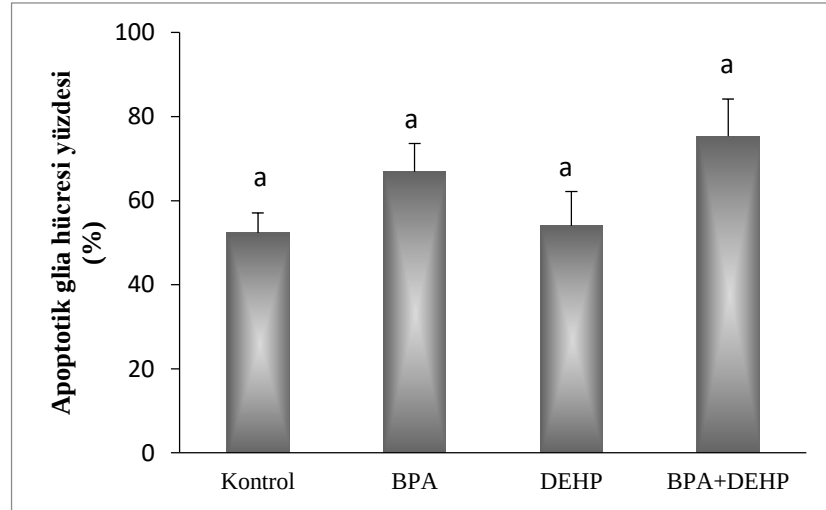
^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

Tablo 4.16. Hipokampus CA3 bölgesi apoptotik glia hücresi yüzdesi.

Çalışma Grupları	Apoptotik glia hücresi yüzdesi (%)
Kontrol	52 $\pm$ 4,70 ^a
BPA	67 $\pm$ 6,68 ^a
DEHP	54 $\pm$ 8,11 ^a
BPA+DEHP	75 $\pm$ 8,89 ^a

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

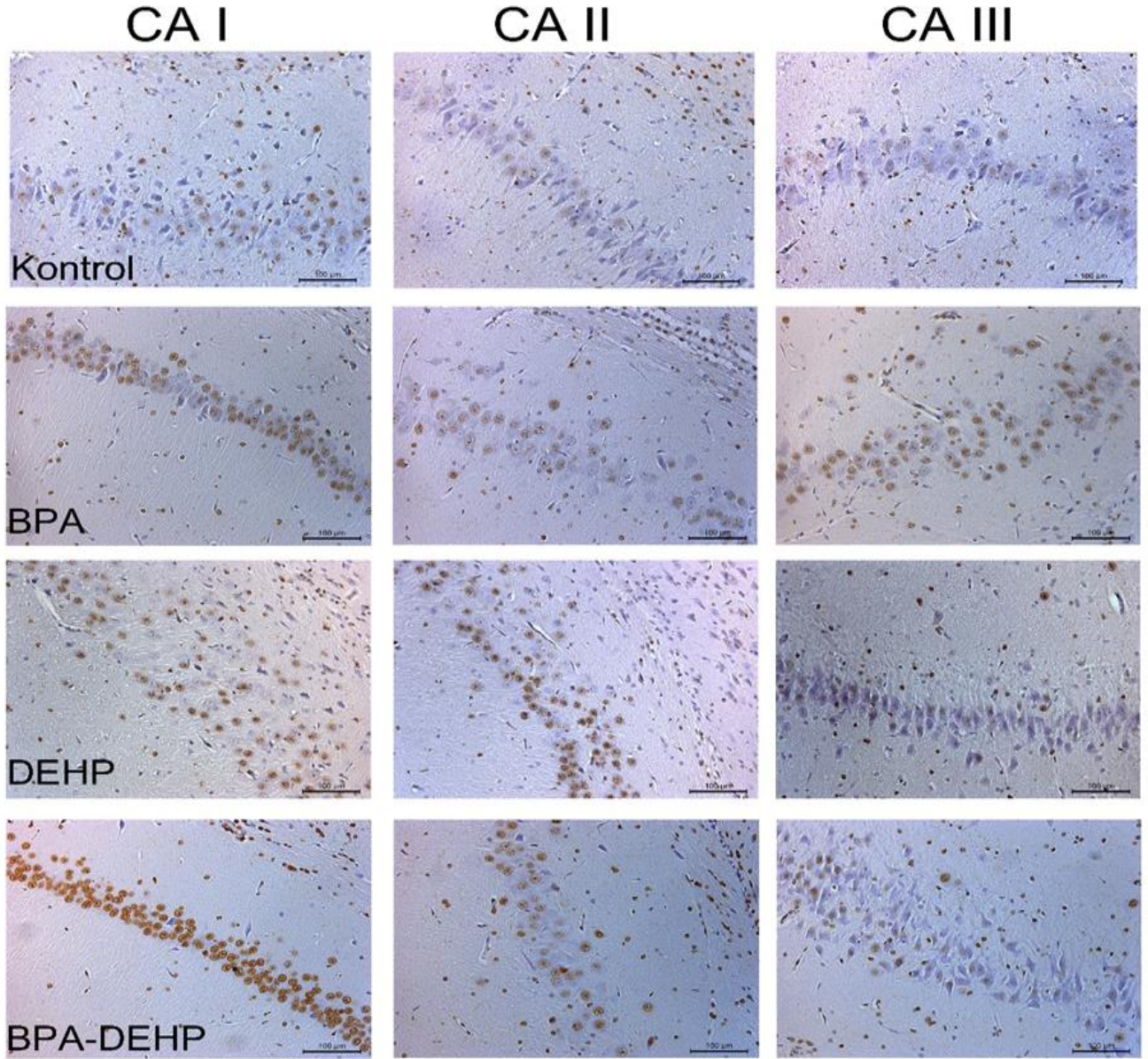
^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.35. Hipokampus CA3 bölgesi apoptotik glia hücresi yüzdesi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

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



Şekil 4.36. Deney gruplarında hipokampus dokusuna ait apoptotik inceleme.

Deney gruplarında hipokampusta CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde TUNEL pozitif (kahverengi) işaretlenen apoptotik hücreler gözlenmiştir (X200).

5. TARTIŞMA

Endokrin bozucu kimyasal maddeler, hormonların sentezini ve/veya biyotransformasyonunu değiştirmek, hormon reseptörlerini aktive/antagonize etmek gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla vücudun normal endokrin işlevlerini bozan doğal veya sentetik kimyasal maddelerdir (1,2). EBK'lerin birçok farklı mekanizma üzerinden beyin gelişimine etki edebileceği üzerinde durulmaktadır. Bu etkilerden bazılarını beyin ve periferik endokrin sistem arasındaki entegrasyonu sağlayan nöroendokrin sistem üzerinden gösterebilecekleri rapor edilmiştir (9,15). Santral sinir sistemi ve nöroendokrin sistem tüm nörotransmitter, nöropeptit ve nörohormon sistemleri ile denge durumunda işlemektedir. EBK'ler mevcut denge durumunu bozarak çeşitli nörolojik hasarlara neden olabilir (14). Son yıllarda toksik kimyasal maddelerin üretimindeki artışla birlikte nörogelişimsel hastalıkların prevalansında artış gözlenmeye başlanmıştır (174).

Endokrin bozucu kimyasal maddelere maruziyetin sonuçları, maruz kalınan doza, maruziyet zamanına ve maruz kalınan maddeye göre önemli ölçüde değişiklik göstermektedir. Santral sinir sistemi ve nöroendokrin sistem özellikle gelişme döneminde hormonal kontrole ve dolayısıyla EBK'lerle maruziyete karşı hassastır (17). EBK'lerin hamilelik döneminde anne kanı ve laktasyon döneminde anne sütü yoluyla bebeğe geçtiğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (175,176). Bu nedenle hamilelik ve laktasyon dönemlerinde EBK'lere maternal olarak maruziyetin fetüsün beyin fonksiyonlarının gelişimsel olarak değişmesine neden olabileceği ve bu durumun ömür boyu sürecek sonuçlarının görülebileceği düşünülebilir (177). Ayrıca, EBK'lerin kullanım alanları ve sıklığı göz önüne alındığında birden fazla kimyasal maddeye aynı anda temasın kaçınılmaz olduğu açıktır. Bu maddelere karışım halinde maruziyet sonucunda ortaya çıkan etkilerin farklı olacağı ve net etkinin değişebileceği öngörülmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, çevrede oldukça yaygın olarak bulunan ve endokrin bozucu etkileri bilinen BPA ve DEHP'e prenatal dönem ve laktasyon döneminde tek tek veya karışım halinde maruziyetin, sıçanlarda nöroendokrin sistem üzerindeki istenmeyen etkileri, beyin dokusunda nörotransmitter sistemler üzerindeki etkileri (DA, DAT ve serotonin düzeyleri, AChE ve MAO aktiviteleri) ile histopatolojik değişiklikler ve apoptoz oluşumu irdelenerek değerlendirilmiştir. Ayrıca, bu

istenmeyen etkilere sebep olabilecek mekanizmalardan biri olarak oksidatif stres oluşumu değerlendirilmiştir. İçerdiği fonksiyonel birimler bakımından serebrum, çoğu beyin fonksiyonunun düzenlendiği merkez konumundadır. Bu nedenle nöroendokrin ve oksidatif stres parametrelerinin bu bölgede ölçülmesiyle birlikte EBK'lerin beyin fonksiyonları üzerindeki etkilerinin geniş bir açıdan irdelenmesi amaçlanmıştır.

5.1. Beyin Ağırlıkları

Çalışma gruplarında yer alan sıçanların ötenazisinin ardından ölçülen ortalama beyin ağırlıkları yönünden gruplarda kontrole kıyasla anlamlı bir fark saptanmamıştır. Rölatif beyin ağırlıkları değerlendirildiğinde ise DEHP grubundaki rölatif beyin ağırlığının kontrol grubuna oranla %18 arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). BPA ve kombine maruziyet gruplarında da kontrol grubuna oranla bir artış görülmekle birlikte bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

Yapılan diğer çalışmalar değerlendirildiğinde, maternal BPA ve/veya DEHP maruziyetinin beyin ağırlıkları üzerindeki etkisinin değişken olabileceği görülmektedir (173, 178). Tanida ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, prenatal BPA ve DEHP maruziyetinin erkek sıçanlarda 6 haftalıkken beyin ağırlığını azalttığını ancak kombine maruziyette aynı etkinin gözlenmediğini bulmuştur. Yine aynı çalışmada, sıçanlar 2 haftalıkken tüm gruplarda kontrole kıyasla rölatif beyin ağırlığının arttığı gözlenmiştir. Ancak 4 ve 6 haftalık sıçanlarda bu etki kaybolmuştur (173). Kabuto ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada ise dişi gebe fareler gebelik ve laktasyon dönemi boyunca 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ BPA içeren içme suyu ile BPA'ya maruz bırakılmış ve yavrular doğduktan sonra 4. haftada dekapite edilerek yaş beyin ağırlıkları ölçülmüştür. 5 $\mu\text{g/ml}$ BPA içeren içme suyuna maruz kalan farelerden doğan yavruların yaş beyin ağırlıklarının kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir (178). Prenatal EBK maruziyetinin yetişkinlik döneminde (sıçanlarda 12. hafta) beyin ağırlığı üzerindeki etkilerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. EBK maruziyeti ile ilişkilendirilen nörogelişimsel bir hastalık olan otizmde de beyin ağırlıklarının arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu artışın EBK maruziyetine bağlı gelişebileceği ileri sürülmektedir (179).

Mevcut bulgular değerlendirildiğinde doz ve maruziyet zamanı kadar ölçümün yapıldığı zamanın da sonuçları etkileyebileceği öngörülmektedir.

5.2. Histopatolojik Analizler

Tez kapsamında yapılan çalışmada, gerek tek başına BPA uygulanan gruba ait gerekse DEHP grubuna ait hipokampusun CA1 bölgesinde piramidal nöronların arasında çevresi boşalmış birkaç dejenere nöron ve yassı çekirdekleri ile mikroglialar gözlenmiştir. Ayrıca DEHP grubunda CA1 bölgesinde belirgin perivasküler ödem izlenmiştir. Bu gruba ait hipokampus CA3 bölgesinde piramidal nöronların yer yer sitoplazmalarının büzüşmüş olduğu ve buna bağlı olarak çevrelerinde boş alanlar olduğu görülmüştür. Ayrıca piramidal hücrelerin bazal dendritleri de normal görüntüsünden farklı olarak daha düz ve aralıklı olarak izlenmiştir.

Karışım halinde BPA ve DEHP uygulanan gruba ait hipokampus dokusunun CA1 bölgesinde normal histolojik yapıya sahip piramidal nöronlar arasında kondanse çekirdek ve koyu boyalı sitoplazmaya sahip büzüşmüş nöronlar ve kondanse çekirdekli glia hücreleri izlenmiştir. Tek başına BPA ve DEHP maruziyet gruplarından farklı olarak yer yer nöron içermeyen alanlar kombine maruziyet grubunun CA1 bölgesinde saptanmıştır. CA2 bölgesinde ökromatik çekirdek ince sitoplazmaya sahip nöronlar arasında kondanse çekirdek ve koyu boyalı sitoplazmaya sahip büzüşmüş nöronlar gözlenmiştir. CA3 bölgesinde ökromatik çekirdek, belirgin çekirdekçik ve bazofilik sitoplazmaları ile piramidal nöronlar yanında birkaç kondanse çekirdek ile belirgin dejenere nöron izlenmiştir. Piramidal hücrelerin bazal dendritleri de normal görüntüsünden farklı olarak daha düz ve aralıklı olarak gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre prenatal ve erken postnatal dönemde BPA ve DEHP maruziyetinin hipokampus dokusunda morfolojik bozulmalara yol açabileceği düşünülebilir. Hipokampus CA1 bölgesi nöronları uzaysal öğrenme ve bellek için büyük önem taşımaktadır. (180). Bunun yanında CA3 bölgesi fonksiyonlarının ve CA1 bölgesi ile CA3 bölgesi arasındaki bağlantıların sağlamlığı uzun süreli hafızanın oluşması için gereklidir (181). Çalışmamızda tüm deney gruplarında hipokampusun CA1 bölgesindeki piramidal nöronlarda dejenerasyon olduğu görülmüştür. Ayrıca, DEHP grubunda ve kombine maruziyet grubunda CA3 bölgesinde morfolojik bozulmaların yanı sıra kombine maruziyet grubunda bu bölgede dejenerasyon olduğu görülmüştür.

Araştırmalar, belleği etkileyen beyin bölgelerinde sinaptik plastisite ve sinaptogenezin östrojene bağlı olarak geliştiğini göstermektedir. EBK'lerin

hayvanlarda hafıza gelişimini bozduğunu gösteren çalışmalar vardır (182-185). Eliam-Stock ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada tek doz BPA maruziyeti (40 µg/kg) sonucunda yetişkin erkek sıçanlarda hafıza testleri sonuçlarında düşme olduğunu ve hipokampusun CA1 bölgesinde %10-25 oranında dendrit yoğunluğunun azaldığını göstermişlerdir (182). Yapılan bir başka çalışmada prenatal olarak 50 mg/kg/gün dozda BPA'ya maruz kalan erkek sıçanlarda hipokampus CA1 bölgesindeki nöronlarda sinaptik açıklıkta artış meydana geldiği gözlenmiştir (183). Dai ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada ise prenatal ve laktasyon döneminde 50 ve 200 mg/kg/gün dozda DEHP'e maruz kalan 6 haftalık erkek farelerde Morris su labirenti testinde hafızanın gerilediği görülmüştür (184). EBK'lere maruziyetin hipokampus ve hafıza üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalara bakıldığında hem prenatal dönemde hem de yetişkinlikte bu maddelere maruziyetin olumsuz etkileri olduğu görülmektedir. Çalışmamızda elde edilen bulgular daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarını destekler niteliktedir. Tek başına BPA veya DEHP'e maruziyet ile gözlenen istenmeyen etkilerin yanısıra, karışım halde maruziyetin hem CA1 hem de CA3 bölgesinde olumsuz etkiler gösterdiği ve gözlenen etkilerin tek başına maruziyetten daha ciddi olduğu görülmektedir.

5.3. Nöroendokrin Parametreler

5.3.1. Monoamin Düzeyleri

Endokrin bozucu kimyasal maddelere maruziyetin dopaminerjik ve serotonerjik sistem üzerindeki sonuçları yeni yeni aydınlatılmaya başlanmaktadır. Çalışmalar nörotoksikanlar ve bu sistemler ile ilişkili hastalıklar arasında kuvvetli ilişkileri gösterdikçe bu maddelere maruziyetin uzun dönemli sonuçları giderek önemli hale gelmiştir. Dopaminerjik sistemin beyin bölgelerindeki kapsamlı lokalizasyonu ve sahip olduğu geniş fonksiyon yelpazesi nedeniyle, dopaminerjik nörotransmisyonunda meydana gelen işlev bozuklukları, şizofreni, duygudurum bozuklukları, obsesif kompulsif bozukluk, otizm spektrum bozukluğu, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB), Tourette sendromu, Parkinson hastalığı, madde bağımlılığı ve diğer pek çok hastalığın patofizyolojisinde rol oynamaktadır (93). Serotonin ise, nöroenez ve olgunlaşma ile ilgili erken gelişimsel olaylardan, hücre ölümünün altında yatan apoptoza ve nörodejenerasyona kadar uzanan, insan yaşamının merkezinde yer

alan birçok biyolojik süreçte yer alır. Serotonerjik sistemin erken dönemde embriyogenez sırasında oluştuğu ve ilk oluşan serotonerjik nöronlar tarafından sürdürülen serotonin nörotransmisyonunun beyin gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (112).

Çalışmamızda tüm çalışma gruplarında (BPA, DEHP ve BPA+DEHP) kontrol grubuna oranla DA ve serotonin düzeylerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde azalma olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu veriler, prenatal ve laktasyon dönemlerinde EBK maruziyeti ile dopaminerjik ve serotonerjik fonksiyonun değişebileceğine ve ileri yaşlarda ortaya çıkabilecek gelişimsel ve davranışsal bozukluklarda rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Endokrin bozucu kimyasal maddelerin monoaminerjik sistemler üzerine etkilerini araştıran diğer çalışmalar incelendiğinde, verilerin BPA veya farklı ftalat türlerine ayrı ayrı maruziyetin sonuçlarının irdelendiği çalışmalar ile sınırlı olduğu; kombine maruziyete ilişkin tek bir çalışmanın bulunduğu görülmektedir (179). Mevcut çalışmalar, sonuçların değişken olabildiği ve birden fazla mekanizmanın monoamin seviyeleri üzerine etki edebileceğini göstermektedir. Ayrıca, beynin farklı bölgelerinde gözlenen sonuçların farklı olabileceği de belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda prenatal ve laktasyon döneminde BPA maruziyeti ile striatumda DA ve dorsal rafe çekirdeklerinde 5-HT konsantrasyonlarının, ön beyinde ise DOPAC, HVA ve 5-HIAA düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. Bu durum, BPA maruziyetinin DA'nın sinir uçlarından salınımını ve metabolitlerine dönüşüm hızını arttırdığını düşündürmektedir (156-159). Estrojenin monoamin konsantrasyonlarını regüle etmesi dikkate alındığında EBK'lere maruz kalmanın beyinde DA ve 5-HT konsantrasyonlarını bozabileceği düşünülebilir. Birçok serotonerjik nöronun dorsal rafe çekirdeklerinde ER α ve ER β ekspresyonu gösterdiği gözlenmiştir (186). Sunulan tez çalışmasında ise yapılan önceki çalışmalardan farklı olarak DA ve 5-HT seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Honma ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada çalışmamızla benzer doz düzeyi, maruziyet zamanı ve maruziyet yolu kullanılmasına karşın ölçümler farklı cinsiyetlerde yapılmıştır (156). Bu çalışmadaki sonuçların çalışmamızla farklı olması BPA'ya maruziyet sonucu monoamin konsantrasyonlarında meydana gelen etkilerin cinsiyete bağlı olarak değişebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada, ölçümlerin maruziyetten sonra 9. haftada yapılmış

olması da sonuçların farklılığını açıklayan bir etmen olabilir. Ayrıca, maruziyet yolunun ve dozun da zıt sonuçlar doğurabileceği görülmektedir (157).

Hayvanların üremesi ve hayatta kalması için sosyal davranış önemlidir. Erken dönemde memelilerde sosyal ve bilişsel becerilerin gelişmesi, hayvanlara çevresel değişikliklere esnek bir şekilde cevap verme yeteneği kazandırır (187). Literatürde EBK'lerin sosyal davranışlarda bozulmalara yol açtığını gösteren hayvan çalışmaları bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada erken ergenlik döneminde DEHP maruziyetinin hayvanın sosyal açıdan gelişimini bozabileceğine dair veriler elde edilmiştir (188). Benzer bir çalışmada, prenatal BPA maruziyetinin dişi sıçanlarda sosyal etkileşim ve erkek sıçanlarla geçirdikleri sürede azalmaya neden olduğunu göstermiştir (170). Serebrum ve beyin sapı gibi beyin bölgelerindeki dopaminerjik ve serotonerjik sistemlerin hayvanlarda davranışsal değişimleri kontrol ettikleri bilinmektedir. Serebrum bölgesindeki DA transmisyonundaki artış sosyal davranışlara eşlik ederken DA transmisyonunda azalma sosyal davranışları engellemektedir (189,190). Çalışmamızda, prenatal ve laktasyon döneminde maternal olarak BPA ve DEHP'e maruz kalmanın erkek sıçanların serebrum bölgesinde DA ve 5-HT transmisyonunu azalttığı gösterilmiştir. Kombine maruziyetin DA düzeylerinde daha da belirgin bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bu etkiler, EBK'lere maruziyet ile birlikte gelişen sosyal davranışlardaki bozulmaların nedenlerinden biri olarak düşünülebilir.

Endokrin bozucu kimyasal maddelerin insanlarda da davranış bozukluğuna yol açabileceği düşünülmektedir. EBK'lerin insanlarda bilişsel eksiklikler, yavaş nörogelişim, agresyon ve depresyon insidansında artış gibi nörogelişimsel etkilerinin olabileceği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (8, 191-193). Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB) görülme sıklığı gittikçe artan nöropsikiyatrik bir hastalıktır. Son yıllarda EBK'lere prenatal ve neonatal olarak maruz kalmanın DEHB gelişimi üzerine etkisini inceleyen çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda idrardaki BPA ve ftalat düzeyleri ile çocuklarda DEHB semptomlarının gelişimi arasında pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir (194-196). Ayrıca, Park ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada DEHB bulunan çocuklarda idrardaki ftalat metabolitlerinin düzeyi ile dopaminerjik gen ekspresyonunda meydana gelen bozulmaların ilişkili olduğunu göstermişlerdir (197). Bu durum EBK'lerin dopaminerjik nörotransmisyonunda meydana getirdikleri bozulmalar yoluyla DEHB patofizyolojisinde rol oynayabileceklerini göstermektedir.

Endokrin bozucu kimyasal maddeler monoaminerjik sistemler üzerinden sadece davranış ile ilgili bozukluklara değil, motor fonksiyon ve hareket bozukluklarına da sebep olabilir. Örneğin Parkinson hastalığı dopaminerjik nöronların kaybı ve DA aktivitesinde azalma ile karakterize nörodejeneratif hareket hastalığıdır. BPA maruziyeti ve Parkinson hastalığı arasında ilişki gösteren çalışmalar vardır. Yapılan çalışmalarda Parkinson hastalığı bulunan kişilerin idrar örneklerinde BPA seviyesinin hasta olmayan insanlara göre daha fazla olduğu ve maternal BPA maruziyetinin Parkinson hastalığı riskini arttırdığı gösterilmiştir (198, 199). Tez çalışmamızda da özellikle DA düzeylerinde azalma yönünde elde ettiğimiz bulgular, EBK maruziyetinin bu hastalıkların gelişimine olası katkılarını destekler niteliktedir.

5.3.2. Dopamin Taşıyıcı Protein Düzeyleri

Çalışmamızda DEHP grubunda DAT düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla %47,4 oranında azaldığı ($p<0,05$) görülmüştür. BPA ve BPA+DEHP gruplarında kontrole göre %16 azalma gözlenmekle birlikte, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,05$) saptanmıştır.

Yapılan bir çalışmada neonatal dönemde intasisternal olarak tek doz 20 $\mu\text{g/kg}$ BPA'ya maruz kalan sıçanlarda DAT genlerinin ekspresyonunda 2 kattan daha fazla azalma olduğu bulunmuştur ($p<0,05$) (160). Başka bir çalışmada 5 günlük sıçanlara tek doz disiklohekzil ftalat (DCHP) (87 nmol/10 μl) intrasisternal uygulanmıştır. Bu sıçanlar 4-5 haftalık olduklarında yapılan ölçümlerde orta beyin bölgesinde DAT seviyelerinin düştüğü gözlenmiştir (169). Ayrıca EBK'lere maruziyet ile dopaminerjik nöronlarda apoptoz meydana geldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (161,162,173).

DAT sinaptik DA'ı nöronlara alarak DA'nın nörotransmisyonunu sonlandırmada ve MSS'nde DA homeostazını sürdürmede kritik rol oynar (99). MSS'nde normal nörolojik fonksiyonu korur. Dopaminerjik nörotransmisyonda yaşlanmaya bağlı gelişen değişikliklerin, azalan DAT ekspresyonunun bir sonucu olabileceği düşünülmektedir (102). Ayrıca DAT sadece hücre dışı DA sinyalinin büyüklüğünü ve süresini kontrol etmekle kalmaz, aynı zamanda hücre içi DA seviyelerini de korur. DAT ekspresyonunun baskılandığı farelerde DA sentezinde bir artışa rağmen depolanmış DA seviyelerinde %95 azalma olduğu görülmüştür (103). Ayrıca DAT sadece dopaminerjik nöronlarda eksprese edildiği için dopaminerjik nöron yoğunluğunu gösteren özgül bir belirteçtir (95). Çalışmamızda özellikle DEHP

grubunda olmak üzere tüm maruziyet gruplarında gözlenen DAT düzeylerindeki azalmanın DAT ekspresyonundaki bir azalmadan ve/veya dopaminerjik nöronlarda meydana gelen apoptozdan kaynaklanabileceği düşünülebilir. DAT düzeylerindeki azalma ile birlikte DA düzeylerinde de azalma gözlenmesi DAT'ın hücre içi DA düzeylerini kontrol eden/ koruyan bir mekanizma olduğunu destekler bir bulgudur.

5.3.3. Monoamin Oksidaz Aktivitesi

Monoamin oksidaz enzimleri beyinde kateşolaminler gibi biyogenik aminlerin parçalanmasında rol oynayan birincil enzimdir. Tez çalışması kapsamında beyin dokusunun serebrum bölgesinde MAO-A ve MAO-B aktivitelerinin ayrı ayrı ölçülmesiyle birlikte serebrum bölgesindeki dopaminerjik nörotransmisyonun metabolizma yönünden değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Yapılan ölçümlerde MAO-A aktivitesinde BPA grubunda kontrol grubuna oranla bir değişim gözlenmemiş, DEHP ve kombine maruziyet gruplarında ise kontrol grubuna oranla artmıştır. Ancak, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. MAO-B aktivitesi düzeyleri ölçüldüğünde ise aktivite BPA ve DEHP gruplarında kontrol grubuna kıyasla değişmezken, kombine maruziyet grubunda aktivitenin 6,7 kat arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$).

Literatürde EBK'lere maruziyetin MAO enzimleri üzerine etkisinin doğrudan ölçüldüğü tek bir çalışma vardır. Bu çalışmada gebeliğin 10. gününden laktasyon dönemi sonuna kadar subkütan olarak BPA (250 ng/kg/gün) uygulanan gebe farelerden doğan erkek yavrularda beyin üç farklı bölümünde (hipokampus, amigdala ve omurilik soğanı) MAO düzeyleri ölçülmüştür. Omurilik soğanında MAO-B aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı bulunmuştur ($p<0,05$). Beynin diğer bölgelerinde ise herhangi bir değişim gözlenmemiştir (159). Bununla birlikte DOPAC/DA oranı DA metabolizmasının hızını ve MAO aktivitesindeki değişiklikleri yansıtmaktadır. Yapılan çalışmalarda prenatal BPA maruziyetinin bu oranı arttırdığı gözlenmiştir. Bu durum BPA'nın DA'nın metabolitlerine dönüşüm hızını arttırdığını düşündürmektedir (156, 157). Ftalat maruziyetinin ve EBK'lere kombine maruziyetin MAO enzim aktiviteleri üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tez çalışmasında özellikle DEHP+BPA grubunda MAO-B aktivitesinde gözlenen önemli

düzeydeki artış, EBK'lere bir arada maruziyet ile DA metabolizma hızının arttığını gösteren bir bulgudur ve DA düzeylerinde azalma ile de uyumludur.

Endokrin bozucu kimyasal maddelere maruziyet ve anksiyete gelişimi arasındaki ilişkinin gösterildiği çalışmalar mevcuttur (200-202). Deney hayvanlarında yapılan araştırmalar dopaminerjik sistemde meydana gelen değişimlerin anksiyojenik etkilerin mekanizmalarından biri olduğunu ve DOPAC/DA oranı ile MAO-A/B seviyelerinin anksiyete davranışı ile ilgili olduğunu göstermektedir (203-205). Çalışmamızda kombine maruziyet ile MAO-B aktivitesinde meydana gelen artışın EBK'lerin anksiyojenik etki mekanizmalarından biri olabileceği düşünülebilir.

5.3.4. Asetilkolinesteraz Aktivitesi

Çalışmamızda BPA ve kombine maruziyet gruplarındaki sıçanların serebrum bölgesinde ölçülen AChE aktivitesinin kontrole kıyasla arttığı (BPA %117; BPA+DEHP %106) ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). DEHP grubunda kontrol grubuna oranla saptanan %19 düzeyindeki artış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Bisfenol A ile yapılan benzer çalışmalar incelendiğinde farklı doz ve maruziyet dönemlerinin sonuçları değiştirebileceği görülmektedir. Yapılan bir çalışmada ergenlik dönemi boyunca 50 mg/kg/gün dozda BPA'ya maruz kalan sıçanların hipokampus bölgesindeki AChE aktivitesinin azaldığı, ancak frontal korteks, hipotalamus ve beyincik bölgelerinde aktivitenin değişmediği bulunmuştur (165). Buna karşın başka bir çalışmada 6 hafta boyunca 25 mg/kg/gün dozda BPA uygulanan 5 aylık sıçanların hipokampus bölgesinde AChE aktivitesinin kontrol grubuna oranla önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Çalışmada kronik BPA maruziyetinin AChE aktivitesi artışına bağlı olarak hipokampusta ACh seviyelerinde azalmaya neden olacağı ve bunun da hafızada gerilemelere yol açabileceği savunulmuştur (167). Yapılan bu iki çalışma maruziyet zamanı ve doz açısından farklılıklar göstermektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde ergenlik dönemindeki maruziyet ile yetişkinlik dönemindeki maruziyetin etkilerinin birbirine zıt olabileceği gözlenmektedir. Sunulan tez çalışması prenatal ve laktasyon dönemini kapsamı bakımından önceki çalışmalardan farklılık göstermektedir. Bulgularda gerek tek başına BPA gerekse BPA+DEHP grubuna ait serebrum AChE aktivitesinde anlamlı düzeyde artış saptanmıştır.

AChE sinir yanıtı için en önemli ve etkili enzimlerden biridir. Kolinerjik nörotransmisyonun insan ve hayvan davranışları üzerinde bir dizi farklı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Anksiyetede azalmanın hipokampustaki AChE aktivitesi ile doğrudan ilişkili olduğu ve hipokampustaki AChE aktivitesinin azalması ile anksiyetenin arttığı düşünülmektedir (124, 206). Bununla birlikte asetilkolin bilinç, hafıza ve öğrenme gibi yüksek beyin fonksiyonlarının yerine getirilmesi açısından önemli bir yere sahiptir (125). Sürekli dikkat isteyen performanslar sırasında kortikal ACh salınımı artmaktadır. Bu nedenle serebral ACh nörotransmisyonunun azalması dikkat eksikliği gelişimi mekanizmalarından biri olarak değerlendirilebilir. Ayrıca artan AChE aktivitesinin kaspaz 3 ve 9 aktivasyonu başta olmak üzere farklı mekanizmalar yoluyla nöronlarda apoptozu indükleyebileceği gösterilmiştir (134). Tarafımızca yapılan tez çalışmasında da EBK maruziyeti sonucu AChE aktivitesinde saptanan artış ile birlikte kontrol grubuna oranla önemli düzeyde gözlenen apoptoz gelişimi bu bulguyu destekler niteliktedir.

5.4. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir rol oynayabileceği hipotezini destekleyen birçok kanıt bulunmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar çevresel EBK'lere maruziyet ile nörodejeneratif hastalıkların insidansı arasında korelasyon olduğunu bildirmektedir. Son zamanlardaki çalışmalar otizm spektrum bozukluğu gibi nörogelişimsel hastalıklar ve tehlikeli çevre kirliliği arasındaki ilişkinin arttığını göstermektedir (183). Santral sinir sisteminin gelişimi sinaps oluşumu ve nöronal büyüme gibi hormona duyarlı periyotlar içerir. Endokrin bozucu kimyasal maddeler bu periyotları engelleyerek nöron hasarına ve bunun sonucunda nörogelişimsel hastalıklara sebep olabilirler (61). Bu maddelere maruziyet ile insanlarda otizm spektrum bozukluğunu ilişkilendiren çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada atipik otizmlili hastaların idrar BPA konsantrasyonlarının hem kontrol grubundan hem de klasik otizmlili hastalardan daha yüksek olduğu ve bu hastalarda oksidan/antioksidan dengenin bozulduğu gözlenmiştir. Bu durum BPA maruziyetinin atipik otizmin gelişimsel nedenlerinden biri olabileceğini düşündürmektedir (207). Ayrıca, oksidatif stres EBK'lerin nöroendokrin parametreler üzerindeki istenmeyen etkilerinin de bir mekanizması olarak değerlendirilebilir.

Merkezi sinir sistemi oksidatif strese karşı özellikle savunmasızdır. Nöronal membranlar, yüksek oranda serbest radikallere duyarlı doymamış yağ asitleri içerir ve bu durum onları oksidatif hasara daha duyarlı hale getirir (208). Çalışmamızda EBK'lere prenatal ve laktasyon döneminde maruziyetin yaygın olarak kullanılan oksidatif stres biyogöstergelerinden LP ve GSH düzeyleri üzerine etkisi incelenmiştir.

Membran lipitlerinin oksidatif hasarı sonucunda LP meydana gelir ve bunun sonucunda MDA başta olmak üzere toksik etkilere sahip ürünler oluşur. MDA, hücre membranlarında yer alan lipitlerin peroksidasyonuna yol açarak membranların iyon geçirgenliğini bozar, enzim aktivitelerini değiştirebilir ve DNA gibi önemli makromolekülleri etkileyerek ciddi hasarlara neden olabilir. MDA uzun yıllardır LP'nin belirlenmesinde önemli bir biyogösterge olarak kullanılmaktadır. GSH ise organizmada bulunan en önemli antioksidan moleküllerden biridir. Oksidatif stresin arttığı durumlarda vücuttaki GSH düzeylerinde değişimler meydana gelebilir ve bu durum oksidan/antioksidan dengenin bozulmasına yol açabilir. Redükte glutatyon/okside glutatyon (GSH/GSSG) oranı, biyolojik sistemlerde oksidatif stres durumunun değerlendirilmesinde kullanılan göstergelerden biridir (147,148).

Literatürde BPA ve DEHP maruziyeti ile sıçan beyin dokusunda LP ve GSH düzeylerinin değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada 10 hafta boyunca 10 mg/kg/gün ve 6 hafta boyunca 25 mg/kg/gün dozda BPA'ya maruz kalan 5 aylık sıçanların korteks ve hipokampus bölgesinde LP ve GSH düzeylerinin arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$) (167). BPA ile yapılan diğer bir çalışmada 6 hafta boyunca, haftada 3 kez oral olarak 50 mg/kg/gün dozda BPA'ya maruz kalan erkek sıçanların serebrum bölgesinde LP düzeylerinde belirgin artış görüldüğü rapor edilmiştir ($p<0,05$) (168). Ftalatlar ile yapılan bir çalışmada ise 28 gün boyunca yüksek dozda DBP'a maruz kalan ferlerde MDA düzeylerinde kontrole oranla artış olduğu bulunmuştur ($p<0,01$) (172). Kombine maruziyetin etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda MDA düzeylerinde tüm çalışma gruplarında kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış (BPA grubu: %122; DEHP grubu: %52,2; BPA+DEHP grubu: %99,3) olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Total GSH düzeylerinin ise yine tüm gruplarda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı (BPA: %146,1; DEHP: %92,2; BPA+DEHP: %144) bulunmuştur ($p<0,05$). Serebral LP

düzeylerinde artış, EBK'lere maruziyete bağlı gelişen oksidatif stres varlığına işaret etmektedir. GSH seviyelerindeki artış ise EBK'lere maruziyet ile indüklenen oksidatif strese karşı organizmanın bir savunma mekanizması olarak değerlendirilebilir.

5.5. Apoptotik Analizler

Tez çalışması kapsamında yer alan TUNEL analizinde deney gruplarında hipokampusun CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde nöron ve glia hücrelerinde apoptotik hücrelerin ortalama yüzdesi değerlendirilmiştir. BPA uygulanan grupta CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde apoptotik nöron ve glia yüzdelерinin kontrole göre arttığı ve bu artışın CA1 ve CA2 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). DEHP uygulanan grupta CA1 ve CA2 bölgelerinde apoptotik nöron yüzdelерinin kontrole istatistiksel olarak anlamlı arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). BPA+DEHP uygulanan grupta ise diğer gruplardan farklı olarak değerlendirme yapılan her üç bölgede de apoptotik nöron yüzdesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı ($p<0.05$) saptanmıştır. Apoptotik glia yüzdesindeki artışlar da her 3 bölgede kontrol grubuna göre yüksektir, ancak sadece CA1 bölgesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar değerlendirildiğinde EBK'lere maruziyetin sinir hücrelerinde apoptoza neden olabileceği görülmektedir. Li ve ark. (2013)'nın yaptığı çalışmada, prenatal ve laktasyon döneminde 500 mg/kg/gün dozda dibütil ftalata (DBP) maruz kalan sıçanların hipokampal nöronlardaki apoptotik hücre sayısında ve kaspaz-3 düzeyinde artış gözlenmiştir (171). Lin ve ark. (2011) yaptıkları bir *in vitro* çalışmada ise DEHP'in nöro-2a hücre hattında peroksizom proliferatör aktive reseptör γ (PPAR γ) ve Trim 17 proteinin ekspresyonunda artışa neden olduğu belirlenmiştir. PPAR γ ekspresyonundaki artışın da intrinsik yolak ve kaspaz-3 aktivasyonu yoluyla nöronlarda apoptozu indüklediği belirlenmiştir (209). Sunulan tez çalışmasındaki sonuçlar daha önceki çalışmaların sonuçları ile uyumludur. BPA ve DEHP'e aynı anda maruziyetin değerlendirildiği ilk çalışma niteliğindedir. Bulgular, BPA ve DEHP'e karışım halinde maruz kalmanın tekli maruziyetten daha ciddi etkilere neden olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında Sprague Dawley türü gebe sıçanlarda prenatal ve erken postnatal dönemde BPA ve/veya DEHP maruziyetinin MSS ve nöroendokrin sistem üzerindeki ters etkileri ve bu etkilerin oksidatif stres ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir:

1. Prenatal ve erken postnatal dönemde BPA ve/veya DEHP maruziyetinin yetişkinlik döneminde beyin ağırlıkları yönünden kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı; ancak DEHP grubundaki rölatif beyin ağırlığının kontrol grubuna oranla %18 arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). BPA+DEHP grubunda da kontrol grubuna oranla ~%15 bir artış gözlenmekle birlikte, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).
2. Histopatolojik incelemeler yapıldığında gerek BPA gerekse DEHP uygulanan gruplara ait hipokampus CA1 bölgesinde piramidal nöronların arasında çevresi boşalmış birkaç dejenere nöron ve yassı çekirdekleri ile mikroglialar gözlenmiştir. Ayrıca, DEHP grubunda CA1 bölgesinde belirgin perivasküler ödem izlenmiştir. Hipokampus CA3 bölgesinde piramidal nöronların yer yer sitoplazmalarının büzüşmüş olduğu ve buna bağlı olarak çevrelerinde boş alanlar olduğu görülmüştür. Piramidal hücrelerin bazal dendritleri de normal görüntüsünden farklı olarak daha düz ve aralıklı olarak izlenmiştir. Karışım halinde BPA ve DEHP uygulanan gruba ait hipokampus dokusunun CA1 bölgesinde de normal histolojik yapıya sahip piramidal nöronlar arasında kondanse çekirdek ve koyu boyalı sitoplazmaya sahip büzüşmüş nöronlar ve kondanse çekirdekli glia hücreleri izlenmiştir. Ayrıca, diğer gruplardan farklı olarak yer yer nöron içermeyen alanlar saptanmıştır. CA2 bölgesinde ökromatik çekirdek ince sitoplazmaya sahip nöronlar arasında kondanse çekirdek ve koyu boyalı sitoplazmaya sahip büzüşmüş nöronlar gözlenmiş; CA3 bölgesinde ökromatik çekirdek, belirgin çekirdekçik ve bazofilik sitoplazmaları ile piramidal nöronlar yanında birkaç kondanse çekirdek ile belirgin dejenere nöron izlenmiştir. Tüm bulgular gerek tek tek gerekse kombine halde

maruziyet ile hipokampal bölgede histopatolojik değişiklikleri ve dejenerasyon varlığını göstermektedir.

3. Tüm çalışma gruplarında beynin serebrum bölgesindeki DA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma (BPA grubu: %40,5; DEHP grubu: %34,6; BPA+DEHP grubu: %47) gözlenmiştir ($p<0,05$). BPA+DEHP grubunda azalma oranının daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bununla paralel olarak yine serebrum bölgesinde tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna oranla serotonin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma (BPA grubu: %19; DEHP grubu: %19; BPA+DEHP grubu: %23,8) gözlenmiştir ($p<0,05$).
4. Serebrum bölgesindeki DAT düzeylerinin DEHP grubunda kontrol grubuna kıyasla %47,4 oranında azaldığı ($p<0,05$) görülmüştür. BPA ve BPA+DEHP gruplarında kontrole göre %16 azalma gözlenmekle birlikte, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,05$) saptanmıştır.
5. Serebrum bölgesindeki MAO-A aktivitesinde BPA grubunda kontrol grubuna oranla bir değişim gözlenmemiş, DEHP ve BPA+DEHP gruplarında ise kontrol grubuna oranla artmıştır (sırasıyla %52,6, %26,3). Ancak, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. MAO-B aktivitesi düzeyleri ise BPA ve DEHP gruplarında kontrol grubuna kıyasla değişmezken, BPA+DEHP grubunda aktivitenin 6,7 kat (%565) arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$).
6. Bisfenol A ve BPA+DEHP gruplarında serebrum bölgesindeki AChE aktivitesinin kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde arttığı (BPA %117; BPA+DEHP %106) bulunmuştur ($p<0,05$). DEHP grubunda kontrol grubuna oranla saptanan %19 düzeyindeki artış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).
7. Çalışma gruplarına ait oksidatif stres parametreleri değerlendirildiğinde, serebrum bölgesindeki MDA düzeylerinin tüm çalışma gruplarında kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı (BPA grubu: %122; DEHP grubu: %52,2; BPA+DEHP grubu: %99,3) olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Total GSH düzeylerinin ise yine tüm gruplarda

kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı (BPA: %146,1; DEHP: %92,2; BPA+DEHP: %144) bulunmuştur ($p<0,05$).

8. Tez çalışması kapsamında yer alan TUNEL analizinde deney gruplarında hipokampusun CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde nöron ve glia hücrelerinde apoptotik hücrelerin ortalama yüzdesi değerlendirilmiştir. Gerek BPA gerekse DEHP uygulanan grupta CA1 ve CA2 bölgelerinde apoptotik nöron yüzdelерinde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı artışlar olduğu görülmüştür ($p<0,05$). BPA+DEHP uygulanan grupta ise her üç bölgede de apoptotik nöron yüzdesinin istatistiksel anlamlı olarak arttığı ($p<0,05$) ve apoptotik glia hücrelerinin yüzdesinde ise tüm bölgelerde artış görülmekle birlikte sadece CA1 bölgesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

Tüm bu sonuçlar prenatal ve erken postnatal dönemde EBK'lere maruziyetin, MSS ve nöroendokrin sistemde ters etkileri olabileceğini ve bu etkilerin yaşamın ileriki dönemlerinde bile devam edebileceğini göstermektedir. Çalışma kapsamında EBK'lerin nöroendokrin sistem üzerindeki ters etkileri serebrum bölgesinde monoamin nörotransmitter (DA ve 5-HT) düzeylerinin azalması, DAT düzeylerinin azalması, MAO-B ve AChE aktivitesinin artması ve oksidan/antioksidan dengenin bozulması olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler EBK'lere maruziyetin beyindeki nörotransmitter sistemler üzerinde dengesizliğe yol açtığını göstermektedir. Ayrıca BPA ve/veya DEHP'e maruziyetin hipokampus bölgesinde apoptoza ve histopatolojik değişimlere neden olduğu belirlenmiştir. Sunulan tez çalışması en sık maruz kalınan EBK'ler olan BPA ve DEHP'e prenatal ve laktasyon döneminde kombine maruziyetin nöroendokrin sistem üzerinde etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Ayrıca, yine kombine EBK maruziyetinde beyinde en önemli oksidatif stres göstergeleri olan LP ve GSH düzeylerindeki değişikliklerin belirlendiği ilk çalışma özelliğine sahiptir. EBK'lere maruziyetin insanlarda nörogelişimsel hastalıklar ile ilişkilendirildiği çok sayıda çalışma vardır (5-8). Nörokimyasal dengesizlikler ve oksidatif stresin bu hastalıkların bir kısmının nedeni olabileceği düşünülmektedir. EBK'lerin toksik etkileri üzerinde çalışılırken birden fazla mekanizmanın varlığı ve nöroendokrin eksenin her seviyesindeki çapraz ilişkiler göz önüne alınmalıdır. Ftalatlar ve BPA'nın nöroendokrin etkilerini değerlendirmek için,

özellikle genetik ekspresyonundaki değişimlerin incelenmesi veya nörotransmitter yollarının her bir seviyesindeki değişimlerin ayrı ayrı incelenmesi gibi etki mekanizmalarını detaylı olarak aydınlatacak kapsamlı ve ileri çalışmalara gereksinim vardır. Ayrıca, EBK maruziyetinin insanlar üzerindeki toksik etkilerinin daha iyi anlaşılması için bu sonuçların yapılacak kapsamlı epidemiyolojik çalışma sonuçları ile birleştirilmesi ve desteklenmesi gereklidir.



7.KAYNAKLAR

1. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2009;30(4):293-342.
2. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. EDC-2: The endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev.* 2015;36(6):1-150.
3. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2015;40(1):241-58.
4. Weiss B. The Intersection of Neurotoxicology and Endocrine Disruption. *Neurotoxicology* 2012;33(6):1410-9.
5. Ipapo KN, Factor-Litvak P, Whyatt RM, Calafat AM, Diaz D, Perera F, et al. Maternal prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and visual recognition memory among infants at 27 weeks. *Environmental Research.* 2017; 155:7-14.
6. Perera F, Roen Nolte EL, Wang Y, Margolis AE, Calafat AM, Wang S, et al. *Environmental Research* 2016; 151:195-202.
7. Arbuckle TE, Davis K, Boylan K, Fisher M, Fu J. Bisphenol A, phthalates and lead and learning and behavioral problems in Canadian children 6–11 years of age: CHMS 2007–2009. 2016; 54:89-98.
8. Harley KG, Gunier RB, Kogut K, Johnson C, Bradman A, Calafat AM, et al. Prenatal and Early Childhood Bisphenol A Concentrations and Behavior in School-Aged Children. 2013;126:43-50.
9. Colborn T. Neurodevelopment and Endocrine Disruption. *Environmental Health Perspectives* 2004; 112(9):944-949.
10. Levine JE. An introduction to neuroendocrine systems. In: Fink G, Pfaff DW, Levine JE, eds. *Handbook of Neuroendocrinology*. 1st ed. Oxford: Elsevier Inc.;2012. p.3-18.
11. Adewale HB, Todd KL, Mickens JA, Patisaul HB. The impact of neonatal bisphenol-A exposure on sexually dimorphic hypothalamic nuclei in the female rat. *NeuroToxicology*;32(1):38-49.
12. Andrade AJM, Grande SW, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. A dose–response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): Non-monotonic dose–response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* 2006;227(3):185-92.
13. McCaffrey KA, Jones B, Mabrey N, Weiss B, Swan SH, Patisaul HB. Sex specific impact of perinatal bisphenol A (BPA) exposure over a range of orally administered doses on rat hypothalamic sexual differentiation. *Neurotoxicology* 2013;36(1):55-62.
14. Gore AC. Neuroendocrine targets of endocrine disruptors. *Hormones (Athens)* 2010;9(1):16-27.

15. Parent AS, Naveau E, Gerard A, Bourguignon JP, Westbrook GL. Early developmental actions of endocrine disruptors on the hypothalamus, hippocampus and cerebral cortex. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2011;14(5-7):328-45.
16. Wayne A., Trudeau VL. Neuroendocrine disruption: more than hormones are upset. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2011;14(5-7):270-91.
17. Negri-Cesi P, Colciago A, Pravettoni A, Casati L, Conti L, Celotti F. Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: Hormonal and environmental influences. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2008;109(3-5):294-9.
18. Olea ML, Martyniuk CJ, Orlando EF, Ottinger MA, Rosenfeld C, Wolstenholme J et al. Current Concepts in Neuroendocrine Disruption. *Gen Comp Endocrinol* 2014;203(1):158-73.
19. Hall JE. Guyton ve Hall, tıbbi fizyoloji. 13. basım. Ankara: Güneş Kitabevi;2016.
20. Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC, et al. Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2006;143(3):303-15.
21. Hauser R, Calafat AM. Phthalates and human health. *Occup Environ Med*. 2005;62(11):806-18.
22. Annamalai J, Namasivayam V. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. *Environment International*. 2015; 76:78-97.
23. Ward JM, Peters JM, Perella CM, Gonzalez FJ. Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor α -null mice. *Toxicol Pathol*. 1998;26(2):240-6.
24. De Coster S, Larebeke NV. Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. *J Environ Public Health*. 2012;7:136-96.
25. Bourguignon JP, Juul A, Franssen D, Fudvoye J, Pinson A, Parent AS. Contribution of the Endocrine Perspective in the Evaluation of Endocrine Disrupting Chemical Effects: The Case Study of Pubertal Timing. *Horm Res Paediatr*. 2016;86(4):221-32.
26. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*. 2012;33(3):378-455.
27. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel J. Endocrine Disrupting Chemicals and Disease Susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;127(3-5):204-215.
28. Melnick R, Lucier G, Wolfe M, Hall R, Stancel G, Prins G, et al. Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environ Health Perspect*. 2002;110(4):427.

29. Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, Vom Saal FS. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect.* 2003;111(8):994.
30. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environmental Health.* 2015; 14:13.
31. Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Phillips TM, Jefferson WN. Developmental Exposure to Endocrine Disruptors and the Obesity Epidemic. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY). 2007;23(3):290-6.
32. Nohynek GJ, Borgert CJ, Dietrich D, Rozman KK. Endocrine disruption: Fact or urban legend? *Toxicology Letters.* 2013;223(3):295-305.
33. Lambert JC, Lipscomb JC. Mode of action as a determining factor in additivity models for chemical mixture risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007;49(3):183-94.
34. Cassee FR, Groten JP, van Bladeren PJ, Feron VJ. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Crit Rev Toxicol.* 1998;28(1):73-101.
35. Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 2006;226(2-3):79-89.
36. Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;127(1-2):27-34.
37. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocrine Reviews* 2009;30(1):75-95.
38. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol.* 2002;15(10):1281-7.
39. Ye X, Wong L-Y, Bishop AM, Calafat AM. Variability of urinary concentrations of bisphenol A in spot samples, first morning voids, and 24-hour collections. *Environ Health Perspect.* 2011;119(7):983.
40. Nachman RM, Hartle JC, Lees PSJ, Gropman JD. Early Life Metabolism of Bisphenol A: A Systematic Review of the Literature. *Curr Environ Health Rep.* 2014;1(1):90-100.
41. Iso T, Watanabe T, Iwamoto T, Shimamoto A, Furuichi Y. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biolo Pharm Bull.* 2006;29(2):206-10.
42. Rochester JR. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol.* 2013;42:132-55.
43. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol.* 2007;24(2):139-77.
44. Meeker JD, Ferguson KK. Relationship between urinary phthalate and bisphenol A concentrations and serum thyroid measures in US adults and adolescents from

- the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2008. *Environ Health Perspect.* 2011;119(10):1396.
45. Tomza-Marciniak A, Stepkowska P, Kuba J, Pilarczyk B. Effect of bisphenol A on reproductive processes: A review of in vitro, in vivo and epidemiological studies. *J Appl Toxicol.* 2017.
 46. Benachour N, Aris A. Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;241(3):322-8.
 47. Latini G. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin Chim Acta.* 2005;361(1-2):20-9.
 48. Zarean M, Keikha M, Poursafa P, Khalighinejad P, Amin M, Kelishadi R. A systematic review on the adverse health effects of di-2-ethylhexyl phthalate. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016;23(24):24642-93.
 49. Hines CJ, Hopf NB, Deddens JA, Silva MJ, Calafat AM. Estimated daily intake of phthalates in occupationally exposed groups. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2011;21(2):133-41.
 50. Shaz BH, Grima K, Hillyer CD. 2-(Diethyl hexyl)phthalate in blood bags: is this a public health issue? *Transfusion.* 2011; 51:2510-17.
 51. Frederiksen H, Kuiri-Hanninen T, Main KM, Dunkel L, Sankilampi U. A Longitudinal Study of Urinary Phthalate Excretion in 58 Full-Term and 67 Preterm Infants from Birth through 14 Months. *Environmental Health Perspectives.* 2014;122(9): 998-1005.
 52. Giammona CJ, Sawhney P, Chandrasekaran Y, Richburg JH. Death receptor response in rodent testis after mono-(2-ethylhexyl) phthalate exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;185(2):119-27.
 53. Erkekoglu P, Giray BK, Kızılgün M, Rachidi W, Hininger-Favier I, Roussel A-M, et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate-induced renal oxidative stress in rats and protective effect of selenium. *Toxicol Mech Methods.* 2012;22(6):415-23.
 54. Ha M, Wei L, Guan X, Li L, Liu C. p53-dependent apoptosis contributes to di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced hepatotoxicity. *Environ Pollut.* 2016;208:416-25.
 55. Buluş AD, Aşci A, Erkekoglu P, Balci A, Andiran N, Koçer-Gümüşel B. The evaluation of possible role of endocrine disruptors in central and peripheral precocious puberty. *Toxicol Mech Methods.* 2016;26(7):493-500.
 56. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Radwan P, Jakubowski L, Wielgomas B, et al. Exposure to widespread environmental endocrine disrupting chemicals and human sperm sex ratio. *Environ Pollut.* 2016;213:732-40.
 57. Earl Gray L, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, et al. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *Int J Androl.* 2006;29(1):96-104.
 58. Erkekoglu P, Zeybek ND, Giray B, Asan E, Arnaud J, Hincal F. Reproductive toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate in selenium-supplemented and selenium-deficient rats. *Drug Chem Toxicol.* 2011;34(4):379-89.

59. Stelmach I, Majak P, Jerzynska J, Podlecka D, Stelmach W, Polańska K, et al., editors. The effect of prenatal exposure to phthalates on food allergy and early eczema in inner-city children. *Allergy Asthma Proc.* 2015;36(4):72-8.
60. North ML, Takaro TK, Diamond ML, Ellis AK. Effects of phthalates on the development and expression of allergic disease and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014;112(6):496-502.
61. Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol* 2014;13(3):330-8.
62. Ganong WF. Ganong tıbbi fizyoloji. 20. baskı. Türk Fizyolojik Bilimler D.: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.
63. Taner D. Fonksiyonel nöroanatomi. 4.basım. Ankara: Adım Ajans Matbaacılık;2004.
64. Meyer G. Human Neocortical Development: The Importance of Embryonic and Early Fetal Events. *The Neuroscientist.* 2001;7(4):303-14.
65. Heimer L, Van Hoesen GW. The limbic lobe and its output channels: Implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2006;30(2):126-47.
66. Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Progress in Neurobiology.* 2005;75(2):143-60.
67. Catani M, Dell'Acqua F, de Schotten MT. A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2013;37(8):1724-37.
68. Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR. *Fundamentals neuroscience.* California: Academic Press;1999.
69. Krpotov JD, Etlinger SC. Selection of actions in the basal ganglia/thalamocortical circuits: review and model. *International Journal of Psychophysiology.* 1999;31(3): 197-217.
70. Herrero MT, Barcia C, Navarro JM. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Child's Nerv Syst.* 2002;18(8):386-404.
71. Ashby FG, Turner BO, Horvitz JC. Cortical and basal ganglia contributions to habit learning and automaticity. *Trends Cogn Sci.* 2010;14(5):208-15.
72. Dorocic IP, Fürth D, Xuan Y, Johansson Y, Pozzi L, Silberberg G, et al. A Whole-Brain Atlas of Inputs to Serotonergic Neurons of the Dorsal and Median Raphe Nuclei. *Neuron.* 2014;83(3):663-78.
73. Hornung JP. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *The human raphe nuclei and the serotonergic system.* 2003;26(4):332-43.
74. Brown RE. *An introduction to neuroendocrinology.* Cambridge: Cambridge University Press;1994.
75. Webster RA, Jordan CC. *Neurotransmitters, Drugs and Disease.* Oxford: Blackwell Scientific Publications;1989.

76. Bryant AS, Greenwood AK, Juntti SA, Byrne AE, Fernald RD. Dopaminergic inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons in the cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *Journal of Experimental Biology*. 2016; 219;3861-65.
77. Jorgensen HS. Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Dan Med Bull*. 2007;54(4):266-88.
78. Russel JA, Shipston MJ. *Neuroendocrinology of stress*. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd;2015.
79. Sullivan RM, Dufresne MM. Mesocortical dopamine and HPA axis regulation: Role of laterality and early environment. *Brain Res*. 2006;1076(1):49-59.
80. Bauer M, Heinz A, Whybrow PC. Thyroid hormones, serotonin and mood: of synergy and significance in the adult brain. *Mol Psychiatry*. 2002;7(2):140-56.
81. Ohno M, Hamada N, Yamakawa J, Noh J, Morri H, Ito K. Myasthenia gravis associated with Graves' disease in Japan. *Jpn J Med*. 1987;26(1):2-6.
82. Sekiguchi Y, Hara Y, Takahashi M, Hiraata Y. Reverse 'see-saw' relationship between Graves' disease and myasthenia gravis; clinical and immunological studies. *J Med Dent Sci*. 2005;52(1):43-50.
83. Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Essentials of Neural Science and Behavior*. Stamford: Appleton&Lange;1995.
84. Ayano G. Common Neurotransmitters: Criteria for Neurotransmitters, Key Locations, Classifications and Functions. *Advances in Psychology and Neuroscience*. 2016;1(1):1-5.
85. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, McNamara JO, et al. *Neuroscience*. 3rd edition. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.;2004.
86. Lajtha A. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology*. 3rd edition. New York: Springer Science+Business Media, LLC.;2008.
87. Jones DC, Miller GW. The effects of Environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochemical pharmacology* 2008;76(5)569-81.
88. Arias-Carrion O, Pöppel E. Dopamine, learning, and reward seeking behavior. *Acta Neurobiol Exp*. 2007;67: 481-8.
89. Gunaydın LA, Diesseroth K. Dopaminergic Dynamics Contributing to Social Behavior. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2014; 79:221-7.
90. Puig MV, Rose J, Schmidt R, Freund N. Dopamine modulation of learning and memory in the prefrontal cortex: insights from studies in primates, rodents and birds. *Frontiers in Neural Circuits*. 2014;93(8): 1-15.
91. Belujon P, Grace AA. Regulation of dopamine system responsivity and its adaptive and pathological response to stress. *Proc Biol Sci*.2015;282(1805): 2014-516.
92. Hummel M, Unterwald EM. D1 Dopamine receptor: A putative neurochemical and behavioral link to cocaine action. *Journal of Cellular Physiology*. 2002;191;17-27.

93. Sadock BJ, Sadock VA. Kaplan&Saddock, klinik psikiyatri. 2.basım. Ankara Güneş Kitabevi;2005
94. Marti J, Santa-Cruz MC, Bayer SA, Ghetti B, Hervas JP. Generation and survival of midbrain dopaminergic neurons in weaver mice. *Int J Dev Neurosci.* 2007;25(5):299307.
95. Stahl SM. Stahl'ın temel psikofarmakolojisi. İstanbul:İstanbul Tıp Kiabevi;2015.
96. Ayano G. Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *Journal of Mental Disorders and Treatment.* 2016;2(2):1-4.
97. Wimalasena K. Vesicular Monoamine Transporters: Structure-Function, Pharmacology, and Medicinal Chemistry. *Med Res Rev.* 2011;31(4): 483-519.
98. Lohr KM, Bernstein AI, Stout KA, Dunn AR, Lazo CA, Alter SP, et al. Increased vesicular monoamine transporter enhances dopamine release and opposes Parkinson disease-related neurodegeneration in vivo. *PNAS.* 2014;111(27):9977-82.
99. Chen N, Reith MEA. Structure and function of the dopamine transporter. *European Journal of Pharmacology.* 2000;405(1-3):329-39.
100. Madras BK, Miller GM, Fischman AJ. The Dopamine Transporter and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry.* 2005;57(11):1397-409.
101. Cheng MH, Bahr I. Molecular Mechanism of Dopamine Transport by Human Dopamine Transporter. *Structure.*2015;23(11):2171-81.
102. McHugh PC, Buckley DA. The structure and function of the dopamine transporter and its role in CNS diseases. *Vitam Horm.* 2015; 98:339-69.
103. Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, Wightman RM, Caron MG. Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad.* 1998;95(7):4029-34.
104. Carpenter AC, Saborido TP, Stanwood GD. Development of Hyperactivity and Anxiety Responses in Dopamine Transporter-Deficient Mice. *Dev Neurosci.* 2012;34:250-257.
105. Masoud ST, Vecchio LM, Bergeron Y, Hossain MM, Nguyen LT, Bermejo MK, et al. Increased expression of the dopamine transporter leads to loss of dopamine neurons, oxidative stress and L-DOPA reversible motor deficits. *Neurobiol Dis.* 2015; 74:66-75.
106. Goldstein DS, Sullivan P, Cooney A, Jinsmaa Y, Sullivan R, Gross DJ, et al. Vesicular Uptake Blockade Generates the Toxic Dopamine Metabolite 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde in PC12 Cells: Relevance to the Pathogenesis of Parkinson Disease. *J Neurochem.* 2012;123(6):932-43.
107. Kumar MJ, Andersen JK. Perspectives on MAO-B in Aging and Neurological Disease. *Molecular Neurobiology.* 2012;30(1):77-89.

108. Gaweska H, Fitzpatrick PF. Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. *Biomol Concepts*. 2011;2(5):365-77.
109. Shih JC, Chen K, Ridd MJ. MONOAMINE OXIDASE: From Genes to Behavior. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:197-217.
110. Sayın A. Dopamin Reseptörleri ve Sinyal İletim Özellikleri. *Klinik Psikiyatri*. 2008; 11:125-34.
111. Alcaro A, Huber R, Panksepp J. Behavioral Functions of the Mesolimbic Dopaminergic System: an Affective Neuroethological Perspective. *Brain Res Rev*. 2007;56(2):283-321.
112. Müller CP, Jacobs BL. *Handbook of behavioral neuroscience*. London: Academic Press; 2010.
113. Young SN, Leyton M. The role of serotonin in human mood and social interaction Insight from altered tryptophan levels. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2002; 71:857-65.
114. Perrier JF, Cotel F. Serotonergic modulation of spinal motor control. *Current Opinion in Neurobiology*. 2015; 33:1-7.
115. Gillette R. Evolution and Function in Serotonergic Systems. *Integrative and Comparative*. 2006;46(6):838-46.
116. Kawashima T. The role of the serotonergic system in motor control. *Neuroscience Research*. 2018; 129:32-9.
117. Strac DS, Pivac N, Mück-Seler D. The Serotonergic System and Cognitive Function. *Translational Neuroscience*. 2016; 7:35-49.
118. Meltzer CC. Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease; the emergin role of functional imaging. *Neuropsychopharmacology*. 1998;21(2):321-2.
119. Gordon JA, Hen R. The Serotonergic System and Anxiety. *NeuroMolecular Medicine*. 2004; 5:27-40.
120. Michelsen KA, Prickaerts J, Steinbusch HWM. The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research*. 2008; 172:233-64.
121. Politis M, Niccolini F. Serotonin in Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2015;15(127):136-45.
122. Bleich A, Brown SL, Kahn R, van Praag HM. The role of serotonin in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1988;14(2):297-315.
123. Müller CP, Homberg JR. The role of serotonin in drug use and addiction. *Behav Brain Res*. 2015;15(277):146-92.
124. Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Manhaes AC. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behavioural Brain Research*. 2011;221(2):367-78.
125. Woolf NJ, Butcher LL. Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behavioural Brain Research*. 2011

126. Higley MJ, Picciotto MR. Neuromodulation by acetylcholine: examples from schizophrenia and depression. *Curr Opin Neurobiol.* 2014; 29:88-95.
127. Himmelheber AM, Sarter M, Bruna JP. Increases in cortical acetylcholine release during sustained attention performance in rats. *Cognitive Brain Research.* 2000; 9:313-25.
128. Klinkenberg I, Sambeth A, Blokland A. Acetylcholine and attention. *Behavioural Brain Research* 2011;221(2):430-42.
129. Platt B, Riedel G. The cholinergic system, EEG and sleep. *Behav Brain Res.* 2011;221(2):499-504.
130. Zhang X, Lu L, Liu S, Ye W, Wu J, Zhang X. Acetylcholinesterase deficiency decreases apoptosis in dopaminergic neurons in the neurotoxin model of Parkinson's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(2):265-72.
131. Colovic MB, Kristic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology.* 2013; 11:315-35.
132. Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res.* 2011;221(2):555-63.
133. Revathikumar P, Bergqvist F, Gopalakrishnan S, Korotkova M, Jakobsson PJ, Lampa J, et al. Immunomodulatory effects of nicotine on interleukin 1 β activated human astrocytes and the role of cyclooxygenase 2 in the underlying mechanisms. *Journal of Neuroinflammation.* 2016;13(1):256.
134. Toiber D, Berson A, Greenberg D, Melamed-Book N, Diamant S, Soreq H. N-Acetylcholinesterase-Induced Apoptosis in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE.* 2008;3(9):1-12.
135. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit.* 2004;10(6):141-7.
136. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* 2012;5(1):9-19.
137. Calabrese V, Boyd-Kimball D, Scapagnini G, Butterfield DA. Nitric Oxide and Cellular Stress Response in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders: The Role of Vitagenes. *In vivo.* 2004; 18:245-68.
138. Djordjevic VB. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol.* 2004; 237:57-89.
139. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *RedoxBiology.* 2015; 4:180-3.
140. Messner KR, Imlay JA. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem.* 2002;277(45):42563-71.
141. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57(1):395-418.
142. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89-96.

143. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuroparmacol*. 2009;7(1):65-74.
144. Rahman T, Hosen I, Islam MMT, Shekhar HU. Oxidative stress and human health. *Adv Biosci Biotechnol* 2012;03(07):997-1019.
145. Shaw PX, Werstuck G, Chen Y. Oxidative stress and aging diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:569-146.
146. Buettner GR, Schafer FQ. Free radicals, oxidants, and antioxidants. *Teratology*. 2000;62(4):234.
147. Kerksick C, Willoughby D. The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2005;2(2). 38-44.
148. Paolicchi A, Dominici S, Pieri L, Maellaro E, Pompella A. Glutathione catabolism as a signaling mechanisms. *Biochemical Pharmacology*. 2002; 64: 1027-35.
149. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(8):1499-503.
150. Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1-2):60-76.
151. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004;134(3):489-92.
152. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*. 2000; 62:649-71.
153. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57(5 Suppl):715-24.
154. Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*. 2012; 2012:137-289.
155. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:360-438.
156. Honma T, Miyagawa M, Suda M, Wang RS, Kobayashi K, Sekiguchi S. Effects of Perinatal Exposure to Bisphenol A on Brain Neurotransmitters in Female Rat Offspring. *Industrial Health* 2006;44(3):510-24.
157. Nakamura K, Itoh K, Yoshimoto K, Sugimoto T, Fushiki S. Prenatal and Lactational Exposure to Low-Doses of Bisphenol A Alters Brain Monoamine Concentration in Adult Mice. *Neuroscience Letters* 2010;484(1):66-70.
158. Matsuda S, Saika S, Amano K, Shimizu E, Sajiki J. Changes in Brain Monoamine Levels in Neonatal Rats Exposed to Bisphenol A at Low Doses. *Chemosphere* 2010;78(7):894-906.

159. Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, Tomizawa H, Sutoh C, Nakazawa K. Effects of Perinatal Exposure to Low Dose of Bisphenol A on Anxiety Like Behavior and Dopamine Metabolites in Brain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2012;39(2): 273-9.
160. Ishido M, Masuo Y, Suzuki JS, Oka S, Niki E, Morita M. Dicyclohexylphthalate causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immuno reactivity. *Journal of Neurochemistry* 2004; 91(1):69-76.
161. Ishido M, Masuo Y. Temporal Effects of Bisphenol A on Dopaminergic Neurons: An Experiment on Adult Rats. *Open Environmental Sciences*. 2014; 8:9-17.
162. Ishido M, Yonemoto J, Morita M. Mesencephalic neurodegeneration in the orally administered bisphenol A-caused hyperactive rats. *Toxicology Letters*. 2007; 173:66-72.
163. Narita M, Miyagawa K, Mizuo K, Yoshida T, Suzuki T. Changes in central dopaminergic systems and morphine reward by prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A in mice: evidence for the importance of exposure period. *Addiction Biology* 2007;12(2)167-72.
164. Suzuki T, Mizuo K, Nakazawa H, Funae Y, Fushiki S, Fukushima S, et al. Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience*. 2003; 117:639-44.
165. Luo G, Wei R, Niu R, Wang C, Wang J. Pubertal exposure to Bisphenol A increases anxiety-like behavior and decreases acetylcholinesterase activity of hippocampus in adult male mice. *Food and Chemical Toxicology* 2013;60(1): 177-80.
166. Fan Y, Ding S, Ye X, Manyande A, He D, Zhao N, et al. Does preconception paternal exposure to a physiologically relevant level of bisphenol A alter spatial memory in an adult rat? *Hormones and Behavior*. 2013; 64:598-604.
167. Khadrawy YA, Noor NA, Mourad IM, Aboul Ezz HS. Neurochemical impact of Bisphenol A in the hippocampus and cortex of adult male albino rats. *Toxicology and Industrial Health* 2016;32(9):1711-9.
168. 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. *Journal of the Neurological Sciences* 2014;347(1-2):251-6.
169. Ishido M, Masuo Y, Sayato-Suzuki J, Oka S, Niki E, Morita M. Dicyclohexylphthalate causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *Journal of Neurochemistry*. 2004;91(1):69-76.
170. Wang R, Xu X, Weng H, Yan S, Sun Y. Effects of early pubertal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate on social behavior of mice. *Horm Behav* 2016;80(1):117-24.

171. Li XJ, Jiang L, Chen L, Chen HS, Li X. Neurotoxicity of dibutyl phthalate in brain development following perinatal exposure: A study in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013; 36:392-402.
172. Yan B, Guo J, Liu X, Li J, Yang X, Ma P, et al. Oxidative stress mediates dibutyl phthalate-induced anxiety-like behavior in Kunming mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016; 45:45-51.
173. Tanida T, Warita K, Ishihara K, Fukui S, Mitsunashi T, Sugawara T, et al. Fetal and Neonatal Exposure to Three Typical Environmental Chemicals with Different Mechanisms of Action: Mixed Exposure to Phenol, Phthalate, and Dioxin Cancels the Effects of Sole Exposure on Mouse Midbrain Dopaminergic Nuclei. *Toxicology Letters* 2009;189(1):40-7.
174. Inadera H. Neurological Effects of Bisphenol A and its Analogues. *International Journal of Medical Sciences* 2015;12(12):926-39.
175. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*. 2007;24(2):139-77.
176. Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal–fetal–placental unit. *Environ Health Perspect* 2002; 110:703–7.
177. Pinson A, Bourguignon JP, Parent AS. Exposure to endocrine disrupting chemicals and neurodevelopmental alterations. *Andrology* 2016;4(4):706-22.
178. Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T. Exposure to Bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sciences*. 2004; 74:2931-40.
179. Redcay E, Courchesne E. When Is the Brain Enlarged in Autism? A Meta-Analysis of All Brain Size Reports. *Biol Psychiatry*. 2005; 58:1-9.
180. İzci Y, Erbaş YC. Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg*. 2015;25(3):287-95.
181. Rubin R, Watson PD, Duff MC, Coen NJ. The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2014;742(8):1-15.
182. Eilam-Stock T, Serrano P, Frankfurt M, Luine V. Bisphenol-A impairs memory and reduces dendritic spine density in adult male rats. *Behav Neurosci* 2012;126(1):175-185.
183. MacLusky NJ, Hajszan T, Leranth C. The Environmental Estrogen Bisphenol A Inhibits Estradiol-Induced Hippocampal Synaptogenesis. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113(6):675-9.
184. Dai Y, Yang Y, Xu X, Hu Y. Effects of uterine and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate on spatial memory and NMDA receptor of hippocampus in mice. *Hormones and Behavior* 2015;71(1):41-8.

185. Smith CA, Holahan MR. Reduced Hippocampal Dendritic Spine Density and BDNF Expression following Acute Postnatal Exposure to Di(2-Ethylhexyl) Phthalate in Male Long Evans Rats. *PLoS One* 2014;9(10):1-9.
186. Z. Sheng, J. Kawano, A. Yanai, R. Fujinaga, M. Tanaka, Y. Watanabe, K. Shinida, Expression of estrogen receptors and androgen receptor in serotonin neurons of the rat and mouse dorsal raphe nuclei: sex and species differences, *Neurosci. Res.* 49 (2004) 185–196.
187. Della Seta D, Minder I, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F. Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. *Brain Research Bulletin* 2005;65(3):255-60.
188. Porrini S, Belloni V, Della Seta D, Farabollini F, Giannelli G, Dessi-Fulgheri F. Early exposure to a low dose of bisphenol A affects socio-sexual behavior of juvenile female rats. *Brain Research Bulletin* 2005;65(3)261-6.
189. Vanderschuren LJ, Niesink RJ, Van Ree JM. The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 1997;21(3),309–326.
190. Giorgi O, Piras G, Lecca D, Hansson S, Driscoll P, Corda MG. Differential neurochemical properties of central serotonergic transmission in Roman high and low-avoidance rats. *J. Neurochem.* 2003; 86:422-31.
191. Kobrosly RW, Evans S, Miodovnik A, Barrett ES, Thurston SW, Calafat AM, et al. Prenatal Phthalate Exposures and Neurobehavioral Development Scores in Boys and Girls at 6–10 Years of Age. *Environmental Health Perspectives* 2014;122(5):521-8.
192. Yolton K, Xu Y, Strauss D, Altaye M, Calafat AM, Khoury J. Prenatal exposure to Bisphenol A and phthalates and infant neurobehavior. *Neurotoxicology and Teratology* 2011;33(5):558-66.
193. Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, Yolton K, Ye X, Dietrich KN, et al. Impact of Early-Life Bisphenol A Exposure on Behavior and Executive Function in Children. *Pediatrics.* 2011;128(5):873-82.
194. Hong SB, Hong YC, Kim JW, Park EJ, Shin MS, Kim BN, et al. Bisphenol A in relation to behavior and learning of school-age children. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 2013;54(8):890-9.
195. Perera F, Vishnevetsky J, Herbstman JB, Calafat AM, Xiong W, Rauh V. Prenatal Bisphenol A Exposure and Child Behavior in an Inner-City Cohort. *Environmental Health Perspectives* 2012;120(8):1190-94.
196. Factor-Litvak P, Insel B, Calafat AM, Liu X, Perera F, Rauh VA, et al. Persistent Associations between Maternal Prenatal Exposure to Phthalates on Child IQ at Age 7 Years. *PLoS One* 2014;9(12):1-15.
197. Park S, Kim BN, Cho SC, Kim Y, Kim JW, Lee JY, et al. Association between Urine Phthalate Levels and Poor Attentional Performance in Children with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder with Evidence of Dopamine Gene-Phthalate Interaction. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2014; 11:6743-56.

198. Landolfi A, Troisi J, Savanelli MC, Vitale C, Barone P, Amboni M. Bisphenol A glucuronidation in patients with Parkinson's disease. *NeuroToxicology*. 2017; 63:90-6.
199. Huang B, Jiang C, Luo J, Cui Y, Qin L, Liu J. Maternal exposure to bisphenol A may increase the risks of Parkinson's disease through down-regulation of fetal IGF-1 expression. *Medical Hypotheses*. 2014; 82:245-9.
200. Panagiotidou E, Zerva S, Mitsiou DJ, Alexis MN, Kittraki E. Perinatal exposure to low-dose bisphenol A affects the neuroendocrine stress response in rats. *J Endocrinol*. 2014;220(3):207-18.
201. Poimenova A, Markaki E, Rahiotis C, Kittraki E. Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol a. 2010; 167:741-9.
202. Chen F, Zhou L, Bai Y, Zhou R, Chen L. Sex differences in the adult HPA axis and affective behaviors are altered by perinatal exposure to a low dose of bisphenol A. *Brain Research* 2014;1571(1):12-24.
203. Cox KH, Gatewood JD, Howeth C, Rissman EF. Gestational exposure to bisphenol A and cross-fostering affect behaviors in juvenile mice. *Horm Behav* 2010; 58:754–61.
204. Chen K, Holschneider DP, Wu W, Rebrin I, Shih JC. A spontaneous point mutation produces monoamine oxidase A/B knock-out mice with greatly elevated monoamines and anxiety-like behavior. *J Biol Chem* 2004; 279:39645–52.
205. Chiavegatto S, Izidio GS, Mendes-Lana A, Aneas I, Freitas TA, Torrao AS, et al. Expression of alpha-synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. *Mol Psychiatry* 2009; 14:894–905.
206. Mineur YS, Obayemi A, Wigstrand MB, Fote GM, Calarco CA, Li AM, et al. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression like behavior. *PNAS* 2013;110(9):3573-78.
207. Kondolot M, Ozmert EN, Ascı A, Erkekoglu P, Oztop DB, Gumus H, et al. Plasma phthalate and bisphenol a levels and oxidant-antioxidant status in autistic children. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2016;43(1):- 149-58.
208. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*. 2006; 97:1634-58.
209. Lin CH, Chen TJ, Chen SS, Hsiao PC, Yang RC. Activation of Trim17 by PPAR γ is involved in Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced apoptosis on Neuro-2a cells. *Toxicology Letter* 2011;206(3):245-51.

8.EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 21/06/2018-E.26012



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç.Dr.Pınar ERKEKOĞLU
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Pınar ERKEKOĞLU, Belma GÜMÜŞEL, N.Dilara ZEYBEK, Nilgün YERSAL, Aylin BALCI, Gizem ÖZKEMAHLI, Alın YİRÜN'den oluşan, G.Ü.ET-18.043 kod numaralı ve "*Prenatal ve Laktasyon Döneminde Bisfenol A Ve/Veya Di-2-Etil Hekzil Ftalat Maruziyetinin Nöroendokrin Bozucu Etkilerinin Değerlendirilmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-18.043 and entitled "*Evaluation of the Neuroendocrine Disrupting Effects of Prenatal and Lactational Exposure to Bisphenol A and/or Di-2-Ethylhexyl Phthalate*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Not: Daha önce onay alan G.Ü.ET-15.066 kod numaralı çalışmada kullanılan 36 adet Sprague-Dawley Ratın beyin dokusunun kullanılmasına onay verilmiştir.

Ek:1 Liste

TELEFONLA
21.06.2018
Esengül BOŞNAK
R.

Evrakı Doğrulamak İçin: <https://belgedogrulama.gazi.edu.tr>
Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
Posta: belgedok@gazi.edu.tr İnternet Adresi: <http://belgedok.gazi.edu.tr/>

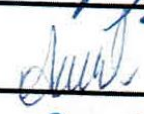
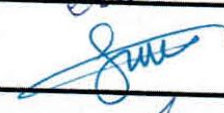
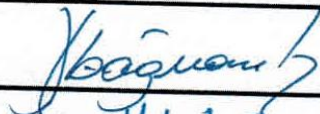
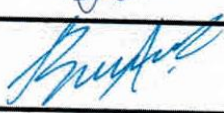
Pin: 35332
Bilgi için :Esengül BOŞNAK
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:03122022666

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 08.06.2018

TOPLANTI SAYISI : 06

ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	
Prof.Dr.Tuncay PEKER	
Prof.Dr.Fatma AKAR	KATILAMADI
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIÇIK	
Doç.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL	KATILAMADI
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.İpek SÜNTAR	
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	
Vet.Hek.Bureu AVCI	
Osman İÇ	KATILAMADI

TELGEMİN 101
ELEKTRONİK İMZALI
21.06.18
Esupul BOMAK
2.

EK-2. Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler

Tez Çalışması ile İlgili Poster Bildirileri

1. **Yirun A**, Ozkemahli G, Erkekoglu P, Kocer-Gumusel B. Effects of Prenatal Endocrine Disrupting Chemical Exposure on Oxidative Stress in Rat Brain. IV.International Congress on Applied Biological Sciences. Eskişehir.



PRENATAL BİSFENOL A
ve/veya Dİ-2-ETİL HEKZİL
FTALAT MARUZİYETİNİN
NÖROENDOKRİN BOZUCU
ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

by ANIL YİRÜN

Submission date: 06-Sep-2018 02:49PM (UTC+0300)

Submission ID: 997675884

File name: 4-ANIL_TEZ_Metni-D_Z.docx (14.05M)

Word count: 28215

Character count: 198946

PRENATAL BİSFENOL A ve/veya Dİ-2-ETİL HEKZİL FTALAT MARUZİYETİNİN NÖROENDOKRİN BOZUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIGINALITY REPORT

12%

SIMILARITY INDEX

7%

INTERNET SOURCES

6%

PUBLICATIONS

1%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

- | | | |
|---|---|-----|
| 1 | Anıl YİRÜN, Pınar ERKEKOĞLU, Belma KOÇER GÜMÜŞEL. "The Neuroendocrine and Neurodevelopmental Effects of Endocrine Disrupting Chemicals", Türkiye Klinikleri Journal of Neurology, 2018
Publication | 4% |
| 2 | katalog.hacettepe.edu.tr
Internet Source | 4% |
| 3 | issuu.com
Internet Source | <1% |
| 4 | Pınar ERKEKOĞLU, Hüseyin KAHVECİOĞLU, Belma KOÇER GÜMÜŞEL. "Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: Phthalates: Review", Türkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences, 2016
Publication | <1% |
| 5 | dergi.fabad.org.tr
Internet Source | <1% |

9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Anıl Yirün

Doğum Yeri ve Tarihi: Adana, 06.04.1993

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

İletişim Adresi ve Telefonu: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik

Toksikoloji Anabilim Dalı Sıhhiye/ANKARA, 0530 330 99 54

II. Eğitimi

2016- : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)

2011-2016: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Lisans)

2007-2011: Ö.Ç. Bilfen Fen Lisesi

III. Mesleki Deneyimi

2017-: Çukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Araştırma Görevlisi)

IV. Bilimsel Faaliyetler

Yayınlar

1.Yirun A, Erkekoglu P, Kocer-Gumusel B. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelerin Nöroendokrin Bozucu ve Nörogelişimsel Etkileri. Türkiye Klinikleri J Neur 2018;13(1):7-19.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan

Bildiriler

1. Yirun A, Ozkemahli G, Erkekoglu P, Kocer-Gumusel B. Effects of Prenatal Endocrine Disrupting Chemical Exposure on Oxidative Stress in Rat Brain. IV.International Congress on Applied Biological Sciences. Eskişehir. (poster presentation)

Projeler

Devam Eden Projeler:

1. Prenatal ve Laktasyon Döneminde Bisfenol a ve/veya Di-2etil Hekzil Ftalat Maruziyetinin Nöroendokrin Bozucu Etkilerinin Değerlendirilmesi. (Proje Yöneticisi: Doç. Dr. Ülfet Pınar Erkekoğlu, Proje Ekibi: Prof. Dr. Belma Gümüşel, Doç. Dr. Dilara Zeybek, Arş.Gör. Aylin Balcı, Arş.Gör. Gizem Özkemahlı, Arş.Gör. Nilgün Yersal) Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Destek Projesi, Proje ID: 17006.

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

1. Türk Toksikoloji Derneği (TTD)

