T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİSFENOL A'NIN TROFOBLAST HÜCRELERİNE VERDİĞİ HASARDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN ROLÜ

Fatma Beyza SAĞ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine Elif GÜZEL MEYDANLI

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Histoloji ve Embriyoloji Programı

Bir öğe seçin.

Ağustos, 2022

Beni her zaman destekleyen aileme ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

BİSFENOL A'NIN TROFOBLAST HÜCRELERİNE VERDİĞİ HASARDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN ROLÜ

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun (TÜBİTAK) 121S021 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecinde tecrübe ve destekleri ile bana yol gösteren çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. E. Elif GÜZEL MEYDANLI' ya bana kattıkları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve desteklerini esirgemeden tecrübeleriyle beni yönlendiren değerli anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK' e ve bölümümüzün kıymetleri öğretim üyeleri Doç. Dr. Gözde ERKANLI ŞENTÜRK ve Doç. Dr. Gamze TANRIVERDİ' ye yüksek lisans eğitimim için verdikleri destek ve katkılar için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Deneylerimizi gerçekleştirebilmemiz için bize materyal desteği sağlayan Dr.Öğr.Üyesi Serçin KARAHÜSEYİNOĞLU' na çok teşekkür ederim. Ayrıca, lisans eğitimimde fikir ve tavsiyeleriyle beni destekleyen ve yüksek lisans eğitimimde de manevi desteğini her zaman hissettiren çok değerli hocam Prof. Dr. Ebru GÜREL GÜREVİN' e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince tecrübelerini benimle her zaman paylaşan, çalışmalarımın her adımında bana verdiği emekleri asla unutamayacağım Arş. Gör. Zehra SEZER' e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda çekinmeden fikir alıp soru sorabildiğim, tez sürecimde tecrübe ve önerilerini paylaşarak bana yardım eden başta Uzm. Dr. Duygu NECCAR, Arş. Gör. Dr. Başak IŞILDAR ve Arş. Gör. Dr. Serbay ÖZKAN olmak üzere; Uzm. Dr. Özgür UZUN, Uzm. Dr. Nurdan OLCAR, Arş. Gör. Halil İbrahim SAYGI ve anabilim dalımızın diğer üyelerine eğitimim süresince bana verdikleri desteklerden dolayı çok teşekkür ederim. Ayrıca, yüksek lisans eğitimimde kendilerinden de çok şey öğrendiğim değerli arkadaşlarım Aynur ABDULOVA, Hakan ŞAHİN ve Dr. Meryem PURELKU' ya teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim, hayatımın ilk öğretmenleri olan canım babam Mustafa SAĞ ve canım annem Elmas SAĞ' a ve sadece varlığıyla bile bana güç veren canım kardeşim İsmail Burak SAĞ' a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, TÜBİTAK – 1002 Hızlı Destek Programı ile desteklenmiştir. Proje No: 121S021.

Ağustos 2022 **Fatma Beyza SAĞ**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BEYAN ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **ix**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **x**
ÖZET ..... **xi**
ABSTRACT ..... **xiii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **4**
2.1. Bisfenol A 4
2.1.1. BFA Maruziyeti 4
2.1.2. BFA'nın Organizma Üzerine Olan Etkileri 6
2.2. Plasenta ve Trofoblast Hücreleri 9
2.2.1. Plasentanın Gelişimi 9
2.2.2. Plasenta Aracılığıyla Fetüsün Beslenmesi 14
2.2.3. Plasenta Çalışmalarında Hücre Hatlarının Kullanılması 15
2.2.4. *In vitro* Sinsisyum Oluşumunda Forskolin Kullanılması 16
2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi 16
2.3.1. Katlanmamış Protein Yanıtı Mekanizması 17
2.3.2. UPR Mekanizmasının Sinyal Yolakları 18
3. YÖNTEM **21**
3.1. Hücre Kültürü Yöntemi 24
3.1.1. Tripan Mavisi ile Canlılık Analizi 25
3.1.2. Preliminar Çalışma İçin Deney Gruplarının Oluşturulması 25
3.1.3. Deney Gruplarının Oluşturulması 25

3.2. Işık Mikroskobik Analizler 26
3.2.1. İmmunofloresan (IF) Analizi 26
3.2.2. İmmunoperoksidaz (ICC-P) Analizi 27
3.3. Biyokimyasal Analizler 28
3.3.1. CCK-8 (Cell Counting Kit 8 / Hücre Sayım Kiti 8) Analizi 28
3.3.2. ELISA (Enzim-Bağlı İmmünosorbent Analiz) Analizi 30
3.4. Western Blot Analizi 31
3.5. İstatistiksel Analizler 32
4. BULGULAR 34
4.1. Hücre Kültürü 34
4.1.1. Tripan Mavisi ile Canlılık Analizi 34
4.2. Işık Mikroskopi Bulguları 34
4.2.1. E-kaderin İmmün İşaretlemesi ile Hücre Farklılaşmasının Tayini 34
4.2.2. Aktif Kaspaz 3 İmmün İşaretlemesi ile Apoptotik Hücrelerin Analizi 36
4.2.3. E-kaderin İmmün İşaretlemesi ile BFA'nın Sinsisyuma Etkisinin Değerlendirilmesi 39
4.3. Biyokimyasal Bulgular 41
4.3.1. CCK-8 ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi 41
4.3.2. ELISA (Enzim-Bağlı İmmünosorbent Analiz) Yöntemi ile hCG Seviyesinin Değerlendirilmesi 42
4.4. Western Blot Bulguları 43
5. TARTIŞMA 48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 55
KAYNAKLAR 56
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 67
ETİK KURUL İZİN YAZISI ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
KURUM İZNİ YAZILARI ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Bisfenol A'nın kaynakları, vücuda alınma yolları ve insan sağlığına etkileri (Ma ve diğ., 2019'dan yararlanılmıştır.) 6

Şekil 2.2: Blastosistin endometriyuma implantasyonu (Ross ve Pawlina, 2011). 12

Şekil 2.3: Koryonik villusların gelişimi (Io ve diğ., 2020). 13

Şekil 2.4: Plasentayı oluşturan yapılar (Io ve diğ., 2020). 14

Şekil 2.5: ER stresi ile aktifleşen UPR sinyal mekanizmasının alt yolakları (Bastida-Ruiz ve diğ., 2017). 20

Şekil 3.1: Çalışma planı (Figürler *biorender.com* 'dan alınmıştır). 21

Şekil 4.1: Tripan mavisi ile yapılan canlılık analizi (kırmızı ok: ölü hücre, yeşil ok: canlı hücre), 10X (a). BeWo hücre morfolojisi, 10X (b). 34

Şekil 4.2: 48 saat farklı dozlarda forskoline maruz bırakılmış BeWo hücrelerinin e-kaderin ekspresyonları, 40X. 35

Şekil 4.3: 48 saat farklı dozlarda forskoline maruz bırakılmış BeWo hücrelerinin e-kaderin ekspresyonları, 40X. 36

Şekil 4.4: E-kaderin ekspresyonunun değerlendirilmesi sonucunda oluşturulan füzyon indeksi grafiği. 36

Şekil 4.5: 48 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerindeki aktif kaspaz 3 ekspresyonu, 40X. 37

Şekil 4.6: 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerindeki aktif kaspaz 3 ekspresyonu, 40X. 38

Şekil 4.7: 48 ve 72 saat uygulanan BFA'nın BeWo hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini gösteren grafik. 39

Şekil 4.8: 48 ve 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücreleri, 40X. 40

Şekil 4.9: 48 ve 72 saat boyunca BFA'ya maruz kalan BeWo hücrelerindeki füzyon indeksi sonucunda oluşan grafik. 41

Şekil 4.10: 48 ve 72 saat boyunca uygulanan BFA'nın BeWo hücrelerinin canlılık ve proliferasyonuna olan etkisini gösteren grafik. 42

Şekil 4.11: 48 ve 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerinin hCG hormon sentezleme fonksiyonu üzerindeki etkisini gösteren grafik. 43

Şekil 4.12: 48 ve 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerindeki GRP78 proteininin seviyesi. 44

Şekil 4.13: 48 ve 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerindeki ATF6 proteininin seviyesi. 45

Şekil 4.14: 48 ve 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerindeki p-PERK proteininin seviyesi. 46

Şekil 4.15: 48 ve 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerindeki p-IRE1 proteininin seviyesi. 47

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Çalışma süresince kullanılan sarf ve kimyasal malzemeler. 21

Tablo 3.2: Çalışma süresince kullanılan cihazlar. 23

Tablo 3.3: Sinsisyum oluşumu için en uygun forkolin dozu ve süresinin tespit edilmesi amacıyla oluşturulan preliminar deney grupları 25

Tablo 3.4: BeWo hücrelerine BFA'nın etkisinin araştırılması için oluşturulan deney grupları. 25

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

ß- : beta-
µM : mikromolar

Kısaltmalar **Açıklama**

ATF6 : Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
BFA : Bisfenol A
CCK-8 : Hücre sayım kiti - 8
CO_2 : Karbondioksit
DMEM : Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyumu
DMSO : Dimetil sülfoksit
ELISA : Enzim-Bağlı İmmünosorbent Analiz
ER : Endoplazmik retikulum
ERAD : Endoplazmik retikulum ile ilişkili bozulma
EVT : Ekstravillöz trofoblast
FBS : Fetal bovin serum
FITC : Floresan İzotiyosiyanat
GRP78 : Glikoz düzenleyici protein 78
hCG : İnsan koryonik gonadotropin
IF : İmmünofloresan
p-IRE1 : fosfo-İnositol gerektiren enzim 1
p-PERK : fosfo-Protein kinaz R-benzeri ER kinaz
PBS : Fosfat tamponlu tuz
PFA : Paraformaldehit
SST : Sinsityotroblast
ST : Sitotrofoblast
UPR : Katlanmamış protein yanıtı
WB : Western blot
T-TBS : %0,1 Tween-20 içeren Tris tamponlu tuz

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİSFENOL A'NIN TROFOBLAST HÜCRELERİNE VERDİĞİ HASARDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN ROLÜ

Fatma Beyza SAĞ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Histoloji ve Embriyoloji Programı

Danışman : Prof. Dr. Emine Elif GÜZEL MEYDANLI

Bisfenol A (BFA); sentetik polimerlerin yapısında bulunmasının yanı sıra hava, toprak ve suda da bulunabilen ve çeşitli yollarla insan vücuduna alınabilen, endokrin bozucu bir kimyasaldır. BFA, östrojeni taklit ederek çeşitli sinyal yolakları aracılığıyla vücut fonksiyonlarını olumsuz yönde etkiler. Yapılan çalışmalarla, BFA'nın birçok patolojide rol almasının yanı sıra, plasentanın oluşumunda görevli olan trofoblast hücreleri üzerindeki zararlı etkisi ve bu etkiye bağlı olarak, preeklampsi ve fetal gelişim bozukluğu gibi gebelikle ilişkili patolojilere neden olduğu gösterilmiştir. Endoplazmik retikulum (ER) stresi, ER'de aşırı miktarda protein birikiminden kaynaklanır. ER; bu stresle başa çıkmak için 'katlanmamış protein yanıtı' mekanizmasını devreye sokar ve hücrenin kalite kontrolünü sağlar. Ancak, hücrenin uzun süreli veya şiddetli ER stresine maruz kalması hücre ölümüne sebep olur. BFA'nın farklı sistemlerde sebep olduğu hasarlarda ER stresi mekanizmasının etkili olduğuna dair çalışmalar yapılmıştır, ancak BFA'nın plasentaya olan etkisinde ER stresinin rolü ve trofoblast hücrelerinde BFA kaynaklı ER stresi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bundan dolayı, bu çalışmada BFA'nın trofoblast hücrelerine olan etkisinde ER stresinin rolünün araştırılması

amaçlanmaktadır. Bu proje kapsamında, BeWo hücreleri kullanıldı ve hücreler sinsisyum oluşturması için forskolin ile uyarıldı. Ardından, hücrelere 0,003 μM, 3 μM, 30 μM ve 300 μM BFA, 48 ve 72 saat olmak üzere iki farklı zamanda uygulandı. Deney sonlandırıldıktan sonra, BFA'nın trofoblast hücrelerine olan etkisinde ER stresinin rolü GRP78, p-IRE1, p-PERK ve ATF6'nın proteinlerinin seviyelerinin analiziyle araştırıldı. Ayrıca, BFA'nın trofoblast hücrelerinin farklılaşma ve sekresyon kapasiteleri, apoptoz ve hücre canlılığı üzerine olan etkileri de incelendi ve sonuçlar ER stresi verileriyle karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu araştırmada Western blot, immunofloresan, ELISA ve CCK-8 analizleri yapıldı. Elde edilen bulgular ile, trofoblast hücrelerinde BFA kaynaklı ER stresinin meydana geldiği sonucuna varıldı. Bu çalışma ile, BFA'nın trofoblast hücreleri üzerine olan etkisinde ER stresinin rolü ortaya konarak, BFA'nın gebelikle ilişkili olan patolojilerinin aydınlatılmasına katkı sağlanabileceği düşünülmektedir.

Ağustos 2022 , .II. sayfa.

Anahtar kelimeler: bisfenol A, trofoblast, endoplazmik retikulum stresi, plasenta

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

THE ROLE OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN THE DAMAGE OF TROPHOBLAST CELLS DUE TO BİSPHENOL A

Fatma Beyza SAĞ

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Histology and Embryology

Histology and Embryology Programme

Supervisor : Prof. Dr. Emine Elif GÜZEL MEYDANLI

Bisphenol A (BPA) is an endocrine disrupting chemical that can be found in synthetic polymers and also in air, soil and water. It is transported to the human body via several ways. BPA mimicks estrogen and various signaling pathways affect body functions negatively because of its estrogen-like effect. Studies have shown that as well as BPA plays in many pathologies, its adverse effect on trophoblast cells which is involved in the development of placenta and, depending on the harmful effect, it causes pregnancy-related pathologies, such as preeclampsia and fetal growth restriction. Endoplasmic reticulum (ER) stress is caused by excessive protein accumulation in the ER. ER activates its 'unfolded protein response' mechanism to cope with ER stress, thereby providing the quality control for proteins in the cell. Prolonged or severe ER stress causes cell death. There are studies about the ER stress mechanism in damages caused by BPA in different systems, however there is no study on ER stress due to BPA in trophoblast cells. Therefore, this project is aimed to demonstrate the role of ER stress in the effect of BPA on trophoblast cells. Within the context of this project, BeWo cells were used and stimulated with forskolin to induce syncytial formation. After that, the cells were exposed to 0.003 μM, 3

μM, 30 μM and 300 μM BPA during two different times as 48 and 72 hours. After the experiment is terminated, the role of BPA mediated ER stress on trophoblast cells were examine by analyze the proteins levels of GRP78, p-IRE1, p-PERK and ATF6. In addition, the effects of BPA on differentiation and secretion capacity, apoptosis and cell viability of trophoblast cells were also examined and the results were compared with ER stress data. In this study, Western blot, immunofluorescence, ELISA and CCK-8 analyzes were be performed. The results obtained shows us that BFA-induced ER stress was present in the trophoblast. By this means, it is thought that this project can contribute to the elucidation of BPA-induced pathologies associated with pregnancy by demonstrating the role of ER stress in the effect of BPA on trophoblast cells.

August 2022, II. pages.

Keywords: bisphenol A, trophoblast, endoplasmic reticulum stress, placenta

1. GİRİŞ

Bisfenol A (BFA), endokrin bozucu kimyasallar sınıfına ait ve üretimi en fazla olan kimyasallardan biridir. Esas olarak, epoksi reçine ve polikarbonatları içeren sentetik polimerlerin üretiminde kullanılmasının yanı sıra su, hava ve toprakta da bulunur. Ancak, insanların en sık karşılaştığı BFA maruziyeti gıdaya temas eden paketler ve şişeler aracılığıyla gerçekleşir (Michałowicz, 2014; Murata ve Kang, 2018; Rolfo ve diğ., 2020). Sindirim sistemi, solunum sistemi ve deri (BFA içeren ürünlerin doğrudan teması ile) gibi birçok yolla vücuda alınan ve östrojenik etki gösteren BFA, vücuttaki yapılarla etkileşime girerek vücut fonksiyonlarını olumsuz yönde etkiler ve organlardaki fizyolojik fonksiyonların bozulması, inflamasyon, oksidatif stres, genotoksik ve epigenetik olaylar gibi birçok mekanizmada toksik rol oynar (Ma ve diğ., 2019). Yapılan birçok çalışmada gebelerin maruz kaldığı BFA'nın, plasentada morfolojik ve hücresel değişikliklere neden olduğu ve plasentayı aşarak fetüste anormal genetik veya epigenetik durumlara sebebiyet verdiği bildirilmiştir (Benachour ve Aris, 2009; Rolfo ve diğ., 2020; Ye ve diğ., 2019; Zbucka-Kręt owska ve diğ., 2019).

Trofoblast hücrelerinin, gebeliğin devamlılığı için plasentayı oluşturacak olan hücrelere farklılaşması, gelişmesi ve invazyon yeteneği kazanması önemlidir. Trofoblast hücreleri, blastosistin dış tabakasında sitotrofoblastlar (ST'ler) olarak gelişir. Farklılaşma sinyalleri doğrultusunda ST'ler; villöz ST hücrelerine ve ekstravillöz trofoblast (EVT) hücrelerine; villöz ST hücreleri sinsitiyotrofoblastlara (SST'lere), EVT hücreleri ise invaziv özellikteki trofoblast hücrelerine farklılaşır. ST ve özellikle SST, fetüs ile anne arasında madde geçişini düzenleyerek besin-gaz-atık değişiminde görev alır (Chang ve diğ., 2018; Handwerger, 2010; Malhotra ve diğ., 2016). SST'nin bir diğer görevi; gebelik hormonları ve büyüme faktörlerini sentezleyip salgılamaktır. SST'ler tarafından salgılanan insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu, gebeliğin devamlılığı için gerekli olan glikoprotein yapılı bir hormondur. hCG, gebelik döneminde maternal serum ve idrar ile yapılan analizlerde, normal ve patolojik gebeliklerin tanımlanmasında ve trofoblastların farklılaşma kapasitelerinin işlevsel olarak değerlendirilmesinde bir belirteç olarak kullanılır (Cole, 2010; Malhotra ve diğ., 2016).

Endoplazmik retikulum (ER); proteinlerin sentezini, katlanmasını, modifikasyonunu ve hücre içindeki akışını düzenleyen önemli bir organeldir. Sadece doğru bir şekilde katlanmış

olan proteinler Golgi aygıtına geçip fonksiyonel hale gelir. Yanlış katlanmış proteinler, ER içinde tutulur ve ER ile ilişkili bozulma (ERAD) mekanizması ile parçalanır. Protein sentezinin yanı sıra ER, intraselüler kalsiyum (Ca^{+2}) deposu olarak da görev yapar ve Ca^{+2} homeostazını sağlar (Ariyasu ve diğ., 2017; Guzel ve diğ., 2017). ER'nin; hipoksi, oksidatif stres, Ca^{+2} homeostazındaki değişiklikler ve glikoz yoksunluğu gibi durumlarda aşırı yüklenmesi, yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikiminden dolayı ER stresine neden olur. ER, bu stresle başa çıkmak için "katlanmamış protein yanıtı (UPR)" mekanizmasını devreye sokar ve UPR sinyal yolaklarını başlatır. UPR mekanizması bir hayatta kalma mekanizmasıdır ve glikoz düzenleyici proteininin (GRP78'in) aktivasyonu ile başlatılarak üç ana transmembran proteini tarafından düzenlenir. Bu transmembran proteinler; inositol gerektiren enzim 1 (IRE1), protein kinaz R-benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)'dır. Aktive olan UPR mekanizması, ER stresine sahip hücrenin canlılığı ve ölümü arasındaki dengeyi düzenler ve bu mekanizmanın uzun süreli aktivasyonu apoptoz ile sonuçlanır (Cao ve Kaufman, 2014; Guzel ve diğ., 2017).

Yapılan çalışmalar UPR mekanizması ile plasenta gelişimi arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. UPR mekanizmasının proteinlerinden biri olan IRE1'in plasentada yüksek aktivite gösterdiği, özellikle ekstraembriyonik dokuların gelişiminde etkili olduğu ve eksikliğinin hem plasenta disfonksiyonuna hem de embriyoda gelişimsel bozukluklara yol açtığı bildirilmiştir (Iwawaki ve diğ., 2009; K. Zhang ve diğ., 2005). Bunun yanı sıra, preeklampsi gibi patolojik gebeliklerden elde edilen plasenta dokularında, ER stresinin arttığı ifade edilmektedir (Du ve diğ., 2017; C. Zhang, 2017). Bu bilgilerin yanında literatürde, BFA'nın vücuttaki farklı sistemlerde sebep olduğu hasarlarda ER stresi mekanizmasının etkili olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. Wang ve diğ. (2019), BFA'nın nöral hücrelerde, ER stresini ve mitokondri hasarını tetiklediğini ve buna bağlı olarak apoptozu arttırdığını gösterirken; Lee ve diğ. (2018) bu durumun tersine, BFA'nın meme kanseri hücrelerinde apoptozu ve ER stresini azaltan bir etki gösterdiğini bildirmiştir (H. M. Lee ve Choi, 2018; H. Wang ve diğ., 2019). Bu bilgiler ışığında, BFA'nın trofoblastlar üzerindeki etki mekanizmasında ER stresinin rolü olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, bu bilgilere dayanarak, BFA'nın trofoblastlar üzerindeki etkilerini ER stresi yoluyla gösterip göstermediği araştırılmıştır. ER stresine sebep olan BFA'nın trofoblastlar üzerindeki etki mekanizmasının ortaya konulması, gebelikle ilişkili preeklampsi ve fetal gelişim bozukluğu gibi patolojilerin mekanizmasının açıklığa kavuşturulması açısından

yarar sağlayacaktır. Literatürde BFA'nın plasentada veya trofoblast hücrelerinde sebep olduğu hasara dair çalışmalar mevcut olup, bu hasarlar üzerinde ER stresinin etkisine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu doğrultuda projemizde, UPR sinyal yolaklarının (GRP78, PERK, IRE1, ATF6), BFA kaynaklı trofoblast hasarındaki rolünün araştırılması amaçlanmaktadır. Böylece, BFA'ya maruz kalan trofoblast hücrelerinde, olası ER stresi kaynaklı hasarın etki mekanizmasının gösterilmesi hedeflenmiştir. BFA'nın trofoblast hücrelerinde meydana getirdiği hasarı, hangi UPR sinyal proteini (PERK, IRE1, ATF6) üzerinden gerçekleştiğinin belirlenecek olması, ileride yapılacak çalışmaların önünü açacaktır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Bisfenol A

Endokrin bozucu kimyasallar sınıfına ait kimyasal bir ajan olarak tanımlanan bisfenol A (BFA; [2,2-bis(4-hidroksifenil)propan]); 17-ß östrojene benzer etki göstererek östrojen, androjen ve tiroid hormonu reseptörleri ile etkileşime giren ve insanlarda endokrin fonksiyonları bozucu etki oluşturan bir maddedir (Ma ve diğ., 2019). 1891 yılında Alexander P. Dianin tarafından sentezlenmesine rağmen, 1930'larda sentetik östrojen çalışmaları sırasında ticari olarak kullanılmaya başlanmış ve 1950'lerden itibaren plastik / polimer endüstrisine girmiştir. Yıllık üretimi 3,8 milyon tondan fazla olan ve dünya çapında en fazla üretimi yapılan insan yapımı en önemli bileşik olduğu bilinmektedir. BFA, fenol gruplarına bağlı hidroksil (OH-) rezidüleri içerdiğinden dolayı, reaktivitesi fazla olan organik bir bileşiktir ve birçok maddenin yapısına katılmaktadır (Michałowicz, 2014). Polikarbonat plastiklerin, epoksi resinlerin ve diğer polimer materyallerin üretiminde kullanılan BFA, fiziksel ve kimyasal özellikleri yardımıyla bu maddelere sertlik, dayanıklılık, termal stabilite, asit ve yağlara karşı direnç kazandırır. Bu özellikleri sayesinde BFA içeren maddeler; su boruları, medikal ekipmanlar, elektronik cihazlar, CD/DVD'ler, oyuncaklar ve termal kâğıtlar (gıda paketleri, etiket, bilet, gazete vs. üretiminde kullanılan) gibi ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Michałowicz, 2014; Rubin, 2011).

2.1.1. BFA Maruziyeti

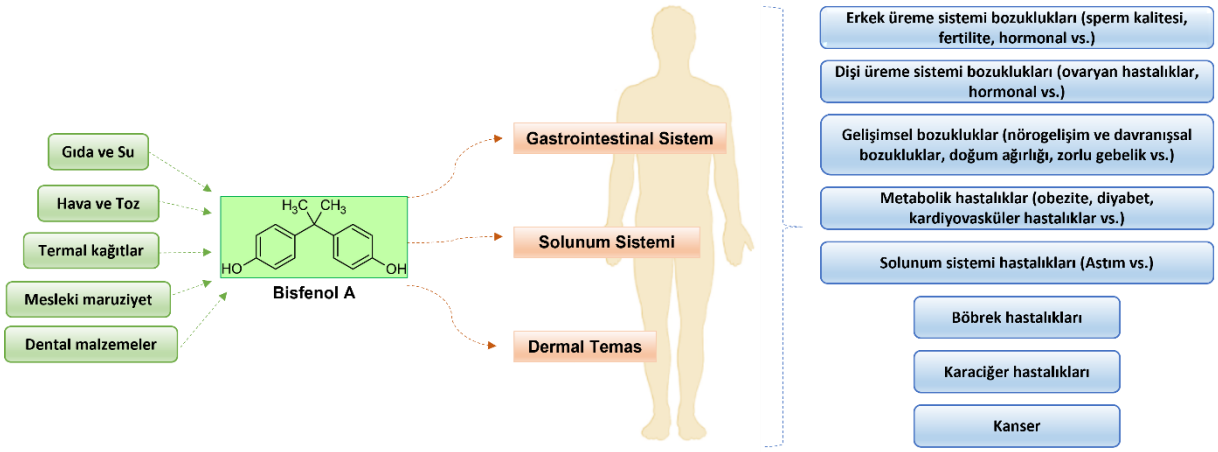
BFA'nın yapısına katıldığı ürünlerin geniş kullanım alanına sahip olması, insanların BFA'ya maruz kalma riskini arttırmaktadır. BFA'ya maruziyet; bu maddenin sentetik ürünlerin üretiminde kullanılması aracılığıyla olmasının yanı sıra, üretimi ve işlenmesi sırasında ortaya çıkan metabolitlerinin çevreye salınması ile de olabilmektedir. Yapılan çalışmalar ile su, hava ve toprakta da BFA'ya rastlanabildiği bildirilmiştir (Aids, 2015).

BFA; beslenme yoluyla sindirim sistemi, inhalasyon ile solunum sistemi ve BFA içeren ürünlerin doğrudan teması ile deri aracılığıyla olmak üzere birçok yolla vücuda alınmaktadır. Ancak insanlar, BFA'ya büyük oranda gıdalar aracılığıyla maruz kalır (Murata ve Kang, 2018; Rolfo ve diğ., 2020). Yiyecek ve içeceklerin içine koyulduğu paket ve kutulardan o gıdaya BFA

geçişi olduğu ve bu geçişin saklama koşullarına (sıcaklık, asitlik vs.) bağlı olarak farklı düzeylerde olabileceği bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada, BFA'nın gıdaya geçişinin yüksek sıcaklık uygulamasından, saklama koşullarının uygun olmamasından ve konservelerin hasar görmüş olmasından etkilendiği gösterilmiştir. Kang ve diğ. (2003), BFA'nın konserve içeriğine geçişinde, sıcaklığın ısıtma süresinden daha etkili olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Ayrıca, konserve içeriğinin tuz veya yağ içermesinin, sıcaklığın artmasıyla BFA geçişinin artmasında rol aldığını göstermişlerdir (J.-H. Kang ve diğ., 2003). Polikarbonat şişelerin kullanıldığı başka bir çalışmada, tekrar tekrar kullanılan şişelerde yeni şişelere göre BFA geçişinin daha fazla olduğu ve bu artan BFA geçiş miktarının polimer degredasyonuna bağlı olduğu ortaya konmuştur (Brede ve diğ., 2003). Kafein konsantrasyonu ve teneke kahve kutusundan BFA geçişi arasındaki ilişki hakkında yapılan bir çalışmada ise, kafein içeriği arttıkça kahve kutusundan BFA geçişinin arttığı tespit edilmiştir (J. H. Kang ve Kondo, 2002).

Çeşitli yollarla vücuda alınan BFA'nın; tükürük, idrar, serum, amniyotik sıvı, foliküler sıvı gibi birçok vücut sıvısında ve akciğer, böbrek, karaciğer ve plasenta dokusu gibi farklı dokularda biriktiği tespit edilmiştir (Benachour ve Aris, 2009; Murata ve Kang, 2018). Ayrıca, Volkel ve diğ. (2002)'nın yaptığı bir çalışmada, oral olarak alınan 5 mg BFA'nın yarı ömrü 6 saatten daha az bir süre (5,3 saat) olarak raporlanmıştır (Völkel ve diğ., 2002). Bunlara ek olarak, BFA'nın çeşitli kaynaklardan vücuda alınmasından sonra intestinal mikroflora ve karaciğer tarafından glukuronidasyon (glukuronik asit konjügasyonu) ve sülfasyon (sülfat konjügasyonu) tepkimeleri yoluyla metabolize edildiği ve vücutta aktif formda metabolitlerinin kaldığı bildirilmektedir (Naomi ve diğ., 2022; Rolfo ve diğ., 2020; Żwierełło ve diğ., 2020).

Yapılan çalışmalarla BFA maruziyetinin ve vücuttaki birikiminin organizma üzerinde çeşitli etkileri olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Bisfenol A'nın kaynakları, vücuda alınma yolları ve insan sağlığına etkileri (Ma ve diğ., 2019'dan yararlanılmıştır.)

2.1.2. BFA'nın Organizma Üzerine Olan Etkileri

Vücuda alınan BFA; sinir sistemini, üreme sistemini, immün sistemi, embriyonun büyüme ve gelişme basamaklarını ve birçok nörolojik, endokrinolojik ve metabolik fonksiyonu değiştirerek etkisini göstermektedir. Organlardaki fizyolojik fonksiyonların bozulmasına neden olan BFA; inflamasyon, oksidatif stres, genotoksik ve epigenetik değişimler gibi birçok mekanizmanın işleyişine katılarak toksik etkiye sebebiyet verir. Bunlara ilaveten, yapılan yayınlarda BFA'nın obezite, diyabet, metabolik sendrom gibi hastalıkları indükleyici bir madde olduğu da bildirilmiştir (Haverinen ve diğ., 2021).

BFA'nın birçok organ ve doku üzerindeki etkileri yapılan çalışmalarla raporlanmıştır. Literatürde rastlanan BFA'nın bağırsak-karaciğer aksı üzerine olan etkisini gösteren bir çalışmada, diyet yoluyla 24 hafta boyunca 50 µg/kg BFA'ya maruz bırakılan erkek farelerde, intestinal mikrobiyotada disbiyosis gelişmiştir. BFA, intestinal floranın bozulmasına bağlı olarak karaciğerde endotoksin birikimi, toll-benzeri reseptör 4 (TLR4)/ nüklear faktör-kappa B (NF-kB) yolağının aktivasyonu aracılığıyla karaciğer inflamasyonuna neden olmuştur. Bu çalışma ile, diyetle BFA maruziyetinin, karaciğerde lipid birikimine neden olarak karaciğer yağlanmasını (hepatik steatosisi) indüklediği sonucuna varılmıştır (Feng ve diğ., 2020). BFA'nın bağırsak-karaciğer aksını etkilemesiyle organizmada başka patalojilerin de tetiklendiği bilinmektedir. Örneğin, Diamante ve diğ. (2021)'nın yaptığı bir çalışmada, gebelik sırasında anne fareye *in utero* olarak 5 µg/kg/gün BFA maruziyeti ile dişi ve erkek yavrularda karaciğer- bağırsak aksına bağlı olarak cinsiyete göre metabolik fenotiplerin vücut ağırlığı ve karaciğer lipid düzeyleri açısından değiştiğini gösterilmiştir (Diamante ve diğ., 2021). BFA'nın

karaciğer üzerindeki etkisini araştıran başka bir çalışmada, sıçanlara toksik olan ancak öldürücü olmayan dozda (10 mg/kg/gün) BFA verilmiştir. Çalışma sonucunda, BFA'nın sıçan karaciğer dokusunda histolojik olarak sinuzoidal tıkanıklık, hepatositlerde sitoplazmik vakuolizasyon, lökosit infiltrasyonu; ultrastrüktürel olarak mitokondriyal dejenerasyon, sinüzoidal genişleme, piknotik çekirdek oluşumu, düz yüzlü endoplazmik retikulum şişmesi, lipid birikimi ve lizozom gelişimine sebebiyet verdiği görülmüştür. Ayrıca, hayvanların serumlarında da karaciğer enzimlerinin patolojik yönde değişikliğe uğradığı gösterilmiştir (Ahmed Zaki ve diğ., 2021).

BFA'nın, hücre ve doku üzerindeki etkisinde maruziyet zamanlaması, maruziyet süresi, dozu gibi birçok parametrenin etkili olabileceği literatüre katkı sağlayan birçok yayında görülebilmektedir. BFA'nın *in vitro* olarak sinir (Neuro-2a) hücrelerine olan etkisinin incelendiği bir çalışmada, hücrelere farklı dozlarda BFA 24 saat süreyle uygulanmıştır. 50 ve 100 μM BFA'nın sinir hücrelerinde istatistiksel olarak olumlu veya olumsuz bir fark yaratmadığı ancak 150 ve 200 μM BFA'nın hücre sayısını ve hücreler arasındaki adezyonu azalttığı görülmüştür. Buna ilaveten, sinir hücrelerindeki mikrofilament iskeleti araştırıldığında dentritlerin kısaldığı ve aksonal sinapsların azaldığı veya yok olduğu görülmüştür. BFA kaynaklı otofajinin sinir hücreleri üzerindeki toksik etkileri LC3, p62 ve Beclin-1 (otofaji ile ilişkili proteinler) proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin analiz edilmesiyle araştırılmıştır. 150 ve 200 μM BFA uygulanan gruplarda LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı bulunurken, p62 proteininin ekspresyonu ise anlamlı olarak artmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular, LC3, p62 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonunun sinir hücrelerinde BFA dozuna bağlı olarak BFA'nın otofajiyi inhibe ettiğini düşündürmüştür (Li ve diğ., 2022). BFA'nın vücuda alınan doza bağlı olarak etki ettiğini gösteren başka bir çalışmada ise, akciğer fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Bu çalışmada, BFA ve türevleri olan Bisfenol F ve Bisfenol S'nin sitotoksik etkileri araştırılmıştır. BFA'nın insan akciğer fibroblast hücrelerinin proliferasyonu, apoptozu ve hücre döngüsü süreçleri incelendiğinde doza bağlı olarak etki ettiği sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmaya göre; 24 ve 48 saat süreyle, hücrelere düşük konsantrasyonlarda (20, 40, 80 ve 100 μM) verilen BFA ve türevlerinin, insan akciğer fibroblast hücreleri üzerinde olumsuz bir etki göstermediği bildirilmiştir (Kim ve diğ., 2021). BFA'nın maruziyet zamanlamasının da organizmadaki patojenite açısından önemli olduğunu gösteren bir çalışmada, BFA'nın kalp hücrelerinin farklılaşma süreçlerine etkisi araştırılmıştır. Sıçan embriyonik kardiyoblastlarına, farklılaşmanın 4-5.gününde *in vitro* olarak 48 saat süreyle, 10 ve 30 μM BFA uygulandığında hücre fenotipinde değişiklikler olduğu, miyoblast

hücrelerinin tübüler özelliğini kaybederek iskelet kası benzeri fenotipe dönüştüğü gösterilmiştir (Escarda-Castro ve diğ., 2021).

BFA'nın üreme toksisitesini de etkileyebilen kimyasal bir ajan olduğu yapılan yayınlarla ispatlanmıştır. Market çalışanı kadınlarda BFA ve polikistik over sendromu (PCOS) arasındaki metabolik/endokrin ilişkileri araştıran bir çalışmada, otomatik vezne makinesi (automated teller machine-ATM), satış noktası (POS) ve diğer satış cihazlarında kullanılan termal kağıt ile temas eden BFA indeksi kullanılarak BFA'ya maruz kalan vaka grubu ve BFA maruziyeti olmayan kontrol grubu oluşturulmuştur. BFA'ya maruz kalan kadınlarında kontrol grubuna kıyasla, trigliserid ve kolesterol konsantrasyonları ile LH : FSH oranında anlamlı artış görülürken, TSH seviyesinde düşüş olmuştur. BFA maruziyeti olan grupta LH:FSH oranındaki artış, kontrol grubunda vaka grubundan ziyade PCOS olduğu doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda, BFA'nın PCOS fizyopatolojisindeki potansiyel rolü olduğunu doğrulayan bulgular elde etmişlerdir (Vahedi ve diğ., 2016). BFA maruziyeti ve preeklampsi arasındaki ilişkiyi konu alan bir çalışmada ise; farelerde gebelik sırasında BFA maruziyetinin, trofoblast invazyonunu ve plasentaya ait spiral arterlerin yeniden şekillenmesini engelleyerek preeklampsi benzeri özelliklere yol açtığı gösterilmiştir (Ye ve diğ., 2019). Yapılan başka bir çalışmada ise, BFA kaynaklı anormal plasenta gelişiminin görüldüğü preeklampsi ve fetal gelişim bozukluğu gibi patolojilerde BFA'nın, pro-anjiyojenik faktörlerin seviyesi azaltıp, anti-anjiyojenik faktörlerin seviyelerini arttırarak anjiyojenik değişikliklerde rol oynayabildiği bildirilmiştir (Ferguson ve diğ., 2015).

Üreme toksisitesi altında değerlendirilebilecek olan patolojiler de BFA dozuna bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. BFA'nın etkilerinin doza bağlı olarak değişebileceğini gösteren bir çalışmada, düşük dozlardaki (1, 50 ve 75 μM) BFA'nın plasental hücrelerin canlılığını etkilemediği; ancak ERK sinyal yolağının aktifleşmesine neden olarak, steroidogenik genler olan CYP11A1 ve CYP19'un ekspresyonunu azalttığı ve buna bağlı olarak da steroid hormonların (östradiol ve progesteron) üretimini azalttığı gösterilmiştir. Araştırmacılar tarafından hormon üretimindeki bozukluğun plasental yetersizliğe ve gebelik kayıplarına neden olabileceği belirtilmiştir (Chu ve diğ., 2018). Başka bir çalışmada ise, *in vitro* koşullarda 24 saat BFA'ya maruz bırakılan sitotrofoblastlarda, uygulanan doza bağlı olarak, hücre ölümlerinin gerçekleştiği bildirilmiştir (Benachour ve Aris, 2009).

BFA düşük konsantrasyonlarda bile plasentayı geçebilen bir bileşiktir (Balakrishnan ve diğ., 2010). Bu nedenle, gebelerin maruz kaldığı BFA, plasentayı aşarak fetüste anormal genetik veya epigenetik durumlara neden olabilmektedir (Rolfo ve diğ., 2020). Zbucka-Krętowska ve diğ. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, plasentanın BFA geçirgenliğine bağlı olarak fetüsün BFA'ya maruziyetinin arttığı ve fetal gelişimin (doğum ağırlığının) olumsuz yönde etkilendiği gösterilmiştir (Zbucka-Krętowska ve diğ., 2019). Gebe fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ise, bu farelere güvenli olduğu düşünülen bir dozda BFA uygulanmasına rağmen, BFA'nın uterus spiral arterlerin yeniden şekillenmesini olumsuz yönde etkileyerek intrauterin gelişim bozukluğuna sebep olduğu gösterilmiştir (Müller ve diğ., 2018). Başka bir çalışmada ise, gebe farelerin 0,5 ve 50 mg/kg/gün BFA'ya maruz bırakılması sonucunda BFA'nın; embriyo gelişiminde rol alan genlerin modülasyonunda/düzenlenmesinde bozulmalara sebep olarak, plasentanın fonksiyonunu bozan ve embriyonun beslenmesini olumsuz yönde etkileyen morfolojik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Tait ve diğ., 2015).

Avrupa Gıda Güvenlik Otoritesi (EFSA), yapılan çalışmaları göz önüne alarak, BFA maruziyetinin halk sağlığı için oluşturduğu riskleri değerlendirmiş ve BFA'nın günlük tolere edilebilir miktarını 4 µg/kg olarak belirlemiştir (Aids, 2015). Avrupa Birliği de BFA'nın sağlık için oluşturduğu riskleri değerlendirmiş, özellikle bebeklerin ve küçük çocukların gıdalarına temas eden malzemelerin ve maddelerin üretiminde BFA kullanımını yasaklamıştır (European Commission, 2018).

2.2. Plasenta ve Trofoblast Hücreleri

2.2.1. Plasentanın Gelişimi

Plasenta; gebelik sürecinde fetüsün büyümesi ve gelişimi için gerekli olan, ortalama olarak 22 cm çapında, 2,5 cm kalınlığında, 470 g ağırlığında ve disk şeklindeki geçici olarak oluşan endokrin bir organdır. Plasentanın esas fonksiyonu, anne ve fetüs arasında bir arayüz görevi görerek gaz değişimini ve besin alışverişini sağlamak, bu alışveriş esnasında oluşan atıkları uzaklaştırmak ve maternal immün yanıtı önlemektir (Benirschke ve diğ., 2012; Lopes ve diğ., 2020). Plasentayı oluştaran hücrelerin farklılaşması ve matürasyonu, embriyonik gelişimin erken dönemlerine dayanır.

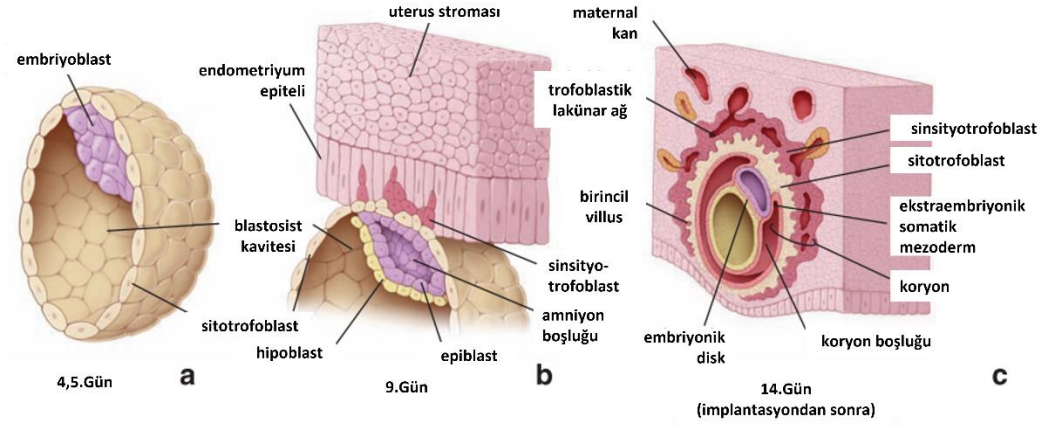
Gelişimin 1. haftasında oosit ile spermin fertilizasyonundan sonra zigot, tuba uterinadan uterusa ilerlerken birçok mitotik hücre bölünmesi (yarıklanma bölünmesi) geçirir ve 12-16 hücre evresindeyken morula olarak adlandırılır. Morula safhasındayken hücrelerde meydana gelen kompaksiyon ve polarite süreci sonucunda iki farklı hücre kümesi ayırt edilir. Bu hücre kümeleri; embriyoyu oluşturacak olan iç hücre kitlesi ve pre-implantasyon aşamasında blastosistin dış duvarını oluşturan dış hücre kitlesidir. Morula uterusa ulaştığında, uterus sıvısı hücrelerin arasından girer ve blastosist kavitesi oluşur. Bu aşamadan sonra embriyo, blastosist olarak adlandırılır. Ayrıca, iç hücre kitlesi *embriyoblast*; dış hücre kitlesi ise *trofoblast* adını alır (Aplin ve diğ., 2020; Hemberger ve diğ., 2020; Ross ve Pawlina, 2011).

Blastosistin uterusa tutunduğu bölgede (embriyonik kutupta), endometriyal epitelin invazyonundan sonra, trofoblast iki tabakaya farklılaşmaya başlar ve trofoblast hücreleri *sinsisyotrofoblastı (primer sinsisyumları)* oluşturmak için hücresel füzyona uğrayarak kaynaşır. Uterusun endometriyal epiteline temas eden blastosistin trofoblast tabakası, gelişim esnasında farklılaşan ilk hücre soyu olma özelliği gösterir. Fertilizasyondan sonraki 6-7.günlerdeki plasenta gelişiminin bu aşamasına *prelakünar evre* denir (Benirschke ve diğ., 2012; Demir, 1995; Turco ve Moffett, 2019) (Şekil 2.2).

İmplantasyondan sonra, sinsisyotrofoblastlar endometriyuma doğru invaze olarak endometriyumda gebeliğin devamı için çeşitli değişikliklerin meydana gelmesini sağlar. Bu aşamada endometriyum *desidua* olarak adlandırılır. Sinsisyotrofoblastlar desidua hücreleri arasında ilerlerken, hücrelerin apoptozu veya nekrozunu değil; hücreler arasındaki bağlantı komplekslerini parçalayarak hücreler arasında boşluklar açılmasını sağlar. Trofoblast hücreleri ile desidua hücreleri arasında desmozomal bağlantılar oluşur. Blastosistin maternal dokularla temasa geçmemiş trofoblast tabakasını oluşturan, birbirleri ile kaynaşmamış hücreler, *sitotrofoblast (ST)* olarak adlandırılır. ST'ler, tek çekirdekli progenitör hücrelerdir. Bir bazal membran üzerine oturur. Mitotik özelliklerinden dolayı 'germinatif' trofoblast tabakası olarak isimlendirilir ve plasentanın kök hücreleri olarak kabul edilir. Plasentanın yapısındaki oranı gebelik sürecinde değişmektedir. Gebeliğin erken döneminde süreklilik gösterirken, miadında plasentadaki villöz yüzeyin %25'ini oluşturduğu bilinmektedir. ST'lerin proliferasyonu ve füzyonu ile maternal dokular ile doğrudan temasta olan trofoblast tabakası oluşur. Bu tabaka, *sinsisyotrofoblast (SST)* olarak isimlendirilir. SST, ST hücrelerinin kaynaşmasıyla oluşan, kesintisiz, çok çekirdekli bir sinsisyumdur. Mikrovilluslardan zengin epitel ile çevrili olan ve hücre sınırları olmayan bir yapıdır. SST plasental villusların en dış tabakasını oluşturur ve erken

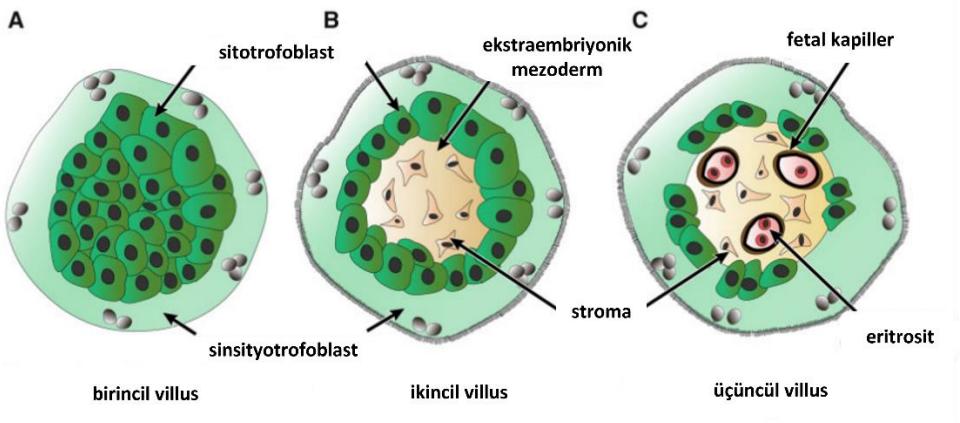
dönemde maternal sekresyon ürünleri ile, ilerleyen evrede ise intervillöz aralığa akan maternal kanla doğrudan temasta olan tabakadır. Gazların, besinlerin alışverişi için esas bölgedir. Ayrıca SST, insan lökosit antijeni (HLA) moleküllerini eksprese etmeyerek immünolojik bir bariyer olarak işlev görür. Böylece maternal dolaşımdaki immün hücreler, allojenik fetüsün varlığına rağmen, SST'yi "yabancı" olarak tespit edemez (Benirschke ve diğ., 2012; Handwerger, 2010; Turco ve Moffett, 2019). Buna ilaveten SST, gebelik için gerekli olan hormon, protein ve büyüme faktörlerini sentezleyip salgılayan önemli bir endokrin organ görevi üstlenmektedir. SST'ler tarafından salgılanan insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu, gebeliğin devamlılığı için gerekli olan glikoprotein yapılı bir hormondur. hCG, gebelik döneminde maternal serum ve idrar ile yapılan analizlerde, normal ve patolojik gebeliklerin tanımlanmasında ve trofoblastların farklılaşma kapasitelerinin işlevsel olarak değerlendirilmesinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Cole, 2010; Malhotra ve diğ., 2016). hCG'nin salgılanması ile ilk trimesterde korpus luteumun gerilemesi önlenir ve böylece, plasenta gelişene kadar gebeliğin devamlılığı için gerekli olan progesteronun salgılanması sağlanır. Bu endokrin fonksiyonuna ek olarak hCG'nin, uterusta anjiyogenezi desteklediği, miyometriyumun sessiz kalmasında rol oynadığı ve maternal immüntoleransa katkı sağladığı gösterilmiştir (Fournier, 2016) (Şekil 2.2a,b).

8-13.günlerde SST'ler arasında içi sıvı dolu boşluklar oluşmaya başlar ve trofoblastik lakünalar oluşur. Lakünalar arasındaki sinsisyal plaklar *trabekül* olarak adlandırılır. Bu evreye plasenta gelişiminin *laküner evresi* denir. Laküner evre, blastosist endometriyuma tamamen gömülene kadar ve endometriyal epitel implantasyon kutbunu tamamen kapatıncaya kadar devam eder. Bu evrede, trofoblastik lakünalar blastosistin trofoblast tabakasını üç tabakaya ayırır: Blastosist kavitesine bakan kısım *primer koryonik plak*; hemen altındaki trabeküllerle birlikte sinsisyotrofoblastik hücrelerden oluşan *laküner sistem*; son olarak ise endometriyumla karşılıklı duran trofoblast tabakası ise *trofoblastik kabuk* olarak isimlendirilir (Benirschke ve diğ., 2012; Demir, 1995; Turco ve Moffett, 2019) (Şekil 2.2c).



Şekil 2.2: Blastosistin endometriyuma implantasyonu (Ross ve Pawlina, 2011).

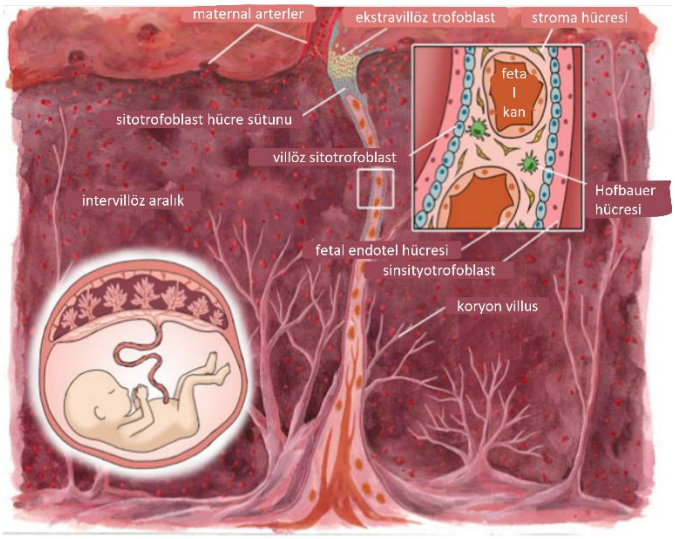
13-14.günde lakünalar içerisinde maternal eritrositler görülmeye başlar. Sitotrofoblastik hücrelerin proliferasyonunda artış görülür. Trabeküller, boşluklara doğru çıkıntı yaparak yan dallar oluşturur. Bu dallar, etrafı SST ile çevrili ST'lerden oluşan *birincil villus* olarak adlandırılır (Şekil 2.3A). Böylece plasenta oluşumunda *erken villus evresi* başlamış olur. Trofoblastik kabuk ile devamlılık gösteren primer villuslar *demirleyici (anchoring) villus* olarak isimlendirilir. Demirleyici villuslardan dallanan villuslara da *terminal villuslar* denir. Maternal ve fetal madde alışverişi, terminal villuslar aracılığı ile gerçekleşir. Ayrıca, laküner sistem ise intervillöz aralığa dönüşür. 15-17.günlerde, koryonik villus gelişiminde ekstraembriyonik mezodermi oluşturan mezenkimal hücreler, birincil villusların merkezine penetre olur. Bu aşamadaki villusa, *ikincil villus* ismi verilir (Şekil 2.3B). Mezenkimal hücreler villus içerinde geniş bir alana yayılır ancak demirleyici villusta trofoblastik kabuğa ulaşmaz. Villusun bu distal bölümü *ST hücre sütunu* olarak isimlendirilir. 18-21.günlerde ikincil villuslardaki ekstraembriyonik mezoderm farklılaşmaya başlar ve içerisinde fetal kapillerler gözlenir. Mezenkimal hücrelerden hematopoietik kök hücre grupları meydana gelir. Villöz stromada kapillerlerin görülmesi *üçüncül villusların* gelişiminin göstergesidir (Şekil 2.3C). Villöz ağaç hızlıca koryonik plaktan genişleyip dallanmaya devam eder. Doğuma kadar tüm fetal vaskülarizasyon bu yapı sayesinde gerçekleşir (Benirschke ve diğ., 2012; Io ve diğ., 2020; Sadler, 2015).



Şekil 2.3: Koryonik villusların gelişimi (Io ve diğ., 2020).

ST ve SST hücreleri plasentanın esas fonksiyonunu gerçekleştirek olan koryon villusları oluşturur ve villöz trofoblast olarak sınıflandırılır. ST'ler, farklılaşma sinyalleri doğrultusunda invaziv özellikteki *ekstravillöz trofoblast (EVT)* hücrelerine de farklılaşabilmektedir. ST'ler, demirleyici villuslarda EVT'ye dönüşür. ST'ler distal hücre sütunundan ayrılarak invaziv fenotip kazanır ve endometriyumu istila eder. Son zamanlarda yapılan yayınlarda desiduayı istila eden EVT'ler, intestial EVT; spiral arterleri intila eden EVT'ler ise endovasküler EVT olarak isimlendirilerek terminolojik olarak ayrılmaya gidilmektedir (Handwerger, 2010; Hannan ve diğ., 2010; Huppertz, 2020).

Plasentanın sağlıklı bir şekilde fonksiyonunu yerine getirebilmesi için trofoblast hücre tiplerinden başka villusların stromasında yer alan farklılaşmamış mezenkimal hücreler, fibroblastlar, miyofibroblastlar, villöz makrofajlar (Hofbauer hücreleri), mast hücreleri, plazma hücreleri ve vaskülarizasyonda görevli hücreler (endotel hücreleri) gibi birçok hücre çeşidi bulunmaktadır. Villus stromasında bulunan bu hücrelerin ekstraembriyonik mezenkimden köken aldığı düşünülmektedir ancak bu durum kesinlik kazanmamıştır (Benirschke ve diğ., 2012; Turco ve Moffett, 2019).



Şekil 2.4: Plasentayı oluşturan yapılar (Io ve diğ., 2020).

2.2.2. Plasenta Aracılığıyla Fetüsün Beslenmesi

İnsan plasentası hemokoryal tipte olan bir plasentadır. Hemokoryal tip plasentada, maternal endotel hücreleri ST hücreleri ile aşındırılır ve daha derin invazyon gerçekleşir. SST'nin yüzeyi maternal kan ile temas eder. Böylelikle fetal ve maternal dolaşım plasental bariyer ile birbirinden ayrılarak kirli kan ile temiz kan karışmaz. "Plasenta bariyeri" veya "maternal-fetal bariyer" terimleri, plasentanın maternal ve fetal dolaşımının birbirine karışmadan aktarılması işlevini yerine getiren bir bariyer rolü üstlendiği için kullanılmaktadır (Benirschke ve diğ., 2012). Plasental bariyer başlangıçta; fetal damarların endoteli, endotelin bazal laminası, villöz mezenkimal doku, trofoblast bazal laminası, sitotrofoblastik tabaka ve sinsisyumdan oluşmaktadır. Gebeliğin ilerleyen evrelerinde (4.aydan itibaren), plasental bariyer incelir. Sadece kan damarlarının endoteli ile sinsisyum tabakası, maternal ve fetal dolaşımda görev alır. Böylece damarların endoteli ile sinsisyum yakından temas ederek madde geçişinin büyük ölçüde artması sağlanır (Ross ve Pawlina, 2011; Sadler, 2015). Plasenta bariyeri, villusun fetüse ait olan içeriğini maternal kandan ayırarak, gazların, besinlerin, protein ve steroid hormonların (plasental laktojen ve koryonik gonadotropin) ve büyüme faktörlerinin maternal ve fetal dolaşım arasındaki geçişine olanak sağlayarak besin-gaz-atık değişiminde görev alır (Handwerger, 2010).

Gelişen embriyonun beslenmesi, ilk olarak uterus bezlerindeki salgı ürünlerinin SST ile temas etmesiyle gerçekleştirilir. Böylece embriyonun histiyotropik beslenmesi implantasyondan birkaç gün sonra başlamış olur. Histiyotrofik beslenme, gebeliğin erken

evrelerinde embriyonun maternal kan ile değil, uterus bezlerinden salgılanan salgı ürünleri ile beslenme yöntemidir. Başlangıçtaki invaziv SST'lerin yerini EVT'ler alır ve trofoblast hücreleri uterus bezlerine daha fazla invaze olarak bezlerin gelişmekte olan intervillöz boşluğa doğru açılmasını sağlar. İntervillöz boşluğa akan salgı ürünleri (uterus sütü) plasentadan embriyoya transfer edilir. Uterus bezlerinin aşındırılmasından sonra, villöz materyal ve sıvıların maternal sisteme geri akışını sağlamak için EVT tarafından uterin venler aşındırılır. 1.trimester esnasında EVT, uterus spiral arterlerini de invaze eder ve lümenlerini tıkayarak maternal kanın plasentaya akışını ikinci trimesterin başına kadar engeller. Bu aşamada, tıkaçlardan yalnızca kan plazması sızar. Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde embriyonun besin desteğine ihtiyacı artar ve 2. trimesterın başında arterlerdeki tıkaçların çözülmesi ve maternal kanının plasentaya akışının sağlanması ile fetüsün beslenmesi sağlanır. Böylece, fetüsün beslenmesi histiyotropik beslenmeden hemotrofik beslenmeye dönüşmüş olur (Huppertz, 2020).

Yapılan çalışmalarla plasenta oluşumunda görülen yapısal veya fonksiyonel bozuklukların, dişi üreme ve fetal gelişim sağlığını etkileyerek fetal büyüme bozukluğu, düşük, preeklampsi, ölüdoğum, preterm doğum gibi gebelik ile ilişkili hastalıklara sebep olduğu bildirilmektedir (Hemberger ve diğ., 2020).

2.2.3. Plasenta Çalışmalarında Hücre Hatlarının Kullanılması

Plasenta ile ilgili yapılan çalışmalarda; deney hayvanları, primer hücre kültürü ve trofoblast hücre soyları kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin her birinde, birçok bakımdan avantaj ve dezavantaj vardır: insan plasenta gelişimi ve ilişkili patolojilerin araştırılmasında, çoğunlukla insan ile aynı tipte plasentaya sahip deney hayvanları (fare, sıçan gibi kemirgenler) tercih edilmesine rağmen, plasenta gelişimi sırasında görülen gelişimsel ve yapısal farklılıklardan dolayı deney hayvanları ideal bir model olarak kabul edilmemektedir. *In vitro* olarak ise ideal olan, trofoblastların primer hücre kültürü ile izole edilmesi olsa da plasenta dokusunun temin edilmesi aşamasında geçerli olan etik kurallar ve bu dokudan izole edilen hücrelerin kültür ortamında sınırlı yaşam ömrüne sahip olması gibi durumlar, bu yöntemi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, son dönemde, insan plasenta gelişimi ve trofoblast farklılaşması ile ilgili çalışmalarda, güvenilir ve tekrarlanabilir *in vitro* modeller geliştirilmekte ve çeşitli hücre soyları kullanılarak *in vivo* sistemlere en yakın sonuçlar elde edilmeye çalışılmaktadır. Bu trofoblast hücre soylarından bazıları; tümör olmayan HTR-8/SVneo ve SGHPL-4,-5 hücre soyları ve koryokarsinomalardan (trofoblastın malign tümörlerinden) elde edilen JEG-3, JAR ve BeWo hücre soylarıdır. Bu trofoblast hücre soylarının kültürü ve manipülasyonu, primer

hücre kültüründen elde edilen hücrelere göre daha kolaydır. *In vitro* modellerde SST füzyonunu değerlendirmek için BeWo hücre soyu kullanılırken, trofoblast invazyonunu değerlendirmek için BeWo, JEG-3 ve JAR hücre soyları yaygın olarak kullanılmaktadır (Hannan ve diğ., 2010; Hemberger ve diğ., 2020; Turco ve Moffett, 2019).

2.2.4. *In vitro* Sinsisyum Oluşumunda Forskolin Kullanılması

Primer hücre kültürü veya çeşitli hücre hatlarının kullanılmasıyla oluşturulan *in vitro* ortamda, sinsiyum oluşumu kendiliğinden gerçekleşmez. Bu nedenle çalışmalarda sinsisyum oluşumu, çeşitli kimyasal ajanların kullanılmasıyla aktive edilmektedir (Benirschke ve diğ., 2012). Bu ajanlar arasında en yaygın kullanılanı forskolindir. Forskolin, cAMP (siklik adenozin monofosfat) sinyal yolağını aktive eden kimyasal aktivatör bir maddedir. Hücre içi cAMP sinyal yolağının aktivasyonu ile çeşitli alt yolakların aktifleştirilmesi sonucunda hücre füzyonu indüklenir (Dubey ve diğ., 2018; Handwerger, 2010). Hücre füzyonu sonucunda ise multinüklear yapılar olan sinsisyumlar oluşur. Örneğin, insan plasentasındaki SST'ler mononüklear ST'lerin sinsisyum oluşturması sonucunda ortaya çıkmaktadır (Ishikawa ve diğ., 2014). ST'lerin farklılaşması sonucunda sinsisyum oluşumu ise hücre membranlarının yeniden organizasyonu nedeniyle hücre membran belirteçleri ile veya sinsisyum oluşumu ile sentezlenmeye başlayan insan koryonik gonadotropin ve insan plasental laktojen hormon seviyelerinin analizi ile değerlendirilebilmektedir (Gerbaud ve diğ., 2015).

Yapılan çalışmalarda da görülebileceği gibi, bir koryokarsinoma hücre hattı olan BeWo hücreleri, plasentanın villöz ST özelliğinde olmasına rağmen, forskolin ile indüklenmesi sonucunda SST formuna dönüşebilen bir hücre hattıdır (Drwal ve diğ., 2018). Bu nedenle BeWo hücreleri, forskolin ile indüksiyonu sonucunda farklılaşarak sinsisyumun oluşması açısından *in situ* ortamı taklit etmesi nedeniyle *in vitro* çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Drwal ve diğ., 2018; Wei ve diğ., 2012).

2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER), toplam hücre hacminin %15-60'ını oluşturan ve proteinlerin sentezi, katlanması, modifikasyonu ve trafiği gibi post-translasyonel süreçleri düzenleyen membranla çevrili önemli bir organeldir. Sadece doğru bir şekilde katlanmış olan proteinlerin Golgi aygıtına geçip fonksiyonel hale gelmesi ER'nin hücre için fonksiyonel önemini göstermektedir. Hücresel fonksiyonun işleyişi için gerekli olan membran ve salgı

proteinlerinin hücre içi trafiğinin sağlanmasının yanında ER; lipid biyosentezi, enerji metabolizması ve detoksifikasyon için de önemli bir organeldir. Ayrıca tüm bu fonksiyonlarının yanında, intraselüler kalsiyum (Ca^{+2}) deposu olarak da görev yapar ve Ca^{+2} homeostazını sağlar (Ariyasu ve diğ., 2017; Cao ve Kaufman, 2014; Guzel ve diğ., 2017).

ER'nin; hipoksi, oksidatif stres, Ca^{+2} homeostazındaki değişiklikler ve glikoz yoksunluğu gibi durumlarda aşırı yüklenmesi ile yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikiminden dolayı hücrede *ER stresi* meydana gelir. ER, bu stresle başa çıkmak ve hücrenin sağkalımını gerçekleştirmek için "*katlanmamış protein yanıtı (UPR)*" mekanizmasını devreye sokar ve UPR sinyal yolaklarını aktive eder.

2.3.1. Katlanmamış Protein Yanıtı Mekanizması

Hücrenin, ER stresi ile baş edebilmesi için aktive olan sinyal yolaklarının tümü *katlanmamış protein yanıtı (UPR)* mekanizmasını oluşturur. Bu mekanizmanın aktifleşmesi ile, hücredeki protein ekspresyonu azaltılarak veya şaperon proteinlerin ve ER ile ilişkili protein degredasyonu (ERAD) ile ilişkili proteinlerin ekspresyonu arttırılarak hücrenin hayatta kalmasının sağlanması amaçlanır. Hücre herhangi bir stres altında olmadığında, UPR sinyal yolaklarının aktivasyonunu sağlayan proteinler, ER lümeninde inaktif halde bulunur (Bastida-Ruiz ve diğ., 2017). Bu proteinler, Ca^{+2} bağımlı şaperon protein olan glikoz düzenleyici proteinine (GRP78; BiP; Hsp70) bağlı durumdadır. Hücrede yanlış katlanmış proteinler tespit edildiğinde, başka bir deyişle ER stresi meydana geldiğinde, UPR mekanizması, ER lüminal altbiriminde bulunan ve ER homeostazını sağlayan GRP78'in aktivasyonu ile başlatılır ve homeostatik şartlarda, organel membranında GRP78'in inaktif halde tuttuğu üç ana transmembran proteininin GRP78'den ayrılması ile yürütülür. Bu transmembran proteinler; inositol gerektiren enzim 1 (IRE1), protein kinaz R-benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)'dır. Bu proteinler, hücrede *ER stres sensörleri* olarak görev yapar. Sonuç olarak, bu sensörlerin her biri, protein translasyonunu azaltmak (PERK'in aktifleşmesi durumunda) ve hücreyi kurtaracak UPR hedef genlerinin (IRE1 ve/veya ATF6'nın aktivasyonu durumunda) ekspresyonunu indüklemek için birbirinden bağımsız olarak hareket ederek hücredeki homeostasisi dengelemeye çalışır (Şekil 2.5) (Cao ve Kaufman, 2014; Guzel ve diğ., 2017; Kumar ve Maity, 2021).

2.3.2. UPR Mekanizmasının Sinyal Yolakları

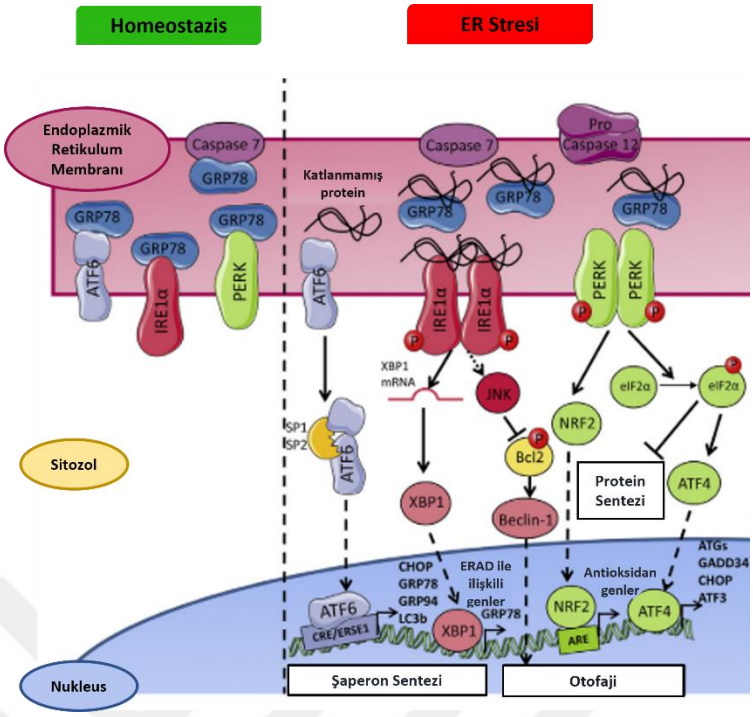
Yanlış katlanmış/katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikmesi sonucunda ER stresi oluştuğunda, UPR sinyal mekanizmasının aktivasyonu GRP78 ile uyarılır. GRP78, ER membranının intrasitoplazmik tarafında bulunan transmembran sinyal moleküllerinin aktivasyonunu indükleyerek down-stream protein yolakları aktive eder. Böylelikle, aktive olan UPR mekanizması, ER stresine sahip hücrenin canlılığı ve ölümü arasındaki dengeyi düzenler (Cao ve Kaufman, 2014; Guzel ve diğ., 2017).

UPR mekanizması, ilk olarak mayalar üzerinde çalışılmış ve sadece *inositol gerektiren enzim 1 (IRE1)* tarafından düzenlendiği görülmüştür. Ancak IRE1, memelilerde ER stresini kontrol altına almak için aktifleşen üç alt yolaktan yalnızca biridir. IRE1, homeostasis durumunda GRP78'e bağlı olarak bulunan ve endoribonukleaz ve (serin/treonin kinaz altbirimi ile) kinaz aktivitesi olan bir transmembran proteindir. Her hücrede bulunan IRE1α ve yalnız intestinal epitelde bulunan IRE1ß olmak üzere iki homologu bulunmaktadır. ER stresi esnasında IRE1α'nın aktivasyonu, IRE1α sitozolik altbiriminin oligodimerizasyonu ve otofosforilasyonunun gerçekleştiği çok aşamalı bir süreçtir. IRE1, aktive olduktan sonra, GRP78'den ayrılmanın bir sonucu olarak, sitoplazmaya salınır ve IRE1'in sitoplazmik altbiriminin oligomerizasyonundan sonra X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1)'i kodlayan mRNA'dan intronları birleştiren RNAaz altbiriminin kesilmesiyle aktif bir endonükleaz görevi görür (XBP1s izoformu oluşur). Transkripsiyon için aktif olan XBP1, yanlış katlanmış proteinlerin proteazom tarafından ubikitinasyonu ve degredasyonu için ERAD ile ilgili genlerin; yanlış katlanmış proteinlerin doğru katlanması için ise GRP78 gibi şaperon proteinlerinin üretimini artırarak ER homeostasisini korur. Ayrıca hücre sağkalımını sağlamak için IRE1α, c-Jun N-terminal kinazlar (JNK) aracılı sinyal yolağı ile otofajiyi tetikler (Bastida-Ruiz ve diğ., 2017; Guzel ve diğ., 2017; Kumar ve Maity, 2021).

Protein kinaz R-benzeri ER kinaz (PERK), sıçan pankreas adacıklarında tanımlanmış, protein translasyonunu azaltarak ER'deki stres durumunu çözen sensör proteinidir. Aktive olduktan sonra yanlış katlanmış proteinlere seçici olarak bağlanır. Luminal ve sitozolik serin/treonin altbirimlerine sahiptir. Luminal altbirimden GRP78'in ayrılması, PERK'in aktivasyonu ile sonuçlanan oligomerizasyon ve trans-otofosforilasyon süreçlerini içerir. Aktive olmuş PERK, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α'daki (eIF2α), α alt birimini fosforile eder. eIF2α 'nın fosforilasyonu, eIF2B'nin inhibisyonu ile sonuçlanır. Sonuç olarak proteinlerin translasyonunun gerçekleşmesi ve sonrasında, ER'deki protein yükü azaltılır. Fosforile olan

eIF2α, ATF4 ve şaperonlar gibi bazı spesifik proteinlerin ekspresyonunu tetikler. Böylece, UPR sinyal mekanizması; yeni proteinlerin ER'ye girişini duraklatan translasyonel azalmayı, GRP78 ve GRP94 gibi ER şaperon proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu ve protein katlanmasında yer alan protein disülfit izomeraz (PDI) ve peptidil-prolil izomeraz proteinlerin olgunlaşmasına ve pro-apoptotik protein C/EBP homolog proteininin (CHOP'un) yanı sıra, proteazom aracılı bozunma yoluyla yanlış katlanmış proteinlerin sayısını azaltmak için ERAD sisteminde işlev gören genlerin transkripsiyonel aktivasyonuna yardımcı olan protein katlanması ile ilişkili ER enzimlerini içerir. Sonuç olarak PERK sinyal yolağının aktivasyonu ile ekspresyonu artan ATF4; CHOP, büyüme durdurucu ve DNA-hasarı indüklenebilir 34 protein (GADD34), ATF3 ve otofaji ile ilgili genler (ATG'ler) gibi proteinlerin transkripsiyonunu tetikler. CHOP, hücreleri apoptozdan koruyan B hücresi lösemi 2 (BCL-2) ailesi gibi anti-apoptotik faktörleri inhibe eder ve pro-apoptotik faktörleri aktive ederek ER stresi ile indüklenen apoptozu uyarır (Ariyasu ve diğ., 2017; Bastida-Ruiz ve diğ., 2017; Guzel ve diğ., 2017; Kumar ve Maity, 2021).

Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6), memelilerde ATF6α ve ATF6β olarak iki izoformu bulunan ve ER membranında bulunan diğer iki transmembran protein gibi homeostatik şartlarda GRP78 ile kompleks oluşturan bir transmembran proteindir. ER stresi sırasında, ER'deki katlanmamış proteinleri algılayarak Golgi aygıtına transloke olur. Golgi aygıtında site-1 proteaz (S1P) ve site-2 proteaz (S2P) tarafından parçalanır. ATF6'nın stres duyarlılığı iki çalışma mekanizması üzerinden yürümektedir: İlki, ER stresi nedeniyle ATF6'nın GRP78'den ayrılarak Golgi aygıtına translokasyonuna yol açmasıdır. İkinci model ise, ATF6'nın lüminal alt biriminin ER'de normal şartlarda moleküller arası disülfit bağları ile dimerler veya oligomerler oluşturmasıdır. ER stresine yanıt olarak, ATF6'nın disülfit bağları parçalanır ve oluşan monomerik ATF6, Golgi aygıtına transloke olur. Daha sonra, ATF6 nukleusa geçerek ER stres yanıt olarak GRP78 ve GRP94 gibi şaperonların veya CHOP, XBP1 gibi genlerin transkripsiyonunu teşvik eder. Sonuç olarak ATF6, hedeflediği ER şaperon genleri ve protein katlama enzim genleri gibi birçok gen ile ER homeostasisinin korunmasında rol alır (Ariyasu ve diğ., 2017; Bastida-Ruiz ve diğ., 2017; Kumar ve Maity, 2021).

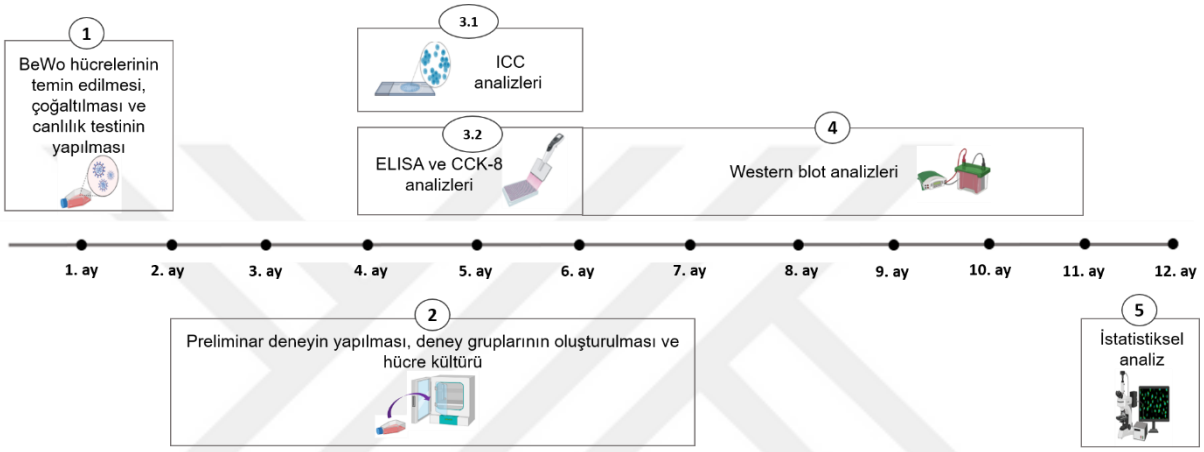


Şekil 2.5: ER stresi ile aktifleşen UPR sinyal mekanizmasının alt yolakları (Bastida-Ruiz ve diğ., 2017).

Yapılan çalışmalar UPR mekanizması ile plasenta gelişimi arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. UPR mekanizmasının proteinlerinden biri olan IRE1'in plasentada yüksek aktivite gösterdiği, özellikle ekstraembriyonik dokuların gelişiminde etkili olduğu ve eksikliğinin hem plasenta disfonksiyonuna hem de embriyoda gelişimsel bozukluklara yol açtığı bildirilmiştir (Iwawaki ve diğ., 2009; K. Zhang ve diğ., 2005). Bunun yanı sıra, preeklampsi gibi patolojik gebeliklerden elde edilen plasenta dokularında, ER stresinin arttığı ifade edilmektedir (Du ve diğ., 2017; C. Zhang, 2017). Preeklamptik plasenta dokularındaki trofoblast hücrelerinde GRP78, PERK ve ATF4 protein seviyelerinin, sağlıklı plasenta dokularına kıyasla daha fazla olduğu gösterilmiş ve bu hücrelerde meydana gelen apoptozun, bu sinyal yolağı üzerinden gerçekleştiği bildirilmiştir (L. Liu ve diğ., 2017).

3. YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan hücre kültürü ve ışık mikroskopi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma planının özeti şekil 3.1'de görselleştirilmiştir.



Şekil 3.1: Çalışma planı (Figürler *biorender.com* 'dan alınmıştır).

Bu çalışma süresince kullanılan malzemeler tablo 3.1'de, kullanılan cihazlar ise tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Çalışma süresince kullanılan sarf ve kimyasal malzemeler.

Kullanılan Malzemeler	Marka
Plastik petri kabı	Falcon 353001
75 cm^2'lik kültür kabı	Jet Biofil-TCF 012250
6 kuyucuklu kültür kabı	Jet Biofil-TCF 011006
12 kuyucuklu kültür kabı	Jet Biofil-TCP 011012
24 kuyucuklu kültür kabı	Jet Biofil-TCP 011024
2 ml eppendorf tüpü	Isolab
15 ml steril santrifüj tüpü	SARSTEDT 554502
50 ml santrifüj tüpü	SARSTEDT 547254
0.22 µm'lik steril filtre	Sartorius Minisart Syringe Filter

Tablo 3.1 (devam): Çalışma süresince kullanılan sarf ve kimyasal malzemeler.

10 ml steril serolojik pipet	SARSTEDT 1254001
1-10 µl mikropipet	Eppendorf
10-100 µl mikropipet	Eppendorf
10-200 µl mikropipet	Eppendorf
8 kanallı otomatik pipet	Nichiryo Nichipet 7000
10 µl mikropipet ucu	Rainin RC-10 17001124
250 µl mikropipet ucu	Rainin RC-250 17001116
Lam ve yuvarlak lamel	Marienfield
Hemositometre	Marienfeld 0640010
Termometre	Achem H910055
Nitroselüloz membran	Thermo Fisher Scientific 88018
%7,5' luk jel	Biorad 4561025
Filtre kağıdı	Biorad 1703932
DMEM/F12	Thermo Fisher 11039021
Fetal Bovine Serum (FBS)	10270106
L-glutamin	Capricorn GLN-B
Antibiyotik/Antimikotik	Sigma A5955
Tripsin/EDTA	Thermo Fisher 25200056
Bisfenol A	Sigma Aldrich 239658-50G
Forskolin	Tocris 1099
Dimetil sülfoksit (DMSO)	PanReac AppliChem A3006
Tripan mavisi	Gibco 15250
Fosfat tamponlu tuz (PBS)	Life technologies
Etanol	Merck
Metanol	Merck
Paraformaldehit	Merck 104005.1000
hCG ELISA kit	Elabscience 107-E-EL-H0175
Hücre sayım kiti 8 (CCK-8)	Abbkine KTC011001
Anti - E-kaderin antikoru	Abcam ab40772
Anti - aktif kaspaz 3 antikoru	Novus Biologicals NB100-56113
Anti - GRP78 antikoru	Novus Biologicals NBP2-12888
Anti - ATF6 antikoru	Invitrogen PA5-20216
Anti - p-PERK antikoru	Affbiotech DF7576
Anti - p-IRE1 antikoru	Invitrogen PA116927
FITC goat anti-rabbit IgG antikor	Santa Cruz sc-2012
Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG HveL antikor	Abcam ab175471
HRP-konjuge goat anti-mouse sekonder antikor	Boster BA1050-0.5

Tablo 3.1 (devam): Çalışma süresince kullanılan sarf ve kimyasal malzemeler.

HRP-konjuge goat anti-rabbit sekonder antikor	Boster BA1054-0.5
Biotinylated Protein Ladder Detection Pack	Cell Signaling Technology 7727
UltraVision Detection System, Anti-Polyvalent Detection, HRP	Thermo Scientific TP-125-HL
Anti-biotin HRP-linked antikor	Cell Signaling Technology 7075P5
Anti - ß-aktin antikoru	SantaCruz sc-47778
Proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyl	Thermo Scientific 78440
Bovine serum albümin (BSA)	Santa Cruz sc-2323
Trisma base	Sigma-Aldrich T6066
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma 31434
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Fisher Scientific BP166-500
Gliserol	Riedel-de Haën 15524
Glycine	Carlo Erba 453807
ß-marcaptoetanol	Fisher Scientific BP176-100
Yağsız süt tozu	LabScientific M0841
4 6, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	Abcam Ab104139
3,3'Diaminobenzidine (DAB) substrat kit	Thermo Scientific TA-125-HD
Triton X-100	Fisher BioReagents BP151-500
Tween-20	Sigma P2287
WesternBright ECL, HRP substrat	Advansta K-12045-D20

Tablo 3.2: Çalışma süresince kullanılan cihazlar.

Kullanılan Cihazlar	Marka
Distile su cihazı	Sartorius Stedim Biotech, Arium pro VF
Dijital çalkalamalı su banyosu	Fisher Scientific
İnkübatör	Thermo Scientific, Heracell 150i
Inverted (ters) ışık mikroskobu	Olympus IX71
Santrifüj	Eppendorf 5810 R
Steril laminar hava akım kabini (Esco Class II)	Thermo Scientific, Heracell 150i
Elektrikli pipetör	Ratiolab Accupetta
Sıvı azot tankı	Thermo Scientific
-80°C dondurucu	Nüve DF490
Buzdolabı	Beko
Masaüstü otoklav	Thermo Scientific Varioklav 25T
Vorteks	Biocote Stuart SA8
pHmetre	Shirwell SH-PH25
Hassas terazi	Sartorius

Tablo 3.2 (devam): Çalışma süresince kullanılan cihazlar.

Orbital shaker	Allsheng OS-200
Mikroplate okuyucu	Allsheng AMR-100 Microplate Reader AS-16050-00
Homojenizatör	
Metal kuyulu alet	
Isıtıcı	
Trans-blot turbo transfer sistemi	Biorad 1658001
Güç Kaynağı	Biorad 1645050
Kemilüminesans Western blot görüntüleme sistemi	Azure Biosystems Azure 300
Fotomikroskop	Olympus BX61
Kamera	Olympus DP72

3.1. Hücre Kültürü Yöntemi

Projemizde, plasenta ile ilgili yapılan çalışmalarda sıkça kullanılan insan koryokarsinoma hücre hattı olan BeWo trofoblast hücreleri kullanıldı. Hücreler, Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Çalışmamızın hücre kültürü aşamaları, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda steril koşullar altında gerçekleştirildi.

Laboratuvarımıza getirilen hücreler deney zamanına kadar sıvı azot tankında -196°C'de muhafaza edildi. Hücreler sıvı azottan çıkarılmadan 30 dk – 1 saat öncesinde, hücrelerin aşırı alkali ortamda strese girmemesi için hücre kültür medyumunun [DMEM/F-12K (1:1), %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, 2mM L-Glutamin, %1 amphoterisin B] 37°C ve %5 CO2 kültür ortamına sahip inkübatörde bekletilerek normal pH'a (7,0 – 7,6) ulaşması sağlandı (Pires ve diğ., 2019). Sonrasında, sıvı azot tankından çıkarılan hücreler 37°C su banyosunda hafifçe çalkalanarak çözündürüldükten sonra 11,78 cm2 büyüme alanına sahip petri kabına ekildi. Petri kabının yüzeyine tutunan hücrelerin medyumu, haftada 2-3 kez değiştirildi. Invert mikroskop altında incelenerek %70-80 yoğunluğa ulaştığı tespit edilen hücreler pasajlandı. Pasajlama işlemi, hücrelerin 5 dk boyunca tripsin/EDTA ile inkübasyonu ile petri kabının yüzeyinden kaldırılması ile başlatıldı. Daha sonra hücrelerin üzerine kültür medyumu eklenerek sindirim reaksiyonu durduruldu ve 350 g'de 5 dk santrifüj yapıldı (Bode ve diğ., 2006). Supernatantın uzaklaştırılmasının ardından pelletin üzerine 1 ml kültür medyumu eklenerek hücreler resüspanse edildi.

3.1.1. Tripan Mavisi ile Canlılık Analizi

Hücrelerin pasaj işleminden sonra canlı olduğu bilinen hücrelerle deney kurulabilmesi için hücreler, tripan mavisi (1:1) ile boyanarak canlılık testi yapıldı. Bu teste göre, ölü hücrelerin tripan mavisi ile boyanması, canlı olan hücrelerin ise boyanmaması amaçlandı. Canlılık testinin sonucuna göre, hücre canlılığının %70'in üzerinde korunduğu tespit edildiğinde deney grupları oluşturuldu.

3.1.2. Preliminar Çalışma İçin Deney Gruplarının Oluşturulması

Sitotrofoblast hücre özelliği gösteren BeWo trofoblast hücreleri, sinsisyotrofoblast özellik kazanmaları için forskolin ile uyarıldı ve sinsisyum oluşumu indüklendi. Forskolin cAMP sinyal aktivitesini uyaran bir madde olması nedeniyle BeWo hücrelerinin füzyonunu incelemek için sıklıkla kullanılan bir ajandır (Drwal ve diğ., 2018). Sinsisyum oluşumu için gereken en uygun doz ve sürenin tespit edilmesi amacıyla preliminar bir deney yapıldı. 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilen 3 deney grubu oluşturuldu (tablo 3.3):

Tablo 3.3: Sinsisyum oluşumu için en uygun forkolin dozu ve süresinin tespit edilmesi amacıyla oluşturulan preliminar deney grupları

I	DMSO içeren medyumla inkübe edilen hücrelerden oluşan kontrol grubu
II	25 µM forskolin uygulanan grup
III	50 µM forskolin uygulanan grup

3.1.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Preliminar deney ile belirlenen doz ve sürede forskolin uygulanması sonrasında, BFA'nın trofoblast hücrelerine etkisinde çeşitli parametrelerin değerlendirilmesi amacıyla Western blot analizi için 6-kuyucuklu hücre kabı, immunofloresan analizi için 24-kuyucuklu hücre kabı ve hücre proliferasyon analizi için 96-kuyucuklu hücre kabı kullanılmak üzere, 48 ve 72 saat süreyle yapılacak olan deneylere göre farklı hücre kaplarına ekilen hücreler ile tablo 3.4'te belirtildiği gibi 6 adet deney grubu oluşturuldu.

Tablo 3.4: BeWo hücrelerine BFA'nın etkisinin araştırılması için oluşturulan deney grupları.

I	Kültür medyumu (DMEM/F12) ile inkübe edilen kontrol grubu
II	DMSO içeren medyumla inkübe edilen hücrelerden oluşan sham grubu

Tablo 3.4 (devam): BeWo hücrelerine BFA'nın etkisinin araştırılması için oluşturulan deney grupları.

III	0,003 µM BFA uygulanan grup
IV	3 µM BFA uygulanan grup
V	30 µM BFA uygulanan grup
VI	300 µM BFA uygulanan grup

3.2. Işık Mikroskobik Analizler

3.2.1. İmmunofloresan (IF) Analizi

Forskolin ile uyarılan BeWo hücrelerinin sinsisyum oluşumu, hücre membran belirteci olan e-kaderin proteininin immunofloresan yöntemi ile işaretlenerek değerlendirildi (Ishikawa ve diğ., 2014). Sinsisyum oluşumu için tablo 3.3'te belirtildiği gibi oluşturulan deney gruplarında en uygun olan forskolin dozu ve inkübasyonu süresi e-kaderin yoğunluğu ile tespit edildi. E-kaderin ile işaretlenen hücre membranının, en az üç çekirdeği çevreleyecek şekilde görüldüğü hücresel yapıların (sinsisyumların) tespit edilmesi sonucunda, plazma membran füzyonunun ve sinsisyum oluşumunun en etkin biçimde gerçekleştiği kabul edildi (Gerbaud ve diğ., 2015). Rastgele belirlenen 10 alanda sinsisyum oluşumu aşağıdaki formül ile analiz edildi:

Füzyon indeksi = Sinsisyumdaki nukleus sayısı / Total nukleus sayısı

BFA'nın trofoblast hücrelerine olan etkisinin hücre ölümü açısından araştırılması amacıyla başka bir IF deneyi gerçekleştirildi. Tablo 3.4'teki gibi oluşturulan deney gruplarındaki hücreler, aktif kaspaz 3 antikoru ile işaretlenerek Image J yazılımı ile semi-kantitatif olarak apoptoz değerlendirildi (S. Lee ve diğ., 2020).

Hücre kültürü laboratuvarında laminar kabin içinde 24-kuyucuklu hücre kabına yerleştirilen yuvarlak lameller üzerine ekilen ve forskolinle indüklerek sinsisyum oluşturulan hücrelere, tablo 3.4'te oluşturulan deney gruplarındaki gibi BFA uygulanmasından sonra deney bitiminde (48 ve 72 saat bitiminde) %4 paraformaldehit (PFA) ile oda sıcaklığında 20 dk fiksasyon işlemi uygulandı. Ardından, fosfat tamponlu tuz (PBS) ile kuyucuklar yıkandı ve hücre kültür laboratuvarından ışık mikroskopi laboratuvarına geçilerek IF yöntemi uygulandı. Uygulanan IF yöntemi için aşağıdaki adımlar izlendi:

1. PBS ile 3 kez 5'er dk yıkama yapılarak hücreler rehidrate edildi.
2. %0,2 Triton-X100/PBS solüsyonunda 15 dk bekletilerek hücrelerin geçirgenleştirilmesi sağlandı.
3. 2 kez 5' er dk PBS ile yıkama yapıldı.
4. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için bloklama solüsyonu ile 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.
5. Hücreler, sinsisyum değerlendirmesi için e-kaderin veya apoptoz değerlendirmesi için aktif kaspaz 3 primer antikor solüsyonunda 4ºC'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
6. Ertesi gün, 3 kez 5'er dk yıkama yapıldı.
7. E-kaderin ile işaretlenen hücreler için FITC-konjuge sekonder antikor kullanılarak, aktif kaspaz 3 ile işaretlenen hücreler için ise Alexa Fluor 568 sekonder antikor kullanılarak karanlıkta, oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapıldı.
8. 3 kez 5'er dk PBS ile yıkama yapıldı.
9. DAPI'li kapatma medyumu ile kapatıldı.
10. Hücreler fotomikroskopta 40X büyütmede incelendi ve rastgele seçilen 10 bölgenin fotoğrafları çekilerek Image J ile skorlandı.

3.2.2. İmmunoperoksidaz (ICC-P) Analizi

BFA'nın BeWo hücrelerindeki sinsisyum oluşumuna olan etkisinin araştırılması için e-kaderin proteininin immün işaretlenmesi yapıldı.

Hücre kültürü laboratuvarında laminar kabin içinde 24-kuyucuklu hücre kabına yerleştirilen yuvarlak lameller üzerine ekilen ve 48 saat 25 μM forskolinle indüklenerek sinsisyum oluşturulan hücrelere, tablo 3.4'te oluşturulan deney gruplarındaki gibi BFA uygulanmasından sonra deney bitiminde (48 ve 72 saat bitiminde) %4 paraformaldehit (PFA) ile oda sıcaklığında 20 dk fiksasyon işlemi uygulandı. Ardından, fosfat tamponlu tuz (PBS) ile kuyucuklar yıkandı ve hücre kültür laboratuvarından ışık mikroskopi laboratuvarına geçilerek ICC-P yöntemi uygulandı.

1. PBS ile 3 kez 5'er dk yıkama yapılarak hücreler rehidrate edildi.
2. %0,2 Triton-X100/PBS solüsyonunda 15 dk bekletilerek hücrelerin geçirgenleştirilmesi sağlandı.
3. 2 kez 5' er dk PBS ile yıkama yapıldı.
4. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için bloklama solüsyonu ile 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.
5. Hücreler, sinsisyum değerlendirmesi için e-kaderin primer antikor solüsyonunda 4ºC'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
6. Ertesi gün, 3 kez 5'er dk yıkama yapıldı.
7. Biyotinlenmiş sekonder antikor ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. 3 kez 5'er dk PBS ile yıkama yapıldı.
9. Streptavidin peroksidaz solüsyonunda 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
10. 3 kez 5'er dk PBS ile yıkama yapıldı.
11. Kromojen olarak kullanılan 3,3'Diaminobenzidine (DAB) ile uygun sürede inkübe edildi.
12. Zıt boyama yapılarak yükselen alkol serilerinden geçirildi ve kapatıldı.
13. Rastgele belirlenen 10 alanda sinsisyum değerlendirmesi aşağıdaki formül ile analiz edildi:

Füzyon indeksi = Sinsisyumdaki nukleus sayısı / Total nukleus sayısı

3.3. Biyokimyasal Analizler

3.3.1. CCK-8 (Cell Counting Kit 8 / Hücre Sayım Kiti 8) Analizi

Hücre Sayım Kiti 8 (CCK-8), hücre proliferasyonunu ve toksisitesini ölçmek için kullanılan, suda çözünen tetrazolyum tuzu WST-8'in hücrelerdeki dehidrojenazlar tarafından turuncu renkli bir ürün (formazan) verecek şekilde indirgenmesi prensibine dayalı olarak

çalışan kolorimetrik bir metottur. Oluşan turuncu renk (formazan) miktarı, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. CCK-8 analizinin, canlı hücre sayısının belirlenmesinde kullanılan diğer kolorimetrik testlere kıyasla daha hassas ve güvenli bir yöntem olduğu bilinmektedir (Cai ve diğ., 2019).

Çalışmamızda, forskolinle indüklerek sinsisyum oluşturulan BeWo hücrelerine BFA uygulamasının ardından (tablo 3.4'teki gibi) hücre canlılığı ve proliferasyonundaki meydana gelebilecek olan değişikliğin incelenmesi amacıyla, deney süreleri sonunda hücrelere CCK-8 analizi yapıldı. Böylece BFA'nın, BeWo hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonu üzerindeki etkisi araştırıldı.

CCK-8 analizi, satın alınan ticari kitin protokolü takip edilerek uygulandı. Bu protokole göre aşağıdaki adımlar izlendi (Abbkine; KTA1020):

1. 96-kuyucuklu hücre kabı kuyucuklarına 100 µL (5000 hücre/kuyucuk) hücre süspansiyonu eklendi.

2. Kontrol grubundaki hücrelere yalnızca hücre medyumu eklenirken, sham grubundaki hücrelere 10 µL DMSO ve deney gruplarındaki hücrelere uygun konsantrasyonda 10 µL BFA eklenerek deney kuruldu.

3. Hücre kabı, deney süresince (48 ve 72 saat) 37°C, %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi.

4. Ardından, her kuyucuğa 10 µL CCK-8 solüsyonu eklendi ve 37°C, %5 CO içeren inkübatörde 2 saat boyunca inkübe edildi.

5. Örneklerin absorbans değerleri, 450 nm dalga boyundaki mikroplate okuyucuda (Allsheng AMR-100 Microplate reader AS-16050-00) ölçüldü.

6. Hücre canlılık yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak değerlendirildi (Tang ve diğ., 2018):

Hücre canlılığı (%) = (Deney grubunun absorbans değeri / Kontrol grubunun absorbans değeri) x 100

3.3.2. ELISA (Enzim-Bağlı İmmünosorbent Analiz) Analizi

Sinsisyotrofoblast plasentada gazların, atıkların ve besinlerin maternal ve fetal dokular ile alışverişinin yapıldığı alan olarak tanımlanmasının yanı sıra, plasentaya endokrin özellik kazandıran bir yapıdır. Bu özelliği dolayısıyla gebelik sürecinde önemli olan östrojen, progestron, insan plasental laktojen (hPL) hormonu ve insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu gibi hormonların sekresyonunu sağlayarak gebeliğin devamını sağlar. hCG, implantasyondan sonra gebeliğin tanımlanması için maternal kanda tespit edilebilen ilk belirteçtir. Trofoblast farklılaşması ve sinsisyotrofoblastın endokrin özellik kazanması hCG sekresyonunun analizi ile değerlendirilebilmektedir (Fournier, 2016; Narciso ve diğ., 2019; Paulesu ve diğ., 2018). *In vitro* olarak yapılan çalışmalarda ise BeWo hücrelerinde sinsisyum oluşumundan sonra hCG ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (Dubey ve diğ., 2018; Mannelli ve diğ., 2015).

Bu çalışmada, forskolinle indüklenerek sinsisyum oluşturulan BeWo hücrelerine, BFA uygulanmasının (tablo 3.4'teki gibi) ardından hücrelerin inkübe edildikleri kültür medyumuna saldıkları hCG hormon seviyelerinin incelenmesi amacıyla deney süreleri (48 ve 72 saat) sonunda toplanan kültür medyumlarına ELISA analizi yapıldı. Bu sayede, BFA uygulanan BeWo hücrelerinin hormon üretim ve salgılama kapasitesi açısından fonksiyonu değerlendirildi (Dubey ve diğ., 2018).

ELISA analizi, satın alınan ticari kitin protokolü takip edilerek yapıldı. Bu protokole göre aşağıdaki adımlar izlendi (Elabscience; E-EL-H0175):

1. Deney sonlandırıldığında hücre kültür medyumları toplandı ve 4°C, 1000 g'de 20 dk santrifüjlenerek supernatant uzaklaştırıldı.

2. Standart dilüsyonlar; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 0 mIU/mL olarak hazırlandı.

3. hCG kaplı 96-kuyucuklu hücre kabının daha önceden etiketlenen kuyucuklarına standartlar ve örnekler duplike olacak şekilde her kuyucuğa 100 µL kadar eklendi ve 37°C'de 90 dk inkübe edildi.

4. Ardından kuyucuklardaki sıvılar uzaklaştırıldı ve 100 µL biotin işaretli antikor solüsyonu her kuyucuğa eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

5. İnkübasyon sonrasında, kuyucuklardaki örnekler yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
6. Daha sonra 100 µL HRP konjuge solüsyon her kuyucuğa eklendi ve 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki örnekler yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
8. Her kuyucuğa 90 µL substrat solüsyonu eklendi ve hücre kabı karanlık ortamda, 37°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
9. Sonrasında, kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
10. Örneklerin absorbans değerleri, 450 nm dalga boyundaki mikroplate okuyucuda (Allsheng AMR-100 Microplate reader AS-16050-00) ölçüldü.

3.4. Western Blot Analizi

ER'de yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesi ile homeostazın bozulması sonucunda ER stresi meydana gelir. ER, bu stresle başa çıkmak için UPR mekanizmasını devreye sokarak, ER homeostazını ve protein katlama kapasitesini düzenleyerek hücreyi kurtarmaya çalışır. Bu sebeple bu çalışmada, forskolinle indüklerek sinsisyum oluşturulan BeWo hücrelerine BFA'nın farklı konsantrasyon ve sürelerdeki olası ER stresi kaynaklı etki mekanizmasını moleküler seviyede araştırmak amaçlandı.

Hücre kültürü aşamasında, BeWo hücrelerine 300 µM BFA uygulamasıyla hücrelerin ölmesi sonucunda hücre sayısında azalma görülmüştür. Canlı hücre sayısındaki azalma nedeniyle Western blot yönteminde ölçülebilecek düzeyde protein elde edilemediği için 300 µM BFA uygulanan deney grubu bu yöntemin uygulanmasına dahil edilmemiştir.

BFA'nın trofoblast hücreleri üzerinde oluşturduğu etkilerde ER stresi (UPR) mekanizmasının rolünün araştırılması ve bu etkide aktif rol oynayan UPR sinyal yolağının/yolaklarının tespit edilmesi amacıyla GRP78, p-PERK, p-IRE1 ve ATF6 protein seviyeleri Western blot analizi ile saptandı. Bunun için, hücre kültürü laboratuvarında forskolinle indüklerek sinsisyum oluşturulan BeWo hücrelerine farklı doz ve sürelerde (tablo 3.4'teki gibi) BFA uygulanarak 48 ve 72 saatlik deney süreleri sonunda, Western blot analizi için 6-kuyucuklu hücre kaplarına ekilen hücrelerin medyumları uzaklaştırıldı ve kuyucuklar hızlıca soğuk PBS ile yıkandı, ardından PBS de uzaklaştırıldı. Daha sonra, hızlıca kuru buz

üzerinde -80°C buzdolabına taşındı. Western blot analizi yapılan güne kadar burada saklandı. Western blot analizi için aşağıdaki adımlar takip edildi (Guzel ve diğ., 2011):

1. Western blot analizi yapılacağında hücreler +4°C buzun üzerinden kaldırılmadan sample buffer eklenerek kuyucuklardan kazındı ve oluşan hücre lizatı ependorflara aktarıldı.

2. Örnekler homojenizatör aracılığıyla homojenize edildi.

3. Homojenizasyon aşamasından sonra 95-98°C metal kuyucuklu alet içerinde proteinlerin denatürasyonu sağlandı.

4. Daha sonra 5000 rpm'de 5 dk süre ile santrifüjlenen örnekler, protein ladder ile birlikte jele yüklendi.

5. Elektroforez sonrasında jelde yürütülen proteinler, nitroselüloz membrana aktarıldı.

6. %0,1 Tween-20 içeren Tris tamponlu tuz (T-TBS) ile yapılan yıkamalardan sonra spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için %5 yağsız süt tozu ile bloklama yapıldı.

7. Daha sonra membranlar, primer antikor (GRP78 (1:500), p-IRE1 (1:1000), p-PERK (1:1000) ve ATF6 (1:500)) ile gece boyu 4°C'de inkübasyona bırakıldı.

8. Ertesi gün T-TBS ile yapılan yıkamalardan sonra sekonder antikor (ve ß-aktin antikoru) ile oda sıcaklığında karanlık ortamda 1,5 saat inkübe edildi.

9. Ardından T-TBS ile yıkama yapılıp immünoreaktif protein bantlarının görüntülenebilmesi için membranlara kemilüminesan substrat çözeltisi uygulanarak oluşan bant yoğunlukları görüntülendi.

10. Protein bantların yoğunlukları Adobe Photoshop CS6 programı ile değerlendirildi.

3.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, IBM Statistics SPSS Version 26 (ışık mikroskobik ve biyokimyasal analizler) ve Sigma Plot 12.0 (Western blot) programları kullanılarak yapıldı. Deney sonuçlarından elde edilen verilere ilk olarak normalite testi uygulandı. Normal dağılım

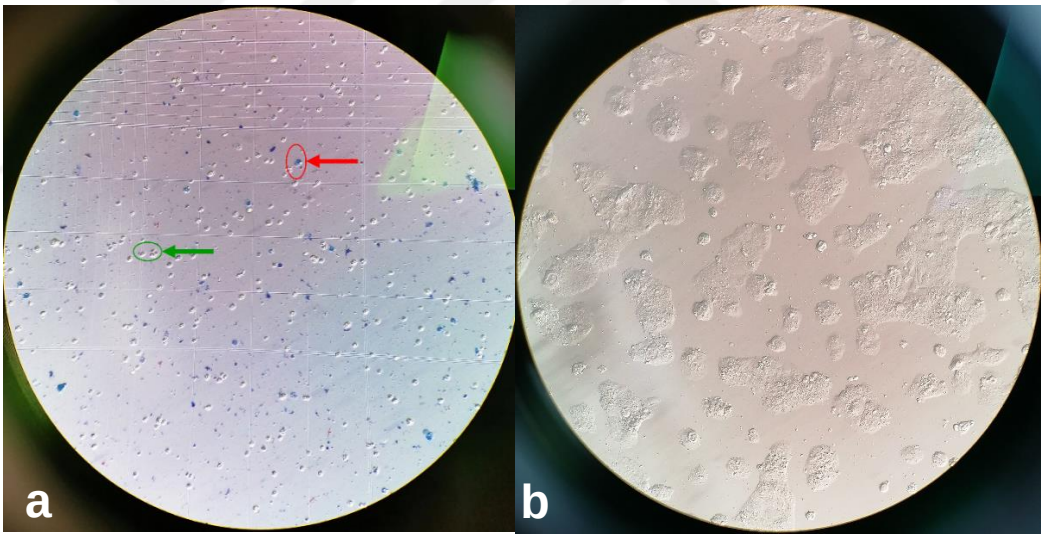
olduğu taktirde homojenite dağılımı incelendi. Normal dağılımı olan ve homojenite gösteren çoklu grup analizleri için parametrik Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) ve post hoc Tukey Testi; normal dağılımı olmayan veya homojenite göstermeyen çoklu grupların değerlendirilmesi için parametrik olmayan Kruskal Wallis Testi uygulandı. Elde edilen tanımsal istatistikler, ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. $p<0,05$ olan sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü

4.1.1. Tripan Mavisi ile Canlılık Analizi

Yapılacak olan tüm deneyler için yeterli miktarda sağlıklı hücre elde edilmesi amacıyla BeWo hücreleri temin edilip büyütüldükten sonra uygun koşullar altında sağlıklı bir şekilde çoğaltılması için pasajlama işlemi yapıldı. Pasaj işlemi sırasında, hücrelerin canlılıkları tripan mavisi ile analiz edildi. Bu analize göre, tripan mavisi ile boyanan hücrelerin ölü olduğu; boyanmayan hücrelerin ise canlı hücreler olduğu kabul edildi. Elde edilen bulgulara göre, canlılığın %70'in üzerinde korunduğu tespit edildi (Şekil 4.1a). Bu doğrultuda, canlı olduğu ispatlanan hücrelerin büyütülüp çoğaltılmasına devam edildi (Şekil 4.1b).



Şekil 4.1: Tripan mavisi ile yapılan canlılık analizi (kırmızı ok: ölü hücre, yeşil ok: canlı hücre), 10X (a). BeWo hücre morfolojisi, 10X (b).

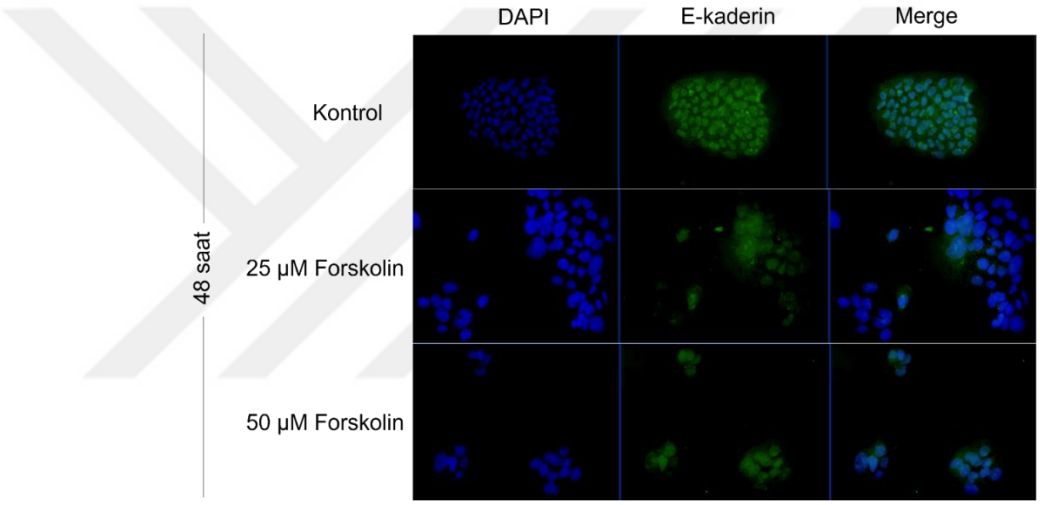
4.2. Işık Mikroskopi Bulguları

4.2.1. E-kaderin İmmün İşaretlemesi ile Hücre Farklılaşmasının Tayini

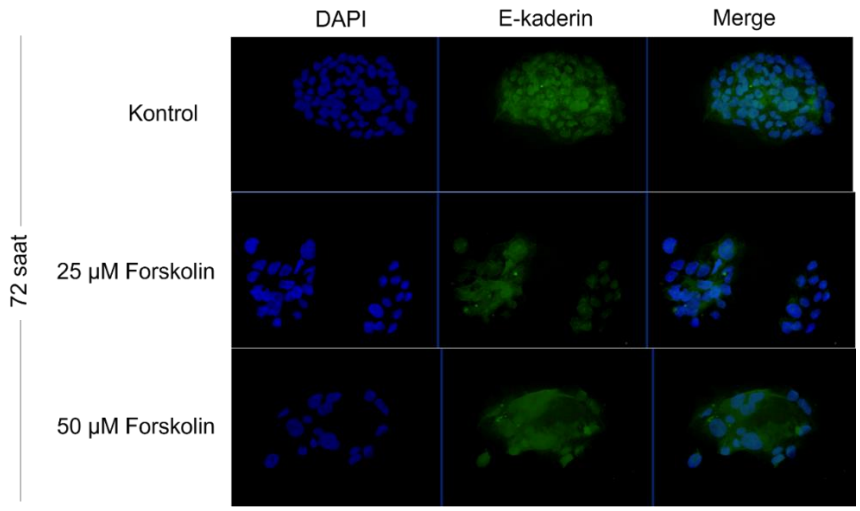
Bewo trofoblast hücrelerinin sinsisyum oluşturması forskolin ile indüklendi. Hücrelerin farklılaşarak sinsisyum oluşturduğunun gösterilmesi için hücre membran proteini olan e-kaderin proteini belirteç olarak kullanıldı. E-kaderin işaretli membran ile sınırlanan en az 3 çekirdekten oluşan multinüklear yapılar sinsisyum olarak kabul edildi. Her preparatta rastgele

belirlenen 10 alanda sinsisyumu oluşturan hücre sayısı, toplam hücre sayısına oranlanarak füzyon indeksi hesaplandı (Wei ve diğ., 2012). Füzyon indeksi değerlendirilerek en uygun forskolin dozu ve süresine karar verildi.

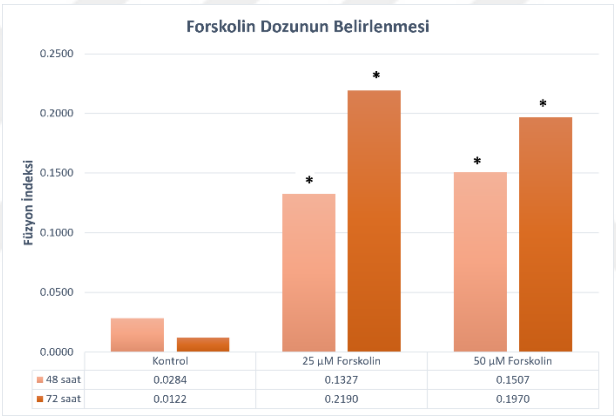
Hücrelerdeki e-kaderin proteinin immunofloresan işaretlemesi sonucunda, şekil 4.2 ve şekil 4.3'te görülebileceği gibi, yalnız DMSO verilen kontrol grubu ile kıyaslandığında her iki deney grubuna ait füzyon indeksi değerlerinde anlamlı bir artış olduğu görüldü. Ancak, 25 µM ve 50 µM forskolin dozu arasında anlamlı farklılık olmadığı belirlendi (p>0,8). Bununla birlikte, hücrelerin forskolin ile 48 ve 72 saat inkübasyonu arasında da anlamlı farklılık görülmedi (p=0,08) (Şekil 4.4).



Şekil 4.2: 48 saat farklı dozlarda forskoline maruz bırakılmış BeWo hücrelerinin e-kaderin ekspresyonları, 40X.



Şekil 4.3: 48 saat farklı dozlarda forskoline maruz bırakılmış BeWo hücrelerinin e-kaderin ekspresyonları, 40X.



Şekil 4.4: E-kaderin ekspresyonunun değerlendirilmesi sonucunda oluşturulan füzyon indeksi grafiği.

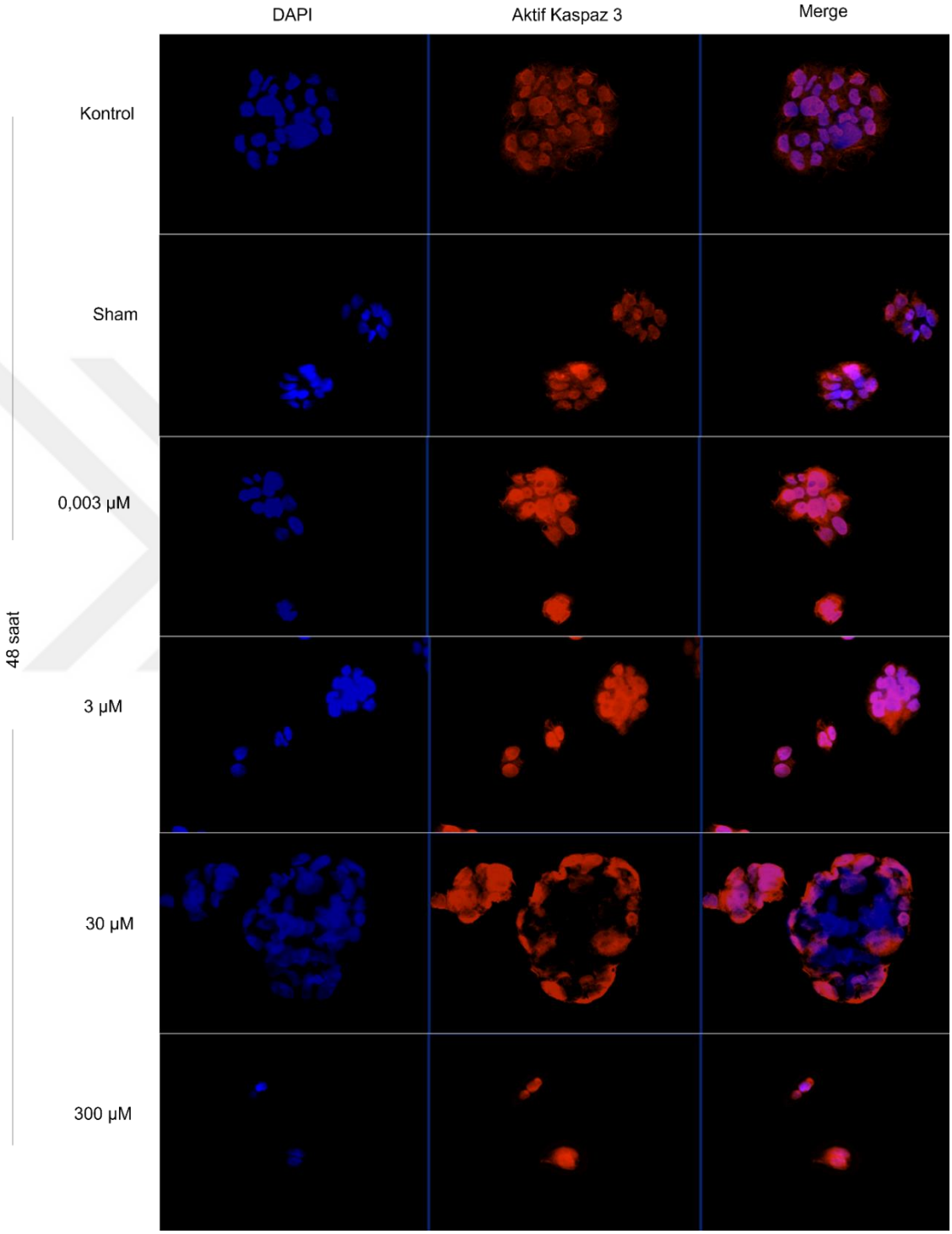
*p<0,05: kontrol grubuna kıyasla; #p<0,05: kontrol grubuna kıyasla; Gruplardaki değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

4.2.2. Aktif Kaspaz 3 İmmün İşaretlemesi ile Apoptotik Hücrelerin Analizi

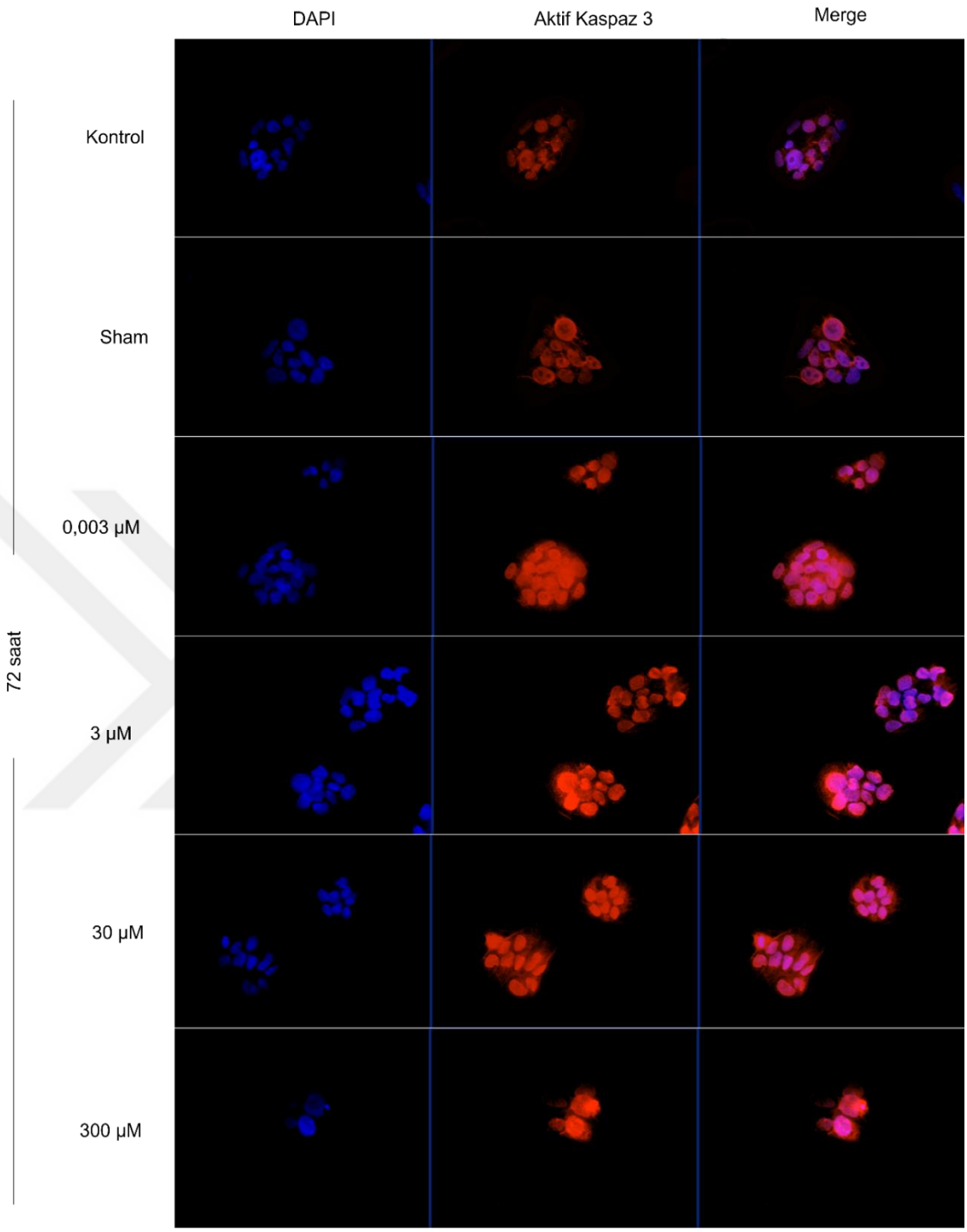
Aktif kaspaz 3 proteininin, hücredeki ekspresyon seviyesindeki artışın hücre apoptozu ile doğru orantılı olarak arttığı bilinmektedir. Çalışmamızda, aktif kaspaz 3 işaretlemesi ile BFA'nın BeWo hücrelerinin apoptozu üzerine olan etkisi incelendi.

Bu yöntemle elde edilen bulgulara göre, 48 saat BFA'ya maruz kalan BeWo hücrelerinde kontrol ve sham gruplarına kıyasla 0,003 μM, 3 μM ve 300 μM BFA maruziyeti ile aktif kaspaz 3 ekspresyonunun arttığı görüldü (p<0,05) (Şekil 4.5,7). Diğer taraftan, 72 saat BFA'ya maruz kalan BeWo hücrelerinde ise kontrol ve sham gruplarına kıyasla 0,003 μM, 30

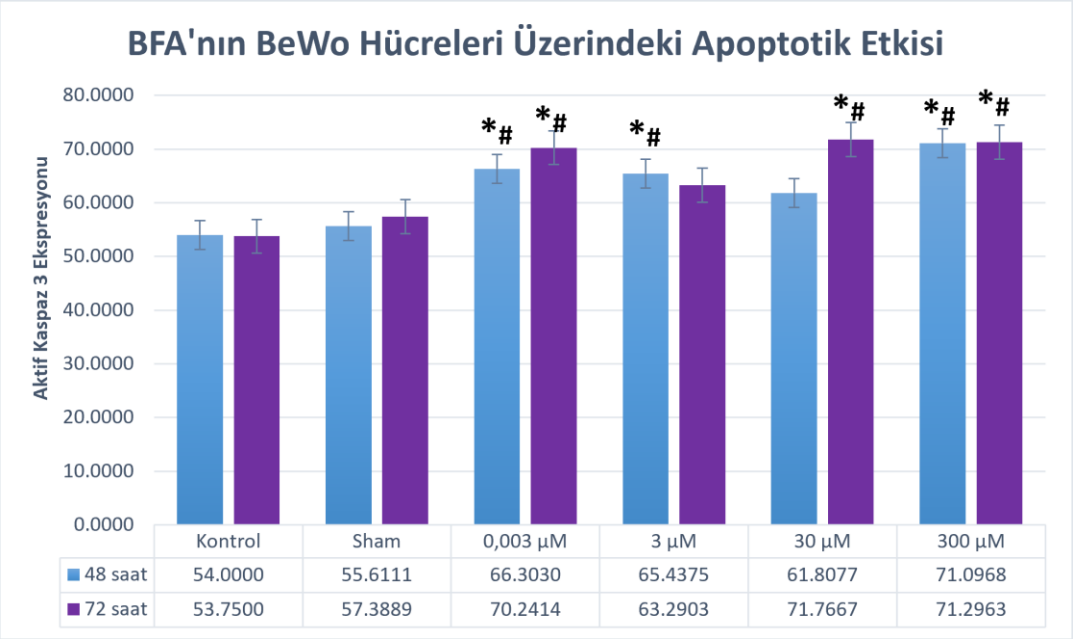
µM ve 300 µM BFA maruziyeti ile aktif kaspaz 3 ekspresyonunun arttığı görüldü (p<0,05) (Şekil 4.6,7).



Şekil 4.5: 48 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerindeki aktif kaspaz 3 ekspresyonu, 40X.



Şekil 4.6: 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerindeki aktif kaspaz 3 ekspresyonu, 40X.



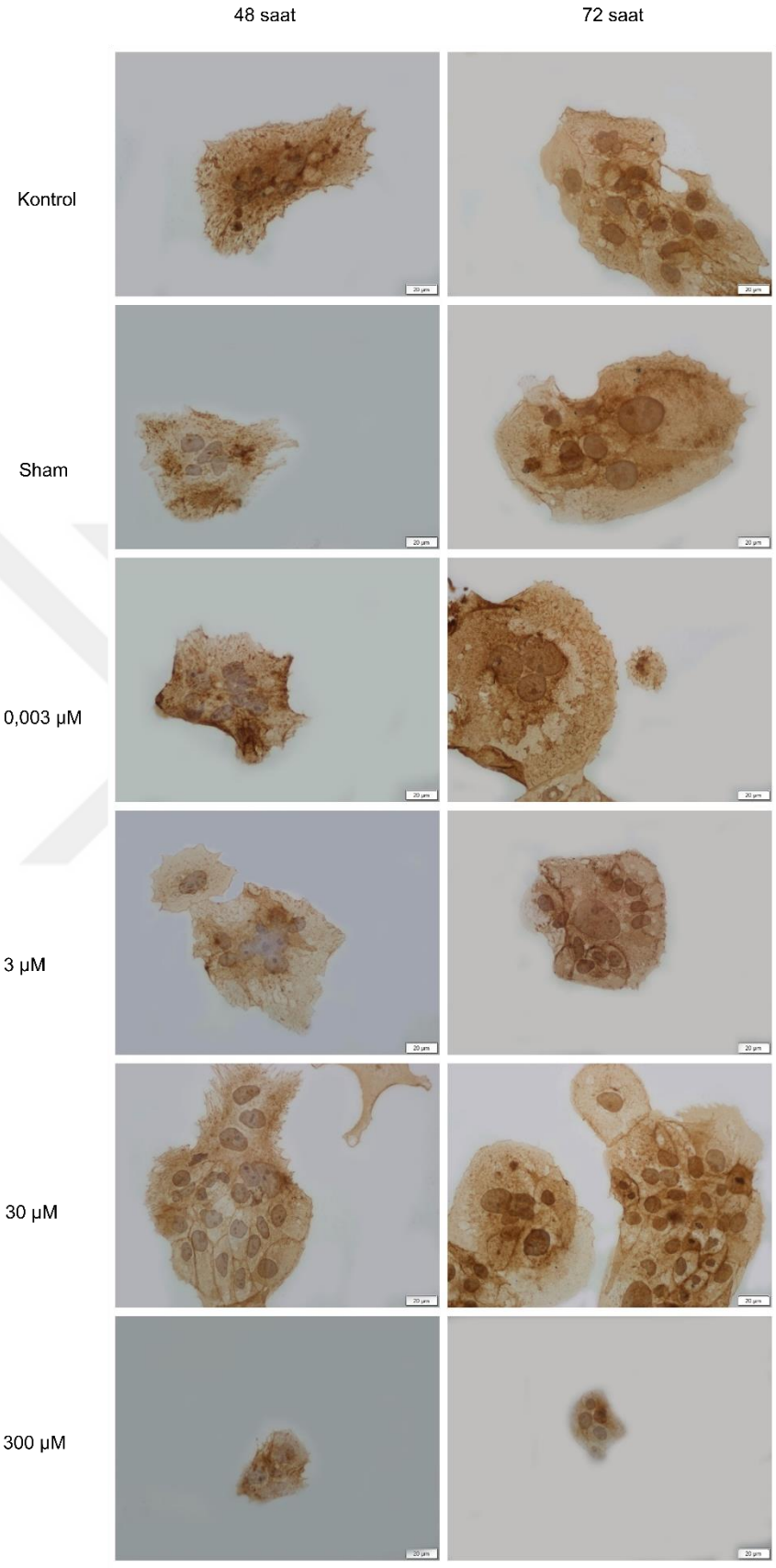
Şekil 4.7: 48 ve 72 saat uygulanan BFA'nın BeWo hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini gösteren grafik.

*p<0,05: kontrol grubuna kıyasla; #p<0,05: sham grubuna kıyasla; Gruplardaki değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

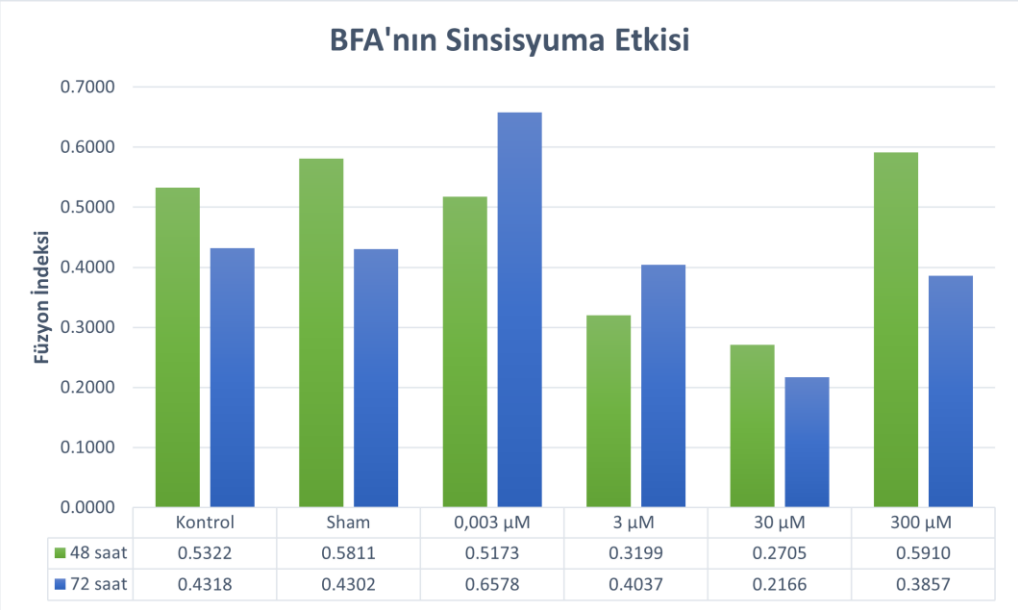
4.2.3. E-kaderin İmmün İşaretlemesi ile BFA'nın Sinsisyuma Etkisinin Değerlendirilmesi

Bewo trofoblast hücrelerinin sinsisyum oluşturması 48 saat 25 µM forskolin ile indüklendi. Ardından, BFA'nın BeWo hücrelerinde oluşan sinsisyum üzerindeki etkisinin incelenmesi için hücrelere belirlenen doz ve sürelerde BFA uygulandı. Hücrelerin farklılaşarak sinsisyum oluşturduğunun gösterilmesi için hücre membran proteini olan e-kaderin proteini belirteç olarak kullanıldı. E-kaderin işaretli membran ile sınırlanan en az 3 çekirdekten oluşan multinüklear yapılar sinsisyum olarak kabul edildi. Her preparatta rastgele belirlenen 10 alanda sinsisyumu oluşturan hücre sayısı, toplam hücre sayısına oranlanarak füzyon indeksi hesaplandı (Wei ve diğ., 2012). Füzyon indeksi değerlendirilerek BFA'nın sinsisyumlar üzerindeki etkisi analiz edildi.

Bu yöntemle elde edilen bulgulara göre, 48 ve 72 saat BFA'ya maruz kalan BeWo hücrelerinde kontrol ve sham gruplarına kıyasla 0,003 µM, 3 µM, 30 µM ve 300 µM BFA maruziyeti sonucunda forskolin indüklenmesi ile oluşan sinsisyum miktarı açısından anlamlı değişiklik olmadığı görüldü (Şekil 4.8,9).



Şekil 4.8: 48 ve 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücreleri, 40X.



Şekil 4.9: 48 ve 72 saat boyunca BFA'ya maruz kalan BeWo hücrelerindeki füzyon indeksi sonucunda oluşan grafik.

*p<0,05: kontrol grubuna kıyasla; #p<0,05: sham grubuna kıyasla; Gruplardaki değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

4.3. Biyokimyasal Bulgular

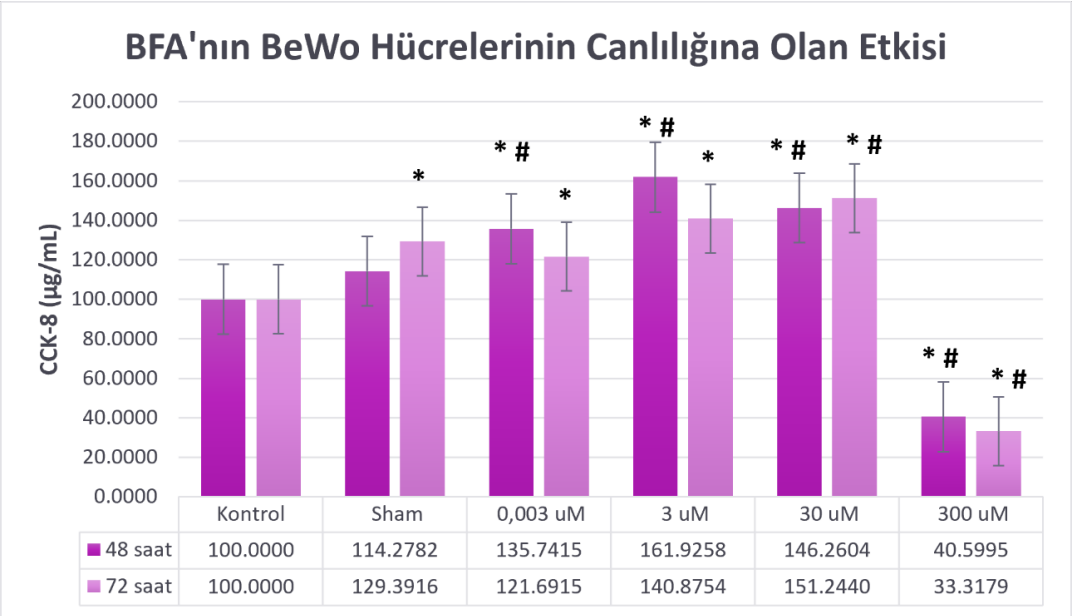
4.3.1. CCK-8 ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmalar sonucunda, farklı dozlarda ve farklı sürelerde uygulanan BFA'nın, hücrelerin canlılığı ve proliferasyonu üzerine olan etkileri farklı hücre tipleri üzerinde değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, BFA'nın trofoblast hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonuna olan etkisi, farklı doz ve sürelerde BFA'ya maruz kalan BeWo hücrelerinde CCK-8 ile kantitatif olarak değerlendirildi.

Yapılan analiz sonucunda kontrol ve sham grubuna kıyasla, 48 saat boyunca 0,003 µM, 3 µM ve 30 µM BFA maruziyetinin hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görülürken; 300 µM BFA'nın hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirlendi ($p<0,001$). Ayrıca, hücre canlılığının 72 saat süreyle sham, 0,003 µM, 3 µM ve 30 µM BFA maruziyetinin olduğu gruplarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı ve 300 µM BFA'ya maruz kalan hücrelerde ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p<0,05$ ve $p<0,001$). Buna ilaveten, hücre canlılığı sham grubu ile

kıyaslandığında 72 saatte, kontrol ve 300 µM BFA ile azalırken, 30 µM BFA uygulanan deney grubunda anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0,001$).

BFA'nın zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine olan etkisi incelendiğinde, 48 ve 72 saat maruziyetin hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görüldü ($p=0,241$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: 48 ve 72 saat boyunca uygulanan BFA'nın BeWo hücrelerinin canlılık ve proliferasyonuna olan etkisini gösteren grafik.

*$p<0,001$: kontrol grubuna kıyasla; #$p<0,001$: sham grubuna kıyasla; Gruplardaki değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

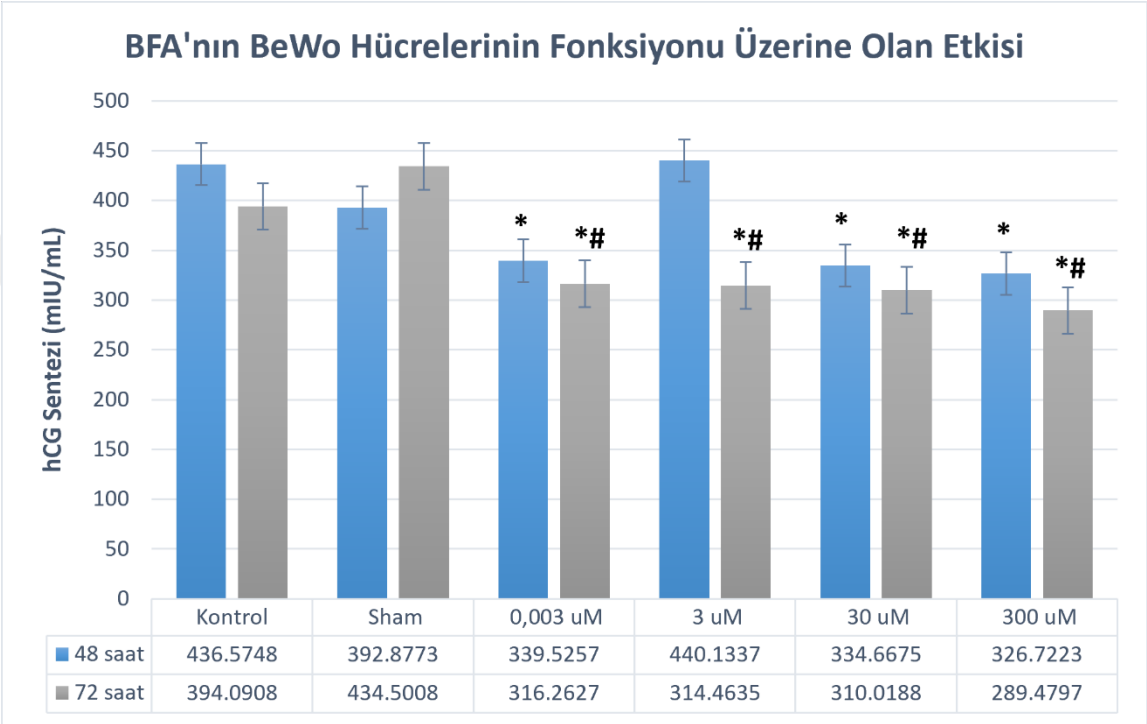
4.3.2. ELISA (Enzim-Bağlı İmmünosorbent Analiz) Yöntemi ile hCG Seviyesinin Değerlendirilmesi

BFA'nın farklılaşan trofoblast hücrelerindeki hormon sentezi üzerindeki etkisi, hCG hormonunun düzeyinin ölçülmesi ile değerlendirilebilmektedir. Çalışmamızda, farklı doz ve sürelerde BFA'ya maruz kalan BeWo hücrelerinin fonksiyonunu değerlendirmek amacıyla BeWo hücrelerinin hCG hormonunu sentezleme düzeyleri incelendi.

Yapılan analiz sonucunda kontrol grubuna kıyasla, 48 saat boyunca 0,003 µM, 30 µM ve 300 µM BFA'ya maruz kalan hücrelerin hCG hormon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülürken ($p<0,05$) sham grubuna kıyasla herhangi bir anlamlı değişiklik olmadı. Buna ilaveten, kontrol ve sham grubuna kıyasla 72 saat süreyle 0,003 µM, 3 µM, 30 µM ve 300

µM BFA'ya maruz kalan hücrelerin hormon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p<0,05$) (Şekil 4.11).

BFA'ya maruziyetinin zamana bağlı olarak hCG seviyesi üzerine olan etkisi incelendiğinde 72 saat maruziyet sonucunda trofoblast hücrelerindeki hCG hormonu seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0.05$) (Şekil 4.11).



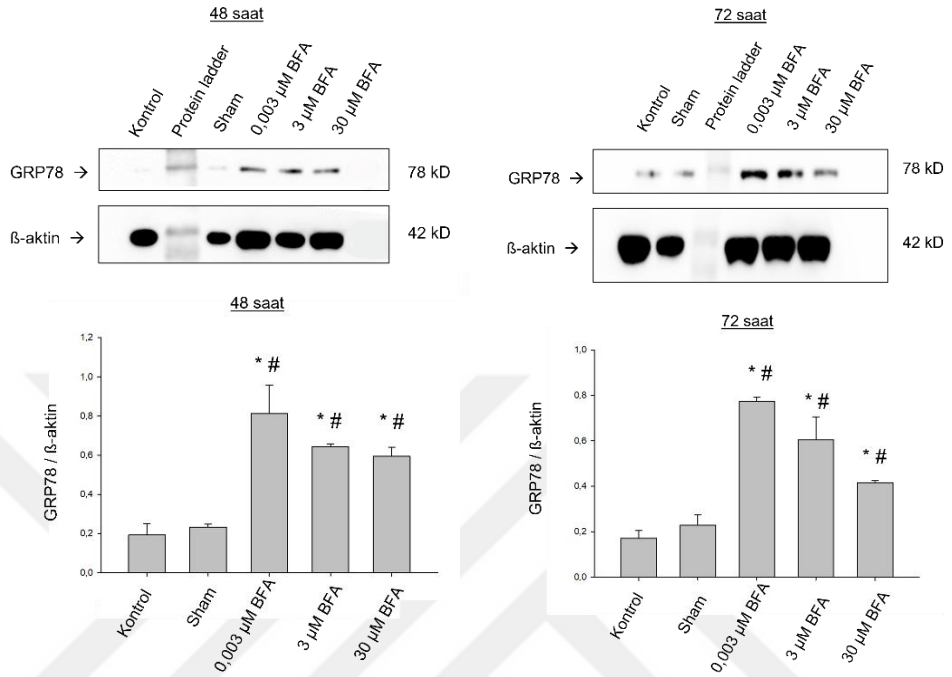
Şekil 4.11: 48 ve 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerinin hCG hormon sentezleme fonksiyonu üzerindeki etkisini gösteren grafik.

*$p<0,05$: kontrol grubuna kıyasla; #$p<0,001$: sham grubuna kıyasla; Gruplardaki değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

4.4. Western Blot Bulguları

BFA'nın trofoblast hücreleri üzerinde oluşturduğu değişikliklerde, ER stresinin etkisinin olup olmadığının araştırılması için UPR mekanizmasının yürütülmesinde aktif rol alan sinyal yolağının/yolaklarının tespit edilmesi amacıyla GRP78, p-PERK, p-IRE1 ve ATF6 protein seviyeleri Western blot analizi ile saptandı. Bu doğrultuda çalışmamızda, BFA'nın BeWo hücreleri üzerinde oluşturduğu etki ile ER stresi mekanizmasının moleküler seviyede tespit edilmesi amaçlandı. Bulgular, birbirinden bağımsız olarak yapılan 3 farklı deney sonucunda elde edildi.

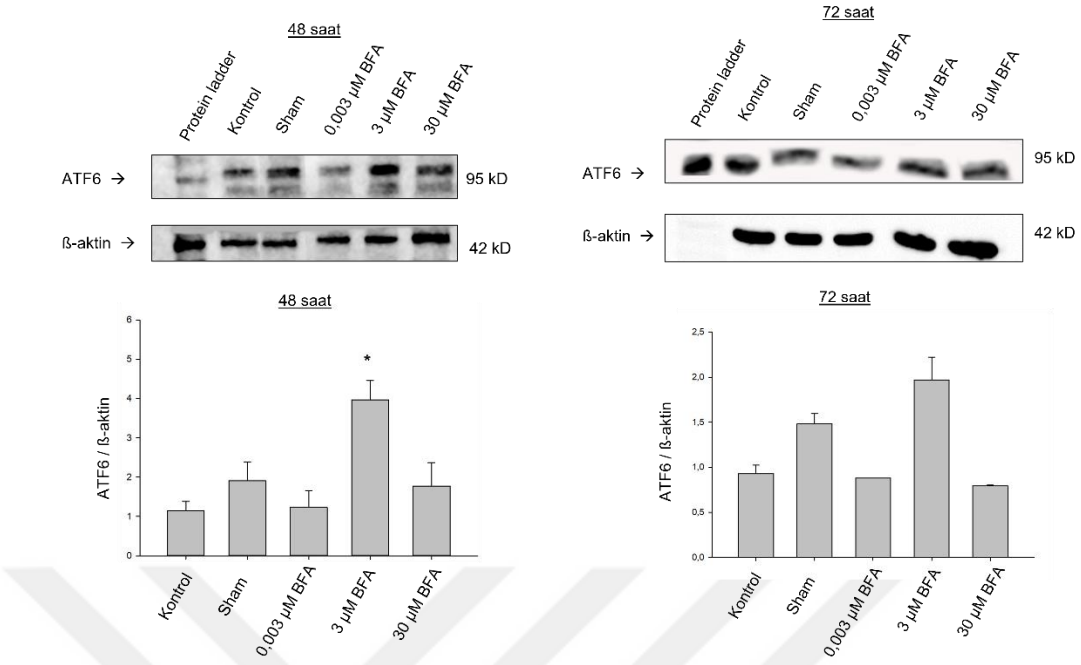
Yapılan analiz sonucunda, 48 ve 72 saat 0,003 µM, 3 µM ve 30 µM BFA'ya maruz bıraklıan BeWo hücrelerinde GRP78 proteininin seviyesinde, kontrol ve sham gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p<0,05$) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: 48 ve 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerindeki GRP78 proteininin seviyesi.

Görseller birbirinden bağımsız olan 3 farklı deneyi temsil etmektedir. *$p<0,05$: kontrol grubuna kıyasla; #$p<0,05$: sham grubuna kıyasla; Gruplardaki değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

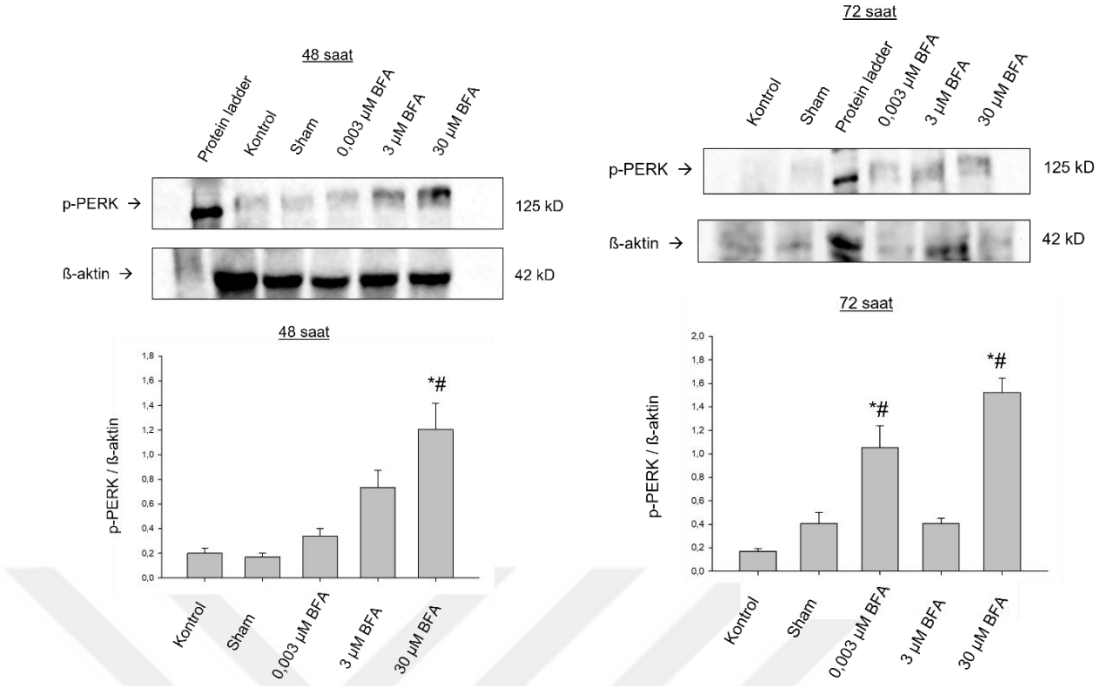
BeWo hücrelerinde BFA kaynaklı ER stresinin tespit edilmesinden sonra, bu mekanizmanın kullandığı UPR sinyal yolağının belirlenmesi amacıyla ATF6 proteininin seviyesi analiz edildi. Elde ettiğimiz bulgular sonucunda, 48 saat sonucunda 3 µM BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p<0,05$) (Şekil 4.13). BeWo hücrelerine 72 saat BFA uygulamasıyla ATF6 proteininin seviyesinde anlamlı bir değişiklik bulunamadı. Ancak, istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, 72 saat BFA uygulamasıyla da 3 µM BFA uygulanan hücrelerde, ATF6 proteininin seviyesindeki artış dikkat çekti (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: 48 ve 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerindeki ATF6 proteininin seviyesi.

Görseller birbirinden bağımsız olan 3 farklı deneyi temsil etmektedir. *p<0,05: kontrol grubuna kıyasla; Gruplardaki değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

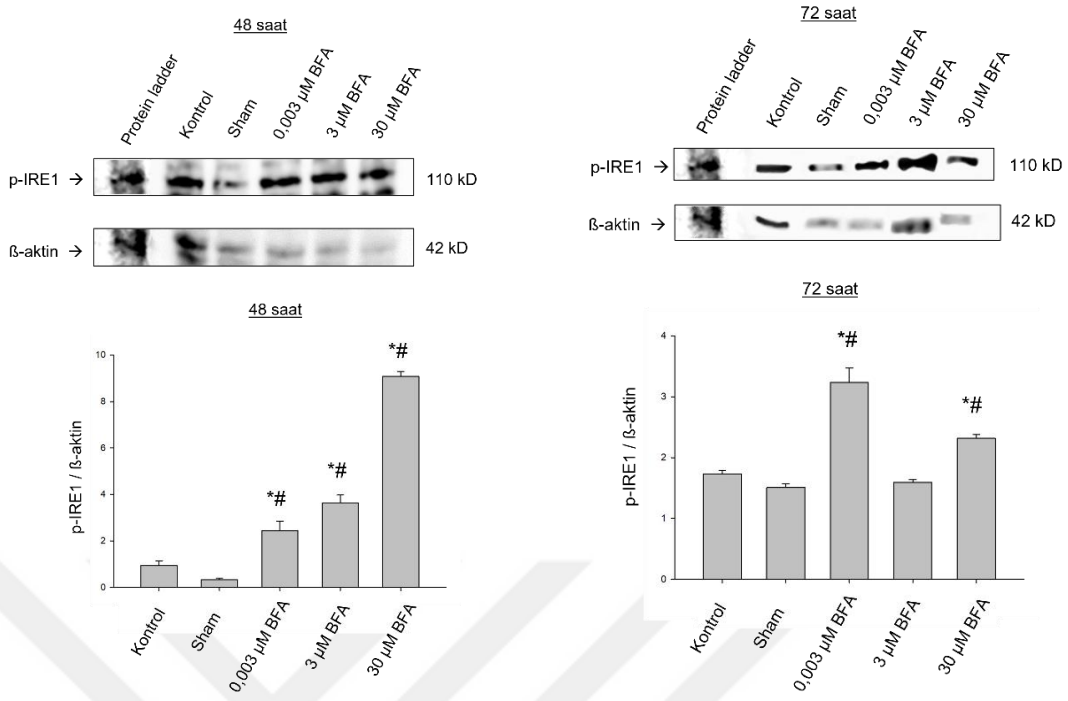
BeWo hücrelerine uygulanan BFA'nın, etki mekanizmasında aktifleşebileceğini düşündüğümüz diğer bir protein olan PERK proteinin miktarı analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda, 48 saat 30 µM BFA'ya maruz kalan BeWo hücrelerinde kontrol ve sham gruplarına göre p-PERK proteininin seviyesinde anlamlı bir artma belirlendi (p<0,05) (Şekil 4.14). 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerinde ise 0,003 µM BFA ve 30 µM BFA uygulanması sonucunda p-PERK proteininin seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü (p<0,05) (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: 48 ve 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerindeki p-PERK proteininin seviyesi.

Görseller birbirinden bağımsız olan 3 farklı deneyi temsil etmektedir. *p<0,05: kontrol grubuna kıyasla; #p<0,05: sham grubuna kıyasla; Gruplardaki değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Son olarak, BFA'nın BeWo hücrelerinde oluşturduğu hasardaki rolünün tespit edilmesi için diğer bir UPR sinyal yolağı olan IRE1 proteininin seviyesindeki değişiklik analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda, 48 saat 0,003 µM, 3 µM ve 30 µM BFA'ya maruz bıraklıan BeWo hücrelerinde p-IRE1 proteininde anlamlı bir artma görüldü (p<0,05) (Şekil 4.15). 72 saat 0,003 µM ve 30 µM BFA'ya maruz kalan hücrelerde de anlamlı bir artış saptandı (p<0,05) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: 48 ve 72 saat BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerindeki p-IRE1 proteininin seviyesi.

Görseller birbirinden bağımsız olan 3 farklı deneyi temsil etmektedir. *p<0,05: kontrol grubuna kıyasla; #p<0,05: sham grubuna kıyasla; Gruplardaki değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Endojen hormonları taklit etmesi veya bu hormonların hücredeki reseptörüne bağlanmasını engellemesinden dolayı endokrin bozucu kimyasallar sınıfına dahil edilen bisfenol A (BFA), termal kâğıt, polikarbonat ve epoksi reçine gibi plastiklerin üretiminde sıklıkla kullanılan kimyasal bir maddedir. İnsanların birçok yolla vücuda alabileceği bilinen BFA'nın, çeşitli hücre ve organ sistemleri üzerinde oksidatif strese, mitokondriyal hasara, DNA hasarına, kansere, apoptoza, diyabete, üreme toksisitesine, nöroinflamasyona ve çeşitli epigenetik değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple, birçok hastalığın patolojik mekanizmasında BFA'nın rol aldığı bilinmektedir. Bu bağlamda, BFA'nın dişi üreme sistemi ve fetal gelişim üzerindeki etkileri de birçok çalışma ile aydınlatılmıştır (Michałowicz, 2014; Rubin, 2011; Tarafdar ve diğ., 2022).

BFA'nın plasentaya ait hücreler olan trofoblastlar üzerindeki etkisinde endoplazmik retikulum (ER) stresinin rolünü ortaya koymak amacıyla yapılan bu çalışmada, BFA'nın farklı dozlarda ve sürelerde BeWo trofoblast hücrelerine uygulanması sonucunda, ER stresi belirteçleri olan UPR sinyal proteinlerinin (GRP78, p-IRE1, p-PERK ve ATF6) seviyelerinin moleküler düzeyde tayin edilerek değerlendirilmesi planlanmıştır. Ayrıca, BFA'nın trofoblast hücrelerine olan etkisinin hücrelerin canlılıkları, farklılaşma ve sekresyon kapasiteleri açısından incelenmesi ve bu parametrelerden elde edilecek bulguların, ER stresi verileriyle karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Projemizde; *in vitro* olarak, BFA'nın trofoblast hücrelerinde sebep olduğu hasarda ER stresinin rolü, bu etkide rol oynayan UPR sinyal proteinlerinin ekspresyonunun araştırılması ile belirlenmiştir. Böylece, ER stresinin gebelik döneminde BFA kaynaklı plasenta hasarına sebep olan yolaklardan biri olabileceğinin ortaya koyulabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla, bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için; BeWo hücreleri temin edildi ve hücre kültürü laboratuvarında steril koşullar altında çoğaltıldı. Tripan mavisi ile hücrelerin canlılığı test edildi. Uygun düzeyde (%70) canlı hücre sayısına ulaştıktan sonra deney grupları oluşturuldu. Ardından, BeWo hücrelerinin farklılaşma kapasitesinin değerlendirilmesini ve sinsisyum oluşumunu sağlamak için farklı doz ve sürelerde forskolin ile ön deney gerçekleştirildi. Forskolin etkinliğinin değerlendirilmesi için immunofloresan (IF) yöntemi ile hücre membran belirteci olan e-kaderin proteini işaretlendi.

Çalışmamız için en uygun forskolin dozu ve süresine karar verildikten sonra, farklı dozlarda (0,003 μM, 3 μM, 30 μM ve 300 μM) uygulanan BFA'nın, sinsisyum oluşturan BeWo hücrelerinin apoptozuna olan etkisi, apoptoz belirteci olan aktif kaspaz 3 antikoru kullanılarak IF yöntemi ile incelendi. Sinsisyum oluşturan BeWo hücrelerinin, farklı dozlarda BFA uygulanması sonrasındaki işlevselliği (hormon sentezleme fonksiyonu), ELISA yöntemi kullanılarak insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonunun düzeyinin analiz edilmesiyle araştırıldı. Ayrıca, farklı dozlarda uygulanan BFA'nın, sinsisyum oluşturan BeWo hücrelerinin canlılığına olan etkisini araştırmak için CCK-8 analizi yapıldı. Son olarak, hücrelere BFA uygulaması sonrasında BeWo hücrelerinde GRP78, p-IRE1, p-PERK ve ATF6 protein seviyelerinin Western blot yöntemi kullanılarak analiz edilmesiyle, BFA'nın trofoblast hücrelerindeki ER stresi üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak, *in vitro* ortamda BeWo hücrelerinin sinsityotrofoblastlara benzerliğinin arttırılması amacıyla sinsisyum oluşumunun indüklenmesi hedeflenmiştir. İnsan plasentasının gelişimi sırasında çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana geldiği bilinmektedir. Bu değişikliklerden biri de sitotrofoblastların füzyonudur. *In vitro* olarak yapılan birçok çalışmada sitotrofoblastların farklılaşarak sinsisyum oluşturması forskolin ile indüklenmiştir. Forskolin, cAMP sinyal yolağını aktive ederek sinsisyum oluşumunu sağlayan bir maddedir (Dubey ve diğ., 2018; Gauster ve Huppertz, 2008). Bu nedenle, çalışmamızda BeWo hücrelerinin füzyonu ve sinsisyum oluşumu için forskolin kullanılmıştır. Forskolin ile indüklenen sinsisyum oluşumu, hücre membran belirteci olan e-kaderinin immün işaretlenmesi ve kültür medyumundaki hCG seviyesinin ELISA analizi ile değerlendirilmiştir. E-kaderin ile işaretlenen hücre membranı ile çevrelenen, en az üç çekirdeğe sahip multinüklear hücresel yapıların (sinsisyumların) tespit edilmesi sonucunda, hücre membran füzyonunun ve sinsisyum oluşumunun etkin bir biçimde gerçekleştiği kabul edilmiştir (Gerbaud ve diğ., 2015; Wei ve diğ., 2012). Bu sinsisyum oluşturan multinüklear yapıların sinsisyotrofoblast olduğu ve hCG salgıladığı bilinmektedir (Dubey ve diğ., 2018; Mannelli ve diğ., 2015). Çalışmamızda, yapılan immün işaretleme sonucunda, sinsisyum oluşumunun hem 25 hem de 50 μM forskolin uygulaması ile kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Ancak, 25 ve 50 μM dozları ile 48 ve 72 saat maruziyet süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığında herhangi bir istatistiksel anlamlılık görülmemiştir. Çalışmamızda, sinsisyum oluşumu için 25 μM ve 50 μM forskolin uygulanması arasında anlamlı fark göremediğimiz için forskolin dozunu 25 μM olarak kullanmayı tercih ettik. Ayrıca, sinsisyum oluşumunda 48 ve 72 saat forskolin

uygulaması ile süre açısından da anlamlı farklılık olmadığından maruziyet süresini 48 saat olarak belirledik. Bu doğrultuda, elde edilen bulgulara göre, en uygun forskolin dozu ve süresi, Dubey ve diğ. (2018)' in bulgularına paralel olarak, 25 µM 48 saat olarak belirlenmiştir (Dubey ve diğ., 2018).

Çalışmamızda, farklılaşarak sinsisyum oluşturan BeWo hücrelerinde BFA'nın sinsisyum oluşumu üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi hedeflendi. Yapılan bir çalışmada, hücrelere 48 ve 72 saat 50 nM gibi düşük bir dozda verilen BFA'nın etkisiyle hücre füzyonunun arttığı bildirilmiştir (L. Narciso ve diğ., 2019). Başka bir çalışmada ise, 40 ve 80 µM BFA'nın adipositlerde farklılaşmayı indüklediği bildirilmiştir (Masuno ve diğ., 2005). Bu doğrultuda çalışmamızda, BeWo hücrelerindeki sinsisyum oluşumunu ve BFA'nın sinsisyum üzerindeki etkisini, e-kaderin immün işaretlemesi ile araştırdık. Jun ve diğ. Yaptıkları çalışmada, BFA etkisiyle e-kaderin protein ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir. Bundan dolayı BFA'nın, e-kaderin proteinin ekspresyon şiddeti üzerindeki etkisinin sinsisyum oluşumu için yanıltıcı bir değerlendirme olabileceğini düşünerek (Jun ve diğ., 2021), sinsisyum oluşturan hücrelerin total hücrelere oranı ile füzyon indeksini analiz ettik. Elde ettiğimiz verilere göre, BFA'nın sinsisyum oluşumuna etki etmediğini gördük.

Etkin doz ve sürede forskolin uygulanmasını takiben farklı doz ve sürelerde BFA maruziyetinin BeWo hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin incelenmesi çalışmamızın diğer bir hedefidir. Yapılan araştırmalar BFA'nın, hücrelerin apoptozuna sebep olabilen bir madde olduğunu ispatlamaktadır. Liu ve diğ. (2016)'nın akciğer hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada, hücrelerde 24 saat süreyle 25 µM ve 50 µM BFA uygulanması ile apoptozun gerçekleşmediği; ancak 75 µM ve 100 µM BFA'nın akciğer hücrelerinde apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (S. H. Liu ve diğ., 2016). Başka bir çalışmada ise, pankreas ß hücrelerine uygulanan 100 µM BFA'nın 24 saatte aktif kaspaz 3 protein seviyesinin arttığı bildirilmiştir (C. C. Huang ve diğ., 2021). Farklı doz ve sürelerde uygulanan BFA'nın trofoblast hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkisinin değerlendirilebilmesi için çalışmamızda aktif kaspaz 3 belirteci kullanılmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre, aktif kaspaz 3 proteininin ekspresyon şiddeti 48 saatte 0,003 µM, 3 µM ve 300 µM BFA uygulanmasıyla; 72 saatte ise 0,003 µM, 30 µM ve 300 µM BFA uygulanması ile arttığı görülmüştür. Bu bulgulara göre, BFA'nın BeWo hücreleri üzerinde apoptotik etkisi olduğu ancak bu etkinin doza ve uygulama süresinden bağımsız olarak gerçekleştiği söylenebilir. Çalışmamızda, BeWo hücrelerinde BFA'nın apoptotik etkisinin araştırılmasına ek olarak hücre canlılığına olan etkisi de değerlendirilmiştir. 0,003 µM, 3 µM,

30 µM BFA'nın 48 ve 72 saatte BeWo hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonunu arttırdığı ve 300 µM BFA'nın ise hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, süreden bağımsız olarak, 300 µM BFA'nın trofoblast hücreleri üzerinde aşırı toksik bir etki gösterdiği düşünülebilir.

Literatürde, trofoblast hücrelerinin canlılığında BFA'nın rolüne dair birçok çalışma bulunmaktadır. Fare desidua stroma hücreleri ile yapılan bir çalışmada düşük doz (10 nM) BFA'nın hücre canlılığını etkilemediği bulunmuştur. PCNA ile yapılan proliferasyon analizi sonucunda ise BFA'nın 0, 24, 48, 72 ve 96 saat maruziyeti sonucunda hücre proliferasyonu üzerinde herhangi bir etkisi görülmemiştir (Zhao ve diğ., 2021). Huang ve diğ. (2021) da BFA'nın doza bağlı olarak hücre canlılığı üzerindeki etkisini fare nöroblastoma hücreleri ile araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre, 24 saatte 25 µM BFA hücre canlılığını etkilemezken, 50, 75, 100 ve 300 µM BFA'nın hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir. Ortalama EC50* değeri ise 75 uM olarak verilmiştir *(*EC50: Maksimum etkinin yarısını oluşturan ajan dozu)*. Huang ve diğ. (2021)'in yaptığı bu çalışmada, BFA'nın aktif metaboliti olan MBP'nin de 24 saatte, 3, 5, 7, 10, 20 ve 30 µM dozlarda nöronal hücrelere muamele edilmesiyle MTT yöntemi ile hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (C. F. Huang ve diğ., 2021). Huang ve diğ. (2021)'nın pankreatik ß hücreleri ile yaptıkları bir diğer çalışmada, nöron hücrelerine benzer olarak, 24 saatte 25 µM BFA'nın hücre canlılığını etkilemediği, 50, 75, 100 ve 300 µM BFA'nın ise hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir (C. C. Huang ve diğ., 2021). Liu ve diğ. (2016), akciğer hücrelerindeki canlılığın 25 µM BFA ile değişmediği ancak 50 µM, 75 µM ve 100 µM BFA'nın 24 saat uygulanması ile hücre canlılığının azaldığı raporlamıştır (S. H. Liu ve diğ., 2016). Wang ve diğ. (2015) ise 48 saat süreyle farklı dozlarda BFA'ya maruz kalan BeWo trofoblast hücrelerinin farklı etkiler gösterdiğini bildirmişlerdir. BeWo hücrelerine 1 ve 10 µM BFA uygulamasının hücre proliferasyonunu arttığını, ancak yüksek konsantrasyonda (1000 µM) uygulanan BFA'nın ise hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir. 100 µM, 0,1 µM ve 0,001 µM BFA'nın ise bu hücreler üzerinde anlamlı olarak bir etkisi gözlenmemiştir (Z. Y. Wang ve diğ., 2015).

Çalışmamızda, 0,003 µM, 3 µM, 30 µM dozlarda uygulanan BFA'nın, süreden bağımsız olarak, BeWo hücrelerindeki proliferasyonu ve apoptozu arttıcı etkisi gösterilmiştir. Hücrelerde proliferasyon ile apoptoz yolakları arasında yakın bir ilişki olduğu bilinmektedir (Alenzi, 2004; Evan, 1992). Daha önce yapılan çalışmalarda, kanser hücreleri ve diyabetik hayvanların damar düz kas hücrelerinde hem proliferasyon hem de apoptozda artış olduğu gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde artan miktardaki onkogenlerin hücre proliferasyonu ile bağlantılı olarak apoptozu

indüklediği ve kontrol edilemeyen proliferasyonun yüksek seviyede apoptoza sebep olduğu bildirilmiştir (Alenzi, 2004). Diğer bir çalışmada, diyabetik hayvanlara greftlenen damarların düz kas hücrelerinde, proliferasyon ve apoptozun arttığı ve bu artışın damar gelişiminde uyarıcı bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Ping ve diğ., 2015). Bu bilgiler ışığında, BFA'ya maruz bırakılan BeWo hücrelerinde görülen benzer yöndeki proliferasyon ve apoptozdaki artışın bu hücrelerin koryokarsinoma türevi olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Bu da karsinoma hücre hattı kullanılan *in vitro* çalışmanın dezavantajı olarak görülmekte ve *in vivo* çalışmaların değerini göstermektedir.

BFA'nın farklılaşan trofoblast hücrelerinin hormon sentezleme fonksiyonu üzerindeki etkisi, hCG hormonunun düzeyinin ölçülmesi ile değerlendirilebilmektedir. Çalışmamızda, farklı doz ve sürelerde BFA'ya maruz kalan BeWo hücrelerinin işlevsel rolünü değerlendirmek amacıyla BeWo hücrelerinin hCG hormonunu sentezleme düzeyleri incelendi. Gelişim esnasında, sitotrofoblastların sinsisyotrofoblastlara farklılaştığının belirteçlerinden biri olarak hCG sekresyonunun seviyesi gösterilebilmektedir. Yapılan çalışmalarla BFA'nın bu farklılaşma üzerindeki etkisi incelenmiştir. Hücre canlılığını etkilemeyen düşük dozlardaki BFA konsantrasyonlarının plasenta gelişimini olumlu yönde etkileyerek hCG salınımını arttırdığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, 1. trimester plasenta hücreleri 48 saat süreyle 1 nM BFA'ya maruz bırakıldığında hCG sekresyonunun uyarıldığı görülmüştür (Mørck ve diğ., 2010). Yapılan başka bir çalışmada ise, 50 nM BFA'nın hem 48 saatte hem de 72 saatte hCG sekresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Laura Narciso et al., 2019). Buna karşın, yapılan başka bir çalışmada, BeWo hücrelerine 24 saat boyunca 30 µM ve üzeri dozlarda uygulanan BFA'nın, hCG sekresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (Mørck ve diğ., 2010; Paulesu ve diğ., 2018). Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre, 48 ve 72 saatte 0,003 µM, 30 µM ve 300 µM BFA maruziyeti ile hCG sekresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, 3 µM BFA'nın 72 saat uygulanması ile BeWo hücrelerinde hCG sekresyonunun azaldığı görülmüştür. Literatürde bulunan bilgilere göre, hCG düzeyindeki azalmanın trofoblastik dokunun ölümü ile ilişkilendirilebileceği ve bu nedenle gestasyonel fizyolojide patolojiye ve düşüklere sebep olabileceği anlaşılmaktadır (Konrad, 2007; Korevaar ve diğ., 2015). hCG sekresyonundaki azalmanın BFA'nın sinsisyuma olan etkisinden kaynaklanmadığını çalışmamızın diğer bir bulgusu olan e-kaderin immün işaretlemesi ile gösterdik. Bu doğrultuda BFA'nın, sinsisyum miktarı üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı ancak sinsisyumu oluşturan hücrelerin fonksiyonu üzerinde etki gösterdiği sonucuna

vardık. Bu bulgulardan yola çıkılarak, BFA'nın hCG sekresyonu üzerindeki etkisinin ER stresine bağlı olabileceği düşünülebilir.

BeWo hücrelerinde BFA'nın ER stresine etkisi değerlendirildiğinde BeWo hücrelerine 48 ve 72 saat BFA maruziyeti ile GRP78 protein seviyesinin, kontrol ve sham gruplarına göre 0,003 µM, 3 µM ve 30 µM BFA konsantrasyonlarında anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür. Farklı BFA dozlarının uygulandığı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık olmaması bu artışın doz bağımlı olmadığını göstermektedir. Bu sayede, çalışmamızın amacına yönelik en önemli hedefimiz gerçekleştirilerek, BFA'nın BeWo trofoblast hücrelerinde ER stresine sebep olduğu sonucuna varılabilmektedir. Çalışmamızın bir diğer hedefi olarak BFA kaynaklı ER stresinin hangi UPR (katlanmamış protein yanıtı) sinyal yolağı üzerinden gerçekleştiğini araştırmak için ATF6, p-PERK ve p-IRE1 proteinlerinin seviyeleri analiz edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre, ATF6 protein seviyesi, 48 saat boyunca 3 µM BFA maruziyeti ile kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttığı görülmüştür. 72 saat 3 µM BFA uygulanması sonucunda da ATF6 protein miktarında belirgin bir artma görülmesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgulara ek olarak, p-PERK proteininin seviyesinde 48 ve 72 saat boyunca 30 µM BFA maruziyeti ile kontrol ve sham grubuna göre anlamlı düzeyde artış görülmüştür. Bu ek olarak, 0,003 µM BFA konsantrasyonunda sadece 72 saat maruziyette p-PERK proteininin seviyesinin kontrol grubuna kıyasla arttığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. p-IRE1 protein seviyesi değerlendirildiğinde ise, kontrol ve sham gruplarına kıyasla 48 saat süreyle 0,003 µM, 3 µM ve 30 µM BFA konsantrasyonlarının istatistiksel olarak arttırdığı sonucuna varılmıştır. 72 saat BFA uygulanmasında ise 0,003 µM ve 30 µM dozlarında kontrol ve sham gruplarına kıyasla istatistiksel olarak arttırdığı görülmüştür. Elde ettiğimiz bulgulara göre; BFA'nın UPR sinyal yolaklarının üçünü de aktifleştirdiği söylenebilir. Bu aktifleşmenin 48 saatte IRE1 ve PERK yolakları üzerinden doz bağımlı olarak arttığı, ATF6 yolağında ise doz bağımlı bir patern olmadığı görülmüştür. 72 saatlik BFA uygulamasında da IRE-1 ve PERK yolaklarının aktifleştiği ancak bunun doz bağımlı olmadığı söylenebilir. **Çalışmamız, BFA'nın BeWo trofoblast hücreleri üzerinde ER stres aracılı etkisini gösteren ilk çalışmadır**. Literatürde farklı hücrelerde BFA kaynaklı ER stresi meydana geldiği görülmüştür, ancak hücre tipinin farklı oluşu BFA'nın gösterdiği etkiyi ve bu etkinin görüldüğü BFA maruziyet doz ve süresini değiştirebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, 100 µM BFA'nın fare hepatositlerinde GRP78 ve pro-apoptotik transkripsiyon faktörü olan CHOP ekspresyonunu arttırdığı ve ER stresi kaynaklı olarak hücre canlılığının

azaldığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada analiz edilen ER stresi ile ilişkili olan diğer bir protein olan XBP1 (IRE1 ile aktifleşir) ekspresyonu tespit edilememiştir. Bu nedenle meydana gelen apoptozun, IRE1 ile ilişkili olabilecek bir yolak üzerinden gerçekleşmediği düşünülmüştür (Asahi ve diğ., 2010). Başka bir çalışmada, 10 µM, 25 µM, 50 µM ve 100 µM BFA'nın hipotalamik nöronlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. 24 saat BFA maruziyeti sonucunda 50 µM ve 100 µM BFA'nın CHOP mRNA ekspresyonunu arttığı gösterilirken; 10 veya 25 µM BFA'nın anlamlı olarak bir etki göstermediği bildirilmiştir (McIlwraith ve diğ., 2022). Huang ve diğ. (2021)'nın yaptığı çalışmada BFA'nın aktif metaboliti olan MBP'nin 10 µM dozda 2-24 saat maruziyeti ile GRP78, CHOP be XBP1 protein seviyeleri artarken; 1-8 saat 10 µM MBP maruziyet ile p-PERK, elF2a, IRE1, ATF4 ve p-ATF6 protein seviyeleri de artmıştır (C. F. Huang ve diğ., 2021). İnsan meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise, 1 µM BFA'nın hücrelere 72 saat maruziyeti sonucunda ER stresi ile ilişkili olan CHOP ve p-elF2α protein seviyelerini azalttığı ve anlamlı olarak hücrelerin proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir (G. A. Lee ve diğ., 2018). Fare desidua stroma hücrelerinin 48 saat BFA ile inkübasyonundan sonra GRP78 ve Luman (son zamanlarda tanımlanmış ER stres belirteci) mRNA seviyelerinde anlamlı olarak artış görülürken, CHOP, IRE1, PERK ve ATF6 mRNA seviyelerinde değişim gözlenmemiştir (Zhao ve diğ., 2021).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, plasenta gelişiminde fonksiyonel ve yapısal rol oynayan trofoblast hücrelerinde bisfenol A (BFA) maruziyeti altında Endoplazmik retikulum (ER) stresinin oluşup oluşmadığının araştırılması amacıyla BFA'nın trofoblast hücrelerinin canlılığı ve işlevi üzerindeki etkisi gösterildikten sonra ER stresinin belirteçleri olan GRP78, p-IRE1, p-PERK ve ATF6 proteinlerinin moleküler seviyede tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde ettiğimiz bulgulara göre, trofoblast hücrelerinde BFA kaynaklı ER stresinin meydana geldiği sonucuna varılmıştır. Gebelik esnasında preeklampsi ve fetal gelişim bozukluğu gibi birçok patolojiye sebep olduğu düşünülen BFA'nın ER stresi mekanizması ile de bu etkiyi gösterebileceği düşünülmektedir. Kadın ve embriyo sağlığının korunması adına yapılabilecek ileri araştırmalar için ön çalışma niteliği taşıyan çalışmamızda, elde ettiğimiz sonuçlar ile literatüre önemli düzeyde katkı sağlayacağımızı düşünmekteyiz. Ayrıca ER stresinin hücrelerin apoptoz ve proliferasyon döngüsü üzerindeki etkisi göz önüne alındığında, BFA kaynaklı ER stresinin trofoblast hücrelerinin apoptozuna ve çoğalma sürecine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu görüşün desteklenmesi için ileri çalışmalar yapılarak UPR sinyal yolaklarının aktifleştirdiği alt yolak proteinlerinin incelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Ahmed Zaki, M. S., Haidara, M. A., Abdallaa, A. M., Mohammed, H., Sideeg, A. M., & Eid, R. A. (2021). Role of dietary selenium in alleviating bisphenol A toxicity of liver albino rats: Histological, ultrastructural, and biomarker assessments. *Journal of Food Biochemistry*, *45*(5), 1–10. https://doi.org/10.1111/jfbc.13725

Aids, P. (2015). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. *EFSA Journal*, *13*(1). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3978

Alenzi, F. Q. B. (2004). Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle. *British Journal of Biomedical Science*, *61*(2), 99–102. https://doi.org/10.1080/09674845.2004.11732652

Aplin, J. D., Myers, J. E., Timms, K., & Westwood, M. (2020). Tracking placental development in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, *16*(9), 479–494. https://doi.org/10.1038/s41574-020-0372-6

Ariyasu, D., Yoshida, H., & Hasegawa, Y. (2017). Endoplasmic reticulum (ER) stress and endocrine disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(2). https://doi.org/10.3390/ijms18020382

Asahi, J., Kamo, H., Baba, R., Doi, Y., Yamashita, A., Murakami, D., Hanada, A., & Hirano, T. (2010). Bisphenol A induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in mouse non-parenchymal hepatocytes. *Life Sciences*, *87*(13–14), 431–438. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.08.007

Balakrishnan, B., Henare, K., Thorstensen, E. B., Ponnampalam, A. P., & Mitchell, M. D. (2010). Transfer of bisphenol A across the human placenta. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *202*(4), 393.e1-393.e7. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.01.025

Bastida-Ruiz, D., Aguilar, E., Ditisheim, A., Yart, L., & Cohen, M. (2017). Endoplasmic

reticulum stress responses in placentation - A true balancing act. *Placenta*, *57*, 163–169. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.004

Benachour, N., & Aris, A. (2009). Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *241*(3), 322–328. https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.09.005

Benirschke, K., Burton, G. J., & Baergen, R. N. (2012). *Pathology of the Human Placenta* (Sixth Edit). https://doi.org/10.1111/j.0001-6349.2001.800721-2.x

Brede, C., Fjeldal, P., Skjevrak, I., & Herikstad, H. (2003). Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Additives and Contaminants*, *20*(7), 684–689. https://doi.org/10.1080/0265203031000119061

Cai, L., Qin, X., Xu, Z., Song, Y., Jiang, H., Wu, Y., Ruan, H., & Chen, J. (2019). Comparison of Cytotoxicity Evaluation of Anticancer Drugs between Real-Time Cell Analysis and CCK-8 Method. *ACS Omega*, *4*(7), 12036–12042. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01142

Cao, S. S., & Kaufman, R. J. (2014). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, *21*(3), 396–413. https://doi.org/10.1089/ars.2014.5851

Chang, C. W., Wakeland, A. K., & Parast, M. M. (2018). Trophoblast lineage specification, differentiation, and their regulation by oxygen tension. *Journal of Endocrinology*, *236*(1), R43–R56. https://doi.org/10.1530/JOE-17-0402

Chu, P. W., Yang, Z. J., Huang, H. H., Chang, A. A., Cheng, Y. C., Wu, G. J., & Lan, H. C. (2018). Low-dose bisphenol A activates the ERK signaling pathway and attenuates steroidogenic gene expression in human placental cells. *Biology of Reproduction*, *98*(2), 250–258. https://doi.org/10.1093/biolre/iox162

Cole, L. A. (2010). Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *8*, 1–14. https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-102

Demir, R. (1995). *İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi*. Palme Yayıncılık.

Diamante, G., Cely, I., Zamora, Z., Ding, J., Blencowe, M., Lang, J., Bline, A., Singh, M., Lusis, A. J., & Yang, X. (2021). Systems toxicogenomics of prenatal low-dose BPA exposure on liver metabolic pathways, gut microbiota, and metabolic health in mice. *Environment International*, *146*. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106260

Drwal, E., Rak, A., & Gregoraszczuk, E. (2018). Co-culture of JEG-3, BeWo and syncBeWo cell lines with adrenal H295R cell line: an alternative model for examining endocrine and metabolic properties of the fetoplacental unit. *Cytotechnology*, *70*(1), 285–297. https://doi.org/10.1007/s10616-017-0142-z

Du, L., He, F., Kuang, L., Tang, W., Li, Y., & Chen, D. (2017). ENOS/iNOS and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placentas of patients with preeclampsia. *Journal of Human Hypertension*, *31*(1), 49–55. https://doi.org/10.1038/jhh.2016.17

Dubey, R., Malhotra, S. S., & Gupta, S. K. (2018). Forskolin- mediated BeWo cell fusion involves down- regulation of miR- 92a- 1- 5p that targets dysferlin and protein kinase cAMP- activated catalytic subunit alpha. *American Journal of Reproductive Immunology*, *February*, 1–11. https://doi.org/10.1111/aji.12834

Escarda-Castro, E., Herráez, M. P., & Lombó, M. (2021). Effects of bisphenol A exposure during cardiac cell differentiation. In *Environmental Pollution* (Vol. 286). https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117567

European Commission. (2018). Commission Regulation (EU) 2018/832 of 12 February 2018 on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact materi. *Official Journal of the European Union*, *2001*(May), 20–30. https://doi.org/https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32018R0213

Evan, G. I. et al. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, *69*, 119–128. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90126-W

Feng, D., Zhang, H., Jiang, X., Zou, J., Li, Q., Mai, H., Su, D., Ling, W., & Feng, X. (2020). Bisphenol A exposure induces gut microbiota dysbiosis and consequent activation of

gut-liver axis leading to hepatic steatosis in CD-1 mice. *Environmental Pollution*, *265*, 114880. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114880

Ferguson, K. K., McElrath, T. F., Cantonwine, D. E., Mukherjee, B., & Meeker, J. D. (2015). Phthalate metabolites and bisphenol-A in association with circulating angiogenic biomarkers across pregnancy. *Placenta*, *36*(6), 699–703. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.04.002

Fournier, T. (2016). Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production. *Annales d'Endocrinologie*, *77*(2), 75–81. https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.012

Gauster, M., & Huppertz, B. (2008). Fusion of cytotrophoblast with syncytiotrophoblast in the human placenta: Factors involved in syncytialization. *Journal Fur Reproduktionsmedizin Und Endokrinologie*, *5*(2), 76–82.

Gerbaud, P., Taskén, K., & Pidoux, G. (2015). Spatiotemporal regulation of cAMP signaling controls the human trophoblast fusion. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 6, Issue SEP). https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00202

Guzel, E., Arlier, S., Guzeloglu-Kayisli, O., Tabak, M. S., Ekiz, T., Semerci, N., Larsen, K., Schatz, F., Lockwood, C. J., & Kayisli, U. A. (2017). Endoplasmic reticulum stress and homeostasis in reproductive physiology and pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(4). https://doi.org/10.3390/ijms18040792

Guzel, E., Basar, M., Ocak, N., Arici, A., & Kayisli, U. A. (2011). Bidirectional Interaction Between Unfolded-Protein-Response Key Protein HSPA5 and Estrogen Signaling in Human Endometrium1. *Biology of Reproduction*, *85*(1), 121–127. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.089532

Handwerger, S. (2010). New insights into the regulation of human cytotrophoblast cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol.*, *323*(1), 94–104. https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.12.015.New

Hannan, N. J., Paiva, P., Dimitriadis, E., & Salamonsen, L. A. (2010). Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biology of Reproduction*, *82*(2), 235–

245. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077800

Haverinen, E., Fernandez, M. F., Mustieles, V., & Tolonen, H. (2021). Metabolic syndrome and endocrine disrupting chemicals: An overview of exposure and health effects. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(24). https://doi.org/10.3390/ijerph182413047

Hemberger, M., Hanna, C. W., & Dean, W. (2020). Mechanisms of early placental development in mouse and humans. *Nature Reviews Genetics*, *21*(1), 27–43. https://doi.org/10.1038/s41576-019-0169-4

Huang, C. C., Yang, C. Y., Su, C. C., Fang, K. M., Yen, C. C., Lin, C. T., Liu, J. M., Lee, K. I., Chen, Y. W., Liu, S. H., & Huang, C. F. (2021). 4-Methyl-2,4-Bis(4-Hydroxyphenyl)Pent-1-Ene, a Major Active Metabolite of Bisphenol a, Triggers Pancreatic B-Cell Death Via a Jnk/Ampkα Activation-Regulated Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptotic Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9). https://doi.org/10.3390/ijms22094379

Huang, C. F., Liu, S. H., Su, C. C., Fang, K. M., Yen, C. C., Yang, C. Y., Tang, F. C., Liu, J. M., Wu, C. C., Lee, K. I., & Chen, Y. W. (2021). Roles of ERK/Akt signals in mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered neuronal cell apoptosis induced by 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene, a major active metabolite of bisphenol A. *Toxicology*, *455*(February), 152764. https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152764

Huppertz, B. (2020). Traditional and new routes of trophoblast invasion and their implications for pregnancy diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1). https://doi.org/10.3390/ijms21010289

Io, S., Kondoh, E., Chigusa, Y., Kawasaki, K., Mandai, M., & Yamada, S. (2020). New era of trophoblast research: Integrating morphological and molecular approaches. *Human Reproduction Update*, *26*(5), 611–633. https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa020

Ishikawa, A., Omata, W., Ackerman, W. E., Takeshita, T., Vandré, D. D., & Robinson, J. M. (2014). Cell fusion mediates dramatic alterations in the actin cytoskeleton, focal adhesions, and E-cadherin in trophoblastic cells. *Cytoskeleton*, *71*(4), 241–256.

https://doi.org/10.1002/cm.21165

Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S., & Kohno, K. (2009). Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(39), 16657–16662. https://doi.org/10.1073/pnas.0903775106

Jun, J. H., Oh, J. E., Shim, J. K., Kwak, Y. L., & Cho, J. S. (2021). Effects of bisphenol A on the proliferation, migration, and tumor growth of colon cancer cells: In vitro and in vivo evaluation with mechanistic insights related to ERK and 5-HT3. *Food and Chemical Toxicology*, *158*(October), 112662. https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112662

Kang, J.-H., Kito, K., & Kondo, F. (2003). Factors Influencing the Migration of Bisphenol A from Cans. *Journal of Food Protection*, *66*(8), 1444–1447. https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.8.1444

Kang, J. H., & Kondo, F. (2002). Bisphenol A migration from cans containing coffee and caffeine. *Food Additives and Contaminants*, *19*(9), 886–890. https://doi.org/10.1080/02652030210147278

Kim, J., Shin, G., Kim, C., Kim, M. J., An, M., Lee, H., & Kim, J. (2021). The cytotoxic effects of bisphenol A alternatives in human lung fibroblast MRC5 cells. *Molecular & Cellular Toxicology*, *0123456789*. https://doi.org/10.1007/s13273-021-00133-w

Konrad, G. (2007). First-trimester bleeding with falling HCG. *Canadian Family Physician*, *53*, 831–832.

Korevaar, T. I. M., Steegers, E. A. P., de Rijke, Y. B., Schalekamp-Timmermans, S., Visser, W. E., Hofman, A., Jaddoe, V. W. V., Tiemeier, H., Visser, T. J., Medici, M., & Peeters, R. P. (2015). Reference ranges and determinants of total hCG levels during pregnancy: the Generation R Study. *European Journal of Epidemiology*, *30*(9), 1057–1066. https://doi.org/10.1007/s10654-015-0039-0

Kumar, V., & Maity, S. (2021). ER Stress-Sensor Proteins and ER-Mitochondrial Crosstalk — Signaling Beyond (ER) Stress Response. *Biomolecules*. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biom11020173

Lee, G. A., Choi, K. C., & Hwang, K. A. (2018). Treatment with phytoestrogens reversed triclosan and bisphenol A-induced anti-apoptosis in breast cancer cells. *Biomolecules and Therapeutics*, *26*(5), 503–511. https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.160

Lee, H. M., & Choi, K. C. (2018). Cigarette smoke extract and isoprene resulted in the induction of apoptosis and autophagy in human placenta choriocarcinoma JEG-3 cells. *Environmental Toxicology*, *33*(2), 178–190. https://doi.org/10.1002/tox.22506

Lee, S., Shin, J., Hong, Y., Shin, S. M., Shin, H. W., Shin, J., Lee, S. K., & Park, H. W. (2020). Sestrin2 alleviates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress, apoptosis, and defective invasion of human trophoblast cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, *83*(4), 0–2. https://doi.org/10.1111/aji.13222

Li, J., Yin, Z., Hua, L., Wang, X., Ren, F., & Ge, Y. (2022). Evaluation of BPA effects on autophagy in Neuro-2a cells. In *Toxicology and Industrial Health* (Vol. 38, Issue 3, pp. 151–161). https://doi.org/10.1177/07482337221076587

Liu, L., Zhang, Y., Wang, Y., Peng, W., Zhang, N., & Ye, Y. (2017). Progesterone inhibited endoplasmic reticulum stress associated apoptosis induced by interleukin-1β via the GRP78/PERK/CHOP pathway in BeWo cells. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *44*(16), 463–473. https://doi.org/10.1111/jog.13549

Liu, S. H., Su, C. C., Lee, K. I., & Chen, Y. W. (2016). Effects of Bisphenol A Metabolite 4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene on Lung Function and Type 2 Pulmonary Alveolar Epithelial Cell Growth. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/srep39254

Lopes, S. M. C. de S., Alexdottir, M. S., & Valdimarsdottir, G. (2020). The TGFβ family in human placental development at the fetal-maternal interface. *Biomolecules*, *10*(3), 1–20. https://doi.org/10.3390/biom10030453

Ma, Y., Liu, H., Wu, J., Yuan, L., Wang, Y., Du, X., Wang, R., Marwa, P. W., Petlulu, P., Chen, X., & Zhang, H. (2019). The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environmental Research*, *176*(July). https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108575

Malhotra, S. S., Banerjee, P., & Gupta, S. K. (2016). Regulation of trophoblast differentiation during embryo implantation and placentation: Implications in pregnancy complications. *Journal of Reproductive Health and Medicine*, *2*, S26–S36. https://doi.org/10.1016/j.jrhm.2016.10.007

Mannelli, C., Ietta, F., Avanzati, A. M., Skarzynski, D., & Paulesu, L. (2015). Biological tools to study the effects of environmental contaminants at the feto–maternal interface. *Dose-Response: An International Journal*, *13*(4), 1–11. https://doi.org/10.1177/1559325815611902

Masuno, H., Iwanami, J., Kidani, T., Sakayama, K., & Honda, K. (2005). Bisphenol A accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicological Sciences*, *84*(2), 319–327. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi088

McIlwraith, E. K., Lieu, C. V., & Belsham, D. D. (2022). Bisphenol A induces miR-708-5p through an ER stress-mediated mechanism altering neuronatin and neuropeptide Y expression in hypothalamic neuronal models. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *539*(August 2021). https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111480

Michałowicz, J. (2014). Bisphenol A - Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *37*(2), 738–758. https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.003

Mørck, T. J., Sorda, G., Bechi, N., Rasmussen, B. S., Nielsen, J. B., Ietta, F., Rytting, E., Mathiesen, L., Paulesu, L., & Knudsen, L. E. (2010). Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, *30*, 131–137. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.02.007

Murata, M., & Kang, J. H. (2018). Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnology Advances*, *36*(1), 311–327. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.002

Naomi, R., Yazid, M. D., Bahari, H., Keong, Y. Y., Rajandram, R., Embong, H., Teoh, S. H., Halim, S., & Othman, F. (2022). Bisphenol A (BPA) Leading to Obesity and Cardiovascular Complications: A Compilation of Current In Vivo Study. *International*

Journal of Molecular Sciences, *23*(6). https://doi.org/10.3390/ijms23062969

Narciso, L., Ietta, F., Romagnoli, R., Paulesu, L., Mantovani, A., & Tait, S. (2019). Effects of Bisphenol A on endogenous retroviral envelopes expression and trophoblast fusion in BeWo cells. *Reproductive Toxicology*, *89*(July), 35–44. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.001

Narciso, Laura, Ietta, F., Romagnoli, R., Paulesu, L., Mantovani, A., & Tait, S. (2019). Effects of Bisphenol A on endogenous retroviral envelopes expression and trophoblast fusion in BeWo cells. *Reproductive Toxicology*, *89*(November 2018), 35–44. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.001

Paulesu, L., Rao, C. V., Ietta, F., Pietropolli, A., & Ticconi, C. (2018). hCG and its disruption by environmental contaminants during human pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), 1–11. https://doi.org/10.3390/ijms19030914

Ping, S., Li, Y., Liu, S., Zhang, Z., Wang, J., Zhou, Y., Liu, K., Huang, J., Chen, D., Wang, J., & Li, C. (2015). Simultaneous increases in proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerate diabetic mouse venous atherosclerosis. *PLoS ONE*, *10*(10), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141375

Rolfo, A., Nuzzo, A. M., De Amicis, R., Moretti, L., Bertoli, S., & Leone, A. (2020). Fetal–maternal exposure to endocrine disruptors: Correlation with diet intake and pregnancy outcomes. *Nutrients*, *12*(6), 1–19. https://doi.org/10.3390/nu12061744

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2011). *Histology A Text And Atlas* (Sixth Edit).

Rubin, B. S. (2011). Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *127*(1–2), 27–34. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.05.002

Sadler, T. W. (2015). *Langman's Medical Embryology* (Thirteenth Edition (ed.)).

Tait, S., Tassinari, R., Maranghi, F., & Mantovani, A. (2015). Bisphenol A affects placental layers morphology and angiogenesis during early pregnancy phase in mice. *Journal of Applied Toxicology*, *35*(11), 1278–1291. https://doi.org/10.1002/jat.3176

Tang, H., Jiang, Z., He, H., Li, X., Hu, H., Zhang, N., Dai, Y., & Zhou, Z. (2018). Uptake and transport of pullulan acetate nanoparticles in the BeWo b30 placental barrier cell model. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 4073–4082. https://doi.org/10.2147/IJN.S161319

Tarafdar, A., Sirohi, R., Balakumaran, P. A., Reshmy, R., Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Kumar, Y., Kumar, D., & Sim, S. J. (2022). The hazardous threat of Bisphenol A: Toxicity, detection and remediation. *Journal of Hazardous Materials*, *423*(PA), 127097. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127097

Turco, M. Y., & Moffett, A. (2019). Development of the human placenta. *Development (Cambridge)*, *146*(22), 1–14. https://doi.org/10.1242/dev.163428

Vahedi, M., Saeedi, A., Poorbaghi, S. L., Sepehrimanesh, M., & Fattahi, M. (2016). Metabolic and endocrine effects of bisphenol A exposure in market seller women with polycystic ovary syndrome. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(23), 23546–23550. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7573-5

Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G. A., Filser, J. G., & Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chemical Research in Toxicology*, *15*(10), 1281–1287. https://doi.org/10.1021/tx025548t

Wang, H., Zhao, P., Huang, Q., Chi, Y., Dong, S., & Fan, J. (2019). Bisphenol-A induces neurodegeneration through disturbance of intracellular calcium homeostasis in human embryonic stem cells-derived cortical neurons. *Chemosphere*, *229*(1799), 618–630. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.099

Wang, Z. Y., Lu, J., Zhang, Y. Z., Zhang, M., Liu, T., & Qu, X. L. (2015). Effect of Bisphenol A on invasion ability of human trophoblastic cell line BeWo. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *8*(11), 14355–14364.

Wei, B.-R., Xu, C., & Rote, N. S. (2012). Increased resistance to apoptosis during differentiation and syncytialization of BeWo choriocarcinoma cells. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *03*(06), 805–813. https://doi.org/10.4236/abb.2012.326100

Ye, Y., Tang, Y., Xiong, Y., Feng, L., & Li, X. (2019). Bisphenol A exposure Alters Placentation and Causes Preeclampsia-like Features in Pregnant Mice Involved in Reprogramming of DNA Methylation of WNT-2. *FASEB Journal*, *33*(2), 2732–2742. https://doi.org/10.1096/fj.201800934RRR

Zbucka-Krętowska, M., Łazarek, U., Miltyk, W., Sidorkiewicz, I., Pierzyński, P., Milewski, R., Wołczyński, S., & Czerniecki, J. (2019). Simultaneous analysis of bisphenol A fractions in maternal and fetal compartments in early second trimester of pregnancy. *Journal of Perinatal Medicine*, *47*(7), 765–770. https://doi.org/10.1515/jpm-2019-0040

Zhang, C. (2017). Roles of Grp78 in female mammalian reproduction. In *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology* (Vol. 222, pp. 129–155). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-319-51409-3_7

Zhang, K., Wong, H. N., Song, B., Miller, C. N., Scheuner, D., & Kaufman, R. J. (2005). The unfolded protein response sensor IRE1α is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(2), 268–281. https://doi.org/10.1172/JCI200521848

Zhao, F., Liu, H., Li, Z., Lin, P., Wang, A., Jin, Y., & Yi, Y. (2021). Low-dose bisphenol A impairs the function of mouse decidual stromal cells by activating LUMAN-mediated unfolded protein response. *Food and Chemical Toxicology*, *153*(December 2020). https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112242

Żwierełło, W., Maruszewska, A., Skórka-Majewicz, M., Goschorska, M., Baranowska-Bosiacka, I., Dec, K., Styburski, D., Nowakowska, A., & Gutowska, I. (2020). The influence of polyphenols on metabolic disorders caused by compounds released from plastics - Review. *Chemosphere*, *240*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124901

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

BİSFENOL A'NIN TROFOBLAST HÜCRELERİNE VERDİĞİ HASARDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN ROLÜ

ORİJİNALLİK RAPORU

%8	%7	%2	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
4	abakus.inonu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
6	openaccess.acibadem.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
7	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	acikerisim.akdeniz.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
	dergipark.org.tr	