



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**BAZI KALICI ORGANİK KİRLETİCİLERİN KÖPEK
VE İNSAN PLASENTAL KOLİNERJİK SİSTEM
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Recep UYAR

**FARMAKOLOJİ VE
TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

ANKARA

2021

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI KALICI ORGANİK KİRLETİCİLERİN KÖPEK
VE İNSAN PLASENTAL KOLİNERJİK SİSTEM
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Recep UYAR

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından
TÜBİTAK 1001 projesi (proje numarası 119S702) kapsamında desteklenmiştir.

ANKARA

2021

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “‘Bazı Kalıcı Organik Kirleticilerin Köpek ve İnsan Plasental Kolinergik Sistem Üzerine Etkisinin’’ başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Kabul ve Onay

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında Recep UYAR tarafından hazırlanan “Bazı Kalıcı Organik Kirleticilerin Köpek ve İnsan Plasental Kolinerjik Sistem Üzerine Etkisinin” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Prof.Dr. Hilal ÖZDAĞ

Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç.Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

Ankara Üniversitesi

Üye

Doç.Dr. Özgür KUZUKIRAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Raportör

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

İçindekiler

ETİK BEYAN	ii
KABUL VE ONAY	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖNSÖZ	vi
Simgeler Ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. Plasentanın Morfolojik Yapısı ve Görevleri	4
1.1.1. Placenta Morfolojik Yapısı	4
1.1.2. Görevleri	8
1.2. Placental Bariyer ve Fonksiyonu	9
1.3. Placental Toksisite	11
1.3.1. Kalıcı Organik Kirleticiler ve Placental Toksisite	12
1.4. Placental Kolinerjik Sistem ve Kalıcı Organik Kirleticiler	14
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1. Gereç	18
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	19
2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	20
2.1.3. Kullanılan Cihazlar	21
2.1.4. Kullanılan Program/Yazılımlar	22
2.2. Yöntem	22
2.2.1. Placenta Örneklerinin Alınması	22
2.2.4. Kirletici Analiz	26
2.2.2. <i>İn Siliko</i> Analiz	30
2.2.2.1. Molekül Hesabı	31
2.2.2.2. Moleküler Dinamik	31

2.2.2.3. Moleküler Kenetleme	32
2.2.3. Mikrodizin Analizleri ve Biyoinformatik Analiz	33
2.2.3.1. RNA İzolasyonu	33
2.2.3.2. Transkriptom Profillem Analizleri	34
2.2.3.2.1. cRNA ve ss-cDNA Sentezi, Fragmentasyon ve İşaretleme	34
2.2.3.2.2. Hibridizasyon, Yıkama-Boyama ve Okuma	36
2.2.3.3 Köpek RNA Dizileme Analizi	37
2.2.3.4. Biyoinformatik Analizler	37
2.2.4. İstatistik Analizleri	39
3. BULGULAR	40
3.1. Plasenta Örneklerine Ait İstatistiksel Bulgular	40
3.2. Kirletici Analizi	42
3.3. <i>İn Siliko</i> Bulguları	57
3.4. Mikrodizin Analizleri ve Biyoinformatik Analiz	60
3.4.1. RNA Ekstraksiyonu	60
3.4.2. cRNA ve ss-cDNA Sentezi ve Fragmentasyon Bulguları	61
3.4.3. Biyoinformatik Bulgular	63
3.4.3.1. Köpek RNasek Bulguları	63
3.4.3.2. Mikrodizin Analiz Bulguları	67
4. TARTIŞMA	72
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	78
ÖZET	81
SUMMARY	82
KAYNAKLAR	83
EKLER	88
EK-1-2 ETİK RAPORU	88
EK-3 İnsan Çevresel Etkilenim Anketi, Veteriner Anamnez Kartı ve Onam Formu	90
Ek-4. Filtreleme öncesi bulunan bütün gene ait detaylı bilgi	93
Ek-5. DAVID veri bankasından elde edilen zenginleştirme skoru ve bütün yolak analiz sonuçları	94
ÖZGEÇMİŞ	95

Önsöz

Plasenta anne ve fetüs arasındaki fizyolojik, hormonal ve kimyasal iletişimin gerçekleştiği geçici ve önemli bir organdır. Kalıcı organik kirleticiler (KOK'lar) ise günlük yaşantımız içerisinde kullandığımız birçok üründe bulunan çevresel kirleticilerdir. Doğada uzun süre kalabilmeleri, biyolojik birikim potansiyeline ve vahşi yaşam ve insanlar üzerindeki toksik etkilerine ilişkin bildirilen kanıtlara dayanarak, Dünya Sağlık Örgütü, Çevre Koruma Ajansları gibi pek çok kurum ve kuruluş tarafından insan ve doğa için zararlı olarak kabul edilmektedir. İnsanların KOK'lara maruz kalması, gelişimsel toksisite, kanser, diyabet ve endokrin bozuklukları gibi olumsuz sağlık etkilerine neden olabilmektedir. Genel popülasyonda bu kirletici maddelerin başlıca maruz kalma kaynakları beslenme, toz gibi çevresel ortam ve KOK içeren ürünlerdir. Bu kirleticiler bizlerin sağlığını olumsuz yönde etkilerken fetüs için de tehlike arz etmektedir. Fetüs, anne tarafından hamilelik sırasında ve hayatı boyunca kimyasal maruziyetini yansıtan bir ortam olarak kabul edilen plasenta yoluyla toksik kontaminantlara maruz kalmaktadır. Bu nedenle plasenta dokusu, annenin ve fetüsün KOK'lara aynı anda maruz kalmasını ve fetüsün yaşam boyunca ilk maruziyetine neden olan bir organ olarak değerlendirilir. Büyük bir çoğunluğu endokrin bozucu etkinlik gösteren KOK'lar; güç doğum, düşük doğum ağırlığı, anomali, hormonal bozukluklar, metabolik, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar ve daha birçok ters etki ile ilişkilendirilmiştir.

Kolinerjik sistem, sinir sistemine ait önemli bir unsur olmasının yanı sıra, birçok doku ve organda bu özelliği dışında farklı fonksiyonlara sahiptir. Anne ve fetüs arasında önemli bir bağ olan geçici organ plasentada da bu fonksiyonları amacıyla özelleşmiş kolinerjik sistem unsurları bulunmaktadır. Çalışmamız, kalıcı organik kirleticilerin plasentada var olduğunu bildiğimiz kolinerjik sistem unsurları yoluyla birçok fonksiyonu etkileyebileceği ve plasentanın işlevini bozarak fetüs büyüme ve gelişimini olumsuz yönde etkileyeceği hipotezi ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen deneyler KOK'ların plasental kolinerjik sistem vasıtasıyla birden fazla hücrel yolağı etkileyerek plasenta fonksiyonlarını etkilediğı ortaya konmuştur. Belirlenen kolinerjik sistem unsurlarındaki gen ifade değışiklikleri ve etkilenen yollar ile birçok çalışmaya ışık tutacağı ve literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve devam etmesinde her türlü desteğini benden esirgemeyen başta değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Begum YURDAKÖK DİKMEN'e, akademik desteklerini esirgemeyen ve sorularımı sabırla yanıtlayarak tezimin tamamlanmasında önemli yeri olan hocalarım Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ, Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN, Dr. Altay ÜNAL, Prof.Dr. Ayhan FİLAZİ, Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL'a; Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyelerine; deneysel çalışmalarım sürecinde her seferinde yanımda olan çalışma arkadaşlarım Vet. Hek. Yağmur TURGUT, Tansu BIÇAKCIOĞLU ve Elif TÜRKER'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, insan plasenta numunelerinin toplanmasında görev alan Doç.Dr. Özgür ÖZYÜNCÜ ve Doç.Dr. Tolga ÇELİK hocalarıma; köpek plasenta numunelerinin toplanmasında görev alan Dr. Kübra KARAKAŞ'a, array analizinde desteklerini esirgemeyen Uzm. Biyo. Seda YILMAZ'a ve istatistik analizlerinde yardımcı olan Doç.Dr. Doğukan ÖZEN'e teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca beni maddi ve manevi destekleyen, akademik kariyer hedefimi kendi hedefleri sayan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, danışmanım Doç. Dr. Begum YURDAKÖK DİKMEN'nin yürütücüsü olduğu 119S702 no'lu TÜBİTAK 1001 Projesi kapsamında desteklenmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABCP	ATP Bağlayıcı Kaset Proteinleri
Ach	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
Al	Alüminyum
BChE	Butirilkolinesteraz
BCRP	Meme Kanseri Direnci Proteinini
BM	Bazal Membran
BuCh	Butirilkolinesteraz
Cd	Kadmiyum
ES	Embriyonik Kök
FABPpm	Yağ Asidi Bağlama Proteinini
FAS	Fetal Alkol Sendromu
FASB	Fetal Alkol Spektrum Bozukluğuna
FAT	Yağ Asidi Taşıyıcıları
FATP	Yağ Asidi Taşıyıcı Proteinini
GLUT	Kolaylaştırılmış Glikoz Nakli
HbF	Fetal hemoglobin
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
Hg	Civa
HIV	Bağışıklık Yetersizliği Virüsü
IFBG	Intrauterin Fetal Büyüme Geriliği
IgG	Immunglobin G
KM	Karbamatlar
KOK	Kalıcı organik kirleticiler
LAT	Sodyum Bağlayıcı Taşıyıcılar
MDR1	Çoklu İlaç Direnci Proteinini 1
MRP	Çoklu İlaç Direnci ile İlişkili Protein

MSS	Merkezi Sinir Sisteminde
MT	Metallotiyonein
MVM	Mikrovillus Membranı
MXR	Mitoksantron Direnci İle İlişkili Protein
Ni	Nikel
OAT	Organik Anyon Taşıyıcı
OKP	Organik klorlu pestisidler
OP	Organofosfatlar
P02	Oksijen Basıncı
Pb	Kurşun
PCB	Poliklorlu Bifeniller
PL	Plasenta Laktojeni
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SLC	Çözünen Taşıyıcı Protein
SOAT	Sodyum Bağımlı Organik Anyon Taşıyıcı
TS	Trofoblast Sapı
VKİ	Vücut kitle indeksi
Zn	Çinko

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Koriyo-allantoik plasentanın biçimlerine ve endometriyumla ilişkisine göre sınıflandırılması	5
Şekil 1.2. Sezaryen Doğum Sonrası Alınan plasenta örnekleri. a. Köpek b. İnsan	6
Şekil 1.3 İnsan maternal koryonik villus (a) ve villusun enine kesiti	7
Şekil 1.4. Plasental Bariyerde Bulunan Trofoblast Tabakasının Şematik Gösterimi	10
Şekil 1.5. Nöronal olmayan ACh'nin sentezi, salınımı, bozulması ve sinyalizasyonu	16
Şekil 2.1. Hacettepe Üniversitesi insan plasentası toplanması	23
Şekil 2.2. İnsan plasentası örnek alımı	24
Şekil 2.3. Köpek plasentalarının örnek alımı için hazırlanan kitler ve açıklaması	25
Şekil 2.4. Tez çalışmalarının gerçekleştirildiği GC-MS cihazı	27
Şekil 2.5. Deneyin gerçekleştirildiği mikrodizin ünitesi	33
Şekil 2.6. RNA ekstraksiyonu ve sonrasında jel yürütülmesi	34
Şekil 2.7. Fragmentasyon aşaması	35
Şekil 2.8. Örneklerin mikrodizin çiplerine yüklenmesi ve hibridizasyon aşaması	36
Şekil 2.9. Yıkama-boyama işlemi sırasında çekilen görüntü ve okuma sonrası alınan ham veri görüntüsü	36
Şekil 2.10. Biyoinformatik analiz şeması	39
Şekil 3.1. Annelerin gebelik süresince tükettikleri yiyecek alışkanlıkları	41
Şekil 3.2. Köpeklerin gebelik süresince tükettikleri yiyecek alışkanlıkları	42
Şekil 3.3. CHRM1 ile CID-4-4 DDE molekülünün etkileşiminin 3 boyutlu gösterimi	58
Şekil 3.4. CHRM3 ile CID-4-4 BAP molekülünün etkileşiminin 2 ve 3 boyutlu gösterimi	59
Şekil 3.5. CHRM5 ile CID-4-4 BAP molekülünün etkileşiminin 2 ve 3 boyutlu gösterimi	60
Şekil 3.6. CHRNA3 ile CID-4-4 BAP molekülünün etkileşiminin 2 ve 3 boyutlu gösteri	62
Şekil 3.7. RNA agaroz jel görüntüleri	61
Şekil 3.8. Fragmentasyon sonrası jel görüntüsü	63

Şekil 3.9. Okuma boyunca gerçekleştirilen yüzde dağılımları ve nitelik dağılımlarına ait grafik

Şekil 3.10. Gruplar arası gen ifade farklılığını gösteren grafik 65

Şekil 3.11. TAC'a yüklenen örneklerin ilk analiz sonuçları 67

Şekil 3.12. TAC Normalizasyon analiz sonucuna ait görsel 68

Şekil 3.13. İfade farklılığı görülen gen sayısı ve analiz ayarları 69

Şekil 3.14. Kümeleme analizi sonrası elde edilen görsel 70



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler	19
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	20
Çizelge 2.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	21
Çizelge 2.4 Kullanılan Programlar ve Yazılımlar	22
Çizelge 2.5. Organik klorlu pestisitler ve PCBler için GC-MS metodu	28
Çizelge 2.6. Organik klorlu pestisitler ve PCBler için GC fırın programı	29
Çizelge 2.7. PAH'lar için cihaz metodu	29
Çizelge 2.8. PAH'lar için GC fırın programı	30
Çizelge 2.9. Yapılan ön deneme hesapları ile workstationların hesap gücü	31
Çizelge 3.1. Kirletici analizleri validasyon sonuçları. 1. kısım	43
Çizelge 3.2. Kirletici analizleri validasyon sonuçları. 2. kısım	45
Çizelge 3.3. İnsan plasenta örneklerinde kirletici analizleri	47
Çizelge 3.4. Köpek plasenta örneklerinde kirletici analizleri	52
Çizelge 3.5. İnsan plasenta örneklerinde kirletici yükünün sigara kullanan ve kullanmayan annelere göre değerlendirilmesi ve bebek baş çevresi, doğum ağırlığı arasındaki ilişki	56
Çizelge 3.6. Köpek plasenta örneklerinde PAH yükü ve evde sigara kullanımı arasındaki ilişki	57
Çizelge 3.7. Mangal yapılan evlerde bulunan annelerden alınan plasenta örneklerinde kirletici yükünün değerlendirilmesi ve bebek baş çevresi, doğum ağırlığı arasındaki ilişki	57
Çizelge 3.8. Tüm ligandların CHRM1 ile etkileşim skorları	58
Çizelge 3.9. Tüm ligandların CHRM3 ile etkileşim skorları	59
Çizelge 3.10. Tüm ligandların CHRM5 ile etkileşim skorları	60
Çizelge 3.11. Tüm ligandların ASGP ile etkileşim skorları	61
Çizelge 3.12. Tüm ligandların CHRNA3 ile etkileşim skorları	61
Çizelge 3.13. İnsan ve köpek RNA NanoDrop Sonuçları	63
Çizelge 3.14. cRNA NanoDrop Sonuçları	64

Çizelge 3.15. ss-cDNA NanoDrop sonuçlar	64
Çizelge 3.16. Okuma kalite ve karakterizasyonu	63
Çizelge 3.17. KEGG yolak analizinde en üstteki 8 yolak	68
Çizelge 3.18. Kolinerjik sistemle ilişkili seçilen 18 genin gruplar arası karşılaştırılması	69
Çizelge 3.19. Kolinerjik sistem ile ilişkili bulunan yolak listesi	72



1. GİRİŞ

Doğum sonrası atılan plasenta, oldukça karmaşık bir organdır. Gebelik sırasında fetüsün akciğerleri, bağırsakları, böbrekleri ve karaciğeri gibi birçok fonksiyonunu gerçekleştiren özelleşmiş geçici bir organ olarak rol almaktadır. Plasenta maternal fizyolojiyi ve metabolizmayı düzenleyen ve fetüsün gelişebileceği güvenli ve koruyucu bir ortam sağlayan önemli endokrin etkilere sahiptir. Plasenta, maternal ve fetal dolaşımların birbirine yakınlaştığı, maternal ve fetal kan arasında maddelerin transfer edilmesine izin veren geniş bir değişim yüzeyi sağlayan diskoid yapı olarak kolayca tanımlanabilir bir organ olmasına rağmen, aslında biyolojik olarak tanımlamak oldukça zordur. Başka bir organ veya sistem ile mukayese dahi edilemeyecek kadar görev yüküne sahip olan plasenta, memelilerde ve hatta filogenetik sınıflandırmada düşük seviyelerde dahi görülmekte ve türlere göre tiplendirmede morfolojik çeşitlilik sağlamaktadır (Sartry, 1998).

Evrimin önemli bir özelliği, türlerin çeşitliliğindeki ve karmaşıklığındaki hiç bitmeyen yükseliştir; bu, döllenmiş bir yumurtanın olgunlaşmasının daha karmaşık hale gelmesinin ve çevresel tehlikelere karşı da bu gelişimin korunabilir kılmasının gerekliliğidir. Bu korunma, sıcaklık, basınç ve nem oranı, yırtıcı hayvanların varlığı vb. tehditlere karşı gelişimi tetikler. Bu gelişimlerle bağlantılı olarak plasenta, anne organizması pahasına güvenli bir ortamda belirli bir süre için döllenmiş yumurtanın büyümesini ve olgunlaşmasını sağlayan kilit düzenleyici organdır (Sartry, 1998).

Plasenta ve ilişkili ekstraembriyonik membranlar, gebeliğin başlangıcında zigottan oluşur ve bu nedenle fetüs ile aynı genetik bileşime sahiptir. İki ana doku kaynağı, blastosistin duvarını oluşturan trofektoderm ve altta yatan ekstraembriyonik mezodermdir. Trofektoderm, plasentanın epitelyal kısmını oluşturur ve ayrıca invaziv ekstravillöz trofoblast hücrelerinin farklı alt popülasyonunu sağlayan

trofoblasta farklılaşır. Ekstraembriyonik mezoderm, plasentanın stromal çekirdeğini oluşturur. Bunlar, fibroblastları, vasküler ağı ve yerleşik makrofaj popülasyonunu meydana getirir (Graham ve Fowden 2015).

Plasentanın bazal plakasına yalnızca birkaç desidual hücre tabakası dahil olmasına ve genellikle doğumdan sonra maternal kontaminantlar olarak kabul edilmelerine rağmen, placentanın gelişimi ve işlevi normalde ayrılmaz bir şekilde endometriyum ile bağlantılıdır. Plasentanın çeşitli ektopik bölgelerde birkaç ay boyunca bir fetüse bağlanabildiği ve onu koruyabildiği doğru olsa da trofoblast dağılımı genellikle düzensizdir. Bu düzensizlik maternal-plasental arayüz intrauterin ortamın dışındaki bölgelerde ciddi şekilde fazladır (Graham ve Jauniaux 2015).

Plasentanın gelişimi oldukça hızlıdır; çünkü organın hazır olması ve fetüsü destekleyebilmesi gerekir. Villöz oluşumlar, gebeliği takiben üçüncü haftanın sonuna doğru koryonik kesenin tüm yüzeyini kaplar. İnsan gebeliğinin ilk üç ayında fetal organ gelişimi ve büyümesinin, besinler ve büyüme faktörleri açısından zengin endometriyal bezlerden salgılarla uyarılan, fizyolojik olarak düşük oksijenli bir mikro ortamda meydana geldiği tespit edilmiştir (Burton ve ark., 2010).

Kirlilik, sigara gibi alışkanlıklar, çevresel kirleticiler, tıbbi ve eğlence amaçlı ilaçların artan kullanımı sebebiyle insan çevre habitatlarında son zamanlarda meydana gelen değişiklikler, plasental bariyerin doğal koruyucu rolünün sınırlarının olduğunu göstermiştir. Talidomid ve dietilstilbestrol gibi ilaçlar buna örnek gösterilebilir. Buna karşılık, metagenomik dizilemeden elde edilen son veriler ilaç ve çevresel kirleticilerin plasentada metabolik, fizyolojik ve diğer birçok yönüyle fonksiyonlarını bozacak şekilde etkilediğini göstermektedir. Bu alanda daha fazla bilgi, plasentalı memelilerin son 225 milyon yılda evrimleştiği karasal çevre ile etkileşimimizi daha iyi anlamak için çok önemlidir (Roberts ve ark., 2016).

İlaçların ve kimyasalların anneden fetüse geçişi, maddelerin plasentadan taşınması ve metabolizmasından etkilenir. Ayrıca bu ilaçlar ve kimyasallar,

plasentadaki besin taşıma sistemlerini etkiler. Kötüye kullanılan üç ana ilaç olan nikotin, morfin ve kokain, ilaçların plasental kolinerjik ve opioid sistemleri üzerindeki etkisinden dolayı hem insan plasental villuslar tarafından aktif amino asit alımını hem de transplasental amino asit taşınmasını baskılamaktadır (Pastrakuljic, Derewlany, and Koren 1999). Nikotin, kolinerjik reseptörü bloke eder ve böylece asetilkolin (ACh) ile kolaylaştırılmış amino asit taşınmasını engeller. Morfin, opiat kappa reseptörlerini uyarır ve ACh salınımını baskılar. Kokain, Ca²⁺ akışını engeller ve böylece ACh salınımını engeller. ACh, kan damarlarının genişlemesine neden olur ve endotelial muskarinik reseptörlerin aktivasyonu ile plasental kan akışını sürdürür (Pastrakuljic, Derewlany, and Koren 1999). Buna benzer birçok ilaç ve kimyasalın kullanımı veya maruziyeti de aynı şekilde ACh salınımı ve plasental kan akışını etkileyerek amino asitlerin ve diğer besinlerin trofoblasttan plasental dolaşıma difüzyonunu baskılayabilir.

Kalıcı organik kirleticiler (KOK'lar) küresel ölçekte her yerde bulunan çevresel kirleticilerdir. Kalıcılıklarına, biyolojik birikim potansiyeline ve vahşi yaşam ve insanlar üzerindeki toksik etkilerine ilişkin kanıtlara dayanarak, poliklorlu bifeniller (PCB'ler), organoklorlu pestisitler (OCP'ler; örneğin DDT'ler) ve polibromlu difenil eterler (PBDE'ler); Birleşmiş Milletler (BM) Çevre Programı (UNEP) ve BM Çevre Asamblesi (UNEA) tarafından 2001'den beri KOK olarak tanımlanmaktadır (Rodan ve ark., 1999). İnsanların KOK'lara maruz kalması, gelişimsel toksisite, kanser, diyabet ve endokrin bozuklukları gibi olumsuz sağlık etkilerine neden olabilir (Jeong ve ark., 2018). Genel popülasyonda bu kirletici maddelerin başlıca maruz kalma kaynakları diyet, toz gibi çevredeki ortam ve KOK içeren ürünlerdir (Lee ve ark., 2013; Yu ve ark., 2013). Fetüs, yalnızca annenin hamilelik sırasında ve hayatı boyunca kimyasal maruziyetini yansıtan bir ortam olarak kabul edilen plasenta yoluyla toksik kontaminantlara maruz kalır (Vizcaino ve ark., 2014). Bu nedenle plasental dokusu, annelerin ve fetüslerinin KOK'lara aynı anda maruz kalmasını ve fetüsün yaşam boyunca ilk maruziyetini sağlar (Ma ve ark., 2012).

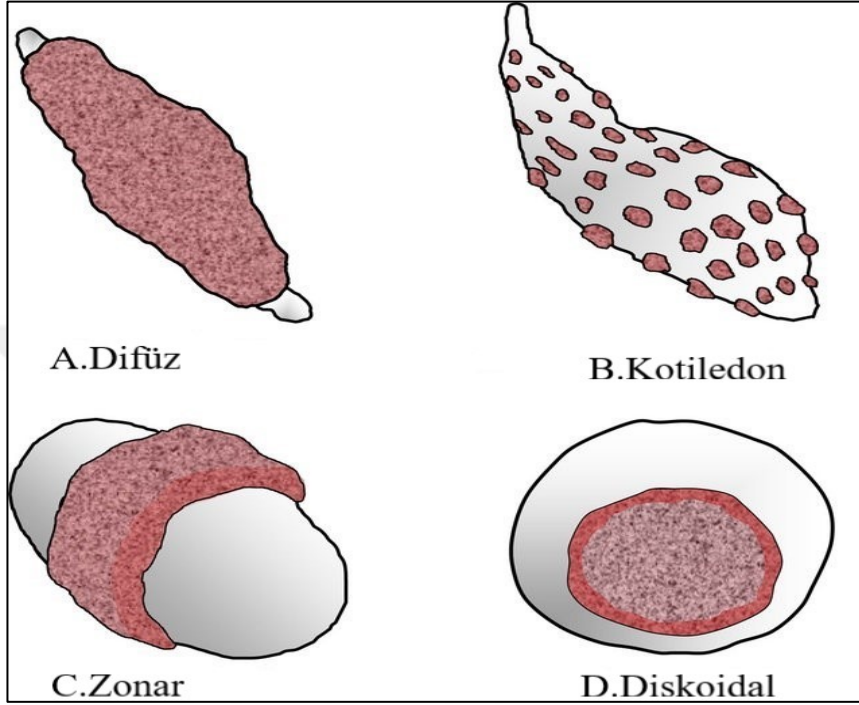
Son 20 yıl içerisinde, gebelik sürecinde anne tarafından alınan ilaç ve toksik ajanlara olan maruziyetin fetal gelişime ve yavrunun sonraki hayatına olan etkileri üzerine yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. Zayıf fetal büyüme, bozulmuş bir intrauterin yapısının en önemli göstergelerinden biri olmakla birlikte, yetişkin yaşamında koroner kalp hastalığı, diyabet ve kanser de dahil olmak üzere birçok yaygın kronik hastalığın risk artışı ile ilişkilendirilmiştir. ‘Fetal programlama’ olarak da adlandırılan, anne-yavru arasındaki etkileşim ve sonuçları; plasentanın işlevsel fonksiyonları, yapısı ve meydana gelen problemlere yönelik ilgiyi arttırmaktadır. Kalıcı organik kirleticilerin (KOK) plasentaya geçtiğine dair bazı çalışmalar kanıtlanmıştır (Leino ve ark., 2013). KOK'lara doğum öncesi maruziyetin önemine rağmen, KOK'ların plasenta yoluyla taşınması süreci ve plasentaya olan etkileri yeterince iyi anlaşılmamıştır. Bu kontaminantların taşıma süreçlerini ve plasental yolla fetüse olan etkilerini araştırmak ve plasentanın invazif olmayan bir biyolojik matris olarak uygulanabilirliğini değerlendirmek için, plasentada araştırmalara ihtiyaç vardır. Regresyon analizleri, anne kanı, plasenta, kordon kanı ve mekonyum gibi çoklu biyolojik matrislerdeki POP konsantrasyonları arasında önemli ilişkiler olduğunu göstermiştir. Bu ilişkiler, plasentanın çeşitli KOK'lara doğum öncesi maruziyetin biyolojik olarak izlenmesi için invazif olmayan bir matriks olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Gupta, 2017).

1.1. Plasentanın Morfolojik Yapısı ve Görevleri

1.1.1. Plasentanın Morfolojik Yapısı

Plasenta, anne ve fetus arasındaki fiziksel bağlantıyı sağlayan disk şeklinde bir yapıya sahip geçici bir organdır. Hamilelik sırasında plasenta, maternal-fetal değişim için daha geniş bir yüzey alanı sağlamak için büyür ve gelişir. Plasenta yapısı ve gelişimi türlere göre yapısal farklılık göstermektedir (Şekil 1.1). İnsan plasentaları implantasyonu takiben 3 ila 5 gün sonra gelişimine başlarken, yaklaşık 500-600 g ağırlığında, 15 ila 20 cm çapında, 2-3 cm genişliğinde ve yaklaşık 15 m² yüzey alanına sahiptir (Moore ve ark., 1988). Köpeklerde, implantasyon preovülatör LH

dalgalanmasından yaklaşık 18 ila 20 gün sonra (yaklaşık 8 ila 10 gün içerisinde diestrus günü) gerçekleşmekte ve ağırlığı ırklara göre farklılık göstermekle birlikte 20 ila 115 gr arasında değişiklik göstermektedir (Anderson, 1969).



Şekil 1.1. Koriyo-allantoik plasentanın biçimlerine ve endometriyumla ilişkisine göre sınıflandırılması. Plasental morfoloji ve koriyon villuslarının bağlanma alanları difüz (yaygın)-at, domuz (A), kotiledon (çanak şeklinde)-büyük ve küçük ruminant (B), zonar (kuşak şeklinde)-kedi, köpek (C) ve diskoidal (disk şeklinde)-rodent (D) olarak sınıflandırılır (Furukawa ve ark., 2014).

Plasenta ve ilişkili ekstraembriyonik membranlar, gebeliğin başlangıcında zigottan oluşur ve bu nedenle fetüs ile aynı genetik bileşime sahiptir. İki ana doku kaynağı, blastosistin duvarını oluşturan trofektoderm ve altta yatan ekstraembriyonik mezodermdir. Trofektoderm, plasentanın epitelyal kaplamasını oluşturur ve ayrıca invaziv ekstravillöz trofoblast hücrelerinin farklı alt popülasyonunu sağlayan trofoblasta farklılaşır. Ekstraembriyonik mezoderm, plasentanın stromal çekirdeğini oluşturur. Bunlar, fibroblastları, vasküler ağı ve yerleşik makrofaj popülasyonunu oluşturur (Burton ve Fowden, 2015). Kompleks bir yapıya sahip olan plasenta hücresel anlamda da heterojen bir hücre popülasyonu içermektedir. Epitelyal nitelikteki ilk farklılaşma ile meydana gelen trofoblast hücreleri; plasentanın

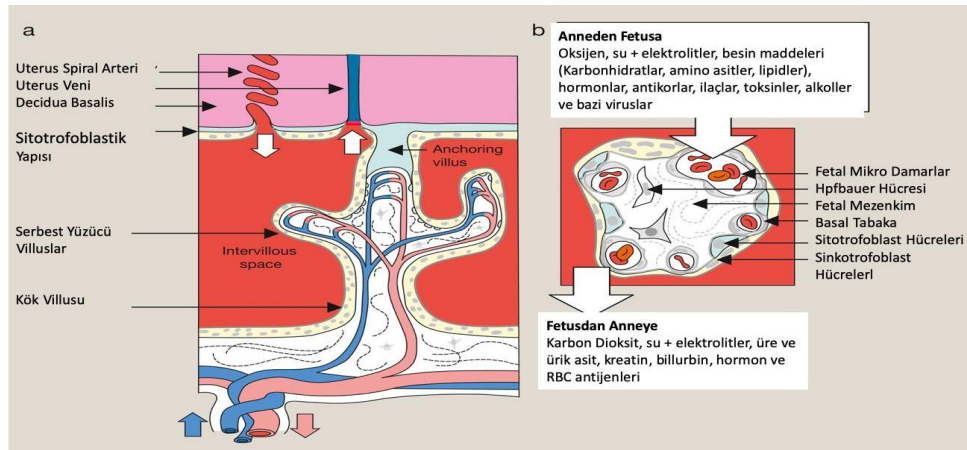
koruyucu ve besleyici özel fonksiyonlarını gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. Anatomik olarak, plasenta geniş oranda maternal-kan ve trofoblast arasındaki araya giren katman sayısına göre üç farklı gruba ayrılabilir. Trofoblastın uterus yüzey epiteline, uterin vasküler endoteline bitişik olmasına ya da doğrudan maternal kanla temas halinde olup olmamasına bağlı olarak, plasentalar sırasıyla epiteliyal (koyun ve diğer kemirgenlerde), endotelyyal (karnivorlar), veya hemokoryyal (insan ve maymun) olarak sınıflandırılır. Hemokoryyal yerleşim, çoğu kemirgende ve insanlar da dahil olmak üzere daha yüksek primatlarda ortaya çıkar. Bu plasenta çeşidi, uterin damar sisteminin yeniden şekillendirilebildiği yüksek derecede eroziv bir trofoblast ile karakterizedir, böylece maternal kanın trofoblast hücrelerinin yüzeyine doğrudan geçmesine izin verir.

Plasenta gelişimine göre türler arasında farklılık göstermektedir. Köpeklerde plasenta morfolojisi zonarlı bir yapıya sahipken (Şekil 1.2a) insanlarda diskoid yapıdadır (Şekil 1.2b). Plasenta, gelişim farklılıklarına göre de tam ve yarım plasenta olarak ikiye ayrılmaktadır. Uterus mukozası ile koryon villusları arasındaki bağın gevşekliği ve desidua yapsının olmaması yarım plasenta yapısına özgüdür. Yarım plasenta uterus ve koryon ilişkisine göre iki alt gruba ayrılmaktadır. Birincisi epiteliokoryyaldir ve bu yapıdaki plasentalara örnek olarak kısırak ve domuz verilebilir. İkincisi ise sindesmokoryyaldir ve bu plasenta yapısına örnek tür de ruminantlardır.



Şekil 1.2. Sezaryen Doğum Sonrası Alınan plasenta örnekleri. a. Köpek b. İnsan (Begüm Yurdakök Dikmen ve Recep Uyar)

Tam plasenta yapısında ise uterus ve koryon ilişki derecesine göre plasenta endoteliya-koryalis, haemo-endoteliyalis ve haemo-koryalis olmak üzere üç alt gruba ayrılır. Plasenta endoteliya koryalis yapısı karnivorlarda görülmektedir. Köpekte plasenta gebeliğin 17. günde görülmeye başlar. Bu günlerden sonra villusların sayıları artar. Villuslar endometriyuma girerek, dallanmaya başlarlar. Bu uzantılar komşu uzantıların kollarıyla birbirlerine sarılırlar ve labirent benzeri tertiplenme gösterirler. Plasenta hemo-endotelialis plasenta yapısı kobay, rat ve maymun plasentasına örnektir. Genel villus yapıları (Şekil 1.3) koryon plakasının derin yüzeyine tutturulmuş bir kök villüsünden doğar ve çapları 1-3 cm çaplarında birer küresel lob oluşturmak için tekrar tekrar dallanırlar. Lobülün merkezi, maternal spiral arterin taban plakası boyunca açılarak yerleşir. Bu açıklıklarda salınan maternal kan, uterus damarlarının açıklıklarına boşaltılmadan ve plasentadan çıkmadan önce villöz dallar arasından süzülür. Böylece, her lobül bağımsız bir maternal-fetal değişim için bir bölüm oluşturmuş olur (Knobil ve Neill, 2006).



Şekil 1.3. İnsan maternal koryonik villus (a) ve villusun enine kesiti (Donnelly and Campling 2019).

Plasentanın temel yapısal birimi olan koryonik villuslar, koryonla çevrili fetal dokunun vasküler görünüşüdür. Koryon iki hücresel tabakadan oluşur; bunlar, intervillous alan içinde maternal kanla doğrudan temas halinde olan dış

sinsitiyotrofoblast hücreleri ve iç sitotrofoblast hücreleridir. Intervillöz boşluk, villusun ulaştığı geniş bir kavernöz genişliktir. Villus olgunlaştıkça, sitotrofoblast bileşeninde belirgin bir azalma meydana gelir, böylece sadece tek bir sinsitiyotrofoblast tabakası maternal kan ve fetal kapiller endotelyumunu ayırır. Villus yapılarının son dallanmaları terminal villuslar olarak adlandırılmaktadır. Bunlar, 12-14 m²'lik bir yüzey alanına sahiptir ve fetal kılcı bir ağ tarafından zengin şekilde vaskülarize edilir. Kılcal damarlar, endoteli trofoblast örtüsüne yakın bir yaklaşıma getiren sinüzoidler olarak adlandırılan lokal genişlemeler gösterir. Bu genişlemeler, lokal olarak incilir; maternal ve fetal dolaşımlar arasındaki difüzyonu 2-3 µm'ye kadar azaltabilmektedir. Vaskülarize özelliği taşıyan membranlar olarak adlandırılan bu yapıların akciğer alveollerine olan morfolojik benzerlikleri, maternal-fetal değişimin temel yapıları oldukları varsayımına yol açmıştır. İnsanda terminal villüs, esas olarak 20 haftalık gebelik döneminden sonra oluşmakta ve villöz yapıların gelişmesi bu döneme kadar devam etmektedir (Simpson ve ark.,1992).

Villöz uzantılar epitelyal yapıda olup, hücreler arası boşluk yok denecek kadar az şekilde sıralanmış sinkotrofoblast hücreleri tarafından meydana gelmektedir. Bu özelliği sebebiyle maternal kandan geçebilecek herhangi bir patojenin doğrudan fetüse geçişini engellemektedir (Robbins ve ark., 2010). Bütün koruyucu özelliğinin yanı sıra sinkotrofoblast hücreleri peptit ve steroid hormonların büyük bir bölümünün salgılanması, ksenobiyotiklere karşı koruma ve aktif taşıma gibi birçok fonksiyonun da gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bütün bu fonksiyonlardan ötürü fetal-plasental oksijen tüketiminin %40'ı bu hücreler tarafından olmaktadır (Carter, 2000). 40 milyon yılı aşan evrimsel temellendirmelere dayanarak, sinkotrofoblast hücrelerinin, farklılaşmış sitotrofoblast hücrelerindenfüzyon mekanizması ile oluştuğu ifade edilmektedir (Mess ve Carter, 2007)

1.1.2. Görevleri

Plasenta, fetal gelişim ve korunması amacıyla birçok fonksiyona sahiptir. Fetal akciğer (gaz değişimi), gastrointestinal kanal (besin alımı) ve böbreklerin (sıvı hacminin düzenlenmesi ve atık metabolitlerinin giderilmesi) nihai işlevlerini aşamalı

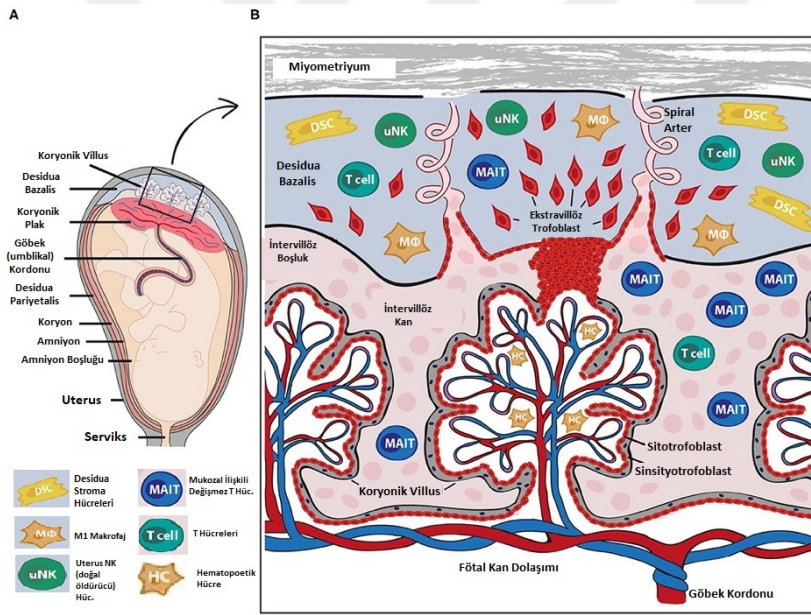
ve geçici olarak üstlenir. Aynı zamanda kendi başına bir endokrin organ görevi görerek steroid ve peptid hormonlarını her iki dolaşımında salgılar. Bütün bunların yanında birçok çevresel kirleticisi, patojen ve ilaçlara karşı da koruyucu bir görev üstlenmektedir (Donnelly ve Campling 2019).

Plasentanın birincil işlevi fetal büyümeyi ve canlılığı destekleyerek onu korumaktır. İlk olarak, plasenta, maternal ve fetal dolaşımların birbirine yakınlaştığı ve moleküllerin maternal ve fetal kan arasında kimyasalların transfer edilmesine izin veren geniş bir değişim yüzeyi sağlar. Bu değişim, fetus için yeterli besin vb. ihtiyaçlarını sağlamak için hayati öneme sahiptir. İkinci olarak, plasenta fetüsün korunmasında görevlidir. Plasenta değişim yüzeyi, maternal kan içindeki potansiyel olarak teratojenik maddelerin fetal dolaşıma girmemesini sağlayan bir özelliğe sahiptir. Bunun yanı sıra plasenta, parental antijenlerin ekspresyonuna rağmen, aktif olarak maternal immün kabulünü (plasenta ve fetus) destekleyen benzersiz immüno-modüle edici ajanlar üretir. Üçüncüsü ise, plasentanın, gebeliğin korunmasını ve fetüsün gelişimi için maternal metabolizmanın değiştirilmesini sağlayan çeşitli hormonlar üretmesi ve gebelik için endokrin sistem açısından da destek sağlamasıdır (Abramovich ve Wade, 1969; Sandler ve ark., 1963; Werner, 1956).

1.2. Plasental Bariyer ve Fonksiyonu

Kan-beyin ve kan-testis bariyerleri dışında en güçlü biyolojik bariyerlerden biri olarak bilinen plasenta, aynı zamanda fetal beslenmeyi ve gelişimi sağlar. Geçmiş zamanlarda plasenta, fetüsü maternal toksinlere karşı yalnızca pasif olarak koruyan mekanik bir bariyer olarak tanımlanırdı. 1900'li yılların başına kadar bilim insanları tarafından, plasentanın olağanüstü bir koruyuculuğa sahip olduğu ve hiçbir ilaç ve toksik maddenin plasental bariyeri geçerek fetüse ulaşamayacağı düşünülmekteydi. Ancak bütün bu iyi bilinen koruyucu özelliğine rağmen plasentanın her zaman mükemmel bir koruyuculuk sağlayamadığı, 1904 yılında, Edinburgh'da bir teratolog olan JW. Ballantyne'nin yaptığı alkolizm, kurşun zehirlenmesi ve morfin zehirlenmesi çalışmalarında gösterilmiştir (Ballantyne, 1904). 1930'ların sonlarında

ise sülfonamidlerin fetüse geçebildiği bildirilmiştir (Maland, 1939). Bunu 1940'larda ve 1950'lerde diğer birçok ilacın transplasental transferini gösteren çalışmalar takip etmiştir (Ginsburg 1971). Maternal kızamıkçığın fetüs üzerindeki etkisi ise 1941'de kanıtlanmıştır (Gregg, 1941). Ancak 1960'lara kadar plasentanın çevredeki zararlı etkilere karşı mükemmel bir bariyer olduğu inancından hareketle ilaçlar hamilelik sırasında serbestçe reçete edilebiliyordu. İlerleyen yıllarda teknolojinin gelişmesiyle birlikte, kadınlarda plasental hormon ve besin transferi üzerine yapılan çalışmalarda substrat olarak radyoaktif etiketli bileşikler kullanılmış ve daha detaylı analizler yapılabilmektedir (Werner, 1956; Sandler ve ark., 1963). Bu gelişmeleri takiben ise daha bir çok maddenin plasental yolla fetüse geçebildiği ortaya konmuştur (Ginsburg, 1971).



Şekil 1.4. Plasental bariyerde bulunan trofoblast tabakasının şematik gösterimi (Rubinchik-Stern ve Eyal, 2012).

Plasentanın temel yapısal birimi koryon villustur. Villi, koryonla çevrili fetal dokunun vasküler çıkıntılarıdır. Koryon; aralıklı boşlukta anne kanıyla doğrudan temas halinde olan dış sinsityotrofoblast ve iç sitotrofoblast olmak üzere iki hücresel katmandan oluşur (Kam ve Power 2020). Villi olgunlaştıkça, sitotrofoblast bileşeninde belirgin bir azalma olur, böylece sadece tek bir sinsityotrofoblast tabakası maternal kanı ve fetal kapiller endoteliumu ayırır. Plasentanın bariyer

fonksiyonları bu tabakalara ait sitotrofoblast bileşiminde bulunan hücrelerin özelleşmiş taşıyıcı görevleri sayesinde gerçekleştirebilmektedir. Bu fonksiyonlar başlıca: maternal ve fetal plazma arasında gaz değişimi ve besinlerin ve atık ürünlerin transferi; immünoglobulinlerin anneden fetüse aktarılmasıyla bağışıklığın aktarılması; fetal büyüme ve gelişme için önemli olan hormonların salgılanması şeklindedir (Urquhart ve Kim, 2009).

Kimyasalların plasental transferine ilişkin kanıtlar, ya plasenta, göbek kordonu kanı ve embriyo/fetüsteki bir kimyasal kalıntının veya metabolitin doğrudan saptanmasından ya da plasenta/fetüste kimyasal bir toksik maddenin neden olduğu spesifik biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Çoğu toksik madde/ilaç (d-tubokürarin, yüksek iyonize salisilatlar, pestisitler, metaller, mikotoksinler ve narkotikler gibi moleküller de dahil) plasental bariyeri geçip fetüse ulaşabilir ve böylece çeşitli toksikolojik ve teratojenik etkiler meydana getirerek plasentanın koruyucu etkinliğini aşabilmektedir. Çeşitli pestisit sınıflarının, metallerin, mikotoksinlerin ve ilaçların plasentadan transferine ilişkin bilgiler bir çok çalışmada bildirilmiştir (Gupta, 2017; Pelkonen ve ark., 2006). 1990'ların ortasından bu yana, plasental bariyerin fonksiyonel ve fizyolojik etkisi birçok bilimsel alan açısından ilgi çekici bir konu haline gelmiştir.

1.3. Plasental Toksisite

Plasenta, yapısı ve işlevi bakımından karmaşık bir organdır. Yapı, türden türe ve gelişim aşamasına göre büyük ölçüde değişir. Anne ve fetus arasında bir kimyasal bilgi akışı sağlar. Plasental toksikoloji, ilaçların, kimyasalların ve biyotoksinlerin anne, plasenta ve fetus üzerindeki toksik etkileri ile ilgilendiği için karmaşık bir konu olarak değerlendirilmektedir. Plasental toksisite, plasentanın ilaç/kimyasalla indüklenen yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin, plasentasyon, implantasyon, embriyotoksisite, fetotoksisite, büyüme geriliği, teratojenez ve nörokimyasal değişiklikler gibi birçok probleme odaklanmaktadır. Bu ilginin birincil sebebi kuşkusuz plasenta ve fetusun kimyasal toksisiteye anneden daha duyarlı olmasıdır. Plasentadaki kimyasalların neden olduğu yapısal ve işlevsel değişiklikler nedeniyle

biyokimyasal, nörokimyasal ve davranışsal sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Bu problemlerin bir kısmının doğum sonrası aşamada devam ettiği ve böylece fetüsü belirli metabolik ve nörodejeneratif hastalıklara yatkın hale getirdiği görülmektedir (Porpora ve ark., 2009).

Ksenobiyotiklerin plasental toksisitesi değerlendirilirken, toksikokinetik ve toksikodinami temeline dayanarak: (1) plasentanın ksenobiyotiklere ne yaptığı ve (2) ksenobiyotiklerin plasentaya ne yaptığı üzerinde durulur (Pelkonen ve ark., 2006; Gupta, 2006). Toksikokinetik bakış açısıyla değerlendirilen ilk başlıkta, maddelerin plasental hücrelere taşıyıcı ve pompa gibi aktif ve difüzyon gibi pasif transportu içeren mekanizmalarla girişi; dağılımı, biyotransformasyonu, atılımı ve depolanmasıdır. Plasental enzimler tarafından ksenobiyotiklerin metabolik aktivasyonu ve reaktif ara ürünlerin üretimi yine toksikokinetik ile ilişkilendirilmektedir. İkinci başlıkta, bileşiklerin plasental kan akışı ve vaskülatür üzerindeki etkileri ve membran ve hücre içi reseptörlerin, enzimlerin ve ksenobiyotikler için diğer potansiyel hedeflerin varlığı gibi toksikodinaminin çalışma konusunu oluşturan başlıklar değerlendirilir. Plasentadaki toksikokinetik ve toksikodinamik etkileşimler nedeniyle, kimyasalların fetal toksisitesi değişebilmektedir. Plasentanın sağlığı, annenin veya fetüsün sağlığı kadar önemli görünmektedir; çünkü plasentadaki kimyasalların neden olduğu hasar muhtemelen fetüsü etkileyebilmektedir (Pelkonen ve ark., 2006).

1.3.1. Kalıcı Organik Kirleticiler ve Plasental Toksisite

İnsan ve çevre sağlığını korumak, maruziyeti azaltmak için 2004 yılında yürürlüğe giren Stockholm Sözleşmesi kapsamında KOK'ların üretim ve kullanımı sınırlandırılıp yasaklanmasına karşın (PCB'ler, diklorodifeniltrikloroetan-DDT ve ana metaboliti diklorodifenil dikloroetan-DDE, polibromludifenileterler-PBDE, heksaklorobenzen-HCB), bu maddelerin kalıcılıklarına bağlı olarak toplumda düşük dozda KOK maruziyeti görülmektedir. Bu antropojenik bileşiklerden polibromlu difenil eterler poliüretan köpüklerin, mobilyaların, inşaat malzemelerinin, araba

koltuklarının ve elektronik ekipmanların (cep telefonu, televizyon kumandası gibi) imalatında alev geciktirici katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Bu bileşikler ürün malzemelerine kovalent olarak bağlanamazlar ve materyal yüzeyinden ayrılabilirdikleri için çevreye kolayca salınabilme özelliğine sahiptirler (Siddiqi ve ark., 2003). Klorlu hidrokarbon bileşiklerden PCB'lerin 209 ayrı bileşiği (konjener) bulunur. Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından karsinojenik olarak (Sınıf 1) sınıflandırılmış olup; reproduktif, gelişimsel ve endokrin bozucu etkinlik oluşturdıkları bildirilmiştir. Yasaklandığı 1977'den önce kapalı uygulamalarda (kapasitör ve transformatörler, ısı transfer ve hidrolik akışkanlar) ve kolay ulaşılabilir uygulamalarda (alev geciktiriciler, mürekkepler, yapıştırıcılar, karbonsuz kopya kağıdı, boya, böcek ilacı, boyaların mikrokapsüllenmesi, plastikleştiriciler, poliolefin katalizör taşıyıcıları, mikroskoplar için kaydırıcı yerleştirme ortamları, yüzey kaplamaları, tel izolatorleri ve metal kaplamalar) gibi pek çok malzemenin üretiminde dielektrik yalıtım malzemesi olarak kullanılmışlardır. Ayrıca belirtilen doğrudan üretimin yanında PVC üretimi veya atık yakma gibi üretim proseslerinin yan ürünleri olarak da ortaya çıkabilmektedir (Siddiqi ve ark., 2003). Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) yiyecek, su ve havada bulunabilen, kovalent olarak DNA'ya bağlanarak mutajenite ve karsinojenite oluşturan kirleticilerdendir. PAH'lar doğal ya da insan kullanımı sebebiyle organik bileşiklerin tam olarak yanmaması sonucu oluşurlar. Doğal şekilde, orman yangınları veya volkanik patlamalarla oluşurlar. İnsan kaynaklı oluşumları ise endüstriyel kaynaklar, konut ısıtma, sıvılaştırma tesisleri ve kömür gazlaştırma, motorlu taşıtlar, kömür katranı zifti ve asfalt üretimi, alüminyum üretimi, katalitik kırma kuleleri, tütülenmiş gıdalar (peynir, et gibi) ve sigara dumanı ile olmaktadır (Abdel-Shafy ve Mansour, 2016). 100'ün üzerinde PAH bileşiği bulunmakla birlikte bunlar arasında Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından 16 tanesi birincil kirletici olarak değerlendirilmektedir (naftalin, asenaften, fenantren, floranten, benzo[a]antrasen, krisen, benzo[b]floranten, benzo[a]piren, indeno[1,2,3-cd]piren, antrasen, asenaftelen, floren, piren, benzo[k]floranten, dibenzo[a,h]antrasen, benzo[g,h,i]perilen) (Alver ve ark., 2012). Organoklorlu pestisidler (OKP) ise 1940-1970 arası yaygın olarak kullanılan, ancak yarı ömürlerinin oldukça uzun olması (20-30 yıl) nedeniyle doğada parçalanmadan uzun yıllar kalabilen ve

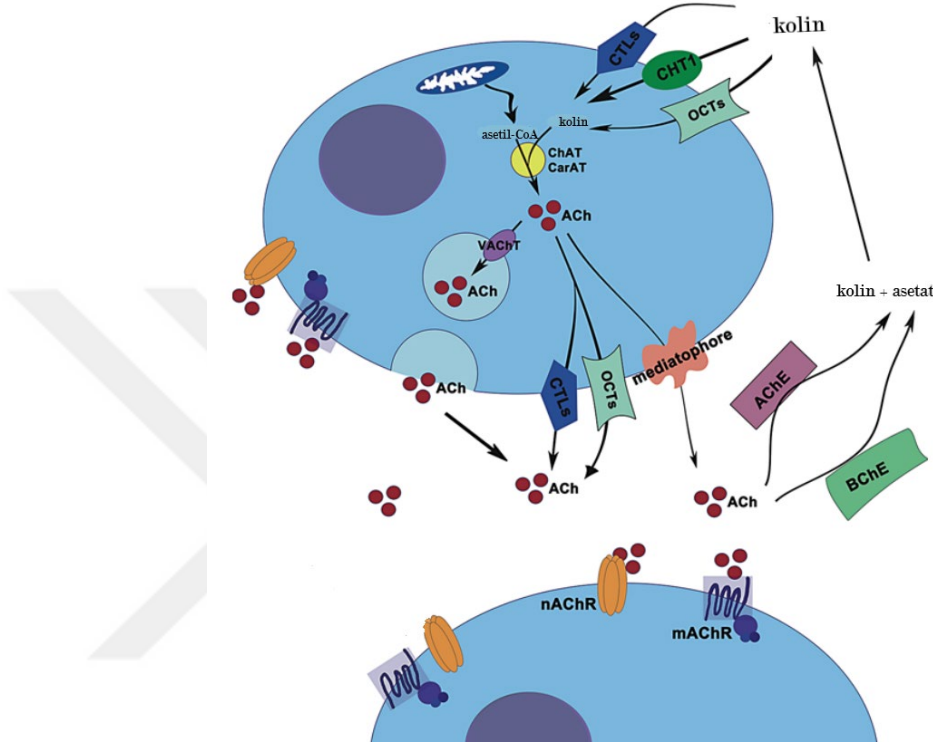
insan ve hayvanlarda biyoakümülyasyon özelliği ile endokrin, reproduktif ve nörolojik sistem başta olmak üzere toksik etkileri nedeniyle kullanımı gelişmiş ölkelerde yasaklanmış sentetik bileşiklerdendir (Jayaraj ve ark., 2016).

1.4. Plasental Kolinerjik Sistem ve Kalıcı Organik Kirleticiler

Kolinerjik sistemin bileşenleri; kolinasetiltransferaz, asetilkolin, kolinesterazlar ve kolinerjik reseptörlerdir. Bu sistemin bilinen en klasik rolü sinir sistemi hücreleri arasındaki uyarıları taşımasıdır. Hedef reseptörlerin bakış açısından, ACh nörotransmisyonu, tamamen farklı iki reseptör proteini türü ve moleküler mekanizmalar üzerinden işlevselliğini sürdürür. Bunlar metabotropik yedi transmembran olan G-proteini yapısındaki muskarinik AChR'ler (M1, M2, M3, M4, M5) ve iyonotropik pentamerik nikotinik asetilkolin reseptörleridir (nAChR'ler, çizgili kas tipi-Nm, gangliyon tipi-Ng ve nöronal SSS). Bunlardan ilki, yedi transmembran segmente sahip olan ve metabolik yollarla ilişkili hücre içi sinyallere aracılık eden reseptörlerin G-proteinine bağlı süper ailesinin üyeleridir. Bununla birlikte nAChR'ler, aynı zamanda gama-amino bütirik asit (GABA-A, GABA-C), glisin, serotonin (5-HT-3) gibi nörotransmitter reseptörleri arasında yer alan pentamerik ligand kapılı iyon kanallarının süper ailesinin üyeleridir. Metabotropik muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChR'ler), farklı G protein türlerine bağlanabilir. Bunlar arasında Gi/o tipi (mAChR'lerin M2 ve M4 alt tipleri) gibi adenilat siklaza negatif olarak bağlı olan ve Gq tipi (M1, M3 ve M5) gibi pozitif bağlı olan mAChR alt tipleri, kolinerjik sinyali metabolik yollara dönüştörmektedir. Presinaptik mAChR'ler (M2, M4 alt tipleri) büyük ölçüde inhibe edicidir. M2 alt tipi, hipokampusta ve serebral kortekste baskın otoreseptördür, M4 ise striatumdaki ana alt tiptir. Dolayısıyla postsinaptik mAChR'ler inhibitör (M2, M4) veya uyarıcı (M1, M3, M5) olabilmektedir. İyonotropik, hızlı sinyal veren nAChR'ler ise, merkezi bir por etrafında psödosimetrik olarak düzenlenmiş beş polipeptit alt biriminden oluşur. Her alt birim, bir hücre dışı alan, gözenek çevresinde üç eşmerkezli halka şeklinde düzenlenmiş dört hidrofobik transmembran segment ve kısa bir hücre dışı karboksi terminal içerir. nAChR'ler karakteristik olarak, nörotransmitterin kısa salımı / yüksek lokal konsantrasyonu koşulları altında ACh'nin

hızlı "fazık" etkilerine dahil olurlar, ancak aynı zamanda düşük, tonik ACh salımı altında veya sistemik olarak uygulanan kolinerjik ilaçları taklit ederek çalışırlar. Bu reseptörler striatumdaki kolinerjik nörotransmisyon ve / veya modülasyonu ile özellikle ilgilidir. Kas tipi nAChR'ler, çevresel sinir sisteminde ve nöronal tip nAChR'ler ise hem çevresel hem de merkezi sinir sistemi ve nöronal olmayan bağışıklık hücreleri, lenfositler, akciğer epitelyumu ve diğer dokularda ifade edilir. Merkezi Sinir Sisteminde, nAChR çeşitli alt birim kombinasyonlarında mevcuttur ($\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ ve $\beta 2$). Bunlar arasında $\alpha 4$ ve $\beta 2$ alt birimleri tarafından oluşturulan heteropentamerik reseptör ve yalnızca $\alpha 7$ alt birimleri tarafından oluşturulan homopentamerik reseptör en yaygın görülenleridir. $\alpha 4\beta 2$ nAChR ayrıca striatal GABAerjik inhibitör internöronlarda da bulunur. Embriyonal dönemde kolinerjik sistemin bileşenleri, sinir iletiminden bağımsız bir şekilde çeşitli doku ve hücrelerde tespit edilmiştir. İnnerve edilmeyen bir organ olmasına rağmen ACh'in plasentadaki varlığı ilk defa 1933 yılında Chang and Gaddum tarafından rapor edilmiştir (Chang ve Gaddum, 1933). Sonraki çalışmalar kolinerjik sistem enzimlerinin plasentadaki varlığını ortaya koyarak yüksek affiniteye sahip nikotinik reseptörlerin de varlığını bildirmiştir (Chang ve Gaddum, 1933). Daha sonraki birçok çalışmada ise bu geçici organda bulunan kolinerjik sisteme ait tüm bileşenlerin (muskarinik reseptörler de dahil olmak üzere) varlığını ortaya koymuştur (Sánchez ve ark., 2015). Kolinerjik sisteme ait bileşenlerin gebelik süresince artarak 20-22. haftalarda pik seviyelere ulaştığı bilinmektedir (Welsch, 1976). Bu değişim göz önüne alındığında kolinerjik sisteme ait bileşenlerdeki artış bu sistemin plasental büyüme ve fetal gelişimle ilişkilendirilebileceğini düşündürmüştür. Bir çalışmada ACh agonisti olduğu bilinen karbamilkolin uygulanmış ve plasental trofoblast hücreler Ca^{++} alımını stimüle ettiği görülmüştür (Welsch, 1976). Daha sonraki çalışmalarda ise Nitrik oksit sentezini arttırdığı ortaya konmuştur (Lyll ve ark., 1998). nAChR'nin ACh tarafından aktivasyonu, Na^+ ve Ca^{2+} 'nın hızlı akışına ve ardından hücreler depolarizasyona yol açar. mAChR'lerin aktivasyonu nispeten yavaştır (milisaniye ile saniye) ve mevcut alt tiplere (M1-M5) bağlı olarak, fosfolipaz C, inositol trisfosfat, cAMP ve serbest kalsiyumun hücreler homeostazını doğrudan değiştirirler (Jonkman ve ark., 1999). Bu etkileşimlerle birlikte bir takım ACh-bağımlı regülatif etkilerin olduğu görülmüştür. Bu etkiler; hücre içi amino asit alımı,

plasental veziküllerdeki kan akış hızı ve miktarı, gebelik süresince plasenta tarafından salınan koriyonik somatomammotropin ve prostaglandin hormonlarının üretimidir (Sastry ve Janson, 1994).



Şekil 1.5. Nöronal olmayan ACh'nin sentezi, salınımı, bozulması ve sinyalizasyonu. ACh: Nikotinik Asetilkolin Reseptörü, BChE: Bütilkolinesteraz, OCTs: Organik kation taşıyıcı, CTLs: Kolin Taşıyıcı Benzeri Protein, VACHT: Veziküler Asetilkolin Taşıyıcısı, ChAT: Kolin Asetiltransferaz, CarAT: Karnitin Asetiltransferaz, CHT-1:yüksek afiniteli Kolin Taşıyıcı Tip 1 (Backman ve ark., 2013).

İnsan plasentasının hem ACh hem de kolinasetiltransferaz içerdiği bilinmektedir. Plasenta kolinerjik sistemin işlevi henüz açıkça tanımlanmamıştır, ancak doğum sırasında kolinerjik sistem ile ilgili bir çok değişiklik meydana gelir ve bu değişimlerin plasental prostaglandin üretimi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Sánchez ve ark., 2015)

Plasenta tarafından amino asit alımı için üç düzenleyici sistem tanımlanmıştır: plasental ACh, fosfolipid N-metiltransferaz ve gammaglutamil döngüsü. Bu sistemler birbirleriyle uyum içinde çalışır ve adenosin 5'-trifosfatın (ATP) hücresel

oluşumuna bağlıdır. Annenin sigara ve uyuşturucu kullanımı, amino asit taşınması için plasental yetersizliklere neden olabilmekte ve bu maddelerin neden olduğu fetal intrauterin büyüme geriliğinin sebebi olduğu bilinmektedir (Sánchezve ark., 2015). Amino asit eksikliklerinin bir kısmı, yeni amino asit taşıma sistemlerinin indüksiyonu ile telafi edilebilir. Kolinerjik sisteme ait unsurlar ise bu indüksiyonun sağlanmasının öncüllerindendir (Sastry, 1997).

Tür ve ırklar arası farklılıklar (temel olarak ksenobiyotiklerin emilme, dağılma, metabolizma, atılma gibi toksikokinetik faktörlere, toksikodinamik faktörlere ve toksikogenetik özelliklere bağlı farklılıklar) göz önünde bulundurulduğunda, aynı ortamı paylaşan canlılarda kolinerjik sistemlerin araştırılması ileride bu sistemi hedef alan uygulamaların geliştirilebilmesi, yolak ve proteinlerin işlevlerinin belirlenmesi bakımından önem taşımaktadır. Çevresel unsurların hastalıkların etiyoloji ve patogenezinde türler arasında ortak rol oynayabileceği düşünüldüğünde türler arası farklılıkların, bu proteinlerin fonksiyonuna yönelik etkilerinin araştırılması ve ilişkilendirilebilmesi açısından temel oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında, sunulan yüksek lisans tezinin hipotezini, KOK'ların plasental kolinerjik sistem substratlarına olan ilgisi olduğu ve bu kirleticilere düşük dozlarda maruziyetin kolinerjik sisteme ait gen yapılarının ifadesinde değişiklikler oluşturabileceği oluşturmaktadır.

Yapılan araştırmaların çoğunluğu, plasentadaki kirletici miktarının tespiti, kirleticilerin fetüs üzerine etkilerinin farklı yönleriyle araştırılmasına yönelik olup, özellikle karışım ve düşük doz maruziyeti değerlendirildiğinde, kolinerjik sistem ile kirleticiler arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışmanın bulunmaması, bu araştırmaların gerçek yaşam maruziyet senaryoları temelinde olmaması, kimyasalların etkilerinin ayrı ayrı değerlendirilmiş olması; önerilen çalışmanın özgünlüğünü oluşturmaktadır. Köpek plasentalarında kolinerjik sisteme ait unsurların bulunduğu dair araştırmalar bulunmakla birlikte plasentanın fonksiyonel yapısındaki etkinliği ve KOK'larla ilişkili olarak değerlendirilebilecek herhangi bir çalışma yapılmamış olup plasental gelişimini ne ölçüde etkilediği dahi bilinmemektedir.

Bu bilgiler ışığında, bu tezin hipotezi, insan ve köpek plasentasında kirleticilerin, kolinerjik sisteme yönelik etkisi olduğu üzerindedir. Hipotezi test etmek üzere; tezin amacını, insan ve köpek plasentasında bazı KOK'ların (PCB28, PCB52, PCB101, PCB 118, PCB138, PCB153, PCB180; PBDE28, PBDE47, PBDE66, PBDE100, PBDE99, PBDE85, PBDE154, PBDE153 ve PBDE183; α -HCH, β -HCH, γ -HCH, HCB, 4,4'-DDE, 2,4'-DDD, 4,4'-DDT, HEP; benzo(a)piren, benz(a)antrasen, benzo(b)fluoranten ve krizen) varlığının araştırılması, plasental gen ifadesinin değerlendirilmesi ve kirletici-kolinerjik reseptörler protein etkileşimlerinin araştırılması oluşturmaktadır.

Bu amaca ulaşabilmek için aşağıdaki hedefler doğrultusunda tez çalışması tasarlanmıştır;

- Placenta numunelerinin moleküler analizler ile kirletici analizlerine uygun olarak toplanması
- Placenta numunelerinde kirleticilerin GC-MS ile tespiti
- Placenta numunelerinde Mikrodizin ve RNAseq sistemleri ile tüm genom analizi için optimizasyon ve biyoinformatik değerlendirmesinin yapılması
- İn siliko analizler ile kolinerjik sistemde görev alan ana protein ve kirletici analizinde tespit edilen kirleticilerin etkileşimlerinin yapılması

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Tez çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen deneylerde kullanılan kimyasal ve sarf malzemeleri; tez danışmanı Doç.Dr. Begüm YURDAKOK-DİKMEN'in yürütücüsü olduğu 119S702 no'lu "Çevresel Kirleticiler ve Plasental Transport Proteinleri" başlıklı TÜBİTAK 1001 Proje bütçesinden karşılanmıştır.

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal Madde Adı	Üretici Firma	Katolog Numarası
Köpek GENOM Mikrodizin Gen Çipi WT Plus Reaktif Kiti	Thermofisher/Affymetrix	901926
Mikrodizin hibridizasyon yıkama ve boyama kiti	Thermofisher/affymetrix	902281
Clariom™ D Testi, İnsan mikrodizin	Thermofisher/affymetrix	902922
Affymetrix genechip® Hibridizasyon Yıkama ve Boyama Kiti	Thermofisher/Affymetrix	900720
Asetonitril (Likit kromatografi saflığında)	Merck	M100030.2500
Asetonitril (Likit kromatografi saflığında)	Merck	SB-M100020.2500
Etil Asetat (Likit kromatografi saflığında)	Merck	SB-M100868.2500
Pastör pipeti, hacim 3 ml, uzunluk 150 mm	Merck	SB-E940050
Magnezyum sülfat (anhidroz) 1000 g analiz için	Merck	SB-M106067.1000
Falkon tüpü, pp, spinwin™, 50 ml, steril, DNaz, RNaz ve pirojenden ari	Merck	SB-E546041
İzooktan (Likit kromatografi saflığında)	Merck	SB-M104717.2500
PCB no.28 10 µg/ml (İzooktan)	Dr. Ehrenstorfer	7012-37-5
PCB no. 52 10 µg/ml (İzooktan)	Dr. Ehrenstorfer	35693-92-6
PCB no. 101 10 µg/ml (İzooktan)	Dr. Ehrenstorfer	35693-99-3

PCB no. 118 10 µg/ml (İzooktan)	Dr. Ehrenstorfer	37680-73-2
PCB no. 138 10 µg/ml (İzooktan)	Dr. Ehrenstorfer	31508-00-6
PCB no. 153 10 µg/ml (İzooktan)	Dr. Ehrenstorfer	35065-28-2
PCB no. 180 10 µg/ml (İzooktan)	Dr. Ehrenstorfer	35065-27-1
Benzo(a)piren 19 µg/ml (Asetonitril)	Dr. Ehrenstorfer	50-32-8
Benzo(a)piren 19 µg/ml (Asetonitril) (İzotop)	Dr. Ehrenstorfer	56-55-3
Benzo(b)fluranten 10 µg/ml (Asetonitril)	Dr. Ehrenstorfer	205-99-2
Krizen 10 µg/ml (Asetonitril)	Dr. Ehrenstorfer	205-99-3
Hibrid-R mini ekstraksiyon kiti	GeneAll	305-101

2.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler çizelge 2.2.'de yer almaktadır.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Liner bölmesi	Thermo	SB-0076
Filament	Thermo	SB-119701-60287-H
Septum (50/pkg)	Agilent	SB-31303211
Mikrolitre enjektör 6/pk	Thermo Finnigan	OM-5221010
DB-5MS 30m, 0,25mm, 0,25u kolon	Agilent	SB-AGT-122-5532
C18, 40um, 100gm	Sigma	SB-AGT-12213012
250ul cam insört 100/pk	Agilent	SB-AGT-5181-8872
GC için cam vial, vida kapaklı, 100pk	Agilent	SB-AGT-8010-0542

1000 ul filtreli pipet ucu	Sarstedt	
200 ul filtreli pipet ucu	Sarstedt	
10 ul filtreli pipet ucu	Sarstedt	
1000 ul filtreli pipet ucu	Sarstedt	
2 ml kriyotüp	Sarstedt	
Steril falkon tüpler 15ml	Sarstedt	
Steril falkon tüpler 50ml	Sarstedt	
Steril 2ml ependrof	Sarstedt	
Maske	Yerli	
Nitril eldiven	Yerli	

2.1.3 Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 2.3.'de yer almaktadır.

Çizelge 2.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Üretici Firma
Laminar akımlı kabin	Telestar
-80 derin dondurucu	Panasonic
Sterilizatör	Yerli
Su arıtma cihazı	Millpock
Yatay elektroforez tankı	Biorad
Mikrodalga fırın	Yerli
Pipet 1000 ul	Gilson
Pipet 100 ul	Gilson
Pipet 10 ul	Gilson
Kırık buz makinesi	Yerli
Santrifüj	Thermo Scientific
Güç kaynağı	Biorad
Vorteks	
UV jel görüntüleme	Kodak
Hassas Terazî	Yerli
Azot Tankı	
Çeker ocak laminar kabin	
Azotlu evaporatör	VLM, Bielefeld
Microarray	Affymetrix, Thermo Fischer
GC-MS	Thermo Finnigan
Homojenizatör	Bandelin hd2200

2.1.4 Kullanılan Programlar ve Yazılımlar

Tez çalışmasında kullanılan program ve yazılımlar Çizelge 2.4.'de yer almaktadır.

Çizelge. 2.4 Kullanılan Programlar ve Yazılımlar

Yazılım/Program Adı	
Autodock Vina	Açık erişim
Gromacs 2019-1	Açık erişim
Pymol-20	Açık erişim

2.2. Yöntem

Çalışmada uygulanan analiz yöntemleri ve prosedürleri bu bölümde anlatılmıştır.

2.2.1. Plasenta Örneklerinin Alınması

Araştırmanın evrenini, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Servisinde canlı doğum yapan anneler ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hastanesi Doğum ve Jinekoloji Kliniği'nde miyadında (58-63 gün) canlı doğum yapan (1-6 yaş) dişi köpekler oluşturmaktadır.

Çoğul gebelikler, erken doğumlar, sistemik hastalığı olanlar, gebelik toksikozu, preeklampsi, erken membran rüptürü, gebelikte hipertansif durumlar, hiperemesis gravidarum gibi gebelik komplikasyonları ile gebelik öncesinde var olan bazı sağlık durumlarıyla (kronik sistemik hastalıklar- kalp, böbrek gibi, diyabet) karşılaşılan anneler çalışma kapsamına alınmadı. Örneklemeye alınan kadın hastalar için gebelik süresince düzenli olarak ultrasonik muayenesinin yapılması ve eylemsiz sezaryen ile doğum yapma şartı arandı. Köpeklerde ise gebelik komplikasyonu, erken doğum, sistemik hastalıklar ve düzenli aşılması

yapılmayan hayvanlar çalışma kapsamına alınmayarak; sezaryen ile doğum yapan hastalar çalışmaya dahil edildi.

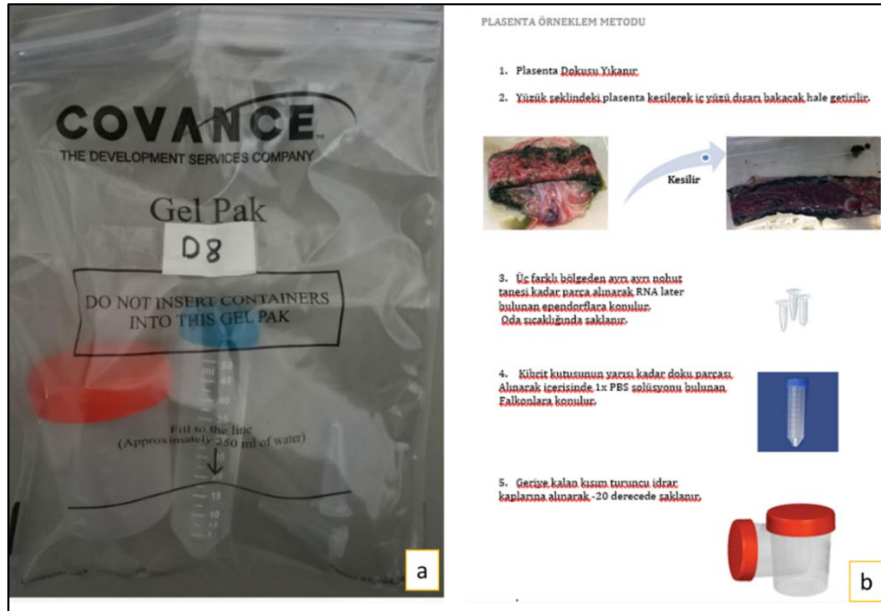


Şekil 2.1. Hacettepe Üniversitesi insan plasentası toplanması.

Araştırma; Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (Etik Kurul Onayı: 07.03.1019 tarih ve 2020/06-01 sayılı karar) ve Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (Etik Kurul Onayı: 19.02.2020 tarih ve 2020-4-30 sayılı karar) belirlemiş olduğu etik ve Helsinki Bildirgesi prensipleri göz önünde bulundurularak yapıldı. Örneklemeye dahil edilecek annelerden “Aydınlanmış Onam Formu” alınacak ve annelere maruziyet kaynaklarını belirlemeye yönelik 25 soruluk bir anket uygulandı (anket formu Etik Kurul Onay Belgesi içerisinde ekte sunulmuş ve ilgili etik kurul tarafından onaylanmıştır). Anket uygulaması Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Neonatoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi H. Tolga Çelik tarafından yapıldı. Patolojik numunelerin ayırt edilmesi işlemi Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Patoloji Anabilim Dalı'nda Prof.Dr. Diclehan Orhan gözetiminde yapıldı ve bu numuneler araştırmaya alınmadı. Benzer şekilde hayvan sahiplerinden “Aydınlanmış Onam Formu” alınacak ve hasta anamnez kartı (anamnez kartı Etik Kurul Onay Belgesi içerisinde ekte sunulmuştur) ilgili veteriner hekim (Doç.Dr. Halit Kanca veya Dr. Kübra Karakaş) tarafından dolduruldu. Hacettepe Üniversitesi'nden örnek alımı sırasında alınan görsel Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.

ayrılan örnekler Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne, kirletici analizi için ayrılan örnekler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na götürüldü.

Tez aşamasının yaklaşık tamamını kapsayan dönem içerisinde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hastanesi Doğum ve Jinekoloji Kliniği'ne gelen sezaryen sayısındaki düşüş sebebiyle çalışmaya dahil edilebilen köpek sayısı 16'dır. Örneklem büyüklüğünün seçilmesinde güç analizi (power analysis) yapıldı. Buna göre, Literatür değerlendirmelerine göre ve tip 1 hata olasılığı (α) = 0.05, güç ($1-\beta$) = 0.80 kriterleri kullanılarak plasentalarda araştırılacak kalıcı organik kirleticilerin maddesinin bulunma prevalansının belirleneceği araştırma düzeninde (tespit edilen kirletici miktarına göre), tahmini prevalans en yüksek %10 olmak üzere, toplamda minimum 6 örneğin çalışmada yer almasının uygun olacağı hesaplandı. Güç analizinin yapılmasında G*Power Version 3.1.9.2 hesaplama aracından ve evren oranını tahmin etmek için kullanılan yöntemden yararlanıldı (Erdfelder ve ark., 2009).



Şekil 2.3. Köpek plasentalarının örnek alımı için hazırlanan kitler ve açıklaması

2.2.2. Kirletici Analizi

Dokularda kalıntıları araştırılan analitler 6 indikatör poliklorlu bifenil (PCB28, PCB52, PCB101, PCB138, PCB153, PCB180) ve dioksin benzeri PCB olan PCB118 ile, 9 polibromlu difenileter (PBDE28, PBDE47, PBDE66, PBDE100, PBDE99, PBDE85, PBDE154, PBDE153 ve PBDE183), 8 organik klorlu pestisit (α -HCH, β -HCH, γ -HCH, HCB, 4,4'-DDE, 2,4'-DDD, 4,4'-DDT, HEP) ve 16 PAH [benzo(a)piren, benz(a)antrasen, benzo(b)fluoranten, krizen, naftalin, asenaftelen, asenaften, flören, fenantren, antrasen, floranten, piren, indeno (1,2,3,c,d)piren, dibenzo(a,h)antrasen, benzo(g,h,i)perilen) olmak üzere toplam 40 kirleticidir. Plasenta dokularından kirletici analizi için ekstraksiyon işlemi; Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı. Analitlerin ayrımı ve kantitatif belirleme işlemi de yine aynı birimde bulunan GC-MS cihazı (Thermo Finnigan Trace GC Polaris Q, San Jose, CA, Amerika Birleşik Devletleri) ile gerçekleştirildi. Kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıkta tercih edildi.

GC-MS analizi için ayrılan numuneler, laboratuvara getirilmelerini takiben homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Örnekler toplandıkları gün veya en fazla 2 gün içinde analize alındı, analize alınana kadar -20 °C'de buzdolabında bekletildi. Analitlerin ekstraksiyonunda Kuzukıran ve arkadaşları (2018) ve Vizcaino (2014) yöntemleri laboratuvar koşullarında uyarlandı (Kuzukıran ve ark., 2018; Vizcaino ve ark., 2014). Yöntem laboratuvara uyarlandıktan sonra valide edildi. Yöntem validasyonu için plasentaya 5 farklı konsantrasyonda standart çözeltiler ilave edilerek ekstraksiyonun tamamlanması ve GC-MS'de değerlendirilmesini takiben hesaplanacak spike geri kazanım, standartlara göre karşılaştırıldı. Standart eğrinin çizilmesini takiben, spike standart eğrisi çizildi ve lineer aralık belirlendi. Gün içi ve günler arası değerlendirme doku spike işleminin üçerli tekrarı halinde ve üç farklı günde değerlendirmesine göre yapıldı. Yöntem tam olarak geliştirilip laboratuvara valide edildikten sonra, örnek analizine başlandı.

Bunun için homojenize edilmiş olan dokulardan 1 g tartılarak cam santrifüj tüpüne aktarılarak, üzerine 5 mL aseton:etil asetat:izooktan (2:2:1), h/h) karışımı eklenerek, 20 dk vorteksle karıştırıldıktan sonra 6°C'de 5 dk 4500 g'da santrifüj

(Hettich, universal 320R, Almanya) edilerek, supernatant kısmı başka bir cam tüpe alındı. Üzerine 0,4 g NaCl ilave edilerek 30 s vorteksle karıştırılıp 6°C’de 5 dk 4500 g’da santrifüj edildi. Supernatant kısmı başka bir cam tüpe alındı. Üzerine 2 g MgSO₄ ilave edilerek 30 s vorteksle karıştırılıp 6°C’de 5 dk 4500 g’da santrifüj edildi. Süpernatant alınarak 35 °C’de azot evaporatorü (VLM, Bielefeld, Almanya) altında 1 mL kalana kadar uçuruldu. Kalan bu sıvı kısım önceden hazırlanan ve 3 mL asetonitril ile şartlandırılan, cam pamuğu, 0,2 g PSA, 0,5 g C18 ile 0,2 g MgSO₄ içeren cam kolondan geçirildi. Bu işlemin ardından 3x1 ml asetonitril ile yapılan toplama işlemini takiben tüm çözücü uçana kadar 35 °C’de azot altında uçurma işlemi uygulandı. Kuru kalıntı 100 µL izooktan ile toplanarak GC-MS cihazına uygulandı. Cihazda kullanılmış olan silica-kapillar kolon (DB-5MS; 30 m x 0.25 mm çap; 0.25 µm film kalınlığı) olup, analitler, seçilen iyon izleme (SIM) moduna göre belirlendi.



Şekil 2.4. Tez çalışmalarının gerçekleştirildiği GC-MS cihazı

Cihazda organik klorlu pestisitler ile PCB’ler için ayrı, PAH’lar için ayrı metot geliştirildi, optimize ve EUROCHEM’e göre valide edildi. Bunlar için belirlenen cihaz metotları çizelge 2.5.,2.6.,2.7.,2.8.’da sunulmuştur.

Çizelge 2.5. Organik klorlu pestisitler ve PCBler için GC-MS metodu

METOT-1					
Zaman Aralığı (dk)	Analit	Alıkonulma zamanı (dk)	İyonlar		
			Q1	Q2	Q3
11,00-14,25	Alfa HCH	12,17	181	183	219
	Hekzaklorobenzen	12,31	284	286	282
	Gamma HCH	13,00	183	181	219
	PCB30**	13,12	186	258	256
	Beta HCH	13,24	183	181	219
14,25-16,15	PCB28	15,43	186	258	256
	Heptaklor	15,76	272	270	274
16,15-20,40	PCB52	16,64	220	257	292
	Aldrin	17,58	263	293	-
	Alfa-endo	20,16	251	253	183
20,40-23,50	PCB101	21,36	254	326	328
	Dieldrin	22,45	239	237	235
	4'4-DDE	23,04	246	248	318
23,50-25,50	PCB118	24,82	326	256	254
	PBDE28	25,17	246	248	406
	4'4 DDD	25,20	235	165	237
	2'4 DDT	25,47	235	165	237
25,50-26,50	PCB153	25,84	290	360	288
	PCB153-C13*	25,84	372	302	374
26,50-30,30	PCB138	27,01	290	360	288
	4'4 DDT	27,34	235	165	237
	Metoksiklor	29,68	227	274	
30,30-33,10	PCB180	30,13	324	396	394
	PBDE47	30,36	486	488	484
	PBDE66	31,11	326	486	484
33,10-45,20	PBDE100	33,58	404	406	566
	PBDE99	34,67	404	406	566
	PCB209*	36,10	498	428	500
	PBDE85	36,63	404	406	566
	PBDE154	37,26	484	486	482
	PBDE153	38,52	484	486	482
	PBDE183	42,95	564	562	566
*	İnternal standart				

**	Enjeksiyon internal standardı
----	-------------------------------

Çizelge 2.6. Organik klorlu pestisitler ve PCBler için GC fırın programı

	Hız (C/dk)	Isı (C)	Bekletme süresi (dk)
Fırın Programı		70	2
	25	150	0
	5	200	5
	5	270	2
	25	290	5
	Toplam süre		44

Çizelge 2.7. PAH'lar için cihaz metodu

METOT-2					
Zaman Aralığı (dk)	Analit	Alıkonulma zamanı (dk)	İyonlar		
			Q1	Q2	Q3
5,00-9,70	Naftalen D8*	5,92	108	136	
	Naftalen	5,97	128	129	102
	Asenaftilen	8,64	150	153	152
	Asenaftilen d10*	9,02	164	162	
	Asenaftilen	9,07	154	153	
9,70-17,00	Floren	10,58	166	165	163
	Fenantren d10*	13,75	188	189	
	Fenantren	13,85	178	152	176
	Antrasen	14,07	178	176	152
17,00-32,00	Fluoranten	19,86	202	200	203
	Piren	21,38	202	200	201
	Benzo(a)antrasen	29,34	228	226	229
	Krizen d12*	29,19	240	236	
	Krizen	29,34	228	226	
32,00-45,20	Benzo(b)fluoranten	34,44	252	253	
	Benzo(k) fluoranten	34,60	252	253	
	Benzo(a)piren	35,96	252	253	
	Perilen d12*	36,24	264	260	
	Indeno(1,2,3-cd)piren	41,20	276	277	
	Dibenz(a,h)antrasen	41,47	278	279	
	Benzo(g,h,i)perilen	42,29	276	277	

Çizelge 2.8. PAH’lar için GC fırın programı

	Hız (C/dk)	Isı (C)	Bekletme süresi (dk)
Fırın programı		70	2
	25	150	0
	5	200	5
	5	270	2
	5	290	5
	Toplam zaman		45,2

2.2.2. *İn Siliko* Analiz

Plasental proteinlerin kirleticilerle etkileşimi kapsamında; kirleticilerin hangi afiniteyle bu proteinlere bağlandığının belirlenmesi amaçlandı. Özellikle maruziyet esnasındaki karışım halindeki kirleticilerin, hangi protein ekspresyonunu nasıl değiştirebileceğinin bilinebilmesi, çoklu maruziyete bağlı olarak protein fonksiyonunu değiştirmesi (azaltması/arttırması/fonksiyonunu etkilemesi) sonucu hangi kimyasalların plasental kolinerjik sisteme ait bileşenleri etkileyebileceği bakımından önem taşımaktadır. Bu sebeple mikrodizin-GC/MS sonuçlarından elde edilen veriler (biyoinformatik ve istatistik sonuçları) ve literatür bilgisiyle (ksenobiyotiklerle indüklenen kolinerjik sisteme ait proteinler) seçilerek proteinin, kirleticilerle ilişkisi *in siliko* olarak molekül hesabı, moleküler dinamik, moleküler docking metodları kullanılarak değerlendirildi.

Analizler için Ankara Üniversitesi bünyesinde hali hazırda bulunan 3 adet HP Z820 iş istasyonu (Workstation) kullanıldı. Yapılan ön deneme hesapları ile iş istasyonlarının hesap gücü Çizelge 2.9’da verilmiştir. Hesaplama testi için demo olarak kullanılan 1 adet NVIDIA TESLA GPU ile de elde edilen veriler aynı çizelgede paylaşıldı. Bu veriler ışığında hesaplama sunucularına 1 adet GPU kartı desteğiyle birlikte yapıldı.

Çizelge 2.9. Yapılan ön deneme hesapları ile iş istasyonlarının hesap gücü

	Gaussian 09	Gromacs 2019-1	Autodo ck Vina
HP Z820 (GPU'suz)	3 gün (Sözkonusu kirleticiler içerisinde en büyük molekül denenmiştir.)	15 ns/gün	8 saat
HP Z820 (GPU'lu)	(Elimizde bulunan lisanslı Gaussian sürümünün GPU desteği yoktur.)	4 ns/gün	3.5 saat

2.2.2.1. Molekül Hesabı

Bu yöntem kirleticilerin 3 boyutlu uzaydaki konformasyonlarını hesaplamak için kullanıldı. Bununla birlikte, protein-ligand etkileşimlerinde büyük öneme sahip humo-lumo enerjileri ve tüm molekülün elektrostatik yük yoğunlukları hesaplandı. Bu aşamada, hesaplamalar için Gaussian09 programı, hesap sonuçlarını görüntüleme ve molekül çizimi için Gaussview 09 programı (Ankara Üniversitesi lisanslı) kullanıldı (Carpenter ve ark., 1988; Foster ve ark., 1980; Naaman ve ark., 1988; Reed ve ark., 1988).

Hesaplama basamakları ve parametreleri şu şekildedir:

- DFT hesabı için; Basis set: B3LYP/6-31G (d orbitali için)
- Frekans kontrolü için; Basis set: 6-311 (2d, 2p orbitali için)

2.2.2.3. Moleküler Dinamik

Bu hesaplar sonucunda her bir amino asidin proteinin yapısındaki rolünü, diğer amino asitlerle ilişkisini, proteinin yapısal kararlılığını, ikincil yapıdaki oluşumları (alfa helix, beta sheet) gibi birçok değişkenin analizi yapılabilir (Jensen, 2001;

Seminario, 2007). Tez çalışmasında kullanılan analizlerden birisi, proteinin ligandla etkileştiği aktif bölgesini oluşturan amino asitlerin analizidir. Bu analiz, protein-ligand etkileşimi üzerine kurulan hipotezimizi desteklemek için kritik önemdedir. Analiz sonuçlarından, hangi amino asitlerin ligand etkileşiminde kritik rol oynadığı ve hangi amino asitlerin proteinin yapısal kararlılığını sağladığı gibi olayları aydınlatmayı hedeflemekteyiz. En yüksek afiniteye sahip moleküller için Moleküler Dinamik Simülasyon işlemleri Gromacs 2019-1'de (program ücretsizdir) yürütülecektir (Abraham ve ark., 2015; Páll ve ark., 2015; Van Der Spoel ve ark., 2005). Serbest enerji hesaplamaları ise G* MM/PBSA aracı ile Moleküler Mekanik Poisson Boltzmann Yüzey Alanı MM/PBSA metoduna göre hesaplanacaktır. Docking analizinden sonra elde edilecek yüksek afiniteli ligandlar için MM/PBSA (Poisson-Boltzmann surface area) serbest enerji hesaplamaları kullanılacaktır.

Hesaplama basamakları ve parametreleri şu şekildedir:

a. Tüm simülasyonlar 300 Kelvin'de, amber99SB-ildn güç alanı (Kresten Lindorff-Larsen, 2010), TIP3P (Jorgensen ve ark., 1983) su modeli ve LINCS (Hess ve ark., 1997) algoritmasıyla yapılacaktır. Nose-hoover thermostat ($t_c=1.0$ ps), Parrinello-Rahman (Shamriz ve ark., 2016) barostat ($t_p=2.0$ ps ve sıkıştırılabilirlik= 4.5×10^{-5} bar), Coulomb etkileşimleri için paritcle mesh Ewald algoritması (cut-off = 1.0 nm), Van der Waals etkileşimleri için Lennard Jones fonksiyonu (cut-off = 1.0 nm) kullanılacaktır.

b. NPT ve NVT için süre 10 ns MD için 200 ns olacaktır.

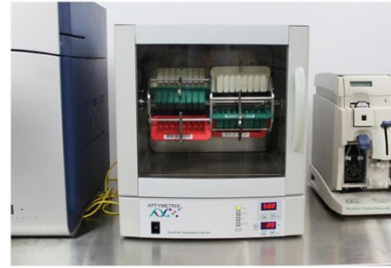
2.2.2.4. Moleküler Kenetleme (Docking)

Docking analizi, birbirine ilgisi olan moleküllerin (önerilen çalışmada, kirleticiler ve kolinerjik sisteme ait bileşenler) etkileşim süreçlerinin aydınlatılmasında kullanıldı. 1. ve 2. adımlar sonucunda elimizde iki tane kararlı yapıda ve 3 boyutlu uzaydaki konformasyonu belli olan molekül elde edildi. Docking analizinde bu iki molekülün (protein-ligand etkileşimi) birbirleriyle olan ilişkisi incelendi (Yu ve ark., 2017). Bu analiz sonrasında ligandın proteinin hangi

epitoplarına hangi enerji değerleriyle bağlandığı değerlendirildi. Bu aşamada Swissdock (Grosdidier ve ark., 2011) (ücretsiz) ve Autodock Vina (ücretsiz) programları kullanıldı. Protein-ligand etkileşimleri ise enerji değerleri üzerinden değerlendirildi.

2.2.3. Mikrodizin Analizleri ve Biyoinformatik Analiz

Mikrodizin verileri kimyasalların plasentanın fonksiyonel yapısını ve fizyolojisini etkileyerek moleküllerin fetüsün sağlığı ve gelişiminde rol oynayabilecek farklı gen bölgeleri (sitokrom p450 enzimleri, aril hidrokarbon reseptörleri, muskarinik ve nikotinik kolinerjik reseptörler, östrojen ve androjen reseptörleri gibi ksenobiyotiklerle etkileşim içerisinde olan), genel metilasyon bölgelerinin saptanması gibi aynı anda farklı pek çok genin analiz edilmesini sağlamaktadır. Araştırmanın bu adımı Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Moleküler Laboratuvarı'nda Prof. Dr. Hilal Özdağ'nın değerlendirme ve gözetiminde gerçekleştirildi. Köpek ifade analizi ise Epigen Biyoteknoloji firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

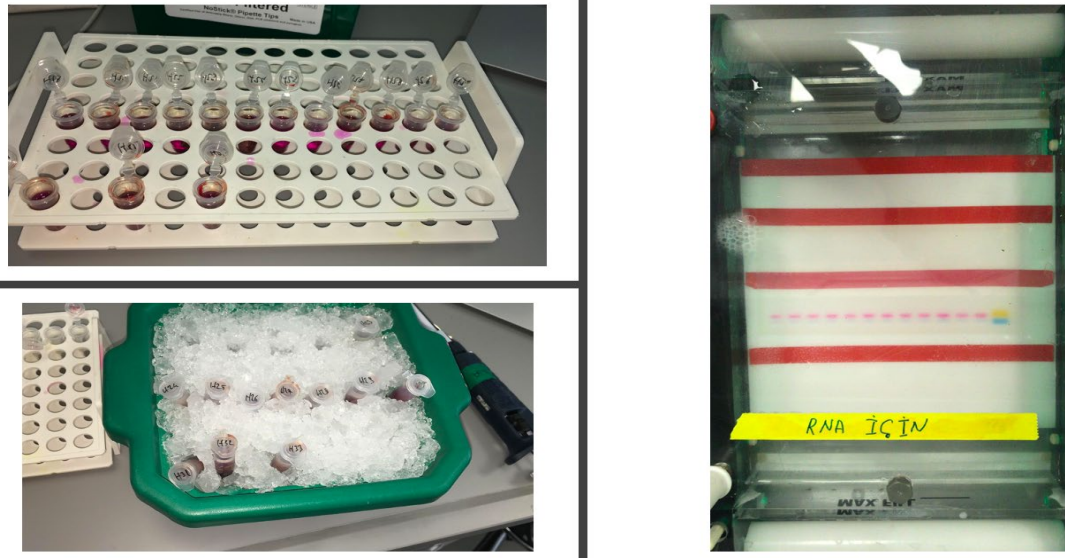


Şekil 2.5. Deneyin gerçekleştirildiği mikrodizin ünitesi

2.2.3.1. RNA İzolasyonu

RNA-stabilizasyonu sağlanması amacıyla azot tankında saklanan örneklerden RNA izolasyonu, tamamen RNAaz ari şartlarda GeneAll Hybrd-R hazır

kiti (GeneAll, Güney Kore) kullanılarak yapıldı. RNA konsantrasyonu NanoDrop ND-1000 Spektrometre (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) ile tayin edildi. RNA örneklerinin kalitesi, %1'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi. Jel görüntülerinde 28S/18S oranı yaklaşık 2 olanlar ile absorbans 260/280 oranı 2.0-2,2 arası olan örnekler çalışmaya dahil edildi. Örnek kalitesi çalışmaya devam edecek düzeyde değil ise hastanın yedek örneğine dönüldü ve izolasyon işlemi tekrarlandı.



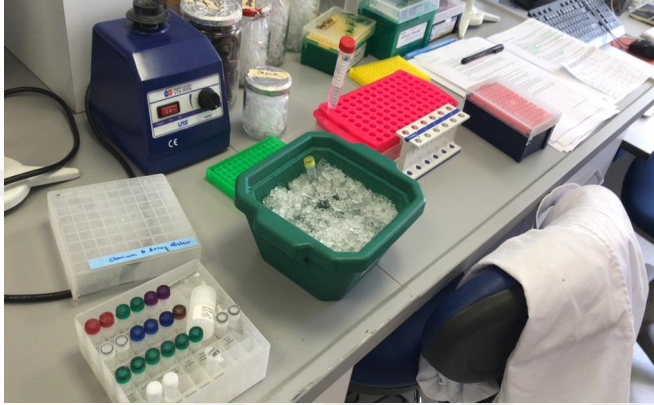
Şekil 2.6. RNA ekstraksiyonu ve sonrasında jel yürütülmesi

2.2.3.2. Transkriptom Profilleme Analizleri

2.2.3.2.1. cRNA ve ss-cDNA Sentezi, Fragmentasyon ve İşaretleme

Bu işlemler üretici protokolünde belirtildiği gibi (Clarium D assay human, Affymetrix) cRNA sentezi doku örneklerinden izolasyonu yapılarak elde edilen amplifiye RNA örneklerinden “GeneChip Expression 3’ IVT kullanılarak biotin ile işaretli cRNA sentezi gerçekleştirildi. Bu işlem sırasında ilk iplik cDNA sentezi gerçekleştirilmesini takiben ikinci iplik cDNA üretimi gerçekleştirildi. Daha sonra

16 saatlik in vitro transkripsiyon sentezi ile cRNA üretimi gerçekleştirildi. Bu işlem sonrasında cRNA purifikasyonu sağlanarak cRNA konsantrasyonu NanoDrop ND-1000 Spektrometre (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) ile ölçülerek bir sonraki aşamaya geçilebilmesi için yeterli olarak belirtilen 15 μg 'a ulaşıp ulaşılmadığı tespit edildi. Edilemeyen örnekler için başa dönülerek yeniden cRNA sentezi tekrarlandı.



Şekil 2.7. Fragmentasyon aşaması.

cRNA miktarları 15 μg 'dan fazla olan örnekler ile çalışmaya devam edildi. Örneklerden elde edilen konsantrasyonlara göre hesaplanarak bütün örneklerden 625ng/ μl olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra örnekler ikinci döngü ss-cDNA sentezi gerçekleştirilerek RNA hidroliz aşamasına geçildi. Elde edilen ikinci döngü ss-cDNA'larının purifikasyonu gerçekleştirildi. Purifikasyonu takiben elde edilen ss-cDNA örneklerinin konsantrasyonu NanoDrop ND-1000 Spektrometre (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) ile ölçüldü. Elde edilen ss-cDNA miktarları 4,4 μg 'dan büyük olanlar ile çalışmaya devam edildi. Toplamda 176 ng/ μl olacak şekilde tüm örnekler hesaplanıp dilüsyonları yapılarak fragmentasyon aşamasına geçildi.

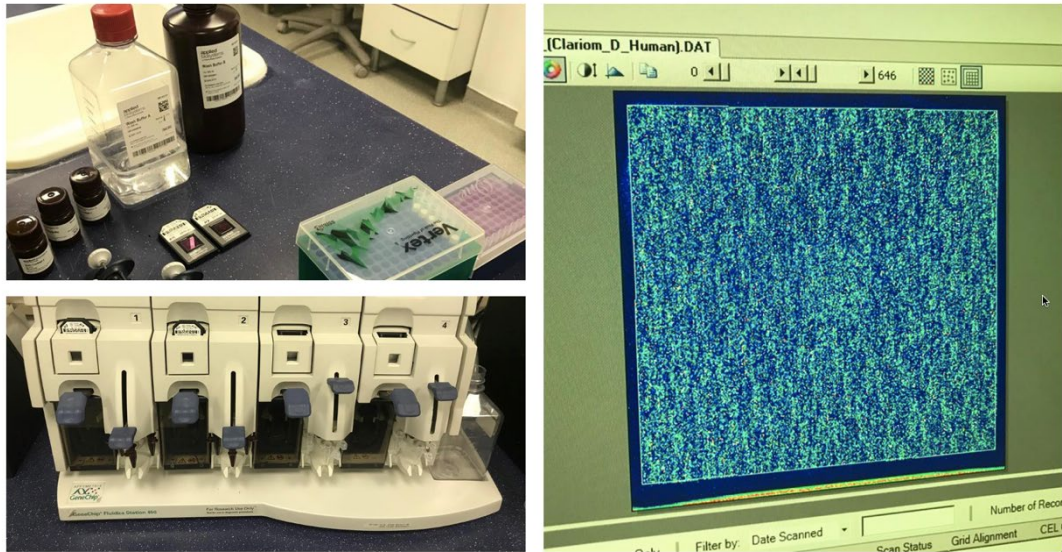
Fragmente edilen örneklerin aynı ölçüde fragmente olup olmadığını değerlendirmek amacıyla elde edilen örnekler %4'lük agaroz jelde yürütüldü. Fragmentasyon aşaması başarıyla gerçekleşen örneklerle işaretleme yapıldı.



Şekil 2.8. Örneklerin mikrodizin çiplerine yüklenmesi ve hibridizasyon aşaması.

2.2.3.2.2. Hibridizasyon, Yıkama-Boyama ve Okuma

İşaretleme aşamasını takiben hibridizasyon aşamasına geçilerek çiplerin 16 saat boyunca 45 °C, 60 rpm’de inkübasyonu sağlandı. İşaretli cRNA örnekleri Affymetrix Clariom D Plus GeneChip mikrodizinlerine hibridize edilmiş örnekler yüklendi. Yıkama ve boyama işlemlerini takiben Affymetrix GeneChip Scanner 3000’de tarandı.



Şekil 2.9. Yıkama-boyama işlemi sırasında çekilen görüntü ve okuma sonrası alınan ham veri görüntüsü

2.2.3.3. Köpek RNA Dizileme Analizi

RNA dizileme(transkriptom analizi), transkripsiyon sonrası modifikasyonlar, gen füzyonu, mutasyon/SNP (Tek nükleotit polimorfizmi), belirli bir andaki gen ifadesi ve farklı gruplar veya tedavilerde gen ifadesi farklılıklarını incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Toplanan köpek plasenta örneklerinin transkriptom analizi BGI Genomics şirketi tarafından DNA Nanoball (DNA nanotop) dizileme teknolojisi kullanılarak DNBseq™ dizileme platformunda yapıldı. Gönderilen total RNA izolatlarından mRNA izolasyonu ve fragmentasyonu yapılmış ardından cDNA senteziyle birlikte PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) adaptörlerinin 3' adenilasyonu tamamlandı. Adenilasyonu sağlanan cDNA parçaları PZR ile amplifiye edilmiş ve Ampure XP Beads (AGENCOURT) ile saflaştırılmıştır. Kitaplık kalite kontrolü Agilent Technologies 2100 biyoanalizöründe doğrulandı.

Elde edilen çift sarmallı PZR ürünleri ısı ile denatüre edilip tek sarmallı sirküler DNA (ssCir DNA) haline getirilerek kütüphaneye eklendi. Kütüphane içeriği Φ 29 DNA polimeraz ile DNA nanotop (DNB) dizilemesi için 300'den fazla kopyaya amplifiye edildi. Oluşturulan DNA nanotopları yeni nesil yüksek verimli nano-dizileme platformunda, sentezleme yoluyla dizileme tekniği kullanılarak dizilendi.

2.2.3.4. Biyoinformatik Analizler

Mikrodizin sonuçlarına ilişkin biyoinformatik analizler (farklı ifade edilen gen setlerinin belirlenmesi, ontoloji ve yolak analizleri) BRB Array Tools, TAC, DAVID, platformlarında Prof. Dr. Hilal Özdağ gözetim ve kontrolünde Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde gerçekleştirildi.

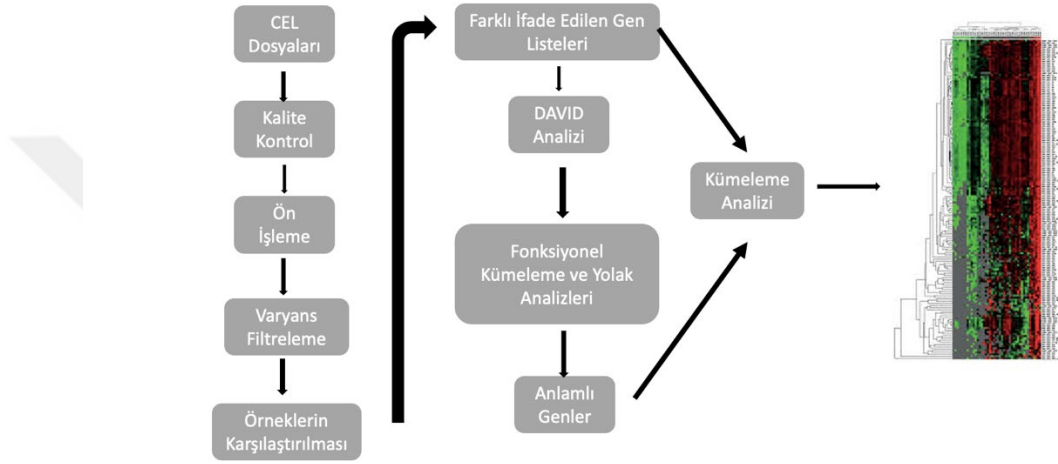
Affymetrix GeneChip Komuta Konsolu (AGCC) yazılımında çiplerin önce görüntü dosyası olan DAT uzantılı dosya elde edildi. Bu ham veri dosyası ardından cihaz yazılımıyla numerik veri dosyasına dönüştürüldü. Mikrodizin verilerinin

biyoinformatik analizler ile işlenmesi için CEL uzantılı dosya kullanılmaktadır. Dolayısıyla numerik verileri içeren dosya CEL uzantılı olarak kaydedildi. Biyoinformatik analizler, çiplerin ön analizleri, normalizasyon, filtreleme, farklı ifade edilen genlerin bulunması ve kümeleme analizlerini içermektedir.

Çiplerin birbirleriyle en doğru şekilde kıyaslanabilmesi için, çalışma sırasında deneysel kaynaklı teknik farklılıklar nedeniyle oluşabilecek arka plan gürültüsünün giderilmesi gerekmektedir. Normalizasyon işlemiyle bu farklılıklar elimine edilip çipler karşılaştırılabilir hale getirildi. Normalizasyon işleminde farklı algoritmalar kullanıldı. Affymetrix çiplerinin analizinde RMA (Robust Multiarray Average) bir normalizasyon algoritması kullanıldı. Çiplerin ön analizleri tamamlandıktan sonra kalite kontrolleri yapıldı. Ardından verinin ileri analizler aşamasına geçildi. Bu analizler sırasında anlamlı düzeyde farklılığa sahip olmayan problemler çıkarılır. Bu işlem varyans filtrelemesidir. Bu uygulamadan sonra gruplar birbirleriyle karşılaştırılarak anlamlı şekilde ifade düzeyi farklılık gösteren gen listeleri ileri analizler ile elde edilir. Bu listeler oluşturulurken p anlamlılık değeri ve genler arasındaki artan ve azalan genlerin değişimlerini saptamak için kat değişimi filtreleri kullanılır. Elde edilen farklı ifade gen listeleri değerlendirilmek üzere yolak analizleri değerlendirildi.

Çalışma ile ilgili aday genlerin, biyobelirteçlerin tanımlanması, gen ontolojisi ve yolak analizleri ile mümkün olmaktadır. Bu işlem için birçok veri tabanı bulunmaktadır. DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), WEBGESTALT (Web-Based Gene Set Analysis Toolkit) gibi veri tabanları; KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genom) veya BIOCARTA gibi programlar üzerinden yolak analizleri yapılmaktadır. Bu veri tabanları içerisinde KEGG biyolojik sistemlerde çalışılmış yüksek işlem hacimli teknolojilerin verilerini içeren büyük bir veri tabanıdır; araştırmamızda da bu nedenle tercih edilmiştir. Biyoinformatik analizlere ait şematik görsel Şekil 2.10'da verilmiştir.

Biyoinformatik analizlerinden elde edilecek sonuçların kirletici konsantrasyonuyla ilişkilendirilmesi; *in siliko* sonuçlardan alınacak verilere göre (kirleticilerin farklı afinitelerde reseptör, enzim ve proteinlere bağlanması göz önünde bulundurularak) ekspresyon-kirletici konsantrasyonu ile ilişkilendirme ve farklı kirleticilerin aynı kolinerjik sisteme ait proteinlere afinitelerinin değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.10. Biyoinformatik analiz şeması.

2.2.4. İstatistik Analizleri

Kirletici verilerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler hesaplanarak Medyan (Minimum- Maksimum) şeklinde özetlendi. Hipotez testlerine geçilmeden önce veriler normal dağılıma uygunluk yönünden Shapiro Wilk testi ile incelendi. Veriler normal dağılıma uygunluk göstermediği için iki grup arası önem kontrolleri Mann Whitney U testi ile yapıldı. Tüm istatistik değerlendirmeler için $p < 0.05$ kriterinden yararlanıldı. Analizler için SPSS 21 paket programı kullanıldı. Array analizlerinde, çiplerin taranmasından sonra, her bir prob seti için floresans yoğunlukları Affymetrix GeneChip Yazılımı kullanılarak belirlendi ve yoğunluk verileri, GeneSpring yazılım paketindeki (Silicon Genetics) Robust Multi-Array Analysis (RMA) algoritması

kullanılarak doğrusallığı en üst düzeye çıkarmak için önceden işlendi. GeneSpring kullanılarak, her prob seti için ifade değerleri ilk olarak ham sinyal (en az dört örnekte > 250) ve varyasyon (en az dört örnekte deney ortalamasından 1.2 kat sapma) ve genler (prob setleri) için filtrelendi. Bu kriterleri geçen, IUGR ve IUGR olmayan plasentalar arasında ekspresyonları farklı olan gen kümelerini elde etmek için GeneSpring'in Genler Arası Hata Modeli kullanılarak ANOVA'ya ve çoklu karşılaştırmalar için Benjamini-Hochberg düzeltmesine tabi tutuldu. Dendrogramlar, GeneSpring'in GeneTree işlevi kullanılarak oluşturuldu. RNA dizileme analizlerinde ise Kaplan-Meier metodu ve çok değişkenli regresyon analizi yöntemi ile istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Örnekler, kirletici tespit edilen ve edilmeyen örnekler olarak iki gruba ayrıldı. Anlamlılık belirletci olarak P değeri kullanıldı. Tüm anlamlılık seviyesi (DFR) <0,05 olarak belirlendi. P değerlerinin bulunması sırasında R3.1.1. yazılım programı kullanıldı.

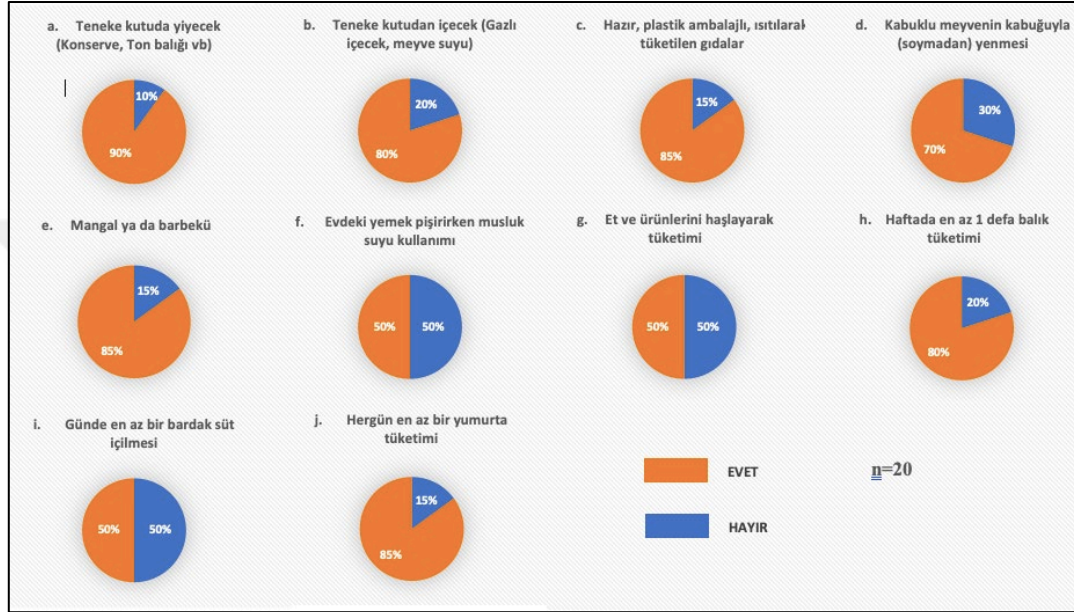
3. BULGULAR

3.1. Placenta Örneklerine Ait İstatistiksel Bulgular

Annelerin gebelik öncesi vücut kitle indeksi %5'i 18,5'un altında (zayıf), %55'i 18,5-24,9 aralığında (normal/sağlıklı), %20'si 25-29,9 aralığında (kilolu), %20'si ise 30 ve üstü (obez) bulunmuştur. Gebelik süresince alınan ortalama kg $12,5 \pm 5,38$ 'dir. Placenta numunesi toplanan annelerin %50'sinde anomalili doğum ve/veya düşük geçmişi tespit edildi. Placenta örnekleri toplanan annelerin %90'ı gebeliklerini trafo, çöplük, sanayi gibi kirleticilere maruz kalabilecekleri ortamların yakınlarında geçirmiştir.

Annelerin yaş ortalaması $32,63 \pm 5,01$ 'dir. Bunların %25'i gebelik süresince sigara kullanmıştır, %65'i sigara içilen ortama maruz kalmıştır. Numunelerin %45'i ilk doğumunu yapan, %55'i iki ve üstü doğum yapmış annelerden alınmıştır. Numune alınan örneklerin gestasyon ortalaması $38,36 \pm 1,22$ olarak bulundu.

Doğumların %5'i 37 haftalıktan öncedir. Anket sonuçlarında annelerin beslenme alışkanlıklarına bakıldığında %73,5 oranında ambalaj, katkı maddesi, pişirilme yöntemleri gibi kirleticiye maruz kalabilecekleri alışkanlıklara sahip oldukları görülmüştür. Annelerin gebelik süresince tükettikleri yiyecek alışkanlıkları Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



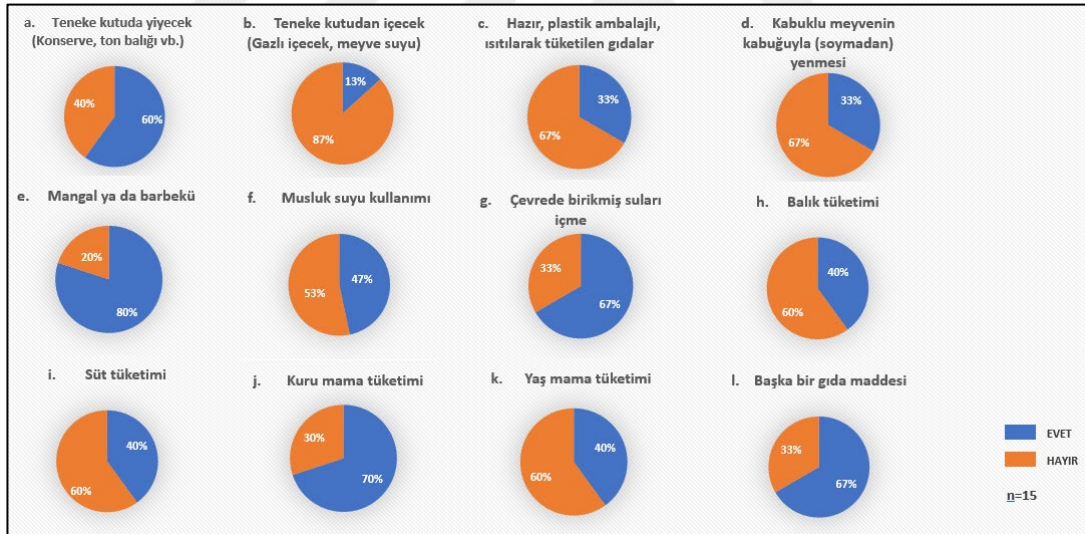
Şekil 3.1. Annelerin gebelik süresince tükettikleri yiyecek alışkanlıkları

Bebeklerin doğum ağırlığı ortalama $3118,42 \pm 517,39$ g olarak bulundu. Bunların %21,052'si düşük doğum ağırlığı kabul edilen 2500 g'ın altındadır. Bebeklerin baş çevresi ortalaması $33,42 \pm 2,57$ cm olarak bulundu. Baş çevresi ölçülen 10 erkek bebekten 3 tanesi, 10 kız bebekten 4 tanesi CDC'nin bildirdiği %10'luk dilimin (%10'luk dilimde erkek bebek baş çevresi; 33,08 cm, kız bebek baş çevresi; 32,75 cm olarak verilmiştir.) altında bulunmuştur. Plasenta ağırlığı ortalama $630,65 \pm 111,73$ olarak bulundu. Bunların %55'i 600-700 g aralığında, %30'u 600 g'ın altında, %15'i 700 g'ın üstünde bulundu.

Çalışmamızda ilk doğumunu yapan ve %45'lik kısmını oluşturan 9 annenin 7'sinde kirletici tespit edildi. Kirletici ortlaması 874,5 ng/g olarak hesaplandı. Geriye

kalan iki ve üstü doğum yapmış 11 anneden alınan örneklerden 7'sinde ise ortalama 355,8 ng/g kirletici tespit edildi. Bu bulgular ışığında ilk doğumunu yapan annelere ait plasenta örneklerinde kirletici yükü iki ve üzeri doğum yapan annelere kıyasla yaklaşık 2,5 kat fazla bulundu.

Araştırmaya dahil edilen köpeklerin %20'sinin gebelik öncesi hastalık geçmişine sahip olduğu; yaş ortalamalarının ise $2,8 \pm 0,74$ yıl olduğu tespit edildi. Numuneler %20'si ilk doğumunu yapan, %80'i ikinci ve üstü doğumlarını yapan köpeklerden alındı. Köpeklerin %60'ı gebelikleri süresince sigara içilen ortama maruz kalmıştır. Köpeklerin %30'unda gebelikleri süresince çeşitli kozmetik ürünler kullanılmıştır. Köpeklerin %40'ı çiş pedi kullanmaktadır. Köpeklerin %20'sinde gebelikleri süresince çeşitli sebeplerle ilaç kullanımı mevcuttur. Köpeklerin gebelik süresince tükettikleri yiyecek alışkanlıkları Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Köpeklerin gebelik süresince tükettikleri yiyecek alışkanlıkları

3.2. Kirletici Analizi

Geliştirilen metod EUROCHEM'e göre valide edildi. Validasyon parametrelerinden doğrusallık, power (r^2), tespit limiti (limit of detection-LOD),

ölçüm limiti (limit of quantification-LOQ), Çizelge 3.1’de.; geri kazanım, ortalama geri kazanım, kesinlik, tekrarlanabilirlik Çizelge 3.2.’de gösterildi. Organoklorlu kirleticilerin 5-100 ng/g doz aralığında linearite sonuçlarında power (r²) tamamında 0,990 üzerinde bulundu. LOD ve LOQ ise sırasıyla 0,27-0,77 ve 0,82-2,30 ng/g olarak tespit edildi. PCB kirleticilerin 5-100 ng/g doz aralığında linearite sonuçlarında power (r²) tamamında 0,990 üzerinde bulundu. LOD ve LOQ ise sırasıyla 0,34-0,66 ve 1,01-1,98 ng/g olarak tespit edildi, PBDE kirleticilerin 5-100 ng/g doz aralığında linearite sonuçlarında power (r²) tamamında 0,990 üzerinde bulundu. LOD ve LOQ ise sırasıyla 0,12-0,31 ve 0,37-0,61 ng/g olarak tespit edildi, PAH’ların 5-100 ng/g doz aralığında linearite sonuçlarında power (r²) tamamında 0,988 üzerinde bulundu. LOD ve LOQ ise sırasıyla 0,39-1,04 ve 1,17-3,12 ng/g olarak tespit edildi.

Çizelge 3.1. Kirletici analizleri validasyon sonuçları. 1. kısım (Linearite, r², LOD ve DOQ)

Analit	Doğrusallık (ng/g)	r ²	LOD ng/g	LOQ ng/g
Alfa HCH	5-100	0,990	0,73	2,20
Hekzaklorobenzen	5-100	0,995	0,51	1,54
Gamma HCH	5-100	0,991	0,68	2,05
Beta HCH	5-100	0,992	0,63	1,89
Heptaklor	5-100	0,995	0,45	1,36
Aldrin	5-100	0,991	0,77	2,30
Alfa-endosülfan	5-100	0,992	0,51	1,53
Dieldrin	5-100	0,992	0,76	2,28
4’4 DDE	5-100	0,996	0,31	0,94
4’4 DDD	5-100	0,993	0,43	1,29
2’4 DDT	5-100	0,993	0,43	1,30
4’4 DDT	5-100	0,997	0,27	0,82
Metoksiklor	5-100	0,996	0,54	1,62
Max		0,997	0,77	2,30
Min		0,990	0,27	0,82
ORT		0,993	0,54	1,63
PCB30**	-	-	-	-
PCB28	5-100	0,993	0,44	1,33
PCB52	5-100	0,992	0,43	1,28

PCB101	5-100	0,994	0,48	1,45
PCB118	5-100	0,993	0,49	1,47
PCB153	5-100	0,997	0,34	1,01
PCB153-C13*	-	-	-	-
PCB138	5-100	0,995	0,36	1,07
PCB180	5-100	0,991	0,66	1,98
PCB209*	-	-	-	-
Max			0,66	1,98
Min			0,34	1,01
ORT		0,994	0,46	1,37
PBDE 28	5-100	0,993	0,12	0,37
PBDE 47	5-100	0,997	0,18	0,53
PBDE 66	5-100	0,994	0,20	0,61
PBDE 99	5-100	0,995	0,20	0,59
PBDE 85	5-100	0,993	0,16	0,47
PBDE 100	5-100	0,994	0,16	0,49
PBDE 154	5-100	0,991	0,17	0,52
PBDE 153	5-100	0,992	0,30	0,89
PBDE 183	5-100	0,990	0,31	0,92
Max			0,31	0,61
Min			0,12	0,37
ORT		0,994	0,17	0,51
1- Naftalin	5-100	0,988	0,78	2,33
2- Asenaftelen	5-100	0,992	0,45	1,35
3- Asenaften	5-100	0,991	0,58	1,73
4- Floren	5-100	0,995	0,73	2,19
5- Fenantren	5-100	0,995	0,55	1,65
6- Antrasen	5-100	0,994	0,61	1,82
7- Floranten	5-100	0,996	0,41	1,23
8- Piren	5-100	0,996	0,39	1,17
9- Benzo (a) antrasen	5-100	0,994	0,44	1,32
10- Krizen	5-100	0,993	0,48	1,43
11- Benzo (b) floranten	5-100	0,996	1,04	3,12
12- Benzo (k) floranten	5-100	0,997	0,53	1,59
13- Benzo (a) piren	5-100	0,997	0,51	1,56
14- Indeno (1,2,3, c, d) piren	5-100	0,994	0,65	1,85
15- Dibenz (a, h) antrasen	5-100	0,992	0,67	2,00
16- Benzo (g, h, i) perilen	5-100	0,994	0,55	1,64
Maksimum		0,997	1,04	3,12

Minimum		0,988	0,39	1,17
Ortalama		0,994	0,58	1,75

*İnternal STD

**Enjeksiyon İnt-STD

Çizelge 3.2. Kirletici analizleri validasyon sonuçları. 2. kısım (Geri kazanım, ortalama geri kazanım, kesinlik, tekrarlanabilirlik)

Analit	Geri kazanım (n=6)		Ortalama geri kazanım (%)	Kesinlik (RSD %)		Tekrarlanabilirlik (RSD %)	
	10 ng/g	75 ng/g		10 ng/g	75 ng/g	10 ng/g	75 ng/g
Alfa HCH	92,41	91,04	91,73	8,90	8,40	9,98	8,69
Hekzaklorobenzen	93,49	92,22	92,86	7,31	5,88	8,19	8,48
Gamma HCH	98,07	103,11	100,59	8,06	6,51	8,82	7,74
Beta HCH	100,22	97,73	98,98	9,22	8,72	9,77	8,27
Heptaklor	94,28	92,51	93,39	6,57	6,20	7,88	7,63
Aldrin	92,61	90,45	91,53	11,34	10,82	12,29	11,02
Alfa-endosülfan	91,24	87,81	89,52	10,28	9,45	10,08	11,34
Dieldrin	88,95	83,52	86,23	10,49	8,43	11,97	10,71
4'4 DDE	100,55	95,75	98,15	7,21	6,72	6,62	5,94
4'4 DDD	98,49	90,45	94,47	10,07	9,66	8,93	7,63
2'4 DDT	99,08	88,59	93,84	9,22	8,61	9,35	7,95
4'4 DDT	100,39	101,77	101,08	7,21	5,25	6,41	6,15
Metoksiklor	97,61	92,90	95,26	8,37	7,46	8,72	8,48
Maksimum	100,55	103,11	101,08	11,34	10,82	12,29	11,34
Minimum	88,95	83,52	86,23	6,57	5,25	6,41	5,94
ORT	95,95	92,91	94,43	8,79	7,85	9,15	8,46
PCB30**	-	-	-	-	-	-	-
PCB28	101,14	102,92	102,03	4,13	3,89	4,52	4,35
PCB52	99,37	105,06	102,21	4,77	4,41	4,94	4,45
PCB101	98,51	97,32	97,91	6,68	5,67	5,78	5,09
PCB118	97,22	98,01	97,61	5,51	5,15	5,88	5,41
PCB153	99,86	95,55	97,71	3,82	3,47	3,26	3,07
PCB153-C13*	-	-	-	-	-	-	-
PCB138	99,76	95,94	97,85	4,03	3,36	4,41	3,92
PCB180	97,80	92,41	95,11	5,62	5,78	7,14	6,68
PCB209*	-	-	-	-	-	-	-
Max	101,14	105,06	102,21	6,68	5,78	7,14	6,68
Min	97,22	92,41	95,11	3,82	3,36	3,26	3,07
ORT	99,09	98,17	98,63	4,94	4,53	5,13	4,71
PBDE 28	92,37	92,76	92,57	8,58	5,57	9,66	9,12

PBDE 47	91,77	93,66	92,71	6,73	4,83	8,21	7,75
PBDE 66	94,74	94,35	94,55	10,30	5,67	12,10	11,19
PBDE 99	93,95	95,54	94,74	10,14	8,93	10,58	9,79
PBDE 85	92,86	93,66	93,26	8,36	7,46	8,51	7,87
PBDE 100	89,30	90,98	90,14	5,43	5,36	5,90	5,81
PBDE 154	91,48	91,87	91,68	6,26	5,78	5,86	5,42
PBDE 153	89,79	90,78	90,29	3,89	3,78	3,70	3,51
PBDE 183	86,03	88,11	87,07	10,68	6,51	14,36	13,29
Maksimum	94,74	95,54	94,74	10,30	8,93	12,10	11,19
Minimum	89,30	90,98	90,14	5,43	4,83	5,90	5,81
ORT	92,50	93,49	93,00	8,26	6,30	9,16	8,59
1- Naftalin	88,69	89,47	89,08	3,17	2,91	2,29	3,64
2- Asenaftilen	91,43	92,22	91,83	10,00	9,17	10,84	10,09
3- Asenaften	91,63	92,41	92,02	8,20	9,52	10,19	9,77
4- Floren	94,12	94,95	94,54	2,48	2,91	4,99	5,30
5- Fenantren	93,85	94,15	94,00	10,68	12,52	14,85	10,82
6- Antrasen	94,25	95,24	94,74	11,45	13,42	15,09	9,26
7- Floranten	97,14	97,86	97,50	8,01	9,39	10,62	8,11
8- Piren	95,07	95,95	95,51	11,62	10,90	13,59	9,67
9- Benzo (a) antrasen	94,47	95,55	95,01	8,78	8,05	7,99	8,53
10- Krizen	95,58	96,00	95,79	2,19	2,01	3,39	2,70
11- Benzo (b) floranten	93,70	94,43	94,07	7,06	8,27	9,82	7,28
12- Benzo (k) floranten	96,62	97,54	97,08	7,63	8,94	11,05	9,88
13- Benzo (a) piren	98,79	100,06	99,43	10,49	12,30	12,89	9,98
14- Indeno (1,2,3, c, d) piren	98,49	99,32	98,90	2,48	2,91	3,93	3,33
15- Dibenz (a, h) antrasen	94,12	95,47	94,80	5,55	6,74	6,50	4,89
16- Benzo (g, h, i) perilen	94,66	95,38	95,02	5,15	6,04	6,10	5,41
Maksimum	98,79	100,06	99,43	11,62	13,42	15,09	10,82
Minimum	88,69	89,47	89,08	2,19	2,01	2,29	2,70
ORT	94,54	95,38	94,96	7,18	7,87	9,01	7,42

Araştırılan örneklerden 10 tanesinde OK'lerden 44-DDE tespit edildi, tespit edilen örneklerin içinde en düşük H5 (32,94 ng/g), en yüksek H2 (157,99 ng/g) numaralı örneklerde bulundu. Ayrıca 4'4 DDD de H2'de 206,03 ng/g miktarında tespit edildi. Örneklerin %25'inde 4'4 DDD ve 2'4 DDT tespit edildi. Toplanan 20 örnekten 2 tanesinde PCB tespit edildi. PCB tespit edilen bu örneklerin her birinde

PCB153 ve PCB180 bulundu. Örneklerin %25'inde PBDE28 tespit edildi ve en düşük 44,537 ng/g, en yüksek 164,321 ng/g miktarında bulundu. Toplanan örneklerden H7'de 6 farklı PAH tespit edildi. Krizen örneklerin %50'sinde tespit edildi ve PAH'lar arasında en çok tespit edilen kirletici olduğu görüldü. Krizenin ardından en çok tespit edilen PAH'lar arasında naftalin, asenaftelen ve fenantren, floren, asenaften gelmektedir. Örnekler arasında toplam PAH tespiti en düşük H17'de 39,43 ng/g, en yüksek H5'de 15469,853 ng/g miktarlarında bulundu. İnsan plasenta örnekleri üzerinde yapılan kirletici analiz sonuçları Çizelge 3.3'de verildi.

Çizelge 3.3. İnsan plasenta örneklerinde kirletici analizleri

ANALİTLER	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H1 2
α -HCH	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
HCB	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
γ -HCH	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
β -HCH	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
HEP	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
ALD	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
α -END	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
DİELD	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
B-END	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
44-DDE	TE	157, 99	45,2	49,5	32,9 4	TE	39,3	TE	33,84	35,4 3
4'4 DDD	TE	206, 03	77,1 4	64,7 5	22,7 2	TE	172, 56	TE	TE	TE
2'4 DDT	TE	56,2 8	8,26	21,1 5	5,38	TE	47,9 4	TE	TE	TE
4'4 DDT	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
MET	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Toplam HCH	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,000	0,000	0,00 0
Toplam DDT	0,00 0	420, 300	130, 600	135, 400	61,0 40	0,00 0	259, 800	0,000	33,84 0	35,4 30
Max	0,00 0	206, 030	77,1 40	64,7 50	32,9 40	0,00 0	172, 560	0,000	33,84 0	35,4 30
Min	0,00 0	56,2 80	8,26 0	21,1 50	5,38 0	0,00 0	39,3 00	0,000	33,84 0	35,4 30
ORT	0,00 0	140, 100	43,5 33	45,1 33	20,3 47	0,00 0	86,6 00	0,000	33,84 0	35,4 30
Toplam OCP	0,00 0	420, 300	130, 600	135, 400	61,0 40	0,00 0	259, 800	0,000	33,84 0	35,4 30

PCB28	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB52	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB101	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB118	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB153	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	11,43 3	TE	TE
PCB138	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB180	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	194,1 81	TE	TE
PCB209*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Max	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	194,1 81	0,000	0,00 0
Min	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	11,43 3	0,000	0,00 0
ORT	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	102,8 07	67,68 0	70,8 60
Toplam DL-PCB	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Toplam NDL-PCB	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	11,43 3	0,000	0,00 0
TOP-PCB	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	205,6 14	0,000	0,00 0
PBDE 28	83,6 65	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	164,3 21	69,6 02
PBDE 47	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 66	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 99	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 85	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 100	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 154	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 153	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 183	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Maksimum	83,6 65	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,000	164,3 21	69,6 02
Minimum	83,6 65	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,000	164,3 21	69,6 02
ORT	83,6 65	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,000	164,3 21	69,6 02
Toplam PBDE	83,6 65	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,000	164,3 21	69,6 02
Toplam POP	83,6 65	420, 300	130, 600	135, 400	61,0 40	0,00 0	259, 800	205,6 14	198,1 61	105, 032
1-Naftalin	TE	36,7 1	TE	TE	TE	TE	167, 48	TE	8365, 168	TE

2-Asenaftelen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	24,6 9	TE	191,4 34	58,8 62
3-Asenaften	TE	TE	TE	TE	TE	TE	102, 43	TE	TE	TE
4-Floren	TE	TE	TE	TE	TE	TE	116, 37	TE	TE	TE
5-Fenantren	TE	27,4 5	TE	TE	TE	TE	73,2 8	TE	TE	TE
6-Antrasen	TE	TE	TE	TE	350, 915	TE	TE	551,6 70	TE	TE
7-Floranten	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
8-Piren	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
9-Benzo(a)antrasen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
10-Krizen	TE	598, 612	419, 822	341, 892	151 18,9 38	TE	138 5,86 4	2069, 872	1687, 446	174 2,85 4
11-Benzo(b)floranten	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
12-Benzo(k)floranten	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
13-Benzo(a)piren	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
14-İndeno(1,2,3,c,d)piren	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
15-Dibenzo(a,h)antrasen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
16-Benzo(g,h,i)perilen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Max	0,00 0	598, 612	419, 822	341, 892	151 18,9 38	0,00 0	138 5,86 4	2069, 872	8365, 168	174 2,85 4
Min	0,00 0	27,4 50	419, 822	341, 892	350, 915	0,00 0	24,6 90	551,6 70	191,4 34	58,8 62
Ortalama	0,00 0	220, 924	419, 822	341, 892	773 4,92 7	0,00 0	311, 686	1310, 771	3414, 683	900, 858
Toplam PAH	0,00 0	662, 772	419, 822	341, 892	154 69,8 53	0,00 0	187 0,11 4	2621, 542	1024 4,048	180 1,71 6

ANALİTLER	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H26	H30
α-HCH	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
HCB	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
γ-HCH	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
β-HCH	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
HEP	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
ALD	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
α-END	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
DİELD	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
B-END	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
44-DDE	65,92	36,73	TE	TE	45,9 3	TE	TE	TE	TE	TE
4'4 DDD	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
2'4 DDT	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE

4'4 DDT	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
MET	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Toplam HCH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam DDT	65,920	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Max	65,920	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Min	65,920	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ORT	65,920	36,730	0,000	0,000	45,930	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam OCP	65,920	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PCB28	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB52	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB101	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB118	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB153	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	11,433
PCB138	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB180	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	194,181
PCB209*	-	-								
Maksimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	194,181
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	11,433
ORT	131,840	36,730	0,000	0,000	45,930	0,000	0,000	0,000	0,000	102,807
Toplam DL-PCB	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Toplam NDL-PCB	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	102,807
TOP-PCB	0,000	0,000	0,000	0,000	15,310	0,000	0,000	0,000	0,000	102,807
PBDE 28	84,308	44,537	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 47	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 66	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 99	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 85	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 100	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 154	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 153	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 183	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Maksimum	84,308	44,537	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Minimum	84,308	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ORT	84,308	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Toplam PBDE	84,308	0,000	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,000
Toplam POP	150,22 8	44,537	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,000
1-Naftalin	44,62	3224,3 17	TE	TE	38,5 60	TE	TE	TE	TE	TE
2-Asenaftelen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
3-Asenaften	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
4-Floren	75,28	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
5-Fenantren	TE	TE	TE	TE	39,4 30	TE	TE	TE	TE	TE
6-Antrasen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
7-Floranten	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
8-Piren	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
9-Benzo(a)antrasen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
10-Krizen	1139,4 87	1627,4 00	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
11-Benzo(b)florante n	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
12-Benzo(k)florante n	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
13-Benzo(a)piren	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
14-İndeno(1,2,3,c,d) piren	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
15-Dibenzo(a,h)antr asen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
16-Benzo(g,h,i)peril en	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Maksimum	1139,4 87	3224,3 17	0,00 0	0,00 0	39,4 30	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,000
Minimum	44,620	1627,4 00	0,00 0	0,00 0	39,4 30	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,000
Ortalama	419,79 6	2425,8 59	0,00 0	0,00 0	39,4 30	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,000
Toplam PAH	1259,3 87	4851,7 17	0,00 0	0,00 0	39,4 30	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,000

TE: Tespit Edilemedi

*İnternal STD

**Enjeksiyon İnt STD

Köpeklerden toplanan plasenta örneklerinde organoklorlu kirleticilerden 44-DDE, 4'4 DDD ve 2'4 DDT tespit edildi. PCB'lerden 15 örnekten üçünde PCB28 birinde PCB118 tespit edildi. PBDE'lerden sadece %6,6 oranında PBDE28 tespit

edilmiştir Analizi yapılan 15 köpek plasenta örneğinden 4 örnekte çeşitli PAH'lar tespit edildi. En çok sayıda örnekten tespit edilen PAH floren, En yüksek miktarda tespit edilen ise fenantren olmuştur. Köpeklerden toplanan plasenta örnekleri üzerinde yapılan kirletici analizlerinin sonuçları Çizelge 3.4'de verildi.

Çizelge 3.4. Köpek plasenta örneklerinde kirletici analizleri

Analitler	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
α -HCH	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
HCB	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
γ -HCH	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
β -HCH	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
HEP	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
ALD	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
α -END	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
DİELD	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
B-END	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
44-DDE	TE	TE	TE	29,150	TE	99,580	TE	37,540
4'4 DDD	TE	TE	TE	407,790	TE	647,380	TE	263,930
2'4 DDT	TE	TE	TE	254,180	TE	209,160	TE	86,810
4'4 DDT	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
MET	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Toplam HCH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam DDT	0,000	0,000	0,000	691,120	0,000	956,120	0,000	388,280
Max	0,000	0,000	0,000	407,790	0,000	647,380	0,000	263,930
Min	0,000	0,000	0,000	29,150	0,000	99,580	0,000	37,540
ORT	0,000	0,000	0,000	230,373	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam OCP	0,000	0,000	0,000	691,120	0,000	956,120	0,000	388,280
PCB28	TE	TE	TE	TE	TE	846,660	TE	TE
PCB52	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB101	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB118	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB153	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB138	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB180	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB209*	-	-	-	-	-	-	-	-
Maksimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	846,660	0,000	0,000
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	846,660	0,000	0,000
ORT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	846,660	0,000	0,000
Toplam DL-PCB	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE

Toplam NDL-PCB	0,00 0	0,000	0,000	0,000	0,000	846,660	0,000	0,000
TOP-PCB	0,00 0	0,000	0,000	0,000	0,000	846,660	0,000	0,000
PBDE 28	TE	TE	TE	168,960	TE	TE	TE	TE
PBDE 47	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 66	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 99	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 85	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 100	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 154	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 153	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 183	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Maksimum	0,00 0	0,000	0,000	168,960	0,000	0,000	0,000	0,000
Minimum	0,00 0	0,000	0,000	168,960	0,000	0,000	0,000	0,000
ORT	0,00 0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam PBDE	0,00 0	0,000	0,000	168,960	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam POP	0,00 0	0,000	0,000	860,080	0,000	1802,78 0	0,000	388,28 0
1-Naphthalene	TE	TE	TE	132,760	TE	92,430	TE	TE
2-Acenaphthylene	TE	TE	TE	87,340	TE	87,320	TE	TE
3-Acenaphthene	TE	TE	TE	72,750	TE	64,870	TE	TE
4-Fluorene	TE	TE	TE	295,320	TE	147,260	TE	TE
5-Phenanthrene	TE	TE	TE	645,880	TE	302,570	TE	TE
6-Anthracene	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
7-Fluoranthene	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
8-Pyrene	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
9-Benzo(a)anthracene	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
10-Chrysene	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
11-Benzo(b)fluoranthene	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
12-Benzo(k)fluoranthene	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
13-Benzo(a)pyrene	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
14-Indeno(1,2,3,c,d)pyrene	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
15-Dibenz(a,h)anthracene	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
16-Benzo(g,h,i)perylene	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Maksimum	0,00 0	0,000	0,000	645,880	0,000	302,570	0,000	0,000
Minimum	0,00 0	0,000	0,000	72,750	0,000	64,870	0,000	0,000
Ortalama	0,00 0	0,000	0,000	246,810	0,000	138,890	0,000	0,000
Toplam PAH	0,00 0	0,000	0,000	1234,05 0	0,000	694,450	0,000	0,000

ANALİTLER	D9	D101	D102	D103	D104	D105	D106
α-HCH	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE

HCB	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
γ -HCH	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
β -HCH	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
HEP	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
ALD	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
α -END	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
DİELD	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
B-END	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
44-DDE	43,610	TE	TE	TE	TE	TE	40,310
4'4 DDD	275,560	TE	TE	TE	TE	TE	TE
2'4 DDT	78,420	TE	TE	TE	TE	TE	TE
4'4 DDT	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
MET	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Toplam HCH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam DDT	397,590	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maksimum	275,560	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Minimum	43,610	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ORT	132,530	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam OCP	397,590	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PCB28	82,640	TE	1014,430	TE	TE	TE	TE
PCB52	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB101	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB118	TE	TE	TE	27,200	TE	TE	TE
PCB153	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB138	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB180	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PCB209*	-	-	-	-			
Maksimum	82,640	0,000	1014,430	27,200	0,000	0,000	0,000
Minimum	82,640	0,000	1014,430	27,200	0,000	0,000	0,000
ORT	612,760	0,000	1014,430	27,200	0,000	0,000	0,000
Toplam DL-PCB	TE	TE	TE	27,200	TE	TE	TE
Toplam NDL-PCB	82,640	0,000	1014,430	27,200	0,000	0,000	0,000
TOP-PCB	82,640	0,000	1014,430	27,200	0,000	0,000	0,000
PBDE 28	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 47	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 66	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 99	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 85	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 100	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 154	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 153	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
PBDE 183	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE

Maksimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ORT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam PBDE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam POP	480,230	0,000	1014,430	0,000	0,000	0,000	0,000
1-Naftalin	78,550	TE	TE	TE	TE	TE	TE
2-Asenaftelen	69,540	TE	TE	TE	TE	TE	TE
3-Asenaften	43,910	TE	TE	TE	TE	TE	TE
4-Floren	186,340	TE	365,400	TE	TE	TE	TE
5-Fenantren	549,270	TE	TE	TE	TE	TE	TE
6-Antrasen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
7-Floranten	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
8-Piren	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
9-Benzo(a)antrasen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
10-Krizen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
11-Benzo(b)loranten	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
12-Benzo(k)loranten	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
13-Benzo(a)piren	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
14-İndeno(1,2,3,c,d)piren	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
15-Dibenzo(a,h)antrasen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
16-Benzo(g,h,i)perilen	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Maksimum	549,270	0,000	365,400	0,000	0,000	0,000	0,000
Minimum	43,910	0,000	365,400	0,000	0,000	0,000	0,000
Ortalama	185,522	0,000	365,400	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam PAH	927,610	0,000	365,400	0,000	0,000	0,000	0,000

*İnternal STD
**Enjeksiyon İnt. STD
**TE tespit edilemedi

Anket içerisinde sorulan sorular ile kirletici bulguları arasında, genel olarak örneklem sayısına bağlı olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$). Örneğin sigara kullanan annelerin plasenta örneklerinde toplam PAH düzeylerinde 2.43 kat, toplam PBDE yükünde 2.07 kat, PCB yükünde ise 60.47 kat artış görülürken, toplam kirletici yükünde 2.35 kat artış görüldü. Çizelge 3.5'te de gösterildiği üzere bu fark anlamlı bulunmadı. Benzer şekilde sigara içilen evde yaşayan köpeklerden alınan plasenta örneklerinde toplam PAH yükünde 1,8, fenantren yükünde 1,5, floren yükünde 3,4 ve asenaftilen yükünde 1,1 kat artış bulundu ($p>0,05$; Çizelge 3.6). Gebelik süresince diyetlerinde mangal ile pişirilmiş gıda tüketen annelerde tüketmeyenlere oranla

toplam organoklorlu pestisit yükünde 3,13 kat artış gözlenmiştir. Bu annelerin bebeklerinin doğum ağırlığında %1 azalma gözlemlendi. Mangal yapılan evlerde bulunan annelerden alınan plasenta örneklerinde kirletici yükünün arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$, Çizelge 3.7).

İlk doğumunu yapan ve %45'lik kısmını oluşturan 9 annenin 7'sinde kirletici tespit dildi. Kirletici ortlaması 874,5 ng/g olarak hesaplandı. Geriye kalan iki ve üstü doğum yapmış 11 anneden alınan örneklerden 7'sinde ise ortalama 355,8 ng/g kirletici tespit edildi. İlk doğumunu yapan annelere ait plasenta örneklerinde kirletici yükü iki ve üzeri doğum yapan annelere kıyasla yaklaşık 2,5 kat fazla bulundu ($p>0,05$).

Çizelge 3.5. İnsan plasenta örneklerinde kirletici yükünün sigara kullanan ve kullanmayan annelere göre değerlendirilmesi ve bebek baş çevresi, doğum ağırlığı arasındaki ilişki

	Sigara kullanmayan anne		Sigara kullanan anne		P
	<i>Arit. Ort ± Std. Sapma</i>	<i>Medyan (Min-Maks)</i>	<i>Arit. Ort ± Std. Sapma</i>	<i>Medyan (Min-Maks)</i>	
Bebek baş çevresi	33,09 ± 2,78	33,25 (25 - 36)	35,63 ± 1,97	35 (34 - 38,5)	0,07
Doğum ağırlığı	3047,5 ± 501,76	3205 (2100 - 3650)	3430 ± 710,4	3590 (2440 - 4100)	0,125
Toplam NDL PCB	0 ± 0	0 (0 - 0)	2,29 ± 5,11	0 (0 - 11,43)	0,25
Toplam PCB	1,02 ± 3,95	0 (0 - 15,31)	61,68 ± 91,95	0 (0 - 205,61)	0,053
Toplam organoklorlu	73,9 ± 121,58	0 (0 - 420,3)	6,77 ± 15,13	0 (0 - 33,84)	0,186
Toplam PBDE	15,84 ± 32,94	0 (0 - 84,31)	32,86 ± 73,49	0 (0 - 164,32)	0,765
Toplam PAH	1457,67 ± 3932,54	39,43 (0 - 15469,85)	3543,46 ± 4259,45	2621,54 (0 - 10244,05)	0,324
Toplam kirletici	1548,42 ± 3938,07	83,67 (0 - 15530,89)	3647,06 ± 4305,28	2838,59 (0 - 10442,21)	0,188

Çizelge 3.6. Köpek plasenta örneklerinde PAH yükü ve evde sigara kullanımı arasındaki ilişki

	Evde Sigara İçilen Köpek Plasentası		Evde Sigara İçilen Köpek Plasentası		P
	<i>Arit. Ort ± Std. Sapma</i>	<i>Medyan (Min-Maks)</i>	<i>Arit. Ort ± Std. Sapma</i>	<i>Medyan (Min-Maks)</i>	
Naftalen	20,47 ± 46,43	0 (0 - 132,76)	19,64 ± 39,28	0 (0 - 78,55)	0,926
Asenaftalen	15,88 ± 35,33	0 (0 - 87,34)	17,38 ± 34,77	0 (0 - 69,54)	0,926
Asenaften	12,51 ± 27,89	0 (0 - 72,75)	10,98 ± 21,96	0 (0 - 43,91)	0,949
Floren	40,23 ± 95,44	0 (0 - 295,32)	137,94 ± 175,25	93,17 (0 - 365,4)	0,355
Penantren	86,22 ± 206,62	0 (0 - 645,88)	137,32 ± 274,64	0 (0 - 549,27)	0,839
Toplam PAH	175,32 ± 408,29	0 (0 - 1234,05)	323,25 ± 438,18	182,7 (0 - 927,61)	0,476

Çizelge 3.7. Mangal yapılan evlerde bulunan annelerden alınan plasenta örneklerinde kirletici yükünün değerlendirilmesi ve bebek baş çevresi, doğum ağırlığı arasındaki ilişki.

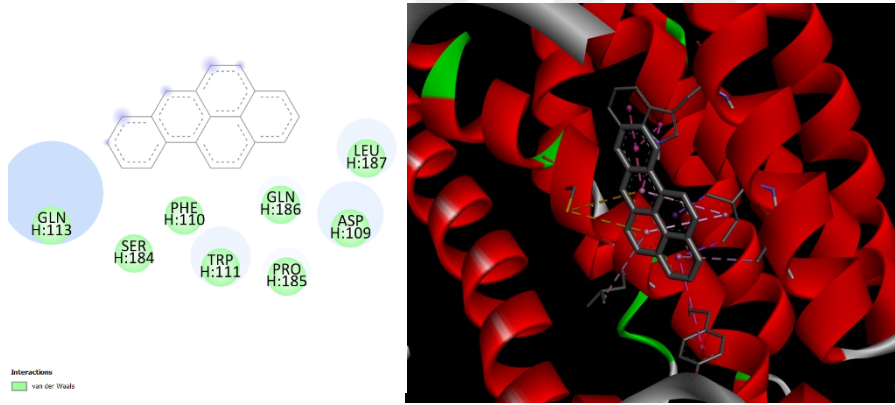
	Haftada en az bir kere mangal yapılmayan		Haftada en az bir kere mangal yapılan		P
	<i>Arit. Ort ± Std. Sapma</i>	<i>Medyan (Min-Maks)</i>	<i>Arit. Ort ± Std. Sapma</i>	<i>Medyan (Min-Maks)</i>	
Bebek baş çevresi	30 ± 7,07	30 (25 - 35)	34,26 ± 1,63	34,05 (32,5 - 38,5)	0,625
Doğum ağırlığı	3555 ± 134,35	3555 (3460 - 3650)	3084,29 ± 576,23	3205 (2100 - 4100)	0,183
Toplam NDL PCB	0 ± 0	0 (0 - 0)	0,67 ± 2,77	0 (0 - 11,43)	0,998
Toplam PCB	34,27 ± 59,36	0 (0 - 102,81)	13 ± 49,77	0 (0 - 205,61)	0,284
Toplam organoklorlu	20,35 ± 35,24	0 (0 - 61,04)	63,61 ± 116,59	0 (0 - 420,3)	0,689
Toplam PBDE	0 ± 0	0 (0 - 0)	23,64 ± 47,73	0 (0 - 164,32)	0,579
Toplam PAH	5156,62 ± 8931,52	0 (0 - 15469,85)	1418,38 ± 2624,58	341,89 (0 - 10244,05)	0,945
Toplam kirletici	5211,23 ± 8937,24	102,81 (0 - 15530,89)	1519,29 ± 2660,7	477,29 (0 - 10442,21)	0,842

3.3. İn Siliko Bulguları

CHRM1 ile CID-BAP molekülünün etkileşiminin skorları Çizelge 3.8.'de; 2 ve 3 boyutlu olarak etkileşimleri ise Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.

Ligand	Bağlanma Afinitesi	rmsd/ub	rmsd/lb
CHRM1 BAP	-8,8	0	0
CHRM1 DDT	-6,7	0	0
CHRM1 PCB52	-6,6	0	0
CHRM1 DDE	-6,3	0	0
CHRM1 PBDE153	-6,3	0	0
CHRM1 PBDE99	-5,3	0	0
CHRM1 PCB153	-6,7	0	0
CHRM1 PCB180	-6,8	0	0

Çizelge 3.8. Tüm Ligandların CHRM1 ile etkileşim skorları



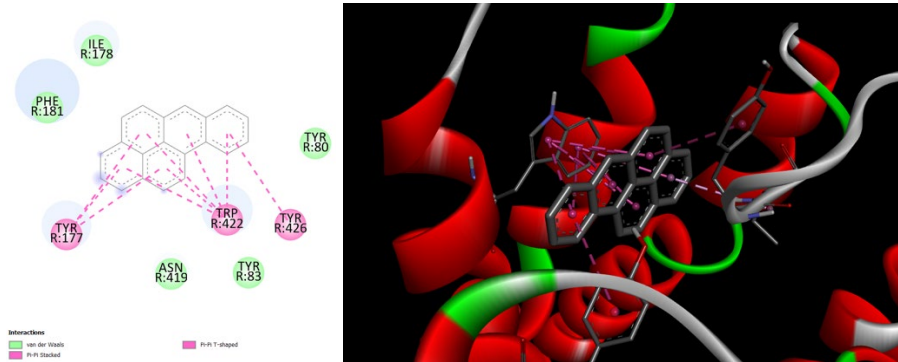
Şekil 3.3. CHRM1 ile CID-4-4 BAP molekülünün etkileşiminin 2 ve 3 boyutlu gösterimi

BAP bileşiğinin CHRM1 proteinine karşı yüksek bir ilgisi olduğu docking skorundan anlaşılmaktadır. Molekülün, proteinin 109, 110, 111, 113, 184, 185, 186 ve 187. rezidüleri ile pi-pi etkileşimleri ile etkileştiği görülmektedir. Bununla birlikte, reseptör-ligand etkileşiminin olduğu bölgenin hidrofobik özellik göstermesi bağların kalıcı olması yönünden önemlidir. Solvent erişim yüzeyi analiz edildiğinde etkileşim bölgesine solvent erişiminin yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre bir reseptör-ligand etkileşimi bulunmaktadır; ancak bağın kalıcılığı tartışmalıdır.

Ligand	Bağlanma Afinitesi	rmsd/ub	rmsd/lb
CHRM3 BAP	-10,7	0	0
CHRM3 DDT	-7,5	0	0
CHRM3 PCB52	-7,1	0	0
CHRM3 DDE	-8	0	0
CHRM3 PBDE153	-8	0	0
CHRM3 PBDE99	-7,5	0	0
CHRM3 PCB153	-8	0	0
CHRM3 PCB180	-8,4	0	0

Çizelge 3.9. Tüm Ligandların CHRM3 ile etkileşim skorları

BAP ve PCB 180 bileşiklerinin CHRM3 reseptörüne karşı yüksek ilgisinin olduğu docking skorundan anlaşılmaktadır (Çizelge 3.9). BAP ile CHRM3'ün Reseptör-ligand etkileşimleri, 80, 83, 177, 178, 181, 419, 422, 426 rezidüler ile pi-pi etkileşimleri aracılığıyla olmaktadır. Etkileşim bölgesinin hidrofobisitesi düşük olmakla beraber solvent etkileşim yüzeyi oldukça büyüktür. BAP ile CHRM3 etkileşimlerine ait 2 ve 3 boyutlu olarak etkileşimleri ise Şekil 3.4.'de gösterilmiştir.

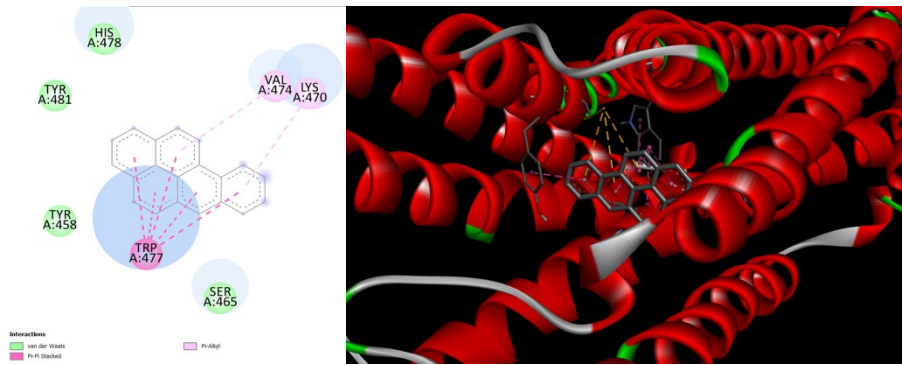


Şekil 3.4. CHRM3 ile CID-4-4 BAP molekülünün etkileşiminin 2 ve 3 boyutlu gösterimi

BAP ve DTT moleküllerinin CHRM5 reseptörüne ilgisi yüksektir (Çizelge 3.10.) BAP ile CHRM5'in Reseptör-ligand etkileşimleri, 458, 465, 470, 474, 477, 478 ve 481 numaralı rezidüler ile olmaktadır. Pi etkileşimleri mevcuttur. Reseptör-ligand etkileşim bölgesi hidrofobisitesi düşük ancak solvent erişimi yüksek özelliktedir. Bu nedenle etkileşimlerin kalıcılığı ve etkisi tartışmalıdır. BAP ile CHRM5 etkileşimlerine ait 2 ve 3 boyutlu olarak etkileşimleri ise Şekil 3.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. Tüm ligandların CHRM5 ile etkileşim skorları

Ligand	Bağlanma Afinitesi	rmsd/ub	rmsd/lb
CHRM5 BAP	-11,3	0	0
CHRM5 DDT	-9	0	0
CHRM5 PCB52	-8,9	0	0
CHRM5 DDE	-7,6	0	0
CHRM5 PBDE153	-7,6	0	0
CHRM5 PBDE99	-7,7	0	0
CHRM5 PCB153	-7,6	0	0
CHRM5 PCB180	-8,1	0	0



Şekil 3.5. CHRM5 ile CID-4-BAP molekülünün etkileşiminin 2 ve 3 boyutlu gösterimi

BAP molekülünün ASGP reseptörüne ilgisi yüksektir (Çizelge 3.11.) Reseptör-ligand etkileşimleri, 458, 465, 470, 474, 477, 478 ve 481 numaralı rezidüler ile

olmaktadır. Pi etkileşimleri mevcuttur. Reseptör-ligand etkileşim bölgesi hidrofobisitesi düşük ancak solvent erişimi yüksek özelliktedir. Bu nedenle etkileşimlerin kalıcılığı ve etkisi tartışmalıdır.

Çizelge 3.11. Tüm ligandların ASGP ile etkileşim skorları

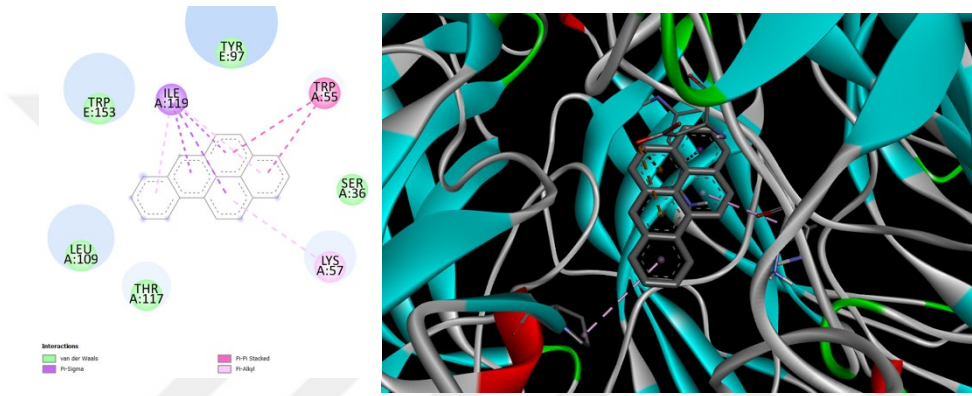
Ligand	Bağlanma Afinitesi	rmsd/ub	rmsd/lb
ASGP BAP	-11,2	0	0
ASGP DDT	-7	0	0
ASGP PCB52	-6,9	0	0
ASGP DDE	-6,4	0	0
ASGP PBDE153	-6	0	0
ASGP PBDE99	-6,3	0	0
ASGP PCB153	-6,3	0	0
ASGP PCB180	-6,5	0	0

BAP molekülünün Adonelin Siklaz G protein reseptörüne ilgisi yüksektir (Çizelge 3.11.) Reseptör-ligand etkileşimleri, 458, 465, 470, 474, 477, 478 ve 481 numaralı rezidüler ile olmaktadır. Pi etkileşimleri mevcuttur. Reseptör-ligand etkileşim bölgesi hidrofobisitesi düşük ancak solvent erişimi yüksek özelliktedir. Bu nedenle etkileşimlerin kalıcılığı ve etkisi tartışmalıdır.

Çizelge 3.12. Tüm ligandların CHRNA3 ile etkileşim skorları

Ligand	Bağlanma Afinitesi	rmsd/ub	rmsd/lb
CHRNA3 BAP	-9,2	0	0
CHRNA3 DDT	-7,4	0	0
CHRNA3 PCB52	-6,5	0	0
CHRNA3 DDE	-6,6	0	0
CHRNA3 PCB153	-6,9	0	0
CHRNA3 PCB180	-7,3	0	0

BAP molekülünün alfa3beta4 nikotinik asetil kolin (CHRNA3) reseptörüne ilgisi yüksektir (Çizelge 3.12.) Reseptör-ligand etkileşimleri, 458, 465, 470, 474, 477, 478 ve 481 numaralı rezidüler ile olmaktadır. Pi etkileşimleri mevcuttur. Reseptör-ligand etkileşim bölgesi hidrofobisitesi düşük ancak solvent erişimi yüksek özelliktedir. Bu nedenle etkileşimlerin kalıcılığı ve etkisi tartışmalıdır. CHRNA3 ve BAP etkileşimlerine ait 2 ve 3 boyutlu olarak etkileşimleri ise Şekil 3.6.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.6. CHRNA3 ile CID-4-4 BAP molekülünün etkileşiminin 2 ve 3 boyutlu gösterimi

3.4. Mikrodizin Analizleri ve Biyoinformatik Analiz

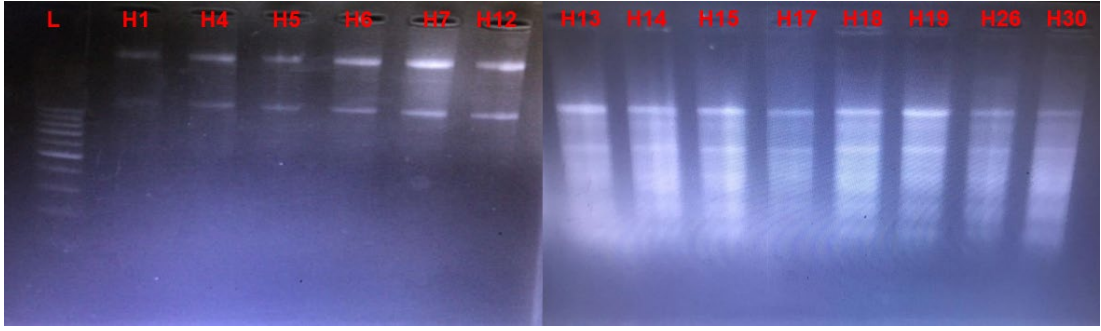
3.4.1. RNA Ekstraksiyon

RNA'nın fragil yapısı ve plasenta dokusunda RNase miktarının diğer dokulara oranla çok daha yüksek olması (Fajardy ve ark., 2009) sebebiyle yüksek kalitede RNA elde edilmesi oldukça zordur. Alınan örneklerden elde edilen RNA'ların konsantrasyonu NanoDrop ND-1000 Spektrometre (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) ile tayin edilmiştir. NanoDrop sonuçları çizelge 3.13.'de sunulmuştur. Absorbans 260/280 oranı 2.0-2,3 arası olan örnekler çalışmaya dahil edilerek bir sonraki aşamaya geçildi.

Çizelge 3.13. RNA NanoDrop sonuçları

Örnek Kodu	RNA Konsantrasyonu	260/280	260/280
H1	338,78	2,12	2,20
H2	379,70	2,18	2,10
H3	340,00	2,20	2,21
H4	388,70	2,11	2,15
H5	389,50	2,09	2,18
H6	184,80	2,17	2,10
H7	338,80	2,15	2,16
H9	353,00	2,14	2,17
H12	238,60	2,15	2,21
H13	280,10	2,10	2,17
H14	378,50	2,20	2,21
H15	275,90	2,13	2,20
H17	147,50	2,17	2,12
H26	290,20	2,12	2,21
H30	328,50	2,12	2,24
D1	92,00	2,01	2,11
D2	120,10	2,10	2,16
D3	154,00	2,14	2,18
D4	128,00	2,08	2,21
D5	87,90	2,11	2,17
D6	210,00	2,01	2,08
D102	110,00	2,06	2,14
D103	107,00	2,10	2,12
D104	165,00	2,18	2,21
D105	142,00	2,04	2,16

RNA bütünlüğünü değerlendirmek üzere %1'lik agaroz jelde yürütülen örneklerle ait görüntüler Şekil 3.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. RNA agaroz jel görüntüleri.

3.4.2. cRNA ve ss-cDNA Sentezi ve Fragmentasyon Bulguları

Yapılan cRNA sentezi sonrası çalışmaya devam edilmesi için uygun görülen örneklerle ait cRNA NanoDrop sonuçları Çizelge 3.14’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.14. cRNA NanoDrop sonuçları

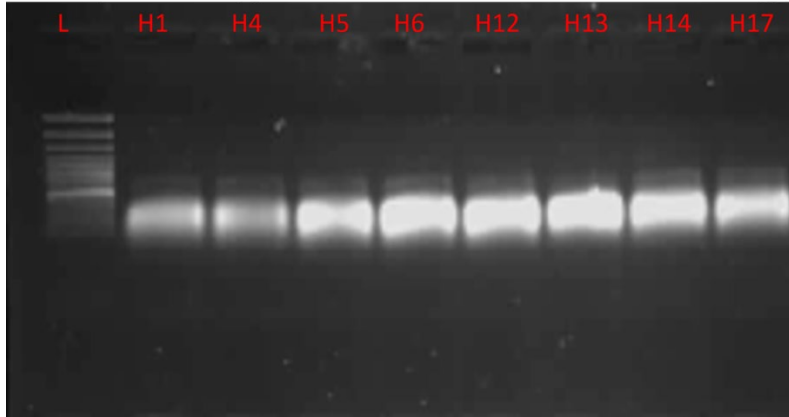
Örnek Kodu	RNA Konsantrasyonu	260/280	260/280
H1	4415,3	1,77	1,81
H4	4219,5	1,87	1,93
H5	4047,6	1,89	1,94
H6	4173,0	1,87	1,93
H7	2953,6	2,12	2,15
H12	4065,8	1,92	1,98
H13	4222,4	1,86	1,91
H14	3798,3	2,03	2,09
H15	2379,5	2,15	2,19
H17	3817,6	2,04	2,13

Elde edilen ss-cDNA sentezi sonrası çalışmaya devam edilmesi için uygun görülen örneklerle ait ss-cDNA NanoDrop sonuçları Çizelge 3.13’de gösterildi.

Çizelge 3.15. ss-cDNA NanoDrop sonuçları

Örnek Kodu	RNA Konsantrasyonu	260/280	260/230
H1	445,2	2,10	2,14
H4	414,2	2,12	2,14
H5	407,8	2,04	2,10
H6	403,0	2,14	2,22
H7	382,7	2,17	2,25
H12	365,8	2,14	2,10
H13	412,4	2,04	2,10
H14	398,7	2,06	2,10
H15	402,3	2,13	2,22
H17	385,8	2,05	2,14

ss-cRNA eldesini takiben fragmentasyon aşaması gerçekleştirilmiştir. Ampfiliye edilen ss-cRNA'ların hibridize edilmeli çok zordur. Bu yüzden 35-200 bp uzunluğunda fragmentlere ayrılması gerekmektedir. Takip edilen IVT protokolüne uygun olarak fragmentasyon işlemini takiben örneklerin %4'lük agaroz jelde yürütülerek fragment boyutu kontrol edildi. Fragmentasyon kontrolüne ait jel görüntüsü Şekil 3.8'de paylaşılmıştır.



Şekil 3.8. Fragmentasyon sonrası jel görüntüsü

3.4.3. Biyoinformatik Bulgular

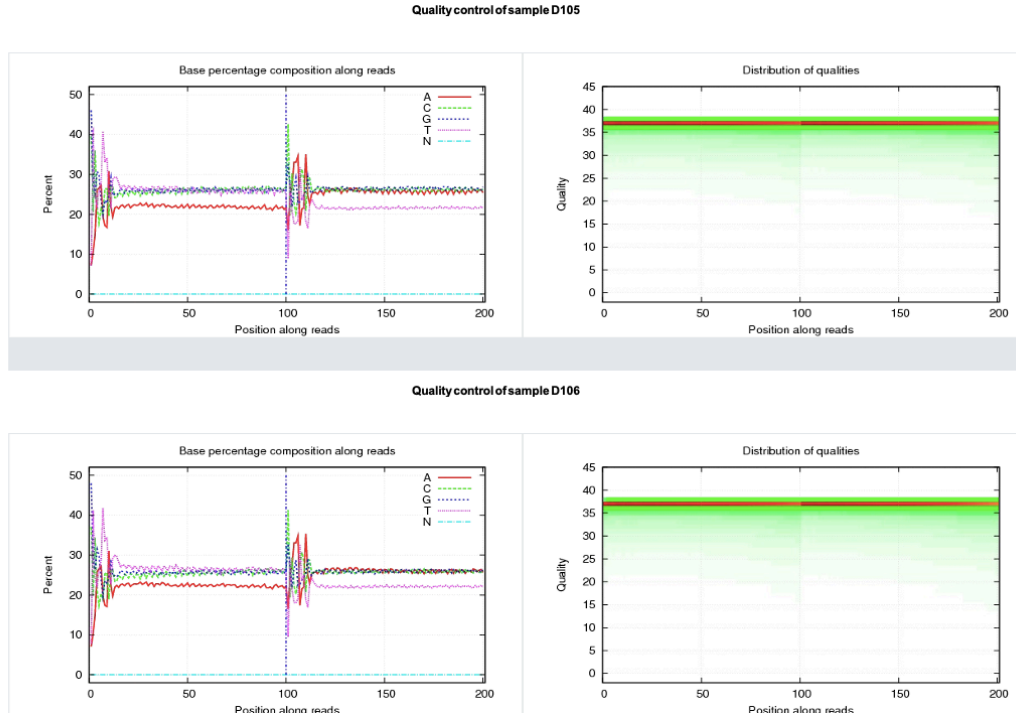
3.4.3.1. Köpek RNasek Bulguları

Köpek plasenta örneklerine ait RNA sekans işlemleri Epigen Biyoteknoloji firmasından hizmet alımı olarak gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen hizmet alımında D1, D2, D6, D7, D8, D9, D12, D101, D102, D103, D104, D105, D106, D107 örnekleri incelendi. Örnekler ait okuma kalitesi ve karakterizasyonu ile ilgili bilgiler Çizelge 3.15’de paylaşıldı.

Çizelge 3.15. Okuma kalite ve karakterizasyonu

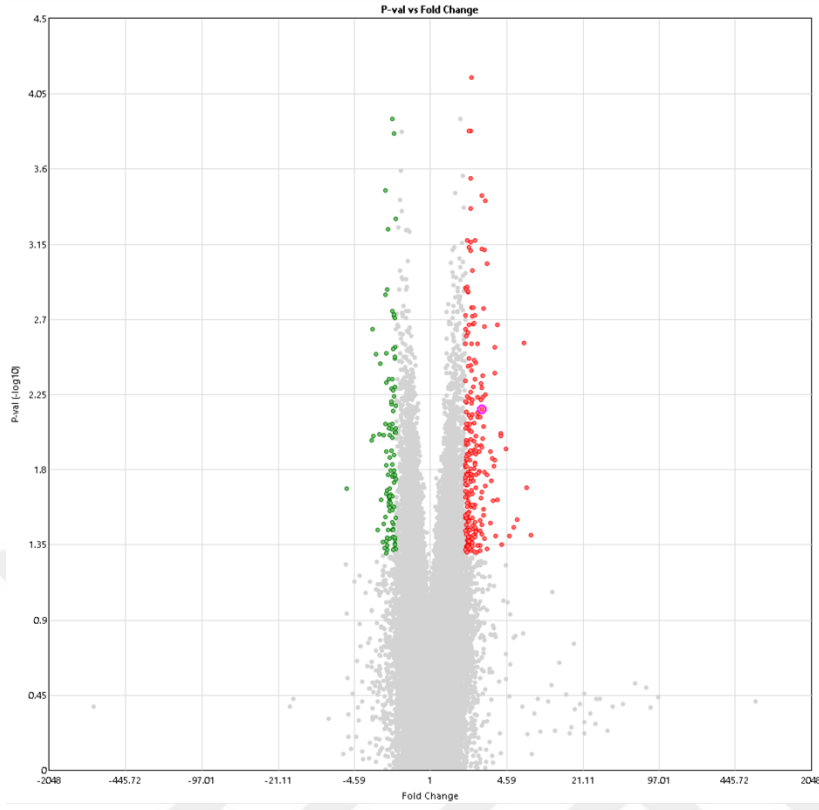
Örnek	Temiz Okuma	Temiz Bazlar	Okuma Uzunluğu (bp)	Q20 (%)	GC (%)
D1	97,630,088	9,763,008,800	100	96.84	51.21
D2	97,956,542	9,795,654,200	100	97.28	52.34
D7	97,627,556	9,762,755,600	100	97.08	51.01
D8	100,686,712	10,068,671,200	100	97.20	50.46
D9	93,255,258	9,325,525,800	100	97.24	52.62
D12	103,688,304	10,368,830,400	100	97.22	52.35
D101	117,669,326	11,766,932,600	100	96.65	51.51
D102	139,570,862	13,957,086,200	100	96.78	50.30
D103	93,293,498	9,329,349,800	100	96.90	51.57
D104	97,701,814	9,770,181,400	100	96.93	51.50
D105	100,345,996	10,034,599,600	100	96.88	52.24
D106	94,875,448	9,487,544,800	100	97.02	52.16

RNA sekanslama işleminde numune filtrelenmesi sonrasında okuma boyunca gerçekleştirilen yüzde dağılımları ve nitelik dağılımlarına ait verilere göre örnekler ait sonuçların kalite kontrolleri değerlendirildi. Bu değerlendirmeler kapsamında D105 ve D106 örneklerine ait yüzde dağılım ve nitelik dağılım grafikleri örnek olarak Şekil 3.9’da paylaşılmıştır. Diğer örnekler ait veriler de ekler kısmında sunuldu.



Şekil 3.9. Okuma boyunca gerçekleştirilen yüzde dağılımları ve nitelik dağılımlarına ait grafik

Kirletici tespit edilen D8, D9, D102, D103 ve D106 örnekleri ile kirletici tespit edilemeyen D1, D2, D7, D101, D104 ve D105 örneklerinin karşılaştırılması amacıyla iki farklı grup için ifade farklılıkları incelendi. Bu iki grup arasında 426 genin farklı ifade edildiği tespit edildi. İfade farklılığını gösteren görsel Şekil 3.10.’da gösterilmiştir.



Şekil 3.10. Gruplar arası gen ifade farklılığını gösteren grafik

Belirlenen bu gen setleri ile Gene Ontology ve KEGG yolak analizi gerçekleştirildi. KEGG yolak analizi sonrasında elde edilen yollar arasında kolinerjik sisteme ile ilişkili olan ilk 8 yolak Çizelge 3.17’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.17. KEGG yolak analizinde en üstteki 8 yolak

	KEGG Yolakları	Sayı	P Değeri
1	Kalsiyum Sinyalizasyon Yolağı	8	0.0005
2	Hücre İskeleti Düzenleme	6	0.008
3	PI3K-Akt Sinyalizasyon Yolağı	5	0.002
4	Karbonhidrat Karşılıklı Dönüşümü	4	0.002
5	cAMP Sinyalizasyon Yolağı	2	0.002
6	Sülfür Metabolizması	3	0.002
7	Kanserde Cholinerjik Metabolizma	2	0.002
8	Amino Asit Transport	3	0.002

Karşılaştırma grupları arasında yapılan Gene Ontology analizi sonucunda farklı ifade edilen 426 genden ifade farklılıklarına göre sıralama yapıldı. Bu sıralamada kolinerjik sistemle ilişkili olanlar filtreleme yöntemiyle seçilerek 18 gen düşürüldü. Bu 18 genin kat değişimleri ve ilgili yolaklarını belirten Çizelge 3.18.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.18. Kolinerjik sistemle ilişkili seçilen 18 genin gruplar arası karşılaştırılması

GENE ID	Gene Sembol	Kat Değişimi	Yolaklar
28312	H19	1.6	
9518	SLC2A1	1.7	Kalsiyum Sinyalizasyon Yolağı
4557	PLCy	2.1	Kalsiyum Sinyalizasyon Yolağı
9566	SLC24A5	2.0	Kalsiyum Sinyalizasyon Yolağı
8876	PLCB1	1.4	Kanserde Kolin Metabolizması
8878	PLCB3	1.7	Kanserde Kolin Metabolizması
6540	CHRM1	1.6	Cholinergic System Receptor
6542	CHRM3	1.8	Cholinergic System Receptor Kalsiyum Sinyalizasyon Yolağı
6544	CHRM5	2.1	Cholinergic System Receptor
3446	PFN	2.14	Hücre İskeleti Regülasyonu
4557	CAMK	2.16	Kalsiyum Sinyalizasyon Yolağı
6599	AKT	2.21	cAMP Sinyalizasyon Yolağı
7756	RAS	2.36	cAMP Sinyalizasyon Yolağı Kanserde Kolin Metabolizması
3257	Rac	2.14	Hücre İskeleti Regülasyonu
3240	PI3K	2.32	PI3K-Akt Sinyalizasyon Yolağı
9584	SLC44A1	2.04	Choline Transporter-Like Protein Amino Asit Taşınması
1014	gbsB	1.86	Amino Asit Taşınması

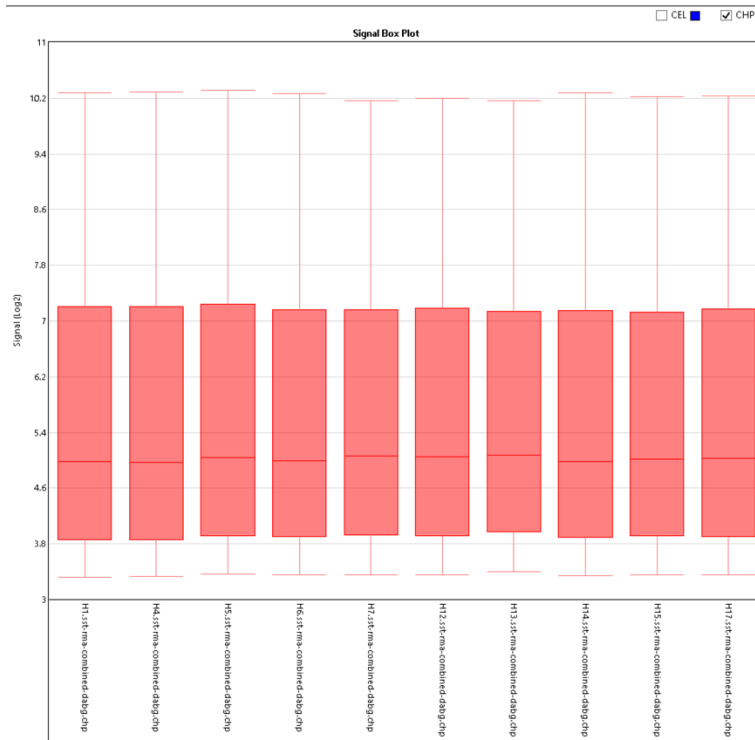
3.4.3.2. Mikrodizin Analiz Bulguları

Örneklerin taranmasından sonra ham verinin oluşturulma işlemleri cihazın yazılımında gerçekleştirildi ve her bir örnek için CEL dosyaları elde edildi. Elde edilen CEL dosyaları TAC (Trankriptom Analiz Konsolu) ile ilk analizleri yapıldı. Bu raporun sonucuna göre örneklerimiz kontrol eşik değerlerini geçerek biyoinformatik analizler için uygun bulundu ve ileri analizlere tabi tutuldu. Örneklerin CEL dosyaları dCHIP programına yüklendi ve ilk olarak ön işleme

analizleri yapıldı. Ön işleme analizlerini takiben normalizasyon işlemleri tamamlandı. TAC'a yüklenen örneklerin ilk analizlerine ait raporlar ve normalizasyon grafiği Şekil 3.11 ve 3.11'da gösterilmiştir.

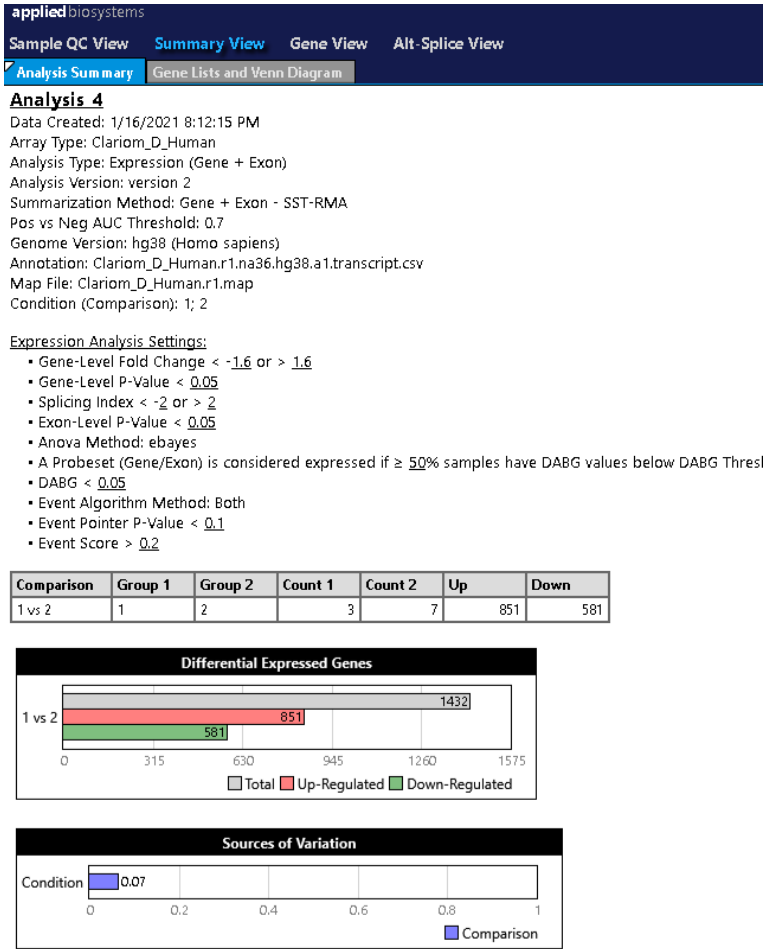
applied biosystems					
Sample QC View Summary View Gene View Alt-Splice View					
Sample Table					
Apply View Filters Show/Hide Columns Export Add Column Reanalyze Samples					
File Name count: 10	Labeling Controls Threshold	Hybridization Controls Threshold	Pos vs Neg AUC Threshold	Condition	
H1.sst-rma-combined-dabg.chp	Pass	Pass	Pass	1	
H4.sst-rma-combined-dabg.chp	Pass	Pass	Pass	2	
H5.sst-rma-combined-dabg.chp	Pass	Pass	Pass	2	
H6.sst-rma-combined-dabg.chp	Pass	Pass	Pass	1	
H7.sst-rma-combined-dabg.chp	Pass	Pass	Pass	2	
H12.sst-rma-combined-dabg.chp	Pass	Pass	Pass	2	
H13.sst-rma-combined-dabg.chp	Pass	Pass	Pass	2	
H14.sst-rma-combined-dabg.chp	Pass	Pass	Pass	2	
H15.sst-rma-combined-dabg.chp	Pass	Pass	Pass	2	
H17.sst-rma-combined-dabg.chp	Pass	Pass	Pass	1	

Şekil 3.11. TAC'a yüklenen örneklerin ilk analiz sonuçları



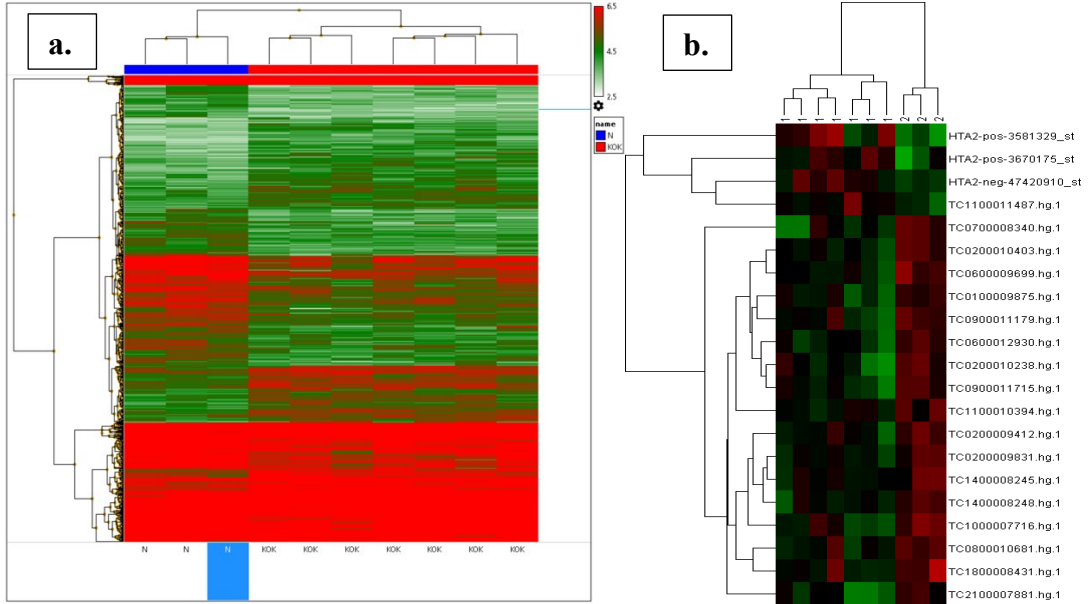
Şekil 3.12. TAC Normalizasyon analiz sonucuna ait görsel

Daha sonra örnekler varyans filtreleme uygulanmış ve sonrasında farklı ifade edilen genleri belirlemek amacıyla örnek grupları oluşturuldu. Örnek grupları kirlenici tespit edilen insan plasenta örneklerinden H4, H5, H7, H12, H13, H14, H15 ve kirlenici tespit edilemeyen H1, H6 ve H17 örnekleri olmak üzere iki grup oluşturuldu. Bu işlem sonucunda ikili grup arasında ifade düzeyleri farklılık gösteren genler belirlendi. Toplamda 851 gende artış, 581 gende azalma olmak üzere 1432 gen belirlendi ve bu aşamada <0.05 P anlamlılık değeri baz alınarak en az 1.6 kat ifade değişimi olacak şekilde filtreleme yapıldı. Toplamda elde edilen gen sayısı ve ifade analiz ayarlarına ait bilgiler Şekil 3.10'de paylaşıldı. Toplamda taranan 135 750 adet gene ait ayrıntılı bilgi ve istatistiksel verilere ait görsel Ek 4.'de sunuldu.



Şekil 3.13. İfade farklılığı görülen gen sayısı ve analiz ayarları

İki grup arasındaki gen ifade farklılığını gösteren Şekil 3.14'deki hiyerarşik kümeleme analizi grafiğinde örnek grupları arasındaki ayrım görüldü. Elde edilen bu sonuçlardan sonra ileri biyoinformatik analizlere geçilerek yolak tespitine geçildi. Bu işlem için DAVID veri tabanı kullanıldı. DAVID veri tabanı bu genler ile zenginleştirilmiş veri analizi yaparak zenginleştirme skoru oluşturur (Huang ve ark., 2009). Bu zenginleştirme skorlarına göre 23 farklı kümeleme ile 234 yolak tespit edildi. Bu yolaklar içerisinde kolinerjik sistemle ilişkili olarak; 1.3 zenginleştirme skorunun üzerinde olan toplamda 16 yolak tespit edildi. Bu yolakların bazılarına ait Çizelge 3.19'da paylaşılmıştır. Ayrıca detaylı DAVID yolak analizi sonucu Ek. 5.'de sunuldu.



Şekil 3.14. Kümeleme analizleri sonucunda elde edilen görseller **a.** TAC yazılımında elde edilen, **b.** BRB yazılımında elde edilen.

Çizelge 3.19. Kolinerjik sistem ile ilişkili bulunan yolak listesi

	Zenginleştirme Skoru	Yolak
1	1.35	Muskarinik asetilkolin reseptör ailesi
2	1.35	Adenilat Siklaz-inhibisyon G-protein asetilkolin reseptör sinyalizasyon yolağı
3	1.35	G-protein asetilkolin reseptör aktivasyonu

4	1.35	Fosfolipaz C-aktivasyon G-protein asetilkolin reseptör sinyalizasyonu
5	1.35	Kolinerjik sistem sinapsis geçiş
6	1.35	Hücre proliferasyonu
7	1.35	Kalsiyum sinyalizasyon yolağı
8	1.35	Hücre iskeleti regülasyonu
9	1.35	Amino asit transport
10	1.35	Hücre enerji metabolizması

İnsan plasenta örneklerinden elde edilen transkriptom verilerinde kirlletici maruziyetine bağılı olarak değışen yolaklar arasında köpek plasenta örneklerinden farklı olarak hücresel enerji metabolizması, adenilat siklaz-inhibisyon G-protein asetilkolin reseptör sinyalizasyon yolağı ve hücre proliferasyonu ile ilgili genlerin ifade farklılıkları olduğı görüldü. Kalsiyum sinyalizasyon yolağı, muskarinik reseptörler, hücre iskeleti regülasyonu, amino asit transferi ve G-protein asetilkolin reseptör aktivasyonu gibi yolaklar ise ortak olarak değışim gösterdiği görüldü. Köpek verilerinde ise insan örneklerinden farklı olarak kanserde kolin metabolizmasına ait genlerde belirgin bir farklılık görüldü.

4. TARTIŞMA

Çevresel kirleticiler arasında antropojenik kaynaklı kalıcı organik kirleticiler (KOK) uzun mesafelere taşınabilmeleri, çevrede kalıcı olmaları, ekosistemde biyoakümüle ve biyomagnifiye olmaları nedeniyle küresel olarak endişe oluşturan kimyasallardır. Yasaklanmalarına karşın bu maddeler çevremizde bulunmakta ve popülasyonda düşük konsantrasyonda ve karışım halinde maruziyet yaratmaktadır. Bu maruziyet fetüste teratojenite, karsinojenite postnatal metabolik ve nörolojik kompleks hastalıklara predispozisyon; erken doğum, düşük doğum ağırlığı, preeklampsi gibi çeşitli etkiler oluşturabilmektedir (Padula ve ark., 2018). KOK maruziyetine bağlı, ksenobiyotiklerin plasental kolinerjik sisteme olan etkileri ve bu etkilerin fetüsün gelişimi ve sağlığını olumsuz olarak etkilemesi bu sisteme ait protein yapılarının ekspresyon seviyesindeki artış ya da azalışı ile meydana gelmektedir. Fetüsün kirleticilerin bu sistem vasıtasıyla etkilenmesine karşı korunmasında ekspresyondaki değişiklikler büyük öneme sahiptir. Yapılan araştırmalar plasentada kirletici miktarının tespitine veya plasental kolinerjik sistem unsurlarının deneysel koşullarda bir veya birkaçının maruziyetine bağlı ifadesinin araştırılmasına yönelik olup, gerçek maruziyet koşullarında etkileşimi ve bu etkileşimin yollarını kapsayan detaylı bir araştırma bulunmamaktadır.

Kalıcı organik kirleticilerin analizi öncesinde kullanılan birçok ekstraksiyon yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemler analizi yapılacak matrikse göre değişmektedir. Çalışmamızda kullanılan ekstraksiyon metodu Kuzukıran ve arkadaşlarının 2018 yılında geliştirdiği metotlara göre uyarlandı (Kuzukıran ve ark., 2018). Dokuya uyarlanan ve kirletici analizi amacıyla geliştirilen bu metot 2014 yılında Vizcaino ve arkadaşlarının yaptığı metotlar ile tutarlılık göstermektedir (Vizcaino ve ark.,2014).

Çevresel kirleticilerden başta OP'ler olmak üzere OK, PCB ve PBDE ve PAH'ların kolinerjik sisteme olan etkileri birçok çalışma ile ortaya konmuştur (Gill

ve ark., 2013; Kodavanti, 2005). Nörolojik etkilerin yanı sıra, nöronal olmayan kolinerjik sisteme ait unsurların birçok fizyolojik fonksiyonları yerine getirdiği bilinmektedir (Welsch, 1976; Lyall ve ark., 1998). Plasenta bu fonksiyonu ile fetüsün büyüme ve gelişimini etkileyebilmekte ve sağlık problemlerine yol açabilmektedir.

Ren ve arkadaşları tarafından 2011 yılında plasenta ile yapılan bir çalışmada, bazı PAH ve DDT kirleticileri tespit edilmiş ve bu kirleticiler ile nöronal tüp defektleri arasındaki ilişki incelenmiştir (Ren ve ark., 2011). Bu çalışmada toplam PAH yükü ortalama 597 ng/g bulunurken tez çalışmamızda ortalama PAH yükü 877 ng/g olarak bulunmuştur. DDT kirletici yükü ise ortalama 60 ng/g bulunurken çalışmamızda 54,82 ng/g olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki köpek örneklerinde ise bu değerler sırasıyla 160 ng/g ve 156 ng/g olarak bulunmuştur. 2018 yılında yapılan bir çalışmada ise farklı sayıda PCB, PBDE ve OK'ların plasentadaki varlığı ortaya konmuştur (Jeong ve ark., 2018). Bu çalışmada ortalama toplam 5,83 ng/g PCB yükü, 63,5 ng/g PBDE yükü, 11,2 ng/g OK yükü tespit edildi. Bizim çalışmamızda elde edilen ortalama toplam PCB yükü 16,6 ng/g, PBDE yükü ise 89,71 ng/g olarak bulunmuştur. Bu değerler köpek plasenta örnekleri için ise sırasıyla 133 ng/g PCB, 488 ng/g PBDE yükü şeklindedir. İnsan plasentalarında yapılan bu çalışmaların aksine, bilgilerimize göre köpek plasentasında kalıcı organik kirletici tespitine ait bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamız kapsamında doğum yapmış annelerden ve doğum yapmış köpek sahiplerinden alınan anket verilerine göre değerlendirmeler yapılmıştır. Fisher ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı çalışmaya göre annenin gebelik yaşı ile kalıcı organik kirleticilere maruziyet arasında anlamlı bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Fisher ve ark., 2016). Çalışmamızda da doğum yapmış annelerin yaş ortalaması $32,63 \pm 5,01$ 'dir. Yaşları, örneklemin yaş ortalamasının üstünde olan 10 anneden 7'sinde yüksek oranda kirleticiye rastlandı.

Sigara gibi birçok tütün ve tütün ürünlerinden dumanı son derece karmaşık bir kimyasal bileşimdir ve birçok polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) dahil olmak

üzere çok sayıda toksik ve kanserojen madde içerir. PAH'lar, kanserojen ve mutajenik özellikleriyle bilinen iki veya daha fazla kaynaşmış benzenoid halkadan oluşan bir bileşikler sınıfıdır ve tütün dumanında beş yüzden fazla farklı PAH vardır (Rodgman ve Perfetti, 2016). Yapılan birçok çalışmada, gebelik süresince sigara içen ya da sigara içilen ortama maruz kalan annelerin plasenta ve kord kanında yüksek oranda PAH değerleri ile karşılaşıldı (Jedrychowski ve ark., 2013). Çalışmamızda annelerin %25'i gebelik süresince sigara kullandığını ve %65'i sigara içilen ortama maruz kaldığını beyan etmiştir. Alınan plasenta örneklerinin %70'inde en az bir adet PAH'a rastlandığı görüldü. Bu bulgular sigara içen ya da sigara içilen ortama maruz kalan annelerden alınan plasenta örnekleri ile plasentada PAH varlığı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Köpek plasenta örneklerinden elde edilen PAH analiz sonuçlarında ise yaşadığı evde sigara içilen ortama maruz kalan 6 köpekten 4'ünde yüksek oranda PAH değerleri saptandı.

Plasentada yapılan kirletici taramalarına ait çalışmalarda, kaçınıcı gebeliğe ait plasenta olduğuna dair bir bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda ilk doğumunu yapan ve %45'lik kısmını oluşturan 9 annenin 7'sinde kirletici tespit edildi. Kirletici ortlaması 874,5 ng/g olarak hesaplandı. Geriye kalan iki ve üstü doğum yapmış 11 anneden alınan örneklerden 7'sinde ise ortalama 355,8 ng/g kirletici tespit edildi. Bu bulgular ışığında ilk doğumunu yapan annelere ait plasenta örneklerinde kirletici yükü iki ve üzeri doğum yapan annelere kıyasla yaklaşık 2,5 kat fazla bulundu. Bu durumun ilk doğumunu yapanların o zamana kadar almış oldukları kirtleticilerin ilk plasentayla atılması ve diğer doğumlarda plasentaya aktarılan kirletici miktarının bu sebeple düşmüş olabileceği ile ilişkilendirilebilir. Bu anlamda birinci doğuma ait plasenta örneklerindeki kirletici yükünün belirgin bir şekilde fazla olması yeni çalışmalara ışık tutacaktır.

İnsan plasentas ile yapılan araştırmalara yönelik, örnek alımı ve metot geliştirilmesi ile ilgili sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır (Burton ve ark., 2014; Roberts ve ark., 2019). Çalışmamızda bulunan insan plasenta örnekleri bu çalışmaları referans alarak toplanmıştır. Bununla beraber çalışmamızın köpek plasenta örneklerini de kapsaması sebebiyle, köpek plasenta örneklerinin hem genomik

araştırmalar hem de analitik araştırmalar için insan rnekelerindeki atımlar takip edilerek; materyal metot kısmında belirtilen aşamalar optimize edildi.

Vafeiadi ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışmada kirletici tespit edilen örnekler ile düşük plasenta ağırlığı ve düşük doğum ağırlığı arasında önemli bir korelasyon bulunmuştur (Vafeiadi ve ark., 2014). Çalışmamız kapsamında köpek ve annelerden elde edilen plasentalardaki kirletici seviyeleriyle plasenta ya da doğum ağırlığı ile elde edilen örneklem sayısıyla ilişkilendirildi.

İn siliko yöntemler biyoinformatik sistemlerin gelişmesi ile birlikte toksikoloji alanı içinde önemli bir yere sahip olmaktadır. Kalıcı organik kirleticilerin organik moleküllere olan ilgisi ve biyolojik etkileri hakkında birçok çalışma bulunmaktadır. Jin Xu ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı bir çalışmada başta DDE ve bazı PCB’ler olmak üzere, bu kirleticiler ile androjen reseptörler arasındaki moleküler dinamik ve bağlanma affiniteleri üzerinde durulmuştur (Jin Xu ve ark., 2013). Çalışmamızda da diğer kirletici matrikslerine kıyasla çok daha fazla yoğunlukta tespit edilen DDE, PCB153, PBDE28 ve krizen’nin, çalışmamızın temelini oluşturan kolinerjik sisteme ait reseptörler (CHRM1, CHRM3, CHRM5) ile arasındaki moleküler dinamik ve bağlanma affiniteleri hesaplanarak, bu kirleticilerin bu reseptörlere olan ilgisini *in siliko* yöntemlerle ortaya konmuştur. Özellikle DDE ve PCB153’n bu reseptörlere olan bağlanma affinitelerinin yüksek olduğu görülmüştür.

İnsan plasenta örneklerinde kalıcı organik kirletici tespiti ile ilgili bir sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak bu kirleticilerin tespiti ile birlikte transkriptom analizleri ve ifade farklılıklarına ait çalışmalar bulunmamaktadır. Ouidir ve arkadaşlarının 2020 yılında gerçekleştirdiği çalışmada ise epigenom analizi yapılarak tespit edilen kirleticilerin DNA metilasyonu ile epigenetik etkileri üzerinde durulmuştur (Ouidir ve ark., 2020). Çalışmamızda ise plasenta örneklerinde kirletici tespiti ile birlikte transkriptom profillemeye ve ifade farklılıkları değerlendirildi.

Nöronal olmayan kolinerjik sistem; bir çok fizyolojik fonksiyon, patolojik ve enfeksiyöz hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Beckman ve Lips, 2013). Nöronal olmayan asetilkolin, mitoz, trofik fonksiyonlar, siliyer aktivite, hücre-hücre teması, hücre iskeleti ve ayrıca bariyer ve bağışıklık fonksiyonları gibi önemli hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Wessler ve ark., 2016). Çalışmamız kapsamında kalıcı organik kirletici tespit edilen ve tespit edilemeyen plasenta örnekleri ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilen transkriptom analizleri sonucunda hücre iskeleti, hücresel kalsiyum metabolizması ve bağışıklık fonksiyonlarından sorumlu yolaklar ile ilgili gen ifade değişikliklerine ait bulgular bulunmuştur. Bu bağlamda özellikle trofoblast hücrelerinin iskelet yapılarının etkilenmesi ve yapısında meydana gelebilecek değişiklikler plasental bariyer özelliğini bozarak koruyuculuğunu azaltabilir. Gebelikte kalsiyum metabolizması, kalsiyum, fosfor, D vitamini, paratiroid hormon ve kalsitonun içeren karmaşık bir süreçtir (Pitkin, 1983). Bu sebeple hücresel kalsiyum metabolizmasında meydana gelebilecek değişiklikler önemli problemlere sebep olabileceği düşünülebilir. Adenilat siklaz-inhibisyonu G-protein (cAMP) asetilkolin reseptör sinyalizasyon yolağı, AMP'ye bağımlı ve birçok canlı organizma ve yaşam süreci için gereklidir ve birçok farklı hücre tepkisine cAMP aracılık eder (Sassone-Corsi, 2012). Bu yolak vasıtasıyla, bir çok hücrenel enzim aktif edilmes ve gen ekspresyonu düzenlenmesinde rol alabilmektedir. Önceden var olan enzimlerin aktivasyonu çok daha hızlı bir süreçken, gen ifadesinin düzenlenmesi çok daha uzundur ve saatler sürebilir. CAMP yolu, cAMP'nin fonksiyon kaybı (inhibisyon) ve fonksiyon kazanımı (artışı) yoluyla incelenir.

ACh'nin plasental amino asit taşınmasını ve kan akışını düzenleyebildiği ön görülmektedir. Bilateral perfüze plasental lobüllerin fetal damarlarından ACh salımının preeklampsi sırasında azaldığı, ancak metabolize edilemeyen amino asit alfa-aminoizobutirik asidin perfüzyon basıncında veya materno-fetal transferinde herhangi bir değişiklik ile ilintili olmadığı bulunmuştur (Sánchezve ark., 2015). Bununla birlikte, insan plasental ACh eksplantlarından ((2-benzoiletil) trimetilamonyum veya vezamikol tarafından inhibe edildiğinde) ve prostaglandin E2

ve F2alfa'nın salımları arasında bir ilişki bulunmuştur. Bu nedenle, plasental amino asit transferinin veya vasküler işleyişinin kontrolünde ACh'nin rolüne ilişkin kanıtlar kesin olmamakla birlikte var olduğu düşünülmektedir (King ve ark., 2008). Çalışmamız kapsamında köpek ve insan plasenta örneklerinden yapılan transkriptom analizleri sonucunda, kirletici tespit edilen ve edilemeyen gruplar arasında amino asit transportuna ait gen ifade değişikliğini gösteren bir yolak saptanmıştır. Bu da önceki çalışmalarda ön görülen; nöronal olmayan kolinerjik sistemlerin amino asit taşınmasında rolü olduğu ön görüşünü destekleyen bir bulgudur.

İlaçların ve kimyasalların anneden fetüse geçişi, maddelerin plasentadan taşınması ve metabolizmasından etkilenir. Ayrıca bu ilaçlar ve kimyasallar, plasentadaki besin taşıma sistemlerini etkiler (Pastrakuljic, Derewlany, and Koren 1999). Kolinerjik reseptörün negatif etkilenmesi ile asetilkolin (ACh) ile kolaylaştırılmış amino asit taşınmasını engeller. Yine Ca^{2+} metabolizmasındaki değişimler de amino asit akışını etkiler ve böylece ACh salınımını engeller. ACh, kan damarlarının genişlemesine neden olur ve endotelyal muskarinik reseptörlerin aktivasyonu ile plasental kan akışını sürdürür (Pastrakuljic, Derewlany, and Koren 1999). Çalışmamız bulgularında hem insan hem de köpek transkriptom profillemesi analizlerinde amino asit transportunun etkilendiği görüldü.

İnsan profillemesi analizi sonucunda, kalıcı organik kirleticiler ve plasental kolinerjik sistem ile ilgili 12 farklı yolak üzerinden değişiklik olduğu görülmektedir. Köpek ve insan plasentasında yapılan bu çalışmada iki farklı türde de ortak olan hücre iskeleti, amino asit transportu, kalsiyum sinyalizasyonu, PI3K-Akt sinyalizasyonu ve kolinerjik reseptör sistemi gibi hücre metabolizmasına etkileyen önemli yolları benzer şekilde etkileyebileceği görülmüştür. Köpek transkriptom profillemesiyle kıyaslandığında hücresel enerji metabolizması, adenilat siklaz-inhibisyon G-protein asetilkolin reseptör sinyalizasyon yolağı ve hücre proliferasyonu ile ilgili genlerin ifade farklılıkları olduğu görüldü.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Antropojenik kaynaklı kalıcı organik kirleticiler (KOK); uzun mesafelere taşınabilmeleri, çevrede kalıcı olmaları, ekosistemde biyoakümüle ve biyomagnifiye olmaları nedeniyle küresel olarak endişe oluşturan kimyasallar olarak değerlendirilmektedir. Kalıcı organik kirleticilerin insanlar, hayvanlar ve doğaya olan zararları, etki mekanizmaları ve bunların önlenmesi amacıyla birçok bilim insanı çalışmalar yapmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalara rağmen bu kirleticilerin biyolojik etkileri hala bilim insanları için merak konusu olmaktadır.

Bugün dünyada insan ve çevre sağlığını korumak, maruziyeti azaltmak için 2004 yılında yürürlüğe giren Stockholm Sözleşmesi kapsamında KOK'ların üretim ve kullanımı sınırlandırılıp yasaklanmasına karar verilmiştir. Bütün bu kısıtlamalara rağmen bu maddelerin kalıcılıklarına bağlı olarak toplumda düşük dozda KOK maruziyeti görülmektedir.

Kalıcı organik kirleticiler birçok doku, organ ve sistemle ilişkilendirilirken geçici ve önemli bir organ olan plasenta da bunlardan biridir. Anne tarafından maruz kalınan bu kirleticilerin plasental yolla fetüse geçerek doğrudan bebekte birçok sağlık problemine yol açarken dolaylı olarak plasental fonksiyonları etkileyerek de fetüse zarar verebilmektedir. Plasentanın birçok fonksiyonunda önemli bir rolü olan nöronal olmayan kolinerjik sistem unsurları ve bu sisteme bağlı yolaklar, bu çevresel kirleticiler ile etkileşim gösterebilmektedir.

Çalışmamızda KOK'ların plasentada varlığının analitik yöntemlerle ortaya konularak çevresel etkilenim anketleri ile birlikte bu kirleticilere maruziyetin hangi çevresel şartlar altında artıp azalabileceğine dair bulgular sunulmuştur. Bu kirleticilerin bazılarının kolinerjik sistemin en önemli unsurlarından olan muskarinik reseptörlere ilgisi, *in siliko* yöntemlerle ortaya konarak KOK'ların biyolojik etkileri

üzerine geliştirilebilecek çalışmalara *in siliko* yöntemlerle yaklaşımın önemini göstermiştir.

Tez çalışmamızda kalıcı organik kirletici tespit edilen plasenta örnekleri ile edilemeyen örnekler arasında tüm genom transkripsiyonunda meydana gelen farklılıkların incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirilen köpek plasenta örneklerinde RNA dizileme ve insan plasenta örneklerinde mikrodizin analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda hücre metabolizmasını etkileyebilecek yollar ve reseptöre ait genlerde değişiklikler meydana gelebileceği görülmüştür. Özellikle insan örneklerinde hücre proliferasyonu, kalsiyum sinyalizasyonu, asetilkolin reseptör sinyalizasyonu, hücre iskeleti ve amino asit transferi gibi nöronal olmayan kolinerjik sisteme ait fonksiyonların etkilendiği görülmüştür.

Çalışmamızda elde edilen veriler ışığında, plasental fonksiyonun etkilenimine bağlı olarak hücre bütünlüğü ve metabolizmasının etkilenmesi ile birlikte fetus için bir bariyer özelliği taşıyan plasentanın koruyuculuğunun azalmasına sebep olabileceği bilinmektedir. Bunun yanı sıra fetüsün büyüme ve gelişimi için önemli bir rol oynayan plasental hücre fonksiyonlarındaki problemler; preklampsi, erken doğum, düşük doğum ağırlığı ve daha birçok kronik problemlere davetiye açtığı görüşü önem kazanmaktadır.

Kalıcı organik kirletici tespit edilen gruplara ait insan ve köpek transkriptom sonuçlarında benzer etkilenimler olduğu görülmüştür. Araştırmamızda örnek sayısı artırılarak, kirletici analizleri ve bununla ilişkili gruplandırmaya bağlı olarak KOK'lara bütünsel bir yaklaşımın yanı sıra taranan KOK'ların her biri için etkileşim analizleri gerçekleştirilebilir. Bu doğrultuda KOK'ların hücresel ve moleküler etki mekanizmaları hakkında detaylı bilgi edilebileceği ön görülebilir.



ÖZET

Bazı Kalıcı Organik Kirleticilerin Köpek ve İnsan Plasental Kolinerjik Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması

Plasental kolinerjik sistem nöronal sinirsel iletimi dışında birçok hücre içi metabolik faaliyetlerde ve plasental gelişimde de önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Bu fonksiyonlar göz önüne alındığında; birçok çevresel kirleticinin bu mekanizmaları etkileyerek fetüste yapısal anomaliler, fonksiyonel bozukluklar, konjenital neoplazi, büyüme geriliği, erken doğum, vitamin D yetersizliği, sistemik inflamasyon, düşük doğum ağırlığı, preterm doğum, erişkin koroner arter ve diyabet hastalıklarına temel oluşturacak epigenetik ve glukoz metabolizmasında değişiklikler, gestasyonel hipertansiyon, preeklampsi, abortus ve fetüs ölümüne neden olabilmektedir. Çalışmada çevresel kirleticiler ve plasental kolinerjik sistem arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, çalışmanın ilk aşamasında hemokoryal yapıya sahip insan ve endotelyokoryal yapıya sahip köpek plasentasında; bazı KOK'ların analizi GC-MS ile yapıldı (PCB, PBDE, PAH ve Organoklorlu pestisitler). Yapılan kirletici taramasında 20 insan plasentasından 13 örnekte kirletici tespit edildi. Kirletici tespiti ile annelerin sigara içme/maruziyeti arasında yakın bir ilişki bulundu. Tarama yapılan 15 köpek plasentasında ise 7 örnekte kirletici tespit edilebilmiştir. Çalışma kapsamında ortalama PAH yükü 877 ng/g DDT kirletici yükü ise ortalama 54,82 ng/g olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki köpek örneklerinde ise bu değerler sırasıyla 160 ng/g ve 156 ng/g olarak bulunmuştur. Elde edilen ortalama toplam PCB yükü 16,6 ng/g, PBDE yükü ise 89,71ng/g olarak bulunmuştur. Bu değerler köpek plaseenta örnekleri için ise sırasıyla 133 ng/g PCB, 488 ng/g PBDE yükü şeklindedir. Tespit edilen kirleticiler ile kolinerjik sistemin önemli bileşenlerinden olan muskarinik, nikotinik reseptörler ve asetilkolinesteraz enzimleri ile yapılan *in silico* taramada özellikle 4-4 DDE'nin ve PCB153'ün bazı muskarinik reseptörlere olan ilgisinin oldukça yüksek olduğu saptandı. RNA-Sekans ve Mikrodizin testleri ile yapılan transkriptom analizleri sonucunda hücre proliferasyonu, kalsiyum sinyalizasyonu, asetilkolin reseptör sinyalizasyonu, hücre iskeleti ve amino asit transferi gibi nöronal olmayan kolinerjik sistem ile ilişkilendirilecek hücre fonksiyonlarının etkilendiği görüldü. Gen ifade farklılığı görülen bu fonksiyonlardan birçoğunun köpek ve insan türleri için ortak olduğu saptandı. Bu hücre fonksiyonlara bağlı olarak hücre bütünlüğü ve metabolizmasının etkilenmesi ile birlikte fetüs için bir bariyer özelliği taşıyan plasentanın koruyuculuğunun azalmasına sebep olabileceği bilinmektedir. Bunun yanı sıra fetüsün büyüme ve gelişimi için önemli bir rol oynayan plasental hücre fonksiyonlarındaki problemler; preklampsi, erken doğum, düşük doğum ağırlığı ve daha birçok kronik problemlere neden olabilmektedir, dolayısıyla sunulan tez; gelişimsel toksisite araştırmaları için önemli bir alt yapı oluşturmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Biyoinformatik, GC/MS, *In Silico*, Kalıcı Organik Kirleticiler, Kolinerjik Sistem, Mikrodizin, Plaseenta

SUMMARY

Investigation of Selected Persistent Organic Pollutants (POP) on Human Human and Dog Placental Cholinergic System

Placental cholinergic system is known to be an important factor in many intracellular metabolic activities and placental development besides neuronal neural transmission. Considering these functions; Changes in epigenetic and glucose metabolism that will form the basis for structural anomalies, functional disorders, congenital neoplasia, growth retardation, preterm birth, vitamin D deficiency, systemic inflammation, low birth weight, preterm birth, adult coronary artery and diabetes diseases by affecting these mechanisms. It can cause gestational hypertension, preeclampsia, abortion and fetal death. The aim of this study is to investigate the relationship between environmental pollutants and placental cholinergic system. For this purpose, in the first stage of the study, in the human placenta with hemochorial structure and the dog placenta with endotheliochorial structure; Analysis of some POPs was made by GC-MS (PCB, PBDE, PAH and Organochlorine pesticides). In the pollutant screening, 13 pollutants were detected from 20 human placenta. A close correlation was found between pollutant detection and mothers' smoking/exposure. Pollutants were detected in 7 samples in 15 dog placenta that were screened. Within the scope of the study, the average PAH load was 877 ng / g DDT pollutant load was determined as 54.82 ng/g. In the dog samples in our study, these values were found to be 160 ng/g and 156 ng/g, respectively. The average total PCB load obtained was 16.6 ng / g, and the PBDE load was 89.71 ng/g. These values are 133 ng/g PCB and 488 ng/g PBDE load for canine placenta samples, respectively. In silico screening performed with the detected pollutants and muscarinic, nicotinic receptors and acetylcholinesterase enzymes, which are important components of the cholinergic system, it was found that especially 4-4 DDEs and PCB153 have a high interest in some muscarinic receptors. As a result of the transcriptome analysis, it was observed that cellular functions that could be associated with the non-neuronal cholinergic system such as cell proliferation, calcium signaling, acetylcholine receptor signaling, cytoskeleton and amino acid transfer were affected. It has been found that many of these functions with gene expression differences are common for canine and human species. It is known that due to these cellular functions, cell integrity and metabolism are affected, and the protection of the placenta, which is a barrier for the fetus, may decrease. In addition, problems in placental cell functions that play an important role in the growth and development of the fetus; It can cause preeclampsia, preterm birth, low birth weight and many other chronic problems, so the thesis presented; It constitutes an important infrastructure for developmental toxicity research.

Keywords: Bioinformatics, Cholinergic System, GC / MS, *In Silico*, Microarray, Persistent Organic Pollutants, Placenta

KAYNAKLAR

- ABDEL-SHAFY HI, MANSOUR MSM (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt J Pet* **25**: 107–123.
- ABRAMOVICH DR, WADE AP (1969). Transplacental passage of steroids: the presence of corticosteroids in amniotic fluid. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* **76**: 610–614.
- ALVER E, DEMIRCI A, ÖZCİMDER M (2012). Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar ve Sağlığa Etkileri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilim Enstitüsü Derg* **3**: 45–52.
- ANDERSON JW (1969). Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog I. The placental labyrinth. *Anat Rec* **165**: 15–35.
- BARKER RH (1938). The Placental Transfer of Sulfanilamide. *N Engl J Med*. **219**(2)
- BURTON GJ, FOWDEN AL (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **370**(1663).
- BURTON GJ, JAUNIAUX E (2015). What is the placenta? *Am J Obstet Gynecol* **213**: S6.e1-S6.e4.
- BURTON GJ, JAUNIAUX E, CHARNOCK-JONES DS (2010). The influence of the intrauterine environment on human placental development. *Int J Dev Biol*. **54**: 2-3
- BURTON GJ, SEBIRE NJ, MYATT L, TANNETTA D, WANG Y, SADOVSKY Y (2014). Optimising sample collection for placental research. *Placenta* **35**: 9–22.
- CARPENTER JE, WEINHOLD F (1988). Analysis of the geometry of the hydroxymethyl radical by the “different hybrids for different spins” natural bond orbital procedure. *J Mol Struct Theochem* **169**: 41–62.
- CARTER AM (2000). Placental Oxygen Consumption. Part I: In Vivo Studies—A Review. *Placenta* **21**: S31–S37.
- CHANG HC, GADDUM JH (1933). Choline esters in tissue extracts. *J Physiol* **79**: 255–285.
- DONNELLY L, CAMPLING G (2019). Functions of the placenta. *Anaesth Intensive Care Med* **20**: 392–396.

- ERDFELDER E, FAUL F, BUCHNER A, LANG AG (2009). Statistical power analyses using G Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods* **41**: 1149–1160.
- FANT ME, HARBISON RD (1981). Syncytiotrophoblast membrane vesicles: A model for examining the human placental cholinergic system. *Teratology* **24**: 187–199.
- FISHER M, ARBUCKLE T, LIANG C, LEBLANC A, FRASER W, 2016. Concentrations of persistent organic pollutants in maternal and cord blood from the maternal-infant research on environmental chemicals (MIREC) cohort study.
- FOSTER JP, WEINHOLD F (1980). Natural hybrid orbitals. *J Am Chem Soc* **102**: 7211–7218.
- FURUKOWA S, KURODA Y, SUGIYAMA S (2014). A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *Journal of toxicologic pathology*, 27(1), 11-18.
- GINSBURG J (1971). Placental Drug Transfer. *Annu Rev Pharmacol* **11**: 387–408.
- GUPTA RC (2006). Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. *Elsevier Academic Press*.
- GUPTA RK, GUPTA RC (2017). Placental toxicity. In: *Reproductive and Developmental Toxicology*, Elsevier, ss 1301–1325.
- HUANG W, SHERMAN BRAD, LEMPICKI R (2009). Systematic and integrative analysis large gene list using DAVID bioinformatic resources.
- JAYARAJ R, MEGHA P, SREEDEV P (2016). Review Article. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip Toxicol* **9**: 90–100.
- JEONG Y, LEE S, KIM S, PARK J, KIM HJ, CHOI G (2018). Placental transfer of persistent organic pollutants and feasibility using the placenta as a non-invasive biomonitoring matrix. *Sci Total Environ* **612**: 1498–1505.
- JEDRYCHOWSKI W, PERARE F, TANG D, RAUH V, JACEK R, CAMANN D, 2013. The relationship between prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-DNA adducts in cord blood. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* volume 23, pages371–377(2013)
- JONKMAN MJ, VAN VLIET T, WALSTRA P, CEBULA DJ (1999). Influence of calcium ion activity on aggregation of casein micelles at pH 5 in the cold. *International Dairy Journal*, Elsevier **9**: 387–388.
- KAM P, POWER I, COUSINS MJ, SIDDAL PJ (2020) Principles of physiology for the

anaesthetist.

KNOBIL E, NEILL JD (2006). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Elsevier.

KUZUKIRAN O, YURDAKOK-DIKMEN B, SEVIN S, SIRELI UT, IPLIKCIOGLU-CIL G, FILAZI A (2018). Determination of selected endocrine disruptors in organic, free-range, and battery-produced hen eggs and risk assessment. *Environ Sci Pollut Res* **25**: 35376–35386.

LEINO O, KIVIRANTA H, KARJALAINEN AK, KRONBERG-KIPPILÄ C, SINKKO H, LARSEN EH, *VD.* (2013). Pollutant concentrations in placenta. *Food Chem Toxicol*.

LYALL F, JABLONKA-SHARIFF A, JOHNSON RD, OLSON LM, NELSON DM (1998). Gene expression of nitric oxide synthase in cultured human term placental trophoblast during in vitro differentiation. *Placenta* **19**: 253–260.

MA J, QIU X, REN A, JIN L, ZHU T (2012). Using placenta to evaluate the polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) exposure of fetus in a region with high prevalence of neural tube defects. *Ecotoxicol Environ Saf* **86**: 141–146.

MALAND CO (1939). The passage of sulfanilamide through the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* **38**: 711.

MAYHEW TM (2008). Taking Tissue Samples from the Placenta: An Illustration of Principles and Strategies. *Placenta* **29**: 1–14.

MESS A, CARTER AM (2007). Evolution of the placenta during the early radiation of placental mammals. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* **148**: 769–779.

MOORE KL, PERSAUD TVN, TORCHIA MG *The developing human : clinically oriented embryology*.

NAAMAN R, VAGER Z (Ed.) (1988). *The Structure of Small Molecules and Ions*. Springer US: Boston, MA.

OUIDIR M, MENOLA P, LOUIS G.M.B, KANNAN K, ZHANG C, TEKOLA-AYELE F (2020). Concentrations of persistent organic pollutants in maternal plasma and epigenome-wide placental DNA methylation. *Clinical Epigenetic*, 12, Article number 103

PADULA AM, HUANG H, BAER RJ, AUGUST LM, JANKOWSKA MM, JELLIFE-PAWLOWSKI LL (2018). Environmental pollution and social factors as contributors to preterm birth in Fresno County. *Environ Heal A Glob Access Sci Source* **17**: 1–21.

PASTRAKULJIC A, DEREWLANY LO, KOREN G (1999). Maternal Cocaine Use and Cigarette Smoking in Pregnancy in Relation to Amino Acid Transport and Fetal

Growth. *Placenta* **20**: 499–512.

PELKONEN O, VÄHÄKANGAS K, GUPTA RC (2006). Placental toxicity of organophosphate and carbamate pesticides. In: *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*, Elsevier Inc., ss 463–479.

PORPORA MG, MEDDA E, ABBALLE A, BOLLI S, DE ANGELIS I, DI DOMENICO A (2009). Endometriosis and Organochlorinated Environmental Pollutants: A Case–Control Study on Italian Women of Reproductive Age. *Environ Health Perspect* **117**: 1070–1075.

REED AE, CURTISS LA, WEINHOLD F (1988). Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. *Chem Rev* **88**: 899–926.

REED AE, WEINHOLD F (1983). Natural bond orbital analysis of near-Hartree–Fock water dimer. *J Chem Phys* **78**: 4066–4073.

REED AE, WEINHOLD F (1985). Natural localized molecular orbitals. *J Chem Phys* **83**: 1736–1740.

REED AE, WEINSTOCK RB, WEINHOLD F (1985). Natural population analysis. *J Chem Phys* **83**: 735–746.

ROBBINS JR, SKRZYPCZYNSKA KM, ZELDOVICH VB, KAPIDZIC M, BAKARDJIEV AI (2010). Placental Syncytiotrophoblast Constitutes a Major Barrier to Vertical Transmission of *Listeria monocytogenes* (DS Schneider, Ed.). *PLoS Pathog* **6**: e1000732.

RODAN BD, PENNINGTON DW, ECKLEY N, BOETHLING RS (1999). Screening for persistent organic pollutants: Techniques to provide a scientific basis for POPs criteria in international negotiations. *Environ Sci Technol* **33**: 3482–3488.

RUBINCHIK-STERN M, EYAL S (2012). Drug Interactions at the Human Placenta: What is the Evidence? *Front Pharmacol* **3**: 126.

SÁNCHEZ S, VERA B, MONTAGNA C, MAGNARELLI G (2015). Characterization of placental cholinesterases and activity induction associated to environmental organophosphate exposure. *Toxicol Reports* **2**: 437–442.

SANDLER M, RUTHVEN CRJ, CONTRACTOR SF, WOOD C, BOOTH RT, PINKERTON JHM (1963). Transmission of Noradrenaline across the Human Placenta. *Nature* **197**: 598–598.

SASTRY B V. R, JANSON VE (1994). Retinal Cholinergic System: Characterization of Rat Retinal Acetyltransferases Using Specific Inhibitors of Choline- and Carnitine-Acetyltransferases. *J Ocul Pharmacol* **10**: 203–215.

- SIDDIQI MA, LAESSIG RH, REED KD (2003). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): new pollutants-old diseases. *Clin Med Res* **1**: 281–90.
- SIMPSON RA, MAYHEW TM, BARNES PR (1992). From 13 weeks to term, the trophoblast of human placenta grows by the continuous recruitment of new proliferative units: A study of nuclear number using the disector. *Placenta* **13**: 501–512.
- SMITHELLS D (1998a). Was the thalidomide tragedy preventable? *Lancet* **351**: 1591.
- SMITHELLS D (1998b). Was the thalidomide tragedy preventable? *Lancet* **351**: 1591.
- ÜSTTEKİ REFERANS İLE AYNI, NASIL A VE B OLUYOR? MENDELEYE ÇİFT GİRİLMİŞ.
- URQUHART BL, KIM RB (2009). Blood-brain barrier transporters and response to CNS-active drugs. *Eur J Clin Pharmacol* **65**: 1063–1070.
- VIZCAINO E, GRIMALT JO, FERNÁNDEZ-SOMOANO A, TARDON A (2014). Transport of persistent organic pollutants across the human placenta. *Environ Int* **65**: 107–115.
- WELSCH F (1976). Uptake of acetylcholine by human placenta fragments and slices from guinea pig and rat placenta. *Biochem Pharmacol* **25**: 81–89.
- WERNER SC, WERNER SC (1956). Transfer of thyroid hormone across the human placenta at term. *J Clin Endocrinol Metab* **16**: 1392–1395.