

ARAŞTIRMA MAKALESİ

Uludağ Univ., J. Fac. Vet. Med. 2018; 37 (2) 109-117

DOI:10.30782/uluvfd.406938

# Fötal ve Neonatal Rat Beyin Dokusunda Bisphenol A'nın Notch1 İmmunohistokimyasal Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Özlem Özden Akkaya<sup>1</sup>, Artay Yağcı<sup>1</sup>, Murat Tosun<sup>2</sup>, Korhan Altunbaş<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar, Türkiye-

<sup>2</sup>Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Afyonkarahisar, Türkiye.

Gönderilme 27.02.2018 Düzeltme:27.03.2018 Kabul 19.03.2018

## Özet

Bisphenol A (BPA), tekrar kullanılabilir plastik kaplarda, gıda ve içecek kutularında, biberonlarda ve diş dolgularında kullanılan bir plastikleştiricidir. BPA'nın bu ürünlerden hidrolize olarak açığa çıkması ve bulunduğu kabın içerisindeki maddelere geçebilmesi canlılarda önemli sağlık problemlerine yol açar. En önemlisi BPA'nın plasental ve laktasyonel yolla geçerek henüz intrauterin dönemdeki veya laktasyonel evredeki canlıların gelişimini etkileyebilmesidir. Notch sinyal yolağı hücrelerin farklılaşmasını, çoğalmasını ve canlı kalmasını düzenleyerek hücre kaderini belirler. Notch sinyal yolağı üyeleri pek çok organ gibi beyinde de ekspre olmaktadır. Notch sinyal yolağı üyelerinden Notch1 ventrikulus çevresinde [ventrikulus duvarı ve subventrikular zon (ventrikulusun altındaki bölge)], pleksus koroyideyus, substansiya grizea ve substansiya alba, hipokampus ve serebral damarlarda ekspre olur. Çalışmamızda fötal ve neonatal dönemlerde 5 farklı zaman aralığında BPA'nın Notch1 ekspresyonu üzerine etkisini araştırdık. Çalışmada Wistar ırkı ratlar kullanıldı (n=60). 5 farklı deney ve kontrol grubu oluşturuldu. Deney gruplarına 50 mg/kg/gün BPA, kontrol gruplarına ise taşıt madde [Susam yağı+etanol (SE), 9:1] uygulandı. Deneyin birinci kısmında Embriyonik (E)18-21, Postnatal (P) 0-3 ve P4-7 dönemlerinde uygulama yapıldı. E18-21 grubuna gebeliğin 18. gününden itibaren gebe annelere günlük olarak, intraperitoneal (i.p.), P0-3 ve P4-7 gruplarında ise yavrulara belirtilen uygulama aralıklarında subkutan (s.c.) BPA veya taşıt madde verildi. Tüm yavrular P7. günde sakrifiye edilerek beyin dokuları alındı. Deneyin ikinci kısmında E18-21, P0-3 dönemlerde birinci deneydekine benzer uygulama yapıldı. Uygulamanın bitmesini takiben E21. günde gebe ratlar sakrifiye edilerek fötusların beyin dokuları ve P3. günde yavru ratlar sakrifiye edilerek yavruların beyin dokuları alındı. Notch1 ekspresyonu immunohistokimya yöntemi ile değerlendirildi. Beyin dokusunda Notch1 pia mater, substansiya grizea, ventrikuluslar çevresi [ventrikulus duvarı ve subventrikular zon (ventrikulusun altındaki bölge)], pleksus koroyideyus ve kapillar endotelinde ekspre oldu. Fötal ve neonatal dönemdeki BPA uygulamalarını takiben E21., P3. ve P7. günlerde farklı düzeylerde Notch1 ekspresyonu gözlemlendi. Sonuç olarak BPA'nın beyinde Notch1 ekspresyonları üzerine etkilerinin maruz kalınan döneme ve gelişim sürecine bağlı olarak değişebileceği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Beyin, bisphenol A, immunohistokimya, Notch1, rat

## Effects of Bisphenol A on Notch1 Immunohistochemical Expression in Fetal and Neonatal Rat Brain

### Summary

Bisphenol A (BPA) is a plasticizer found in reusable plastic containers, food and beverage cans, baby bottles and dental sealants. BPA exposure has become an important health concern based on its ability to "leach" from these products and penetrate the materials contained within them. Importantly, BPA can be transferred via placenta or lactation and this may affect the living body in intrauterine or lactation period. Notch signaling pathway to regulate cell fate by modulating differentiation, proliferation, and survival of cells. It has been reported that the members of Notch signaling are expressed in brain. Notch1 is a member of Notch signalling pathway, that expresses in subventricular zone, choroid plexus, grey matter, white matter, hippocampus and cerebral vessels of brain.

In our study, we examined the effect of BPA on Notch1 expression in 5 different time intervals of fetal and neonatal periods *in vivo*.

\*Corresponding author Adres: Telefon: 05056294313 Faks: 02722281349 E-mail: korhana@aku.edu.tr

Wistar rats were used in this study (n=60). Five different experimental and control groups were formed. The experimental groups were treated with BPA at 50 mg/kg/day when control groups were treated with sesame oil and ethanol at 9:1 (vehicle).

During the first part of the experiment, BPA or vehicle was applied to three groups at E 18-21, P 0-3 and P 4-7 periods. When BPA or vehicle were injected intraperitoneally to pregnant dams in E 18-21 group neonatal pups in P0-3 and P4-7 groups were given subcutaneous injections. The pups were sacrificed at the end of 7th day and their brain tissues were collected. During the second part of the experiment, similar applications with first experiment was performed. Following the application, pregnant dams were sacrificed and brain tissue of their fetuses were collected at E21st day and neonatal pups were sacrificed at P3rd day and their brains were collected.

Notch1 expression was assessed by using immunohistochemistry. Notch1 was expressed in the pia mater, the grey matter, around ventricles (ventricular walls and sub ventricular zone) and in choroid and vascular plexus of brain.

After BPA applications in fetal and neonatal periods, Notch1 expression was seen in different levels at E21st, P3rd and P7th days.

In conclusion, the effects of BPA on Notch1 immunohistochemical expression in brain tissue, varies depends on exposure time and the developmental period during the exposure.

Key words: Bisphenol A, brain, immunohistochemistry, Notch1, rat

## Giriş

Endokrin bozucular; endokrin sistemin gelişimi ve fonksiyonunu değıştiren, doğal ya da sentetik bileşiklerdir. Bu bileşikler, endojen hormonlara benzer fonksiyonlar üstlenerek endojen bağımlı mekanizmaları hedefler ve bozarlar (Bigsby ve ark., 1999; Safe ve ark., 2001). Çevresel endokrin bozuculardan biri olarak bilinen BPA [2,2-bis(4-hidroksifenil) propan] ise plastik gıda kutuları üretim sanayi ve diğç hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Brotos ve ark., 1995; Olea ve ark., 1996). Plastik gıda kaplarının, konservelerin lake kaplamalarının, bebek maması kutularının, karbonsuz baskı kağıtlarının ve diğç birçok kaynağın aracılığı (özellikle ısıtıldığında ve mikrodalga fırınla fırınlandığında) ile insanlar ve hayvanlar günlük olarak bu maddelere sürekli maruz kalırlar. Yeni doğan yoğun bakım ünitelerinde bebek mama kaplarından mama içine BPA'nın geçmesinden ve medikal aletlerde BPA'nın kullanımından dolayı özellikle bebekler yüksek düzeyde BPA'ya maruz kalırlar. Havadaki toz içerisinde de belirlenebilir miktarda BPA bulunur (Brede ve ark., 2003; Calafat ve ark., 2008; Calafat ve ark., 2009; Carwile ve ark., 2009 ).

BPA ile yapılan ilk çalışmalar onun östrojenik özelliklere sahip olduğunu ve BPA'nın fütusa plasenta yoluyla (Takahashi ve Oishi 2003); yeni doğanlara ise laktasyonal yolla (Vandenberg ve ark., 2009; Vom Saal ve ark., 2007; Yoo ve ark., 2001) geçebildiğini göstermiştir. Ayrıca hamile kadınların ve fütusun serumunda, amniyotik sıvıda, plasental dokuda ve anne sütünde tespit edilmesi (Ikezuki ve ark., 2002; Schönfelder ve ark., 2002; Sun ve ark., 2004), BPA'nın hem plasental yolla hem de laktasyonal yolla yavruya geçebildiğini doğrular niteliktedir. Gelişimin kritik dönem-

leri olan fütal ve neonatal dönemde endokrin bozuculara maruz kalınması reproduktif sistem, endokrin sistem ve merkezi sinir sistemi gibi pek çok sistemin gelişimini etkileyebilir. Bu nedenle son çalışmalarda özellikle fütal ve neonatal dönemlere odaklanılmıştır.

Östrojen beyin gelişiminde önemli role sahip hormonlardan biridir (McCarthy, 2008). Bu hormonun düzeyinde meydana gelecek değışiklikler hormona bağımlı mekanizmalarla birlikte beyin fonksiyonlarını da etkiler. Östrojen benzeri etkilere sahip BPA, östrus siklusunun östrojen pozitif geri bildiriminde önemli olan beynin rostral periventriküler preoptik alanında tirozin hidroksilaz nöronlarının sayısını azaltır ve beyin gelişimi esnasında cinsel farklılaşmadan sorumlu bölgelerde değışikliğe neden olur. (Durmaz ve Giray, 2013; Rubin ve ark., 2006) Ayrıca embriyonik, fütal ve neonatal dönemde BPA'ya maruz kalan farelerde oksidatif strese ve peroksidasyona bağılı olarak beyin dokusunun gelişimi geri kalır; glutatyon peroksidaz ve katalaz aktivitelerinde artış olmasına rağmen beyindeki peroksidasyonun indüklenmesiyle beyin yeterince gelişemez (Kabuto ve ark., 2004). Bu veriler BPA'nın önemli beyin fonksiyonlarını ve gelişimini etkileyebileceğini göstermektedir.

Notch sinyal yolağı üyeleri, embriyogenezis esnasında merkezi sinir sisteminin de içinde bulunduğu memelilere ait pek çok sistemin hücre gelişiminde kritik rol oynarlar (Artavanis-Tsakonas ve ark., 1999). Notch sinyal yolağı ailesi üyeleri hücre yüzeyinden ekstrasellüler sinyalleri alır ve çekirdekteki gen ekspresyonunu düzenler (Lai, 2004), hücre kaderini belirler ve sırasıyla hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozisi etkilerler (Artavanis-Tsakonas ve ark., 1999).

Beyinde kök hücrelerde ekspre olduğu bilinen Notch1 (Koch ve ark., 2003) embriyonal dönem dışında yaşa bağlı olarak azalan miktarlarda fetal, postnatal ve erişkin dönemlerde de ekspre olmaya devam eder (Irvin ve ark., 2001; Stump ve ark., 2002). Embriyonal dönemde ventriküler zonda (germinal zon); fetal ve postnatal dönemlerde ventriküler zonda, subventriküler zonda, substansiya grisea ve substansiya albada, hipokampüste ve serebral damarlar-da ekspre olur (Irvin ve ark., 2001; Stump ve ark., 2002). Embriyonal dönemde, Notch1 ekspresyonunun gözlemlendiği ventriküler zondaki (VZ) nöroepitel kök hücrelerinden, daha sonra nöron ve glia hücreleri meydana gelir; erişkin dönemde ise çoğalmaya devam eden bu kök hücreler aynı zamanda da ependim hücrelerine farklılaşırlar (Köktürk ve ark., 2007). Ayrıca *in vitro* olarak da Notch1'in nöron oluşumunu düzenleyerek mitoz bölünme sonrası nöronlarda da rol aldığı gösterilmiştir (Berezovska ve ark., 1999). Son çalışmalarda ise erişkin memelilerde nöron gelişiminin devam ettiği ve bu gelişimin Notch1'in ekspre olduğu lateral ventriküllerin subventriküler zonu (SVZ) ve hipokampus olmak üzere başlıca iki bölgede meydana geldiği belirtilmiştir (Köktürk ve ark., 2007). Hücrelerin proliferasyon ve apoptozisinden sorumlu, hücrenin kaderini belirleyen Notch sinyal yolağının endokrin bozucular gibi pek çok ekzojen faktörden etkilenmesi muhtemeldir. Endokrin bozucu olarak kabul edilen fitoöstrojenler grubunda yer alan soya fasülesinin, iskemik felç (inme) oluşturulan erkek farelerin beyinde Notch1 ekspresyonu arttırıp apoptozisi azaltması, endokrin bozucuların beyinde Notch sinyal yolağını etkileyebildiğini göstermektedir (Huang ve ark., 2009). Bununla birlikte endokrin bozuculardan BPA'a embriyonal ve neonatal dönemde maruz kalmanın beyin dokusunda Notch1 ekspresyonu üzerine etkileri bilinmemektedir. Sunulan çalışmada beyin gelişimi sırasında olumsuz etkilere sahip olduğu belirlenen BPA'nın, neonatal beyin gelişimi sırasında hücre gelişimine yön veren Notch1 üzerine etkisini belirlemeyi amaçladık.

## Materyal ve Metot

### Hayvan

25.04.2013 tarihli, 49533702/311 sayılı, AKÜHADYEK-218-13 referans nolu araştırmamız Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Araştırmada Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden elde edilen 2 aylık Wistar ırkı dişi ratlar kullanıldı. Ratlara ışık (aydınlık periyodu 7:00 a.m.'den

9:00 p.m'e kadar), ısı (26-28 °C) ve nem (30-70%) kontrollerinin yapıldığı odalarda bakıldı ve fitoöstrojenlerin olası etkilerini elimine etmek için özel olarak üretilen soya free scientific diet 5V01 yemi (Lab Dieti PMI Nutrition International LLC, Brentwood, MO) ve su verildi.

### Deneysel Prosedür

Ratlarda vajinal sitoloji yöntemi ile siklus belirlendi. Proöstrusta olduğu belirlenen ratlar erkek ratlar ayrı bir kafese konuldu. Ertesi gün vajinal smear ile sperm varlığı saptanan ratlarda gebeliğin 0. (E0) günü kabul edildi ve 7 gün östrus siklusları takip edildi. Bu süreçte diöstrusta olduğu gözlenen ratların gebeliği doğrulandı.

Beş farklı deney ve kontrol grubu oluşturuldu. Her grupta 6 hayvan olacak şekilde toplam 60 yavru rat kullanıldı. Deneyin birinci kısmında hayvanlar E18-21, P0-3 ve P4-7 günlerde uygulama yapmak üzere üç gruba ayrıldı ve gruplar 1., 2., 3. kontrol ve deney grupları olarak isimlendirildi. [sırasıyla E18-21 uygulama yapıldı ve P7. gün sakrifiye edildi 1. grup; P0-3 uygulama yapıldı ve P7. gün sakrifiye edildi 2. grup; P4-7 uygulama yapıldı ve P7. gün sakrifiye edildi 3. grup]. Deney gruplarına 50 mg/kg/gün BPA ve kontrol gruplarına taşıt madde [Susamyağı+etanol (SE), 9:1] uygulandı. E18-21 grubuna gebeliğin 18. gününde gebe annelere günlük olarak intraperitoneal (i.p.) 50 mg/kg/gün BPA veya taşıt madde uygulaması yapıldı. P0-3 uygulama grubunda, doğan yavrulara ilk enjeksiyon doğumdan en az 4 saat sonra gerçekleştirildi. P4-7 grubuna postnatal 4. günde saat 9:00 da ilk enjeksiyon yapıldı. Yavrulara enjeksiyonlar ense bölgesinden subkutan (sc) olarak aynı dozlarda yapıldı. Tüm gruplardaki hayvanlara zaman aralıkları süresince (4 gün boyunca) enjeksiyon yapılarak yavrular postnatal 7. günde saat 17:00'de sakrifiye edildi. Deneyin ikinci kısmında E18-21 ve P0-3 olmak üzere sırasıyla 4. ve 5. kontrol ve deney grupları oluşturuldu [E18-21 uygulama yapıldı ve E21. gün sakrifiye edildi 4. grup; P0-3 uygulama yapıldı ve P3. gün sakrifiye edildi 5. grup]. İlk deneydekine benzer şekilde E18-21 grubunda gebe hayvanlara günlük i.p. olarak 50 mg/kg/gün BPA veya taşıt madde uygulandı; P0-3 grubundaki yenidoğan yavrulara ise doğumdan yaklaşık 4 saat sonra aynı dozlarda subkutan enjeksiyon yapıldı ve bu enjeksiyon uygulamalarına günlük olarak devam edildi. Gebe hayvanlar ve yavrular ilk deneyden farklı olarak son yapılan enjeksiyonlarını müteakip saat 17:00'de sakrifiye edildi.

### Tespit, Doku Takibi ve Kesit Alma

Fetal ve neonatal ratların beyin dokuları toplandı. Alınan beyin dokuları tespit için tamponlu nötral formalin solusyonuna konuldu. Dokular tespit solusyonunda 48 saat tespit

edildi. Tespit edilen dokular bir gece musluk altında çeşme suyu ile yıkandı. Dereceli alkol serisinden (%70, 80, 96, 100) geçirilerek dehidre edilen dokular daha sonra ksilolde parlatıldı. 56-58°C'de eriyen parafinin içine alınarak parafinin dokuya nüfuz etmesi sağlandı. Dokular daha sonra parafine gömüldü ve 5 µm'lik kesitler alındı.

### Boyama

İmmünohistokimyasal (IHK) yöntem olarak İndirekt Streptavidin-Biotin Peroksidaz yöntemi ile kullanıldı ve Harris Hematoksilin (H) ile boyanarak zıt boyama yapıldı. Sadece 4. grupta (fötuslarda) hematoksilin DAB boyamayı kamufle ettiği için zıt boyama yapılmadı. Kesitler ilk olarak ksilolde deparafinize edildi. Sonra dereceli alkollerden (%100, 96, 80, 70) geçirilerek rehidrasyon yapılan kesitler distile su ile yıkandı. Kesitlere mikrodalga fırında sitrat buffer ile antijen retrieval işlemi uygulandı. PBS ile yıkanan kesitler %3 hidrojen peroksitte tutuldu. Kesitler 10 dakikalık bloking aşamasından sonra bir gece +4°C'de Notch1 antikoru [dilüsyon 1:300, (Cell Signalling D1E11)] ile inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile yıkanan kesitler biotinlenmiş sekonder antikor (10 dakika) ve horseradish peroksidaz enzim ile (Histostain Plus Broad Spectrum #859043; Invitrogen) (10 dakika) inkübe edildi. PBS ile yıkanan kesitlere 3, 3 -diaminobenzidine (DAB) substrat-kromojen solüsyonu (Vector 4100) uygulandı. Kesitler %96 ve %100 alkollerden ve ksilolden geçirilerek kapatıldı (Akkaya ve ark., 2017).

### Değerlendirme

İmmünohistokimyasal değerlendirme; hedef dokunun boyanıp boyanmamasına, hedef doku yapılarının hangi bölümlerinin boyandığına ve oluşan boyanma yoğunluğuna bakılarak yapıldı. Değerlendirme iki bağımsız gözlemci tarafından, boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++) , şiddetli boyanma (+++) özelliklerine göre 0'dan 3'e kadar değerler verilerek yapıldı (Stump ve ark., 2002).

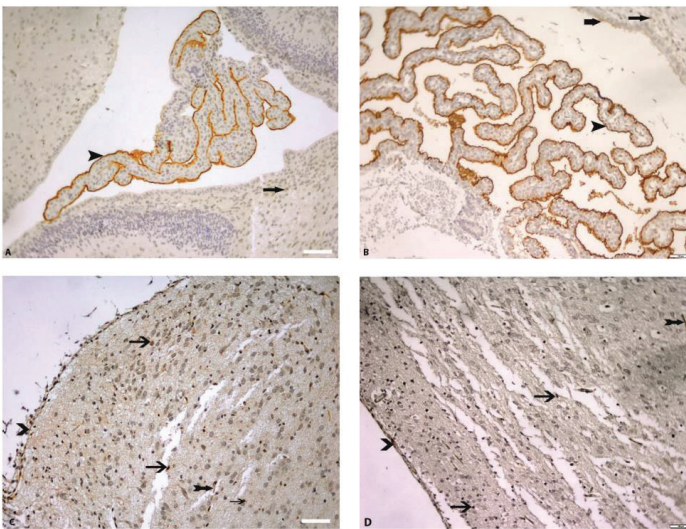
### İstatistiksel Analiz

İstatistik SPSS (IBM SPSS, Armonk, NY) programı kullanılarak yapıldı. Kontrol ve deney gruplarının verileri non-parametrik Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Güven düzeyini göstermede p<0.05 için \*, simgesi kullanıldı.

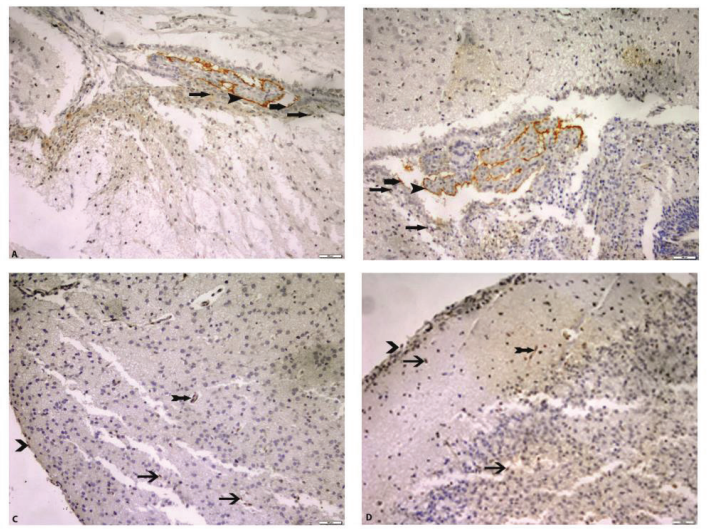
### Bulgular

Notch 1 immünohistokimyasal ekspresyonu beyin dokusunda; pia mater, substansiya grizea, ventrikuluslar çevresi [ventrikulus duvarı ve subventrikular zon (ventrikulusun altındaki bölge)], pleksus koroyideus ve kapillar endotelinde belirlendi (Şekil 1,2,3,4,5).

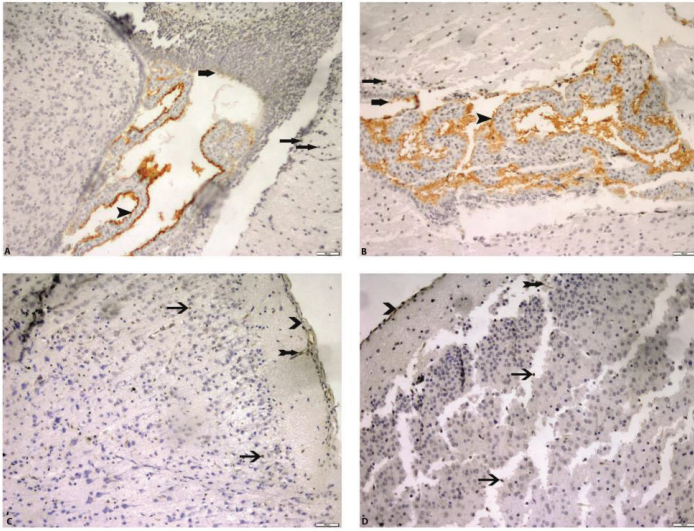
Tüm gruplarda ventrikulus duvarında ekspresyon zayıf ile orta şiddette değişirken, subventrikular zonda zayıf reaksiyonlar belirlendi (Şekil 1 A, B; 2 A, B; 3 A, B; 4 A, B; 5 A, B). Pia materde Notch1 ekspresyonlarının zayıf ile şiddetli arasında değiştiği gözlemlendi. Substansiya grizeada yer alan hücrelerin bazılarında nüklear tarzda ekspresyonlar



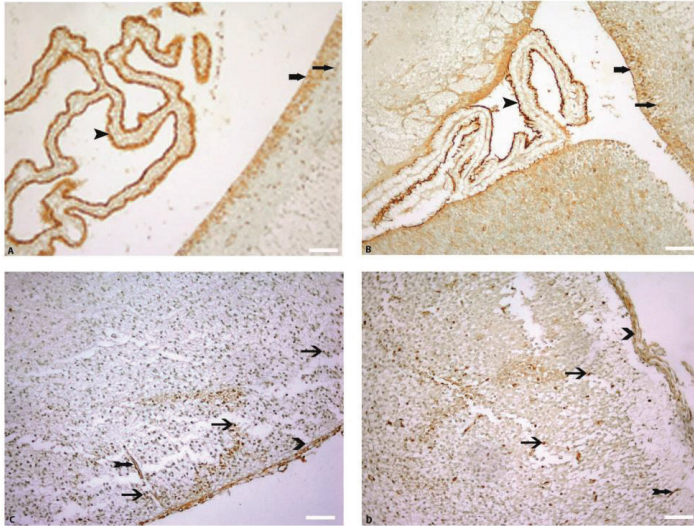
Şekil 1. 1. grup beyin kesitlerinde Notch1 immünohistokimyasal ekspresyonu. A: deney grubu, B: kontrol grubu; ok başı: pleksus koroyideus, ince ok: subventrikular zon, kalın ok: ventrikulus duvarı. C: deney grubu, D: kontrol grubu; ok başı: pia mater, ince ok: substansiya grizea, kıvrıklı ok: kapillar endotelleri, 1 bar= 100 µm.



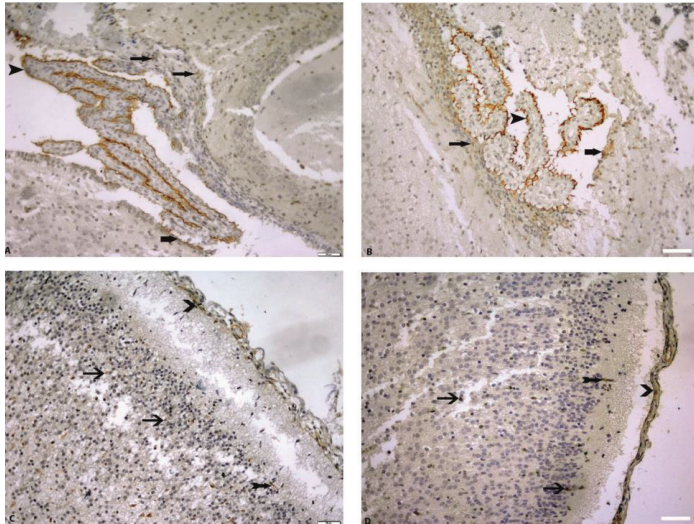
Şekil 2. 2. grup beyin kesitlerinde Notch1 immünohistokimyasal ekspresyonu. A: deney grubu, B: kontrol grubu; ok başı: pleksus koroyideus, ince ok: subventrikular zon, kalın ok: ventrikulus duvarı. C: deney grubu, D: kontrol grubu; ok başı: pia mater, ince ok: substansiya grizea, kıvrıklı ok: kapillar endotelleri, 1 bar= 100 µm.



Şekil 3. 3. grup beyin kesitlerin de Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonu. A: deney grubu, B: kontrol grubu; ok başı: pleksus koroyideyus, ince ok: subventrikular zon, kalın ok: ventrikulus duvarı. C: deney grubu, D: kontrol grubu; ok başı: pia mater, ince ok: substansiya grizea, kuyruklu ok: kapillar endotelleri, 1 bar= 100 µm.



Şekil 4. 4. grup beyin kesitlerin de Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonu. A: deney grubu, B: kontrol grubu; ok başı: pleksus koroyideyus, ince ok: subventrikular zon, kalın ok: ventrikulus duvarı. C: deney grubu, D: kontrol grubu; ok başı: pia mater, ince ok: substansiya grizea, kuyruklu ok: kapillar endotelleri, 1 bar= 100 µm.



Şekil 5. 5. grup beyin kesitlerinde Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonu. A: deney grubu, B: kontrol grubu; ok başı: pleksus koroyideyus, ince ok: subventrikular zon, kalın ok: ventrikulus duvarı. C: deney grubu, D: kontrol grubu; ok başı: pia mater, ince ok: substansiya grizea, kuyruklu ok: kapillar endotelleri, 1 bar= 100 µm.

Tablo 1. 1. grupta kontrol ve deney gruplarındaki hayvanlara ait Notch1 immunohistokimyasal ekspresyon skor ortalamaları. \* iki değ er arasındaki önem p<0,05.

Değişken	Grup1	N	Ortalama±S.H.	P
Pia mater	Deney	5	2,5±0,00	<b>0,017*</b>
	Kontrol	5	2,12±0,22	
Kapillar endotelleri	Deney	6	2,5±0,32	<b>0,011*</b>
	Kontrol	5	2±0,00	
Substansiya grizea	Deney	5	1,7±0,67	<b>0,408</b>
	Kontrol	5	1,5±0,5	
Pleksus koroyideyus	Deney	5	3±0,00	<b>1,000</b>
	Kontrol	5	3±0,00	

Tablo 2. 2. grupta kontrol ve deney gruplarındaki hayvanlara ait Notch1 immunohistokimyasal ekspresyon skor ortalamaları. \* iki değ er arasındaki önem p<0,05.

Değişken	Grup2	N	Ortalama±S.H.	P
Pia mater	Deney	5	2,2±0,84	<b>0,545</b>
	Kontrol	6	2,5±0,55	
Kapillar endotelleri	Deney	6	2,66±0,82	<b>0,201</b>
	Kontrol	6	2,33±0,52	
Substansiya grizea	Deney	6	1,58±0,80	<b>0,036*</b>
	Kontrol	6	2±0,00	
Pleksus koroyideyus	Deney	5	3±0,00	<b>1,000</b>
	Kontrol	6	3±0,00	

Tablo 3. 3. grupta kontrol ve deney gruplarındaki hayvanlara ait Notch1 immunohistokimyasal ekspresyon skor ortalamaları. \* iki değ er arasındaki önem p<0,05.

Değişken	Grup3	N	Ortalama±S.H.	P
Pia mater	Deney	6	2,15±0,77	<b>0,677</b>
	Kontrol	6	2,17±0,61	
Kapillar endotelleri	Deney	6	1,58±0,66	<b>0,665</b>
	Kontrol	6	1,75±0,61	
Substansiya grizea	Deney	6	1,33±0,52	<b>0,269</b>
	Kontrol	6	1,67±0,52	
Pleksus koroyideyus	Deney	6	2,5±0,55	<b>0,434</b>
	Kontrol	6	2,75±0,27	

Tablo 4. 4. grupta kontrol ve deney gruplarındaki hayvanlara ait Notch1 immunohistokimyasal ekspresyon skor ortalamaları. \* iki değ er arasındaki önem p&lt;0,05.

Değişken	Grup4	N	Ortalama±S.H.	P
Pia mater	Deney	5	2±0,00	<b>0,519</b>
	Kontrol	5	2±,0,61	
Kapillar endotelleri	Deney	5	2±0,00	<b>0,317</b>
	Kontrol	5	1,9±0,22	
Substansiya grizea	Deney	5	2±0,00	<b>1,000</b>
	Kontrol	6	2±0,00	
Pleksus koroyideyus	Deney	5	3±0,00	<b>1,000</b>
	Kontrol	5	3±0,00	

saptandı. Çoğunluğunu piramit şekilli hücrelerin oluşturduğu bu hücrelerde ekspresyonların zayıf ve orta arasında değiştiği belirlendi (Şekil 1 C-D, 2 C-D, 3 C-D, 4 C-D, 5 C-D ). Kapillar endotellerinde Notch1 ekspresyonu zayıf ile şiddetli arasında değiştiği gözlemlendi (Şekil 1 C-D, 2 C-D, 3 C-D, 4 C-D, 5 C-D). Pleksus koroyideyustaki ependim hücrelerin apikal yüzünde membransel olarak, şiddetli Notch1 ekspresyonu belirlendi (Şekil 1 A-B; 2 A-B; 3 A-B; 4 A, B; 5 A, B).

Aynı dönemlerde uygulama yapılan ve sakrifiye edilen BPA ve SE gruplarında Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonları karşılaştırıldı. E18-21. günlerde uygulama yapılan ve P7. günde sakrifiye edilen 1. grupta BPA uygulamasının pia mater ve kapillar endotellerinde Notch1 ekspresyon düzeyini arttırdığı gözlemlendi (p<0.05) (Tablo 1). P0-3 günler arasında uygulama yapılan ve P7. günde sakrifiye edilen 2. grupta ise BPA uygulamasının sadece substansiya grizeadaki hücrelerdeki ekspresyonunu azalttığı belirlendi (Tablo 2). P4-7. günler arasında uygulama yapılan ve P7. günde sakrifiye edilen 3. grup (Tablo 3) ile E18-21. günler arasında uygulama yapılan ve E21. günde sakrifiye edilen 4. grupta (Tablo 4) deney ve kontrol grupları arasında fark gözlenmedi. P0-3. günlerde uygulama yapılan ve P3. günde sakrifiye edilen 5. grupta; BPA'nın kapillar endotellerinde, 1. grubun aksine Notch1 ekspresyonunu azalttığı belirlendi (Tablo 5).

## Tartışma ve Sonuç

BPA, beyin gibi hayati öneme sahip bir organın gelişimi sırasında bir takım hücrelerin sayısını ve çeşitli enzim aktivasyonlarını değiştirerek bu organın fonksiyonlarını etkileyebilmektedir (Durmaz ve Giray, 2013; Kabuto ve ark., 2004; Rubin ve ark., 2006). Merkezi sinir sistemi ile ilgili

Tablo 5. 5. grupta kontrol ve deney gruplarındaki hayvanlara ait Notch1 immunohistokimyasal ekspresyon skor ortalamaları. \* iki değ er arasındaki önem p&lt;0,05.

Değişken	Grup5	N	Ortalama±S.H.	P
Pia mater	Deney	6	1,33±0,26	<b>0,269</b>
	Kontrol	6	1,17±,0,26	
Kapillar endotelleri	Deney	6	1,33±0,52	<b>0,045*</b>
	Kontrol	6	1,92±0,20	
Substansiya grizea	Deney	6	1,75±0,42	<b>0,461</b>
	Kontrol	6	1,92±0,20	
Pleksus koroyideyus	Deney	6	3±0,00	<b>1,000</b>
	Kontrol	6	3±0,00	

li son çalışmalarda hücre gelişime odaklanılmış ancak BPA'nın beyinde hücre gelişiminde rol oynayan Notch1 ekspresyonu üzerine etkilerine dair bilgilerin yetersizliği dikkati çekmiştir.

Hücrenin kaderini belirleyen Notch ailesi üyelerinin embriyonik progenitor hücre farklılaşmasındaki ve nörogenezdeki rolü günümüzde yaygın olarak çalışılmaktadır (Berezovska ve ark., 1999; Koch ve ark., 2003; Morrison ve ark., 2000). Bununla birlikte fetal ve neonatal dönemde Notch sinyal yolağının beyindeki fonksiyonlarına ilişkin çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalarda fetal ve neonatal dönemlerde de Notch1'in ekspresyonu olduğu ve beyinde embriyonik dönem dışında fetal ve neonatal dönemlerde de önemli roller üstlenebileceği bildirilmiştir (Berezovska ve ark., 1999; Irvin ve ark., 2001; Stump ve ark., 2002). Sunulan çalışmada da fetal ve neonatal dönemde beyin dokusunda Notch1'in immun ekspresyonu gösterilmiş ve immunreaktivitenin yaygın olarak pleksus koroyideyusta yer alan ependim hücrelerinde şekillendiği dikkati çekmiştir. Sunulan çalışmaya benzer olarak Hunter ve arkadaşları (2007) da yaptıkları araştırmalarında pleksus koroyideyusta Notch1 ekspresyonunun oldukça fazla olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca sunulan çalışmada ventrikülüs duvarını döşeyen ependim hücrelerinde de Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonu saptanmıştır. Johansson ve arkadaşları (1999) da benzer şekilde ventrikulus duvarını döşeyen ependim hücrelerinde Notch1 ekspresyonunu belirlemişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen bulgulara (Irvin ve ark., 2001; Stump ve ark., 2002) paralel olarak pia mater, substansiya grizea, subventrikular zon ve kapillar endotellerinde de Notch1 ekspresyonunun varlığı bu çalışmayla tekrar ortaya konulmuştur. Fetal ya da neonatal dönemlerde BPA'ya maruziyetin Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonunun lokalizasyon ve şiddetinde farklılıklara yol açması da yapılan bu çalışmanın

bir diğ er önemli bulgusu olarak ortaya çıkmaktadır. Zira f ötal dönemde BPA'ya maruz bırakılan ve P7. günde sakrifiye edilen hayvanların (Grup-1) pia mater dokusunda Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonunda artışlar dikkati ç ekirken diğ er uygulama gruplarında pia materde Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonunda belirgin bir değ iş iklik tespit edilmemiştir. Ayrıca yine 1. grupta yer alan hayvanların beyin dokusuna ait kapillar endotellerinde de Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonunda artış gözlenmiştir. 1. gruptaki hayvanların pia mater ve kapillar endotellerinde immunreaktivitedeki bu artış f ötal dönemde BPA'ya maruz bırakılan ve yine f ötal dönemde (E21) sakrifiye edilen 4. grupta yer alan hayvanlarda gözlenmemiştir. Bu sonuç f ötal dönemde maruz kalınan BPA'nın etkilerinin pia mater ve kapillar endotellerinde f ötal dönemden ziyade neonatal dönemin ilerleyen günlerinde ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte erken neonatal periyotta (P0-3) BPA'ya maruz bırakılan ve uygulama bitiminde (P3) sakrifiye edilen 5. gruba ait yavruların kapillar endotellerinde Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonunun azaldığı dikkati ç ekmiştir. 1. grupta kapillar endotellerinde Notch1 ekspresyonunda tespit edilen artışa karş ın söz konusu immunreaktivitenin 5. grupta azalması gelişimin farklı dönemlerinde maruz kalınan BPA'nın beyin dokusunda kapillar endotellerinde Notch1 varlığını farklı şekillerde etkileyebileceğini göstermektedir. 5. grupta kapillar endotellerinde Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonunda belirlenen bu azalmanın aynı dönemde (P0-3) uygulama yapılan ve P7. günde sakrifiye edilen 2. grupta gözlenmemesi ise BPA'nın erken neonatal dönemde kapillar endotellerindeki bu etkisinin, maruziyetin ortadan kalkması ile sonlanabileceğini de göstermektedir. Bu sonuçlar BPA'nın beyinde kapillar endotellerinde Notch1 ekspresyonu üzerine etkilerinin erken neonatal dönemde maruz kalındığında uyarının ortadan kalkmasını takiben kaybolabileceğini; buna karş ın f ötal dönemde maruz kalınması durumunda ise maruziyet ortadan kalksa dahi yaşamın ilerleyen dönemlerinde etkilerin ortaya çıkabileceğini ortaya koyması açısından oldukça önemlidir. Bu da BPA'nın kapillar endotellerinde Notch1 üzerine etkilerinin ortaya çıkış ında maruz kalınan dönemin (f ötal ya da neonatal) önemli olduğunu açık bir biçimde ortaya koymaktadır.

Erken neonatal periyotta (P0-3) BPA'ya maruz bırakılıp P7. günde sakrifiye edilen hayvanların (Grup-2) substansiya grizea dokusundaki sinir hücrelerinde Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonunun arttığı belirlendi. F ötal dönem (E18-21) ve neonatal dönemde (P4-7) BPA uygulaması yapılan ve P7. günde sakrifiye edilen gruplardaki rat-

ların sinir hücrelerinde Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonu değ iş mezken 2. grupta yer alan hayvanların aynı beyin bölgesindeki sinir hücrelerinde tespit edilen Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonundaki artış BPA'nın özellikle erken neonatal periyotta incelenen bu hücreleri daha fazla etkileyebileceğini göstermektedir. Diğ er yandan 2. grupta benzer uygulama yapılan (P0-3) fakat farklı olarak uygulama bitiminde (P3) sakrifiye edilen 5. grupta ise sinir hücrelerinde Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonu yönünden belirgin bir fark gözlenmemesi erken neonatal dönemdeki BPA maruziyetinin sinir hücreleri üzerine etkilerinin daha sonraki dönemlerde (neonatal 7. günde) ortaya çıkabileceğini ve bu etkilerin erişkin yaşamda da sürebileceğini akla getirmektedir.

Normal beyin gelişimi sırasında programlı hücre ölümü (apoptozis) devam ederken (Ikonomidou ve ark., 1999) Notch1 erken dönem progenitör hücrelerde P53 geni aracılı apoptozisi indüklemektedir (Yang ve ark., 2004). Diğ er yandan BPA merkezi sinir sisteminin erken gelişim döneminde apoptozisi uyarmaktadır (Oka ve ark., 2003). Sunulan bu çalışmada da erken neonatal periyotta (P0-3) uygulama yapılan 2. grupta BPA'nın sinir hücrelerinde Notch1'in immunreaktivitesini artırıyor olması, BPA'nın apoptozis üzerine bilinen bu etkisini Notch1 ekspresyonunu değ iş tirerek gerçekleştiriyor olabileceğini düşündürmektedir. BPA'nın bu yöndeki etkisinin belirlenmesi için BPA, Notch1 ekspresyonu ve apoptozisin birlikte değerlendirilebileceği çalışmaların yapılması gerektiği düşünölmektedir.

Sunulan bu çalışmada elde edilen bulgular dikkate alındığında BPA'nın, uygulama süreçlerine [f ötal (E18-21), neonatal (P0-3, P4-7)] ve gelişim dönemlerine [f ötal (E21), neonatal (P3, P7)] bağ ılı olarak beyinde sinir hücreleri baş ta olmak üzere çeş itli yapılardaki Notch1 immunohistokimyasal ekspresyonunu değ iş tirebileceği sonucuna varılmış tır.

## Teş ekür

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 13-VF-03 proje numarası ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284: 770-776, 1999.

- Berezovska O, McLean P, Knowles R, Frosh, M, Lu FM, Lux SE, Hyman BT. Notch1 inhibits neurite outgrowth in post-mitotic primary neurons. *Neuroscience*, 9: 433-39,1999.
- Bigsby R, Chapin RE, Daston GP, Davis BJ, Gorski J, Gray LE, Howdeshell KL, Zoeller RT, vom Saal F.S. Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environ Health Persp*, 107 Suppl 4: 613-618, 1999.
- Brede C, Fjeldal P, Skjevraak I, Herikstad H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam*, 20: 684-689, 2003.
- Brotans JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Persp*, 103: 608-612, 1995.
- Calafat AM, Ye X, Wong Ly, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Persp*, 116: 39-44, 2008.
- Calafat AM, Weuve J, Ye X, Jia LT, Hu H, Ringer S, Huttner K, Hauser R. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Persp*, 117: 639-644, 2009.
- Carwile JL, Luu HT, Bassett LS, Driscoll DA, Yuan C, Chang, JY, Ye X, Calafat AM, Michels, KB. Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Persp*, 117: 1368-1372, 2009.
- Durmaz E, Giray BK. Çevresel bir endokrin bozucu: Bisfenol A ve toksik etkilerinin değerlendirilmesi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 56: 192-199, 2013.
- Huang G, Cao X, Zhang X, Chang H, Yang Y, Du W, Wilson JX. Effects of soybean isoflavone on the notch signal pathway of the brain in rats with cerebral ischemia. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 55: 326-331, 2009.
- Hunter NL, Susan M. Dymecki SM. Molecularly and temporally separable lineages form the hindbrain roof plate and contribute differentially to the choroid plexus. *Development*, 134: 3449-3460, 2007.
- Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod*, 17: 2839-2841, 2002.
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L, Olney JW. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283: 70-74, 1999.
- Irvin DK, Zurcher SD, Nguyen T, Weinmaster G, Kornblum HI. Expression Patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development. *J Comp Neurol*, 436: 167-181, 2001.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*: 96, 25-34, 1999.
- Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sci*, 74: 2931-2940, 2004.
- Koch U, Lehal R, Radtke F. Stem cells living with a Notch. *Development*, 140: 689-704, 2003.
- Köktürk S, Alkan F, Dağistanlı F, Sezgin M, Uzunalan M, Uruluer B. Bromodeoksiuridin uygulamasını takiben erişkin sıçan beyinde lateral ve üçüncü ventriküllerin ventriküler ve subventriküler zonunda mitojenik aktivitenin incelenmesi. *Tıp Derg*, 17: 77-80, 2007.
- Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*, 131: 965-973, 2004.
- McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev*, 88: 91-124, 2008.
- Morrison SJ, Perez SE, Qiao Z, Verdi JM, Hicks C, Weinmaster G, Anderson DJ. Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stemcells. *Cell*, 10: 499-510, 2000.
- Oka T, Adati N, Shinkai T, Sakuma K, Nishimura T, Kurose K. Bisphenol A induces apoptosis in central neural cells during early development of *Xenopus laevis*. *Biochem Bioph Res Co*, 312: 877-882, 2003.
- Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, C. Estrogenicity of



- resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Persp*, 104: 298-305, 1996.
- Özden-Akkaya Ö, Altunbaş K, Yağcı A. Effects of methoxychlor on IGF-I signaling pathway in rat ovary. *Biotech His-tochem*, 92: 230-242, 2017.
- Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environ-mentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology*, 147: 3681-3691, 2006.
- Safe SH, Pallaroni L, Yoon K, Gaido K, Ross S, Saville B, Donnell D.M. Toxicology of environmental estrogens. *Re-prod Fertil Dev*, 13: 307-315, 2001.
- Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the hu-man maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Persp*, 110: A703-7, 2002.
- Stump G, Durrer A, Klein AL, Lütolf S, Suter U, Verdon Taylor V. Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mech Dev*, 114: 153-159, 2002.
- Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detec-tion. *Biomed Chromatogr*, 18: 501-507, 2004.
- Takahashi O ve Oishi S. Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food Chem Toxicol*, 41: 1035-1044, 2003.
- Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev*, 30: 75-95, 2009.
- Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, Farabollini F, Guillette Jr LJ, Hauser R, Heindel JJ, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Keri RA, Karen E. Knudsen KE, Laufer H, Leblanc G.A, Marcus M, Mclachlan JA, Myers JP, Nadal A, Newbold RR Olea N, Prins, G.S., Richter CA, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM, Talsness C.E, Vandenbergh JG, Vandenberg LN, Walser-Kuntz DR, Watson CS, Welshons WV, Yelena Wetherill Y, Zoeller RT. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*, 24: 131-138, 2007.
- Yang X, Klein R, Tian X, Cheng HT, Kopan R, Shen J. Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway. *Dev Biol*, 269: 81-94, 2004.
- Yoo SD, Shin BS, Lee BM, Lee KC, Han SY, Kim HS, Kwack SJ, Park KL. Bioavailability and mammary excretion of bi-sphenol a in sprague-dawley rats. *J. Toxicol Env Heal A*, 64: 417-426, 2001.