

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

**BİSFENOL TÜREVLERİNİN OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN HEPG2 HÜCRELERİNDE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Büşra ÖZYURT

Farmasötik Toksikoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2018

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİSFENOL TÜREVLERİNİN OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN HEPG2 HÜCRELERİNDE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Büşra ÖZYURT

Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ü. Pınar Erkekoğlu

ANKARA
2018

**BİSFENOL TÜREVLERİNİN OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
HEPG2 HÜCRELERİNDE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Büşra ÖZYURT

Danışman: Doç. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU

Bu tez çalışması 28.05.2018 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ayşe Nurşen BAŞARAN
Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL
Lokman Hekim Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Gonca ÇAKMAK
Gazi Üniversitesi



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

11 Haziran 2018

Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü



YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

- **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

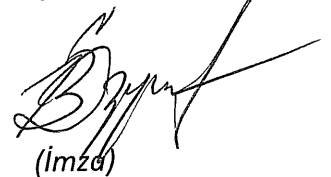
(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının ön belleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ✓ **Tezimin/Raporumun 28.05.2048 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporunun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

- **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**



(imza)

Ecz. Büşra ÖZYURT

ETİK BEYAN

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



Ecz. Büşra ÖZYURT

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında değerli zamanını bana ayıran, bilgisini, deneyimlerini, zor durumlarda anlayışını ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım **Doç.Dr. Pınar Erkekoğlu**'na,

Deneylerimin yapılması sırasında ve tüm bu yorucu süreçte bana destek olan yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım **Dr. Ecz. Kübra Gizem Özkemahlı**'ya,

Hayatım boyunca attığım her adımda benden hiçbir fedakarlığı esirgemeyen, bana inanan ve çalışmalarımın her aşamasında manevi desteğini gördüğüm **Ailem**'e,

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Özyurt, B. Bisfenol Türevlerinin Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkilerinin HepG2 Hücrelerinde Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018. Bisfenoller, difenilmetanlar olarak bilinen bir kimyasal gruba aittir ve polikarbonat plastiklerin üretiminde, gıda ve içecek kutularının reçine kaplamasında temel kimyasal olarak yaygın bir şekilde kullanılır. Bu maddelerin endokrin sistemin normal işleyişini bozarak büyüme, stres yanıtı, cinsiyet gelişimi, üreme yeteneği, insülin yapımı ve kullanımı ve metabolik hız gibi birçok temel fizyolojik süreci etkiledikleri düşünülmektedir. Literatürde BPA maruziyetinin farklı etkileri değerlendirilmesi amacıyla yapılan birçok hayvan çalışması ve sınırlı sayıda da *in vitro* çalışma da bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonuçları BPA'nın sağlık üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini göstermiş ve BPA özellikle çocukların kullandığı birçok üründe yasaklanmış veya kullanımı kısıtlanmıştır. Son yıllarda BPA'nın potansiyel istenmeyen etkileri göz önüne alınarak, BPA'nın yerine bisfenol F (BPF) ve bisfenol S (BPS) gibi alternatif bisfenoller kullanılmaya başlanmıştır. Bununla birlikte, alternatif bisfenollerin toksisitesi hakkında çok az bilgi vardır ve toksikolojik bilgilerin çoğu, bu türevlerinin sadece endokrin bozucu etkileriyle sınırlıdır. BPS ve BPF'nin metabolizması, organizmadaki yazgısı ve olası toksik etkileri yeterli düzeyde çalışılmamıştır. Tez kapsamında yapılan araştırmalarda, BPA, BPF ve BPS'nin HepG2 hücrelerindeki olası toksik etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla, bisfenollerin sitotoksikite, hücre içi reaktif oksijen türlerinde (ROS) yol açabileceği olası değişiklikler ve antioksidan/oksidan parametreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sitotoksikite deneyleri sonrasında bulunan medyan inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerlerine göre bisfenol türevlerinin sitotoksikite potansiyelleri BPS>BPF>BPA olarak belirlenmiştir. Hücre içi ROS artışı değerlendirildiğinde BPA ve BPF aynı oranda ve kontrole göre anlamlı artışlara neden olurken, BPS'nin de kontrole göre anlamlı artışa yol açtığı; ancak neden olduğu değişimin BPA ve BPF'den anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir. BPF ve BPS uygulamalarının glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesini anlamlı derecede azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, BPA'nın süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini arttırdığı; ancak diğer bisfenollerin SOD aktivitesini değiştirmediği görülmüştür. Hiçbir bisfenol türevi katalaz (CAT) aktivitesini anlamlı derecede değiştirmemiştir. Çalışmanın sonunda, endüstride BPA'ya alternatif olarak kullanılan BPF ve BPS'nin de BPA'ya benzer toksik etkilerinin olabileceği görülmüştür. Bu nedenle, BPA'ya yeni ve farklı alternatiflerin bulunması ve gelecekte bu alternatiflerin de toksik etkilerinin araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bisfenol A, Bisfenol F, Bisfenol S, Oksidatif Stres, Sitotoksikite, HepG2 hücre hattı

ABSTRACT

Özyurt, B. Comparative Evaluation of Oxidative Stress Parameters the Effects on Bisphenol Derivatives in HEPG2 Cells. Hacettepe University Health Sciences Institute, Pharmaceutical Toxicology Program, Msc Thesis, Ankara, 2018. Bisphenols belong to a chemical group known as diphenylmethanes and widely used in the production of polycarbonate plastics, as basic chemicals in the resin coating of food and beverage tins. These substances are suggested to affect many basic physiological processes such as growth, stress response, gender development, reproduction ability, insulin production and utilization, and metabolic rate by disrupting the normal functioning of the endocrine system. There are many animal studies and limited number of *in vitro* studies in the literature evaluating the different effects of BPA exposure. The results of these studies have shown that BPA can have adverse health effects, and the use BPA is banned or restricted, particularly in different products used by children. Considering the potential adverse effects of BPA in recent years, alternative bisphenols such as bisphenol F (BPF) and bisphenol S (BPS) have begun to be used instead of BPA. In the last years, by taking into account the potential unwanted effects of BPA, different alternative bisphenols like bisphenol F (BPF) and bisphenol S (BPS) are being used instead of BPA. However, there is little information on the toxicity of alternative bisphenols and most of these information is limited only to the endocrine disrupting effects of these derivatives. The metabolism of BPS and BPF, their fate within the organism and the possible toxic substances have not been studied adequately. The possible toxic effects of BPA, BPF and BPS in HepG2 cells were evaluated comparatively by the research conducted In this thesis. For this purpose, the possible changes caused by bisphenols, like cytotoxicity and intracellular reactive oxygen species (ROS) and the effects on antioxidant/oxidant parameters, have been examined. In cytotoxicity experiments, the cytotoxicity potentials of different bisphenol derivatives was found to be as BPS> BPF> BPA according to the median inhibitor concentration (IC₅₀) values . When the increase of intracellular ROS levels was evaluated, BPA and BPF caused significant and similar increases in intracellular ROS production compared to control, while BPS also caused a significant increase compared to control; but the cytotoxicity induced by BPS was found to be significantly lower than BPA and BPF. In addition, BPA has increased superoxide dismutase (SOD) activity; but other bisphenols did not cause alterations in SOD activity. BPF and BPS treatments significantly decreased glutathione peroxidase (GPx) activity. No bisphenol derivative catalase (CAT) activity has significantly changed CAT activity. At the end of the study, we observed that the bisphenols used as alternatives to BPA, namely BPF and BPS, had similar toxic effects to BPA. Therefore new and different alternatives to BPA must be discovered and the toxic effects of these alternatives must be investigated in the future.

Keywords: bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, oxidative stress, cytotoxicity, HepG2 cell line

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xviii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Endokrin bozucu kimyasal maddeler	4
2.2.Endokrin Bozucuların Sağlık Üzerine Etkileri	6
2.3. Bisfenoller	7
2.4. Bisfenol A'nın (BPA) Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	8
2.4.1. Bisfenol A'nın Biyotransformasyonu	9
2.4.2. Bisfenol A Kullanım Alanları Ve Maruziyet Yolları	10
2.4.3. Bisfenol A'nın Toksisitesi	12
2.5. Bisfenol F'nin (BPF) Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	16
2.5.1.Bisfenol F'in Biyotransformasyonu	16
2.5.2. Bisfenol F'in Toksisitesi	17
2.6. Bisfenol S'in (BPS) Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	22

2.6.1. Bisfenol S Kullanım Alanları ve Maruziyet Yolları	22
2.6.2. Bisfenol S'in Biyotransformasyonu	23
2.6.3. Bisfenol S Toksisitesi	24
2.7. Oksidatif Stres	32
2.7.1. Oksidatif Stresin Hücresel Düzeyde Etkisi	34
2.7.2. Lipitler Üzerine Etkileri	35
2.7.3. Proteinler Üzerine Etkileri	36
2.7.4. DNA Üzerine Etkileri	36
2.8. Antioksidan Savunma Sistemleri	38
2.8.1. Antioksidanlar	39
2.8.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	41
3. MATERYAL VE METOT	43
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	44
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Hücreler	45
3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	46
3.3.1. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	46
3.3.2. ROS Deneyinde Kullanılan Çözeltiler	46
3.3.3. HepG2 Hücrelerinin Lizisinde kullanılan çözeltiler	47
3.3.4. Protein Tayin Deneyinde [Bişinkoninik asit (BCA) Deneyi] Kullanılan Çözeltiler	47

3.3.5. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler	48
3.3.6. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler	49
3.3.7. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler	50
3.3.8. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	52
3.3.9. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşikleri (TBARS) Deneyinde Kullanılan Çözeltiler	53
3.3.10. Protein Karbonil Deneyinde Kullanılan Çözeltiler	54
3.3.11. BPA, BPF ve BPS'in Stok Konsantrasyonlarının Hazırlanması ve Uygun Konsantrasyonlarda Hücreye Uygulanması	55
3.4. Hücreler ve Deney Grupları	55
3.4.1. Deney Grupları	55
3.4.2. Donmuş Hücrelerin Çözülme Basamakları	56
3.4.3. Hücrelerin Durumunun Kontrol Edilmesi Ve Pasajlama	56
3.4.4. Hücrelerin Besiyerinin Değiştirilmesi	57
3.4.5. Daha Sonra Yapılacak Testler İçin Hücrelerin Dondurulup Saklanması	57
3.4.6. Hücrelerin Sayılması Ve Plağa Ekilmesi	58
3.5. Deneysel İşlemler ve Yöntemler	59
3.5.1. HepG2 Hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	59

3.5.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi	61
3.5.3. HepG2 Hücrelerinin Lizisi ve Fraksiyonlanması	63
3.5.4. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Ölçümü	64
3.5.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü	65
3.5.6. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	67
3.5.7. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	69
3.5.8. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi	70
3.5.9. Karbonil Grubu Düzeylerinin Ölçümü	71
3.5.10. Protein Miktarının Belirlenmesi	73
4. BULGULAR	75
4.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	75
4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri Üretiminin Belirlenmesi	80
4.3. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi	81
4.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	82
4.5. Katalaz Aktivitesi	84
4.6. Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri	86
4.7. Glutasyon Düzeyleri	88
4.8. Protein Oksidasyonu Düzeyleri	90
4.9. İstatistiksel Değerlendirme	91
4. TARTIŞMA	93
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	100
6. KAYNAKÇA	102
7. ÖZGEÇMİŞ	116

SİMGELER VE KISALTMALAR

8-oksG	7,8-Dihidro-8-Oksoguanin
ATP	Adenozintrifosfat
BCA	Bişinkoninik Asit
BSA	Sığır Serum Albumini
CAT	Katalaz
cm²	Santimetre kare
CuZnSOD	Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNPH	2,4,-Dinitrofenilhidrazin
D-PBS	Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik
DTNB	5,5'-Diti-Bis-(2-Nitrobenzoik) Asit
DTPA	Dietilen Triamin Tetraasetik Asit, Disodyum Tuzu
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit, Disodyum Tuzu
ER	Endokrin Reseptör
FBS	Fetal Sığır Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon (Glutasyon disülfid)

GST	Glutasyon S-Transferaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
HepG2	İnsan Hepatosellüler Karsinoma Hücreleri
HO-	Hidroksil Anyonu
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IC₃₀	Hücrelerin %30'unun Öldüğü İnhibitor Konsantrasyon
IC₅₀	Hücrelerin %50'sinin Öldüğü İnhibitor Konsantrasyon
KOH	Potasyum Hidroksit
Kromojen	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
LP	Lipit Peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
MES	2-(N-Morfolin) Etansülfonik Asit
MnSOD	Mangan Süperoksit Dismutaz
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-İl)-2,5 Difenil Tetrazolyum Bromür
NaCl	Sodyum Klorür
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NO•	Nitrik Oksit
O₂	Moleküler Oksijen, Dioksijen
O₂•-	Süperoksit Anyonu
OH•	Hidroksil Radikali
PBS	Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik
pH	Hidrojenin Gücü

RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşikler
TCA	Trikloroasetik Asit



ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Endokrin bozucuların hücre reseptörlerine etkisi	5
2.2.	Bisfenol A, bisfenol F ve bisfenol S'nin kimyasal yapısı	8
2.3.	Bisfenol A'nın kimyasal yapısı ve fenol ve asetonan kondenzasyonu	8
2.4.	BPA'nın biyotransformasyonu	10
2.5.	BPS'nin biyotransformasyonu	24
2.6.	Oksidatif stres ve etkenleri	34
2.7.	ROS'un etkisiyle oluşan 8-OHdG'nin yapısı	37
2.8.	Glutasyonun yapısı	42
3.1.	Canlı hücreler tarafından MTT'nin formazan tuza dönüşüm metabolizması	60
3.2.	Süperoksit dismutaz reaksiyon şeması	65
3.3.	GSH döngüsü	69
3.4.	MDA-TBA kompleksinin oluşumu	70
4.1.a.	BPA'nın 50-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi	76
4.1.b.	BPA'nın 50-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi	76
4.2.a.	BPF'nin 25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi	77
4.2.b.	BPF'nin 25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi	78

4.3.a.	BPS'nin 25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi.	79
4.3.b.	BPS'nin 25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi.	79
4.4.	Deney gruplarında hücre içi ROS oluşumu	81
4.5.	Çalışma gruplarında glutatyon peroksidaz (GPx1) aktivitesi	82
4.6.	Süperoksit dismutaz standartları	83
4.7.	Çalışma gruplarında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi	84
4.8.	Katalaz standartları	85
4.9.	Çalışma gruplarında katalaz aktivitesi	86
4.10.	Malondialdehit standartları-absorbans eğrisi	87
4.11.	Çalışma gruplarında malondialdehit düzeyleri	88
4.12.	Glutatyon standartları	89
4.13.	Çalışma gruplarında total glutatyon düzeyleri	90
4.14.	Çalışma gruplarında protein karbonil düzeyleri	91

TABLolar

Tablo		Sayfa
2.1.	Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri	32
2.2.	Biyolojik sistemlerde yer alan enzimatik antioksidan yapılar, rolleri ve özellikleri	39
4.1.	BPA uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı	75
4.2.	BPF uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı	77
4.3.	BPS uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı	78
4.4.	Çalışma gruplarında IC ₃₀ ve IC ₅₀ değerleri	80
4.5.	Çalışma gruplarında hücre içi ros üretimi	80
4.6.	Çalışma gruplarında glutatyon peroksidaz aktivitesi	82
4.7.	Çalışma gruplarında süperoksit dismutaz aktivitesi	83
4.8.	Çalışma gruplarında katalaz aktivitesi	85
4.9.	Çalışma gruplarında malondialdehit (MDA) aktivitesi	87
4.10.	Çalışma gruplarında süperoksit dismutaz aktivitesi	89
4.11.	Çalışma gruplarında protein karbonil aktivitesi	91

1. GİRİŞ

Endokrin bozucu kimyasal maddeler (EBK), endokrin sistemin normal işleyişini bozarak organizmada istenmeyen etkilere neden olabilen bileşiklerdir. EBK'ler hormonların üretim, taşınma, reseptöre bağlanma, sekresyon ve hatta hedef hücredeki etkilerini değiştirebilir (1).

Endokrin bozucu kimyasal maddeler, doğal veya sentetik yapıda olmakla birlikte etkilerini genellikle steroid yapılı hormonlar veya peptit/protein yapılı hormonlar aracılığıyla gösterir. Doğal yapıdaki EBK'lerin yarı ömürleri sentetik olanlara göre daha kısa olup, dokularda birikmeden kolaylıkla vücuttan atıldıklarından dolayı genellikle önemli yan etki oluşturmaz. Sentetik yapıdaki EBK'ler ise, başlıca endüstride ve tarımda kullanılır. Sentetik EBK'lerden birçoğu günlük hayatta sıklıkla kullandığımız metal yiyecek kutuları, bazı plastik şişeler, oyuncaklar, deterjanlar, kozmetikler ve hatta yiyeceklerde yaygın bir şekilde bulunmaktadır (2).

Endokrin bozucu bileşiklere yaşamın her döneminde maruziyet mümkündür ve bu bileşiklere fetal dönemde maruziyet, düşüklere, malformasyonlara veya yaşamın ileriki dönemlerinde ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Endokrin bozucu kimyasal maddenin yapısı, maruz kalınan süre ve yaşamın hangi döneminde maruz kalındığı gibi faktörler toksik etkilerin doğru değerlendirilmesi için önemlidir. Ayrıca bireylerin metabolizmaları ve vücut kompozisyonları, EBK'nın yarı ömrünü ve vücutta kalış süresini, dolayısıyla da toksisitesini etkilemektedir (3).

Bisfenoller, çok yaygın maruz kalınan çevresel kirleticilerdir ve bazı türevlerinin endokrin bozucu özellikte olduğundan şüphelenilmektedir. En yaygın kullanılanları bisfenol A (BPA)'dır. Sentetik EBK arasında yer alan BPA, başta plastik sanayii olmak üzere çoğunlukla şeffaf ve dayanıklı ürünlerin yapısında (su damacaneleri, biberonlar, yemek saklama kapları gibi), oyuncaklar, kağıtpara, metal yiyecek kaplarının iç yüzeyinde metal yüzey ile yiyecek temasının önlenmesi için ince bir tabaka halinde, diş hekimliğinde diş yapım malzemelerinde, bazı pesitisitlerin ve fungusitlerin içinde kullanılır (4). BPA'nın üreme, gelişme ve karsinogenez dahil olmak üzere çeşitli istenmeyen etkileri rapor edilmiştir (5). BPA'nın sağlık üzerinde olumsuz

etkileri pek çok araştırmacı üzerinde endişe yaratmış ve BPA kullanımının daha sıkı denetlenmesine karar verilmiştir (6). Potansiyel sağlık etkileri göz önüne alınarak, BPA'nın yerine alternatif olarak bisfenol F (BPF) ve bisfenol S (BPS) gibi bisfenollerin kullanımına ağırlık verilmiştir (7). BPF, BPA alternatifi olarak özellikle BPA içermeyen ürünlerde, yüksek dayanıklılık içeren malzemelerin yapımında, epoksi reçinelerinde, endüstriyel kaplamalarda ve su boruları gibi yapı malzemelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (8). Bisfenol F'nin toksik etkilerinin değerlendirildiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yetersizdir. Az sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışmada, BPF'ye maruziyetin östrojenik, androjenik ve tiroid hormonları üzerinde bozucu etkileri olduğu gösterilmiştir (9). Cabaton ve ark. (2009) BPF'nin endokrin bozucu ve genotoksik etkileri olduğunu göstermiştir (10). BPS ise yüksek ısıdaki stabilitesi ve güneş ışığına dirençli olmasından dolayı epoksi reçinelerinde, konserve kutuları, kutu içecekler, termal fatura kağıtları, hazır yemek kutuları, bromlu alev geciktiriciler, bagaj etiketleri, el ilanları ve gazete materyali olarak çeşitli endüstriyel ürünlerde kullanılmaktadır (11). BPS, BPA ile karşılaştırıldığında çevresel çözünübilirlik açısından daha dirençli olmasına rağmen, plastik materyal teması ile doğrudan maruziyete yol açabilir ve potansiyel risk oluşturabilir (12) Literatürde BPS ve BPF'nin biyotransformasyonlarına dair yeteri kadar bilgi yoktur. Ancak, sınırlı sayıda *in vitro* ve *in vivo* veri BPF'nin BPA ile benzer bir biyolojik yazgıya sahip olduğunu göstermiştir (10).

Sunulan tez çalışmasında, özellikle yaygın olarak kullanılan ve zararlı etkilerinden dolayı artık kullanımı kısıtlanmış olan BPA'nın alternatifleri olan BPF ve BPS'nin, ksenobiyotik metabolizma ve detoksifikasyon sürecinde önemli bir yere sahip karaciğer üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Maruziyet ile oluşabilecek istenmeyen etkilerin altında yatan oksidatif stres ile hücredeki oksidan/ antioksidan statü değişiklikleri göstergesi olan reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz 1 aktivitesi (GPx1) ve katalaz aktivitesi ile total glutatyon düzeyleri, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu değerlendirilmiştir.

Bisfenol A ve türevlerine maruziyetin etkilerinin incelendiği çalışmalar sınırlıdır. Tez alışması ile elde edilecek bulgular sıklıkla maruz kalınan BPA ve kullanımları giderek yaygın bir hale gelen türevlerinin karaciğerde ortaya çıkabilecek istenmeyen etkilerinin ve bu etkilerin altında yatması olası olan mekanizmalarının ayınlatılmasına katkı sağlamıştır. Bu alanda sınırlı sayıda veri olması nedeniyle elde edilecek verilerin yayınlanması ile mevcut bilimsel birikim için önemli düzeyde katkı elde edilecektir.

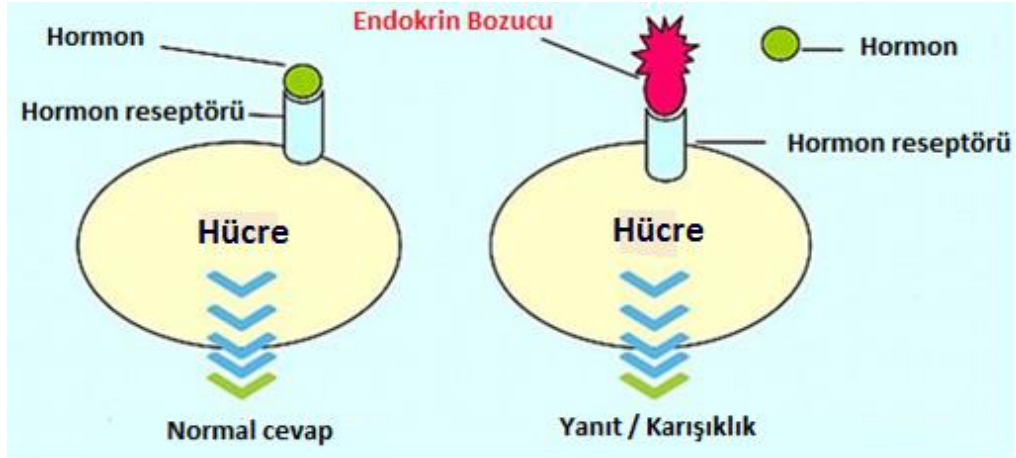


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler

Endokrin bozucu kimyasal maddeler (EBK), kısaca “organizmanın çevreyle etkileşimini ve hormonların etkilerini değiştiren bileşikler” olarak tanımlanır. Doğal ya da sentetik yapıda olabilirler. Doğal yapıda olanlar genellikle çeşitli bitkilerin (meyve ve sebzelerin) içinde bulunur. Doğal EBK’lerin yarı ömürleri sentetik olanlara göre daha kısa olup, dokularda birikmeden kolaylıkla vücuttan atıldıklarından dolayı, genellikle önemli yan etki oluşturmazlar. Bunlardan en iyi bilinenleri fitoöstrojenlerdir. Yaygın olarak bilinen bu bileşiklere örnek olarak genistein, kumestrol, enterodiol ve daidzein verilebilir (1). Sentetik EBK’ler ise, başlıca endüstride ve tarımda kullanılır. Sentetik EBK’lerden birçoğu günlük hayatta sıklıkla kullandığımız metal yiyecek kutuları, bazı plastik şişeler, oyuncaklar, deterjanlar, kozmetik ürünler ve hatta yiyeceklerde bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan pek çok çalışma çevredeki kimyasal maddelerin endokrin sistemin işleyişini olumsuz olarak etkilediğini göstermiştir (2). Endüstride kullanılan çözücüler, yağlar ve bunların yan ürünlerinden olan poliklorlu bifeniller (PCB’ler), polibromlu bifeniller (PBB’ler), dioksinler, plastizerler (bisfenol türevleri, ftalatlar), pestisitler [metoksiklor, klorpirifoz, diklorodifeniltrikloroetan (DDT)], fungusidler (vinklozolin) ve farmasötikler [dietilstilbestrol (DES)] EBK’lere örnek olarak verilebilir.

Endokrin bozucu kimyasal maddeler sistemik etkilerini farklı hormonların üretim, taşınma, ilgili reseptörüne bağlanma (agonist ve/veya antagonist), metabolizma veya atılımını değiştirerek meydana getirebilir (Şekil 2.1) (13). Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalar, EBK’lerin östrojenik/androjenik/anti-androjenik etkileri üzerinde yoğunlaşmış olsa da, günümüzde bu etkilerinin yanında tiroid, pankreas ve adrenal bezler gibi vücuttaki diğer endokrin yapılar üzerinde de olası etkileri araştırılmaktadır (14).



Şekil 2.1. Endokrin bozucuların hücre reseptörlerine etkisi

Endokrin bozucu kimyasal maddelerin endokrin sistemin normal işleyişini bozarak stres yanıtı, büyüme, üreme yeteneği, cinsiyet gelişimi, insülin üretimi/kullanımı ve metabolik hız gibi pekçok temel sürecin işleyişini bozdukları düşünülmektedir. Genel olarak, bu maddelerin suda çözünürlükleri düşüktür ve yağda yüksek çözünme özelliği gösterirler. Bu özellikleri yağ dokusunda kolaylıkla birikmelerine neden olur. EBK'lerin bazıları işlevselliği yönünden uzun yarı ömüre sahip olmaları planlanarak üretilmiştir. Bu maddeler kolayca çürümediği, metabolize edilmediği, metabolize edildiklerinde ise daha toksik maddeler açığa çıkabildiği için yıllar öncesinde yasaklanmalarına rağmen maddelerin istenmeyen etkileri günümüzde de görülebilmektedir. Bisfenol A (BPA) gibi maddeler bu derece kalıcı olmamasına karşın, yaygın kullanılmaları nedeniyle en sık rastlanan EBK'ler arasında yer almaktadır (15).

Endokrin bozucu kimyasal maddelerin olası ve ispatlanmış etki mekanizmalarını gözden geçirmek, maruziyetleri sonrasında gösterebilecekleri biyolojik etkileri anlamak açısından önemlidir. Genel olarak tek bir EBK'ye maruziyet nadirdir; çevreden birden fazla EBK'ye maruziyet söz konusudur. Ayrıca EBK'lerin sinerjistik etkileri de görülebilmektedir. Bireylerin metabolizmaları ve vücut kompozisyonları, EBK'ın yarı ömrünü ve vücutta kalış süresini etkilemektedir. Yine, bireylerin EBK'lere hassasiyetlerinde genetik polimorfizmler de etkindir. EBK'lere yaşamın hangi döneminde maruz kalındığı, olası toksik etkilerinin doğru

değerlendirilmesi açısından önemlidir (3). Örneğin, intrauterin dönemde çok toksik bir dioksin olan 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD)'ye maruz kalan erkek kemiricilerde androjenlerin üretiminde, testislerin inmesinde ve spermatogenezde sorunlar yaşandığı görülmüştür. Ancak, postnatal maruziyet sonucunda yalnızca somatik ve genital büyümenin olumsuz etkilendiği ve spermatogenezin bozulduğu görülmüştür (16). Erkek üreme sistemi ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunda EBK'lerin özellikle testiküler dokularda apoptoza yol açtığı bildirilmiştir. Örneğin, deltametrine maruz bırakılan sıçanlarda testiküler apoptoz belirlenmiş ve DNA'da hasar meydana gelmiştir (17). Diğer taraftan EBK'lerin üreme, metabolizma ve yağ dokusu ile olan ilişkileri düşünüldüğünde diyabet ile ilişkili olmaları muhtemel görünmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar incelendiğinde yüksek dioksin seviyelerinin, artmış diyabet riski ya da bozulmuş glukoz metabolizması ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (18).

2.2. Endokrin Bozucuların Sağlık Üzerine Etkileri

Son 40 yıldır yapılan çalışmalar EBK'lerin başta üreme sistemi olmak üzere tüm vücutta istenmeyen birçok etkiye neden olabileceğini göstermiştir. Yapılan çalışmalarda farklı EBK'lerin gerek dişi gerekse erkek hayvanlarda (balık, sürüngen, kuş ve memeli) primer ve sekonder karakteristik özellikleri üzerinde değişimler meydana getirdiği belirlenmiştir (19). Toppari ve ark. (1996)'nın yaptığı araştırmada östrojenik etkili EBK'lere maruziyetin özellikle erkek üreme sisteminde bozulmaya yol açtığı; testis ve meme kanseri gibi hormon ilişkili kanser indansında artışa neden olduğu gösterilmiştir (20). Crisp ve ark. (1998) hayvan çalışmalarıyla DDE, DDT, ftalat esterleri ile PCB grubu bileşiklerin östrojenik ve antiandrojenik etkileri olduğunu göstermişlerdir (19). Diğer taraftan, kız ve erkek çocukların cinsel gelişimi üzerinde etkili olan EBK'lerin belirlenmesi amacıyla kaza sonucu belli kimyasal maddelere yüksek temasın bulunduğu bölgelerde epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır. Michigan'da 1973 yılında bir kaza sonucunda 4000'den fazla kişi PBB'ye maruz kalmıştır. O dönemde kız çocuklarının adet görme yaşının ve normal meme gelişiminin erkene kaydığı görülmüş, bunun PBB'nin östrojenik etkilerinin sonucu olduğu bildirilmiştir (21).

2.3. Bisfenoller

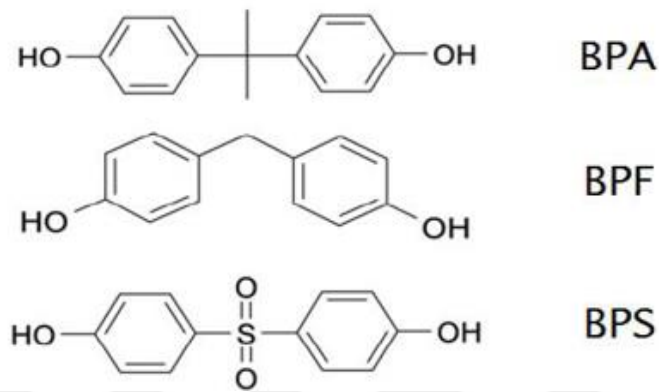
Bisfenoller, difenilmetanlar olarak bilinen kimyasal bir gruba aittir. Genellikle bir karbon atomu olan bir köprü atomu ile birbirine bağlanmış iki fenol halkası içeren geniş bir grup kimyasal maddeyi temsil eder. Bisfenoller, reaktan gruplarına göre isimlendirilir. BPA'nın reaktan grubu aseton olduğu için BPA olarak adlandırılmıştır. Bisfenol F (BPF)'nin reaktan grubu formaldehit, bisfenol S (BPS)'nin reaktan grubu ise kükürt trioksittir (22).

Bisfenoller, polikarbonat plastiklerin üretiminde ve gıda ve içecek kutularının reçine kaplamasında temel kimyasal olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (6). Farklı bisfenoller, nehir sularının diplerinde (23), yüzey sularında (8) ve kanalizasyon sularında (24) farklı oranlarda tespit edilmiştir (25). Ayrıca, yapılan çalışmalarda bisfenollerin insan idrarında ve kanında da tespit edilebilir düzeylerde bulunduğu belirlenmiştir. Bu tespitler, bu kimyasal maddelere insanların sürekli ve yüksek düzeylerde maruz kaldığını göstermektedir (24). Bisfenollerin gıdalarla birlikte tahmini alım miktarı, çocuklar için 243 ng/kg vücut ağırlığı/gün ve yetişkinlerde 58,6 ng/kg vücut ağırlığı/gün'dür (26).

Bisfenol A'nın çevrede ve biyolojik örneklerde yaygın olarak tespit edilebilir olduğu pek çok bilimsel yayında belirtilse de, diğer bisfenol analoglarının varlığı hakkında bilgi azdır (25). BPA'nın sağlık üzerinde çeşitli olumsuz etkilere yol açtığını gösteren bilimsel kanıtların artmasıyla yaygın olarak kabul gören bu bisfenolün pek çok tüketici ürününde kullanımı yasaklanmış ve yerine 1,1,1,3,3,3-heksafloro-2,2-bis (4-hidroksifenil) propan (BPAF), BPF, BPS ve dimetil-BPA (DMBPA) gibi BPA alternatifleri yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (27).

Endüstriyel uygulamalarda BPA'nın yerine bazı bisfenol analogları alternatif olarak kullanıma girmiştir. Örneğin BPS yüksek sıcaklıklarda daha dayanıklı olup, güneş ışığından etkilenmemektedir. ABD'deki termalkağıt üretiminde 2006'dan beri BPA yerine alternatif olarak BPS'i kullanılmaktadır. BPA'nın doğada geri dönüşümü zor olup doğada daha uzun yıllar kalırken, BPS'in doğaya karışması daha kolaydır (28). BPS'nin konserve gıdalarda 175 ng/g konsantrasyona kadar bulunduğu bildirilmiştir

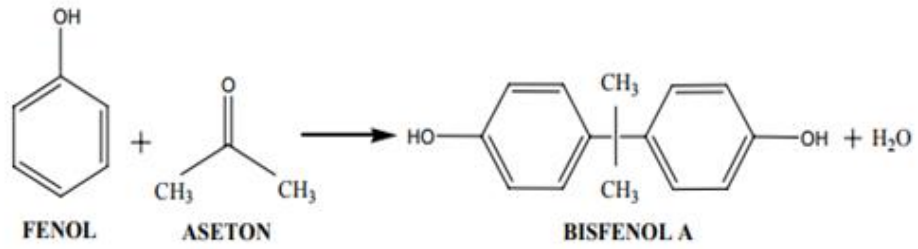
(29). BPF'nin alkolsüz içeceklerde ortalama 0,180 µg/L konsantrasyonda bulunabileceği rapor edilmiştir. Bir çalışmada yüzey suyu, kanalizasyon ve çöktürlerde BPF'nin tespit edilebilir düzeylerde bulunduğu bildirilmiştir. Tetrabromobisfenol A (TBBPA) ise alev geciktirici olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda, birçok elektrik malzeme ve işlenmiş plastik levhalarda kullanılır (30). BPA, BPF ve BPS'nin kimyasal yapıları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Bisfenol A, bisfenol F ve bisfenol S'nin kimyasal yapısı

2.4. Bisfenol A'nın (BPA) Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bisfenol A (BPA), ilk olarak 1905 yılında katalizör olarak asit varlığında fenol ve asetonun kondansasyonu ile sentezlenmiştir ve 1940'lardan beri genellikle plastikleri sertleştirmek amacıyla kullanılan kimyasal bir ajandır (31, 32). BPA, başka kimyasallarla kombine olarak uzun yıllardır plastik yapımında kullanılmaktadır (33). International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) adlandırması 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan; kimyasal formülü $C_{15}H_{16}O_2$, yapısal formülü $(CH_3)_2C-(C_6H_4-OH)_2$ 'dir. BPA'nın kimyasal yapısı elde edilişi Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı ve fenol ve asetondan kondenzasyonu

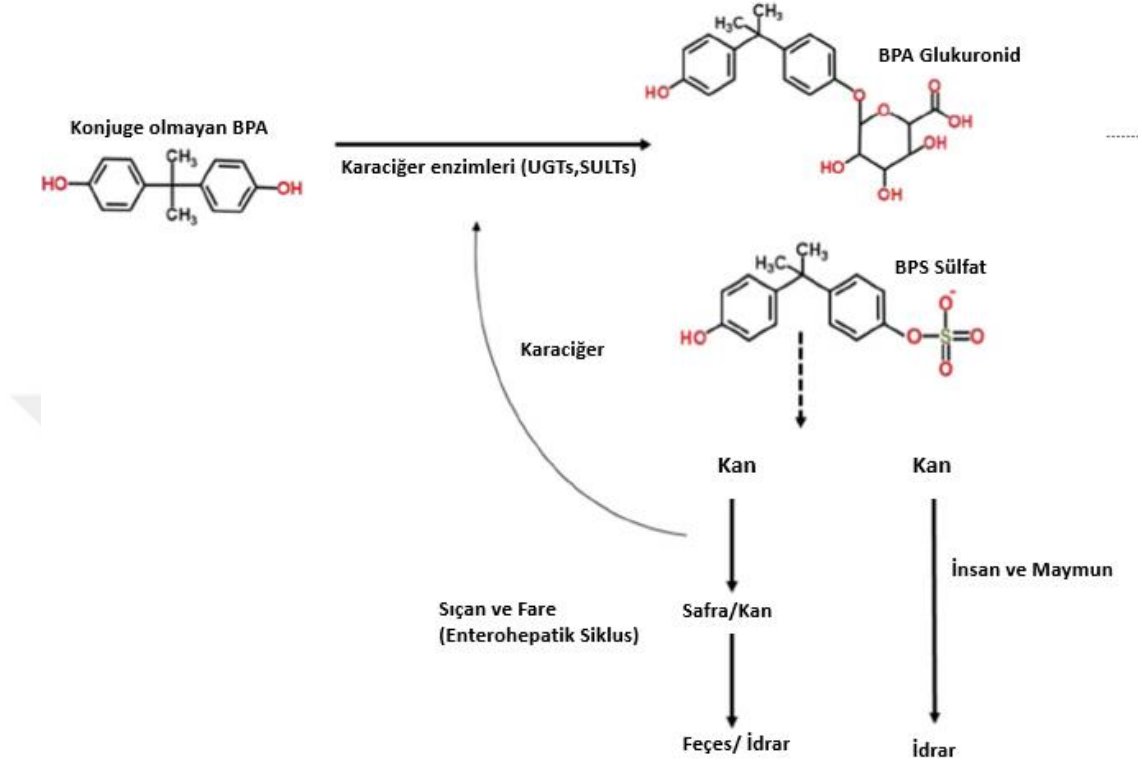
2.4.1. Bisfenol A'nın Biyotransformasyonu

Bisfenol A ile ilgili yapılan pekçok biyotransformasyon çalışması deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilmiştir. İnsanlarla yapılan çalışmalar ancak kaza yoluyla BPA'ya temas eden kişilerle veya gönüllülerle yapılmıştır. Bundan dolayı BPA'nın insandaki metabolik yoluyla ilgili bilinmeyen birçok nokta bulunmaktadır. BPA'ya maruziyetin en çok oral yolla gerçekleştiği bilinmekte olup okul çocuklarında ve daha küçük çocuklarda temasın %99,9'unun oral yolla gerçekleştiği bildirilmiştir. Dermal yoldan maruz kalındığında ise %10 kadar emilim olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca inhalasyon yoluyla da temas olasıdır; BPA'nın sentezi sonrasında yılda yaklaşık 100 tonunun atmosfere yayıldığı bildirilmiştir (34).

Oral olarak alınan BPA, insanlarda gastrointestinal sistemden emiliminin ardından karaciğerde başlıca CYP2C18 ve daha az oranda CYP2C19 ve CYP2C9 enzimleri ile metabolize edilir. Karaciğerde ilk geçiş eliminasyonuna uğradıktan sonra glukuronik asit ve sülfat ile konjuge olarak sırasıyla ana metaboliti BPA glukuronit (BPAG) ve minör metaboliti BPA sülfata dönüşür. Yarılanma ömrü yaklaşık 6 saat olup yaklaşık 42 saatte tamamına yakınının idrarla atıldığı belirlenmiştir. Az sayıda gönüllü ile yapılan bir çalışmada, BPA'nın %9,5'uğunun hiç değişmeden, %21'inin BPA sülfat konjugatları ve %69,5'inin ise BPA glukuronat konjugatları şeklinde idrarla atıldığı gösterilmiştir (35). BPA'nın biyotransformasyonu Şekil 2.4'de gösterilmiştir.

Vücutta BPA'nın ortalama konsantrasyonları kanda 0,1-10 µg/L, idrarda 0,4-149 µg/L, semen, anne sütü, yağ dokusu, fetüs ve amniyotik sıvıda 0,1-10 µg/L olarak belirtilmektedir. Ayrıca plasenta, kord kanında, kolostrum ve tükürükte de tespit

edilebilir düzeylerde bulunduğu bildirilmiştir (36). Amerikan popülasyonunun %95'inde BPA düzeylerinin idrarda saptanabilir limitler içinde olduğu belirtilmiştir (37).



Şekil 2.4. BPA'nın biyotransformasyonu

2.4.2. Bisfenol A kullanım alanları ve maruziyet yolları

Bisfenol A'nın kullanımının kontrolsüz olarak artması ve kullanıldığı ürünlerden çevreye sızarak kronik maruziyet yaratması sonucu BPA'nın kullanımı kısıtlanmıştır. Liao ve Kannan (2013), yaptığı çalışmada BPA ve analoglarının test edilen gıda numularının (mısır gevrekleri, sebzeler, balık ve deniz ürünleri, ambalajlı gıdalar, konserveler) %75'inde ortalama 4,38 ng/g taze ağırlık miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir. İnsanlardan alınıp analiz edilen 2517 idrar numunesinin %90'dan fazlasında ve birçok biyolojik örnekte BPA'nın varlığı gösterilmiştir. Dolayısıyla bu bisfenol türevine maruziyetin insanda yüksek düzeylerde olduğu görülmektedir (38).

Bisfenol A molekülleri arasındaki kimyasal bağlar kararsız olduğu için sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlerle hidrolizi kolaylaşır ve çevreye BPA salınımı artar (39).

Pastörizasyon işlemi sırasında sıcaklığın 100 °C'ye çıkması sonucu besinlerin ve içeceklerin içine koyulduğu, yapımında epoksi reçine kullanılmış teneke kutulardan BPA'nın 18 kat daha hızla salındığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, pastörizasyon işlemi uygulanmayan ve aynı ambalajla paketlenmiş besinlere BPA sızıntısının önemli ölçüde azaldığı da gösterilmiştir (40).

Bisfenol A'ya maruziyetin diğer bir yolu da arıtma tesisleri ve depolama alanlarından BPA'nın doğal su kaynaklarına sızmasıdır. Atık su arıtma tesislerinden alınan numunelerde BPA düzeyinin 370 µg/L'a kadar çıktığı tespit edilmiştir. Yüzey sularında ise bu miktarın 56 µg/L'a kadar çıktığı bulunmuştur (41). İnhalasyon yoluyla maruziyetin derecesinin belirlenmesi için de çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, özellikle plastik fabrikalarının iç ortam havasındaki BPA varlığı ile açık havada, iş yerlerinde ve bu işyerlerinin çevresinde bulunan evlerdeki BPA varlığı araştırılmıştır. İç ortam havasındaki en yüksek BPA konsantrasyonu Çin Halk Cumhuriyeti'ndeki reçine fabrikalarında bildirilmiş (>50.000 ng/m³), en düşük BPA konsantrasyonları ise (<100 ng/m³) ticari binalarda ve konutlarda tespit edilmiştir. Ev ve ofis havasındaki BPA'nın asıl kaynağının iç mekanlarda kullanılan epoksi temelli zemin malzemeleri, elektronik malzemeler, boyalar ve yapıştırıcılar gibi ürünlerde yardımcı olarak kullanılan ve bu ürünlerden buharlaşarak havaya salınan BPA olduğu düşünülmektedir (42). 2011'de Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada iki farklı bölgeden toplanan 56 toz örneğinin %95'inde BPA varlığı tespit edilmiştir. Numunelerdeki BPA miktarlarının 0,5-10,200 ng/g arasında değiştiği; en yüksek konsantrasyonun ise laboratuvar kapılarında bulunan hava filtrelerinde olduğu tespit edilmiştir. BPA'nın insan sağlığı üzerine olası zararlı etkilerinin endokrin bozucu aktivitesinden kaynaklandığı birçok farklı araştırmanın sonucunda anlaşılmıştır (43).

Bisfenol A ile ilgili ilk düzenleyici risk değerlendirme raporu Kanada hükümeti tarafından yayınlanmış olup, bu raporun sonucuna göre BPA'nın Kanada'daki biberonlarda kullanımı yasaklanmıştır. Ocak 2010'da ise Amerikan İlaç ve Gıda İdaresi (FDA), BPA'nın infant ve çocuk sağlığı üzerindeki potansiyel yan etkilerinden duyduğu endişeyi belirtmiştir. Takiben, yiyecek saklama kaplarında BPA kullanımı Japonya, Kanada ve Amerika'daki pek çok eyalette yasaklanmıştır. Avrupa Birliği ise 2011'de

BPA içeren bebek ürünlerinin üretimini, pazarlanmasını ve ihracatını durdurmuştur (44).

Şu andaki çalışmalar yiyecek ambalajlarında kullanılan BPA'nın daha güvenli maddeler ile değiştirilmesi yönündedir. Ancak, bütün bu alternatif materyallerin fonksiyonel ve güvenlik açısından bilimsellik çerçevesinde değerlendirilmesi gerekmektedir (45).

2.4.3. Bisfenol A'nın Toksisitesi

Bisfenol A, östrojen reseptörü alfa ($ER\alpha$) ve östrojen reseptörü beta ($ER\beta$)'ya bağlanabilen fenolik yapıda ksenoöstrojen bir maddedir ancak $ER\beta$ 'ya afinitesi $ER\alpha$ 'ya göre 10 kat daha fazladır. Fenolik yapısı nedeniyle BPA'nın, östrojen reseptörleri ile etkileştiği ve endokrin reseptör (ER) bağımlı sinyal yolları yoluyla agonist veya antagonist etkisi olduğu gösterilmiştir (46). BPA, östrojene benzer davranmakta ve östrojen reseptörlerine ~10000 kat daha az afinite göstermektedir. Bu nedenle BPA'nın kadın ve erkek infertilitesi, erken ergenlik, meme ve prostat kanseri gibi hormona bağlı tümörler ve polikistik over sendromu dahil olmak üzere birçok endokrin bozukluğun patogeneğinde rol oynayabileceği belirtilmektedir (47). BPA'nın risk değerlendirmesi amacıyla yapılan çalışmalarda kullanılan en düşük doz 1997 yılı öncesinde, yan etki görülen en düşük düzey (LOAEL) olarak kabul edilen 50 $\mu\text{g/kg/gün}$ idi. Fakat yapılan çalışmalar BPA'nın LOAEL değeri altında da sağlık üzerine ciddi olumsuz etkileri olduğunu göstermiş bunun üzerine 2009'da BPA için en düşük doz 10^{-7} M olarak belirlenmiştir (11). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, BPA'nın tolere edilebilen alım düzeyini 50 $\mu\text{g/kg}$ vücut ağırlığı/gün'den 4 $\mu\text{g/kg}$ vücut ağırlığı/gün'e düşürmüştür (39).

Yapılan *in vitro*, hayvan ve insan çalışmaları BPA'nın insan sağlığı üzerinde ciddi olumsuz etkileri olabileceğini göstermiştir. BPA maruziyetinin obezite ve diyabet gibi metabolik hastalıklara zemin hazırladığı; tiroid, adrenal ve üreme hormonları üzerinde endokrin bozucu etkileri olduğu; organizmada oksidatif stres sonucu organ (karaciğer, böbrek, testis, beyin, kalp) hasarı yaptığı; kardiyovasküler sistem, solunum

sistemi ve renal sistem hastalıkları gibi çok sağlık sorunuyla bağlantılı olduğu ve fetal merkezi sinir sistemine etki ederek doğum defektleri ile meme kanseri gibi kronik hastalıklara yol açabildiği bildirilmiştir (48). Ayrıca BPA'nın nöroendokrin sistem üzerine etkileriyle ilgili de çalışmalar yapılarak, kemirgenler ve diğer hayvanlarda BPA'nın kognitif defektlere, kaygı durumunda artışa, sosyal ve cinsel yönden geriliklere, annelik bakımının azalmasına ve fiziksel aktivite de azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (49, 50).

Bisfenol A maruziyeti sonucunda gerçekleşebilecek karaciğer toksisitesine ilişkin *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Hassan ve ark. (2012) yaptığı araştırmada sıçanlar beş gruba ayrılmıştır: İlk dört grup sıçana dört hafta boyunca farklı dozlarda BPA (0,1, 1, 10, 50 mg /kg vücut ağırlığı/gün) oral yoldan verilmiştir. Bir grup ise kontrol olarak belirlenmiştir. 0,1 mg/kg vücut ağırlığı/gün uygulanan gruptaki hayvanların son vücut ağırlıkları kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş göstermiştir. 50 mg/kg vücut ağırlığı/gün BPA grubunda uygulanan grupta ise, kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük glutatyon (GSH) düzeyleri ve yine anlamlı derecede düşük süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) aktiviteleri belirlenmiştir. Yüksek doz BPA (50 mg/kg vücut ağırlığı /gün) uygulanan grupta alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP) ve total bilirubinin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. BPA'nın antioksidan enzim genlerin ekspresyonunu kontrole kıyasla önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, BPA'nın oksidatif strese yol açarak hepatotoksositeye yol açtığına işaret etmektedir (51).

Son yıllarda, bisfenollerin endokrin bozucu etkileri dışında ilgi çeken diğer bir durum da bileşiklerin genotoksik etki potansiyelleridir. Yapılan çalışmalarda BPA'nın genotoksositeye yol açması hakkında çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. BPA'nın *in vivo* olarak DNA katım ürünlerinin oluşumuna neden olduğu (52), gen mutasyonları (53) ve DNA hasarını indüklediği belirlenmiştir. Ancak, sitotoksik olmayan dozlarda BPA ile yapılan bazı *in vitro* genotoksikite testlerinde (kromozomal aberasyon testi, mikronükleus testi, comet yöntemi), BPA'nın genotoksik etkisinin olmadığı gösterilmiştir (54).

Bisfenol A ile Yapılan *In Vitro* Çalışmalar

Bisfenol A maruziyetinin etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla hayvan çalışmalarının yanısıra sınırlı sayıda da olsa, *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Michalowicz ve ark. (2015) kan hücrelerinde bisfenollerin etki mekanizmasını belirlemek için BPA ve türevlerinin insan periferik kan mononükleer hücreleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. BPA ve türevleri, hücrelere 0,06 μ M-1,2 mM konsantrasyon aralığında uygulanarak 1-4 saat arasında inkübe edilmiştir. 1 saat inkübe edilen hücre grubunda reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyi ve hidroksil radikal formasyonuna bakılmış olup, 4 saat inkübe edilen grupta ise diğer oksidatif stres parametreleri değerlendirilmiştir. 220 μ M ve 440 μ M BPA uygulanan gruplarda, 4 saatin sonunda hücre canlılığı istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda BPA uygulanması sonunda ise hücre canlılığı neredeyse tamamen kaybolmuştur. BPA için medyan letal konsantrasyon (LC_{50}) değeri 549,6 μ M olarak bulunmuştur. Yüksek doz (440 μ M) BPA uygulanan hücrelerde morfolojik değişiklikler de meydana getirmiştir. Hücre içi ATP düzeylerini en az etkileyen bisfenol türevi BPS olmuştur. 150 μ M BPA uygulamasının 4 saatin sonunda hücre içi ATP'nin neredeyse hepsinin tüketilmesine neden olduğu görülmüştür (55).

Peyre ve ark. (2014) çalışmalarında, BPA ve BPS'nin insan hepatoselüler hücre hattı HepG2 hücreleri üzerindeki etkisini karşılaştırmalı olarak değerlendirmeyi amaçlamıştır. BPA ve BPS'in kronik toksisitesini belirlemek için hücreler 2 haftadan daha uzun süreyle düşük doz BPA ve BPS'ye maruz bırakıldığında hücre yoğunluğunda anlamlı bir azalma görülmemiştir. Bisfenol türevlerinin hücreler üzerinde yol açtığı değişiklikler 100 μ M'dan sonra görülmeye başlamıştır. Hücre görüntüleme verilerine göre, BPA ve BPS'in doz bağımlı olarak hücrelerde lipid akümülyasyonuna yol açtıkları tespit edilmiştir. Ancak, BPA ve BPS'nin hücrelerde lipid akümülyasyonu üzerine farklı etkilerinin olabileceği ve hücrede farklı toksik etkiler meydana getirebilecekleri belirlenmiştir. BPA'nın pregnan X reseptörü (PXR) reseptörünü etkileyebildiği ve lipid

homeostazının bozulmasına yol açan bir süreç olan intraselüler nötr lipid depolamasında artışa yol açtığı da çalışmada gösterilmiştir (56).

Bisfenol A ile Yapılan Hayvan Çalışmaları

1930'larda Dodds ve Lawson, BPA'nın östrojenik etkisi olduğunu saptamıştır ve ardından maddenin kemiricilerde östrojenik etki gösterdiği belirlemiştir (13). Bu nedenle BPA östrojen replasman tedavilerinde çok kısa bir süre kullanılmış, daha sonra yerini dietilstilbesterole (DES) bırakmıştır (45). Bunun yanında BPA'nın beyin gelişimi, tiroid hormonları, kardiyovasküler hastalıklar, erkek üreme sistemi, pubertal gelişim obezite ve diyabet üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir. Son yıllarda, BPA'nın nöroendokrin sistem üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır (40).

Bisfenol A ve türevleri ile ilgili yapılan çoğu hayvan çalışmasında zebra balığı kullanılmıştır. Zebra balığı ile çalışmanın pek çok avantajı vardır ve gelişim biyolojisi çalışmalarında kullanılan önemli bir omurgalı modelidir (57). Molina ve ark. (2018)'nin yaptığı araştırmada 150 adet 16 haftalık dişi zebra balığı kullanılmıştır ve balıklar 14 gün süreyle 1, 10, 100 ve 1000 µg/L konsantrasyonlarda BPA'ya maruz bırakılmıştır. 2 haftanın sonunda balıklar ötenazi edilmiş; vücut ve over ağırlıkları ölçülmüş ve overler analize dek -80°C'de saklanmıştır. BPA'ya maruz kalan zebra balıklarının yumurtaları histopatolojik olarak incelendiğinde BPA konsantrasyonunun artışıyla doğru orantılı olarak atretik foliküllerin sayısında artışa neden olduğu belirlenmiştir. Bu da BPA'nın yüksek dozlarda zebra balıklarında üreme sistemini bozduğuna işaret etmektedir. Bu çalışmada değerlendirilen diğer bir nokta ise balıklarda östrojen maruziyetinin belirlenmesinde kullanılan vitellogenin protein düzeyleridir. 2 haftanın sonunda tüm gruptaki balıklarda vitellogenin artmıştır. Test edilen en yüksek BPA dozu olan 1000 µg/L'de ise vitellogenin düzeyleri kontrol grubunun 500 katına çıkmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, foliküler atrezi ve vitellogenin proteininde görülen artışların BPA'nın zebra balıklarında endokrin bozucu bir etkisinin olduğuna ve BPA'nın dişi

zebra balıklarının üreme sisteminde işlevsel bozukluklar oluşturabileceğine işaret etmektedir (58).

Bisfenol A İnsan çalışmaları

Huo ve ark. (2015)'nin yaptığı bir çalışmada, gebelik sırasında BPA'ya maruz kalmış ve idrarlarında yüksek miktarda BPA bulunan gebe kadınların düşük doğum ağırlıklı bebek dünyaya getirdiği görülmüştür (59). Yine aynı şekilde Troisi ve ark. (2014)'nin yaptığı çalışmada düşük doğum ağırlığıyla doğan 200 bebek incelendiğinde bu bebeklerin plasentalarındaki BPA seviyesinin normal doğum ağırlığıyla doğan bebeklerden anlamlı oranda fazla olduğu bulunmuştur (60). Ayrıca BPA'nın insan plasentasını geçerek fetal gelişim için bir risk oluşturabileceği ifade edilmiştir (61).

Çin Halk Cumhuriyeti'nde yapılan bir diğer çalışmada, BPA'ya yaygın bir şekilde maruz kaldığı düşünülen gençlerden oluşan bir gruptan idrar örnekleri toplanıp analiz edilmiştir. İdrar örneklerindeki total BPA derişiminin 0,19-23,9 ng/mL aralığında olduğu bildirilmiştir. Ancak, elde edilen verilerin BPA için EFSA tarafından 2006'da ve Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (US EPA) tarafından 2007'de belirlenen tolere edilebilen günlük doz (TDI)' dan daha düşük olduğu da aynı çalışmada belirtilmiştir (62).

2.5. Bisfenol F'nin (BPF) Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bisfenol A'nın yapısal bir türevi olan ve endokrin bozucu etki gösteren BPF [bis(4-hidroksifenil)metan], yaklaşık 200,23 g/mol molekül ağırlığında olup şeffaf ile açık pembe arasında renge sahip katı bir maddedir.

2.5.1. Bisfenol F'in Biyotransformasyonu

Jaeg ve ark. (2004)'ın BPF'nin dağılım ve metabolizmasını göstermek için gebe ve gebe olmayan sıçanlar ile yaptığı çalışmanın sonucunda ortaya çıkan metabolit sayısının fazla olması BPF biyotransformasyonunun oldukça karmaşık olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca BPF metabolizmasındaki ana yolağın BPF hidroksilasyonu

olduğu da düşünülmektedir (63). İnsan ve sıçan karaciğer mikrozomları ile yapılan çalışmalarda, BPF'nin sitokrom P450 (CYP450) ile oksidasyona uğradığı ve ana metabolitlerinin orto- ve meta-hidroksil BPF olduğu gözlenmiştir (63, 64). BPF'nin sülfat ve glukuronat konjugatları şeklinde idrar ile atılabildiği gösterilmiştir (65).

2.5.2. Bisfenol F'in Toksisitesi

Bisfenol F'nin toksik etkilerinin değerlendirildiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yetersizdir. Az sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışmada, BPF'ye maruziyetin östrojenik, androjenik ve tiroid hormonları üzerinde bozucu etkileri olduğu gösterilmiştir (9). Eksik polimerizasyon veya verniklerin bozulması, BPF'nin ortam veya gıda içine salınmasına neden olabilir. Avrupa Komisyonu tarafından 2005 yılında gıda ile temasta bulunacak materyallerin ve ürünlerin üretiminde genotoksik olduğu bilinen bazı toksik epoksi türevlerinin kullanımını sınırlayan düzenlemeler yayınlanmıştır. BPF ilk olarak 2000 yılında değerlendirilmiş ve 2005 yılında Gıda Üzerine Bilimsel Komite (SCF) tarafından BPF ile ilgili belirli toksikolojik verilerin mevcut olduğu, ancak kabul edilebilir bir günlük alımının veya tolere edilebilen bir günlük alım düzeyinin bulunmamasından dolayı Liste 7'ye yerleştirilmiştir (10).

Fromme ve ark. (2002)'nin yaptığı çalışmada, Almanya'daki çeşitli nehirler, göller ve kanallardan toplanan çevresel örneklerde BPF konsantrasyonları belirlenmiştir. Toplanan tortu numunelerinin %58'inde BPF tespit edilmiştir; ancak BPF düzeylerinin BPA'ya göre oldukça düşük olduğu bulunmuştur. Bu düşük konsantrasyonun nedeni büyük ihtimalle BPF'nin BPA'dan çok daha küçük miktarlarda kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, yüzeysel su numunelerinin %77'sinde BPA konsantrasyonu 0,0001-0,180 µg/L, atık su numunelerinin %72 'sinde ise 0,022-0,123 µg/L bulunmuştur (8).

BPF' nin endokrin bozucu ve genotoksik etkileri vardır. Cabaton ve ark. (2009) BPF ve metabolitlerinin IC₅₀ dozu olan 0,796 mM konsantrasyonuna HepG2 hücrelerini maruz bırakmışlardır. Ames testi sonucunda BPF'nin sitotoksik etkilerinin olduğu görülmüştür. Comet testinin sonuçlarına göre ise BPF'nin HepG2 hücrelerinde DNA hasarı meydana getirdiği görülmüştür (10).

BPF ile Yapılan *In Vitro* Çalışmalar

İnsan meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve sıçan hipofiz kanseri hücre hattı GH3 kullanılarak yapılan bir çalışmada, BPF'nin 19 analog arasından en düşük östrojenik aktiviteye sahip olduğu ve ayrıca androjenik etkinliği bulunmadığı belirlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde BPF için östrojen lusiferaz raportör deneyi sonrasında etkin doz 50 (EC_{50}) değeri 1 mM, BPS için ise 1,1 mM olarak bulunmuştur. Bu değer BPA için 0,63 mM olarak belirlenmiştir (66). MCF-7 hücrelerinin transfeksiyonu ile elde edilen MELN hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada ise, BPF'nin ER'lere bağlanarak östrojenik etki gösterdiği, EC_{50} değerinin $0,98 \pm 0,05$ mM olduğu ve BPS'dan (EC_{50} : $12,10 \pm 0,92$ mM) daha yüksek östrojenik aktivitesinin bulunduğu belirlenmiştir. Ancak, BPF'nin BPA'ya (EC_{50} : $0,47 \pm 0,03$ mM) göre östrojenik aktivitesinin yine de düşük kaldığı bulunmuştur (58). BPF'nin östrojenik aktivitesinin östrojen reseptörü ER α 'nın aracılıklı olduğu maya deneylerinde de gösterilmiştir (67). Sağlıklı Sprague-Dawley sıçanlarından elde edilen karaciğer mikrozomal enzimleri ile yapılan bir çalışmada ise, BPF ve BPS başta olmak üzere 7 BPA analogunun zayıf östrojenik etkisi olduğu gözlenmiştir (68). MCF-7 hücreleri ve kemik iliği dendritik hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, BPF ve diğer türevlerin östrojenik aktivitelerinin bulunduğu ve immün aktivasyona sebep olabilecekleri gösterilmiştir. Ancak, kullanılan diğer östrojenik bileşikler içinde en düşük östrojenik proliferatif etkinin BPF tarafından oluşturulduğu bulunmuştur [nonifenol (NP)> BPA> oktilfenol (OP)> bisfenol B (BPB)> BPF] (69).

İnsan adrenal korteks karsinoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada BPA'nın östrojen reseptöründe maksimum cevap oluşturması için gerekli EC_{50} değeri 0,08 mM olarak bulunurken, bu değer BPF için 0,82 mM, BPS için ise 1,17 mM olarak belirlenmiştir. Ancak, BPF'nin östrojenik aktivitenin yanında, H295R steroidogenesis yönteminde 17 α -hidroksiprogesteron'a da büyük bir efikasite gösterdiği (BPF için EC_{50} : 20,8 mM; BPS için 14,7 mM) belirlenmiştir. BPS'nin ise BPA'dan daha az östrojenik ve anti-androjenik olduğu belirlenmiştir (70). Bir diğer çalışmada ise, MCF-7 hücre hattında BPF'nin hücre proliferasyonu için EC_{50} değeri 84,8 nM, BPS için ise

EC₅₀ değeri 410 nM olarak bulunmuştur. Bu değer 17 β -estradiol için 0,0045 nM olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, çalışmadaki maddelerin (flavonoidler ve bisfenol türevleri) 17 β -estradiol ile kombine uygulamalarında en yüksek proliferatif aktivite 17 β estradiol+BPF uygulaması ile belirlenmiştir. Tamoksifen ile çalışmada kullanılan maddelerin bir arada maruziyeti sonucunda ise BPF ile kontrole göre %766 hücre canlılığı belirlenmişken, bu oran BPA için %617, 17 β -estradiol için ise %562 olarak bulunmuştur. BPF'nin anti-androjenik etkisinin ise, flavonoidlerden daha düşük olduğu bildirilmiştir (71). Ayrıca, BPA ve BPF'nin *in vitro* olarak adinopektin üretimini ve salgılanmasını azalttığı düşünülmektedir (72).

Diğer taraftan BPF'nin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin saptanması amacıyla yapılan bir çalışmada, BPF'nin insan karaciğer kanseri HepG2 hücrelerin deki inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀) değeri 0,080 mM, BPF-digilisdil eter (BFDGE)'in ise, 0,796 mM olarak bulunmuştur. Ames testi uygulandığında ise, BPF'nin *Salmonella typhimurium*'un farklı suşlarında bakteriyel mutasyonları (nokta ve kalıp kayması mutasyonları) indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca, BPF ile HepG2 hücrelerinde mikronükleus testi ile de negatif sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, Comet testi ile yüksek konsantrasyonlarda BPF'nin (50 ve 70 mM) HepG2 hücrelerinde DNA hasarını indüklediği belirlenmiştir. Diğer taraftan lusiferaz deneyi sonrasında BPF'nin BFDGE'den daha yüksek östrojenik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (10).

BPF ile Yapılan *In Vivo* Çalışmalar

Bisfenol F'nin kemiricilerde plasental bariyeri aştığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Kritik gelişme dönemlerinde (prenatal veya erken postnatal) endokrin bozucu kimyasal maddelere maruziyet, çocukluk ve yetişkinlik döneminde istenmeyen etkilere sebep olabilir. Cabaton ve ark. (2006) BPF'nin hayvanlarda dağılımını incelemek ve BPF metabolitlerinin potansiyel etkilerini değerlendirerek BPF metabolitlerinin gebeliğin son evrelerinde plasental bariyeri geçip geçmediğini araştırmak için gebe ve gebe olmayan dişi Sprague-Dawley sıçanlarıyla çalışmışlardır. Bunun için işaretlenmiş BPF 70 ve 100 mg/kg vücut ağırlığı dozunda sıçanlara gastrik gavaş ile verilerek sıçanlar 96 saat süreyle metabolik kafeste tutulmuştur. Gebe

olmayan sıçanlarda BPF 'nin ve metabolitlerinin itrahının idrarla (verilen dozun %43-54) ve daha az miktarda dışkıyla (verilen dozun %15-20'si) gerçekleştiği belirlenmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri, idrarda bulunan ana metabolitin (idrarda bulunan radyoaktivitenin %50'sinden fazlası) BPF'nin sülfat konjugatı olduğunu göstermiştir. 96 saat sonunda en yüksek BPF'nin karaciğerde (uygulanan dozun %0,5'i) biriktiği belirlenmiştir. Gebe olan sıçanların dozlamasından sonra ise gebeliğin 17. gününde uterus, plasenta, amniyotik sıvı ve fetüslerde BPF (uygulanan dozun %0,9-1,3'ü) tespit edilmiştir. Bu da BPF'nin büyük oranda absorbe edildiği ve dişi sıçanlarda üreme sistemine dağıtılarak radyoaktif BPF'nin sıçanlarda gebeliğin geç bir aşamasında plasental bariyerden geçtiğinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, sindirim kanalının lümeninde daha büyük miktarda radyoaktif BPF (dozun %8-10'u) belirlenmiştir. Tek bir oral doz [3H] BPF uygulanmasından sonra ise, radyoaktif BPF'nin %46'sı safra ile atılmıştır. Bu durumda, araştırmacılar sıçanlarda BPF ve/veya metabolitlerinin büyük olasılıkla enterohepatik sıklusa geçtiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca, BPF'nin enterohepatik sıklusa girmesi nedeniyle BPF uygulamasından 4 gün sonra bile biyolojik sıvılarda hala nispeten yüksek miktarda atılan BPF ve/veya metabolitleri belirlenebilmiştir (65).

Daphnia magna (su piresi) ile yapılan bir çalışmada, 0,1–100 mg/L arasında BPF uygulaması yapılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonraki EC₅₀ değeri 80 mg/L, 48 saat sonraki EC₅₀ değeri 56 mg/L olarak bulunmuştur. Çalışmada ayrıca BPF'nin su piresinde görülen toksik etkilerinin BPA'dan daha düşük olduğu gösterilmiştir (73).

Yamasaki ve ark. (2003) yaptığı bir çalışmada bir çalışmada, erkek Crj:CD sıçanlar ile çalışılmıştır. Bu çalışmada, BPF'nin LOAEL değeri 100 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiş ve sıçanlara oral yoldan 0, 50, 200 ve 1,000 mg/kg/gün dozlarda BPF 10 gün süreyle verilmiştir. Çalışmanın sonucunda 100 mg/kg dozda BPF'nin sıçanların vücut ağırlığında azalmaya ve spontan hareketlilikte düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. BPF uygulanan bütün dozlarda sıçanlarda rölatif ventral prostat, seminal vezikül, glans penis, bulbocavernosus/ levator ani kası ve Cowper bezi ağırlıkları değişmemiştir. Ancak, BPF'nin bir androjen antagonisti olan flutamid [10 mg/kg /gün] ve testosteron propionat (0,2 mg/kg/gün) ile birlikte uygulanması sonucunda tüm

organ rölatif ağırlıklarında önemli azalmalar olduğu belirlenmiştir (74). Yine aynı araştırıcı grubun bir yıl sonra yayınladığı bir diğer çalışmada, 3 gün boyunca 20 günlük dişi Crj:CD sıçanlarına i.v. 0, 100, 300, ve 1000 mg/kg/gün dozlarda BPF uygulanmıştır. Maruziyetin dişi Crj:CD sıçanlarında 10 günlük uygulama ile vücut ağırlığında anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı ancak uygulanan tüm dozlarda doz bağımlı olarak uterusun absolü ve rölatif ıslak ve kuru ağırlıklarını arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca, tüm dozlarda etinil estradiol ve tamoksifen ile birlikte BPF uygulamasının benzer şekilde tüm dozlarda doz bağımlı olarak uterusun absolü ve rölatif ıslak ve kuru ağırlıklarını arttırdığı belirlenmiştir (75). Yukarıda açıklanan iki çalışmada, sıçanlarda BPF'ye maruz kalmanın uterin büyümeye neden olduğu, dolayısıyla östrojenik aktivitenin de varlığını göstermektedir. Stroheker ve ark. (2003)'nın yaptığı çalışmada da aynı sonuçlara ulaşılmıştır. Bu  alışmada Crj:CD sıçanlar 4 gün boyunca oral yoldan 0, 25, 50, 100 ve 200 mg/kg/gün dozlarda BPF'ye maruz bırakılmıştır. BPF'nin ıslak uterus ağırlığını anlamlı olarak 100 ve 200 mg/kg vücut ağırlığı/gün uygulama ile, kuru uterus ağırlığını ise anlamlı olarak sadece 200 mg/kg/gün uygulama ile arttırdığı belirlenmiştir. Aynı  alışmada, BPA'nın uygulanan hiçbir dozda (25, 50, 100 ve 200 mg/kg/gün) kuru ve ıslak uterus ağırlıklarını artırmadığı bulunmuştur (76). Bir diğer çalışmada ise, 8 haftalık Crj:CD 10 erkek ve 10 dişi kullanılmış olup sıçanlar oral yoldan gavaj ile 28 gün boyunca 0, 20, 100, 500 mg/kg/gün dozlarda BPF'ye maruz bırakılmıştır. 500 mg/kg vücut ağırlığı/gün BPF uygulanan erkek sıçan grubunda maruziyetin 17. gününden itibaren kontrol grubuna göre vücut ağırlıklarında anlamlı azalma görülmeye başlanmış, dişi sıçanlarda ise aynı etki 12. günde başlamasına rağmen daha düşük dozda (100 mg/kg/gün) belirlenmiştir. Erkek hayvanlarda, 500 mg/kg vücut ağırlığı/gün uygulama ile T₃ ve T₄ hormonlarında düşüşler belirlenirken, bu etki dişilerde 20 ve 100 mg/kg/gün'de T₄ düzeylerinde azalma, 500 mg/kg vücut ağırlığı /gün de ise hem T₃ hem de T₄ düzeylerinde düşüş olarak belirlenmiştir. Erkek hayvanlarda karaciğer fonksiyon testlerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ancak rölatif karaciğer, tiroid ve beyin ağırlıkları 500 mg/kg vücut ağırlığı/gün uygulama ile anlamlı bir şekilde artmıştır. Dişilerde ise, 200 mg/kg vücut ağırlığı/gün'de rölatif böbrek ağırlığı, 500 mg/kg vücut ağırlığı/gün'de ise rölatif

karaciğer, böbrek ve beyin ağırlıklarında anlamlı artışlar görülmüştür. Erkek sıçanlarda glutamik-okzaloasetik transaminaz (GOT) ve γ -glutamil transpeptidaz (γ -GTP) aktiviteleri 500 mg/kg /gün dozda artarken, dişilerde aynı dozda sadece γ -GTP aktivitesi artmıştır. Erkek hayvanların yem tüketiminde 1-28. günler arasında en yüksek doz olan 500 mg/kg /gün'de azalma belirlenirken, dişi sıçanlarda yem tüketimindeki düşüş hem 100 mg/kg vücut ağırlığı/gün, hem de 500 mg/kg vücut ağırlığı/gün uygulamalarda belirlenmiştir (77).

2.6. Bisfenol S'in (BPS) Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bisfenol S (BPS, CAS 80-09-1; IUPAC adı: 4,4'-sülfonildifenol) bir sülfonil grubuyla bağlı iki hidroksifenil grubuna sahip organik bir bileşiktir. $C_{12}H_{10}O_4S$ kimyasal formülüne sahiptir. BPS'nin suda çözünürlüğü yoktur, az miktarda benzen ve dimetil sülfoksitte çözünür ayrıca etanol ve eterde çözünürlüğü vardır (7). BPS, BPA ile karşılaştırıldığında plastik matriksten ayrılmaya ve çevreye salınma dirençli olmasına rağmen plastik materyal teması ile doğrudan maruziyete yol açabilir ve potansiyel risk oluşturabilir. BPS de BPA gibi östrojen benzeri bir aktiviteye sahiptir (12).

2.6.1. Bisfenol S'nin Kullanım Alanları ve Maruziyet Yolları

Bisfenol S, son yıllarda sıklıkla kullanılan bir bisfenol türevidir. BPS yüksek ısıdaki stabilitesi ve güneş ışığına dirençli olmasından dolayı epoksi reçineleri, konserve kutuları, kutu içecekler, termal fatura kağıtları, hazır yemek kutuları, bromlu alev geciktiriciler, bagaj etiketleri, el ilanları ve gazete materyali olarak çeşitli endüstriyel ürünlerde kullanılmaktadır (11). Bu nedenle insanların günlük aktivitelerine dayalı olarak BPS'ye doğrudan maruz kalması kaçınılmazdır. Portekiz'de yapılan bir araştırmada teneke içeceklerde 7-170 ng/L arasındaki konsantrasyonlarda BPS'ye rastlanmıştır (29).

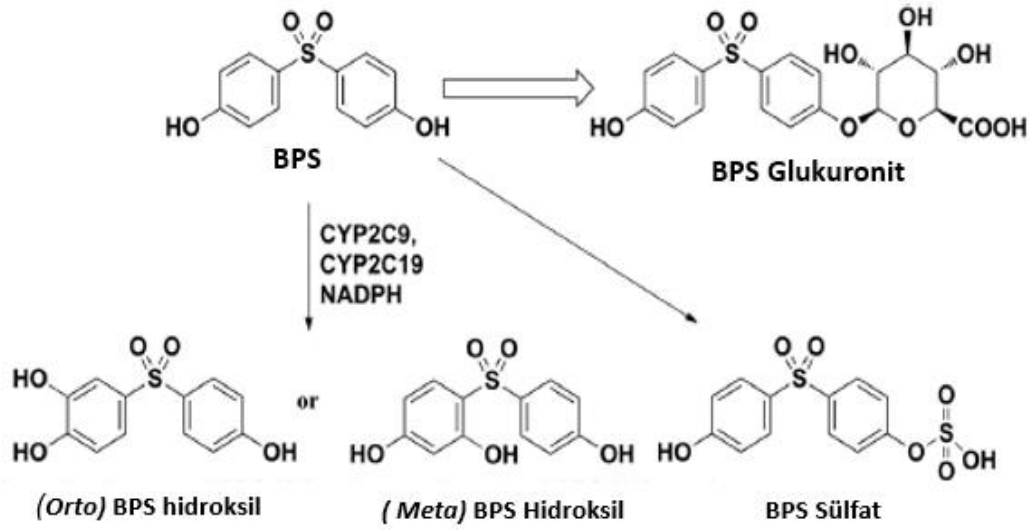
Günümüzde özellikle bebek biberonlarında BPA'nın yerine BPS tercih edilmektedir (23). BPS'nin tahmini günlük diyet alım miktarı erkekler için 9,55 ng/kg vücut ağırlığı/gün ve kadınlar için 9,56 ng/kg vücut ağırlığı/gün'dür (78). Kadın ve

erkeklerden alınan toplam 315 idrar numunesinin %81'inde ortalama 0,19 ng/ L konsantrasyonda BPS'ye rastlanmıştır (30). Ye ve ark. (2015)'nin yaptığı çalışmada 2000'den 2014'e kadar toplanan 616 idrar örneği BPS için analiz edilmiştir. Numunelerin çoğunda <0,1 µg/L ile 0,25 µg/L'lik aralıklarda BPS tespit edilmiştir. Ayrıca BPS'nin, 2009'dan 2014'e kadar alınan daha yeni örneklerde de tespit edilebilir miktarda bulunduğu görülmektedir. Bu veriler, insanların BPS'ye maruz kalma oranının arttığını açıkça göstermektedir (79).

Bisfenol S'ye maruz kalma obezite ve hepatik steatoz gibi farklı sağlık etkilerine neden olabilir (80). Yapılan araştırmalarda BPS'in özellikle çevresel sulara yoğun olarak dağıldığı tespit edilmiştir (81). Kienhuis ve ark. (2000)'nin yaptıkları araştırmada, nehir sularında 3 mg/L ye varan miktarlarda BPS tespit edilmiştir (82). BPS'nin çevredeki miktarlarının artması ve insan temasındaki belirgin artış nedeniyle, BPS'nin son yıllarda akut ve kronik toksik etkileri ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda artış olmuştur (30).

2.6.2. Bisfenol S'in Biyotransformasyonu

Karaciğer BPS'nin biyotransformasyonunun gerçekleştiği esas organdır. Ancak çok küçük bir kısmı da bağırsakta metabolize edilebilir. Faz I oksidatif yollar, BPS metabolizmasının az bir bölümünü temsil eder. "Metasite" yazılımı ile yapılan *in silico* veriler aşağıdaki Şekil 2.5.'de görüldüğü üzere BPS'nin fenol halkasının orto ve meta pozisyonlarında hidroksilasyonunun gerçekleşeceğini öngörmektedir (83). İnsan karaciğer mikrozomlarıyla yapılan bir *in vitro* çalışmada ana metabolitin orto hidroksillenmiş BPS olduğu belirlenmiştir. BPS uridin 5-difosfo-glukuronil transferaz 1A9 (UGT1A9) enzimi aracılığıyla glukuronidasyona uğrar (84). Le Fol ve ark. (2015) farklı insan ve zebra balığı modellerinde BPS'nin metabolizmasını *in vitro* olarak gerçekleştirdiklerinde, BPS'nin hem glukuronidasyona (%85,8) hem de sülfatasyona (%10,5) uğradığını belirlemişlerdir. Zebra balığında ise BPS glukuronid tespit edilen ana metabolittir. HepG2, MELN ve T47D-Kbluc insan meme kanseri hücre hatları kullanıldığında BPS-sülfatın baskın metabolit olduğu görülmüş, BPS-glukuronid ise zorlukla tespit edilebilmiştir (85).



Şekil 2.5. BPS'nin biyotransformasyonu (84).

2.6.3. Bisfenol S Toksisitesi

Yapılan çalışmalar, BPS'nin akut toksisite, genotoksisite ve östrojenik aktivite açısından BPA'ya benzer etkilere sahip olduğunu destekler niteliktedir (73, 86). Aşağıda BPS'nin toksik etkilerinin incelendiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar özetlenmiştir.

Bisfenol S ile Yapılan *In Vitro* Çalışmalar

Roelofs ve ark. (2015)'nin yaptığı çalışmada bisfenol analoglarının MA-10 Leydig ve maya hücrelerinde üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, BPS ve TBBPA'nın Leydig hücrelerinde steroid sentezi ve rekombinant maya hücrelerinde glukokortikoid (GR) ve androjenik reseptörlere (AR) antagonistik etkisi incelenmiştir. Araştırmanın sonuçlarına göre TBBPA ile testosteron sekresyonunda bir artış belirlenmesine rağmen BPS uygulaması ile anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. BPS maruziyeti sonucu MA-10 Leydig hücrelerinde steroid sentezinin başlangıcında progesteron seviyelerinin arttığı da saptanmıştır. BPS'nin TBBPA'nın aksine rekombinant maya hücrelerinde androjenik reseptörlere ve GR'lere antagonistik etkisinin olmadığı belirlenmiştir (87).

Feng ve ark. (2016), BPS de dahil olmak üzere farklı bisfenol türevlerinin (BPAF, BPA, BPF) insan adrenokortikal karsinoma hattında (H295R) steroidegenез yolağında meydana getirebilecekleri olası endokrin bozucu etkilerini ve hücre toksisitesini araştırmışlardır. Çalışmada 10-500 mM konsantrasyonlarda BPA, BPF, BPS ve BPAF 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde hücrelere uygulanmış, 72 saat sonunda letal konsantrasyon (LC₅₀) belirlenerek hücre canlılığı ve steroid hormon sentezi değerleri ölçülmüştür. Sonuçlar sitotoksitenin, doz ve süre bağımlı olduğunu göstermiştir. BPAF'nin, sırasıyla 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca uygulama ile 200 mM'de %16,1, %3,9 ve %0 hücre canlılığı oluşturduğu belirlenmiştir. Sitotoksite potansiyeli açısından BPAF'yi sırasıyla 24 saat, 48 saat ve 72 saat süresince 200 mM'de %60,2, %22,2 ve %13,8 hücre canlılığı oluşturmasıyla BPA izlemiştir. BPS'nin ise, BPA'dan daha az sitotoksik olduğu bulunmuştur ve 200 mM BPS maruziyeti sonucunda 24, 48 ve 72 saat süreyle hücre canlılığı %62,6, %32,6 ve %33,3 olarak bulunmuştur. Hücreler BPF'ye 24 saat boyunca 200 mM konsantrasyonda maruz bırakıldığında dahi sitotoksite gözlenmemiştir. 72 saat sonrasında uygulanan maddelerin sitotoksiteleri şu şekilde sıralanmıştır: BPAF> BPA> BPS> BPF. Diğer taraftan, kortizol sentezinde de doz bağımlı bir azalma görülmüştür. BPS'nin 30, 50 ve 70 µM konsantrasyonda hücrelere uygulanması ile kortizol biyosentezinde sırasıyla %55, %71,7 ve %79'luk bir düşüş saptanmıştır. Ayrıca 30, 50 ve 70 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonucu kortizol düzeyleri sırasıyla %32, %53,6 ve %68 oranında azalmıştır. BPS uygulaması ile testosteron üretimindeki azalma 1-70 µM arasındaki konsantrasyonlarda incelenmiş; 1 mM konsantrasyonda %34,0 oranında azalma görülürken, 70 mM konsantrasyonda bu azalma %86,6 olarak belirlenmiştir (88).

Daha önce BPA ile yapılan çalışmalarda, BPA'nın bir metabolik sendrom göstergesi olan alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması (NAFLD) tetikleyebileceği bulunmuştur. NAFLD, karaciğerdeki yağ miktarını artması, koagülasyon faktörlerinin değişmesi, glikoz üretiminin artması ve inflamasyon biyogöstergelerinin artmasıyla karakterize metabolik bir hastalıktır. İlginç olarak BPA maruziyetinin farelerde lipid sentezinde bozukluklara sebep olduğu, vücut ağırlığında artışa ve insülin sekresyonunda bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (89). Huc ve ark. (2012)

yaptığı çalışmada, BPA'nın HepG2 hücrelerinde lipit metabolizmasını düzensizliklere ve inflamasyona sebep olarak steatosizin gelişimine zemin hazırladığı görülmüştür (90).

Yukarıda da özetlenen ve burada da BPS ile ilgili detayları verilecek olan Peyre ve ark. (2014)'nin yaptığı bir çalışmada BPA ve BPS'nin HepG2 ve HepG2/PXR hücreleri üzerindeki toksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak DES kullanılmıştır. PXR, NAFLD'ye yol açan süreci daha iyi anlamak için, bir ksenobiyotik sensör görevi gören ve ksenobiyotik metabolizmanın düzenlenmesini koordine eden nükleer hormon reseptörüdür. 72 saat süreyle 1 pM ile 50 µM arasındaki konsantrasyonlarda normal hücre yapısında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. 100 µM BPA ve BPS uygulamaları ile hem HepG2 hem de HepG2/PXR hücrelerinde normal hücre sayısında bir azalma olduğu görülmüştür. 72 saatin sonunda hücre canlılığında en anlamlı düşüş BPA'ya maruz bırakılan hücrelerde olmuştur. BPA ve BPS'nin kronik toksisitesini belirlemek için hücreler 2 haftadan daha uzun süreyle BPA ve BPS'ye maruz bırakıldığında ise, hücre yoğunluğunda anlamlı bir azalma görülmemiştir. Bisfenol türevlerinin hücreler üzerinde oluşturdukları toksik etkilerin 100 µM sonra görülmeye başladığı bildirilmiştir. 250 µM BPS uygulanmasından sonra 9 günden 3 haftaya kadar geçen sürede hücre sayısında sabit oranda bir azalma gözlenmiş olup, 3 hafta sonunda hücre canlılığı %20 olarak bulunmuştur. BPA ve DES ile BPS'nin PXR transaktivasyon potansiyeli karşılaştırıldığında BPA'nın, test edilen üç molekül arasında (DES, BPA ve BPS) en güçlü PXR agonisti olarak görülebileceğini, buna karşılık Sui ve ark. (2012) tarafından daha önce de belirtildiği üzere, BPS'nin bu reseptörü önemli ölçüde aktive etmediği görülmüştür (91). Ayrıca, BPA ve BPS'nin daha önce steatoz üzerinde yapılan hem *in vitro* (90) hem de *in vivo* (89) çalışmalardan elde edilen verilerle uyumlu olarak doza bağımlı bir şekilde lipit birikimine yol açtıkları tespit edilmiştir (56).

Héliès-Toussaint ve ark. (2014)'nin HepG2 ve fare adiposit hücreleri (3T3-L1) ile yaptıkları bir çalışmada düşük dozlardaki BPS'nin sitotoksikite, protein miktarı, glikoz alımı, lipit metabolizması, lipit birikimi ve diğer endokrin işlevler üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu etkiler BPA'nın etkileri ile karşılaştırılmıştır. Pozitif kontrol

olarak DES kullanılmıştır. 1 mM, 1 nM, 1 μ M ve 1 fM BPS ve BPA içeren medyumlarda HepG2 hücreleri 4 gün boyunca; 3T3-L1 hücreleri ise 10 gün boyunca inkübe edilmiştir. 4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile sitotoksosite belirlenmiş ve sonuçta 0,1 mM BPS ve BPA'nın hücre canlılığında %60 azalmaya sebep olduğu bulunmuştur. LipidTOX boyama ile bisfenollerin lipit birikimi üzerine etkileri incelenmiştir. Buna göre artan dozlarda bisfenollerin uygulanması sonucu her iki hücre tipinde de intraselüler trigliserit üretiminin indüklenerek yaklaşık %10'luk artış gösterdiği belirlenmiştir. BPA, her artan konsanstrasyonda intraselüler lipit miktarını 1,35 kat artırırken, BPS sadece 1 nM ve 1 μ M konsanstrasyonlarda 1,4 kat artırmıştır. Adipositlerde depolanan trigliserit miktarı depolanan ve hücreden serbest bırakılan trigliserit kapasitesine bağlıdır. Salım, lipoliz ile gerçekleşir ve hücresel ortamdaki gliserol salımı adipolizin derecesini gösterir. Her iki bisfenolün de 10 günün sonunda, 50 nM insülin varlığında düşük konsantrasyonlarda [BPA (1 μ M) ve BPS (1 μ M)] ile -L1 hücrelerinde lipolizi önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. BPS sadece 3T3-L1 hücrelerinde glikoz alımını doza bağlı olarak artırmıştır; BPS'nin aksine BPA'nın glikoz alımını önemli ölçüde arttırmadığı görülmüştür. Leptin üretimi açısından incelendiğinde, BPS'nin 3T3-L1 hücrelerinde yüksek oranda leptin salımına neden olduğu (%200), BPA'nın ise kontrol grubuna göre önemli bir artışa neden olmadığı saptanmıştır. BPS'nin 1pM konsantrasyonda enerji dengesini düzenleyen genler üzerinde de etkisinin olduğu, peroksizom prolifer edici aktive reseptör g (PPAR γ) koaktivatör α (PGC-1 α) genini upregüle ettiği belirlenmiştir. BPA'nın ise benzer bir etkisi görülmemiştir. BPA'nın, ER α ve ER γ ekspresyonlarını arttırdığı, BPS'nin ise bu reseptörlerin ekspresyonlarını azalttığı tespit edilmiştir. Bisfenollerin HepG2 hücrelerinde lipit homeostazı üzerine etkileri incelendiğinde ise, her iki bisfenol türevinin de hepatositlerde trigliserit birikimine yol açtığı, düşük doz BPS'nin glikoz alımını indüklerken, BPA'nın böyle bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Yapılan çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, BPS ve BPA'nın obezite ve steatozisde farklı mekanizmalarla etkili olabileceği belirtilmiştir. BPS ve BPA'nın adipositlerdeki gen ekspresyonları üzerindeki etkilerini incelemek için adiposit farklılaşmasının düzenlenmesinde yer alan farklı transkripsiyon faktörleri ölçülmüştür. Bisfenol

türevlerinin erken farklılık genlerinden olan sterol regülatör elemanı-bağlayıcı transkripsiyon faktörü 1c (SREBP-1c), PPAR γ 2 ve adipocyte protein 2 (aP2) genleri] ile farklılaşmasının sonraki basamaklarında yer alan lipoprotein lipaz (LPL), hormona duyarlı lipaz (LHS) ve yağlı asit sentaz (FAS) üzerindeki etkileri incelendiğinde, BPS'nin LPL, LHS ve FAS üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı, BPA'nın ise erken dönemde hafif düzeyde bu genlerin transkripsiyonu artırdığı görülmüştür (80).

Bisfenol S ile Yapılan Hayvan Çalışmaları

Literatürde BPS ile ilgili az sayıda *in vivo* çalışma ve BPS'nin endokrin sistem üzerindeki etkileri hakkında oldukça az sayıda veri bulunmaktadır. Balıkların erken yaşam dönemlerinde endokrin bozucuların en düşük konsantrasyonlarına karşı bile savunmasız oldukları bilinmektedir. Bu nedenle *in vivo* çalışmalarda sıklıkla yavru zebra balıkları kullanılmaktadır (92). Bu aşamada, endojen hormonların (özellikle de steroid ve tiroid hormonları) küçük konsantrasyonları bile cinsiyet farklılaşması, metabolizma, embriyolojik büyüme ve gelişim ve osmoregülasyonda önemli rol oynamaktadır (93). Vajda and Norris (2011), endokrin bozucu kimyasal maddelere yaşamın erken dönemlerinde maruziyetin hormonal dengede değişimlere neden olduğu ve yaşamın ilerleyen dönemlerinde cinsiyet gelişiminde bozukluklar meydana getirebileceğini öne sürmüştür (94). Yakın tarihli bir çalışmada, BPS'nin cinsiyet steroid hormonu dengesini ve yetişkin zebra balığının normal üremesini bozabileceği gösterilmiştir (95).

Zebra balığı ile ilgili yapılan bir başka çalışmada, BPS maruziyetinin testosteron, estradiol ve vitellogenin konsantrasyonlarını değiştirdiğini ve üreme bozukluğuna neden olduğunu (örneğin; yumurta üretiminde azalma, kuluçka zamanı artışı ve sperm sayısını azaltma) göstermiştir. Ayrıca F₀ jenerasyonunda hayatta kalma oranı, cinsiyet oranı, plazma vitellogenin, hepatosomatik indeks gibi yavruların üreme yeteneğiyle ilgili veriler de incelenmiştir. Vitellogenin erkek balıkların plazmasında normalde çok düşük düzeyde bulunmaktadır (96).

Naderi ve ark. (2014) 'nın yaptığı çalışmada zebra balığının yaşam boyu BPS'ye farklı konsantrasyonlarda maruziyeti sonucu steroid ve tiroid hormonlarındaki değişim ile üreme potansiyeli etkileri incelenmiştir. Yabani tip olgun dişi ve erkek zebra balıkları 4-5 aylık iken satın alınmış ve deneyden önce daha önce Shi ve ark. (2008) (97) tarafından tanımlanan protokollere göre 14 saat aydınlık ve 10 saatlik karanlık bir ışık periyoduyla $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 2 hafta süresince beslenmiştir. Fertilizasyon sonrasında (dpf) elde edilen embriyolar 2 saat sonra toplanıp, yıkanmış ve bir stereomikroskop altında incelenmiştir. Normal gelişen ve blastula evresinde ulaşan embriyolar seçilerek bir sonraki deneyler için birkaç petri kabına bölünmüş ve 2 gün boyunca beslenmiştir (97). Ortalama 700 embriyo 0, 0,1, 1, 10 ve 100 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonda BPS içeren su içeren tanklarında 75 gün boyunca tutulmuşlardır. Bu süre zarfında ölü yumurta ve larvalar çıkarılmıştır. 75 günlük maruziyet süresinin sonunda dişi ve erkek balıklar cinsiyetlerine göre ayrılmış, ayrılan erkek ve dişi balıklar 2 hafta boyunca temiz suda bakılmıştır. Bundan sonra aynı şekilde muamele gören erkek ve dişi zebra balıkları rastgele yumurtlama tanklarına atanmıştır ve 7 günün sonunda her bir konsantrasyon grubunun yumurtaları toplanarak sayılmıştır. Her yumurtlama tankı için 3 tekrar yapılmıştır. Aynı zamanda balıkların gonad, karaciğer ve vücut ağırlıkları tartılmış ve vücut uzunlukları ölçülmüştür. 17β -estradiol, testosteron, T3 ve T4 değerleri enzim bağımlı immünosorbent yöntem (ELISA) ile ölçülmüştür. BPS'nin yüksek dozlarında (100 mg/L) mortalitede artış görülmüş, BPS'nin boy uzunluğu, vücut ağırlığı ve hepatosomatik indeksi etkilediği saptanmıştır. Erkek balıkların boylarının dişi balıklara göre daha kısa olduğu ve 100 mg/L BPS'e maruz bırakılan balıklarda yüksek oranda boy kısalığı meydana geldiği belirlenmiştir. Vücut ağırlığının ise doz artışından belirgin bir şekilde etkilenmediği, ancak erkek balıkların daha az ağırlığa sahip oldukları görülmüştür. Erkeklerde kontrol grubuna göre testosteron değerlerinde önemli oranda düşüş görülmüştür. Hepatosomatik indeksin dişilerde doz bağımlı olarak yükseldiği; erkeklerde ise 100 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyon grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, plazma tiroid hormon seviyeleri (T_3 ve T_4) ve cinsiyet arasında belirgin bir ilişki olduğu görülmüştür. Erkeklerde önemli oranlarda düştüğü görülürken, dişilerde anlamlı bir

değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Plazma estradiol düzeylerine bakıldığında ise hem erkek hem de dişilerde doz bağımlı olarak estradiol düzeylerinin arttığı görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda, balıklarda embriyo veya larva dönemlerinde düşük dozlarda bile maruziyette BPS'nin östrojeni taklit ederek yaşamlarının daha sonraki evrelerinde fizyolojik bozukluklara yol açabileceği; gelişimsel toksisiteye, hormonal dengesizliğe ve üreme bozukluklarına neden olabileceği belirtilmiştir (95, 98).

Chen ve ark. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, BPA ve diğer bisfenol türevlerinin su piresi üzerindeki akut toksik etkileri araştırılmıştır. Su piresi yavruları 2 gün süreyle BPA ve türevlerine maruz bırakılmıştır. BPA'nın 24 ve 48 saatlik maruziyetteki EC_{50} değerleri sırasıyla 24 mg/L ve 10 mg/L iken, BPS için EC_{50} değerlerinin aynı sürelerde sırasıyla 76 mg/L ve 55 mg/L olduğu ve BPS'in akut toksik etkisinin BPA'ya oranla çok daha düşük olduğu gösterilmiştir (73).

Ji ve ark. (2013) ise BPS'ye maruz bırakılan zebra balıkları ile çalışmışlardır ve gonad ağırlığı, plazma östrojen ve testosteron düzeyleri ve üreme sistemindeki değişiklikleri (yumurta üretiminde ve yumurtadan çıkmada azalma, kuluçka zamanı artışı ve embriyo malformasyonlarında artış) incelemişlerdir. Erkek ve dişi zebra balıkları 16 saat aydınlık, 8 saatlik karanlık bir ışık periyodu altında $25\pm1^{\circ}C$ 'de 21 gün süreyle 0,5, 5 veya 50 $\mu g/L$ BPS içeren akvaryumlarda tutulmuşlardır. Kontrol grubu olarak 4 erkek ve 6 dişi zebra balığı test maddesi içermeyen başka bir test akvaryumuna yerleştirilmiş ve fertilizasyon sonucu oluşan yumurtalar sayılarak toplanmıştır. Her balık için toplam ağırlık, hepatosomatik indeks ($HSI= 100 \times \text{karaciğer ağırlığı}/\text{vücut ağırlığı}$), beyin somatik indeksi ($BSI=100 \times \text{beyin ağırlığı}/\text{vücut ağırlığı}$) ve gonad ağırlıkları hesaplanmıştır. Gonad ağırlığı hem dişi hem erkek zebra balıklarında 50 $\mu g/L$ ve $\geq 0,5 \mu g/L$ BPS konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmıştır (erkeklerde $\beta = -0,513$; dişilerde $\beta = -0,762$, $p < 0,05$). Karaciğer veya beyin ağırlığında vücut ağırlığına göre herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Hormon sonuçlarına bakıldığında ise 17- β -estradiol plazma konsantrasyonları hem dişi hem erkek balıklar sırasıyla $\geq 0,5 \mu g/L$ ve 50 $\mu g/L$ BPS'ye maruz bırakıldığında anlamlı şekilde artmıştır. Testosteron seviyeleri erkek balıklarda önemli derecede düşerken,

dişilerde herhangi bir değişim saptanmamıştır. 17 β -estradiol/testosteron oranlarına bakıldığında ise, hem erkek hem de dişilerde önemli derecede artış gözlenmiştir (95).

Kinch ve ark. (2015)'nin embriyonik zebra balıkları ile yaptıkları çalışmada, zebra balıklarının 0,0068 μ M (insanın günlük maruz kaldığı dozun 1000 kat altı) konsantrasyonda BPS'ye 0-5 gün arası maruziyeti sonucu hipotalamik nöroenezde normal gelişim sürecinden önce gelişim ve hiperaktif davranışlar meydana geldiği gözlenmiştir (99).

Yamasaki ve ark. (2003) yaptığı çalışmada sıçanlarda doğum sonrası 0,6 μ g/kg konsantrasyonlarda 3 gün süreyle uygulanan BPS'nin, uterus büyümesine neden olduğunu bulunmuştur. Araştırmacılar ayrıca BPS'nin %0,0055 bağıl bağlanma afinitesinde ER'lere bağlandığını belirlemişlerdir (74).

Bisfenol S ile Yapılan İnsan Çalışmaları

Liao ve ark. (2012) tarafından yapılan bir araştırmada, Amerika ve Asya ülkelerinde yaşayan popülasyonun %81'nin idrar örneklerinde serbest ve konjuge yapıda BPS bulunduğu tespit edilmesinin ardından Amerika Bileşik Devletleri ve Çin, Hindistan, Malezya, Japonya, Kore, Kuveyt ve Vietnam dahil olmak üzere 7 Asya ülkesinden toplam 315 idrar örneği toplanmış ve ölçülen idrar konsantrasyonlarına göre potansiyel BPS maruziyet değerleri hesaplanmıştır. Buna göre ortalama günlük BPS maruziyeti 0,930 mg/gün olarak bulunmuştur (23). İdrarda en yüksek düzeyde BPS bulunan ülke Japonya (1,18 ng/mL, 0,933 μ g/g kreatinin) olmuş ve Japonya'yı Amerika Birleşik Devletleri (0,299 ng/mL, 0,304 μ g/g kreatinin), Çin (0,226 ng/mL, 0,223 μ g/g kreatinin), Kuveyt (0,172 ng/mL, 0,126 μ g/g kreatinin) ve Vietnam (0.160 ng/mL, 0.148 μ g/g kreatinin) olmuştur. Ye ve ark. (2014)'nin yaptıkları benzer bir çalışmada, 2000-2014 yılları arasında 616 yetişkin gönüllüden idrar örnekleri toplanmıştır ve toplanan idrar örneklerinde BPS konsantrasyonlarının geometrik ortalamaları hesaplanmış ve konsantrasyonun 2010-2014 yılları arasında artma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. 2000 yılında bireylerin ortalama %25'nin idrarında BPS saptanırken, 2014 yılında bu oran %75'e çıkmıştır. BPS'in idrardaki konsantrasyon

artışının nedeni olarak son yıllarda BPA'ya alternatif olarak kullanımından kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır (100).

2.7. Oksidatif Stres

Serbest radikaller reaktif ve kısa ömürlü olup normal metabolizma süresince veya hücrenin enerji üretimi sırasında ortaya çıkan reaktif atom veya moleküldür. Dış orbitallerinde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulundurlar. Bu nedenle diğer moleküllerle, biyolojik makro ve mikromoleküllerle kolaylıkla reaksiyona girebilirler (101).

Bu radikallerden en önemlileri ROS ve reaktif azot türleri (RNS)'dir. ROS'un en iyi bilinen örnekleri olarak süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), alkoksil radikali ($RO^{\cdot}$) ve peroksi radikali ($ROO^{\cdot}$) verilebilir (Tablo 2.1.). Ancak, daha az reaktif ve daha kararlı olan ve yine oksijen ve azot merkezli bazı moleküllerinde (non-radikaller) bazı oksidasyon reaksiyonlarına girebildiği de bilinmektedir (102).

Tablo 2.1. Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri.

REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)	
Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen Peroksit H_2O_2
Hidroksil $OH^{\cdot}$	Hipokloröz Asit $HOCl$
Peroksil $ROO^{\cdot}$	Hipobromöz Asit $HOBr$
Hidroperoksil $H_2O_2^{\cdot}$	Singlet Oksijen $^1O_2$
Alkoksil $RO^{\cdot}$	Ozon O_3
Lipit peroksil $LOO^{\cdot}$	
REAKTİF AZOT TÜRLERİ (RNS)	
Nitrik Oksit $NO^{\cdot}$	Nitrik Asit HNO_2
Nitrojen Dioksit $NO_2^{\cdot}$	Nitroksil Katyonu NO^+
	Nitroksil Anyonu NO^-
	Dinitrojen tetroksit N_2O_4
	Peroksinitrit $ONOO^{\cdot}$
	Nitronyum Katyonu NO_2^+

Organizmadaki serbest radikaller hem endojen hem ekzojen kaynaklar tarafından meydana getirilebilir. Başlıca oluşum mekanizmaları aşağıda sıralanmıştır: (103)

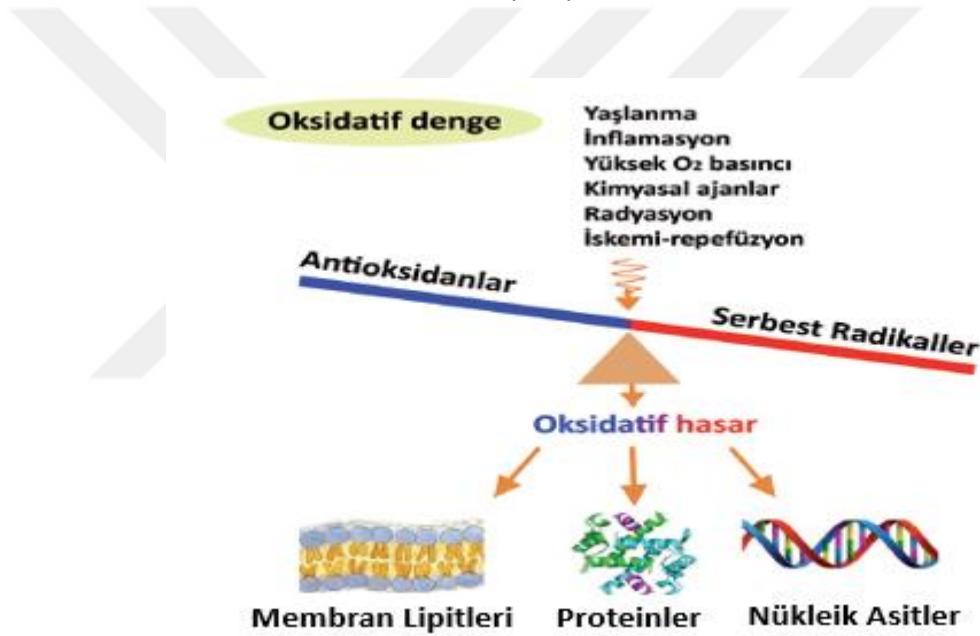
1. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün dış orabitalinde ortaklanmamış elektron kalması sonucu radikal formu meydana gelir.
2. Kovalan bağların homolitik bölünmesi: Kovalan bağlı molekülün, bölünme sonrasında her bir parçasında ortak elektronlardan biri kalır.
3. Normal bir moleküle elektron transferi: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün tek elektron transferi sonucu dış orbitaline eşleşmemiş elektron taşınır ve oluşan yeni molekül reaktif özellik gösterir (104).

Reaktif oksijen türleri, canlı organizmalar tarafından normal hücre metabolizması ve hava kirleticileri veya sigara dumanı gibi çevresel faktörlerin bir sonucu olarak üretilir ve oldukça reaktif moleküllerdir, karbonhidrat, nükleik asit, lipit ve proteinler gibi hücredeki makromoleküllerin yapılarına zarar verebilir ve işlevlerini değiştirebilir. Homeostaz surumunda vücutta oksidan ve antioksidanlar bir denge surumundadır. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengede oksidanlar lehine değişiklik "oksidatif stres" olarak adlandırılır. Oksidatif stres, ROS üretimi ile antioksidan savunmalar arasındaki dengede bir bozukluk olarak tanımlanır. Hücredeki redoks dengesinin düzenlenmesi, hücrenin canlılığı, işlevselliği, proliferasyonu ve doku ve organların sağlıklı bir şekilde çalışabilmesi için kritik öneme sahiptir (105).

Hücre hasarı ve hücreyi ölüme kadar götüren olaylardan sorumlu mekanizmalar çok kompleks olmakla birlikte fiziksel, kimyasal, enfeksiyöz, immünolojik ve nütrisyonel faktörlerle oluşabilir. Ayrıca yaşlanma, inflamasyon, iskemi-reperfüzyon ve yüksek oksijen basıncı da ROS oluşumunu ve takiben hücre hasarını tetikleyebilir. Oluşan hasara göre hücre başta apoptoz, nekroz ve otofaji gibi mekanizmalar olmak üzere ölüme gider. Belirli doku ve organlarda yüksek miktarda hücre ölmü bu doku veya organın hasarı ve işlevselliğini yitirmesi ile sonuçlanır (106). Oksidatif stres ve etkenleri Şekil 2.6.'da gösterilmiştir.

Oksidatif stres, genelde oksidatif DNA hasarının göstergesi olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinin belirlenmesi; lipit peroksidasyonun ölçümü [örneğin; MDA düzeylerinin belirlenmesi]; protein oksidasyonunun belirlenmesi (örneğin; protein karbonil düzeylerinin ölçümü); GPx, SOD, CAT, GR, GST gibi antioksidan enzimlerin aktivite ve/veya protein düzeylerinin belirlenmesi; glutatyon ve tiyol düzeylerinin belirlenmesi; hücre içi askorbik asit, ubikinon, α -tokoferol gibi antioksidan moleküllerinin düzeylerinin ölçümü yardımıyla belirlenir (107).

Reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu oksidasyon reaksiyonlarını stabilize eden ve/veya önleyen ve organizmayı ROS kaynaklı hasarlarına karşı koruyan maddelere "antioksidan" adı verilir (108).



Şekil 2.6. Oksidatif stres ve etkenleri

2.7.1. Oksidatif Stresin Hücresel Düzeyde Etkisi

Reaktif oksijen türleri, hücre içerisinde genellikle ekzojen ve endojen etmenler nedeniyle artabilir ve oksidatif stres ortaya çıkabilir. Ayrıca, antioksidanların çeşitli etkenlere bağlı olarak azalması sonucu hücre içi oksidatif denge bozulur (109). Oksidatif dengenin bozulması başta membran lipitleri olmak üzere hücredeki karbonhidatlar, proteinler ve DNA'da önemli hasarlara; hatta hücre ölümüne sebep olabilir. Hücre türüne, maruz kalınan stresin çeşidine, şiddetine ve süresine bağlı

olarak toksik, mutajenik veya karsinojenik etki görülebilir (110). Çok sayıda veri kanserin ilerlemesine neden olan bileşiklerin etkilerini ROS üreten kaynakları aktive ederek ya da doğrudan ROS oluşumuna neden olarak gösterdiklerini doğrulamaktadır (111). ROS'un kanser dışında da birçok hastalıkta etkili oldukları bilinmektedir. Bunların başında nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı) gelmektedir (112). Astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve aterosklerozda da ROS üretimi ve uzaklaştırılması arasındaki dengesizliğin önemli bir neden olduğu gösterilmiştir (113).

2.7.2. Lipitler Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin başlıca zararlı etkileri membran lipitleri üzerinde görülür (103). ROS, hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile kolaylıkla reaksiyona girerek peroksidasyona neden olur (104). Hücredeki yağ asitlerinin ROS ile bir zincir reaksiyonuna girdikten sonra, okside olup oksidatif degradasyona uğramasına "lipit peroksidasyon" adı verilir. Bunun sonucunda membran akışkanlığında bozulma ve hücrenin diğer iyonlara karşı geçirgenliğinde değişiklikler meydana gelir (114). Tüm bu olaylar hücre membranı yapısının ve fonksiyonunun zayıflamasına veya hücrelerde canlılık kaybına neden olur (115). Bu zincir reaksiyonlar daha sonra protein oksidasyonuna da neden olabilir. Ancak, protein oksidasyonu tek başına da ortaya çıkabilen bir durumdur. Esterbauer ve ark. (1990) yaptıkları çalışmalar sonucunda, lipit peroksidasyonu sonucu ikincil olarak oluşan akrolein, sirotonaldehit, MDA ve 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) gibi aldehit yapısında ürünler meydana geldiğini göstermişlerdir. Bu ikincil ürünler hücre membranından sızma ve hücre ölümüne kadar giden bir dizi reaksiyon gerçekleştirmektedirler. Bu olayın altında yatan mekanizmanın iki veya daha fazla çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asitlerinden prostoglandin-benzeri endoperoksitlerin oluşmasını olduğu ileri sürülmektedir (116, 117). MDA, hücre membranlarının permeabilitesini değiştirerek iyon alışverişinin normal işleyişini bozduğu için hücre H⁺ iyonlarına karşı daha geçirgen hale gelir. Bunun sonucunda membran bütünlüğünün bozulur, lize olur ve hücre içeriği ile organellerin dışarıya salınması durumu ortaya

çıkabilir (118). Sonuç olarak hücre hasarı veya hücre ölümü meydana gelir (119). Birçok araştırma lipid peroksidasyonunun başta inflamasyon olmak üzere kanser, nörodejeneratif hastalıklar, böbrek fonksiyon bozuklukları gibi birçok önemli hastalığa neden olabileceğini göstermiştir (104).

2.7.3. Proteinler Üzerine Etkileri

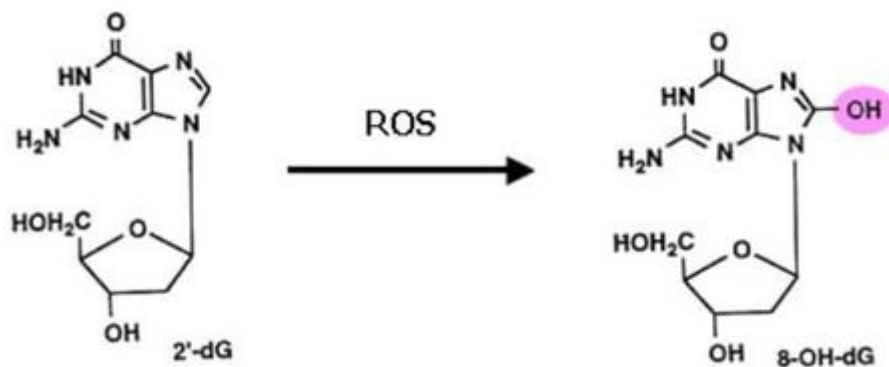
Proteinlerin serbest radikallerin zararlarından etkilenme derecesi, proteinin aminoasit yapısına bağlıdır. Fenil alanin, histidin, metionin, triptofan, tirozin ve metionin gibi aminoasitlerin reaktivitesi daha yüksek olduğundan serbest radikallerin zararlı etkilerinden daha kolay etkilenirler (110). Oksidatif strese bağlı olarak meydana gelen ROS hücredeki proteinler üzerinde çeşitli oksidatif değişikliklere ve bunun sonucunda oksidatif hasara neden olur; bu hasar geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olabilir (120). Protein yapılarının oksidatif modifikasyonlar sonucu değişmesi başta hücre iskeletini oluşturan proteinlerde ve hücrenin yaşamsal fonksiyonunu devam ettiren enzimlerde yapısal ve işlevsel değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler birçok hastalığın [Alzheimer hastalığı, amiotrofik lateral skleroz (ALS), katarakt, kronik hepatit, kistik fibrozis, diyabet, inflamatuvar barsak hastalığı, juvenil kronik artrit, romatoid artrit, üremi, varikosel gibi] patogenezinin sorumludur veya birçok hastalığın sonucunda ortaya çıkabilir (121). Proteinlerde ROS ile oluşan primer değişikliklerden biri karbonil gruplarının oluşumudur ve bu gruplarının miktarının spektrofotometrik veya spektrofotometrik olarak belirlenmesiyle protein oksidasyon düzeylerinin ölçümü gerçekleştirilebilir (110).

2.7.4. DNA Üzerine Etkileri

Güneş ışınları (UV-A, UV-B), iyonize radyasyon, termal etki, endüstriyel kimyasal maddeler gibi ekzojen faktörlerin etkisiyle veya endojen prosesler sonucu DNA’da ortaya çıkabilen istenmeyen değişikliklere “DNA hasarı” adı verilir. Bu hasar alkilasyon, hidroliz, katım ürünü eklenmesi, bazların yanlış düzenlenmesi (mismatch) veya çapraz bağlanma (cross-link) gibi mekanizmalarla ortaya çıkabilir. ROS da DNA’da hasar oluşturabilir. Bu hasar ‘oksidatif DNA hasarı’ olarak adlandırılır. DNA’da

görülen oksidatif hasar DNA yapısındaki bazları, şekerleri veya nükleotidlerini etkileyebilir. Oluşan DNA hasarı ise “DNA onarım prosesleri” ile onarılır. Ancak, bazı durumlarda DNA’da gerçekleşen oksidatif hasar onarılamaz. Özellikle son derece reaktif bir bileşik olan hidroksil radikali DNA’daki guanin molekülünün oksidasyonuna neden olur ve oksidatif baz hasarına (örneğin; 8-OHdG) yol açabilir. 8-OHdG DNA baz lezyonları arasında en sık rastlanılan baz hasarıdır ve plazma, doku ve idrarda DNA hasarının bir biyogöstergesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (122). Örneğin, meme kansinomalarda 8-OHdG’nin meme tümör dokularında normal meme dokusuna oranla 8-17 kat arttığı belirtilmektedir. Ayrıca akut lenfoblastik lösemi, kolorektal kanser, ileri düzeyde servikal displazi, renal hücre kansinoması, birçok akciğer kanseri tipi, gastrik intestinal metaplazi ve gastrik adenokarsinomalarda idrar veya tümör dokusundaki 8-OHdG düzeylerinin yükseldiği rapor edilmiştir. ROS’un etkisiyle oluşan 8-OHdG’nin yapısı Şekil 2.7.’de gösterilmiştir.

Hidroksil radikali DNA ile etkileşerek tümör süpresör genlerin inaktivasyonuna, nokta mutasyonlarına yol açarak onkogenlerin aktivasyonuna ve DNA onarımı ile genleri etkileyerek DNA hasarının onarımının önlenmesine neden olur. Tüm bu olumsuz etkiler mutajenisite, karsinojenisite ve prematür yaşlanmaya dek giden sonuçlar doğurabilir (111, 123, 124).



Şekil 2.7. ROS’un etkisiyle oluşan 8-OHdG’nin yapısı

2.8. Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücreler, serbest radikal saldırısından sonra DNA'yı onarabilen, hasar gören proteinleri yıkabilen ve lipid hidroperoksitleri metabolize edebilen savunma sistemleri içerir. Antioksidanlar, oksidanlara göre düşük konsantrasyonlarda bulunduğu, ilgili oksidan ile gerçekleştirilen oksidasyonu geciktiren veya önleyen maddelerdir. Antioksidanlar biyolojik olarak önemli reaktif türlerini temizleyerek (scavenger), oluşumlarını önleyerek veya yaptıkları hasarı onararak etki gösterirler. ROS, hücrelerin normal işlevleri esnasında da sürekli meydana gelebildiği için antioksidan savunma mekanizmaları tarafından sürekli olarak bertaraf edilmesi gerekmektedir (115).

Etki mekanizmalarına göre antioksidanlar 2'ye ayrılırlar:

1. Enzimatik antioksidanlar: Oluşan serbest radikallerle reaksiyona girerek daha zararlı formlara dönüşmelerini engellerler ve hücrede yeni serbest radikal oluşumunun önüne geçerler. Bu enzimler serbest radikallerin lipid, protein ve DNA gibi hücresel yapılara zarar vermesini engellemek için herhangi bir hücresel bölgeden diğerine geçişi engeller. Birincil antioksidan enzimlere örnek olarak GPx, SOD ve CAT gibi hücresel enzimler örnek olarak verilebilir (125). Bazı antioksidan enzimlerin normal fonksiyonları için çinko, bakır ve selenyum gibi eser elementlere ihtiyaç vardır (126).
2. Non-enzimatik antioksidanlar: Oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran başlıcaları ise GSH, askorbik asit (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), betakaroten, koenzim Q10 (Co Q10), ürik asit, polifenoller ve melatonindir (127).

Biyolojik sistemlerde yer alan enzimatik antioksidan yapılar, rolleri ve özellikleri aşağıda Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

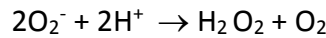
Tablo 2.2. Biyolojik sistemlerde yer alan enzimatik antioksidan yapılar, rolleri ve özellikleri.

Antioksidan Enzimler	Rolü	Özellikleri
Süperoksit Dismutaz (SOD)	- Hücreyi süperoksit radikallerinden koruyan ana enzimdir. - Oksidatif strese karşı savunmanın ilk basamağını oluşturur.	- Manganez içerir (Mn-SOD) - Bakır ve Çinko içerir (CuZn-SOD) - Mn ve Fe içerir (Fe-SOD) - Ni içerir (Ni-SOD) - Bakır içerir (Cu-SOD)
Katalaz (CAT)	H₂O₂'yi H₂O'ya dönüştürür.	Peroksizomlarda yer alan tetrametik bir proteindir.
Glutatyon Peroksidaz (GPx)	H₂O₂ ve lipid peroksitleri uzaklaştırarak etkisiz hale getirir.	- Selenoprotein (Se²⁺) içerir. - Çoğunlukla sitozolde, az olarak mitokondride bulunur. - İndirgenmiş GSH'ı okside glutatyon (GSSG) dönüştürür.

2.8.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz

İlk olarak 1968 yılında Fridovich ve McCord tarafından tanımlanmıştır. SOD, süperoksit radikallerinin dismutasyonunu sağlayan, katalitik olarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen ve dolaylı olarak da lipid peroksidasyonu inhibe eden bir metalloenzimdir (128). SOD, MSOD'un oluşturduğu reaksiyon aşağıda gösterilmiştir:

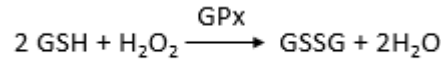


Bu reaksiyon spontan gerçekleşebileceği gibi, SOD katalizörlüğünde 4000 kat daha hızlı gerçekleşir (129). İnsanlarda SOD1 (sitozolik, Cu, Zn-SOD), SOD2 (mitokondriyal, Mn-SOD) ve SOD3 (ekstraselüler, EC-SOD) olmak üzere 3 izoformu bulunur (130). Cu SOD1'de görülen mutasyonların (A4V, G93A) bir motor nöron hastalığı olan amiotrofik lateral skleroz (ALS)'de görüldüğü bildirilmiştir (131). Zn-SOD aktivitesinin benign prostat hiperplazisinde yükseldiği ve prostat kanserinde

azaldığı gösterilmiştir. Aşırı ekspresyonunun ise hücre hasarına neden olduğu ve Down Sendromunun nedenlerinden olabileceği bildirilmiştir (132).

Glutasyon Peroksidaz

İlk defa 1957 yılında Mills (133) tarafından hayvan eritrositlerinde hemoglobini oksidatif hasardan koruyan eritrositik bir enzim olarak tanımlanmıştır (134). Flohe ve ark. (1971) ise sığır kırmızı kan hücresini saflaştırarak GPx'in fiziksel ve kinetik özelliklerini belirlemişlerdir (135). GPxler, H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasını sağlarken, indirgenmiş GSH'ı GSSG'ye dönüştürürler. Böylece H_2O_2 'nin de hidroksil radikaline dönüşmesini önlemiş olurlar ve dolaylı olarak da lipid peroksidasyonunun başlatılmasını önlerler (136).



Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu hücreler/dokular başta eritrositler ve karaciğerdir. GPx3, hemoglobinin oksidasyonunun önlenmesinde ve eritrositlerin hemolize karşı korunmasında görev yapar. GPx1 ise, sitozolde ve mitokondride 2:1 oranında bulunur ve H_2O_2 'den hidroksil radikalinin oluşmasını engelleyerek oksidatif hasara karşı hücreleri korur (137).

Hücre içi antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşeni olan GPx'ler ROS'a karşı anahtar enzimler olarak bulunmaktadır (136). GPx'ler selenyum bağımlı ve selenyum bağımlı olmayanlar olmak üzere iki grupta incelenebilirler. Selenyum bağımlı GPx'ler ise (Örneğin; GPx1, GPx3) selenyum içeren tetramerik yapıdaki glikoproteinlerdir ve her alt ünite aktif kısmında kovalan bağlı dört adet selenosistein rezidüsü (SeCys) içerir (138). Selenyum bağımlı GPx'ler, hücrelerin oksidan hasardan korunmasında anahtar bir fizyolojik işleve sahiptir. Selenyum eksikliğinde GPx aktivitesinde %90'a varan azalma gözlenir ve bu durumda vücutta antioksidan savunma tam anlamıyla gerçekleştirilemez. Selenyum eksikliği oluşturulan

hayvanlarda, selenyum suplementasyonu ile GPx aktivitesinde hızlı ve sigmoidal bir artış gözlenmektedir (139).

Katalaz

Katalaz oksijene maruz kalan hemen tüm organizmalarda peroksizomlarda bulunan bir enzimdir (140). İlk kez Sumner ve Dounce tarafından 1937 yılında siğir karaciğerinden izole edilen CAT molekülünün ağırlığı 240 kDa civarında olup, aktif kısmında dört tane ferrihem grubu (Fe^{3+} -protoforfilin) bulunduran bir hemoproteindir. CAT primer olarak H_2O_2 'nin oksijen ve suya parçalanmasında rol alır (katalitik reaksiyon) (141).



Bir molekül CAT milyonlarca molekül H_2O_2 'i parçalayabilir. Ayrıca hidrojen donörleriyle [örneğin; alifatik alkoller (metanol, etanol), formaldehit, formik asit, fenoller] reaksiyona girerek peroksidaz aktivitesi gösterir (peroksidik reaksiyon) (142).

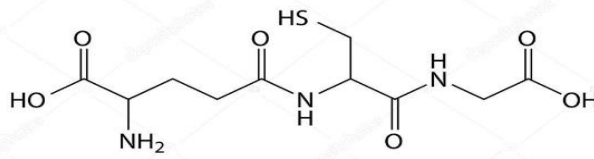
Katalaz enziminin aktivitesinin dokular ve hücreler arasında farklılıklar gösterdiği belirtilmektedir. CAT'ın tamamen yokluğuyla ortaya çıkan ve Japonya, İsviçre ve Macaristan'da sıklıkla görülen "akatalazy" otozomal peroksi otozomal resesif bir hastalıktır CAT'da görülen polimorfizmlerin sistemik lupus eritematosus, beyin kanserleri ve hipertansiyon ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (143).

2.8.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Glutasyon

Glutasyon glisin, sistein ve glutamik asitten oluşan düşük molekül ağırlıklı atipik bir tripeptittir. Atipik olmasının nedeni yapısındaki γ -glutamik asitten kaynaklanır. Vücuttaki peptidazlar genelde α -peptidazdır. Dolayısıyla γ -peptitleri

kolay parçalayamazlar. Bu da GSH'a dayanıklılık ve uzun süre kalıcılık sağlar. GSH tüm bitki ve hayvan hücrelerinde bulunur. Fizyolojik koşullarda birçok farklı dokuda sentezlense de en fazla hepatositlerde sentezlenir. İnsanda ise çeşitli redoks formları bulunmaktadır: indirgenmiş GSH) ve GSSG. Glutatyon melekülleri aynı zamanda proteinlere de bağlanabilir. Yüksek miktarda sitoplazmada mitokondri ve çekirdekte bulunur; suda çözünür. Mitokondri hücresel GSH'ın %10'unu içerir (144). Yapısı Şekil 2.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Glutatyonun yapısı

Glutatyon serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan önemli bir antioksidandır. Hemoglobinin oksidasyona uğrayarak methemoglobine dönüşümünü engeller. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redüksiyonunu sağlayarak bu grupları oksidasyona karşı korur. Glutatyon özellikle de karaciğer hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Ayrıca, eritrositler başta olmak üzere, tüm hematopoetik sistem hücrelerini ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir (145).

Sağlıklı hücre ve dokulardaki tiyol havuzunun %90'ından fazlasını GSH oluşturur. GSH'ın yapısında bulunan sisteinin ROS gibi reaktif molekülleri redükleme yeteneği vardır. Bu durumda kendisi reaktif hale gelir ve iki reaktif glutatyonun birleşmesi sonucu glutatyon disülfiti yani GSSG'ı oluşturur. Ciddi oksidatif stres altında hücrenin GSSG'ı GSH'a indirgeme özelliği azalır ve böylece GSSG hücrede akümüle olur. Artmış GSSG/GSH oranı (redoks oranı) oksidatif stresin göstergesidir. GSH sitozol, mikrozom ve mitokondride GST'lerle katalizlenen çok sayıda konjugasyon ve redüksiyon reaksiyonunda substrat olarak görev alır (146).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma - Aldrich
Bisfenol A	Sigma-Aldrich
Bisfenol F	Sigma-Aldrich
Bisfenol S	Sigma-Aldrich
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma - Aldrich
Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu, Düşük glikozlu (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM Low Glucose)	Biowest
Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS)	Multicell, Wisent Bioproducts
Florometrik Hücre içi ROS kiti	Sigma - Aldrich
Fötal Sığır Serum (FBS)	Sigma - Aldrich
Glutasyon kiti	Cayman Chemical
Glutasyon Peroksidaz kiti	Cayman Chemical
Hücre Liziz Reaktif (Cellytic MT)	Sigma – Aldrich
Katalaz kiti	Cayman Chemical
Penisilin-Streptomisin (hücre kültürü için)	Biological Industries
Proteaz İnhibitör Kokteyli	Sigma – Aldrich
Protein Karbonil kiti	Sigma – Aldrich
Protein Miktar Tayini kiti (BCA kiti)	Cayman Chemical
Süperoksit Dismutaz kiti	Cayman Chemical
TBARS kiti	Cayman Chemical

Terazi	Mettler Toledo, XS105 Dual Range
Tripsin	Biowest

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

96 kuyucuklu plak	Greiner bio-one, Cellstar
Biyogüvenlik kabini	Holten, Lamin Air Model 1,2
Buz kırma makinası	Scotsman AF100
Buzdolabı	Arçelik, Tek kapılı
Çok kanallı mikropipet	Finpipette
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik, Tek kapılı
Derin dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Falcon tüpü (15, 50 ml)	Isolab
Hassas Terazi	Mettler Toledo
Hemositometre	Marienfeld
Hücre kültürü uyumlu flask (25/75 cm ²),	Corning
Eppendorf tüp	Isolab
Işık Mikroskobu	Leica, DFC280
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments, Funvion Line
Lam	Isolab
Lamel	Isolab
Mikro Santrifüj	Heraeus, Hettich, Mikro22

Mikro Santrifüj tüpü	Isolab
Mikropipet (10 – 100 µl, 100 – 1000 µl, 1 – 5 ml)	Eppendorf, Finnpiquette, Labsystems
Neubauer Lamı (Hücre sayım lamı)	Marienfeld
Pipet (1, 5, 10, 25 ml)	Eppendorf
Pipet ucu (0,5 – 10, 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl'lik)	Eppendorf, Top-Line
Santrifüj	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
Spektrofotometre / Spektroflorometre	Molecular Devices, SpektraMax M2
Su Banyosu	Memmert, Edelstaht Rostfrei
Terazi	Mettler Toledo, XS105 Dual Range
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX-3000L
Yatay çalkalayıcı	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Hücreler

Bu çalışmada insan hepatoma hücre hattı (HepG2, ATCC® HB-8065™) kullanıldı. Hücreler American Type Cell Collection (ATCC)'den temin edilmiştir. Hücreler 15 yaşındaki beyaz, adölesan erkek bir hepatoma hastasından elde edilmiş olan epitel morfolojiye sahip, adheren yapıdadır.

Hücreler DMEM içinde, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin eklenerek flasklarda çoğaltılmıştır. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücre medyumunu hücrelerin çoğalmasına göre haftada 2-3 kez değiştirilmiştir. Hücreler %95 yoğunluğa ulaştıktan sonra BPA, BPF ve BPS'ye maruz bırakılmıştır.

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)

Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Dimetil Sülfoksit

Dimetil sülfoksit (C₂H₆OS) yoğunluğu 1,1 g/ml'dir. Oda sıcaklığında saklanabilir.

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Çözeltisi

15 mg MTT 3 ml D-PBS içerisinde çözöldükten sonra, 27 ml DMEM eklenerek 0,5 mg/ml konsantrasyondaki çözelti elde edilmiştir. Hazırlanan MTT çözeltisi ışıktan korunmalıdır ve çözelti 24 saat dayanıklıdır.

3.3.2. ROS Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

ROS Tayin Reaktifi

Kit 1 ml ROS tayin reaktifi içermektedir. -20°C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

Dimetil Sülfoksit

Kit 0,1 ml DMSO içermektedir. Tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır.

Deney Tamponu

Kit 20 ml deney tamponu içermektedir. -20°C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

Master Reaksiyon Karışımı

20 µl 500X ROS tayin reaktifi ve 10 µl deney tamponu içeren karışımdır. -20°C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

3.3.3. HepG2 Hücrelerinin Lizisinde kullanılan çözeltiler

Liziz Tampon Çözeltisi

CellLytic™ MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent kullanılmıştır. Düşük konsantrasyonlarda deterjan, bisin ve 150 mM NaCl içerir. +4°C'de saklanmalıdır.

Proteaz İnhibitör Kokteyli

100 ml liziz tampon çözeltisi içinde 1 ml protez inhibitörü içerir.

Proteaz İnhibitörü

Aprotinin, bestatin, E-64, löpeptin, pepstatin A içerir. Bu proteaz inhibitörleri serin, sistein, aspartik protez ve aminopeptidazları inhibe eder. -20°C'de saklanmalıdır.

3.3.4. Protein Tayin Deneyinde [Bişinkoninik asit (BCA) Deneyi] Kullanılan Çözeltiler

QuantiPro BCA Reaktif QA

Reaktif QA 0,2 M NaOH (pH 11,25) içerisinde sodyum karbonat, sodyum tartat ve sodyum bikarbonattan oluşan çözeltidir.

QuantiPro BCA Reaktif QB

Reaktif QB, %4'lük (pH 8,5) BCA çözeltisidir. Kitin içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir.

QuantiPro BCA Reaktif QC

Bakır (II) Sülfat

Reaktif QC, 12 ml %4 (a/h) bakır (II) sülfat, pentahidrat çözeltisi içeren bir plastik şişe içinde temin edilmiştir.

Protein Stok ve Standart Çözeltileri

Kit, koruyucu olarak %0,05 sodyum azid içeren 0,15 M NaCl içinde 1,0 mg / ml sığır serumu albümini (BSA)'dan oluşan 1 ml'lik 10 cam ampulden oluşan stok çözelti içerir. Deneyde kullanılmak üzere 100 µl stok çözeltisi 1,9 ml tampon çözeltiyle seyreltilmiştir ve 50 µg/ml ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Protein ara stok çözeltisi ve distile su kullanılarak 0, 0,5, 5, 10, 20, 30, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında protein standart çözeltileri hazırlanmıştır.

3.3.5. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler

GPx Deney Tamponu (10X)

1 ml deney tamponu 9 ml non-iyonize su ile seyreltilerek çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti 5 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) tamponudur ve 4°C'de 6 ay saklanabilir.

GPx Örnek Tamponu (10X)

2 ml örnek tamponu 18 ml distile su ile seyreltilmiştir. Hazırlanan örnek tamponu 5 mM EDTA ve 1 mg/ml BSA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) tamponudur. Bu tampon GPx kontrol çözeltisini ve örnekleri seyreltmek için kullanılmıştır. 4°C'de en az 1 ay dayanıklıdır.

Glutasyon Peroksidaz (Kontrol)

Kit içinde hazır olarak bulunan vial 50 µl sığır eritrosit GPx'i içermektedir. Enzimi kullanmadan önce, enzimin 10 µl'si başka bir vial buz üzerinde aktararak 490 µl örnek tamponu ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş enzim dakikada ortalama 0,051 absorbans azalması gösterir ve 4 saat içerisinde kullanılmalıdır.

Co- Substrat Karışımı

Kit içinde bulunan her vial liyofilize NADPH, GSH ve GR içerir. Her bir vial ihtiyacı karşılayacak kadar 6 ml non-iyonize suda çözülmüş ve karıştırılmıştır. Hazırlanan çözülmüş reaktifler deney süresince 25°C'de tutulmalıdır. Deney bittikten sonra ise 4°C'de saklanmalıdır. Karışım 4°C'de 2 gün stabildir.

GPx Kümen Hidroperoksit

96 kuyucuklu plak içeren kit 1 vial (2,5 ml) kümen hidroperoksit içermektedir. Reaktif kitten çıktığı gibi kullanıma hazırdır. Vialler -20°C'de saklanmalıdır.

3.3.6. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu (10X)

3 ml deney tamponu 27 ml deiyonize su ile seyreltilmiştir. Elde edilen deney tamponu 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM dietilen triamin pentaasetik asit (DTPA) ve 0,1 mM hipoksantin içermektedir. Bu çözelti radikal dedektörü seyreltmek için kullanılır. 4°C'de 2 aydan kısa bir süre stabildir.

Örnek Tamponu (10X)

Konsantre 3 ml örnek tamponu 27 ml deiyonize su ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş çözelti 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponudur. Elde edilen örnek tamponu SOD standartlarını hazırlamak, ksantin oksidazı ve SOD örneklerini seyreltmek için kullanılmıştır. 4°C'de 6 ay dayanıklıdır.

Radikal Detektör

Radikal detektörü içeren vial 250 µl tetrazolyum tuzu içermektedir. Kullanmadan önce eldeki çözeltinin 50 µl'si başka bir vialde aktarılmıştır. 19,95 ml 1X deney tamponu ile seyreltilmiştir ve ışıktan korunmuştur. Seyreltilen radikal detektör 2 saat içinde kullanılmıştır. Kullanılmayan kısım ise -20°C'de saklanmıştır.

Süperoksit Dismutaz Standart Çözeltileri

Vial, 100 µl sığır eritrosit SOD stok çözeltisi (Cu/Zn-SOD şeklinde) içermektedir ve SOD standart çözeltilerini hazırlamak için kullanılmıştır. 20 µl SOD standardı 1,98 ml dilüe örnek tamponu ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş SOD stok çözeltisinden sırasıyla 0 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 120 µl, 160 µl ve 200 µl alınarak üzerlerine sırasıyla 1000 µl, 980 µl, 960 µl, 920 µl, 880 µl, 840 µl ve 800 µl örnek tamponu ilave edilerek seyreltilmiştir. Böylece 0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 ve 0,05 U/ml SOD aktivitesi içeren bir dizi standart çözeltisi taze olarak hazırlanmıştır.

Ksantin Oksidaz

Kit içinden çıkan vial 150 µl ksantin oksidaz içermektedir. Kullanmadan önce 50 µl'si başka bir vialle aktararak 1,95 ml örnek tamponu ile seyreltilmiştir. Deney süresince buzda bekletilerek kullanılmıştır. Seyreltilmiş enzim bir saat dayanıklıdır.

3.3.7. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler

Katalaz Deney Tamponu

1 ml katalaz deney tamponu 9 ml su ile seyreltilmiştir. Bu çözeltinin pH'sı 7 olup 100 mM potasyum fosfat tamponudur. 4°C'de 2 ay stabildir.

Katalaz Örnek Tamponu

2 ml katalaz örnek tamponu 18 ml distile su ile seyreltilmiştir. Bu karışım 25 mM potasyum fosfat (pH 7,5) tamponudur ve 1 mM EDTA ile %0,1 BSA içerir. Hazırlanan örnek tamponu analizden önce formaldehit standartlarını ve örnekleri seyreltmek için kullanılmıştır.

Katalaz Formaldehit Standardı

Kitin içinde hazır olarak bulunan vial 4,25 M formaldehit içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 10 µl katalaz (CAT) standardı 9,99 ml örnek tamponu ile seyreltilerek 4,25 mM formaldehit ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ara stok çözeltisinden alınan 0 µl, 10 µl, 30 µl, 60 µl, 90 µl, 120 µl ve 150 µl formaldehit,

örnek tamponundan sırasıyla 1000 µl, 990 µl, 970 µl, 940 µl, 910 µl, 880 µl, 850 µl alınarak seyreltilmiştir ve 0, 5, 15, 30, 45, 60 ve 75 µM konsantrasyonlarında standart çözeltileri hazırlanmıştır.

Katalaz (Kontrol)

Kitin içinde hazır olarak tedarik edilen her vial pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere toz halde sığır karaciğer CAT enzimi içermektedir. Rekonstitüe halde bulunan katalaz 2 ml örnek tamponu ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 50 µl alınarak 0,95 ml dilüe örnek tamponu ile karıştırılmış ve vortekslenmiştir. Her kuyucuğa 20 µl eklenmiştir. Dilüe edilmiş enzim 30 dakika stabildir. Rekonstitüe haldeki CAT kontrol enzim ise -20°C’de 1 ay stabildir.

Katalaz Potasyum Hidroksit

Kitin içinden hazır olarak tedarik edilen vial 4 ml 10 M potasyum hidroksit (KOH) içermektedir ve tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 4°C’de 3 ay dayanıklıdır.

Katalaz Hidrojen Peroksit

Kitin içinden hazır olarak tedarik edilen vial 8,82 M hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi içermektedir. Bu çözeltinin 40 µl’si 9,96 ml deiyonize su ile seyreltilerek 35,28 mM çözelti elde edilmiştir. Dilüe çözelti 2 saat içerisinde kullanılmalıdır.

Katalaz Purpald (Kromojen)

Her vial 0,5 M hidroklorik asit (HCl) içerisinde hazırlanmış 4 ml “4-amino-3-hidrazino-5-merkaptio-1,2,4-triazol” (purpald) içermektedir. Kitin içinden kullanıma hazır olarak tedarik edilir.

Katalaz Potasyum Periodat

Her vial 0,5 M potasyum hidroksit içerisinde 1,5 ml potasyum periyodat içermektedir. Kullanıma hazır halde temin edilir.

3.3.8. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

GSH MES Tamponu

Tampon 0,4 M 2-(N-morfolin) etansülfonik asit (MES), 0,1 M fosfat ve 2 mM EDTA içerir (pH 6,0). Kullanılmadan önce 60 ml MES tamponu 60 ml deiyonize su ile seyreltilmiştir.

GSSG Standart -Okside Glutasyon Standart ve Stok Çözeltileri

Kitin içinden çıkan her vial 2 ml okside glutasyon (GSSG, 25 μ M) içermektedir ve tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. 0-4 °C'de saklandığında 1 yıl stabildir. 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 ve 8 μ M konsantrasyonlarındaki GSSG Standart çözeltilerini hazırlamak için sırasıyla 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 μ l GSSG standart çözeltilerinin üzerine sırasıyla 500, 495, 490, 480, 460, 420, 380, 340 μ l MES tampon çözeltisi eklenerek standartlar hazırlanmıştır.

GSH Kofaktör Karışımı

Kitin içinde hazır olarak tedarik edilen her bir vial liyofilize toz halinde NADP⁺ ve glukoz-6-fosfat içermektedir. İçerik 0,5 ml distile su ile sulandırılarak iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0-4 °C'de 2 hafta stabildir.

GSH Enzim Karışımı

Kitin içinde hazır olarak tedarik edilen her bir vial 0,2 ml tampon içerisinde glutasyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz içermektedir. MES tampon çözeltisinden 2 ml eklenerek seyreltilmiştir. Hazırlanan bu çözelti 96 kuyucuklu bir plak için yeterlidir. Sulandırılmış enzim karışımı 0-4 °C'de 2 hafta stabildir.

GSH DTNB

Kitin içinde hazır olarak tedarik edilen her bir vial liyofilize toz halinde 5,5'-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit (DTNB, Ellman reaktifi) içermektedir. Kullanılmadan önce içerik 0,5 ml su ile çözülmüştür. Reaktif çözeltisi hazırlandıktan itibaren 10 dakika içerisinde kullanılmıştır.

3.3.9. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşikleri (TBARS) Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

Tiyobarbitürik Asit

Kitin içinde hazır olarak tedarik edilen her bir vial 2 g tiyobarbitürik asit (TBA) içermektedir. Renk reaktifini hazırlamak için kullanıma hazır haldedir.

TBA Asetik Asit

Kitin içinde hazır olarak tedarik edilen her bir vial 20 ml konsantre asetik asit içermektedir. 30 ml TBA asetik asit 120 ml deiyonize su ile seyreltilmiştir. Dilüe edilmiş bu çözelti renk reaktifi hazırlamak için kullanılmıştır. Oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

TBA Sodyum Hidroksit (10X)

Kitin içinde hazır olarak tedarik edilen vial 20 ml sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi 180 ml distile su ile seyreltilmiştir. Hazırlanan çözelti renk reaktifi hazırlamak için kullanılmıştır. Oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

TBA Malondialdehit Stok ve Standart Çözeltileri

Kit, 500 μ M malondialdehit (MDA) stok çözeltisi içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 250 μ l MDA çözeltisi 750 μ l distile su ile seyreltilerek 125 μ M ara stok çözeltisi elde edilmiştir. Hazırlanan 125 μ M ara stok çözeltisinden sırasıyla 0, 5, 5, 10, 120, 80, 200, 200 ve 300 μ l alınmıştır ve üzerlerine sırasıyla 1000, 995, 995, 990, 960, 920, 800, 300 ve 200 μ l distile su eklenerek 0, 0,625, 1,25, 2,5 5, 10, 25, 50 ve 75 μ M konsantrasyonlarında MDA standartları hazırlanmıştır.

TBA Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi

Kitin içinde tedarik edilen sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi kullanıma hazırdır.

Renk Reaktifi

Renk reaktifi 530 mg TBA, 50 ml seyreltilmiş asetik asit çözeltisi ve 50 ml seyreltilmiş sodyum hidroksit çözeltisi içinde çözülerek hazırlanmıştır. Çözelti 24 saat dayanıklıdır.

3.3.10. Protein Karbonil Deneyinde Kullanılan Çözeltiler**Hidroklorik Asit**

Kitin içinden çıkan vial 12 M hidroklorik asit (HCl) içerir. 2,5 M HCl elde etmek için 40 ml suya vialin içindeki HCl eklenir. Oda sıcaklığında 3 ay stabildir.

2,4-dinitrofenilhidrazin

Kitin içinden çıkan vial 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) içermektedir. 2,5 M 10 ml HCl ile çözülmüştür. 4°C'de saklandığında 1 hafta dayanıklıdır. Karanlıkta muhafaza edilmelidir.

Trikloroasetik (TCA) Çözeltisi

Kitin içerisindeki vial 1 g/ml trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi içermektedir. 12 ml TCA çözeltisi 48 ml deiyonize su üzerine eklenerek %20 TCA çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan TCA çözeltisinin 20 ml'sine 40 ml deiyonize su eklenerek %10'luk TCA çözeltisi elde edilmiştir. Oda sıcaklığında 1 ay stabildir.

Guanidin Hidroklorür

Kitin içerisinde kullanıma hazır olarak tedarik edilir.

Etanol

Kitin içerisinde kullanıma hazır olarak tedarik edilir.

Etil Asetat

Kitin içinden çıkan her vial 30 ml etil asetat içermektedir. 30 ml etanol ile 1:1 seyreltilerek kullanılmıştır.

3.3.11. BPA, BPF ve BPS'in stok konsantrasyonlarının hazırlanması ve uygun konsantrasyonlarda hücreye uygulanması

BPA Stok Çözeltisi

29 mg BPA hassas terazide tartılmış ve 100 μ l DMSO'da çözülmüştür. Bu çözeltiden 20 μ l alındı ve besiyeriyle 20 ml'ye tamamlanmıştır. Böylece %0,1 DMSO içeren stok çözelti hazırlanmıştır. BPA için hücrelere uygulanması belirlenen konsantrasyonlar 800, 600, 400, 200, 100, 50 ve 25 μ M'dır. Bu çözeltiler besiyeri ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

BPF Stok Çözeltisi

10 mg BPF hassas terazide tartılmış ve 50 μ l etanolde çözülerek içerisinden 20 μ l alınmış ve besiyeriyle 20 ml'ye tamamlanmıştır. Böylece %0,1 etanol içeren stok çözelti hazırlanmıştır. BPF için belirlenen konsantrasyonlar 600, 400, 200, 100, 50 ve 25 μ M'dır. Bu çözeltiler besiyeri ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

BPS Stok Çözeltisi

12,5 mg BPS hassas terazide tartılmış ve 50 μ l etanolde çözülerek içerisinden 20 μ l alındı ve besiyeriyle 20 ml'ye tamamlanmıştır. Böylece %0,1 etanol içeren stok çözelti hazırlanmıştır. BPS için belirlenen konsantrasyonlar 600, 400, 200, 100, 50, 25 ve 10 μ M BPS'dir. Bu çözeltiler besiyeri ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.4. Hücreler ve Deney Grupları

3.4.1. Deney Grupları

HepG2 hücreleri aşağıdaki gibi gruplandırılmıştır:

1. **Kontrol grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmayan gruptur.
2. **BPA grubu:** Sitotoksisite deneylerinin sonunda BPA'nın inhibitör konsantrasyon 30 (IC_{30})'u uygulanan gruptur.
3. **BPF grubu:** Sitotoksisite deneylerinin sonunda BPF'nin IC_{30} 'u uygulanan gruptur.

4. **BPS grubu:** Sitotoksosite deneylerinin sonunda BPS'nin IC₃₀'u uygulanan gruptur.

3.4.2. Donmuş hücrelerin çözülme basamakları

1. Su banyosu açıldı ve sıcaklığının 37-40°C'ye kadar ısınması beklenmiştir.
2. DMEM +4°C dolaptan çıkarılmıştır ve su banyosunda uygun sıcaklığa getirilmiştir.
3. -80'den çıkarılan hücreler hemen buz üzerine alınmıştır.
4. Dondurma tüpü bu üzerinde ısınan su banyosu yanına taşınmıştır.
5. Dondurma tüpü su banyosu içine koyulmuş ve 1-2 dak ısıtılmıştır.
6. Su banyosundan dondurma tüpü alınmıştır; kurulanıp biyogüvenlik kabini içine alınmıştır.
7. 15ml'lik santrifüj tüpü içine 8 ml besiyeri koyulmuştur.
8. Dondurma tüpü içindeki hücre karışımı sıvı çekilip tüpe koyulmuştur.
9. Pipetaj yapılmış ve resuspanse edilmiştir.
10. 1200 devirde 5-10 dak santrifüjlenmiştir.
11. Santrifüj sonrası tüpün üstündeki süpernatant Pasteur pipeti ile çekilerek atılmıştır.
12. Tüpün dibinde kalan pelet üzerine besiyeri eklenmiştir.
13. Eklenen besiyeri ile pelet pipetaj yapılarak resüspanse edilmiştir
14. Tüpte oluşan hücre ve besiyeri karışımı pipet ile çekilerek 75 cm² flaska ekilmiştir.
15. Işık mikropkobunda hücreler kontrol edilmiştir.
16. Flaskalar 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.

3.4.3. Hücrelerin durumunun kontrol edilmesi ve pasajlama

1. Hücrelerin durumu her gün kontrol edilmiştir.
2. 9 günün sonunda hücrelerin 3 flaska bölünebilecek duruma geldiği görülmüştür.
3. Hücrelerin durumuna ışık mikroskobu altında bakılmıştır.

4. Hücreler steril pipet ile DPBS kullanılarak yıkanmıştır.
5. Hücreler 3-4 ml tripsin-EDTA ile muamele edilmiştir ve hücrelerin yüzeyden kalkmaları için 3-4 dak inkübatörde bekletilmiştir.
6. Besiyerini hızlıca 37 °C'ye getirmek için su banyosuna konulmuştur.
7. Tripsinin aktivitesini durdurmak için 37°C'de 5 ml besiyeri eklenilmiştir
8. Flasktan çekilen hücre+tripsin+DMEM 15'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
9. 1200 devirde 10 dak santrifüjlenmiştir
10. Hücreler besiyeri ile karıştırılarak flasklara ekilmiştir.
11. Flasklar üzerine hücre tipi, tarih, besiyeri ve pasaj sayısı yazılarak inkübatöre konulmuştur.

3.4.4 Hücrelerin besiyerinin değiştirilmesi

1. İnkübatördeki hücreler dışarı alınmıştır.
2. Mikroskopta hücrelerin canlılığı kontrol edilmiştir.
3. Flaskın hücre olmayan köşesinde biriktirilen besiyeri Pasteur pipeti ile çekilmiştir.
4. Flasktaki hücreler D-PBS ile yıkanmıştır.
5. Flasklara 13-14 ml taze besiyeri eklenmiştir.
6. Hücrelerin durumuna mikroskopta bakılmış ve inkübatöre koyulmuştur.

3.4.5. Daha sonra yapılacak testler için hücrelerin dondurulup saklanması

1. İşlem öncesi dondurma çözeltisi hazırlanmıştır. Dondurma çözeltisini hazırlamak için cryoviale 700 µL besiyeri ve üzerine 200 µL FBS, hücreyi koymadan hemen önce ise 100 µL DMSO eklenmiştir.
2. İnkübatörden flasklar çıkarılmıştır.
3. Flasktaki besiyeri çekilmiştir
4. Flask D-PBS ile yıkanarak kalan besiyeri uzaklaştırılmıştır.
5. Flaska 2,5 ml Tripsin-EDTA eklenmiştir.

6. Flasklar hücrelerin yüzeyden kalkması için inkübatörde 3-4 dak bekletilerek hücreler falkon tüplere aktarılmıştır.
7. 1200 devirde 5 dak santrifüjlenmiştir.
8. Supernatan atılmıştır.
9. Dondurma vasatı hücrenin üzerine eklendi ve yavaşça pipetaj yapılmıştır.
10. 10.24 saat -20 °C’de bekletilmiştir.
11. 24 saat sonunda saklamak için -80’e alınmıştır.

3.4.6. Hücrelerin sayılması ve plağa ekilmesi

Hücrelerin sayılması için hücrelerin canlılığının belirlenmesi önemlidir. Hücrelerin sayılması ‘Tripın Mavisı’ adı verilen bir boya ile yapılır. Bu boya negatif yüklüdür. Eğer hücre membran bütünlüğü bozulmamış ise, boya hücre içine giremez. Ancak, membran bütünlüğünü kaybetmiş ölü hücreler boyayı absorbe eder ve mikroskop altında mavi görünür. Tripın mavisı ile çalışırken hücrelerin boyaya belirtilen süreden daha uzun süre kalmamasına dikkat edilir. Aksi takdirde canlı hücreler de maviye boyanarak hücre sayımında hataya sebep olabilir (147).

Hücrelerin sayılması aşağıdaki basamaklarda gerçekleştirilmiştir:

1. Flasklardaki hücrelerin yoğunluğu ışık mikroskobu altında kontrol edilmiştir ve sonrasında flasklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır.
2. Flaska 3 ml D-PBS koyularak hücreler 2 defa yıkanmıştır.
3. Hücrelerin tutunduğu yüzeyden kalkması için 3 ml Tripsin-EDTA eklenmiştir ve flasklar 3-4 dak inkübatöre koyulmuştur.
4. Flasklara 3-4 ml besiyeri koyulmuştur.
5. Besiyeri ve hücreler flasktan alınarak 15ml’lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve 1200 devirde 5 dak santrifüjlenmiştir.
6. Supernatan atılmış ve 5-15 ml besiyeri eklenerek pipetaj yapılarak besiyeri ve hücrelerin homojen hale gelmesi sağlanmıştır.

7. Elde edilen hücre süspansiyonundan 30 µl alınmış ve steril bir ependorf tüpe aktarılarak üzerine 30 µl tripan mavisi çözeltisi (%0,4) eklendi ve süspande edilmiştir.
8. Hücre süspansiyonu Neubauer hücre sayım lamı üzerine alınmıştır; lamın iki bölmesine lamel arasından 10 µl hücre süspansiyonu eklenmiştir ve ışık mikroskobu altında hücreler sayılmıştır. 8 ayrı karedeki toplam hücreler sayılmış ve ortalaması alınmıştır. Hücreler iki kez sayılmış ve tüm sayımların ortalaması alınmıştır. Mililitredeki hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Total hücre miktarı} = N \times \frac{2}{4} \times 10000$$

N: Sayılan ortalama hücre sayısı

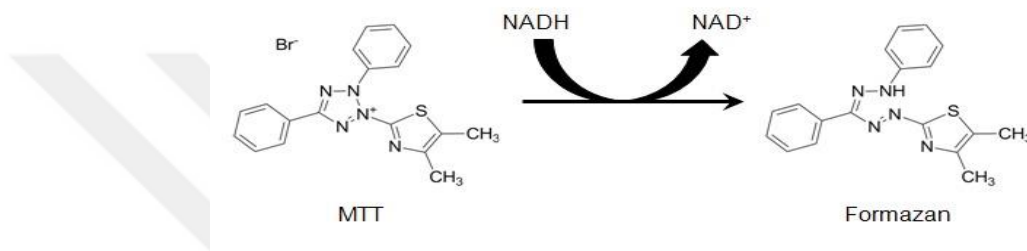
3.5. Deneysel İşlemler ve Yöntemler

3.5.1. HepG2 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

Yöntemin Esası

4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinden biridir. İlk olarak Mosmann tarafından bulunmuş, Denizot ve Lang tarafından geliştirilmiştir. Sağlam mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalaması sonu ortaya çıkan renk şiddetinin kolorimetrik olarak ölçülmesi ilkesine dayanır. Bu yöntemle hücre canlılığı ve sitotoksitenin yanında hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenir; zira çoğalan hücreler proliferasyon olmayan hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite göstermektedir. MTT suda çözünen bir tetrazolyum tuzu olup, fenol kırmızısı içermeyen medyum veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Hücredeki solunum zinciri ve diğer elektron taşıma sistemlerinden çıkan elektronların artan dehidrogenaz enzim aktivitesi ile ortama konulan MTT'yi ya da diğer tetrazolyum tuzlarını indirgemesi ve suda çözünmeyen mor rekli formazan kristalleri oluşturması esasına dayanır. Bu kristaller sonrasında DMSO'da çözülür ve

renk şiddeti spektrofotometrik olarak 570 nm’de ölçülür. Tetrazolyum halkası ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve böylece renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücreler meydana getirebilirler (148). Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybeder ve herhangi bir renk değişimi gözlenmez (149). Böylece hücrelerin canlılığı ve çoğalmaları takip edilebilir (150, 151). MTT yönteminin diğer kullanım alanları arasında sitokinlerin, büyüme faktörlerinin medyum komponentlerinin hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesi sayılabilir (152).



Şekil 3.1 Canlı hücreler tarafından MTT'nin formazan tuza dönüşüm metabolizması

Yöntemin Uygulanışı

1. 22,5 mg MTT toplam hacmin %10 'u kadar olan 4,5 ml D-PBS'te çözülmüştür. Nihai konsantrasyonu 0,5 mg/ml olmalıdır.
2. 4,5 ml D-PBS küçük falkona alınmıştır ve küçük ependorfta tartılan MTT üzerine azar azar eklendi. Homojen olması için pipetaj yapılmıştır.
3. 40,5 ml DMEM üzerine eklenerek MTT çözeltisi eklenmiştir.
4. Kuyucuklardan hücrelerden steril şartlarda besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra belirlenen konsantrasyonlarda BPA (800, 600, 400, 200, 100, 50 ve 25 μ M), BPF (600, 400, 200, 100, 50 ve 25 μ M) ve BPS (600, 400, 200, 100, 50, 25 ve 10 μ M)'ye 24 saat maruz bırakılarak inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon süresi sonunda madde çözeltileri atılarak her bir kuyucuğa hazırlanan MTT çözeltisinden (0,5mg/ml) 100 μ l eklenmiş ve hücreler MTT ile 4 saat inkübe edilmiştir.

6. İnkübasyon süresi sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek üzere her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklenmiş ve çalkalayıcıda 5 – 10 dak süre ile çalkalanmıştır.
7. Kuyucukların absorbens değerleri 570 nm’de ölçülmüştür.
8. Kontrol hücre grubu olarak test maddesi uygulanmayan HepG2 hücre hattı kullanılmıştır.

MTT yöntemi ile sitotoksosite testleri yapılmış ve test sonuçlarına göre medyan inhibitör konsantrasyon IC_{50} ve IC_{30} değerleri belirlenmiştir. Hücrelere her analiz maddesi için IC_{70} konsantrasyonlarında maddeler uygulanmıştır.

Hücre Canlılığının Hesaplanması

Kontrol hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilerek, diğer hücrelerin canlılığı kontrole oranla % olarak hesaplanmıştır.

3.5.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası

Hücrelerin oksijen tüketmesi ve ROS üretmesi ilk olarak aerobik hücre ile başlamıştır. Hücre içi reaksiyonlar indirgenme-yükseltgenme reaksiyonları olarak gerçekleşmektedir ve oksijen bilenen en güçlü oksidandır. Hücre içi oksidasyon bir oksitleyici ajandan hücrel bir moleküle elektron transferi ile gerçekleşir ve bu reaksiyonlar serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Serbest radikaller eşleşmemiş elektron içeren atomlar, moleküller veya iyonlardır (153). Hücreler için bir diğer tehdit unsuru ise, reaktif azot bileşikleri (RNS) dir. RNS yapısında oksijen ve azot bulunduran ve nitrik oksit kaynaklı serbest radikaller veya peroksitlerdir. Bunlar da yüksek reaktiviteye sahiptir ve oksidatif reaksiyonlarda yer alabilirler. Hücrenin normal redoks durumu bazı durumlarda bozulur. Oksidatif stres, ROS üretimi/varlığı ile biyolojik sistemin bunları detoksifiye etmesi ve oluşturdukları hasarı onarması arasında bir dengesizlik oluşması ile ortaya çıkar (154).

Hücredeki ROS miktarını belirlemek için en hızlı ve en kolay yol ROS duyarlı floresan problemlerin algılanmasıdır. Yöntem, floresan olmayan 5-(ve 6-) klorometil-2',7'-diklorodihidrofloreskein diasetat (CM-H₂DCFDA)'ın canlı hücreler tarafından yeşil-floresans veren 2',7'-diklorofloreskein (CM-DCF)'ne dönüştürülmesi sonucu oluşan parlak yeşil renkli floresansın ölçümü ($\lambda_{\text{eksitasyon}}=640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisyon}}=675 \text{ nm}$) esasına dayanmaktadır (155).

Yöntemin Uygulanışı

ROS tayini için aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir:

1. Bütün reaktifler deneye başlamadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.
2. 500X ROS tayin reaktif çözeltisi, kit içinde yer alan ROS tayin reaktifi ile 40 μl DMSO karıştırılarak hazırlanmıştır.
3. 96 kuyucuklu siyah hücre kültür plağına HepG2 hücre örnekleri 90 μl DMEM içinde olacak şekilde ekilmiş ve IC₃₀ konsantrasyonlarının 10 katı olacak şekilde BPA, BPF ve BPS hazırlanarak her kuyucuğa 10 μl eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına (test maddesi içermeyen HepG2 hücreleri) 10 μl besiyeri eklenmiştir.
4. Hücre kültür plağı 30 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
5. Master reaksiyon karışımı (20 μl 500X ROS tayin reaktifi ve 10 μl deney tamponu içeren karışım) hazırlanmıştır. Karışım tek bir hücre kültür plağı için yeterlidir.
6. 100 μl /kuyucuk olacak şekilde master reaksiyon karışımı eklenmiştir.
7. Hücre kültür plağı 30 dakika – 1 saat aralığında inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
8. Kuyucukların floresansı ($\lambda_{\text{ex}}=640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=675 \text{ nm}$) ölçülmüştür.

ROS Düzeylerinin Hesaplanması

Kontrol hücrelerinin ROS üretimi %100 kabul edilerek diğer hücrelerin ROS üretimi kontrole oranla % olarak hesaplanmıştır.

3.5.3. HepG2 Hücrelerinin Lizisi ve Fraksiyonlanması

HepG2 hücrelerinin lizisi ve fraksiyone edilmesi aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

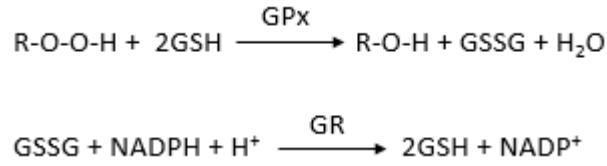
1. -80°C'de saklanan hücre pelletleri lize edilmek üzere alınmış ve tüm liziz esnasında buz üzerinde çalışılmıştır.
2. Lize etme işleminde hücre liziz tampon çözeltisi ve protein inhibitör kokteyli kullanılmıştır. 100 ml liziz tampon çözeltisi (düşük konsantrasyonlarda deterjan, bicine ve 150mM NaCl) içerisinde 1 ml proteaz inhibitörü (aprotinin, bestatin, E-64, Leupeptin, Pepstatin A) içermelidir.
3. Kontrol ve BPA, BPF ve BPS'ye maruz bırakılan hücre pelletlerinin her birinin üzerine 400 µl liziz tamponu/proteaz inhibitör karışımı eklenmiştir.
4. Antioksidan enzim aktiviteleri için kullanılan hücre pelletlerinin hazırlanması: Hücre pelletleri 3500 rpm'de 15 dak santrifüjlendikten sonra 13000 rpm'de de 15 dak süresince santrifüjlenmiş ve süpernatant alınarak ve alikotlanarak deneylere dek -80°C'de saklanmıştır.
5. GSH, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu için kullanılan hücre pelletlerinin hazırlanması: Hücre pelletleri 3500 rpm'de 15 dak santrifüjlendikten sonra ve süpernatant alınarak ve alikotlanarak deneylere dek -80°C'de saklanmıştır.

3.5.4. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Ölçümü

Yöntemin Esası

Kullanılan kit, GPx1 aktivitesini GR aracılığıyla gerçekleşen bir reaksiyon varlığında dolaylı olarak ölçmektedir. H_2O_2 'nin GPx ile indirgenmesiyle oluşan GSSG, GR ve NADPH ile indirgenmiş haline geri döndürülmektedir (156). Bu indirgenme reaksiyonu esnasında GR elektron vericisi olarak NADPH'yi kullanır. GR bir flavoproteindir ve GSH'nin oluşması için gerekli olan en önemli hücre antioksidan enzimidir. GSH / GSSG oranı (redoks oranı) bir organizmanın oksidatif stresinin önemli

genel bir ölçümüdür; çok yüksek konsantrasyonda GSSG birçok enzimin yapısında hasar oluşturabilir (157).



Yöntemin Uygulanışı

1. “Enzimatik olmayan kuyucuklar” olarak nitelendirilen plak kuyucukları için 3 kuyucuğa 120 µl deney tamponu ve 50 µl ko-substrat karışımı eklenmiştir.
2. “Pozitif kontrol” için 3 kuyucuğa 100 µl deney tamponu, 50 µl ko-substrat ve 20 µl dilüe edilmiş GPx (kontrol) eklenmiştir.
3. İlgili örnek kuyucuklarına 100 µl deney tamponu, 50 µl ko-substrat karışımı ve 20 µl BPA, BPF ve BPS maruziyetinde kalmış HepG2 hücre örnekleri eklenmiştir.
4. Bütün kuyucuklara 20 µl kümen hidroperoksit eklenerek reaksiyon başlatılmıştır.
5. Plak birkaç saniye hafifçe çalkalanıp iyice karışması sağlanmış ve 340 nm’de en az 5 zaman noktasında okuma yapılarak kaydedilmiştir.

Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Hesaplanması

1. Dakika başına absorbans değişiklikleri (ΔA_{340}) hesaplanması için zamanın bir fonksiyonu olarak absorbans-konsantrasyon eğrisi çizilmiştir.
2. Enzimatik olmayan örneklerin dakikadaki absorbans değerleri ile örneklerin dakikadaki absorbans değerleri arasındaki fark bulunmuştur.
3. GPx etkinliğini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{GPx aktivitesi} = \frac{\Delta A_{340}/\text{dk}}{0,00373 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0,19 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}} \times \text{Örnek dilüsyonu} = \text{nmol/dk/ml}$$

4. Eğrinin doğrusal kısmında iki nokta seçildi ve aşağıdaki denklem kullanılarak absorbanstaki değişiklikler hesaplandı.

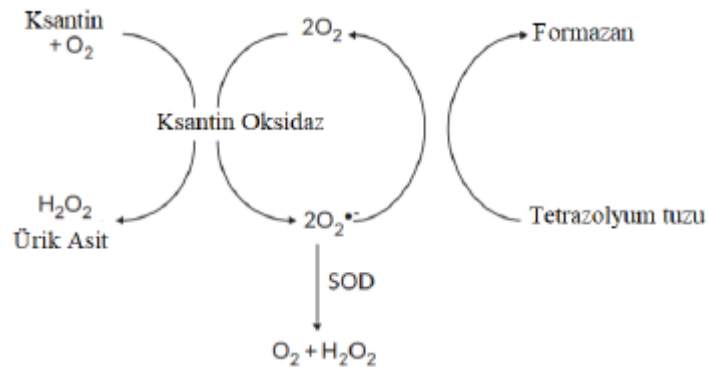
$$\Delta A_{340}/dk = \frac{|\Delta A_{340}/dk (\text{süre 2}) - \Delta A_{340}/dk (\text{süre 1})|}{\text{Süre2(dk)} - \text{Süre1 (dk)}}$$

3.5.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü

Yöntemin Esası

Kullanılan SOD aktivite tayin kiti ile tetrazolyum tuzu kullanılarak ksantin oksidaz ve hipoksantin ile üretilen süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikallerinin tespiti yapılmaktadır.

Bir SOD birimi, süperoksit radikalinin %50 oranında dismutasyonunu göstermek için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanır. SOD kiti ile üç tip SOD (Cu/Zn, Mn ve Fe) ölçülebilmektedir. Test plazma, serum, eritrosit lizatları, doku homojenatları ve hücre lizatlarındaki SOD aktivitesini test etmek için basit, tekrarlanabilir ve hızlı bir araç sağlar. Total SOD aktivitesi, ksantin oksidazın ksantini ürik aside dönüştürürken oluşturduğu süperoksit iyonunun SOD ile dismutasyonu esnasında ortama eklenen WST-1 formazan [2-(4-iyodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu] maddesinin WST1' e dönüşmesinin ölçülmesinde ortaya çıkan renk değişiminin spektrofotometrik bir yöntemle ölçülmesi sonucunda hesaplanır. Yöntemin esası Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Süperoksit dismutaz reaksiyon şeması.

Yöntemin Uygulanışı

1. Standart kuyucuklara radikal dedektör 200 µl koyulmuş ve üzerine 10 µl standartlardan eklenmiştir.
2. Örnek kuyucuklarına 200 µl radikal dedektör ve 10 µl BPA, BPF ve BPS içeren hücre lizatlarından eklenmiştir.
3. 20 µl ksantin oksidaz eklenerek reaksiyon başlatılmış ve birkaç saniye hücre kültür plağı çalkalanmıştır.
4. Hücre kültür plağı çalkalayıcıda (oda ısısında ve karanlıkta) 30 dak inkübe edilmiştir.
5. Çalkalayıcıdan alınan plaktaki örneklerin absorbanları 460 nm’de ölçülmüştür.

Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Hesaplanması

Hücre lizatlarındaki SOD aktivitesi standartlardan elde edilen eğriden ve takiben aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{SOD (U/ml)}}{\text{Protein (mg/ml)}} \times \text{dilüsyon faktörü}$$

$$\text{Dilüsyon faktörü} = \frac{V_{\text{final}}}{V_{\text{örnek}}} \times d_{\text{örnek}}$$

V_{final} : Kuyucuğun nihai hacmi (0,23ml)
 $V_{\text{örnek}}$: Kuyucuğa eklenen örnek hacmi (0,01ml)
 $d_{\text{örnek}}$: Örnek dilüsyonu

3.5.6. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Yöntemin Esası

Katalaz, çoğunlukla aerobik hücrelerde bulunan bir antioksidan enzimdir. Hem normal aerobik metabolizma sonucu oluşan, hem de patojenik ROS üretiminin toksik

bir ürünü olan H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda görev alır. Bu enzim iki H_2O_2 molekülünün moleküler oksijen ve suya dönüşümünü katalize eder. Katalaz aynı zamanda, düşük molekül ağırlıklı alkollerin elektron vericileri olarak görev yapabileceği peroksidatik aktivite de gösterir (158)

Deneylerde kullanılan katalaz aktivite tayin kiti, enzim aktivitesinin belirlenmesi için katalazın peroksidatik formunu kullanır. Yöntem, enzimin optimal bir H_2O_2 konsantrasyonunun varlığında metanol ile reaksiyona girmesine dayanır. Reaksiyon sonucu oluşan formaldehitin, kromojen (4-amino-3-hidrazino-5-merkaptotriazol; purpald) ile renkli bir bileşik oluşturması sonucu meydana gelen renk şiddetinin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (159).

Yöntemin Uygulanışı

1. Formaldehit standart kuyucuklarına için 100 μ l dilüe deney tamponu, 30 μ l metanol ve 20 μ l standart (A-G tüpleri) eklenmiştir.
2. Pozitif kontrol kuyucuklarına 100 μ l dilüe deney tamponu, 30 μ l metanol ve 20 μ l dilüe katalaz kontrol iki kuyucuğa eklenmiştir.
3. Örnek kuyucuklarına 100 μ l dilüe deney tamponu, 30 μ l metanol ve 20 μ l BPA, BPF ve BPS içeren HepG2 hücre lizatları ilgili kuyucuklara eklenmiştir.
4. Reaksiyonu başlatacak olan seyreltilmiş H_2O_2 tüm kuyucuklara mümkün olan en hızlı şekilde 20 μ l eklenmiştir.
5. Hücre kültür plağı çalkalayıcıda oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.
6. Reaksiyonu sonlandırmak üzere tüm kuyucuklara önce 30 μ l potasyum hidroksit eklenmiş, ardından 30 μ l katalaz purpald eklenmiştir.
7. Hücre kültür plağı çalkalayıcıda oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.
8. Çalkalayıcıdan alınan kültür plağının üzerine 10 μ l potasyum periyodat eklenmiş ve hücre kültür plağı oda sıcaklığında çalkalayıcıda 5 dakika inkübe edilmiştir.
9. Absorbans değeri 540 nm'de okunmuştur.

Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması

1. Formaldehit standartlarının ve örneklerin absorbens değerleri hesaplanmıştır.
2. Formaldehit standartlarına karşılık absorbens grafiği çizilmiştir.
3. Aşağıdaki formül kullanılarak örneklerin formaldehit konsantrasyonları hesaplanmış ve standart eğrinin yerine geçen doğrusal regresyondan elde edilen her numune için düzeltilmiş absorbens değeri hesaplanmıştır.

$$\text{Formaldehit } (\mu\text{M}) = \left[\frac{\text{Örnek absorbens} - \gamma \text{ eksenini kestiği nokta}}{\text{Eğim}} \right] \times \frac{0,17 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}}$$

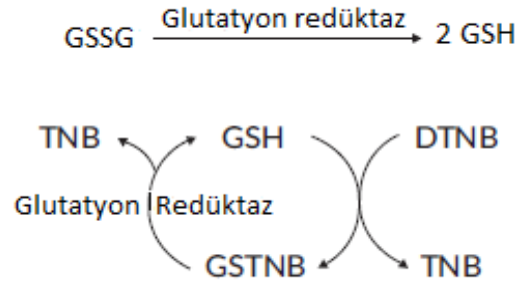
4. Aşağıdaki denklem kullanılarak numunenin CAT aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\text{CAT Aktivitesi} = \frac{\text{Örnek } (\mu\text{M})}{20 \text{ dak}} \times \text{Örnek Dilüsyonu} = \text{nmol/dak/ml}$$

3.5.7. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası

Yöntem, DTNB'nin GR ile katalizlenen bir reaksiyonla, sarı renkli 5-tiyo- 2-nitrobenzoik asit (TNB)'ye dönüşmesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Üretilen disülfür GSTNB (GSH ve TNB arasında), GSH'yi geri dönüştürmek ve daha fazla TNB üretmek amacıyla GR tarafından indirgenmektedir. Üretilen TNB oranı doğrudan bu geri dönüşüm reaksiyonu ve dolayısıyla örnekteki GSH konsantrasyonu ile orantılıdır. TNB'nin absorbensinin 414 nm'de ölçülmesi ile örnekteki GSH düzeyi belirlenebilmektedir. Glutasyon döngüsü Şekil 3.5.'de verilmiştir (160).



Şekil 3.3. Glutasyon döngüsü.

Yöntemin Uygulanışı

1. Kuyucuklara 50 µl GSSG standart çözeltileri eklenmiştir.
2. Kuyucuklara kontrol, BPA, BPF ve BPS ile muamele edilmiş HepG2 hücre lizatlarından 50 µl eklenmiştir.
3. Taze olarak deney kokteyli (1:1 oranında seyreltilmiş 11,25 ml MES tamponu, 0,45 ml kofaktör karışımı, 2,1 ml enzim karışımı, 2,3 ml distile su ve 0,45 ml DTNB) hazırlanmıştır.
4. Kuyucuklara taze olarak hazırlanmış deney kokteyli hızlı bir şekilde 150 µl eklenmiştir.
5. Hücre kültür plağı ışıktan korunarak 25 dakika inkübe edilmiştir.
6. Örneklerin absorbans değerleri 414 nm’de ölçülmüştür.

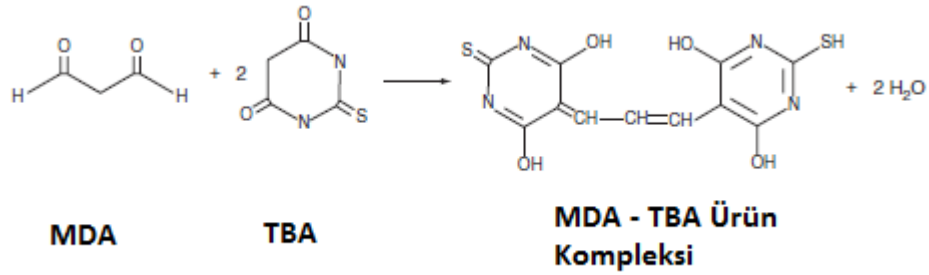
Total Glutasyon Düzeylerinin Hesaplanması

Deney tamamlanmasından 25 dak sonra her standart ve örnek için absorbans değerleri ölçülmüştür. Standart A’nın absorbans değeri kendisinden ve diğerlerinden çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değeri hesaplanmıştır. GSSG standartlarından elde edilen absorbans değerlerine karşı konsantrasyon eğrisi çizilmiştir. Çizilen standart eğrisinden total glutasyon hesaplandı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak bulunmuştur.

3.5.8. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Yöntemin esası

Malondialdehit doğal olarak oluşan lipid peroksidasyon ürünüdür. Bitki, hayvan dokusu ve hücrelerindeki oksidatif stresin bir göstergesidir. Çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA'lar) türemiş olan lipid peroksitler kararsızdır ve MDA gibi reaktif karbonil bileşikleri içeren kompleks bileşikler dizisini oluşturmak üzere ayrışır. MDA ve tiyobarbitürik asit reaktif bileşikler (TBARS)'ın ölçümü, lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için iyi bilinen bir yöntemdir (161). Deneyde kullanılan TBARS test kiti plazma, serum, idrar, doku homojenatı ve hücre lizatlarındaki lipid peroksidasyonu belirlemek için kullanılabilir. MDA ve TBA reaksiyonu sonucu oluşan ürün kompleksinin absorbansının kolorimetrik (veya florometrik) olarak ölçülmesi esasına dayanır (Şekil 3.7.) (162).



Şekil 3.4. MDA-TBA kompleksinin oluşumu

Yöntemin Uygulanışı

1. 50 µl örnek ve standart çözeltisi ilgili 10 ml'lik tüplere eklenmiştir. Üzerine 100 µl SDS solüsyonu eklenerek vortekslenmiştir.
2. Her cam tüpe renk reaktifi (530 mg TBA, 50 ml dilüe TBA asetik asit ve 50 ml TBA NaOH içerir) eklenmiş, tüplerin kapakları kapatılmış ve çözelti karıştırılmıştır.
3. Tüpler 100°C'de su banyosunda bir saat boyunca bekletilmiştir.
4. Bir saat sonunda tüpler kaynayan sudan hızlıca alınarak buzda 10 dakika süre bekletilmiştir.

5. Tüpler 1600 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Tüplerin içinden 150 µl alınarak hazırlanan plak konfigürasyonuna uygun olarak plakta ilgili kuyucuklara aktarılmıştır.
7. Örneklerin absorbans değerleri 530 nm'de ölçülmüştür.

Malondialdehit düzeylerinin hesaplanması

Standartlardan elde edilen absorpsiyon değerleri ve standart konsantrasyonları ile çizilen standart eğri, örneklerin içindeki MDA düzeylerinin hesaplanması için kullanılmıştır. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.5.9. Karbonil Grubu Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası

Reaktif oksijen bileşikleri normal aerobik metabolizmanın bir sonucu olarak üretilir. Yüksek reaktif özellik gösteren serbest radikal türleri lipitleri ve proteinleri oksitleyerek kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların başlamasına katkıda bulunan DNA hasarı, aterosklerotik hastalıklar ve inflamatuvar hastalıklara neden olabilir (163). Protein oksidasyonunun en çok kullanılan göstergesi protein karbonil gruplarıdır. H_2O_2 veya O_2 'nin varlığında, Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi redoks döngüsü katyonları, proteinler üzerindeki katyon bağlanma bölgelerine bağlanarak birkaç aminoasitin yan zincir amin gruplarını karbonillere dönüştürür (164). Protein karbonil içeriğini ölçmek için birçok farklı yöntem mevcuttur. Bunun için en uygun yöntem DNPH ve protein karbonilleri arasındaki reaksiyondur. DNPH, protein karbonilleri ile reaksiyona girerek bir Schiff bazı oluşturur. Buna karşılık gelen hidrozonun spektrofotometrik olarak tayin edilmesi sonucu oksidatif hasarın derecesi anlaşılmış olur (163).

Yöntemin Uygulanışı

1. Kitteki çözeltiler oda sıcaklığına getirilmiştir.
2. Deneyde her örneğin kendi kontrolü olacak şekilde çalışılmıştır.

3. 200 µl kontrol ve örnek ependorflara birbirinin de kontrolü olacak şekilde alınmıştır.
4. Örnek tüplerine 400 µl DNPH ve kontrol tüplerine 2,5 M 400 µl HCl eklenmiştir.
5. Örnek ve kontrol grupları oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince her 15 dakikada bir örnek ve kontrol tüpleri vortekslenmiştir.
6. 1 saatin sonunda her tüpe 500 µl %20'lik TCA eklenmiş, vortekslenmiş ve 5 dakika buzda bekletilmiştir.
7. Tüpler 15000 devir/dak olacak şekilde 10 dakika süresince mikrosantrifüj yardımıyla santrifüjlenmiştir.
8. Tüplerden süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti 500 µl %10'luk TCA ile süspande edilmiştir. Takiben tüpler buzda 5 dakika inkübe edilmiştir.
9. Tüpler tekrar 15000 devir/dak olacak şekilde 10 dakika süresince mikrosantrifüj yardımıyla santrifüjlenmiştir.
10. Süpernatantlar uzaklaştırılmıştır ve çökelek 1 ml (1:1) etanol/etil asetat karışımı ile süspande edilmiştir.
11. Tüpler 15000 devir/dak olacak şekilde 10 dakika süre ile santrifüj edilmiş ve bu işlem iki kere daha tekrarlanmıştır.
12. En son yapılan yıkamadan sonra çökelek 500 µl guanidin hidroklorit ile süspande edilmiştir.
13. Tüpler hiçbir kalıntının kalmaması için tekrar 15000 devir/dak olacak şekilde 10 dakika süresince mikrosantrifüj yardımıyla santrifüjlenmiştir.
14. Örnek ve kontrol tüplerinden 220 µl plaklara aktarılmıştır.
15. Absorbans değerleri 360 nm'de okunmuştur.

Karbonil Düzeylerinin Hesaplanması

Düzeltilmiş absorbans (corrected absorbance, CA) değerini hesaplamak için kontrol gruplarının absorbans değerleri ile örnek gruplarının absorbans değerleri

arasındaki fark alınmıştır. Aşağıdaki formül ile karbonil konsantrasyonları nmol/ml cinsinden hesaplanmıştır:

$$\text{Protein Karbonil (nmol/ml)} = [(CA) / (*0,011 \mu\text{M}^{-1})] \times (500 \mu\text{l} / 200 \mu\text{l})$$

CA: Düzeltilmiş absorbans

*DNPH 370 nm'deki ekstinksiyon katsayısı $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($0,022 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)'dir. Bu değer kuyucuktaki çözeltiye da bağlı olan yol uzunluğu da hesaba katılarak yeniden hesaplanmıştır.

Takiben karbonil düzeyleri aşağıdaki formül ile nmol/mg cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Karbonil (nmol/mg)} = [\text{Protein Karbonil (nmol/ml)}] / \text{protein (mg/ml)}$$

3.5.10. Protein Miktarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası

Protein tayini, biyokimyasal araştırmalarda kullanılan en yaygın işlemlerden biridir. BCA tayini diğer protein tayinlerine göre pekçok avantaja sahiptir; kullanımı kolaydır, oluşan renk kompleksi kararlı haldedir, deterjanlara daha az hassastır ve çok çeşitli protein konsantrasyonlarında uygulanabilir (165).

Yöntem, alkali koşullar altında Cu^{+2} – protein kompleksinin oluşumuna, ardından Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesine dayanmaktadır. İndirgenme miktarı mevcut protein ile orantılıdır. Sistein, sistin, triptofan, tirozin ve peptit bağlarının Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirgeyebildiği gösterilmiştir. BCA, alkali ortamlarda Cu^{+1} ile mavi – mor renkli kompleks oluşturur ve oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülebilir (166).

Protein Miktarının Hesaplanması

Protein miktarı protein standartlarından elde edilen absorpsiyon değerleri yardımıyla çizilen standart eğri kullanılarak örneklerin içindeki protein miktarları hesaplanmıştır. Sonuçlar $\mu\text{g/ml}$ olarak verilmiştir.

Yöntemin Uygulanışı

1. Kuyucuklara kör, standartlar, kontrol grubu, BPA, BPF ve BPS ile muamele edilmiş HepG2 hücre lizatlarından 10 µl eklenmiştir.
2. 7 ml QA tamponu, 7 ml QB tamponu ve en son 280 µl bakır (II) sülfat içeren çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çalışma çözeltisinden 150 µl alınarak kuyucuklara koyulmuştur.
3. Plak, çalkalayıcıda 5 dakika, ardından etüvde 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
4. Örneklerin absorbans değerleri 562 nm'de oda sıcaklığında ölçülmüştür.



4. BULGULAR

4.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

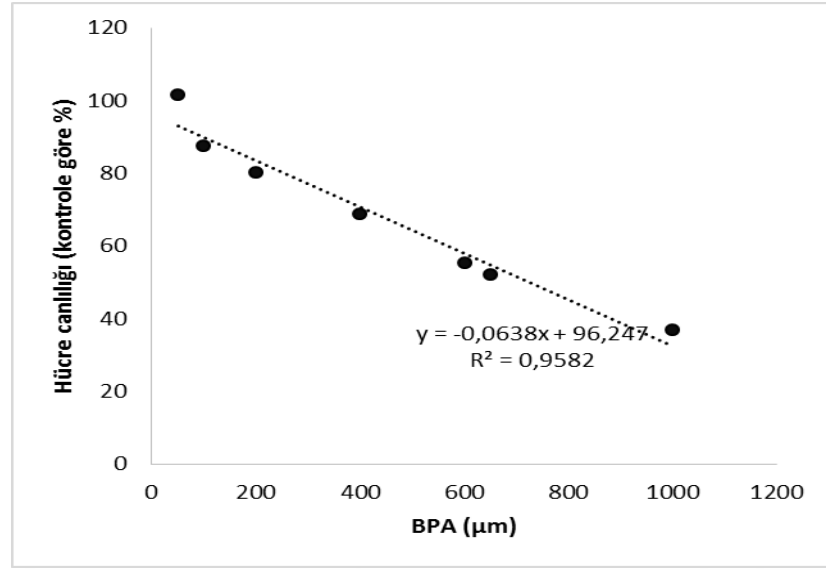
HepG2 hücrelerine BPA (25-1000 µg/ml), BPF (25-1000 µg/ml) ve BPS (25-1000 µg/ml) konsantrasyon aralığında uygulanmış ve hücreler 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.

MTT yöntemi ile ölçülen BPA, BPF ve BPS'nin hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.1, Tablo 4.2., Tablo 4.3. ve Şekil 4.1.a., Şekil 4.1.b., Şekil 4.2.a, Şekil 4.2.b., Şekil 4.3.a., Şekil 4.3.b.,'de verilmiştir.

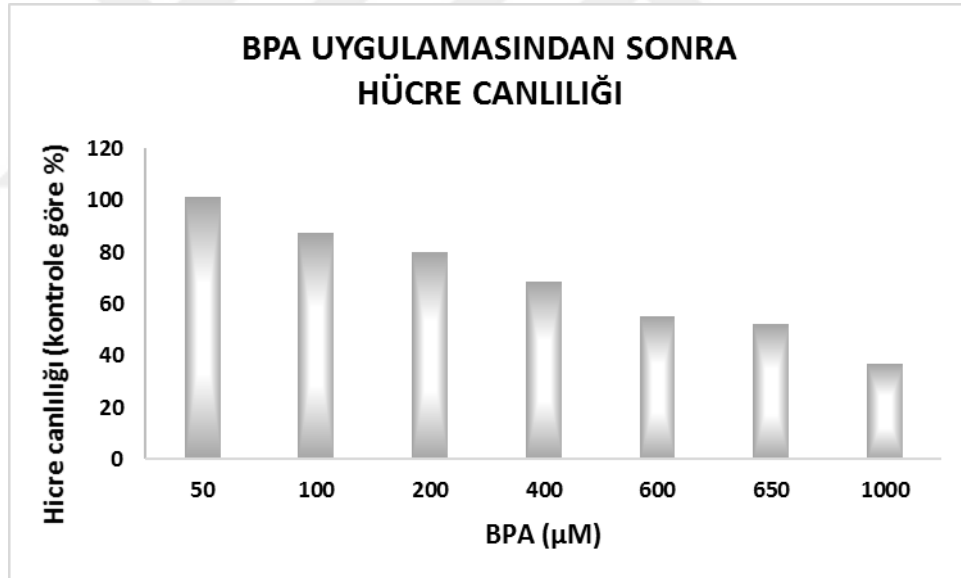
Tablo 4.1. BPA uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı.

Uygulanan BPA dozları (µg/ml)	Hücre Canlılığı (%)
50	101,46
100	87,44
200	80,15
400	68,71
600	55,42
800	52,04
1000	36,97

Hücre canlılığının belirlenmesinde kontrol hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilerek, diğer gruplardaki hücrelerin canlılıkları kontrole göre % olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, üç farklı zamanda ve gün içi iki tekrarla yapılan çalışmaların ortalama değeri olup; üç farklı günde yapılan değerlerden elde edilen ortalama hücre canlılığı verilmiştir.



Şekil 4.1.a. BPA'nın 50-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyon aralığında HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi.

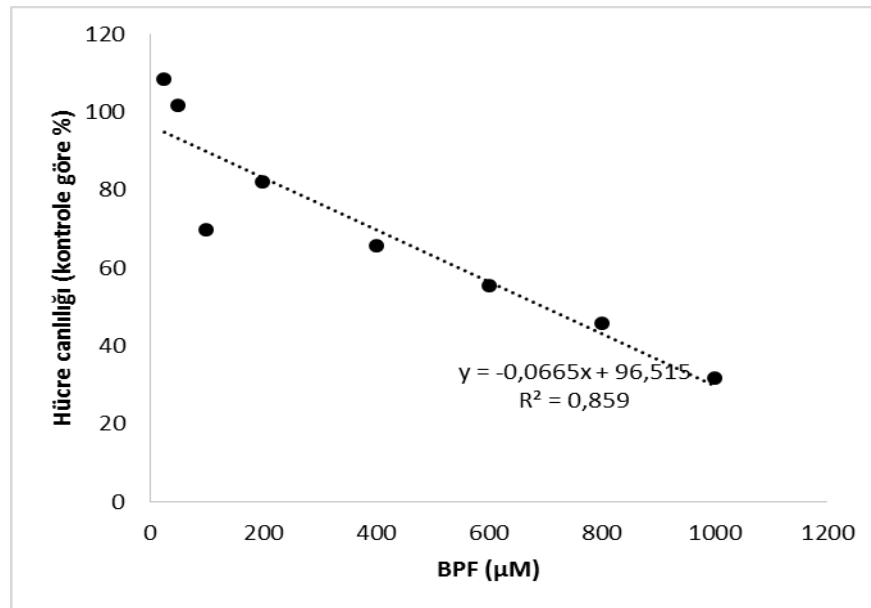


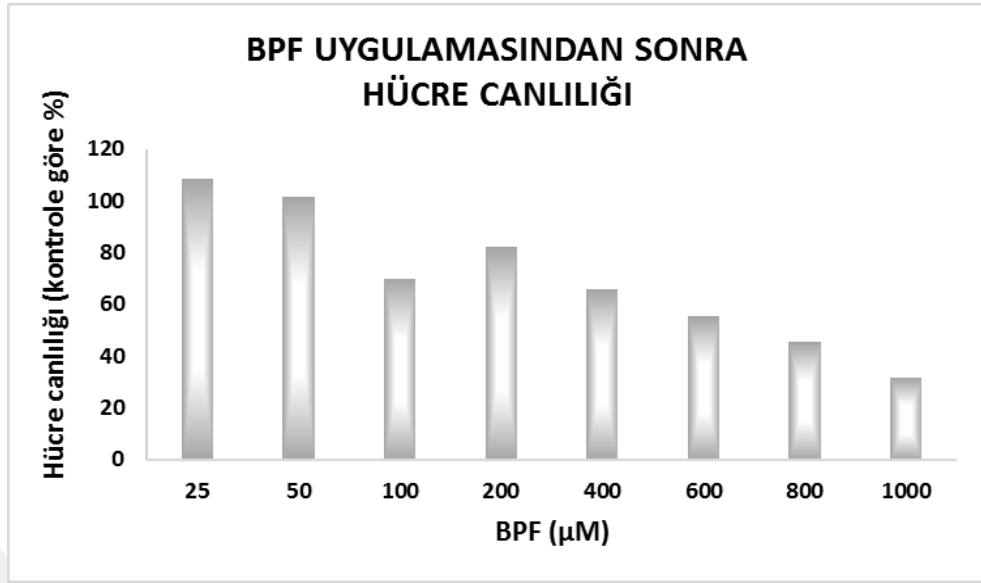
Şekil 4.1.b. BPA'nın 50-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyon aralığında HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi.

Tablo 4.2. BPF uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı.

Uygulanan BPF dozları (µg/ml)	Hücre Canlılığı (%)
25	108,51
50	101,70
100	69,76
200	82,12
400	65,85
600	55,36
800	45,76
1000	31,87

Hücre canlılığının belirlenmesinde kontrol hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilerek, diğer gruplardaki hücrelerin canlılıkları kontrole göre % olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, üç farklı zamanda ve gün içi iki tekrarlı yapılan çalışmaların ortalama değeri olup; üç farklı günde yapılan değerlerden elde edilen ortalama hücre canlılığı verilmiştir.

**Şekil 4.2.a.** BPF'nin 25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi.

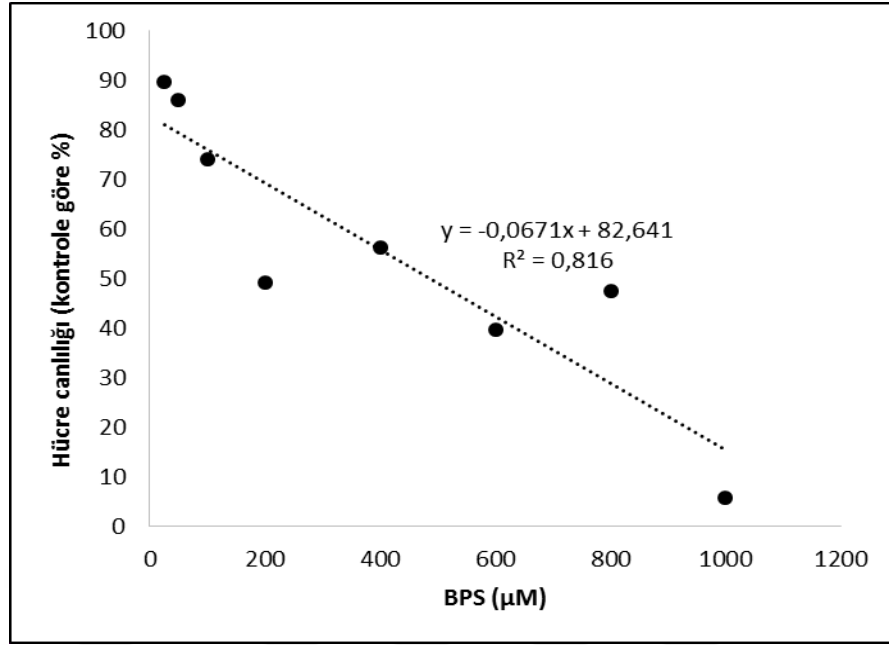


Şekil 4.2.b. BPF'nin 25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi.

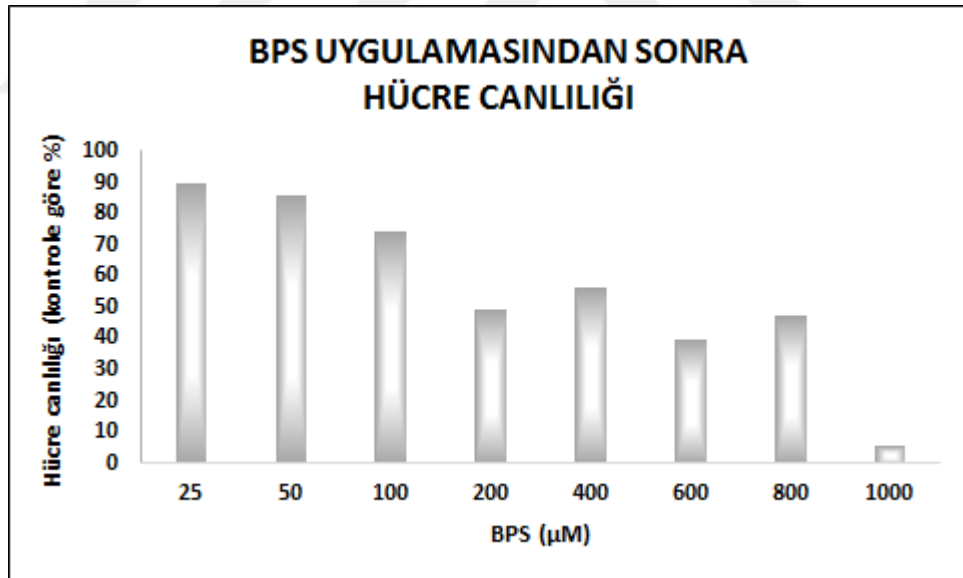
Tablo 4.3. BPS uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı.

Uygulanan BPS dozları (µg/ml)	Hücre Canlılığı (%)
25	89,59
50	85,99
100	74,17
200	49,13
400	56,25
600	39,70
800	47,42
1000	5,89

Hücre canlılığının belirlenmesinde kontrol hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilerek, diğer gruplardaki hücrelerin canlılıkları kontrole göre % olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, üç farklı zamanda ve gün içi iki tekrarla yapılan çalışmaların ortalama değeri olup; üç farklı günde yapılan değerlerden elde edilen ortalama hücre canlılığı verilmiştir.



Şekil 4.3.a. BPS'nin 25-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyon aralığında HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.3.b. BPS'nin 25-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyon aralığında HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi.

Tablo 4.4. Çalışma gruplarında IC₃₀ ve IC₅₀ değerleri.

	BPA	BPF	BPS
IC ₃₀ (µg/ml)	397,27	371,89	191,52
IC ₅₀ (µg/ml)	623,30	611,72	428,80

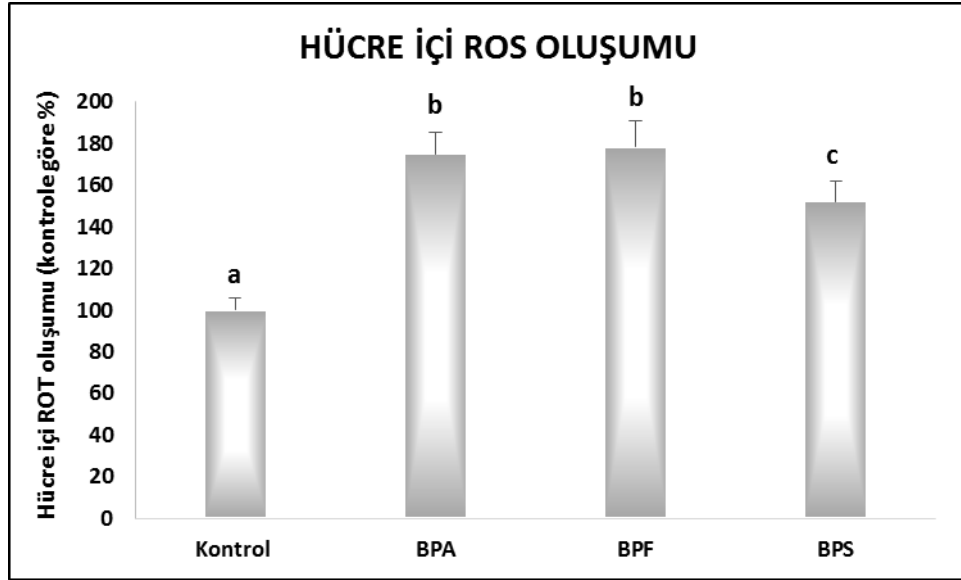
4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri Üretiminin Belirlenmesi

Çalışma gruplarında tayin edilen intrasellüler ROS üretimi Tablo 4.5 ve Şekil 4.7 'de verilmiştir. İntrasellüler ROS üretiminin BPA, BPF ve BPS gruplarında kontrol grubuna oranla gözlenen sırasıyla %78,15, %78,55 ve 52,09 artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). BPA grubunda BPS grubuna oranla %14,62 daha yüksek intrasellüler ROS oluşumu gözlenirken ($p < 0,05$), BPF grubunda ise BPA grubuna oranla %0,22 intrasellüler ROS artışı belirlenmiştir. BPA grubu ve BPF grupları arasında intrasellüler ROS artışı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.5. Çalışma gruplarında hücre içi ROS üretimi.

Çalışma grupları	ROS Üretimi*
Kontrol (n=6)	%100 ^a
BPA (n=6)	%178,15 ^b
BPF (n=6)	%178,55 ^b
BPS (n=6)	%152,09 ^c

*Kontrole göre % olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.4. Deney gruplarında hücre içi ROS oluşumu.

a, b, c Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.3. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi

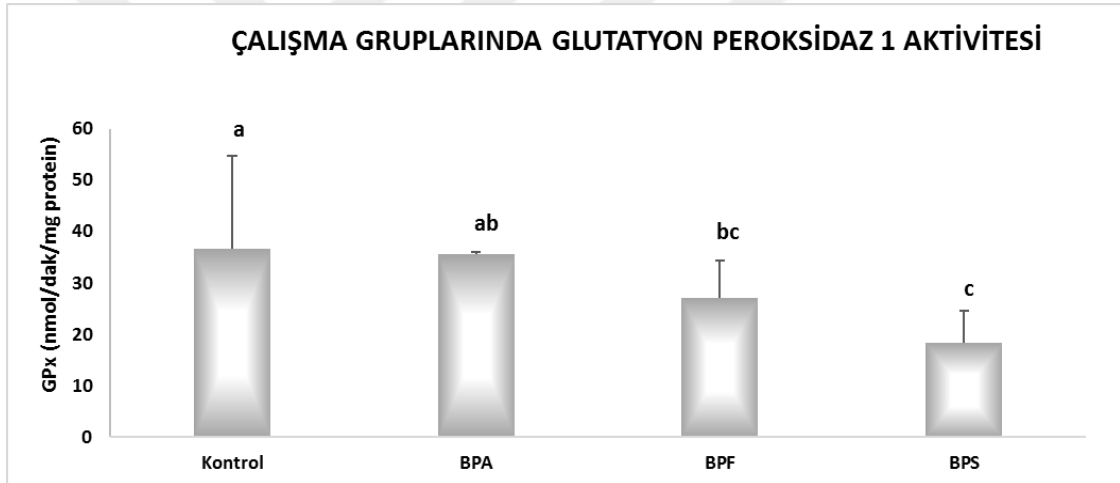
Çalışma gruplarında tayin edilen GPx1 aktiviteleri Tablo 4.6 ve Şekil 4.8 'de verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde GPx aktivitesi $36,59 \pm 18,04$ nmol/min/mg protein; BPA grubunda $35,64 \pm 0,37$ nmol/min/mg protein, BPF grubunda $27,17 \pm 7,20$ nmol/min/mg protein ve BPS grubunda $18,36 \pm 6,29$ nmol/min/mg protein olarak belirlenmiştir. BPF ve BPS grubu ile kontrol grubu arasında farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ve sırasıyla %25,75 ve %49,82 azalma görülmüştür ($p < 0,05$). BPF grubu BPA grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). Bisfenol grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise BPA grubundaki GPx1 aktivitesi BPS grubuna göre anlamlı olarak (%48,48) yüksek bulunurken, BPF grubuyla BPA grubu arasında GPx1 aktivitesi açısından anlamlı fark görülmemiştir. BPF grubunda gözlenen GPx1 aktivitesi BPS grubuna göre %32,42 yüksektir; ancak iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.6. Çalışma gruplarında glutatyon peroksidaz 1 aktivitesi

Çalışma Grupları	GPx (nmol/dak/mg protein)
Kontrol (n=6)	36,59±18,04 ^a
BPA (n=6)	35,64±0,37 ^{ab}
BPF (n=6)	27,17±7,20 ^{bc}
BPS (n=6)	18,36±6,29 ^c

Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

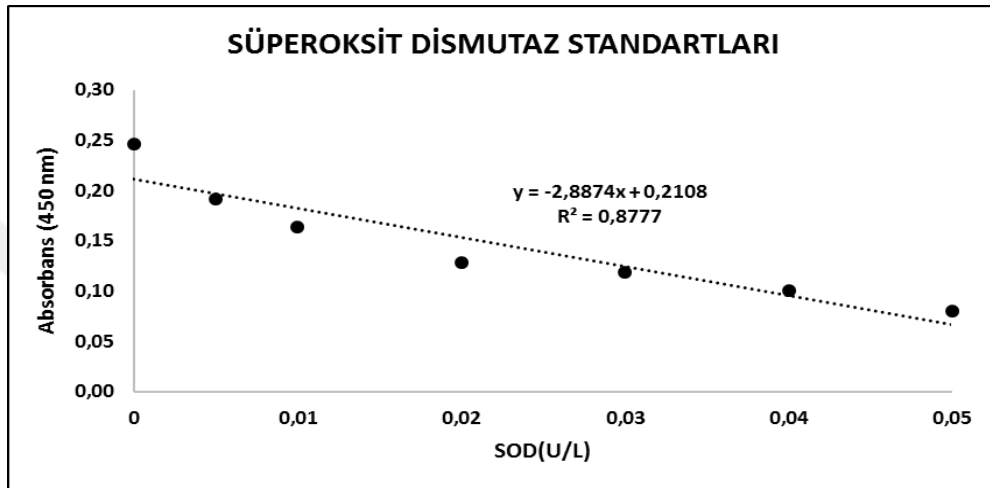
**Şekil 4.5.** Çalışma gruplarında glutatyon peroksidaz (GPx1) aktivitesi.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Süperoksit dismutaz standartlarına ait eğri Şekil 4.6.'da verilmiştir. Çalışma gruplarında tayin edilen SOD aktiviteleri Tablo 4.7. ve Şekil 4.10. 'da verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde SOD aktivitesi 268,09±89,88 U/mg protein, BPA grubunda 518,00±1,13 U/mg protein, BPF grubunda 353,10±42,97 U/mg protein ve BPS grubunda 390,30±49,44 U/mg protein olarak belirlenmiştir. BPF ve BPS grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). BPA

grubunda kontrol grubuna oranla gözlenen %48,24 artış istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). Gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında ise BPF ve BPS arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). BPA uygulanan grupta SOD aktivitesi BPF grubuna göre %31,83 yüksek iken ($p<0,05$), BPS grubuna göre ise %24,65 yüksek olarak bulunmuştur ($p<0,05$).



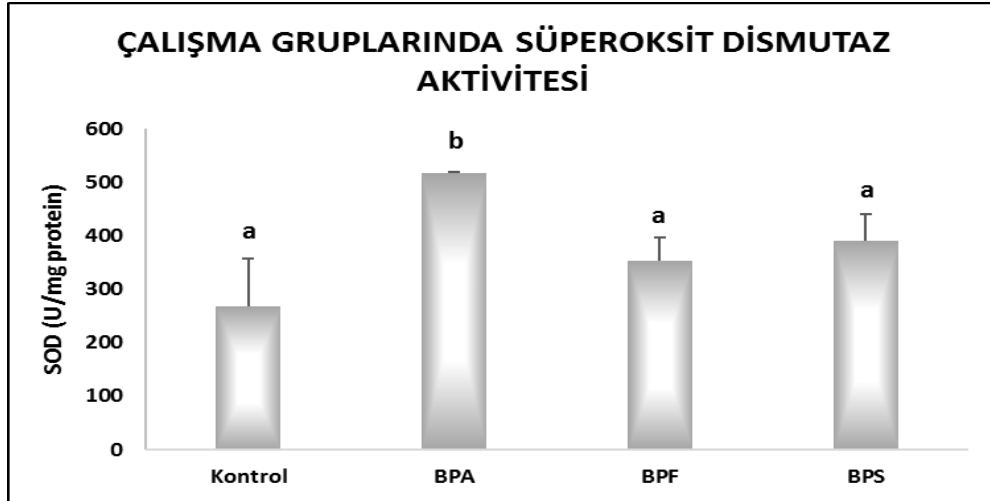
Şekil 4.6. Süperoksit dismutaz standartları.

Tablo 4.7. Çalışma gruplarında süperoksit dismutaz aktivitesi

Çalışma Grupları	SOD (U/mg protein)
Kontrol (n=6)	268,09±89,88 ^a
BPA (n=6)	518,00±1,13 ^b
BPF (n=6)	353,10±42,97 ^a
BPS (n=6)	390,30±49,44 ^a

Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

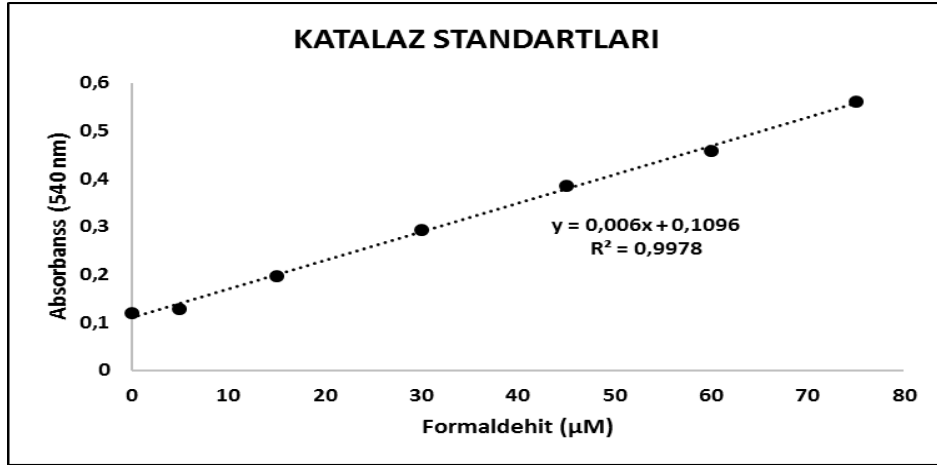


Şekil 4.7. Çalışma gruplarında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi.

a, b, c Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.5. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Katalaz standartlarına ait eğri Şekil 4.8.'de verilmiştir. Deney gruplarında tayin edilen CAT aktiviteleri Tablo 4.8 ve Şekil 4.9 'da verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde CAT aktivitesi $61,61 \pm 11,55$ nmol/min/mg protein, BPA grubunda $70,92 \pm 15,93$ nmol/min/mg protein, BPF grubunda $52,76 \pm 7,47$ nmol/min/mg protein ve BPS grubunda $63,35 \pm 10,47$ nmol/min/mg protein olarak belirlenmiştir. BPA, BPF ve BPS grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak fark bulunmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Bisfenol uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise BPA, BPF ve BPS arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).



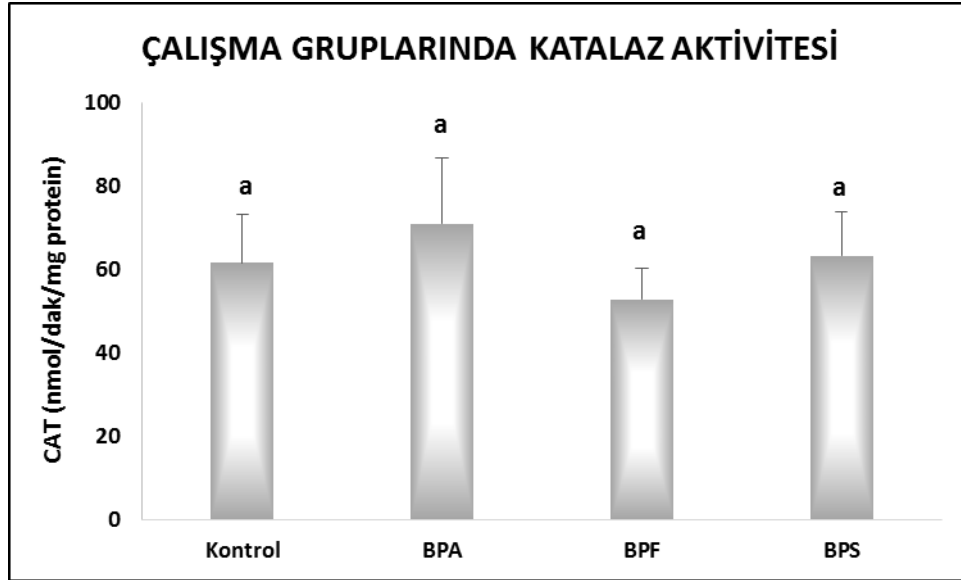
Şekil 4.8. Katalaz standartları.

Tablo 4.8. Çalışma gruplarında katalaz aktivitesi

Çalışma Grupları	CAT (nmol/dak/mg protein)
Kontrol (n=6)	61,61±11,55 ^a
BPA (n=6)	70,92±15,93 ^a
BPF (n=6)	52,76±7,47 ^a
BPS (n=6)	63,35±10,47 ^a

Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

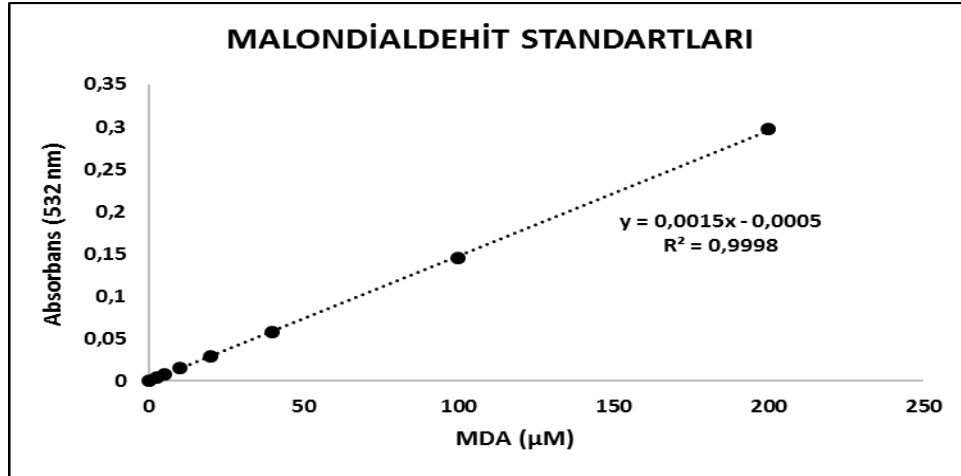


Şekil 4.9. Çalışma gruplarında katalaz aktivitesi.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.6. Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri

Malondialdehit standartlarına ait eğri Şekil 4.10.'da verilmiştir. Çalışma gruplarında tayin edilen MDA düzeyleri Tablo 4.9 ve Şekil 4.14'de verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde MDA düzeyleri $27,52 \pm 0,19$ nmol/mg protein; BPA grubunda $27,74 \pm 0,19$ nmol/mg protein, BPF grubunda $27,86 \pm 0,00$ nmol/mg protein ve BPS grubunda ise $27,63 \pm 0,38$ nmol/mg protein olarak belirlenmiştir. BPA, BPF ve BPS grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak fark bulunmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Bisfenol uygulanan gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise, BPA ile BPF ve BPS arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. BPF ile BPS arasında da anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).



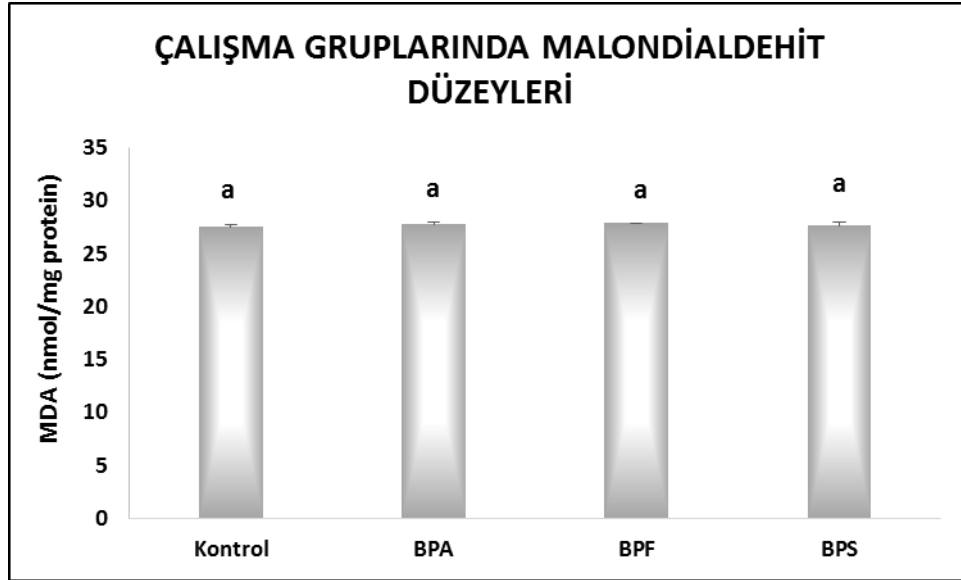
Şekil 4.10. Malondialdehit standartları-absorbans eğrisi.

Tablo 4.9. Çalışma gruplarında malondialdehit (mda) aktivitesi

Çalışma Grupları	MDA (nmol/mg protein)
Kontrol (n=6)	27,52±0,19 ^a
BPA (n=6)	27,74±0,19 ^a
BPF (n=6)	27,86±0,00 ^a
BPS (n=6)	27,63±0,38 ^a

Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

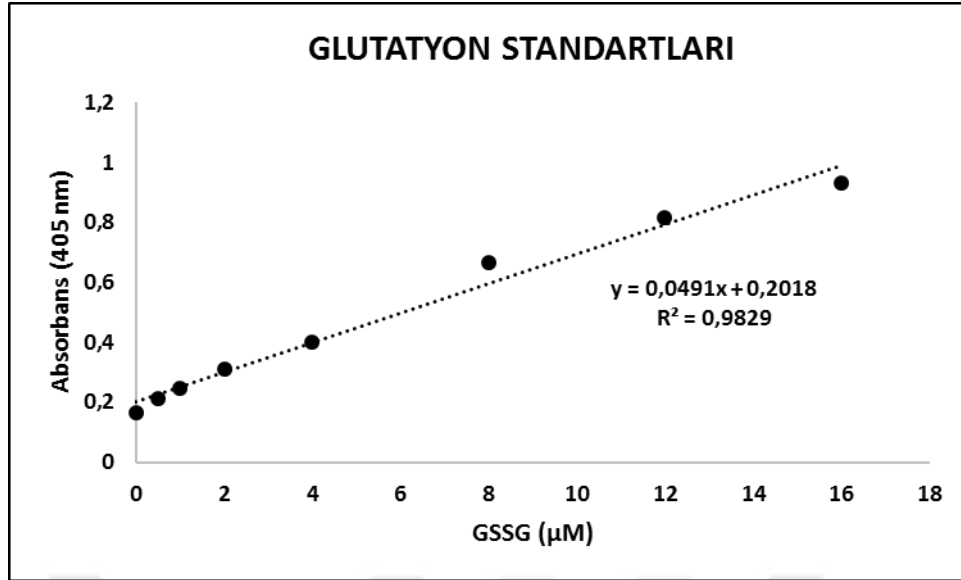


Şekil 4.11. Çalışma gruplarında malondialdehit (mda) düzeyleri.

a, b, c Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.7. Glutasyon Düzeyleri

Okside glutasyon standartlarına ait eğri Şekil 4.12.'de verilmiştir. Çalışma gruplarında tayin edilen total GSH düzeyleri Tablo 4.10. ve Şekil 4.13.'de verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde total GSH düzeyleri $8,41 \pm 0,92$ nmol/mg protein, BPA grubunda $16,86 \pm 0,82$ nmol/mg protein, BPF grubunda $18,31 \pm 0,86$ nmol/mg protein ve BPS grubunda $18,18 \pm 1,31$ nmol/mg protein olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında BPA, BPF ve BPS gruplarında sırasıyla %50,11, %54,04 ve %53,74 oranda GSH düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış görülmüştür ($p < 0,05$ tüm gruplarda). Bisfenol uygulanan gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).



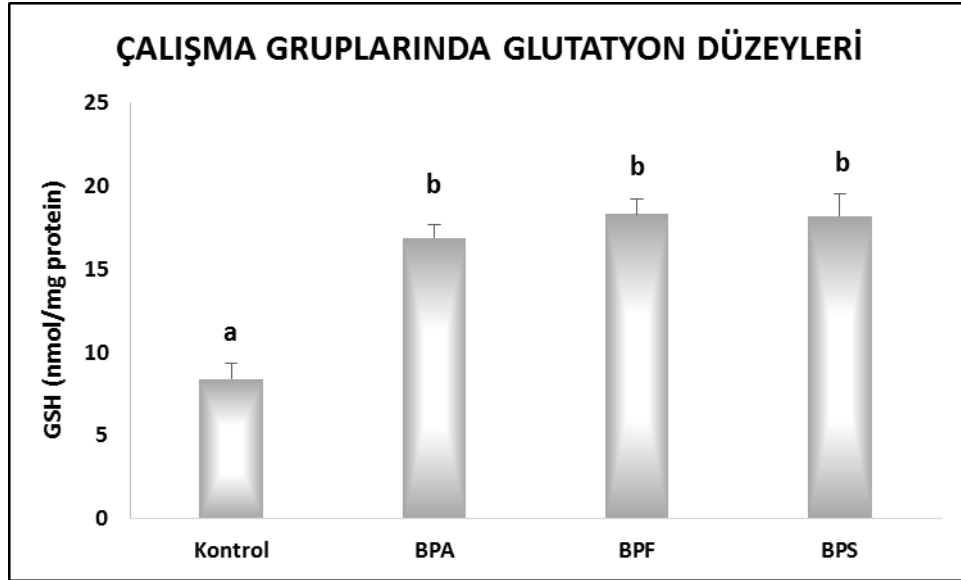
Şekil 4.12. Glutatyon standartları.

Tablo 4.10. Çalışma gruplarında total gsh düzeyleri.

Çalışma Grupları	GSH (nmol/mg protein)
Kontrol (n=6)	8,41±0,92 ^a
BPA (n=6)	16,86±0,82 ^b
BPF (n=6)	18,31±0,86 ^b
BPS (n=6)	18,18±1,31 ^b

Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.



Şekil 4.13. Çalışma gruplarında total glutatyon düzeyleri.

a, b, c Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.8. Protein Oksidasyonu Düzeyleri

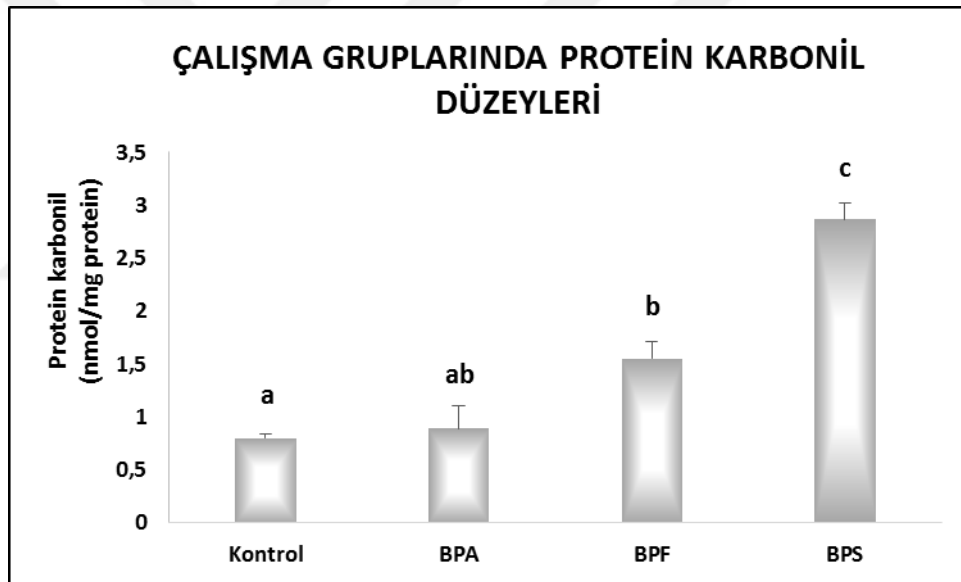
Çalışma gruplarında tayin edilen karbonil düzeyleri Tablo 4.11 ve Şekil 4.14’de verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde karbonil düzeyleri $0,80 \pm 0,04$ nmol/mg protein, BPA grubunda $0,89 \pm 0,22$ nmol/mg protein, BPF grubunda $1,550 \pm 0,16$ nmol/mg protein ve BPS grubunda ise $2,870 \pm 0,16$ nmol/mg protein olarak belirlenmiştir. BPF ve BPS grubunda kontrol grubuna oranla sırasıyla %94,15 ve %258,55 olarak bulunan artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile BPA grubu; BPA grubu ve BPF grubu aralarındaki farklar ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.11. Çalışma gruplarında protein karbonil aktivitesi.

Çalışma Grupları	Protein karbonil (nmol/mg protein)
Kontrol (n=6)	0,80±0,04 ^a
BPA (n=6)	0,890±0,22 ^{ab}
BPF (n=6)	1,550±0,16 ^b
BPS (n=6)	2,870±0,16 ^c

Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

a, b, c Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

**Şekil 4.14.** Çalışma gruplarında protein karbonil düzeyleri.

a, b, c Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.9. İstatistiksel Değerlendirme

Gruplar arası farkların önem kontrolleri, ANOVA tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Gruplar arasında fark çıkması halinde farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için t testi yapılmıştır. Verilerin istatistiksel analizi Statistical Package for Social Sciences Programme (SPSS) versiyon 20.0 kullanılarak yapılmıştır.

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak sunulmuştur. Tüm analizlerde $p<0,05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.



5. TARTIŞMA

Bisfenoller çok yaygın maruz kalınan çevresel kirleticilerdir ve bazılarının endokrin bozucu özellikte olduğundan şüphelenilmektedir. En yaygın kullanılanları BPA'dır. BPA çoğunlukla şeffaf ve dayanıklı, yeniden kullanılabilen plastik ürünlerin yapısında (biberonlar, su damacaneleri, kağıtpara, oyuncaklar, yemek saklama kapları vb.) bulunur. Ayrıca, BPA içecek metal kutularının iç yüzeyinde metal yüzey ile içeceğin etkileşimini engellemesi amacıyla ince bir tabaka halinde kaplama materyali olarak kullanılır. Diş dolgu malzemelerinde, fungusit ve diğer bazı pestisitlerin içeriğinde, sanayide köpük ve paketlenme sistemlerinde, fiberglass üretiminde, beton restorasyonu ve korumasını içine alan inşaat uygulamalarında da BPA kullanılmaktadır (163).

Bisfenol A'nın üreme, gelişme ve karsinogenez dahil olmak üzere çeşitli olumsuz sağlık etkileri rapor edilmiştir. BPA'nın östrojenik aktivitesi estradioldan daha potent olmamakla birlikte karşılaştırılabilir düzeydedir. BPA'nın östrojenik aktivitesi, birçok *in vitro* ve *in vivo* model ile gösterilmiştir (5). Birçok *in vivo* çalışmada BPA'nın düşük dozlarda dahi istenmeyen sonuçlara neden olduğunu göstermiştir ve "düşük doz etkisi"nin BPA için geçerli bir teori olduğu belirtilmektedir. Bu teoriye göre, BPA düşük dozlarda etkileştiği östrojenik ve diğer tüm reseptörlerde bir doygunluk sağlayabilmekte ve daha yüksek dozlarda uygulandığında zaten reseptör doygunluğuna ulaşabildiği için daha fazla bir toksisite oluşturmamaktadır (167). Ayrıca, yapılan epidemiyolojik çalışmalar ve diğer insan çalışmaları, BPA'nın üreme, nörogelişim, tiroid fonksiyonu, metabolizma ve endokrin sistem ile ilişkili olumsuz sağlık etkileri olduğunu göstermiştir (168). BPA gibi farklı EBK'ler ile yapılan epidemiyolojik çalışmalar hayvan deneylerine göre daha az kontrol edilebilir olduğundan nedenselliğin gösterilmesini zorlaştırmaktadır; ancak insanlardaki potansiyel sağlık etkilerinin gösterilmesi açısından önem taşımaktadır (169).

Bisfenol A'nın sağlık üzerinde olumsuz etkilerinin endişe verici olduğu birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiş ve tüm yapılan çalışmaların sonucunda

düzenleyici birçok kuruluş, BPA kullanımının daha sıkı denetlenmesi gerektiğine karar vermiştir (34). Bu endişeler, BPA'nın belirli ürünlerden çıkarılmasını sağlamıştır (170).

Son yıllarda sağlık üzerine istenmeyen etkileri göz önüne alınarak, BPA'nın yerine alternatif olarak BPF ve BPS gibi bisfenollerin kullanımına ağırlık verilmiştir. Bununla birlikte, alternatif bisfenollerin toksisitesi hakkında çok az bilgi vardır ve toksikolojik çalışmalar genelde bu türevlerinin sadece endokrin bozucu etkilerine yoğunlaşmıştır. BPS'nin suda çözünürlüğü yoktur; az miktarda benzen ve dimetil sülfoksitte çözünür, etanol ve eterde çözünür (7). BPS, BPA ile karşılaştırıldığında çevresel çözünebilirlik açısından daha dirençli olmasına rağmen, plastik materyal teması ile doğrudan maruziyete yol açabilir ve potansiyel risk oluşturabilir (12). BPS, BPA gibi östrojen benzeri bir hormonal aktiviteye sahiptir (75). *In vitro* çalışmalarda BPF ve BPS'nin BPA'ya benzer hormonal etkileri ve potensleri olduğunu belirlemiştir. *In vivo* çalışmaların sonuçları ise, bu bisfenol türevlerinin benzer hormonal aktivite gösterdiklerini kanıtlar niteliktedir. BPF ve BPS'nin BPA'nın yapısal benzerleri olduğu ve bu nedenle toksisite mekanizmalarının da benzer olması beklendiğinden bu şaşırtıcı değildir (73). BPA'nın, hormonlar ve ksenoöstrojenlerle kombine edildiğinde östrojenik etkisinin arttığı belirlenmiştir (171). Ayrıca, BPF androjenik bileşikler ile birlikte *in vivo* olarak uygulandığında endokrin bozucu etkisi artmaktadır (74).

Literatürde BPS ve BPF'nin biyotransformasyonlarına dair yeteri kadar bilgi yoktur. Ancak, sınırlı sayıda *in vitro* ve *in vivo* veri BPF'nin BPA ile benzer bir biyolojik yazgıya sahip olduğunu göstermiştir. BPA, *in vitro* olarak, insan ve sıçan karaciğer hücreleri tarafından, biyoaktif olmayan sülfat ve glukuronid konjugatlarına metabolize edilmektedir. Serbest BPF uterus, plasenta, amniyotik sıvı ve fetüs de dahil olmak üzere birçok dokuya dağılım göstermiştir. Aktif ana bileşiğin metabolit/konjugatlara oranı BPA'ninkine benzemektedir (10, 172). *In vivo* olarak gebe sıçanlara gavaj yoluyla uygulanan BPF, aktif olmayan sülfat konjugatlarına dönüşmektedir. BPS'nin metabolizmasını, metabolitlerin biyoaktivitesini değerlendiren yeterli çalışma yapılmamıştır. BPS metabolizmasını, BPF ve BPS metabolitlerinin biyoaktivitesini belirleyen çalışmalara ihtiyaç vardır (10, 172).

Bu tez çalışması kapsamında HepG2 hücrelerinde BPF ve BPS'nin oluşturabileceği sitotoksosite, ROS artışı ve oksidatif stres biyogöstergelerindeki değişimler, kontrol ve BPA uygulanan hücrelerle karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada karaciğer hücrelerinin kullanılmasının bazı nedenleri vardır. Bu nedenler kısaca şöyle özetlenebilir:

1. Karaciğer, ksenobiyotik metabolizma ve detoksifikasyon süreçlerinde yer alan en önemli organdır. Bisfenol türevlerinin biyotransformasyonu için de başlıca organ karaciğerdir (173). Böylece karaciğer hücrelerinin bisfenol ve türevleri çalışmaları için iyi bir model olduğu öngörülmüştür. Sıçanlarda yapılmış daha önceki bir araştırma *in vivo* olarak BPF uygulamasından sonra ana hedef organın karaciğer olduğunu göstermiştir (10).
2. HepG2 hücreleri, yüksek metabolik kapasiteleri nedeniyle ksenobiyotik toksisite çalışmaları için model bir sistem olarak kullanılan ve iyi tanımlanmış bir insan karaciğer hücre dizisidir. HepG2 hücreleri aynı zamanda genotoksisiteyi değerlendirmek için de rutin olarak kullanılır (10). Nitekim, bu hücreler uzun süredir çevresel ve diyet kaynaklı oksidatif stresin ve genotoksitenin tayini için kullanılmaktadır (174).

Tez kapsamında değerlendirilen en önemli parametrelerden biri bisfenol türevlerinin oluşturduğu sitotoksitedir. HepG2 hücrelerinde 24 saatlik uygulama sonunda BPA, BPF ve BPS için IC_{50} değerleri sırasıyla 397,27, 371,89 ve 191,52 $\mu\text{g/ml}$; IC_{30} değerleri ise sırasıyla 623,30, 611,72 ve 428,80 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Bu verileri göre, BPF ve BPS'nin HepG2 hücrelerinde sitotoksitenin BPA'ya göre daha yüksek olduğu belirtilebilir ve sitotoksosite sıralaması şu şekilde verilebilir: BPS > BPF > BPA. Literatürde benzer koşullarda gerçekleştirilen başka bir çalışma bulunamamıştır. Yukarıda da söz edilen ve BPF'nin sitotoksik etkisinin belirlenmesi için gerçekleştirilen bir çalışmada, BPF'nin HepG2 hücrelerindeki IC_{50} değeri 0,080 mM olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada, BPF-digilisidil eter (BFDGE)'in IC_{50} değeri ise, 0,796 mM olarak bulunmuştur (10). Farklı bisfenol türevlerinin hücre toksisitesini araştırmak amacı yapılan bir diğer çalışmada, H295R adenokarsinoma hücrelerine 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde 10-500 μM konsantrasyonlarda BPS uygulanmış, hücre canlılığı

değerlendirilmiştir. Sitotoksik etkinin maruziyet süresi ve doz-bağımlı olarak arttığı belirlenmiştir. Hücre canlılığı 24, 48 ve 72 saatler sonunda sırasıyla %62,6, %32,3 ve %33,3 olarak belirlenmiştir. BPS için LC_{50} değeri 72 saat için 159,6 μM olarak hesaplanmıştır. 72 saat sonrasında uygulanan maddelerin sitotoksiteleri şu şekilde sıralanmıştır: BPAF> BPA> BPS> BPF (88). Bu çalışmadan elde edilen sitotoksitite verilerinin yapılan tez çalışmasıyla örtüşmemesinin nedeni uygulama sürelerinin ve uygulanan hücre hattının farklı olmasıdır. İnsan kolon adenokarsinoması hücre hattı (LS174T), HepG2 ve böbrek adenokarsinoması hücre hattı (ACHN) ile yapılan bir çalışmada, BPA ve BPF'nin bu hücrelerde yüksek derecede biyotransformasyona uğradığı rapor edilmiştir. Ayrıca, BPF'nin 1-100 μM doz aralığında doz-bağımlı bir şekilde bu üç hücre hattına da sitotoksik olduğu; BPA'ya kıyasla daha düşük sitotoksik potansiyel gösterdiği, kendi metaboliti olan dihidroksibenzofenona göre ise, sitotoksititeyi daha düşük dozlarda gösterebildiği belirlenmiştir (53).

Bilindiği üzere hücre içi ROS artışı oksidatif strese neden olmakta; takiben de hücre organellerinde ve hücrel makromoleküllerde hasar oluşturmaktadır. Yaptığımız tez çalışmasında, BPA ve BPF'nin kontrol grubuna oranla hücre içi ROS artışını %178 oranda arttırdığı bulunmuştur. BPS'nin ise neden olduğu hücre için ROS artışı kontrole göre %152 düzeyindedir; ancak bu artış gerek BPA gerekse BPF'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüktür. İnsan PMN hücreleriyle yapılan bir başka çalışmada, bisfenol türevlerinin ATP düzeylerini değiştirme, ROS ve hidroksi radikali oluşumuna neden olma, protein ve lipid hasarı oluşturma potansiyelleri araştırılmıştır. Artan konsantrasyonlarda (0,06-0,5 μM) BPS uygulaması ile 1 saatlik inkübasyon sonucunda ATP sentezinde azalma görülmüştür. BPS'nin neden olduğu ROS ve hidroksi radikallerinin oluşumunun doz bağımlı olduğu; ancak ciddi bir ROS artışına neden olmadığı belirlenmiştir. Tüm bu parametrelerin diğer bisfenollerle (BPAF, BPA ve BPF ile) karşılaştırılması sonucunda BPS'nin insan PMN hücreleri üzerinde daha az toksik etkiye neden olduğu görülmüştür (55).

Tez kapsamında yapılan araştırmalarda, BPF ve BPS uygulamalarının GPx aktivitesini anlamlı derecede azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, BPA'nın SOD aktivitesini artırdığı; ancak diğer bisfenollerin bu tarz bir etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. Hiçbir

bisfenol türevi CAT aktivitesini anlamlı derecede değiştirmemiştir. Tüm bisfenol gruplarında total GSH düzeyleri anlamlı bir artış göstermiştir. Bunun nedeni, kısa süreli bisfenol uygulamasına (24 saat) verilen adaptif bir yanıt olabileceği gibi; GSSG düzeylerinde ciddi bir artışın gerçekleşmesi de olabilir. Ölçülen parametre total GSH düzeyleri olduğu için kesin bir yargıya varmak imkansızdır. Deney gruplarında MDA miktarı artmazken; BPF ve BPS gruplarında protein oksidasyonunda anlamlı artışlar belirlenmiştir. Bu durumda, bisfenol türevlerinin 24 saat uygulama sonrası HepG2 hücrelerinde lipid peroksidasyondan bağımsız bir şekilde protein oksidasyonunu tetikleyebileceği söylenebilir. Ancak, uygulamanın daha uzun süre devam etmesi durumunda lipid peroksidasyonda bir artış olup olmayacağına dair bir yorumda yapmak mümkün değildir.

Literatürde bisfenol türevleriyle ilgili yapılan çalışmalar genellikle *in vivo* alışmalardır ve erkek üreme sistemi üzerinde yoğunlaşmıştır. Yapılan az sayıda *in vitro* alışmada ise, bazı bisfenol türevlerinin hepatositlerde veya hücre hatlarında oksidatif stresi indükleyebileceğine dair sonuçlar elde edilmiştir. Zhang ve ark. (2016)'nın fare hepatositleri ve renal hücrelerini kullanarak yaptığı bir çalışmada BPS'nin toksisitesi değerlendirilmiştir. Farklı dozlarda (0,1-1 mM) 12 saat süreyle BPS'ye maruz bırakılan hücrelerde, BPS'nin doğrudan CAT ile reaksiyona girdiği, CAT'ın Gly 117 rezidüsüne bağlanarak enzimin yapısını ve aktivitesini değiştirdiği belirlenmiştir (175). Diğer taraftan, Khan ve ark. (2016)'nın yaptığı bir başka çalışmada, Wistar sıçanlara 14 gün boyunca 150 mg/kg vücut ağırlığı/gün, 250 mg/kg vücut ağırlığı/gün ve 500 mg/kg vücut ağırlığı/gün BPA oral olarak uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda, karaciğerde mitokondriyel elektron transport zincirinin bozulduğu, karaciğer enzim düzeylerinin, süperoksit oluşumunun, protein oksidasyonunun ve lipid peroksidasyonun arttığı; GSH düzeylerinin ve SOD aktvitesinin ise azaldığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, yapılan histopatolojik çalışmalarda BPA maruziyetnin hepatosellüler ödem, dejenerasyon ve nekroza yol açtığı görölmüştür. Araştırmacılar, BPA'nın mitokondriyel enerji mekanizmalarını bozduğunu ve karaciğerde ciddi toksisiteye yol açabileceğini ifade etmişlerdir (176). Yapılan az sayıda çalışmada ise farklı antioksidanların ve ajanların (timokinon,

kuersetin, vitamin C), BPA'nın neden olduğu hepatik oksidatif strese karşı *in vivo* koruyuculuklarının olduğu gösterilmiştir (177-179).

Literatürde bulunan *in vivo* çalışmalardan da bisfenol türevlerinin hepatik oksidatif stresi indükleyebileceklerine dair veriler elde edilmiştir. Moon ve ark. (2012)'nin yaptığı bir çalışmada farelere 5 gün boyunca istenmeyen etki gözlenmeyen düzey (NOAEL)'in altına BPA (0,05 ve 1,2 mg/kg vücut ağırlığı/gün) uygulanmasını takiben, hepatik mitokondri hasarı, hepatik MDA düzeylerinde artış ve bulduğumuz sonuçlara benzer bir şekilde GPx3 ekspresyonunda azalma belirlenmiştir. Ayrıca, proinflamatuvar sitokinlerden interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α) ekspresyonlarında bir artış belirlenmiştir. Aynı çalışmada, 10 veya 100 nM konsantrasyonlarda HepG2 hücrelerine BPA uygulanmış ve hücrelerin oksijen tüketimlerinde, ATP üretimlerinde ve mitokondriyel membran potansiyellerinde bir azalma olduğu belirlenmiştir. Sonuçta araştırmacılar, BPA'nın NOAEL dozlarının altında bile mitokondriyel bozukluklara yol açarak, oksidatif stres ve inflamasyonu tetikleyebileceğini ifade etmişlerdir (180). Geng ve ark. (2017)'nin yaptığı bir çalışmada ise, BPA'nın HepG2 hücrelerinde doz bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı (1-1000 nM arası) belirlenmiştir; ancak kontrole göre anlamlı fark yalnızca 1000 nM uygulamadan sonra olmuştur. Hücrelerin 5 gün boyunca 100 nM BPA'ya maruz kalmasının glikoz tüketiminde de doz-bağımlı bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. BPA'nın 10 ve 100 nM dozlarda kontrol hücrelere göre anlamlı bir şekilde MDA düzeylerini arttırdığı; ayrıca 100 nM uygulama ile kontrol grubuna göre anlamlı IL-6 ve TNF- α düzeylerinde artışa yol açtığı belirlenmiştir (181). Yukarıda da sözü edilen ve Hassan ve ark. (2012) yaptığı araştırmada dört hafta boyunca sıçanlara dört farklı dozda BPA (0,1, 1, 10, 50 mg/kg vücut ağırlığı/gün) oral yoldan uygulanmıştır. 0,1 mg/kg vücut ağırlığı /gün uygulanan gruptaki hayvanların son vücut ağırlıkları kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş göstermiştir. 50 mg/kg vücut ağırlığı /gün BPA grubunda uygulanan grupta ise, kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük GSH düzeyleri ve yine anlamlı derecede düşük SOD, GPx, GST, GR) ve CAT aktiviteleri belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler yaptığımız *in vitro* çalışmaya benzer bir şekilde, BPA'nın *in vivo* olarak da oksidatif strese yol açtığını

göstermektedir (51). Ozaydın ve ark. (2018)'nin yaptığı bir çalışmada, Wistar sıçanlara 8 hafta boyunca 3 farklı dozda (5, 50 ve 500 µg/kg vücut ağırlığı/gün) BPA uygulanmıştır. Araştırmanın sonunda, karaciğer GSH düzeylerinin ve SOD, GPx ve CAT aktivitelerinin düştüğü; plazma TBARS ve nitrik oksit (NO) düzeylerinin yükseldiği belirlenmiştir. Ayrıca, BPA uygulamasının pankreatik β-hücre işlevlerini bozduğu görülmüştür (182). Elswefy ve ark. (2016) yaptığı bir çalışmada ise, Wistar sıçanlara 8 hafta boyunca 50 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozda BPA uygulanmıştır. BPA uygulamasının serumda karaciğer enzimlerinin düzeylerini yükselttiği, karaciğerde kolajen fiberlerinin birikimine neden olduğu, interlökin 1β (IL-1β) düzeylerini arttırdığı, interlökin 10 (IL-10) düzeylerini azalttığı ve IL-1β/IL-10 oranını yükselttiği belirlenmiştir. Ayrıca, BPA uygulaması ile hepatik MDA düzeylerinin arttığı, redükte GSH düzeylerinin azaldığı, CAT'ın inhibe olduğu ve apoptozun indüklendiği görülmüştür. Araştırmacılar, BPA'nın inflamatuvar cevapları stimüle ederek, oksidatif stres ve ekstraselüler matriks dönüşümünü hızlandırarak karaciğerde fibrozis oluşturabileceği sonucuna varmışlardır (183).

Bisfenol türevlerinin yalnız karaciğerde değil, birçok dokuda oksidatif stres oluşturabileceği öngörülebilir. Başta BPA olmak üzere bisfenol türevlerinin testis ve epididimiste oksidatif strese ve apoptoza yol açtığı birçok çalışmada belirtilmiştir (184, 185). Dolayısıyla, bisfenol türevlerinin genel olarak oksidatif stresi farklı organ ve dokularda indüklediği belirtilebilir. Ancak, oluşan oksidatif stres, antioksidan enzimlerdeki ve oksidan parametrelerdeki değişikliklerin doz, süre, hücre veya hayvan tipine bağlı olarak farklı şekillerde görülebileceğini söylemek mümkündür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında HepG2 hücre hattında BPA, BPF ve BPS maruziyetinin neden olabileceği olası toksik etkiler incelenmiştir. Bu amaçla sitotoksosite, hücre içi ROS üretimi ve oksidatif stres parametreleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler aşağıda değerlendirilmiştir:

1. Hücre canlılığı, MTT testi kullanılarak belirlenmiştir ve test maddelerinin her biri için IC₅₀ ve IC₃₀ konsantrasyonları hesaplanmıştır. Buna göre IC₃₀ değeri BPA, BPF ve BPS için sırasıyla 397,27, 371,84 ve 191,52 µg/ml'dir. IC₅₀ değerleri ise, BPA, BPF ve BPS için sırasıyla 623,30, 611,72 ve 428,80 µg/ml olarak bulunmuştur. IC₅₀ değerlerine göre bisfenoller arasında sitotoksosite sınıflandırması BPS>BPF>BPA olarak verilebilir.
2. Hücre içi ROS üretimi kontrol grubuna kıyasla BPA ve BPF grubunda %78, BPS grubunda ise %52 oranında anlamlı artış göstermiştir (p<0,05, tüm gruplar için). BPS grubundaki hücre içi ROS üretiminin BPA ve BPF'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu belirlenmiştir.
3. HepG2 hücrelerinin BPA, BPF ve BPS'ye 24 saatlik maruziyeti sonucunda BPF (%25,75) ve BPS (%49,82) gruplarında GPx aktivitesi anlamlı olarak azalmıştır. Ayrıca BPA'nın SOD aktivitesini artırdığı; ancak diğer bisfenollerin SOD aktivitesi üzerine bir etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. Beklenenin aksine hiçbir bisfenol türevi CAT aktivitesini anlamlı derecede değiştirmemiştir.
4. Tüm bisfenol gruplarında total GSH düzeyleri anlamlı bir artış göstermiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında GSH düzeyleri BPA, BPF ve BPS gruplarında sırasıyla %50,11, %54,04 ve %53,74 oranda anlamlı şekilde artmıştır (p<0,05, tüm gruplarda). Bunun nedeni, kısa süreli bisfenol uygulamasına (24 saat) verilen adaptif bir yanıt olabileceği gibi; GSSG düzeylerinde ciddi bir artışın gerçekleşmesi de olabilir. Ölçülen parametre total GSH düzeyleri olduğu için kesin bir yargıya varmak imkansızdır.
5. BPF ve BPS grubunda protein oksidasyonu kontrol grubuna oranla sırasıyla %94,15 ve %258,55 artmış olarak bulunmuştur ve bu artış istatistiksel olarak

anlamlıdır ($p<0,05$). Deney gruplarının hiçbirinde MDA, kontrol grubuna kıyasla artmamıştır. Bu durumda, bisfenol türevlerinin 24 saat uygulama sonrası HepG2 hücrelerinde lipit peroksidasyondan bağımsız bir şekilde protein oksidasyonunu tetikleyebileceği söylenebilir. Ancak, uygulamanın daha uzun süre devam etmesi durumunda lipit peroksidasyonda bir artış olup olmayacağına dair bir yorumda yapmak mümkün değildir.

Sonuç olarak, sunulan tez çalışmasında özellikle yaygın olarak kullanılan ve zararlı etkilerinden dolayı artık kullanımı kısıtlanmış olan BPA'nın alternatifleri olan BPF ve BPS'nin, ksenobiyotik metabolizma ve detoksifikasyon sürecinde önemli bir yere sahip karaciğer üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Tüm bu sonuçlar EBK'lara maruziyetin karaciğer hücrelerinde toksik etkilere sebep olabileceğini göstermektedir. BPF ve BPS'nin, BPA'nın yapısal benzerleri olduğu ve bu nedenle toksisite mekanizmalarının da benzer olması beklendiğinden bu şaşırtıcı değildir. Bu toksik etkiler, hücrede oksidan/antioksidan dengelerin değişmesine ve hatta hücrenin ölüme sebep olabilir. BPF ve BPS'nin yol açabileceği toksik etkilerin, bu toksik etkilerin altında yatan mekanizmaların ve olası zararlı etkilerinin daha iyi açıklanabilmesi için daha çok mekanistik çalışmaya ihtiyaç vardır. Özellikle BPA ile farklı bisfenol türevlerinin karşılaştırmalı olarak çalışılması, toksisitesi BPA'dan düşük türevlerin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu konunun başta çocuklar gibi hassas popülasyonlar olmak üzere, tüm toplumun bisfenoller gibi EBK'lerin olası istenmeyen etkilerinden korunması için büyük önem taşıdığı belirtilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Hauser R, Barthold JS, Meeker JD. Epidemiologic evidence on the relationship between environmental endocrine disruptors and male reproductive and developmental health. *Endocrine-Disrupting Chemicals*: Springer. 2007; 225-51.
2. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Van Der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*. 1998;139(10):4252-63.
3. Earl Gray L, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, et al. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *International journal of andrology*. 2006;29(1):96-104.
4. Halden RU. Plastics and health risks. *Annual review of public health*. 2010;31:179-94.
5. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquie M, Gauthier BR, et al. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER α . *PloS one*. 2008;3(4):e2069.
6. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs Jr DR, Lee D-H, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*. 2012;33(3):378-455.
7. Ogata E, Oi F, Yanase N, Nate N. Process for producing high-purity 4, 4'-dihydroxydiphenyl sulfone. Google Patents; 2008.
8. Fromme H, K  chler T, Otto T, Pilz K, M  ller J, Wenzel A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water research*. 2002;36(6):1429-38.
9. Rochester JR, Bolden AL. Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environmental health perspectives*. 2015;123(7):643.
10. Cabaton N, Dumont C, Severin I, Perdu E, Zalko D, Cherkaoui-Malki M, et al. Genotoxic and endocrine activities of bis (hydroxyphenyl) methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology*. 2009;255(1-2):15-24.
11. Vandenberg LN. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose-response*. 2014;12(2): 13-020.
12. Vi  as R, Watson CS. Bisphenol S disrupts estradiol-induced nongenomic signaling in a rat pituitary cell line: effects on cell functions. *Environmental health perspectives*. 2013;121(3):352.
13. Dodds EC, Lawson W. Synthetic strogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*. 1936;137(3476):996.

14. Göktekin E, Barlas N. Histopathological effects of 4-tert-octylphenol treatment through the pregnancy period, on the pituitary, adrenal, pancreas, thyroid and parathyroid glands of offspring rats at adulthood. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2008;26(2):199-205.
15. Calafat AM NL. Human exposures and body burdens of endocrine-disrupting chemicals. In: Gore AC, ed. *Endocrinedisrupting chemicals: from basic research to clinical practice*. Totowo, NJ. 2007:253-68.
16. Ishihara K, Warita K, Tanida T, Sugawara T, Kitagawa H, Hoshi N. Does paternal exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affect the sex ratio of offspring? *Journal of veterinary medical science*. 2007;69(4):347-52.
17. El-Gohary M, Awara WM, Nassar S, Hawas S. Deltamethrin-induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology*. 1999;132(1):1-8.
18. Remillard RB, Bunce NJ. Linking dioxins to diabetes: epidemiology and biologic plausibility. *Environmental health perspectives*. 2002;110(9):853.
19. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette Jr LJ, et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental health perspectives*. 1996;104(4):741.
20. Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetcke KP, et al. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environmental health perspectives*. 1998;106(1):11.
21. Hansen LG. Stepping backward to improve assessment of PCB congener toxicities. *Environmental Health Perspectives*. 1998;106(1):171.
22. Schmidt J, Mašič LP. Organic synthetic environmental endocrine disruptors: structural classes and metabolic fate. *Acta Chimica Slovenica*. 2012;59:4.
23. Liao C, Liu F, Kannan K. Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environmental science & technology*. 2012;46(12):6515-22.
24. Yang Y, Guan J, Yin J, Shao B, Li H. Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China. *Chemosphere*. 2014;112:481-6.
25. Tsai W-T. Human health risk on environmental exposure to bisphenol-A: a review. *Journal of Environmental Science and Health Part C*. 2006;24(2):225-55.
26. Liao C, Kannan K. Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(19):4655-62.
27. LaKind JS, Naiman DQ. Temporal trends in bisphenol A exposure in the United States from 2003–2012 and factors associated with BPA exposure: Spot

samples and urine dilution complicate data interpretation. *Environmental research*. 2015;142:84-95.

28. Cobellis L, Colacurci N, Trabucco E, Carpentiero C, Grumetto L. Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women. *Biomedical Chromatography*. 2009;23(11):1186-90.
29. Viñas P, Campillo N, Martínez-Castillo N, Hernández-Córdoba M. Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010;397(1):115-25.
30. Liao C, Liu F, Guo Y, Moon H-B, Nakata H, Wu Q, et al. Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environmental science & technology*. 2012;46(16):9138-45.
31. Rykowska I, Wasiak W. Properties, threats, and methods of analysis of bisphenol A and its derivatives. *Acta chromatographica*. 2006;16:7.
32. Atanassova N, McKinnell C, Turner K, Walker M, Fisher J, Morley M, et al. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology*. 2000;141(10):3898-907.
33. Bondesson M JJ, Pongratz I, Oleab N, Cravedi JP, Zalkoc D, Håkansson H, et al. A Cascade of Effects of Bisphenol. *A Reproductive Toxicology*. 2009;28:563-67.
34. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine reviews*. 2009;30(1):75-95.
35. Shelby M. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. *Ntp cerhr mon*. 2008(22):v, vii-ix, 1-64.
36. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human reproduction*. 2002;17(11):2839-41.
37. Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental health perspectives*. 2005;113(4):391.
38. Azzouz A, Rascón AJ, Ballesteros E. Simultaneous determination of parabens, alkylphenols, phenylphenols, bisphenol A and triclosan in human urine, blood and breast milk by continuous solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2016;119:16-26.

39. Cwiek-Ludwicka K. Bisphenol A (BPA) in food contact materials-new scientific opinion from EFSA regarding public health risk. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2015;66(4).
40. Michałowicz J. Bisphenol A—sources, toxicity and biotransformation. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2014;37(2):738-58.
41. Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, et al. Global assessment of bisphenol A in the environment: review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. *Dose-Response*. 2015;13(3):1559325815598308.
42. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon J-P, Goeyens L, Lecomte P, et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and chemical toxicology*. 2012;50(10):3725-40.
43. Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Molecular and cellular endocrinology*. 2006;254:179-86.
44. Vogel SA. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a “safety”. *American journal of public health*. 2009;99(S3):S559-S66.
45. Erler C, Novak J. Bisphenol a exposure: human risk and health policy. *Journal of pediatric nursing*. 2010;25(5):400-7.
46. Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, et al. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. *Molecular and cellular endocrinology*. 1998;142(1-2):203-14.
47. Ma R, Sassoon DA. PCBs exert an estrogenic effect through repression of the Wnt7a signaling pathway in the female reproductive tract. *Environmental health perspectives*. 2006;114(6):898.
48. Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, Mornagui B. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment international*. 2014;64:83-90.
49. Johnson SA, Javurek AB, Painter MS, Ellersieck MR, Welsh Jr TH, Camacho L, et al. Effects of developmental exposure to bisphenol A on spatial navigational learning and memory in rats: A Clarity-Bpa study. *Hormones and behavior*. 2016;80:139-48.
50. Jašarević E, Williams SA, Vandas GM, Ellersieck MR, Liao C, Kannan K, et al. Sex and dose-dependent effects of developmental exposure to bisphenol A on anxiety and spatial learning in deer mice (*Peromyscus maniculatus bairdii*) offspring. *Hormones and behavior*. 2013;63(1):180-9.
51. Hassan ZK, Elobeid MA, Virk P, Omer SA, ElAmin M, Daghestani MH, et al. Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012;2012.

52. Izzotti A, Kanitz S, D'Agostini F, Camoirano A, De Flora S. Formation of adducts by bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA in vitro and in liver and mammary tissue of mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2009;679(1):28-32.
53. Audebert M, Dolo L, Perdu E, Cravedi J-P, Zalko D. Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Archives of toxicology*. 2011;85(11):1463.
54. Ivett J, Brown B, Rodgers C, Anderson B, Resnick M, Zeiger E. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. IV. Results with 15 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1989;14(3):165-87.
55. Michałowicz J, Mokra K, Bąk A. Bisphenol A and its analogs induce morphological and biochemical alterations in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Toxicology in Vitro*. 2015;29(7):1464-72.
56. Peyre L, Rouimi P, de Sousa G, Héliers-Toussaint C, Carré B, Barcellini S, et al. Comparative study of bisphenol A and its analogue bisphenol S on human hepatic cells: a focus on their potential involvement in nonalcoholic fatty liver disease. *Food and chemical toxicology*. 2014;70:9-18.
57. Mills D. *Akvaryum Bakımı A, İnkılap Kitabevi, İstanbul, Türkiye*. 1994.
58. Molina AM, Abril N, Morales-Prieto N, Monterde JG, Lora AJ, Ayala N, et al. Evaluation of toxicological endpoints in female zebrafish after bisphenol A exposure. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;112:19-25.
59. Huo W, Xia W, Wan Y, Zhang B, Zhou A, Zhang Y, et al. Maternal urinary bisphenol A levels and infant low birth weight: A nested case-control study of the Health Baby Cohort in China. *Environment international*. 2015;85:96-103.
60. Troisi J, Mikelson C, Richards S, Symes S, Adair D, Zullo F, et al. Placental concentrations of bisphenol A and birth weight from births in the Southeastern US. *Placenta*. 2014;35(11):947-52.
61. Corbel T, Gayrard V, Puel S, Lacroix M, Berrebi A, Gil S, et al. Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide, in the isolated perfused human placenta. *Reproductive Toxicology*. 2014;47:51-8.
62. Gao C, Liu L, Ma W, Zhu N, Jiang L, Ren N, et al. Bisphenol A in urine of Chinese young adults: concentrations and sources of exposure. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 2016;96(2):162-7.
63. Jaeg JP, Perdu E, Dolo L, Debrauwer L, Cravedi J-P, Zalko D. Characterization of new bisphenol A metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(15):4935-42.

64. Atkinson A, Roy D. In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite (s). *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;210(2):424-33.
65. Cabaton N, Chagnon M-C, Lhuguenot J-C, Cravedi J-P, Zalko D. Disposition and metabolic profiling of bisphenol F in pregnant and nonpregnant rats. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(26):10307-14.
66. Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, et al. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences*. 2005;84(2):249-59.
67. Hashimoto Y, Moriguchi Y, Oshima H, Kawaguchi M, Miyazaki K, Nakamura M. Measurement of estrogenic activity of chemicals for the development of new dental polymers. *Toxicology in vitro*. 2001;15(4-5):421-5.
68. Kitamura S, Sanoh S, Kohta R, Suzuki T, Sugihara K, Fujimoto N, et al. Metabolic activation of proestrogenic diphenyl and related compounds by rat liver microsomes. *Journal of health science*. 2003;49(4):298-310.
69. Pisapia L, Del Pozzo G, Barba P, Caputo L, Mita L, Viggiano E, et al. Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. *General and comparative endocrinology*. 2012;178(1):54-63.
70. Rosenmai AK, Dybdahl M, Pedersen M, Alice van Vugt-Lussenburg BM, Wedeby EB, Taxvig C, et al. Are structural analogues to bisphenol a safe alternatives? *Toxicological sciences*. 2014;139(1):35-47.
71. Stroheker T, Picard K, Lhuguenot J, Canivenc-Lavier M, Chagnon M. Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines. *Food and chemical toxicology*. 2004;42(6):887-97.
72. Kidani T, Kamei S, Miyawaki J, Aizawa J, Sakayama K, Masuno H. Bisphenol A downregulates Akt signaling and inhibits adiponectin production and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2010;17(8):834-43.
73. Chen MY, Ike M, Fujita M. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environmental toxicology*. 2002;17(1):80-6.
74. Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawaki M, Imatanaka N, Shinoda K, Takatsuki M. Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology*. 2003;183(1-3):93-115.
75. Yamasaki K, Noda S, Imatanaka N, Yakabe Y. Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicology letters*. 2004;146(2):111-20.
76. Stroheker T, Chagnon M-C, Pinnert M-F, Berges R, Canivenc-Lavier M-C. Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reproductive toxicology*. 2003;17(4):421-32.

77. Higashihara N, Shiraishi K, Miyata K, Oshima Y, Minobe Y, Yamasaki K. Subacute oral toxicity study of bisphenol F based on the draft protocol for the “Enhanced OECD Test Guideline no. 407”. *Archives of toxicology*. 2007;81(12):825-32.
78. Liao C, Kannan K. A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2014;31(2):319-29.
79. Ye X, Wong L-Y, Kramer J, Zhou X, Jia T, Calafat AM. Urinary concentrations of bisphenol A and three other bisphenols in convenience samples of US adults during 2000–2014. *Environmental science & technology*. 2015;49(19):11834-9.
80. Héliers-Toussaint C, Peyre L, Costanzo C, Chagnon M-C, Rahmani R. Is bisphenol S a safe substitute for bisphenol A in terms of metabolic function? An in vitro study. *Toxicology and applied pharmacology*. 2014;280(2):224-35.
81. Öman C, Hynning P-Å. Identification of organic compounds in municipal landfill leachates. *Environmental Pollution*. 1993;80(3):265-71.
82. Kienhuis PG, Geerdink RB. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis of surface and waste water with atmospheric pressure chemical ionisation: II. Applications1. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2000;19(7):460-74.
83. Grignard E, Lapenna S, Bremer S. Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicology in vitro*. 2012;26(5):727-31.
84. Gramec Skledar D, Troberg J, Lavdas J, Peterlin Mašič L, Finel M. Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. *Xenobiotica*. 2015;45(6):511-9.
85. Le Fol V, Aït-Aïssa S, Cabaton N, Dolo L, Grimaldi M, Balaguer P, et al. Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-s in zebrafish and human in vitro models used for toxicity and estrogenicity screening. *Environmental science & technology*. 2015;49(6):3860-8.
86. Eladak S, Grisin T, Moison D, Guerquin M-J, N'Tumba-Byn T, Pozzi-Gaudin S, et al. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and sterility*. 2015;103(1):11-21.
87. Roelofs MJ, van den Berg M, Bovee TF, Piersma AH, van Duursen MB. Structural bisphenol analogues differentially target steroidogenesis in murine MA-10 Leydig cells as well as the glucocorticoid receptor. *Toxicology*. 2015;329:10-20.
88. Feng Y, Jiao Z, Shi J, Li M, Guo Q, Shao B. Effects of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells. *Chemosphere*. 2016;147:9-19.
89. Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, et al. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology*. 2012;55(2):395-407.

90. Huc L, Lemarié A, Guéraud F, Héliers-Toussaint C. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicology in vitro*. 2012;26(5):709-17.
91. Sui Y, Ai N, Park S-H, Rios-Pilier J, Perkins JT, Welsh WJ, et al. Bisphenol A and its analogues activate human pregnane X receptor. *Environmental health perspectives*. 2012;120(3):399.
92. Kime DE. Disruption in eggs, embryos, larvae and juvenile fish. *Endocrine Disruption in Fish*: Springer. 1998;187-200.
93. Power D, Llewellyn L, Faustino M, Nowell MA, Björnsson BT, Einarsdóttir IE, et al. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2001;130(4):447-59.
94. Vajda AM, Norris DO. Endocrine-active chemicals (EACs) in fishes. *Hormones and Reproduction of Vertebrates: Fishes*: Elsevier. 2011:245-64.
95. Ji K, Hong S, Kho Y, Choi K. Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental science & technology*. 2013;47(15):8793-800.
96. Lazier C. Vitellogenin gene expression in teleost fish. *Biochemistry and molecular biology of fishes*. 1993:391-405.
97. Shi X, Du Y, Lam PK, Wu RS, Zhou B. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. *Toxicology and applied pharmacology*. 2008;230(1):23-32.
98. Naderi M, Wong MY, Gholami F. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic toxicology*. 2014;148:195-203.
99. Kinch CD, Ibrazehiebo K, Jeong J-H, Habibi HR, Kurrasch DM. Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(5):1475-80.
100. Liao C, Liu F, Alomirah H, Loi VD, Mohd MA, Moon H-B, et al. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environmental science & technology*. 2012;46(12):6860-6.
101. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2004;15(1):91-6.
102. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *International journal of food science & technology*. 2001;36(7):703-25.
103. Cheeseman K, Slater T. An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*. 1993;49(3):481-93.

104. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*. 1993;57(5):715S-24S.
105. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 2006;160(1):1-40.
106. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *The American journal of medicine*. 1991;91(3):S23-S30.
107. Arsova-Saradinovska Z, Eken A, Matevska N, Erdem O, Sayal A, Savaser A, et al. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *Clinical biochemistry*. 2009;42(12):1228-35.
108. Elliott JG. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technology-Champaign Then Chicago-*. 1999;53:46-9.
109. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*. 1991;91(3):S31-S8.
110. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1. *Free radical biology and medicine*. 2001;31(11):1287-312.
111. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis*. 2007;115(2):81-103.
112. Zhang J-Z, Wu Y, Williams BY, Rodney G, Mandel F, Strasburg GM, et al. Oxidation of the skeletal muscle Ca²⁺ release channel alters calmodulin binding. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1999;276(1):C46-C53.
113. Rahman I. Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*. 2002;1(3):291-315.
114. KAVAS GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 1989;9(1):1-8.
115. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary A, Jha U, Yadav UC, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer. *Asian Pac Cancer Prev*. 2014;15:4405-9.
116. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*. 186: Elsevier, 1990: 407-21.
117. Pryor WA, Stanley J. Suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *The Journal of organic chemistry*. 1975;40(24):3615-7.
118. Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. *Free Radicals in Diagnostic Medicine: Springer*, 1994: 17-27.

119. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(9):1482-95.
120. Prokai L, Yan LJ, Vera-Serrano JL, Stevens SM, Forster MJ. Mass spectrometry-based survey of age-associated protein carbonylation in rat brain mitochondria. *Journal of mass spectrometry*. 2007;42(12):1583-9.
121. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta*. 2003;329(1-2):23-38.
122. Hardie L, Briggs J, Davidson L, Allan J, King R, Williams G, et al. The effect of hOGG1 and glutathione peroxidase I genotypes and 3p chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer. *Carcinogenesis*. 2000;21(2):167-72.
123. Kamendulis LM, Klaunig JE. Role of Oxidative Stress in Chemical Carcinogenesis. *Environmental Stressors in Health and Disease*: CRC Press; 2001: 106-28.
124. Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods in enzymology*. 300: Elsevier, 1999: 56-66.
125. Diplock A. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series. 1998:59.
126. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American journal of medicine*. 1994;97(3):S5-S13.
127. Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(11):3122-8.
128. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*. 1969;244(22):6049-55.
129. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya. 1995:32.
130. Sandström J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(29):19163-6.
131. Milani P, Gagliardi S, Cova E, Cereda C. SOD1 transcriptional and posttranscriptional regulation and its potential implications in ALS. *Neurology research international*. 2011:2011.

132. Groner Y, Elroy-Sterol O, Avraham K, Schickler M, Knobler H, Minc-Golomb D, et al. Cell damage by excess CuZnSOD and Down's syndrome. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 1994;48(5-6):231-40.
133. Mills GC. Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry*. 1957;229(1):189-97.
134. Arteel GE, Sies H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2001;10(4):153-8.
135. Flohe L. Die glutathionperoxidase: Enzymologie und biologische aspekte. *Klinische Wochenschrift*. 1971;49(12):669-83.
136. Farina M, Campos F, Vendrell I, Berenguer J, Barzi M, Pons S, et al. Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. *Toxicological sciences*. 2009;112(2):416-26.
137. Aydemir B, Sarı EK. Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*. 2014;2(2):56-60.
138. Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. *The FEBS journal*. 2007;274(9):2163-80.
139. Lei XG, Cheng W-H, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:41-61.
140. Aebi Hi. Methods of enzymatic analysis. *Catalase*. 1983:673-86.
141. Gutteridge J, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;899(1):136-47.
142. Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 1999;32(8):595-603.
143. D'souza A, Kurien BT, Rodgers R, Shenoi J, Kurono S, Matsumoto H, et al. Detection of catalase as a major protein target of the lipid peroxidation product 4-HNE and the lack of its genetic association as a risk factor in SLE. *BMC Medical Genetics*. 2008;9(1):62.
144. Samuelsson M, Vainikka L, Öllinger K. Glutathione in the blood and cerebrospinal fluid: a study in healthy male volunteers. *Neuropeptides*. 2011;45(4):287-92.
145. Murray RK, Mayes P, Granner D, Radwell V. Harper'in biyokimyası. Çevirenler: Prof Dr Gülriz Menten, Prof Dr Biltan Ersöz Barış Kitabevi. 1993.
146. Haddad JJ, Harb HL. I-γ-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro-and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox (γ) immunologic sensor (s)? *Molecular immunology*. 2005;42(9):987-1014.

147. Freshney R. Measurement of viability and cytotoxicity. *Culture of animal cells*. 1994;3:287-307.
148. Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Polyamine protocols*: Springer; 1998: 179-84.
149. Riss TL, Moravec RA, O'Brien MA, Hawkins EM, Niles A. 28 Homogeneous Multiwell Assays for Measuring Cell Viability, Cytotoxicity, and Apoptosis. *Handbook of Assay Development in Drug Discovery*. 2006:385.
150. Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tuor U. The MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and environmental microbiology*. 1999;65(8):3727-9.
151. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer research*. 1991;51(10):2515-20.
152. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
153. Wickens AP. Ageing and the free radical theory. *Respiration physiology*. 2001;128(3):379-91.
154. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
155. Wojtala A, Bonora M, Malinska D, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods in enzymology*. 542: Elsevier; 2014: 243-62.
156. Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*. 1978;17(13):2639-44.
157. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy*: ACS Publications; 2011: 1-37.
158. Cheung C, Zheng G, Li A, Richardson B, Lam P. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic toxicology*. 2001;52(3-4):189-203.
159. Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte Jr DW. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical biochemistry*. 1990;184(2):193-9.
160. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical biochemistry*. 1980;106(1):207-12.

161. Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Free radicals in diagnostic medicine*: Springer; 1994. p. 43-58.
162. Draper H, Squires E, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radical Biology and Medicine*. 1993;15(4):353-63.
163. Halliwell B. Commentary oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free radical research*. 1996;25(1):57-74.
164. Stadtman E, Oliver C. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 266. 2005;2008:1991.
165. Smith PK, Krohn RI, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
166. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical biochemistry*. 1988;175(1):231-7.
167. Vandenberg LN. Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. *Vitamins & Hormones*. 94: Elsevier; 2014. p. 129-65.
168. Rochester JR. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive toxicology*. 2013;42:132-55.
169. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*. 2009;30(4):293-342.
170. Fagin D. Toxicology: The learning curve. *Nature News*. 2012;490(7421):462.
171. Lee YS, Kang KS, Cho SD. Additive estrogenic activities of the binary mixtures of four estrogenic chemicals in recombinant yeast expressing human estrogen receptor. *Journal of veterinary science*. 2002;3(1):1-5.
172. Vandenberg LN, Hunt PA, Myers JP, vom Saal FS. Human exposures to bisphenol A: mismatches between data and assumptions. *Reviews on environmental health*. 2013;28(1):37-58.
173. Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Rathahao E, Debrauwer L, et al. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environmental health perspectives*. 2003;111(3):309.
174. Knasmüller S, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, Schwab C, Uhl M, et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens

- and antimutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1998;402(1):185-202.
175. Zhang R, Liu R, Zong W. Bisphenol S interacts with catalase and induces oxidative stress in mouse liver and renal cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2016;64(34):6630-40.
 176. Khan S, Beigh S, Chaudhari BP, Sharma S, Aliul Hasan Abdi S, Ahmad S, et al. Mitochondrial dysfunction induced by Bisphenol A is a factor of its hepatotoxicity in rats. *Environmental toxicology*. 2016;31(12):1922-34.
 177. Korkmaz A, Ahbab MA, Kolankaya D, Barlas N. Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(10):2865-71.
 178. Sangai NP, Verma RJ, Trivedi MH. Testing the efficacy of quercetin in mitigating bisphenol A toxicity in liver and kidney of mice. *Toxicology and industrial health*. 2014;30(7):581-97.
 179. Abdel-Wahab WM. Thymoquinone attenuates toxicity and oxidative stress induced by bisphenol A in liver of male rats. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 2014;17(11):1152-60.
 180. Moon MK, Kim MJ, Jung IK, Koo YD, Ann HY, Lee KJ, et al. Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *Journal of Korean medical science*. 2012;27(6):644-52.
 181. Geng S, Wang S, Zhu W, Xie C, Li X, Wu J, et al. Curcumin attenuates BPA-induced insulin resistance in HepG2 cells through suppression of JNK/p38 pathways. *Toxicology letters*. 2017;272:75-83.
 182. Ozaydin T, Oznurlu Y, Sur E, Celik I, Uluisik D, Dayan M. Effects of bisphenol A on antioxidant system and lipid profile in rats. *Biotechnic & Histochemistry*. 2018:1-8.
 183. Elswefy SES, Abdallah FR, Atteia HH, Wahba AS, Hasan RA. Inflammation, oxidative stress and apoptosis cascade implications in bisphenol A-induced liver fibrosis in male rats. *International journal of experimental pathology*. 2016;97(5):369-79.
 184. Ogo FM, Siervo GE, Gonçalves GD, Cecchini R, Guarnier FA, Anselmo-Franci JA, et al. Low doses of bisphenol A can impair postnatal testicular development directly, without affecting hormonal or oxidative stress levels. *Reproduction, Fertility and Development*. 2017;29(11):2245-54.
 185. Kaur S, Saluja M, Bansal M. Bisphenol A induced oxidative stress and apoptosis in mice testes: Modulation by selenium. *Andrologia*. 2018;50(3):e12834.

8. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı- Soyadı: Büşra ÖZYURT

Doğum yeri ve tarihi: Ankara-1992

Uyruğu: TC

İletişim Adresi ve telefonu: Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Söğütözü Mahallesi,
2176. Sk. No:5, 06520 Çankaya/Ankara, 0530 738 24 12

II. Eğitimi

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2010-2015

Ankara Süleyman Demirel Anadolu Lisesi 2006-2010

Etimesgut İlköğretim Okulu 1998-2006

III. Mesleki Deneyimi

Yardımcı Eczacılık 2016-2017

TC Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Türkiye Farmakovijilans
Merkezi Nisan 2018-

IV. Bilimsel Faaliyetleri

1. Özyurt B, Yıldıztekin K.G, Gümüşel B, Erkekoğlu P. (2017, Mayıs) The Cytotoxic Potential Of Different Bisphenols in Human Hepatoma Cells. *Uluslararası Rating Academy Kongresi. Bilim, Kültür ve Sanatta Güzeli Arayış, Çanakkale, Türkiye*
2. Köse Ö, Erkekoğlu P, Özyurt B, Koçer-Gümüşel B. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Obezite İlişkisine Genel Bir Bakış. *TürkiyeKlinikleri J Pharm Sci* 2017;6(2):77-93
3. Özyurt B, Erkekoglu P. Toksik Kimyasal Maddeler ve Kahve Tüketimi ile Pankreas Kanseri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, Ankara,2015
4. Özyurt B. Pankreas Kanseri Neden Olduğu Düşünülen Toksik Kimyasal Maddeler. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Mezuniyet Projesi*, Ankara, 2015

