

**BİSFENOL A (BPA)' NİN VE
METABOLİTLERİNİN DNA ÜZERİNDEKİ
GENOTOKSİK, SİTOTOKSİK VE OKSİDATİF
HASAR POTANSİYELLERİNİN İNSAN KAN
LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE İNCELENMESİ**

SEDA YAPRAK EKİNCİ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
TEMMUZ-2015**

**BİSFENOL A (BPA)' NİN VE
METABOLİTLERİNİN DNA ÜZERİNDEKİ
GENOTOKSİK, SİTOTOKSİK VE OKSİDATİF
HASAR POTANSİYELLERİNİN İNSAN KAN
LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE İNCELENMESİ**

SEDA YAPRAK EKİNCİ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayla ÇELİK**

**MERSİN
TEMMUZ-2015**

Seda Yaprak EKİNCİ tarafından Prof. Dr. Ayla ÇELİK danışmanlığında hazırlanan “ Bisfenol A (BPA)’nın ve Metabolitlerinin DNA Üzerindeki Genotoksik, Sitotoksik ve Oksidatif Hasar Potansiyellerinin İnsan Kan Lenfosit Kültürlerinde İncelenmesi ” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Ayla ÇELİK

Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI

Yard. Doç.Dr. Dilek BATTAL

D. Battal.

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21.10.2015 tarih ve 2015.19.1.767 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

BİSFENOL A (BPA)'NIN VE METABOLİTLERİNİN DNA ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK, SİTOTOKSİK VE OKSİDATİF HASAR POTANSİYELLERİNİN İNSAN KAN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE İNCELENMESİ

SEDA YAPRAK EKİNCİ

ÖZ

Bu çalışmada, yapay reçine ve polikarbonatlı plastik üretiminde kullanılarak hayatımızın hemen her alanına dahil olan bisfenol A (BPA)'nın ve metabolitlerinin insan kan lenfosit kültürlerinde genotoksik, sitotoksik ve oksidatif potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada *in vitro* mikronükleus (MN) testi ve komet yöntemi kullanılmış olup hücrelerin sitokinez blok proliferasyon indeksi (CBPI) hesaplanmıştır. Ayrıca BPA'nın metabolitlerinin de etkilerini görmek için S-9 aktivasyon sistemi kullanılarak *in vivo* ortam oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada sağlıklı, sigara ve alkol kullanmayan 25 yaşında 3 erkek bireyden kan alınmıştır. S-9 metabolik aktivasyonlu ve metabolik aktivasyonsuz insan lenfosit hücre kültürü üzerine BPA'nın 0.063µg/L, 0.128µg/L ve 0.32µg/L konsantrasyonları eklenmiştir. BPA'nın kullanılan konsantrasyonlarının negatif kontrollerle karşılaştırılması sonucu MN frekansında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek MN frekansı, kullanılan en yüksek konsantrasyon olan 0.32µg/L' de görülmüştür. Ayrıca her konsantrasyonun kendine ait S-9' lu ve S-9' suz ortamları karşılaştırıldığında bunlar arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Komet testi sonucunda S-9' lu ve S-9' suz ortamda elde edilen hasarlı hücre yüzdesi (HHY) ve genetik hasar indeksi (GHI) konsantrasyon artışına bağlı olarak anlamlı bir artış göstermiştir. CBPI değerleri hesaplandığında ise değerlerde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada elde edilen veriler BPA'nın kullanılan konsantrasyonlarının insan kan lenfosit hücre kültüründe genotoksik, sitotoksik ve oksidatif potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Bisfenol A, mikronükleus, komet, S-9 aktivasyon sistemi, sitokinez blok proliferasyon indeksi

Danışman: Prof. Dr. Ayla Çelik , Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

THE INVESTIGATION OF GENOTOXIC AND CYTOTOXIC EFFECTS AND OXIDATIVE DAMAGE POTENTIALS OF BISPHENOL A (BPA) AND ITS METABOLITES ON DNA IN HUMAN BLOOD LYMPHOCYTE CULTURES

SEDA YAPRAK EKİNCİ

ABSTRACT

In this study, it is aimed to investigate the effects of genotoxic and cytotoxic and oxidative potentials of Bisphenol A and its metabolites used in plastic production and synthetic resin in human blood lymphocyte cultures synthetic resin. In this study, *in vitro* micronucleus test and comet test (single cell gel electrophoresis method) is used and cytokinesis block proliferation index (CBPI) is measured. Besides the S-9 activation system is used to determine the effects its metabolites of Bisphenol A. In this study, The blood samples were collected from three healthy and non-smoking male persons aged 25. The lymphocytes cultures were set up as without and with S-9 activation system. Three different concentrations of Bisphenol A were used as 0,063µg/L, 0,128 µg/L, 0,32 µg/L. There is a significant difference between negative control and all the concentrations of Bisphenol A for micronucleus frequency, CBPI values and damaged cell percent, genetic damage index in comet test ($p<0.05$). There is no significant difference between with S-9 and without S-9 activation system treatment concentrations for micronucleus frequency, CBPI values and damaged cell percent, genetic damage index in comet test. There is a significant among all the concentrations of Bisphenol A for CBPI values, micronucleus frequency and damaged cell percent, genetic damage index in comet test ($p<0.05$). As a result, Bisphenol A and its metabolites are genotoxic, cytotoxic and have potential the oxidative damage on DNA in human blood lymphocytes cultures under in vitro condition.

Keywords: Bisphenol A, micronucleus, comet, S-9 activation system, cytokinesis block proliferation index

Advisor: Prof. Dr. Ayla ÇELİK, Department of Biology, University of Mersin

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca sabrından, anlayışından, yardım ve katkılarından dolayı beni her zaman anlayan danışman hocam Sn. Prof. Dr. Ayla ÇELİK' e çok teşekkür ederim.

Laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağladığı için Biyoloji Bölüm Başkanı Sn. Prof. Dr. Gökhan CORAL' a teşekkür ederim.

Katkılarından dolayı Sn. Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN' e teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca her türlü destek veren ve çalışmamda beni yalnız bırakmayan laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bana maddi manevi her konuda destek veren ve her zaman arkamda duran aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	6
2.1. BPA' NIN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	6
2.2. BPA' YA MARUZİYET.....	7
2.2.1. BPA' nın Çevresel Potansiyeli.....	7
2.2.2. BPA' nın Gıdalarla Alımı.....	8
2.2.3. BPA' nın Dental Dolgulardan Salınımı.....	9
2.3. BPA' NIN İNSAN DOKU VE SIVILARINDAKİ SEVİYESİ.....	9
2.3.1. Serum, Kan ve Plazma.....	9
2.3.2. Anne Sütü.....	10
2.3.3. İdrar.....	10
2.3.4. Hamilelikle İlişkili Sıvılar.....	11
2.4. BPA' NIN HORMONAL AKTİVİTESİ.....	11

2.4.1. BPA' nın Östrojen ile İlgili Mekanizması.....	11
2.4.2. BPA' nın Androjen ile İlgili Mekanizması.....	12
2.5. BPA' NIN OKSİDATİF HASAR POTANSİYELİ.....	13
2.6. BPA' NIN BİYODEGRADASYONU.....	15
2.7. BPA' NIN METABOLİZASYONU.....	17
2.7.1. Mantarlarda.....	17
2.7.2. Bitkilerde.....	17
2.7.3. Balıklarda.....	17
2.7.4. Memelilerde.....	17
2.8. GENOTOKSİSİTE, SİTOTOKSİSİTE VE OKSİDATİF POTANSİYEL.....	20
2.9. İN VİTRO YÖNTEMLER.....	21
2.9.1. Mikronükleus (MN) Yöntemi.....	21
2.9.2. Komet Yöntemi.....	24
2.10. SİTOKİNEZ BLOK PROLİFERASYON İNDEKSİ (CBPI).....	25
2.11. S-9 AKTİVASYON SİSTEMİ.....	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1. GEREÇLER.....	27
3.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	27
3.1.2. BPA Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....	28
3.1.3. Pozitif Kontrollerin Hazırlanması.....	29

3.1.4. Kullanılan Cihazlar.....	29
3.2.YÖNTEM.....	30
3.2.1. S-9' suz ve S-9' lu MN Preparatlarının Hazırlanması.....	30
3.2.2. S-9' suz ve S-9' lu Komet Preparatlarının Hazırlanması.....	31
3.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	33
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	34
4.1. BULGULAR.....	34
4.1.1. Lenfositlere Uygulanan MN Testi Sonuçları.....	35
4.1.2. CBPI Sonuçları.....	39
4.1.3. Lenfositlere Uygulanan Komet Testi Sonuçları.....	42
4.1.3.1. Lenfositlerde Yapılmış Komet Analizine Göre Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY) Sonuçları.....	43
4.1.3.2. Lenfositlerde Yapılmış Komet Analizine Göre Hasarlı Genetik Hasar İndeksi (GHI) Sonuçları.....	45
4.2.TARTIŞMA.....	49
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. BPA' nın genel özellikleri	7
Çizelge 4.1. S-9' suz ortamda elde edilen MN değerleri.....	36
Çizelge 4.2. S-9' lu ortamda elde edilen MN değerleri	37
Çizelge 4.3. BPA' daki konsantrasyon artışına bağlı olarak elde edilen MN değerleri.....	38
Çizelge 4.4. S-9' suz ortamda lenfosit hücrelerine uygulanan MN testi sonucunda elde edilen CBPI değerleri.....	40
Çizelge 4.5. S-9' lu ortamda lenfosit hücrelerinde uygulanan MN testi sonucunda elde edilen CBPI değerleri.....	40
Çizelge 4.6. BPA' daki konsantrasyon artışına bağlı olarak elde edilen CBPI değerleri.....	41
Çizelge 4.7. S-9' suz ortamda lenfosit hücrelerine uygulanan komet testi sonucunda elde edilen HHY değerleri.....	43
Çizelge 4.8. S-9' lu ortamda lenfosit hücrelerine uygulanan komet testi sonucunda elde edilen HHY değerleri.....	44
Çizelge 4.9. lenfositlere uygulanan komet testi sonucunda elde edilen HHY değerleri.....	44
Çizelge 4.10. S-9' suz ortamda lenfosit hücrelerine uygulanan komet testi sonucunda elde edilen GHI değerleri.....	46
Çizelge 4.11. S-9' lu ortamda lenfosit hücrelerine uygulanan komet testi sonucunda elde edilen GHI değerleri.....	46
Çizelge 4.12. lenfositlere uygulanan komet testi sonucunda elde edilen HHY değerleri.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Plastiklerde kullanılan rakamların anlamları	3
Şekil 2.1. Bisfenol A' nın fenol ve asetonadan yoğunlaştırılması	6
Şekil 2.2. Bisfenol A (BPA)' nın kimyasal yapısı	6
Şekil 2.3. BPA'nın biyodegradasyon mekanizması	16
Şekil 2.4. Bisfenol A ve ana metabolitleri	19
Şekil 2.5. Sitotoksik ajanların etkisindeki hücrelerin olası durumları	20
Şekil 2.6. Sitokinez Blok MikroNükleus (CBMN) Dağılımı	23
Şekil 4.1. 1 MN elde edilen S-9' lu ve S-9' suz grupların karşılaştırması	39
Şekil 4.2. 2 MN elde edilen S-9' lu ve S-9' suz grupların karşılaştırması	39
Şekil 4.3. S-9' lu ve S-9' suz ortamda çalışılan grupların CBPI değerlerinin karşılaştırması	41
Şekil 4.4. Sitokinezi bloke edilmiş 1 MN' li hücre.....	42
Şekil 4.5. Sitokinezi bloke edilmiş 2 MN' li hücre.....	42
Şekil 4.6. HHY değerleri elde edilen S-9' lu ve S-9' suz grupların karşılaştırması.....	44
Şekil 4.7. GHI değerleri elde edilen S-9' lu ve S-9' suz grupların karşılaştırması.....	47
Şekil 4.8. Komet oluşturmuş lenfositlerin floresan mikroskoptaki görüntüleri.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

- BADGE: Bisfenol A diglisil eter
BFDGE: Bisfenol F diglisil eter
BN: Binükleus
BPA: Bisfenol A
BPF: Bisfenol F
CBPI: Sitokinez blok proliferasyon indeksi
CD-1: Sprague Dawley fareleri
CF: Siklofosfamid
Cyt- B: Sitokalsin B
ER: Östrojen reseptörü
FAO: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA: Gıda ve İlaç İdaresi
GC-MS: Gaz kromatografisi kütle spektroskopisi
GHI: Genetik hasar indeksi
HHY: Hasarlı hücre yüzdesi
HPLC: Yüksek performans sıvı kromatografisi
KKD: Kardeş kromatid değişimi
LC₅₀: Letal konsantrasyon
LMA: Düşük erime noktalı agar
MMC: Mitomisin C
MN: Mikronükleus
NMA: Normal erime noktalı agar
NPB: Nükleoplazmik köprü
NTP: Ulusal Toksikoloji Programı
PBS: Fosfat tamponu
PHA: Fitohemaglutinin
ppb: Her milyardaki partikül miktarı
S-9: Karaciğer homozenizatı
UGT: Üridin di fosfat glukuronil transferaz enzimi
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Son derece hızlı nüfus artışı ve çalışma hayatındaki hızlı gelişmeler nedeniyle, çeşitli amaçlar için kullanılmakta olan kimyasalların sayısı her geçen yıl artmaktadır. Günümüzde üretilen kimyasal bileşiklerin sayısı 65 milyonu bulmaktadır [1].

Evsel, endüstriyel ve zirai uygulamalar sonucu çevreye kontrolsüz olarak verilen bu kimyasallar canlıların ciddi sağlık problemleri ile karşı karşıya kalmasına ve yaşamsal faaliyetlerinin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır. Örneğin, endüstri ve kozmetik sanayiinde geniş çapta kullanılan bazı kimyasallar atmosferin koruyucu ozon tabakasını zayıflatmakta, bazılarının uzun süre kullanımı maruz kalanlarda kanser oluşumuna neden olmakta, zararsız zannedilmiş olan birtakım ilaçların fazla kullanımı böbrek yetmezliğine yol açmakta, tarımda kullanılan kimyasallar zemin sularının kimyasal kirlenmesine neden olmaktadır. Ayrıca endüstriyel atık suların içerisinde bulundurdukları toksik maddeler, sucul organizmaların yaşamını etkileyerek, bu canlıların kısa sürede tükenmesine yol açmakta ve ekosistemi olumsuz etkilemektedir [1].

Pek çok kimyasal madde, tehlikesinden habersiz olarak evlerimize, iş yerimize, gıdalarımıza ve vücudumuza girmektedir. Bunlardan birisi de dünya çapında her yıl 1.7 milyar kg civarında üretilerek en yüksek üretim kapasitesine sahip kimyasallar arasında bulunan Bisfenol A (BPA)'dır [1].

1930' larda bilim adamları BPA' nın yapay östrojen olduğunu keşfettiklerinde, o yıllarda bu kimyasalın östrojenik etkisi endüstride verimi arttırmak için sığırları ve kümes hayvanlarını hızlıca büyütmede kullanılıyordu [2].

BPA' nın 1936 yılında dişi sıçanların üreme sistemini uyarıcı etkisi olduğu gösterildiği halde, bu madde sadece son yıllarda kaygı verici bir kimyasal haline gelmiştir. Bu kimyasal 1950' lerden beri polikarbonatlı plastik ve reçinelerin sentezinde monomer olarak kullanılmaktadır [3].

1996 yılında üretilen bisfenolün %48' inin Amerika'da, %32' sinin Doğu Avrupa'da, %20' sinin de Japonya' da üretildiği belirtilmiştir [4].

BPA; fenol reçine, poliakrilat ve poliester yapımında kullanılmakta olup asıl kullanıldığı alan %60' lık oranla polikarbonatlı plastik üretimi ve %26' lık oranla da yapay reçine üretimidir. Polikarbonatlı plastik olarak; CD, otomobil farları, ev aletleri, yiyecek paketleri ve plastik şişelerin yapımında, yapay reçine olarak ise; konserve kutularının yiyeceklerle temas eden yüzeyleri, plastik boru kaplamaları, metal kavanoz kapaklarının yapımı ve tutkalların yapımında kullanılmaktadır. Bu alanların dışında BPA plastik diş dolgusu yapımında da kullanılmaktadır [5,6].

BPA'nın bu alanlarda kullanılmasının nedeni; sert, uzun ömürlü, saydam, -40 °C ile +145 °C' ye kadar dayanıklı ve bazı asit ve yağlara karşı dirençli olmasıdır [7].

BPA besinlerin saklama kalitesini arttırmak, gıdaları daha kullanılabilir hale getirmek için kullanılmaktadır. Gıda katkı maddelerinin güvenli kullanımı için çalışan uluslar arası kuruluşlar [8,9];

1. CAC (Codex Alimentarius Commission) : Birleşmiş milletlere bağlı olarak çalışmaktadır.
2. JECFA (The Joint FAO/ WHO Expert Committee On Food Additives) : FAO/ WHO ortak uzmanlar komitesine verilen isimdir.
3. JMPR (The Joint FAO/ WHO Meeting On Pesticides Residues) : Gıdalardaki pestisit kalıntılarını değerlendiren, gıdaların günlük alımında insan sağlığına zarar vermeyecek maximum pestisit miktarını belirleyen kuruluştur.
4. SCF (Eu-Scientific Committe On Food) : Avrupa Birliği' ne bağlı olan komitedir.
5. FDA (Food and Drug Administration) : ABD' nin ulusal kuruluşudur.

BPA, plastiklerde 3 ve 7 ile numaralandırılmış ürünlerde kullanılmaktadır. Bu kimyasal, başta 2010 yılının Eylül ayında Kanada olmak üzere, Danimarka ve Amerika gibi bazı gelişmiş ülkelerde yasaklanmıştır [10].



Şekil 1.1. Plastiklerde kullanılan rakamların anlamları [11].

1. PETE veya PET (Polyethylene Terephthalate, Polietilen Tereftalat); yumuşak içecekler, su, meyve suyu, deterjan, temizleyici ve fındık ezmesi kaplarında kullanılır.
2. HDPE (High Density Polyethylene, Yüksek Yoğunluklu Polietilen); şeffaf plastik süt ve su kapları, çamaşır suyu, deterjan ve şampuan şişeleri ve bazı plastik torbalarda kullanılır.
3. PVC veya V (Polyvinyl Chloride, Polivinil Klorid); alüminyum folyo, bazı şişeler, pişirme yağı ve fındık ezmesi kapları, deterjan ve cam temizleme şişelerinde kullanılır.
4. LDPE (Low Density Polyethylene, Düşük Yoğunluklu Polietilen); manav saklama çantalarında, çoğu plastik streç filmlerde ve bazı şişelerde kullanılır.
5. PP (Polyethylene, Polietilen); çorba, şurup ve yoğurt kaplarında, pipetlerde ve biberonlarda kullanılır.
6. PS (Polystyrene, Polistiren); plastik mantar yiyecek tepsilerinde, yumurta kartonlarında, tek kullanımlık bardak ve tabaklarda, taşınabilir saklama kaplarında ve şeffaf olmayan plastik çatal bıçak takımlarında kullanılır.

7. Diğer; çoğu plastik bebek biberonunda, 19 litrelik su damacanelerinde, “spor” su mataralarında, şeffaf plastik suluklarda ve bazı plastik çatal, bıçak takımlarında kullanılır. Yeni biyolojik bazlı bazı plastikler de ‘7’ ile etiketlenebilir [11].

BPA’ya oldukça benzerlik gösteren bisfenol F (BPF) ile yapılan bir çalışmada kullanılan konsantrasyonların bakterilerde mutajenik olduğu, ökaryotik hücrelerden kültüre edilmiş lenfositlerde ise sitotoksik olduğu rapor edilmiştir [12]. BPA’nın oksidatif potansiyelini belirlemek için meme kanseri hücre dizisinde (MCF-7) yapılan bir çalışmada uygulanan konsantrasyonların komet kuyruk uzunluklarını arttırdığı ve DNA’da çift zincir kırıklıklarına yol açtığı ortaya konmuştur [13]. Ancak uygulanan konsantrasyonların oldukça yüksek olması nedeniyle elde edilen sonuçların BPA’nın gerçek oksidatif potansiyelini yansıtmadığı düşünülmektedir [14].

Bu çalışmada öncelikle, son derece hızlı nüfus artışı ve çalışma hayatındaki hızlı gelişmeler nedeniyle çevresel deşarj potansiyeline sahip olan ve eko-genotoksik etkileri hakkında çok az bilgi sahibi olunan BPA’nın ve özellikle metabolitlerinin hala tartışılmakta olan *in vitro* sitotoksik, genotoksik ve oksidatif potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanında BPA’nın besin zincirine bağlı olarak oluşacak metabolitlerinin çevresel deşarjları sonucu ekosistemde bulunan diğer kimyasallar ile birlikte oluşturacağı potansiyel etkileşimlerin belirlenmesi, bu maddenin oluşturacağı çevresel toksik riskler konusunda bilinçlenme, seçilen BPA konsantrasyonlarının, bu kimyasala maruz kalmış bireylerin serum değerleri olması nedeniyle, BPA’ya maruz kalınma durumunda ortaya çıkabilecek olası sağlık etkilerinin kısmen de olsa ortaya konması, BPA’nın alıcı hücrelerdeki akıbetleri, canlılar üzerine toksik etkileri ve yol açabilecekleri diğer potansiyel çevreyle ilgili riskler konusunda Çevre ve Orman Bakanlığı, Sağlık Bakanlığı ve gıda sektörü gibi benzeri kuruluşlar tarafından da kullanılabilecek önemli çıktılar elde edilmesi amaçlanmıştır.

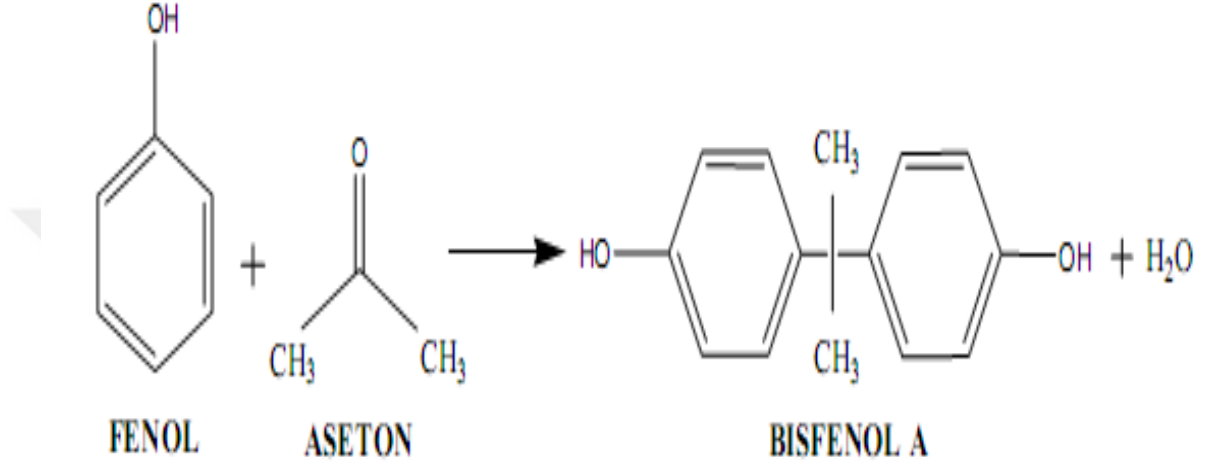
Yapılan bu çalışmada, BPA' nın ve metabolitlerinin insan kan lenfosit kültürlerinde genotoksik, sitotoksik ve oksidatif potansiyelleri hücresel düzeyde incelenmiş ve etkiler birbirleriyle karşılaştırılmıştır.



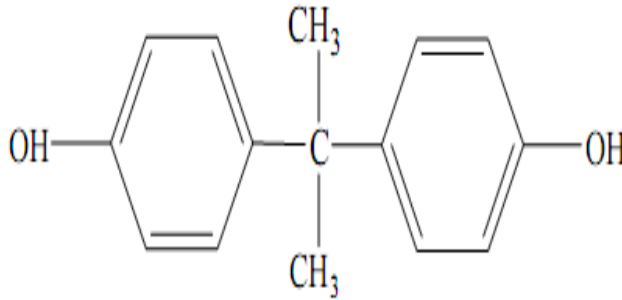
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. BPA'NIN GENEL ÖZELLİKLERİ:

Bisfenol A (BPA) iki mol fenolün bir mol aseton ile düşük pH da ve yüksek sıcaklıkta yoğunlaştırılması sonucu elde edilen organik bir bileşiktir [15].



Şekil 2.1. Bisfenol A' nın fenol ve asetonla yoğunlaştırılması [15].



Şekil 2.2. Bisfenol A (BPA)' nın kimyasal yapısı [15].

Çizelge 2.1. BPA' nın genel özellikleri [1].

BPA' nın genel özellikleri	
Genel adı	Bisfenol A
IUPAC adlandırması	2,2-bis (4-hidroksifenil)propan
CAS numarası	80-05-7
Moleküler formülü	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Moleküler ağırlığı	228.9
Erime noktası	153 °C
Kaynama noktası	220 °C
Yoğunluğu	1.1-1.2 kg/m ³
Buhar basıncı	25 °C 'de 3.91E-07 mm Hg
Alevlenme sıcaklığı	270 °C
Fiziksel hali ve rengi	Beyaz partikül veya toz
Sudaki çözünürlüğü	25 °C 'de 120 mg/L

2.2. BPA'YA MARUZİYET

2.2.1. BPA'nın Çevresel Potansiyeli

BPA fabrikalarda üretim sırasında oluşan atıkların tamamen arıtılmadan kirli sulara bulaşmasıyla akuatik çevreye zarar vermektedir [7, 16, 17]. Yamamoto ve ark. atık sulardaki BPA seviyesinin 1.3 ile 17.200 µg/mL arasında değiştiğini rapor etmişlerdir [18]. Nehirlerden alınan su örnekleriyle, Amerika, Almanya, Japonya ve Hollanda' da yapılan çalışmalarda ise BPA seviyesinin atık sulardan daha az olmakla birlikte 8 ng/mL olduğu tespit edilmiştir [19,20,21]. Japonya 'da Kawagoshi ve ark.

tarafından kimyasal analiz yöntemleriyle (GC-MS) yapılan bir çalışmada yer altı sularında çok sayıda ksenoöstrojen ve antiöstrojen belirlenmiş fakat ölçülen östrojenik aktiviteye en büyük katkıyı BPA'nın sağladığı tespit edilmiştir [22].

BPA'nın büyük miktarda yıllık üretimi yüzünden plastik üretimi sırasında hava partiküllerine karışması, bu kimyasala hava ve tozla da maruz kalınmasına sebep olmaktadır. Bu şekildeki maruziyetin sebebinin BPA'nın düşük buhar basıncına sahip olmasına rağmen buharlaşmadan kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir [23]. Yapılan çalışmalarda BPA'nın havadaki ortalama seviyesinin 0.51 ng/m³ olduğu tespit edilmiştir [23].

Yer altı veya yüzey sularına bulaşan BPA toprağa geçerek de canlıların maruziyetine sebep olabilir. Fent ve arkadaşları ¹⁴C- BPA ve toprak kullanarak yaptıkları bir çalışmada BPA'nın topraktaki yarılanma ömrünün 3 günden az olduğunu önermişlerdir. Ayrıca topraktaki BPA kirliliği ile insanların evsel ve endüstriyel atıkları arasındaki korelasyonun çok yüksek olduğu düşünülmektedir [24].

2.2.2. BPA'nın Gıdalarla Alımı

BPA ile üretilen yapay reçineler, yiyecek ve içeceklerin bulunduğu metal kutuların iç yüzeyindeki cila yapımında kullanılarak bu gıdalarla temas etmektedir. Yine yapımında BPA'nın kullanıldığı polikarbonatlı plastiklerden bebek biberonu, su şişesi ve günlük hayatta gereksinim duyulan çeşitli plastiklerle de bu kimyasala maruziyet söz konusudur [25].

Çeşitli ülkelerde üretilen bebek biberonları kullanılarak HPLC, LC-ED ve GC-MS metotlarıyla yapılan çalışmalarda, bu biberonlardan BPA'nın sızdığı gözlemlenmiştir [26]. Sun ve ark. polikarbonatlı şişelerin daha ilk kullanıldıklarında BPA sızdığını rapor etmiştir [27]. Bunu takiben Brede ve ark. su şişelerinin bulaşık makinelerinde yıkanması, kaynar su veya fırçalama ile muamele edilmesiyle suya büyük konsantrasyonlarda BPA salındığını keşfetmişlerdir [28].

Yüksek ısı polikarbonatlı kaplardan BPA salınımını arttırdığı halde, bunlar mikrodalga fırınlarda kullanılmak üzere yüksek oranda piyasaya sürülmektedir.

Nerin ve ark. mikrodalgada pişirilebilen polikarbonatlı plastik kapları inceleyip, plastikte bulunan 30 µg/g BPA'nın 6.5 µg/g'ının yiyeceklere geçtiğini keşfetmişlerdir [29].

BPA plastiklerin dışında metalik gıda kaplarından da yiyecek ve içecekler sızmaktadır. Bununla ilgili yapılan çalışmalarda BPA'nın sızmasına ısıtma süresi, ısıtma sıcaklığı, saklama süresi ve saklama sıcaklığı gibi faktörlerin neden olduğu belirtilmiştir [30-31]. Kang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada BPA'nın salınımında en önemli faktörün ısıtma sıcaklığı olduğu keşfedilmiştir. Yine aynı çalışmada bitkisel yağ ve sodyum klorür solüsyonlarının da BPA salınımını önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir [31].

Birçok çalışmada, canlıların BPA'ya asıl maruziyetinin çevrenin etkisinden çok yiyeceklerle olduğu savunulmaktadır [25].

2.2.3. BPA'nın Dental Dolgulardan Salınımı

Birçok reçine esaslı monomer diş hekimliğinde dolgu maddesi, yapıştırıcı madde ve dolgu koruyucu olarak kullanılmaktadır. 1960'lerden beri BPA diğlisil metakrilat çoğu diş dolgu maddesinin yapımında kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda BPA'nın bu polimerize dental materyallerden sızıp, tükürük ve idrar gibi vücut sıvılarında görüldüğü tespit edilmiştir [5,32,33]. Zarfa ve ark. diş dolgusuna maruz kalan 8 hastadan topladıkları tükürük örneklerini incelediklerinde örneklerin hepsinde 15.3-32.4 ng/mL oranlarında değişen BPA miktarlarına rastlamışlardır [34].

2.3. BPA'NIN İNSAN DOKU VE SIVILARINDAKİ SEVİYESİ

2.3.1. Serum, Kan ve Plazma

1999'dan beri insan kanındaki serbest BPA konsantrasyonunu ölçmek için farklı analitik teknikler kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır [35]. Inoue ve arkadaşları LC-MS metoduyla insan plazma serumunda yaptığı çalışmada BPA duyarlılığının 0.1 ng/mL olduğunu keşfetmişlerdir [36]. 2002 yılında Schonfelder ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise GC-MS tekniği kullanılıp fetüs serumunda, anne serumunda ve plasentada BPA duyarlılığının 0.01 ng/mL olduğu bulunmuştur

[37]. Bunu takiben 2003 yılında HPLC floresans tekniğiyle anne serumu, fetal kordon serumu ve steril dişi serumunda yapılan bir çalışmada BPA duyarlılığının 0.04 ng/ mL olduğu saptanmıştır [38].

2.3.2. Anne Sütü

Oral yolla alınan BPA gastrointestinal yolla vücuda girmektedir. Lipofilik bir bileşik olan BPA' nın yağa ve anne sütüne geçebildiği belirtilmektedir [39].

Sun ve ark. 23 sağlıklı anneden toplanan sütü incelediğinde, BPA konsantrasyonunun 0.28- 0.97 ng/mL arasında değiştiğini ve ortalama değerin 0.61 ng/mL olduğunu rapor etmişlerdir [40].

Otaka ve arkadaşları SPE-GC-MS tekniğiyle çalışıp anne sütündeki BPA duyarlılığını 0.09 ng/mL olarak hesaplamışlardır [41]. 2007 yılında Japonya' da yapılan bir çalışmada ise anneden gelen ilk sütün BPA değerinin ELISA tekniği ile 0.3 ng/mL olduğu keşfedilmiştir [42].

2.3.3. İdrar

İnsan idrarındaki BPA miktarı dünya çapında birçok popülasyonda ölçülmüştür. Yapılan bu çalışmalara göre idrardaki BPA' nın büyük bir bölümü BPA-glukuronid veya BPA-sülfat olarak bağlı bir şekilde bulunmaktadır. Bu yüzden idrardaki toplam BPA miktarını hesaplayabilmek için araştırmacılar enzimatik uygulamalar kullanmaktadırlar [43].

Kore'de 15 erkek, 15 kadın olmak üzere 30 yetiştikten toplanan idrar ile HPLC metodu kullanılarak yapılan bir çalışmada erkeklerin idrarındaki BPA değeri 2.82 ng/mL, kadınların idrarındaki BPA değeri ise 2.76 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre idrardaki toplam BPA değeri cinsiyete göre farklılık göstermemektedir. Ancak, erkeklerin idrarında BPA-glukuronid, kadınların idrarında ise BPA-sülfat oranı daha yüksek çıkarak, bağlı BPA'ların oranlarında farklılıklar görülmüştür [44].

2.3.4. Hamilelikle İlişkili Sıvılar

Birçok çalışmaya göre BPA'nın yüksek konsantrasyonları, belki de BPA'ya en fazla duyarlılığın gelişim evrelerinde olması nedeniyle, fetüs kordon serumu, hamile anne serumu ve fetüs amniyotik sıvıda ölçülmüştür [43]. Bir çalışmada 15-18 haftalık fetüs amniyotik sıvıda BPA seviyesinin ortalama 8.3 ng/mL gibi yüksek bir seviyede olmasına karşın, anne serumunun 1.4-2.4 ng/mL konsantrasyon gösterdiği rapor edilmiştir [45]. Bunun yanında çoğu çalışmada da göbek kordon kanı ve fetüs plazmasında BPA seviyeleri incelenmiştir [45,46]. Tüm bu çalışmalar, BPA'nın anne-fetüs plasenta bariyerini geçebildiğini göstermektedir [43].

2.4. BPA'NIN HORMONAL AKTİVİTESİ

2.4.1. BPA'nın Östrojen ile İlgili Mekanizması

Yapılan *in vivo* çalışmalarda BPA'nın düşük doz etkisinin farelerde ve sıçanlarda üreme sistemini ve organlarını etkilediği rapor edilmiştir. Örneğin, BPA'nın düşük düzeylerinin, fetüs fare prostatının büyüklüğünü ve ağırlığını arttırdığı [47] erkek farelerin de günlük sperm üretimini düşürdüğü rapor edilmiştir [48]. Kullanılan tüm bu düşük dozların steroid hormonları etkilediği açıklanmıştır [49]. BPA'nın östrojen ve androjen reseptörlerine bağlanmasının doğal hormonlara göre 1000-10000 kez daha zayıf olduğu belirtilmiştir [50].

BPA hedef hücrelerde ER α ve özellikle de ER β reseptörlerine bağlanabilme özelliğine sahip olduğundan *in vitro* ve *in vivo*da östrojenik etki göstermektedir. Bu kimyasalın, ER bağlantılı gen ekspresyonunu uyardığı östradiolden 10⁵, etinil östradiolden ise 10⁶ kat daha zayıf olduğu rapor edilmiştir [51].

Bazı çalışmalarda BPA'nın nükleer östrojen reseptörlerine bağlanarak ters etki yapmak için çok zayıf olduğu söylenebilir, 7 transmembran reseptörü olan GRP30 üzerinden ters etki yaptığı savunulmaktadır [52]. Yapılan çalışmalarda, BPA'nın düşük dozlarının membrana bağlı ER α üzerinden ters etki gösterdiği ya da bu kimyasalın G proteinine bağlı östrojen reseptörleri üzerinden PKA ve PKG'yi aktive ederek ters etki gösterdiği rapor edilmiştir [52].

BPA'ın östrojenik bir bileşik olduğunu 4 ölçüt açıklamaktadır. Bunlar, bu kimyasalın; ER'ye bağlanabilmesi, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde proliferasyona sebep olması, progesteron reseptörlerini indüklemesi ve tamoksifen tarafından östrojenik aktivitesinin iptal edilebilmesidir [52].

2.4.2. BPA'ın Androjen ile İlgili Mekanizması

İnsan androjen reseptörü içeren mayalarda yapılan bir çalışmada BPA'ın dihidrotestosteronun etkisini bloke ederek anti-androjenik aktivite gösterdiği savunulmuştur [53].

BPA'ın 50 µg/kg dozları kullanılarak yapılan bir çalışmada uygulanan farelerde prostatik androjen reseptörlerinin sürekli olarak arttığı ve buna ek olarak prostat ağırlığındaki artışın negatif kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olduğu gözlenmiştir [48].

Yapılan bir çalışmada BPA'ın prostat kanseri tedavisinde yıkıcı etki gösterdiği, bunun nedeninin BPA'ın, bazı prostat kanserli insanlarda bulunan androjen reseptör mutanları olan T877A'ya bağlandığı ve böylece androjen yokluğunda insan prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunu tetiklediği rapor edilmiştir [54].

BPA'ın androjen reseptörü reporter gen testi ile agonistik ve antogonistik aktivitesini belirlemek amacıyla, Afrika maymunu CV-1 böbrek hücre kültüründe yapılan çalışmada BPA'ın, dihidrotestosteron tarafından indüklenen transkripsiyonel aktivite üzerinde önemli ölçüde inhibe edici etkiye sahip olduğu ve androjen reseptörü antogonisti olduğu rapor edilmiştir [55].

BPA'ın androjenik ve anti-androjenik etkisini belirlemek için Afrika maymunu CV-1 böbrek hücre kültüründe yapılan çalışmada BPA'ın güçlü anti-androjenik etki gösterdiği ve LC₅₀ değerinin 2.14 µM olduğu tespit edilmiştir [56].

Tüm bu çalışmaların tersine Sprague- Dawley erkek sıçanlarında yapılan bir çalışmada BPA, bu sıçanlara 7 gün boyunca günde 0.4 mg/kg dozlarında oral olarak uygulanmıştır. Bu çalışmada, androjenik ve anti-androjenik kimyasalları ölçmek için

duyarlı bir metod olan hersherger testi kullanılmıştır. Bu metoda göre BPA' nın androjenik ve anti-androjenik aktivite göstermediği rapor edilmiştir [57].

2.5. BPA' NIN OKSİDATİF HASAR POTANSİYELİ

Bazı çalışmalar BPA' nın mutajenik olmadığını iddia etmektedir. BPA' nın ames, fare lenfoması, kardeş kromatit değişimi ve memeli gen mutasyonu testlerinde sonuçların büyük çoğunluğu mutajenik olmadığını göstermektedir [58]. Ancak, bazı raporlar BPA' nın nokta mutasyonlarını, DNA çift zincir kırıklıklarını ve anöploidiyi indüklediğini savunmaktadır [13].

Yapılan bir çalışmada mavi midyelerin solungaç hücrelerine uygulanan BPA' nın uygulanan konsantrasyonlarının sadece mikronükleus (MN) oluşumunu indüklediği, diğer nükleer anormalliklere sebep olmadığı gözlenmiştir [59].

BPA' nın yapay bir bileşiği olan diglisidil eterin (BADGE) birinci ve ikinci kez hidroliz edilmesiyle oluşan ürünlerin (BADGE.H₂O, BADGE.2H₂O) E.coli bakteri suşları üzerinde mutajenitesini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada WP2, WP2uvrA ve IC3327 reversiyon testleri kullanılarak bu bileşiklerin mutajenik olduğu gösterilmiştir [60].

Yine BADGE ve hidrolizi sonucu oluşan ürünlerle (BADGE.H₂O, BADGE.2H₂O) yapılan bir çalışmada S-9 metabolik aktivasyonlu ve S-9 metabolik aktivasyonsuz insan kan lenfositleri kullanılmıştır. BADGE ve birinci hidroliz ürünü olan BADGE.H₂O' nun kullanılan konsantrasyonları 12.5 - 62.5 µg/mL aralığında, ikinci hidroliz ürünü olan BADGE.2H₂O' nun kullanılan konsantrasyonları 25.0 - 100.0 µg/mL aralığında, BADGE.2HCl' nin kullanılan konsantrasyonu ise 6.25 - 50.0 µg/mL aralığındadır. Çalışmada kullanılan bütün konsantrasyonların sitokinez blok hücre proliferasyon indeksini düşürürken, mikronükleus frekansını arttırdığı rapor edilmiştir [61].

Syrian hamster embriyo hücre kültürüne uygulanan konsantrasyonlardan 100–200 µM' ın önemli ölçüde toksik olduğu, 50 µM' ın ise tolere edilebilir olduğu rapor edilmiştir [62].

MCF-7 meme kanseri hücre kültüründe yapılan çalışmada BPA' nın DNA çift zincir kırıklıklarını tetiklediği gösterilmiştir [13].

BPA' nın genotoksitesini belirlemek amacıyla, kromozom aberasyonu testi, mikronükleus testi ve c-mitotik etki olmak üzere üç farklı sitogenetik parametre kullanarak İsviçre albino faresi kemik iliklerinde yapılan bir çalışmada, oral yolla uygulanan BPA'nın tek doz 10, 50, 100 mg/kg ve tekrarlı doz 10 mg/kg olmak üzere test edilen dozlardan, kromozomal sapmalarda ya da mikronükleus frekansında artışa neden olmadığı, ancak sitotoksik potansiyelini c-mitotik etki yoluyla gösterdiği bildirilmiştir [63].

Yapılan *in vivo* bir çalışmada dişi ve erkek sıçanlara oral yolla 2.4 µg, 10µg, 5mg ve 50 mg/kg dozlarında günde bir kez olmak üzere 6 gün boyunca BPA uygulanmıştır. Kemik iliği ve kan örnekleri alınarak, mikronükleus, kromozom aberasyonu ve tek hücre jel elektroforez teknikleri ile genotoksitesini incelenmiştir. Aynı çalışmada BPA' nın mutajenitesini ölçmek için S-9 varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 ve TA 102 suşları kullanılmıştır. 2.4 µg doz uygulaması dışında diğer BPA maruziyetlerinin polikromatik eritrositlerde mikronükleus frekansını önemli ölçüde arttırdığı, kemik iliği hücrelerinde yapısal kromozom aberasyonuna neden olduğu ve lenfositlerde DNA hasarına yol açtığı gözlenmiştir. Kullanılan bakteri suşlarında ise herhangi bir mutajenik etki görülmemiştir. Bu çalışmada BPA' nın mutajenik olmadığı fakat genotoksik aktivite gösterdiği ve oksidatif hasara yol açtığı rapor edilmiştir [58].

Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) BPA' nın karsinojenitesini değerlendirerek, yetişkinlerin maruziyetinde bu kimyasalın güçlü bir karsinojen olmadığı sonucuna varmıştır [64]. Ancak, fareler ve sıçanlar bu kimyasala daha duyarlıdır [14]. Son zamanlardaki çalışmalar, BPA' ya maruz kalan hamile sıçanlarda meme kanserinin görüldüğünü [65] ve erkek sıçanlarda ise prostat kanseri riskinin arttığını göstermiştir [66].

BPA' nın Sprague- Dawley (CD-1) farelerinin karaciğer ve meme hücrelerinde DNA- katımı oluşturma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir [67].

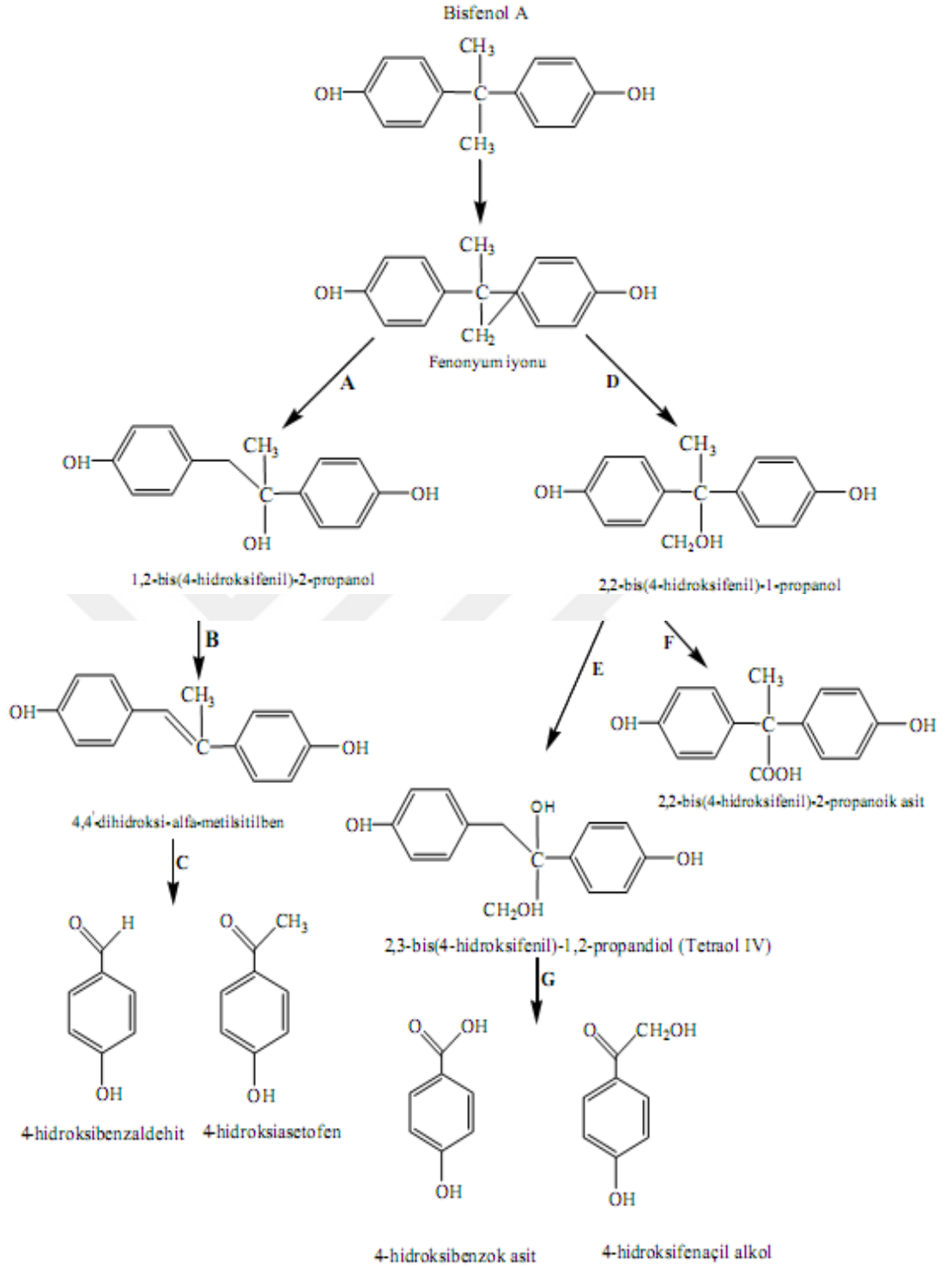
2.6. BPA'NIN BİYODEGRADASYONU

Yapılan çalışmalar, çevreye giren BPA'nın biyolojik olarak yıkıldığını, sedimente adsorbe olduğunu ve muhtemelen fotokimyasal yıkıma uğradığını göstermektedir. Atık su arıtma tesislerinden izole edilen ve özel bir Gram (-) bakteri suşu olan MV-1 ile yapılan çalışmalar BPA'nın minör ve majör yıkım yollarını, aynı zamanda ana yıkım metabolitlerini ortaya çıkarmıştır. 1992 yılında Lobos ve ark., 1994 yılında ise Spivack ve ark. tarafından yapılan bu çalışmalarda, BPA'nın majör yıkım yolağı sonucu oluşan iki ana metabolit 4-hidroksiasetefenon ve 4-hidroksi benzoik asidin hızlıca CO₂ ve suya yıkılarak bakteriyel hücreye alındığı tespit edilmiştir [5, 68].

Lobos ve ark. karbonun %60'ının CO₂ için, %20'sinin bakteriyel büyüme için ve %20'sinin çeşitli organik bileşikler için kullanıldığını ortaya koymuştur. Howard 1989 yılında BPA'nın nötral ve asidik metanol solüsyonlarında 290 nm üzeri dalga boylarında hafif, bazik metanol solüsyonunda ise anlamlı bir absorpsiyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar BPA'nın yüzey sularında ve atmosferde fotolize uğrayabileceğine işaret etmektedir [5, 68].

BPA'nın topraktaki parçalanabilirliğinin çok uzun zaman aldığı, ¹⁴C ile işaretli BPA kullanılarak yapılan çalışmada ancak 120 günlük inkübasyon sonrasında işaretli karbondioksit örneklerinin toplanabildiği belirtilmiştir [68].

BPA'nın nehir suyu örneklerindeki parçalanmasında ise bakteri sayısının etkili olduğu belirtilmektedir [69].



Şekil 2.3. BPA'nın biyodegradasyon mekanizması [70]. (A) BisfenolA hidroksilaz B, (B) 1,2-bis (4hidroksifenil)-2-propanol redüktaz, (C) 4,4'-dihidroksi-alfa-metilstilben oksijenaz, (D) Bisfenol A hidroksilaz A, (E) 2,2-bis (4-hidroksifenil)-2-propanol hidroksilaz, (F) 2,2-bis (4-hidroksifenil)-2-propanol oksidaz, (G)2,3-bis (4-hidroksifenil)-1,2-propandioli oksijenaz

2.7. BPA' NİN METABOLİZASYONU

2.7.1. Mantarlarda

Mantarlarla ilgili yapılan bir çalışmada 26 mantar cinsinden 11 tanesinin BPA' nın %50'sinden daha fazlasını parçalayabildiği görülmüştür [71].

Mantarlar BPA' yı parçalama işlemini manganez peroksidaz ve lakkaz gibi lignin parçalayıcı enzimleri sayesinde yaparlar. BPA, mangan peroksidaz enzimi ile 4-izopropenilfenol, 4-izopropilfenol ve heksöstrole metabolize edilir [72]. Lakkaz enzimi ile ise; 5,5'-bis-[1-(4-hidroksifenil)-1-metil-etil]-bisfenil-2,2'-diol' e metabolize edilir [73].

2.7.2. Bitkilerde

Bitkiler BPA' yı su ile kolaylıkla alabilir ve onu çeşitli glukozidik bileşiklere parçayabilirler. Yapılan çalışmalarda bitkilerde BPA' nın ana metabolitinin mono-O-B-glukopiranoz olduğu rapor edilmiştir [74].

2.7.3. Balıklarda

BPA' ya maruz kalan balıklarda yapılan çalışmalarda BPA' nın sülfat ve glukuronid metabolitleri belirlenmiştir [75]. Yokota ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise BPA' nın asıl metaboliti olan BPA-glukuronid metabolizasyonunun ince bağırsakta gerçekleştiği rapor edilmiştir [76].

2.7.4. Memelilerde

Uygulama yolu farklılıklarına rağmen uygulanan doz ve deney hayvanları farklı olsa bile BPA' nın genellikle %56- 82' si vücuttan dışkıyla atılır. İdrarda %13-28 oranında BPA' nın metabolitleri bulunur [77].

BPA memelilerin karaciğerinde 2 yolla metabolize edilir. Bunlar, glukuronidasyon ve sülfasyon yollarıdır [77].

Yapılan bir çalışmada, her bir kişiye 5 mg radyoaktif BPA uygulanmış ve BPA' nın tamamının 24 saatte elimine olduğu rapor edilmiştir. Plazmada ulaşılan en yüksek konsantrasyonun doz uygulamasından 80 dakika sonra olduğu, bunu takip

eden 6 saat boyunca ise konsantrasyon miktarında hızlıca bir azalma görüldüğü savunulmuştur. BPA sadece glukuronid formunda bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, BPA'nın gastrointestinal bölgede hızlıca absorbe olup, karaciğerde glukuronik asitle birleşerek, hızlıca kandan bağırsaklar aracılığı ile idrara geçtiği rapor edilmiştir [78].

Bazı çalışmalarda, glukuronidasyonun bazı faktörlerin etkisiyle tür içerisinde değişkenlik gösterdiği savunulmaktadır. Örneğin, hepatik glukuronidasyonun gebe olanlarda olmayanlara göre daha az olduğu bunun sebebinin ise ilaca dayanıklılığın ve UGT (üridin di fosfat glukuronil transferaz) miktarının gebelerde azaldığı rapor edilmiştir [79]. Bunun yanında insan fetüsü karaciğerindeki UGT değerinin erişkin karaciğerinden daha düşük olduğu bulunmuştur [80].

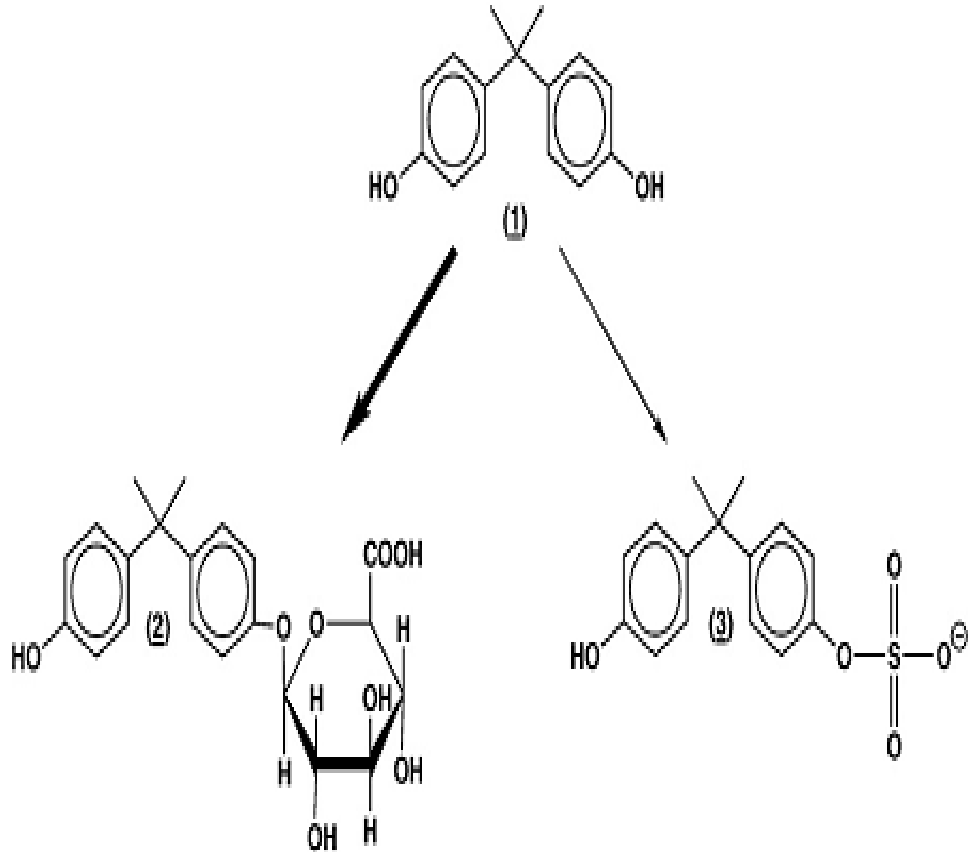
BPA'nın glukuronidasyonu karaciğerdeki UGT enzimi ile, sülfasyonu ise yine karaciğerdeki sülfattransferaz enzimi ile gerçekleşmektedir [81].

BPA sıçanlarda da glukuronidasyon ve sülfasyon yollarıyla detoksifiye edilmektedir. Ancak, sıçan karaciğerinde bu yollardan sonra BPA'nın metabolitlerinin safraya, hamile veya dişi sıçanlarda ise metabolitlerin büyük çoğunluğunun kan damarlarına geçtiği belirtilmektedir [79].

Türler arasında BPA metabolizmasında farklılıklar vardır. Örneğin, sıçanlarda karaciğerden atılan BPA glukuronid safra yoluyla sindirim kanalına ulaşarak burada tekrar BPA'ya dönüşmekte ve kana geçmektedir. BPA'nın bu şekilde enterohepatik dolaşıma girmesi insanlarla karşılaştırıldığında bu kimyasalın sıçanlarda daha yavaş emilmesine sebep olmaktadır [82]. Bunun yanında Negishi ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir çalışmada primatlarda (maymun ve şempanze) oral ve deri altından uygulanan BPA'nın absorpsiyonunun sıçanlardan daha kolay olduğu ve primatların serumundaki BPA'yı ortadan kaldırmanın sıçanlardan daha uzun zaman alacağı rapor etmişlerdir [83]. Ayrıca nesillerdeki farklılıkları Snyder ve ark. tespit etmiş ve F-344 sıçanlarının idrarında BPA metabolitlerinin CD sıçanlarına göre daha fazla olduğunu görmüşlerdir [39].

BPA metabolitlerinin içinde BPA glukuronid en önemlisidir. Diğer metabolitler olarak BPA sülfat konjugat, BPA diglukuronid, 5-hidroksi BPA ve ilgili sülfat konjugatlar rapor edilmiştir [84, 85]. Jaeg ve ark. (2004) BPA'nın metabolizasyonunda CD1 fare karaciğer mikrozomlarında ve S-9 lu ortamda 9 tane metabolit belirlemiştir. Bu metabolitler: izopropil hidroksi fenol, BPA glutatyon konjugat, glutatyonil fenol, glutatyonil 4- izopropil fenol ve BPA dimerleridir [86].

BPA metabolitleri üzerindeki toksisite ve östrojenite belirlenmiştir. Atkinson ve Roy BPA'nın bir metaboliti olan bisfenol-o-kinonun DNA'yı *in vitro* ve *in vivo*da bağlayabildiğini keşfetmişlerdir [85, 86]. Bu sonuçlardan, *in vivo*da BPA'ya maruz kalan DNA'nın kovalent modifikasyonlarının belki de hepatoksisitenin indüksiyonunda bir faktör olabileceğini önermişlerdir [85, 86].

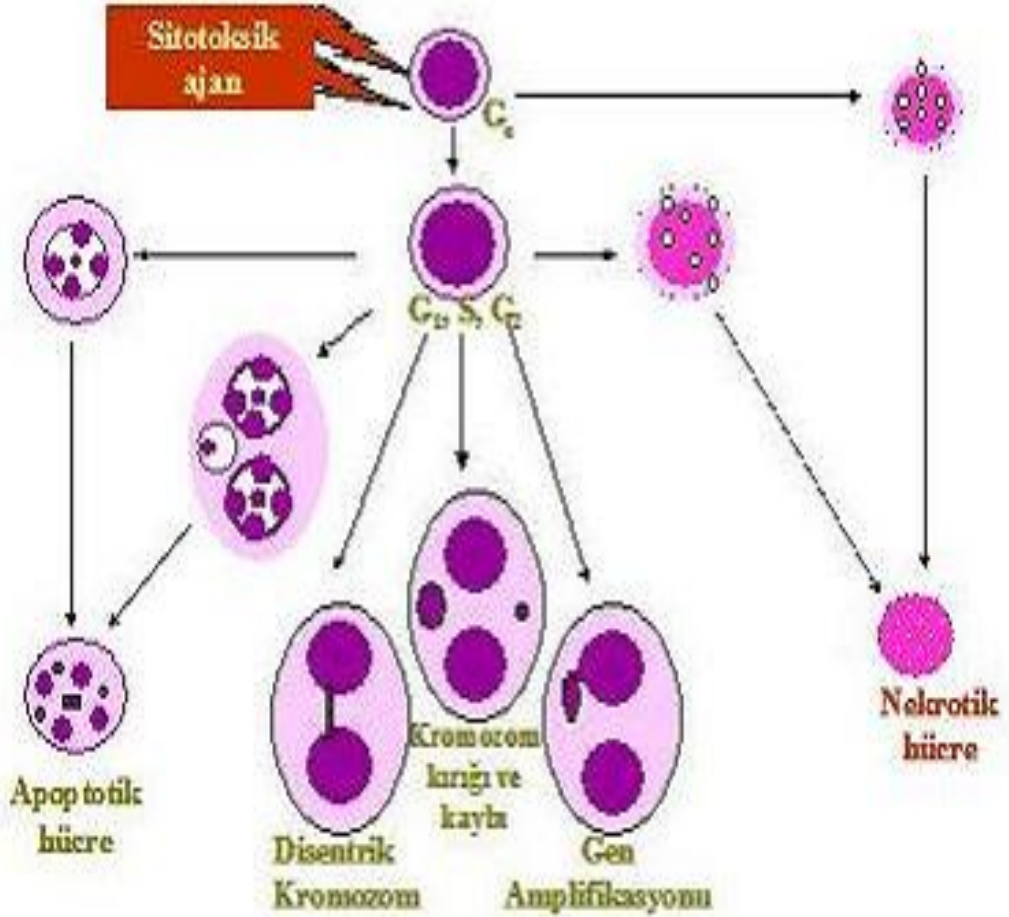


Şekil 2.4. Bisfenol A ve ana metabolitleri [84, 85]. 1. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı, 2. Bisfenol A glukuronidin kimyasal yapısı, 3. Bisfenol A sülfatın kimyasal yapısı

2.8. GENOTOKSİSİTE, SİTOTOKSİSİTE VE OKSİDATİF POTANSİYEL

Genotoksisite; kimyasal, fiziksel veya biyolojik ajanların genetik materyalde hasar yaratabilme özelliğidir. Genotoksisite ile karsinojenite arasında çok yakın bir ilişki vardır. Çünkü birçok ajanın genotoksisitesi değişik hastalıklara yol açabilir. Bunlar arasında en sık rastlanana ise kanserdir. Hatta genotoksisitenin kanser oluşumunu başlatan en önemli mekanizma olduğu savunulmaktadır [31].

Sitotoksisite; hücreye toksik şekilde etki edip hücreyi öldüren ya da fonksiyonunu durduran maddelere sitotoksik maddeler denir. Bu maddeler hücrelerde çeşitli değişikliklere sebep olabilirler (Şekil 2.5)



Şekil 2.5. Sitotoksik ajanların etkisindeki hücrelerin olası durumları [87]

Oksidatif potansiyel; hücrelerin artışı ve fonksiyonları üzerinde meydana gelen olumsuz etkiye 'oksidatif hasar' denir [88].

Oksidatif DNA hasarı normal metabolizma sırasında bazı tepkime basamaklarında oluşan oksijen radikalleri tarafından endojen olarak oluşabileceği gibi iyonizan radyasyon ve çeşitli kimyasallar gibi eksojen faktörler tarafından da meydana gelebilmektedir. Bu moleküller DNA ile etkileşerek oksidatif baz modifikasyonları ve DNA zincir kırıklıklarını oluşturabilirler [89].

2.9. IN VİTRO YÖNTEMLER

Bu yöntemler test tüpü içinde veya hücre kültürü kabında gerçekleştirilebilir. Bu testlerde hücreler veya bakteriler genellikle test materyaliyle temas halinde olacak şekilde yerleştirilirler. Kullanılan materyalin etkisi genellikle maruz kalan hücrelerin sayısı, büyüme oranı, metabolik fonksiyonu veya diğer hücresel fonksiyonları belirlenerek değerlendirilir.

In vitro yöntemlerin önemli avantajları vardır. Kısa sürede sonuçlandırılabilirler, maliyetleri azdır, kontrol ve standardize edilebilirler, etik ve yasal sorunlardan uzaktadırlar ve çok sayıda örnek taraması için idealdirler. Ancak bunların yanında dezavantajları da bulunmaktadır. Bu yöntemler organizmanın dışında gerçekleştiği için, kullanılan test materyaline karşı esas biyolojik cevap hakkında yanıltıcı bulgular sağlayabilirler [89].

Bu çalışmada *in vitro* mikronükleus ve *in vitro* komet (tek hücre jel elektroforez) yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca S-9 metabolik aktivasyon sistemi kullanılarak, esas biyolojik cevaplara ulaşılması amaçlanmıştır.

2.9.1. Mikronükleus (MN) Yöntemi

Mikronükleus (MN)' lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında oluşan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. Bu oluşumlar genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanmaktadır [90].

MN sayısındaki artış çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı olarak göstergesidir. Anöploidiyi uyaran ajanlar sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıklıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle hücrelerde MN sayısında artış saptanması somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [91].

MN testi fiziksel etkenlerin, ilaçların, çevresel kirleticiler ve gıda katkı maddeleri gibi günlük yaşamda sıklıkla maruz kaldığımız her türlü kimyasal maddenin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin ve güvenilirliklerinin araştırılmasını sağlar. Ayrıca kanser riskinin tahmin edilmesini ve kanserin izlenmesini sağlar [92].

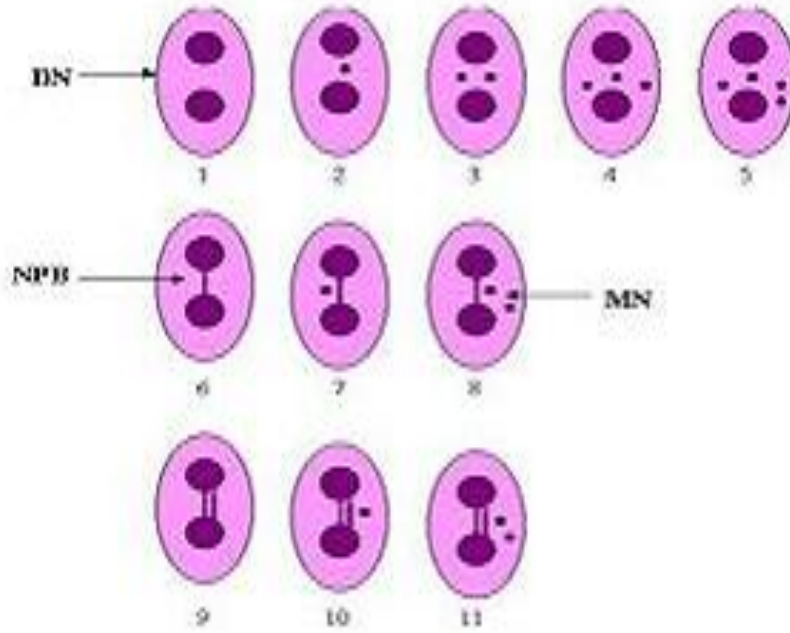
MN testi mitoz geçiren tüm bitki, hayvan ve insan hücrelerinde, fiziksel ve kimyasal ajanların oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılabilir. Daha çok kan ve kemik iliği hücrelerine uygulanırsa da çeşitli çalışmalarda karaciğer, akciğer, solungaç, böbrek, bağırsak, embriyo, ağız epitel hücreleri, üriner epitel hücreleri, deri fibroblastları ve yumurtalık hücreleri gibi pek çok hücreye de uygulanmıştır [93].

MN testi insanlarda genotoksisiteyi belirlemek amacıyla çoğunlukla periferik kan lenfositlerine uygulanır. Çünkü yapılan çalışmalarda kanser hastalarından alınan periferik kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış kanser dokusundaki MN frekansı kadar bulunmuştur [93].

Lenfosit kültürlerine MN testi uygulanırken uygun konsantrasyonda sitokalsin-B (Cyt-B) ilave edilir. Böylece çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirmemiş çift çekirdekli hücreler elde edilir. Bu hücrelerden MN bulunduran hücrelerin oranı genetik hasarın dolaylı göstergesi olarak kabul edilir [91].

Sitokinezi blokle edilmiş hücrelerde iki nükleuslu hücreler ve MN sayımında şu kriterler kullanılmaktadır [94] :

- a. Hücreler çift nükleusa sahip olmalıdır.
- b. Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak veya oval görünümlü olmalıdır.
- c. Nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak veya oval olmalıdır.
- d. MN çapı ana nükleusun 1/3' ü kadar veya daha küçük olmalıdır.
- e. MN' ler yuvarlak veya oval şekilde olmalıdır.
- f. MN' ler ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır.
- g. MN' lerin boya alma yoğunluğu ana nükleus ile aynı olmalıdır.
- h. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN' lerin sayılması esas alınmalıdır.



Şekil 2.6. Sitokinez Blok MikroNükleus (CBMN) Dağılımı [95]. 1. Binükleuslu (BN) hücre, 2. Bir MN' li BN hücre, 3. İki MN' li BN hücre, 4. Üç MN' li BN hücre, 5. Dört MN' li BN hücre, 6. Nükleoplazmik köprü (NPB) ' lü BN hücre, 7. Bir NPB ve bir MN' li BN hücre, 8. Bir NPB ve iki MN' li BN hücre, 9. İki NPB, 10. İki NPB ve bir MN' li BN hücre, 11. İki NPB ve iki MN' li BN hücre

2.9.2. Komet Yöntemi

Bu yöntemin temel prensibi kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini, hücrelerin DNA' larını tek tek inceleyerek tespit etmektir [96].

1984 yılında ilk kez Ostling ve Johanson mikrojel elektroforez tekniği ile hücrelerde DNA hasarını görüntüleyerek bu yöntemin temelini atmışlardır. Bu araştırmacılar nötral ortam kullanarak DNA' daki çift zincir kırıklıklarının tayinini göstermişlerdir [97]. 1988 yılında ise Singh ve ark. alkali ortam kullanarak DNA' da tek ve çift zincir kırıklıklarının tayinini sağlamışlardır [98].

DNA nükleus içerisinde yoğun bir yapı halinde bulunur. Çeşitli genotoksik ajanlarla hasarlanan DNA' lar tamir mekanizmaları ile onarılmazsa ve DNA' da tek veya çift zincir kırıklıkları oluşmuş ise DNA yoğun yapısını kaybeder ve ana nükleus bölgesinden dışarı doğru göç eder. Bu yapıya bir elektrik akımı uygulandığında DNA molekülleri elektroforetik ortamda molekül ağırlıklarına göre farklı hızlarda katoda doğru göç eder. Ancak ana nükleusu oluşturan DNA çok büyük olduğu için nükleusu terk edemez. Bu yöntemde floresan bir boya ile boyanan DNA dairesel bir formdan kuyruklu yıldız benzer bir forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturur. Bu yüzden bu yönteme kuyruklu yıldız anlamına gelen 'komet' adı verilmiştir [96].

Bu yöntemde değerlendirme floresan mikroskopta gözle ya da bilgisayar programı ile yapılır. DNA göç miktarı ile DNA' daki kırık sayısı arasında doğru orantı vardır. Kuyruk uzunluğu DNA hasarına bağlı olarak artar. Görsel değerlendirme yapılırken kometler DNA göç uzunluğuna göre 5 kategoride toplanır. Bunlardan, parlak başlı ve kuyuksuz olanlar 0, çok az hasarlı olanlar 1, az hasarlı olanlar 2, hasarlı olanlar 3 ve çok küçük başlı ve uzun kuyruklu olanlar yani çok hasarlı olanlar ise 4 kategorisindedir [96].

Komet testi geniş bir uygulama alanına sahiptir. Bu yöntem günümüzde [99];

- DNA hasar ve onarım çalışmalarında,
- Çeşitli kimyasallardan kaynaklanan genotoksisite değerlendirilmesinde,

- Çeşitli ajanlara maruz kalan çalışanlarda mesleki maruziyetin ölçülmesinde,
- Ekotoksikolojik değerlendirmelerde,
- Klinik çalışmalarda kullanılmaktadır.

Bu yöntemin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır [100] :

Avantajları;

- Maliyetinin düşük olması,
- Kolay uygulanması,
- Deneysel zamanının kısa olması,
- Hemen hemen her hücre tipine uygulanabilmesidir.

Dezavantajları;

- ◆ Sadece zincir kırıklıkları şeklindeki DNA hasarını tayin etmesi,
- ◆ Mutasyon, DNA- katım ürünleri gibi DNA hasarlarını ölçememesidir.

2.10. SİTOKİNEZ BLOK PROLİFERASYON İNDEKSİ (CBPI)

Sitokinez blok hücre proliferasyon indeksi (CBPI) hücrenin bölünme hızını ölçen bir methodur. Uygulanan kimyasalın toksisite derecesi ne kadar yüksek ise CBPI değeri o kadar düşük çıkar [101].

CBPI hücrenin kaçınıcı mitozda olduğu baz alınarak aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$CBPI = 1 \times (\%M1) + 2 \times (\%M2) + 3 \times (\%M3) / 100$$

M1: 1. Mitozdaki hücreleri (tek çekirdekli)

M2 : 2. Mitozdaki hücreleri (iki çekirdekli)

M3 : 3. Mitozdaki hücreleri (üç yada dört çekirdekli) ifade etmektedir.

2.11. S-9 AKTİVASYON SİSTEMİ

Vücuda alınan kimyasallar karaciğer tarafından metabolize edilmektedir. Böylece *in vivo* çalışmalarda hem kimyasalın hem de metabolitlerinin etkisi gözlenebilmektedir. Ancak S-9 aktivasyon sistemi geliştirilmeden önce *in vitro* çalışmalarda metabolitlerinin değil de sadece ana kimyasalın etkisi gözlenebilmekteydi. Bunu sağlamak için ilk olarak Ames (1973), Garner (1972) ve ark. sıçan karaciğerini homojenize ettiler [102]. Ardından Maron ve Ames (1983) S-9 aktivasyon sistemini geliştirdiler [103].

S-9 aktivasyon sistemi kimyasalı sanki *in vivo* ortamdaymış gibi metabolize etmektedir. Böylece *in vitro* ortamda kimyasalın dönüşüm sonundaki ürünlerinin de araştırılmasına olanak sağlanmaktadır [102].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Besiyeri:

100 mL besi ortamı (RPMI 1640)'na 25 mL fotal kalf serum ve 0.2 mL penisilin- streptomisin eklenerek hazırlanır.

Hipotonik Çözeltisi:

0.5592 gr KCl 100 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlanır (0.075 M KCl).

Fiksatif:

3:1 metanol: asetik asit

% 5' lik Giemsa Boya Çözeltisi:

5 mL giemsa 95 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlanır.

Fitohemaglutinin Çözeltisi (PHA):

1.2 mg fitohemaglutinin 5 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlanır.

Sitokalsin-B (Cyt-B) Solüsyonu:

1.5 mg sitokalsin-B 10 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlanır.

Lizis Çözeltisi (500 mL pH: 10):

73.05 gr NaCl, 18.6 gr EDTA, 0.6 gr Trizmayı karıştırılıp 350 mL distile su eklenir, 20 dk sonra 4 gr NaOH eklenir. Distile suyla 445 mL'ye tamamlanarak hazırlanır. Bu solüsyondan 71 mL alınıp 8 mL DMSO ve 1 ml Triton-X-100 ile karıştırılır (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton-X-100).

Düşük Erime Noktalı Agar (Low Melting Agaroz- LMA):

0.065 gr LMA 10 mL PBS içerisinde çözülerek hazırlanır.

Normal Erime Noktalı Agar (Normal Melting Agaroz- NMA):

0.25 gr NMA 50 mL PBS içerisinde çözülerek hazırlanır.

Fosfat Tamponu (PBS) :

0.96 gr PBS 100 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlanır.

Nötralizasyon Tamponu (500 mL pH: 7.5):

24 gr Tris- HCl 500 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlanır.

Elektroforez Çözeltisi (1.5 L pH: 13):

18 gr NaOH ve 0,63 gr EDTA tartılarak 1.5 L distile su içerisinde çözülerek hazırlanır (300 mM NaOH, 1 mM EDTA).

Etidyum Bromür Solüsyonu:

5 mg etidyum bromür 50 mL distile su içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlanır. Stok çözeltilerden seyreltme oranı 1: 4 etidyum bromür: distile sudur.

S-9 Metabolik Aktivasyon Sistemi:

1 mL S-9 (sigma); 0.33 mL 1 M KCl; 0.32 mL 0.25 M MgCl₂.6H₂O; 0.25 mL 0.2 M G-6-P; 1 mL 0.04 M NADP; 0.2 M 5 mL fosfat buffer Na₂HPO₄NaH₂PO₄ pH: 7.5; 10 mL distile suda çözülerek hazırlanır.

3.1.2. BPA Konsantrasyonlarının Hazırlanması

0.063 µg/L' lik konsantrasyon;

BPA' dan 31.5 mg tartılarak 1 L steril distile suda çözülmüştür. Bu çözeltilerden 100 µL alınarak tekrar 1 L steril distile suda çözülerek stok çözelti oluşturulmuştur. Ekim esnasında bu çözeltilerden 100 µL alınıp 5 mL besi yerine eklenince bu konsantrasyona ulaşılmış olmaktadır.

0.128 µg/L' lik konsantrasyon;

BPA' dan 64 mg tartılarak diğer işlemler aynı şekilde uygulanmıştır.

0.32 µg/L' lik konsantrasyon;

BPA' dan 160 mg tartılarak diğer işlemler aynı şekilde uygulanmıştır.

3.1.3. Pozitif Kontrollerin Hazırlanması

Mitomisin C (MMC) (S-9' suz MN kültürü için);

0.1 gr MMC 10 mL distile suda çözülmüştür. Bundan 1 mL alınarak üzerine 9 mL distile su eklenmiştir. Aynı işlem tekrarlanarak stok solüsyonu elde edilmiştir. Ekim sırasında 5 mL' lik tüplere 100' er µL konulduğunda tüplerdeki konsantrasyonu 2 µg/mL MMC' dir.

Siklofosamid (CF) (S-9' lu MN kültürü için);

0.007 gr madde 10 mL distile suda çözülmüştür. Bu çözeltilerden 1 mL alınıp üzerine 9 mL steril distile su eklenerek stok çözelti oluşturulmuştur. 5 mL' lik kültür ortamına bu stoktan 100 µL eklendiğinde tüpteki son konsantrasyon 1.4 µg/mL' dir.

Hidrojen Peroksit (H₂O₂) (S-9' suz KOMET kültürü için);

%30'luk H₂O₂ çözeltisinden 102 µL alınmış ve 100 mL'ye kadar saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. 5 mL' lik besi kültürüne 100 µL eklendiğinde tüpteki son derişim 10 mM olmaktadır.

Benzo- a- pren (S-9' lu KOMET kültürü için);

377.4 µL benzo-a-pren mikropipet ile çekilerek 10 mL' ye kadar steril distile su ile tamamlanarak stok çözelti hazırlanmıştır. 5 mL' lik besi kültürüne 100 µL eklendiğinde tüpteki son derişim 158 µM olmaktadır.

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj (Nüve-NF 815)
- pH metre (Inolab wtw)

- Etüv (Nüve-EN 400)
- Işık mikroskobu (Olympus sd30)
- Elektroforez (Thermo Scientific, EC300XL2)
- Floresan mikroskop (Olympus, BX51 mikroskop)
- Sıcak su banyosu (Nahita, 601/12)
- Manyetik karıştırıcı (Misung Scientific, MS300HS)
- Hassas terazi (Kern, ALJ 220-4)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. S-9' suz ve S-9' lu MN Preparatlarının Hazırlanması

1. Sigara ve alkol kullanmayan, 25 yaşında, 3 sağlıklı erkek bireyden 10' ar mL heparinli kan alınmıştır.
2. İçlerinde 5' er mL besiyeri bulunan deney tüplerine 0.5 mL kan ve 0.15 mL PHA eklenmiştir.
3. BPA' nın 0.063 µg/L; 0.128 µg/L; 0.32 µg/L konsantrasyonları, negatif ve pozitif kontroller tüplere yazılarak gruplandırılmıştır.
4. Deney tüpleri ayrıca S-9' lu ve S-9' suz olarak ayrılarak toplamda MN testi için 30 tüp elde edilmiştir.
5. S-9' suz tüpler için BPA çözeltileri konsantrasyonları belirtilen tüplere 100' er µL eklenmiştir.
6. Pozitif kontrol tüplerinden S-9' lu olanlara 100 µL CP, S-9' suz olanlara 100 µL MMC solüsyonu, negatif kontrol tüplerine ise 100 µL steril saf su ilave edilmiştir.
7. Tüplerin ağzı kapatılarak 45° lik açıyla inkübasyon için 37 °C' lik etüve konulmuştur.
8. 24. saatin sonunda S-9' lu tüplere 100 µL BPA ve 0.5 mL S-9 aktivasyon sistemi eklenmiştir.
9. S-9' suz tüplere ise hiçbir işlem uygulanmamıştır.
10. BPA ve S-9 aktivasyon sistemi eklenen tüpler tekrar etüve konularak 3 saat bekletilmiştir.
11. 3. saatin sonunda RPMI besiyeriyle iki kez yıkanıp tekrar etüve konulmuştur.

12. 44. saatte bütün tüplere 300 µL sitokalsin- B eklenmiştir.
 13. Tekrar etüve konulduktan sonra 72. saatte çıkarılıp 2000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiştir.
 14. Çökelti üzerine 10 mL hipotonik solüsyonu eklenip hafifçe pipetle karıştırılmıştır.
 15. 3 dk oda ısısında bekletilmiştir.
 16. Tüpler 2000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiştir.
 17. Çökelti üzerine 5 mL fiksatif solüsyonu eklenmiş ve tekrar 2000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiştir.
 18. Bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır.
 19. En son çökelti üzerine 1 mL fiksatif eklenerek lamlara yayılmıştır.
 20. Preparatlar oda ısısında kurumaya bırakıldıktan sonra distile suyla hazırlanan % 5' lik giemsa boya solüsyonu ile boyanarak mikroskopta incelenmiştir.
- 3.2.2. S-9' suz ve S-9' lu Komet Preparatlarının Hazırlanması
1. Sigara ve alkol kullanmayan, 25 yaşında, 3 sağlıklı erkek bireyden 10' ar mL heparinli kan alınmıştır.
 2. 5 mL Histopak-1077 üzerine 5 mL tam kan eklenmiş, 2000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir.
 3. Ayrıştırılan lenfositler mikropipet yardımıyla alınarak 500 µL PBS + 500 µL lenfosit karışımı hazırlanmıştır.
 4. BPA' nın 0.063 µg/L; 0.128 µg/L; 0.32 µg/L konsantrasyonları, negatif ve pozitif kontroller tüplere yazılarak gruplandırılmıştır.
 5. Deney tüpleri ayrıca S-9' lu ve S-9' suz olarak ayrılarak toplamda komet testi için 30 tüp elde edilmiştir.
 6. İçlerinde 5' er mL besiyeri bulunan ve konsantrasyonları yazan deney tüplerine bu karışımdan 300'er µL eklenmiştir.
 7. Tüpler 37°C' de 72 saat inkübe edilmiştir.
 8. 72. saatin sonunda her tüpe belirtilen konsantrasyonlarda 100' er µL BPA eklenmiştir.

9. S-9' suz pozitif kontrol tüplerine 100 µL H₂O₂; S-9' lu pozitif kontrol tüplerine 100 µL benzo-a-pren; S-9'lu negatif kontrol tüplerine 100 µL DMSO; S-9'suz negatif kontrol tüplerine ise 100 µL su eklenmiştir.
10. S-9 ile çalışılacak tüplere 500 µL S-9 aktivasyon sistemi eklenmiştir.
11. Bütün tüpler 37°C' de 3 saat inkübe edilmiştir.
12. Her tüpten 100 µL alınarak endorf tüplerine konulmuş ve su banyosu içerisinde 100 µL LMA ile karıştırılmıştır.
13. Örnekler lamlara alınarak üzerleri lamelle kapatılmıştır.
14. +4 °C' de 15 dk bekletildikten sonra lameller üzerlerinden çekilip içerisinde lizis çözeltisi bulunan şalelere ışık almayacak şekilde yerleştirilip 60 dk +4 °C' de bekletilmiştir.
15. Lizis çözeltisinden çıkarılan preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra içerisinde elektroforez çözeltisi bulunan elektroforez tanklarına ışık almayacak şekilde yerleştirilmiştir.
16. Preparatlar , tankın içerisinde 20 dk çalıştırılmadan , 20 dk ise 25 V 300mA' da çalıştırılarak bekletilmiştir.
17. Bu muameleden sonra soğuk distile su ile yıkayıp 10 dk nötralizasyon çözeltisinde bekletilmiştir.
18. Tekrar soğuk distile su ile yıkamıştır.
19. 10 dk soğuk etanolde bekletilen preparatlar durulanmadan kurumaya bırakılmıştır.
20. Preparatlar etidyum bromür boya solüsyonu ile boyanarak floresan mikroskopta incelenmiştir.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Deney sonuçlarından elde edilen verilerin istatistiksel analizinde two-way ANOVA ve post-hoc Tukey testleri kullanılmıştır. Elde edilen veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını incelemek amacıyla öncelikle tüm gruplar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Daha sonra S-9 aktivasyon sistemi içermeyen gruplar kendi negatif ve pozitif kontrolleriyle, S-9 aktivasyon sistemi içeren gruplar da kendi negatif ve pozitif kontrolleriyle kıyaslanmıştır. Ayrıca MN ölçümleri analiz edilmeden önce logaritmik transformasyon uygulanmıştır. Değerlendirmeler yapılırken istatistiksel anlamlılık değeri (p değeri = güven aralığı) 0.05 olarak alınmıştır. Veriler SATATA MP/ 11 paket programı kullanılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

Bu çalışmanın amacı son yıllarda kullanımı oldukça artış gösteren, polikarbonatlı plastikler ve yapay reçinelerin yapımında kullanılarak hayatımıza dahil olan BPA'nın *in vitro* sitotoksik, genotoksik ve oksidatif potansiyellerini incelemektir. Bu çalışma insan kan lenfosit kültürü ile yapılarak bu kimyasalın sitotoksik, genotoksik ve oksidatif potansiyeli hücresel düzeyde ölçülmüştür. Çalışmada kullanılan konsantrasyonlar daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda insan serumundaki değerler referans alınarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri sigara kullanmayan sağlıklı üç erkek bireyden alınmıştır. Hücre kültürlerinde BPA konsantrasyonları 0.063 µg/L; 0.128 µg/L; 0.32 µg/L olacak şekilde ayarlanmıştır.

Mikronükleus (MN) testi uygulanırken negatif kontrol hücre kültürlerine saf su; pozitif kontrol hücre kültürlerinden S-9' suz olanlara mitomisin-C, S-9' lu olanlara ise siklofosfamid eklenmiştir. Kurutulan preparatlar Pery ve Wolf'un giemsa tekniğine göre boyanmıştır [104]. Preparatlardan 1000 binüklü hücre arasından 1 MN ve 2 MN içeren hücreler sayılarak kaydedilmiştir.

Sitokinez blok hücre proliferasyon indeksi (CBPI) hücrenin kaçınıcı mitozda olduğu baz alınarak aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$CBPI = 1 \times (\%M1) + 2 \times (\%M2) + 3 \times (\%M3) / 100$$

Komet testi uygulanırken negatif kontrol gruplarından S-9' suz olanlara saf su, S-9' lu olanlara DMSO; pozitif kontrol gruplarından S-9' suz olanlara H₂O₂, S-9' lu olanlara ise benzo-a-pren eklenmiştir. Hazırlanan preparatlar etidyum bromür ile boyanmıştır. Her bireye ait bir konsantrasyondan 100 hücre sayılarak hücreler hasar derecesine göre gruplandırılmıştır. Hiç hasar görmeyenler tip 0, çok az hasarlı olanlar tip 1, az hasarlı olanlar tip 2, hasarlı olanlar tip 3, çok küçük başlı ve uzun kuyruklu olanlar yani çok hasarlı olanlar tip 4 olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan sayımlar sonucunda hasarlı hücre yüzdeleri ve genetik hasar indeksleri hesaplanmıştır.

Genetik hasar indeksi (GHI): [(Tip0x0) + (Tip1x1) + (2xTip2) + (3xTip3) + (4xTip4)].

Hasarlı hücre yüzdesi (HHY): Tip2 + Tip3 + Tip4

4.1.1. Lenfositlere Uygulanan MN Testi Sonuçları

MN testi için sonuçlara bakıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak 1 MN ve 2 MN değerlerinde artış olduğu görülmektedir (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.). 1 MN sayılan preparatlardan S-9' suz ve S9' lu grupların aynı konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0.440). Ancak konsantrasyonlar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. (p=0.023). 2 MN sayılan preparatlardan S-9' suz ve S9' lu grupların aynı konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0.345). Ancak konsantrasyonlar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (p=0.005). Elde edilen veriler Çizelge 4.1., Çizelge 4.2., Çizelge 4.3., Şekil 4.1. ve Şekil 4.2. ' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. S-9' suz ortamda elde edilen MN değerleri

Bireyler	Negatif kontrol(NK)	0.063 µg/L	0.128 µg/L	0.32 µg/L	Pozitif kontrol (PK)
1. Birey	3 (1MN li)	6 (1MN li)	8 (1MN li)	8 (1MN li)	10 (1MN li)
	0 (2MN li)	2 (2MN li)	3 (2MN li)	5 (2MN li)	7 (2MN li)
2. Birey	2 (1MN li)	5 (1MN li)	7 (1MN li)	8 (1MN li)	10 (1MN li)
	0 (2MN li)	1 (2MN li)	4 (2MN li)	6 (2MN li)	8 (MN li)
3. Birey	4 (1MN li)	5 (1MN li)	6 (1MN li)	7 (1MN li)	8 (1MN li)
	1 (2MN li)	1 (2MN li)	5 (2MN li)	7 (2MN li)	7 (2MN li)

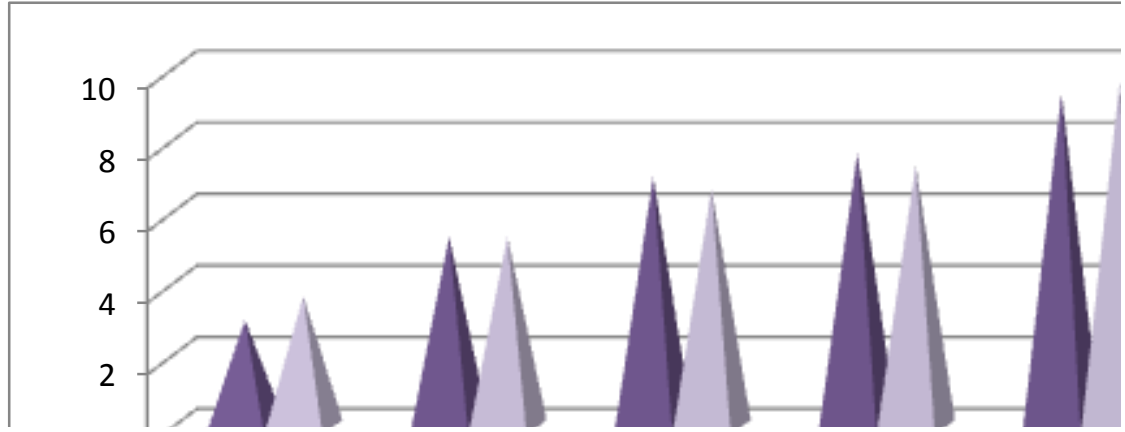
Çizelge 4.2. S-9' lu ortamda elde edilen MN değerleri

Bireyler	Negatif kontrol (NK)	0.063 µg/L	0.128 µg/L	0.32 µg/L	Pozitif kontrol (PK)
1. Birey	4 (1MN li)	5 (1MN li)	7 (1MN li)	8 (1MN li)	10 (1MN li)
	1 (2MN li)	1 (2MN li)	3 (2MN li)	6 (2MN li)	8 (2MN li)
2. Birey	3 (1MN li)	5 (1MN li)	6 (1MN li)	7 (1MN li)	9 (1MN li)
	2 (2MN li)	2 (2MN li)	4 (2MN li)	5 (2MN li)	6 (2MN li)
3. Birey	4 (1MN li)	6 (1MN li)	7 (1MN li)	7 (1MN li)	10 (1MN li)
	2 (2MN li)	2 (2MN li)	2 (2MN li)	4 (2MN li)	8 (2MN li)

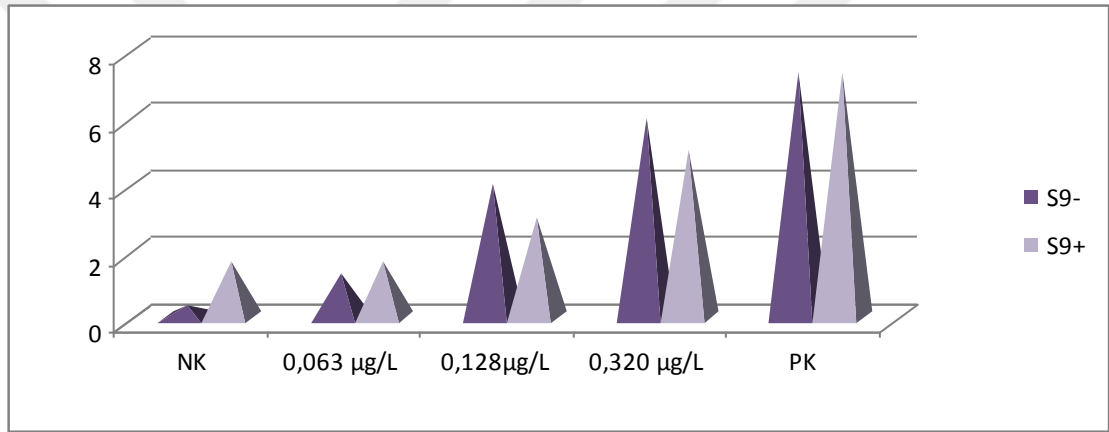
Çizelge 4.3. BPA' daki konsantrasyon artışına bağlı olarak elde edilen MN değerleri

*: Negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0.05$) farklıdır.

		1 MN	2 MN
		Ort±SS	Ort±SS
S9-	NK	3.00±1.00	0.33±0.58
	0.063 µg/L	5.33±0.58 *	1.33±0.58 *
	0.128µg/L	7.00±1.00 *	4.00±1.00 *
	0.320 µg/L	7.67±0.58 *	6.00±1.00 *
	PK	9.33±1.15 *	7.33±0.58 *
S9+	NK	3.67±0.58	1.67±0.58
	0.063 µg/L	5.33±0.58 *	1.67±0.58
	0.128 µg/L	6.67±0.58 *	3.00±1.00 *
	0.320 µg/L	7.33±0.58 *	5.00±1.00 *
	PK	9.67±0.58 *	7.33±0.58 *



Şekil 4.1. 1 MN elde edilen S-9' lu ve S-9' suz grupların karşılaştırması



Şekil 4.2. 2 MN elde edilen S-9' lu ve S-9' suz grupların karşılaştırması

4.1.2. CBPI Sonuçları

CBPI değerlerine bakıldığında değerlendirilen preparatlardan S-9' suz ve S9' lu grupların aynı konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p=0.795$). Ancak konsantrasyonlar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p=0.001$). BPA' nın konsantrasyon artışına bağlı olarak CBPI oranındaki düşüş Çizelge 4.4., Çizelge 4.5., Çizelge 4.6 ve Şekil 4.3' te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. S-9' suz ortamda lenfosit hücrelerine uygulanan MN testi sonucunda elde edilen CBPI değerleri

Bireyler	Negatif kontrol (NK)	0.063 $\mu\text{g/L}$	0.128 $\mu\text{g/L}$	0.32 $\mu\text{g/L}$	Pozitif kontrol (PK)
1.Birey	2.54	2.38	2.18	1.85	1.51
2.Birey	2.53	2.32	2.02	1.75	1.46
3.Birey	2.54	2.35	2.10	1.80	1.46

Çizelge 4.5. S-9' lu ortamda lenfosit hücrelerinde uygulanan MN testi sonucunda elde edilen CBPI değerleri

Bireyler	Negatif kontrol (NK)	0.063 $\mu\text{g/L}$	0.128 $\mu\text{g/L}$	0.32 $\mu\text{g/L}$	Pozitif kontrol (PK)
1.Birey	2.53	2.33	2.12	1.90	1.46
2.Birey	2.56	2.28	2.05	1.87	1.51
3.Birey	2.54	2.30	2.08	1.88	1.46

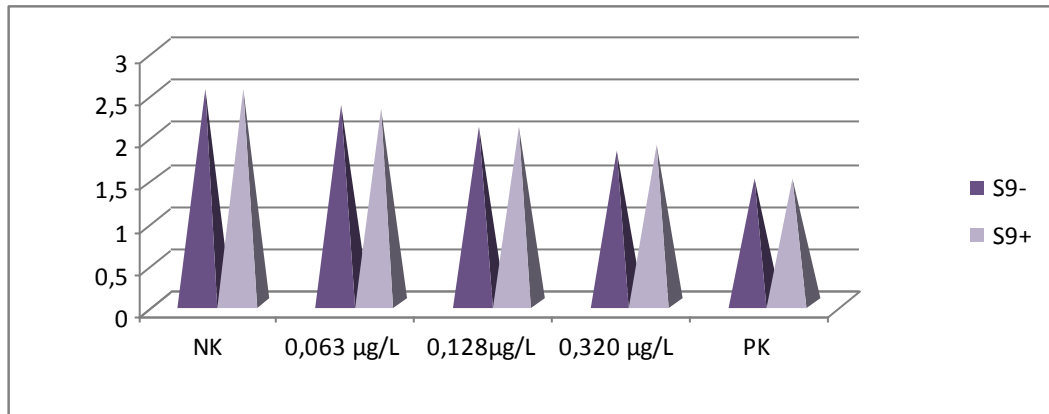
Çizelge 4.6. BPA' daki konsantrasyon artışına bağlı olarak elde edilen CBPI değerleri

*: Negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0.05$) farklıdır.

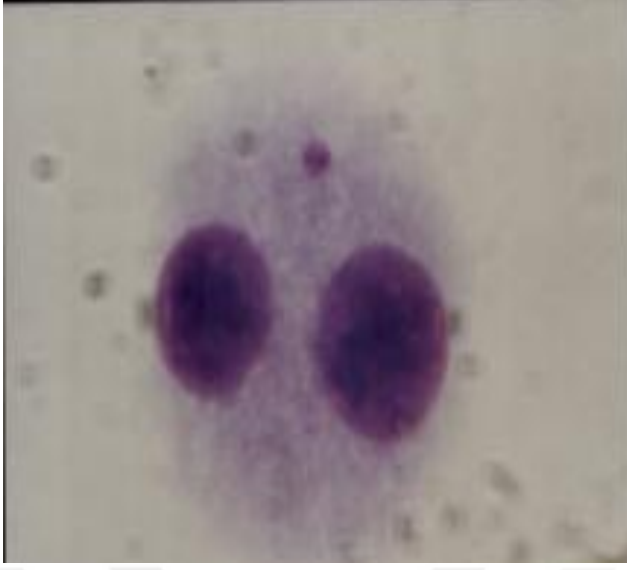
** : Negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0.01$) farklıdır.

***: Negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0.001$) farklıdır.

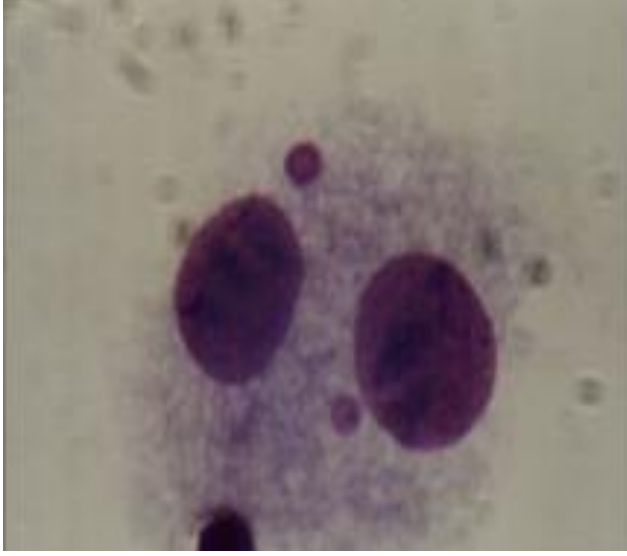
		CBPI
		Ort±SS
S9-	NK	2.54±0.01
	0.063 µg/L	2.35±0.03 **
	0.128µg/L	2.10±0.08 **
	0.320 µg/L	1.80±0.05 **
	PK	1.48±0.03 ***
S9+	NK	2.54±0.02
	0.063 µg/L	2.30±0.03 **
	0.128µg/L	2.08±0.04 **
	0.320 µg/L	1.88±0.02 **
	PK	1.48±0.03 ***



Şekil 4.3. S-9' lu ve S-9' suz ortamda çalışılan grupların CBPI değerlerinin karşılaştırması



Şekil 4.4. Sitokinezi bloke edilmiş 1MN' li hücre



Şekil 4.5. Sitokinezi bloke edilmiş 2 MN' li hücre

4.1.3. Lenfositlere Uygulanan Komet Testi Sonuçları

Komet testi için hazırlanan preparatlar etidyum bromür ile boyanıp her preparattan 100 hücre sayılmıştır.

4.1.3.1. Lenfositlerde Yapılmış Komet Analizine Göre Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY) Sonuçları

Hasarlı hücre yüzdesi, sayılan 100 hücre içerisindeki tip 2, tip 3 ve tip 4 düzeyinde hasar görmüş hücrelerin toplam sayısıdır. BPA'nın artan konsantrasyonlarına bağlı olarak HHY artış göstermiştir (Şekil 4.8.). Değerlendirilen preparatlardan S-9' suz ve S9' lu grupların aynı konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p=0.456$). Ancak konsantrasyonlar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0.0001$). Elde edilen değerler Çizelge 4.7., Çizelge 4.8., Çizelge 4.9. ve Şekil 4.6. ' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. S-9' suz ortamda lenfosit hücrelerine uygulanan komet testi sonucunda elde edilen HHY değerleri

Bireyler	Negatif kontrol (NK)	0.063 µg/L	0.128 µg/L	0.32 µg/L	Pozitif kontrol (PK)
1. Birey	16	17	24	29	86
2. Birey	14	20	28	32	94
3. Birey	8	27	29	34	92

Çizelge 4.8. S-9' lu ortamda lenfosit hücrelerine uygulanan komet testi sonucunda elde edilen HHY değerleri

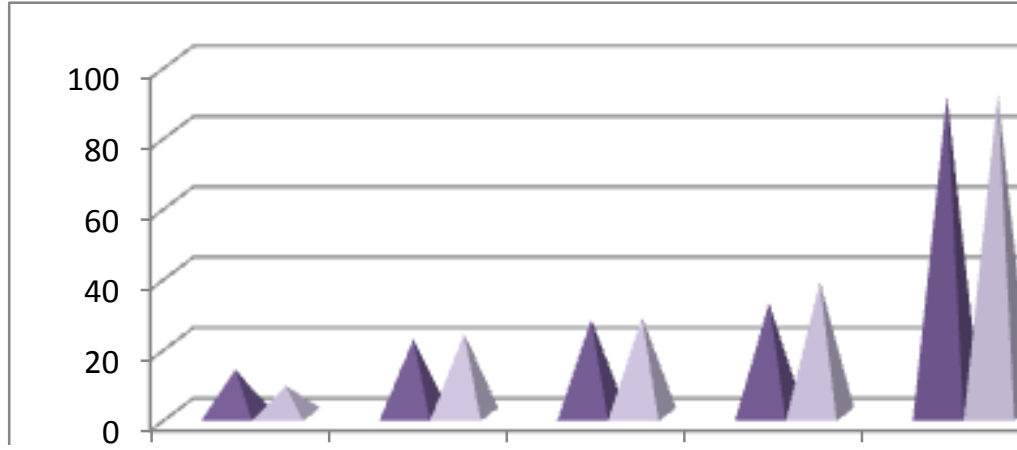
Bireyler	Negatif kontrol (NK)	0.063 µg/L	0.128 µg/L	0.32 µg/L	Pozitif kontrol (PK)
1. Birey	7	22	29	36	89
2. Birey	8	24	26	39	96
3. Birey	9	23	28	38	88

Çizelge 4.9. Lenfositlere uygulanan komet testi sonucunda elde edilen HHY değerleri

*: Negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0.05$) farklıdır.

** : Negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0.01$) farklıdır.

GRUPLAR	S9- Ort±SS	S9+ Ort±SS
NK	12.67±1.00	8.00±1.00
0.063 µg/L	21.33±5.14 *	23.00±1.00 *
0.128µg/L	27.00±2.65 **	27.67±1.53 **
0.320 µg/L	31.67±2.52 **	37.67±1.53 **
PK	90.67±4.16 **	91.00±4.36 **



Şekil 4.6. HHY değerleri elde edilen S-9' lu ve S-9' suz grupların karşılaştırması

4.1.3.2. Lenfositlerde Yapılmış Komet Analizine Göre Genetik Hasar İndeksi (GHI) Sonuçları

Genetik hasar indeksi sayılan 100 hücre içerisinde elde edilen tip1, tip2, tip3, tip4 değerleri hesaba alınarak;

GHI: $[(0 \times \text{Tip0}) + (1 \times \text{Tip1}) + (2 \times \text{Tip2}) + (3 \times \text{Tip3}) + (4 \times \text{Tip4})]$ formülünden elde edilmiştir. Komet tip 0' lar formüle dahil edilmemiştir.

BPA'nın artan konsantrasyonlarına bağlı olarak GHI artış göstermiştir (Şekil 4.8.). S9' suz ve S9' lu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur. ($p=0.447$). Ancak konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0.001$). Elde edilen değerler Çizelge 4.10., Çizelge 4.11., Çizelge 4.12. ve Şekil 4.7.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. S-9' suz ortamda lenfosit hücrelerine uygulanan komet testi sonucunda elde edilen GHI değerleri

Bireyler	Negatif kontrol (NK)	0.063 $\mu\text{g/L}$	0.128 $\mu\text{g/L}$	0.32 $\mu\text{g/L}$	Pozitif kontrol (PK)
1.Birey	58	67	98	115	302
2.Birey	58	70	99	118	340
3.Birey	48	93	103	128	330

Çizelge 4.11. S-9' lu ortamda lenfosit hücrelerine uygulanan komet testi sonucunda elde edilen GHI değerleri

Bireyler	Negatif kontrol (NK)	0.063 $\mu\text{g/L}$	0.128 $\mu\text{g/L}$	0.32 $\mu\text{g/L}$	Pozitif kontrol (PK)
1.Birey	37	74	106	121	319
2.Birey	42	83	98	126	310
3.Birey	43	77	104	124	316

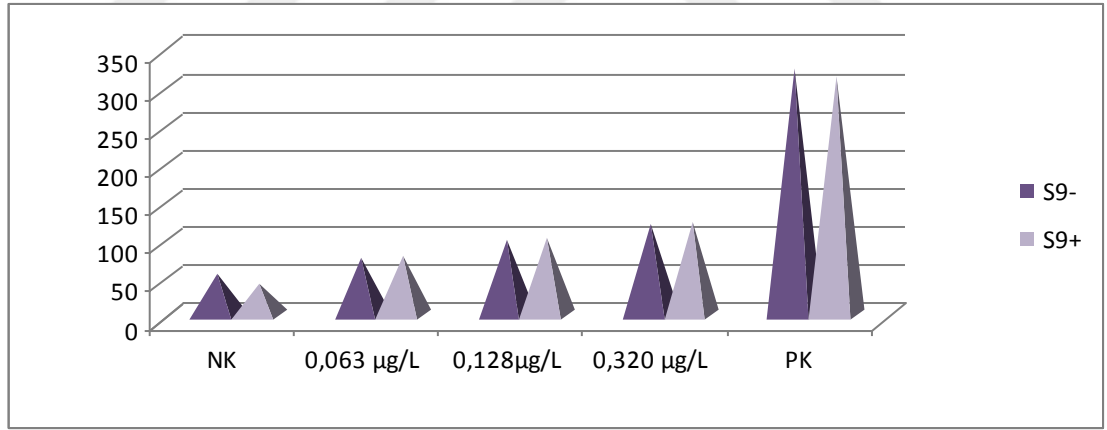
Çizelge 4.12. Lenfositlere uygulanan komet testi sonucunda elde edilen GHI değerleri

*: Negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0.05$) farklıdır.

** : Negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0.01$) farklıdır.

***: Negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0.001$) farklıdır.

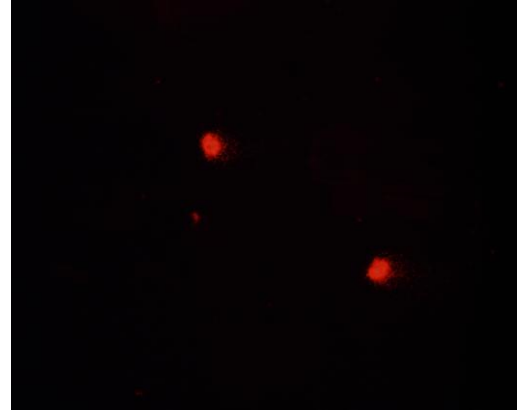
	S9-	S9+
	Ort±SS	Ort±SS
NK	54.67±5.77	40.67±3.21
0,063 µg/L	76.67±14.22 *	78.00±4.58 *
0,128µg/L	100.00±2.65 **	102.67±4.16 **
0,320 µg/L	120.33±6.81 **	123.67±2.52 **
PK	324.00±19.70 ***	315.00±4.58 ***



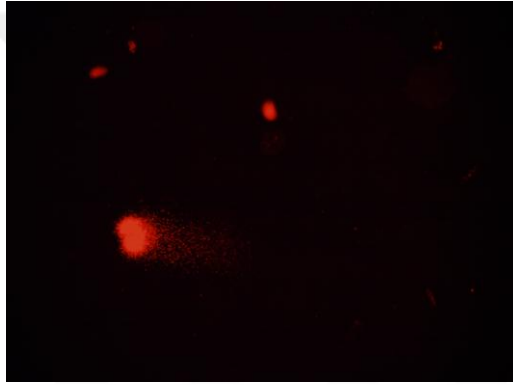
Şekil 4.7. GHI değerleri elde edilen S-9' lu ve S-9' suz grupların karşılaştırması



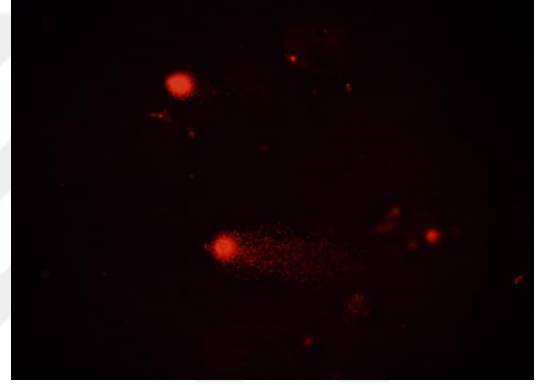
A) Tip 0



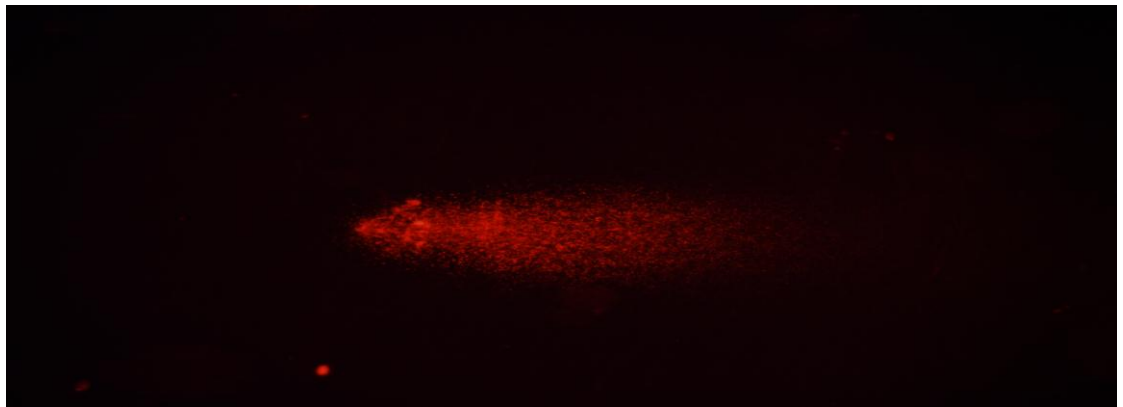
B) Tip 1



C) Tip 2



D) Tip 3



E) Tip 4

Şekil 4. 8. Komet oluşturmuş lenfositlerin floresan mikroskoftaki görüntüleri

4.2. TARTIŞMA

Bu çalışmada yapay reçine ve polikarbonatlı plastik üretiminde kullanılan BPA ve metabolize ürünlerinin insan kan lenfosit kültüründe genotoksik, sitotoksik ve oksidatif potansiyellerini belirlemek amaçlanmıştır. Hücrelere MN ve komet testleri uygulanmış ve hücrelerin CBPI değerleri hesaplanmıştır. Çalışmada S-9 metabolik aktivasyonlu ve metabolik aktivasyonsuz ortamlar kullanılmıştır. S-9 metabolik aktivasyon sistemi kullanılmayan ortamda sadece BPA'nın, S-9 metabolik aktivasyon sistemi kullanılan ortamda ise BPA ve metabolitlerinin etkileri ölçülmüştür.

Elde edilen verilerden BPA'nın kullanılan konsantrasyonları insan kan lenfosit kültürlerinin S-9' suz ve S-9' lu ortamlarında genotoksik etki göstermiştir. Bu etki MN ve komet yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir. Uygulanan komet testinde BPA'nın artan konsantrasyonlarında DNA kuyruk uzunluklarının anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Bu durum aynı zamanda bu kimyasalın DNA'da oksidatif potansiyele sahip olduğunun da bir göstergesidir. Lenfositlerde MN oluşumlarının ise konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada BPA'nın sitotoksik potansiyelini belirlemek amacıyla hücrelerin CBPI değerleri hesaplanmıştır. BPA'nın uygulanan konsantrasyonu arttıkça CBPI değerinin düştüğü belirlenmiştir. CBPI uygulanan kimyasalın toksisite derecesiyle ters orantılı olduğu için BPA'nın uygulanan konsantrasyonlarının insan kan lenfosit kültüründe sitotoksik etki oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

BPA ve türevleri ile ilgili yapılan çalışmalar *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki farklı şekilde gruplandırılabilir.

BPA ve türevleri ile ilgili yapılan *in vivo* çalışmalar:

Tennant ve ark. dişi ve erkek sıçanlarda yaptığı bir çalışmada BPA'nın genotoksitesini araştırmışlardır. Yetişkin sıçanlara oral yolla 2.4 µg, 10 µg, 5 mg ve 50mg/kg dozları günde bir kez olmak üzere 6 gün boyunca uygulanmıştır. Kemik iliği ve kan örnekleri alınarak MN, kromozom aberasyonu ve tek hücre jel elektroforezi (komet testi) gibi genotoksikite testleri uygulanmıştır. 2.4 µg/kg doz

uygulaması dışında diğer BPA maruziyetlerinin polikromatik eritrositlerde MN frekansını önemli ölçüde arttırdığı, kemik iliği hücrelerinde yapısal kromozom aberasyonuna neden olduğu ve lenfositlerde DNA hasarına yol açtığı gözlenmiştir. Bu sonuçlardan BPA'nın genotoksik aktivite gösterdiği ve oksidatif hasara sebep olduğu rapor edilmiştir [58]. Yapılan bu çalışma bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Çalışmamızda S-9' lu ortamda konsantrasyon artışına bağlı olarak MN frekansında artış gözlenmiştir. Komet testinde de konsantrasyon artışına bağlı olarak kuyruk uzunluğunda artışa neden olarak DNA' da oksidatif hasara yol açtığı gözlenmiştir.

BPA'nın 5 mg, 10 mg ve 20 mg/kg dozları kullanılarak dişi farelerin somatik hücrelerinde DNA hasarını belirlemek için yapılan bir çalışmada dişi fareler iki haftalık BPA maruziyetine bırakılmıştır. Çalışmada MN ve komet testleri kullanılmıştır. Komet testinden elde edilen verilere göre BPA'nın sadece akciğer hücrelerinde DNA kırıklıklarını tetiklediği; kemik iliği lenfositleri, karaciğer, böbrek ve dalak hücrelerini etkilemediği gözlenmiştir. MN frekansının ise sadece periferel kanın retiküositlerinde artış gösterip kemik iliği lenfositlerinde artış göstermediği rapor edilmiştir [105]. Bu çalışmadan elde edilen veriler bizim çalışmamızı desteklememektedir. Lenfositlerde komet testi sonucunda DNA kırıklıklarının görülmemesi ve MN testi sonucunda MN frekansında artış görülmemesi çalışmamızla örtüşmemektedir. Bu farklılığın sebebinin bizim çalışmamızda *in vivo* ortam oluşturmak için S-9 metabolik aktivasyon sisteminin kullanılıp bu çalışmada ise gerçek *in vivo* ortamın kullanılmış olduğundan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Ayrıca çalışmalarda farklı canlıların lenfositlerinin kullanılmasının farklı sonuçlar doğurmuş olabileceği de düşünülmektedir.

Yukarıdaki çalışmayla aynı doğrultuda yapılan başka bir çalışmada erkek farelere iki hafta boyunca 5 mg, 10 mg, 20 mg ve 40 mg dozlarında BPA uygulanmıştır. Elde edilen verilerde yukarıdaki çalışmanın aksine kullanılan her dozun lenfosit, dalak, böbrek, akciğer ve üreme hücrelerinin DNA' larında zincir kırıklıkları oluşturduğu gözlenmiştir [106]. Elde edilen veriler çalışmamızla tutarlılık göstermektedir.

Ulutaş ve ark. yetişkin erkek Wistar albino sıçanlarla yaptıkları bir çalışmada BPA' nın 125 mg ve 250 mg/kg dozları kullanılarak komet yöntemi ile genotoksitesini araştırmışlardır. Her doz için 6' şar sıçan kullanılarak sıçanlar 4 hafta boyunca BPA ile oral yolla muamele edilmiştir. Çalışma sonunda DNA kuyruk uzantıları bakımından 125 mg/kg doz uygulanan grupla negatif kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık oluşmazken 250 mg/kg doz uygulanan grupla negatif kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık olduğu rapor edilmiştir [107]. Elde edilen veriler çalışmamızla örtüşmektedir.

BPA' nın genotoksik ve sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla; kromozom aberasyonu, MN testi ve c-mitotik etki olmak üzere üç farklı parametre kullanılarak İsviçre albino fare kemik iliklerinde yapılan bir çalışmada oral yolla uygulanan BPA' nın tek doz 10 mg, 50 mg ve 100 mg ve tekrarlı doz 10 mg/kg olmak üzere test edilen dozlarının kromozomal sapma ya da MN frekansında değişime sebep olmadığı ancak sitotoksik potansiyelini c-mitotik etkide azalma yoluyla gösterdiği bildirilmiştir [63]. Bu çalışma BPA' nın genotoksik olmadığını ancak sitotoksik olduğunu göstermektedir. Oysa bizim çalışmamızdan elde edilen verilere göre BPA hem genotoksik hem de sitotoksik etkiye sahiptir. Çalışmalardan farklı sonuç alınmasının çalışılan canlı grubunun aynı olmamasından ileri geldiği düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmanın doğrudan *in vivo* ortamda gerçekleştirilip bizim çalışmamızın ise S-9 metabolik aktivasyon sistemi kullanılarak *in vivo* ortamın sağlanması gibi farklılıklardan kaynaklandığı da düşünülmektedir.

Yapılan bir çalışmada BPA' nın dişi yavru sıçanların karaciğer hücrelerindeki DNA hasarı üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada BPA' nın 0.5 mg ve 50 mg/kg dozları emzirilme dönemleri boyunca (20 gün) yavru sıçanlara enjekte edilmiştir. Yapılan komet testinde her iki dozun da kontrol gruplarıyla karşılaştırılması sonucunda DNA hasarında anlamlı artışa sebep olduğu bildirilmiştir [108]. Yapılan bu çalışmadan elde edilen veriler bizim verilerimizi desteklemektedir.

BPA ve türevleri ile ilgili yapılan *in vitro* çalışmalar:

Iso ve ark. yaptığı bir çalışmada östrojen reseptörü pozitif MCF-7 hücre kültürü kullanılarak BPA' nın DNA üzerindeki hasar potansiyeli araştırılmıştır. DNA

hasarı komet kuyruk ölçümü ve γ H2AX metotları ile değerlendirilmiştir. Uygulanan BPA konsantrasyonlarından 10^{-6} M' in 3 saat muamelesinden sonra, 10^{-4} M' in ise 1 ve 3 saat muamelelerinden sonra komet kuyruk uzunluğunu arttırdığı rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmada BPA' nın 10^{-6} M konsantrasyonunun 3 saat muamelesinden sonra γ H2AX metodu ile MCF-7 hücre kültüründe DNA çift zincir kırıklıklarına yol açtığı bildirilmiştir. Bu sonuçlardan BPA' nın genotoksik olduğu rapor edilmiştir. Ancak BPA' nın bu çalışmadaki etkili konsantrasyonlarının genotoksik olmasının MCF-7 hücrelerinin yaşamasını engellemediğinden sitotoksik olduğunu göstermediği vurgulanmıştır [13]. Bu çalışma BPA' nın genotoksitesini ve DNA üzerindeki oksidatif potansiyeli bakımından bizim çalışmamızla örtüşmektedir. Ancak çalışmalar sitotoksitesine bakımından aynı doğrultuda değildir. Bu durumun farklı hücre kültürlerinin kullanılmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Yapılan bir çalışmada mavi midyelerin solungaç hücrelerine 50 ppb konsantrasyonunda BPA uygulanmıştır. Bu konsantrasyonun mavi midyelerde MN oluşumuna sebep olurken diğer nükleer anormalliklere sebep olmadığı gözlenmiştir [59]. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar birbirini desteklemektedir.

Xin ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada INS-1 sıçan insülinoma hücre kültürü 25 μ M, 50 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarında BPA' ya maruz bırakılmıştır. Süre sonunda bu hücre kültürüne komet testi uygulanmıştır. Elde edilen verilerden BPA' nın hücrelerde DNA göçünü arttırdığı tespit edilmiştir [109]. Yapılan bu *in vitro* çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Yapılan bir çalışmada BPA' nın yapay bir bileşiği olan BADGE ve onun hidroliz ürünleri olan BADGE. H₂O ve BADGE.2H₂O ile çalışılmıştır. Çalışma bu bileşiklerin insan kan lenfosit kültürlerinde genotoksitesilerini belirlemek için S-9 metabolik aktivasyon sistemi varlığında ve yokluğunda MN testi kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada BADGE ve BADGE.H₂O' nun 12.5- 62.5 μ g/mL, BADGE.2H₂O' nun 25.0- 100 μ g/mL arasındaki konsantrasyonları kullanılmıştır. Elde edilen verilerden S-9' suz ve S-9' lu ortamların her ikisinde de konsantrasyon artışına bağlı olarak MN frekansında artış gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada

hücrelerin CBPI değerlerinin düştüğü rapor edilmiştir. Bu sonuçlar BADGE ve hidroliz ürünlerinin kullanılan konsantrasyonlarının insan kan lenfosit kültüründe sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir [61]. Bu çalışmadan elde edilen veriler bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Bisfenol F diglisil eter (BFDGE)'nin insan kan lenfositlerinde genotoksitesinin araştırıldığı bir çalışmada hücre kültürüne kardeş kromatit değişimi (KKD) ve MN testleri uygulanmıştır. BFDGE'nin S-9 aktivasyon sistemi varlığı ve yokluğunda 12.5- 62.5 µg/mL konsantrasyonları kullanılmıştır. Konsantrasyon artışına bağlı olarak her iki ortamda da KKD ve MN oranlarında artış kaydedilmiştir. Ayrıca hücrelerin CBPI değerleri hesaplanarak bu değerlerin düştüğü rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada BFDGE'nin kullanılan konsantrasyonlarının insan kan lenfosit kültürlerinde genotoksik ve sitotoksik hasara yol açtığı bildirilmiştir [12]. Bu sonuçlar bizim tez çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir.

Yapılan başka bir çalışmada BPF (36.4 µM, 53.5 µM, 78.7 µM, 115.7 µM, 170 µM), BFDGE (10 µM, 25 µM, 50 µM, 70 µM) ve BPF'nin metabolitlerinden birisi olan 4,4-dihidroksibenzofenonun (100 µM, 200 µM, 500 µM, 1000 µM, 2000 µM) toksik potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışma *in vitro* ortamda HepG2 hücre kültürüne komet ve MN testleri uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Komet testi uygulaması sonucunda BPF 78.7 µM, 4,4-dihidroksibenzofenon 200 µM, BFDGE ise 50 µM konsantrasyonundan itibaren genotoksitesini göstermiştir. MN testi sonuçlarında BPF ve metabolitinin kullanılan konsantrasyonlarının MN frekansını arttırmadığı, BFDGE'nin ise 50 µM'lık maruziyetinden itibaren MN frekansını arttırdığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada BFDGE'nin 50 µM'lık, 4,4-dihidroksibenzofenonun ise 500 µM'lık konsantrasyonlarından itibaren canlılık indeksinde azalmaya sebep olarak sitotoksitesilerini gösterdikleri bildirilmiştir. BPF'nin canlılık indeksi hesaplandığında ise sitotoksik olmadığı sonucuna varılmıştır [110]. Bu çalışma bizim çalışmamızla aynı doğrultudadır ancak bu çalışmadan elde edilen istatistiksel olarak anlamlı verilerle bizim çalışmamızdan elde edilen anlamlı verilerin birbirinden farklı olması kullanılan hücre kültürünün farklılığından ve uygulanan kimyasalların birbirine çok benzemesine rağmen aralarında farklılıklar bulunabileceğinden ileri geldiği düşünülmektedir.

BPA' nın karsinojenitesi ve BPA' ya bağlı aktivitelerin incelendiği bir çalışmada *in vitro* Syrian hamster hücre kültürü kullanılmıştır. BPA' nın 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 200 µM konsantrasyonlarının 24 saatten 72 saate kadar olan zaman aralığında hücre büyümesindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen verilerden 50 µM konsantrasyonunda uygulanan BPA' nın düşük etki gösterip, 100 µM ve 200 µM konsantrasyonlarının hücre büyümesini anlamlı derecede azalttığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda BPA' nın 50 µM' dan 200 µM' a kadar olan bütün konsantrasyonlarının koloni oluşturma verimliliğinin kontrol seviyesinin üstünde olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada BPA' nın 50 µM' dan 200 µM' a kadar olan bütün konsantrasyonlarının DNA katımını indüklediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan BPA' nın kullanılan konsantrasyonlarının memeli hücre kültüründe karsinojenik ve genotoksik etkisinin olduğu bildirilmiştir [62]. Yapılan bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Johnson ve ark. yaptığı bir çalışmada insan lenfoblastoid hücre kültürü olan AHH-1' de BPA' nın 1.5 µg/mL, 3.1 µg/mL, 6.2 µg/mL, 7.7 µg/mL, 9.2 µg/mL, 10.8 µg/mL, 12.3 µg/mL, 18.5 µg/mL, 24.6 µg/mL ve 37.0 µg/mL konsantrasyonlarının genotoksik etkisini araştırmak için MN testi kullanılmıştır. MN oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı sonuç 12.3 µg/mL konsantrasyonundan itibaren gözlenmiştir [111]. Bu çalışma bizim çalışmamızla aynı doğrultudadır. Ancak farklı konsantrasyonlarda görülen anlamlı istatistiksel artışın kullanılan hücre kültürlerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

BPA' nın maruziyetiyle ilgili yapılan bir çalışmada Mersin ili şehir merkezi ve kırsal bölgesinde yaşayan bireylerden idrar örnekleri alınmıştır (n=200). Çalışmaya katılanların yaşları 3 ile 85 arasında değişirken, yaş ortalaması 29.95±18.80' dir. Çalışmada BPA' nın ve majör metaboliti olan BPA glukuronidin insan idrar örneklerindeki miktarını belirlemek için LC/MS-MS metodu kullanılmıştır. Çalışmaya katılan ve kırsal bölgede yaşayan bireylerde BPA %4 (tespit edilen miktar limiti; 0.03 ng/mL), BPA glukuronid %37 (tespit edilen miktar limiti; 0.1 ng/mL), şehir merkezinde yaşayan bireylerde ise BPA % 13, BPA glukuronid % 42 oranlarında dedeksiyon limitinin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Buna göre şehir merkezi ve kırsal bölge arasında BPA belirlenen birey sayıları

arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenirken, şehir merkezi ve kırsal bölgede BPA glukuronid belirlenen birey sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bu çalışmada belirlenen BPA miktarı gelişmiş ülkelerde yapılan benzer çalışma sonuçlarına ve EFSA' nın BPA için belirlediği referans değere (50 µg/kg/gün) göre düşüktür [112].



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada BPA' nın önceki yıllarda yapılan çalışmalarda belirtilen insan serumundaki değerler göz önünde bulundurularak 0.063 µg/L, 0.128 µg/L ve 0.32 µg/L' lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar hem S-9 aktivasyon sistemi varlığında hem de yokluğunda çalışılarak S-9' suz ortamda yalnızca BPA' nın, S-9' lu ortamda ise hem BPA hem de metabolitlerinin insan kan lenfosit kültüründe genotoksik, sitotoksik ve oksidatif potansiyelleri araştırılmıştır.

MN testi sonucunda kullanılan kontrantrasyonların hem S-9' lu hem de S-9' suz ortamda negatif kontrollerle karşılaştırılması sonucunda konsantrasyon artışına bağlı olarak MN frekansında artış olduğu gözlenmiştir (p<0.05). Bu durum genotoksik hasarın bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Komet testinden elde edilen verilere göre insan kan lenfosit kültürü hücrelerinin hasarlı hücre yüzdesi değerleri hesaplandığında bu değerlerin S-9' lu ve S-9' suz ortamların her ikisinde de konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir (p<0.05). Komet testinden elde edilen diğer bir değer ise genetik hasar indeksidir. Yine her iki ortamda da konsantrasyon artışına bağlı olarak genetik hasar indeksi artış göstermiştir (p<0.05). Bu sonuçlar BPA ve metabolitlerinin kullanılan konsantrasyonlarının insan kan lenfosit kültürlerinde genotoksik ve oksidatif potansiyel oluşturduğunu göstermiştir.

BPA' nın kullanılan konsantrasyonlarının insan kan lenfosit kültürlerinde sitotoksik potansiyelini değerlendirmek için hücrelerin sitokinez blok proliferasyon indeksleri hesaplanmıştır. S-9' lu ve S-9' suz ortamların her ikisinde de konsantrasyon artışına bağlı olarak bu değerlerde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçtan BPA ve metabolitlerinin kullanılan konsantrasyonlarının insan kan lenfosit kültürleri için sitotoksik olduğu gözlenmiştir.

Çalışmanın sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde genotoksisite ve sitotoksisite arasında lineer bir ilişki görülmektedir. Çünkü hem CBPI değerleri düşmüş hem de MN sayısında ve komet oluşumunda artışlarda istatistiksel bir anlamlılık düzeyine ulaşma söz konusudur. Bu sonuçlara göre BPA' nın *in vitro* şartlarda kuvvetli genotoksik ve sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu

değerlendirmekteyiz. Ancak her ne kadar bu sonuçlar elde edilmiş olsa bile başka test sistemleri ile de BPA' nın olası etkileri hücrel aktivite düzeyinde moleküler tekniklerle bölünme aktivitesinde görev alan proteinlerin de değerlendirilmesi oldukça önem arz etmektedir.

- Cam biberonlar tercih edilmeli, polikarbonat içeren biberonlar kullanılmamalıdır.
- Sıcak su, kaynar süt ve bebek mamaları plastik şişelere konulmamalıdır.
- Plastik kaplar mikrodalga fırında ısıtılmamalıdır.
- İçi plastik kaplı metal kaplarda bulunan yiyecekler tüketilmemelidir.
- Polikarbonatlı hiçbir kapkacak kullanılmamalıdır.
- Tüm plastik malzemelerde türünü gösteren işaret bulunmalıdır.
- BPA' nın belirlenen etkileri göz önünde bulundurularak çevresel maruziyeti bakteri biyodegradasyonu gibi avantajlar kullanılarak en aza indirilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] ECB, " European Chemicals Bureau, European Union Risk Assessment Report 4,4'-Isopropylidenediphenol (Bisphenol-A). " Eines No: 201-245-8 Office for Official Publications of the European Communities,(2003).
- [2] Breast Cancer Fund. " A Tale of Two Estrogens: BPA and DES. " <http://www.breastcancerfund.org/site/p.p.asp?c=kwKXLdPaE&b=3959141>. (28.11.2008).
- [3] Dodds, E.C., Lawson, W. " Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus " , Nature, 137: 996, (1996).
- [4] Cousins, I.T., Staples, C.A., Klecka, G.M., Mackay, D. " A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A " , Hum Eco Risk Assess. 8: 1107-1135, (2002).
- [5] Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea- Serrano, F., Rivas, A., Novillo Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M., Sonnenschein, C. " Estrogenicity of resin- based composites and sealants used in dentistry " , Environ Health Perspect, 104:298-305, (1996).
- [6] Novillo- Fertrell, A., Rivas, A., Pazos, P., Pedraza, V., Navajas, J.M., Olea, N. " Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis- GAMA- based composites and sealants by high performance liquid chromatography" , Environ. Health Perspect. 108: 21-27, (2000).
- [7] Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T., Harris, L.R. " A review of the environmental fate, effects and exposures of BPA " , Chemosphere. 36:2149-2173, (1998).
- [8] Sarıkaya, R., Çakır, Ş. " Genotoxicity of four food preservatives and their combinations in the Drosophila wing spot test " , Environ. Tox. Pharma. 20: 424-430, (2005).
- [9] Karaali, A., " Avrupa topluluğu ve ABD' de gıda mevzuatı ve uygulamaları " , Gıda Sanayi. 2(7): 29-32, (1994).
- [10] <http://www.ahmethasimkucukusta.com/2010/11/26/yazilar/tip-yazilari/modern-hayat/avrupa-da-biberonlarda-bisfenol-a-kullanimina-yasak/>
- [11] www.wrap.org.ukhasinformationforbusinessesonplasticsrecycling.
- [12] Sueiro, R.A., Soarez, S., Araujo, M.J. " Mutagenic and genotoxic evaluation of bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) in prokaryotic and eukaryotic systems " , Mutant Res. 536: 39-48, (2003).
- [13] Iso, T., Watanabe, T., Shimamoto, A., Furuichi, Y. " DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity " , Biol Pharm Bull. 29: 206-210, (2006).
- [14] Keri, R.A., Ho, S.M., Hunt, P.A., Kundsens, K.E., Soto, A.M., Prins, G.S. " An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A " , Reprod Toxicol. 24: 240-252, (2007).
- [15] Prokop, Z., Hankova, L., Jderabek, K., "Bisphenol A Synthesis – Modeling of Industrial Reactor and Catalyst Deactivation," , Reac. and Func. Polym. 60: 77-83, (2004).
- [16] Fürhacker, M., Scharf, S., Weber, H. " Bisphenol A: emissions from point sources " Chemosphere. 41: 751-756, (2000).

- [17] Körner, E., Bolz, U., SüBmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V., Hagenmaier, H. " Input/ output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany " , Chemosphere. 40: 1131-1142, (2000).
- [18] Yamamoto, T., Yasuhara, A., Shiraishi, H., Nakasugi, O. " Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates " , Chemosphere. 42: 415-418, (2001).
- [19] Staples, C.A., Williams, J.B., Blessing, R.L., Varineau, P.T. " Measuring the biodegradability of nonylphenol ether carboxylates, octylphenol ether carboxylates and nonylphenol " , Chemosphere. 38: 2029-2039, (1999).
- [20] Bolz, U., Heganmair, H., Körner, W. " Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments and sewage sludge from Baden- Württemberg, south- west Germany " , Environ. Pollut. 115:291-301, (2001).
- [21] Hemken, O.P., Reincke, H., Stachel, R., Theobald, N. " The occurrence of xenoestrogens in the Elbe River and the North Sea " , Chemosphere. 45: 245-259, (2001).
- [22] Kawagashi, Y., Fujita, Y., Kishi, I., Fukunaga, I. " Estrogenic chemicals and estrogenic activity in leachate from municipal waste landfill determined by yeast two- hybrid assay " , J. Environ Monit. 5:269-274, (2003).
- [23] Matsumoto H, Adachi S, Suzuki Y. "Bisphenol A in ambient air particulates responsible for the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells and its concentration changes over 6 months. " Arch Environ Contam Toxicol. 48:459-466, (2005).
- [24] Kawahata, H., Ohta, H., Inoue, M., Suzuki, A., " Endocrine disrupter nonylphenol and bisphenol A contamination in Okinawa and Ishigaki islands. Japan-within coral reefs and adjacent river mouths. " , Chemosphere. 55, 1519-1527, (2004).
- [25] Kang, J.H., Kondo, F., Katayama, Y. " Human exposure to bisphenol A" , Toxicology. 226:79-86, (2006).
- [26] Wong, K.O., Leo, L.W., Seah, H.L. " Dietary exposure assessment of infants to bisphenol A from the use of polycarbonate baby milk bottles " , Food Addit Contam. 22: 280-288, (2005).
- [27] Sun Y, Wada M, Al-Dirbashi O, Kuroda N, Nakazawa H, Nakashima K. "High-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection of bisphenol A migrated from polycarbonate baby bottles using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride as a label" , J Chromatogr B. 749:49-56, (2000).
- [28] Brede C, Fjeldal P, Skjevrak I, Herikstad H. " Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling, and brushing. " , Food Addit Contam. 20:684-689, (2003).
- [29] Nerin C, Fernandez C, Domeno C, Salafranca J. " Determination of potential migrants in polycarbonate containers used for microwave ovens by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. " , J Agric Food Chem. 51:5647-5653, (2003).
- [30] Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Olea N. " Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans " , Environ Health Perspect. 103:608-612, (1994).
- [31] Kang J-H, Kito K, Kondo F. " Factors influencing the migration of bisphenol A from cans. " , J Food Prot. 66:1444-1447, (2003).

- [32] Sasaki, N., Okuda, H., Abe, K. et al. " Salivary bisphenol A levels detected by ELISA after restoration with composite resin " , J. Mater Sci. Mater Med. 16:297-300, (2005).
- [33] Joskow, R., Barr, D.B., Barr, J.R., Cabfat, A.M., Needham, L.L., Rubin, C. " Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants " , J Am Dent Assoc. 137: 353-362, (2006).
- [34] Zarfa, A., Del Olmo, M., Pulgar, R., Navalon, A., Vilchez, J.L. " Determination of the bisphenol A and related compounds in human saliva by gas chromatography- mass spectrometry " , Chromatographia. 56: 213-218, (2002).
- [35] Sajiki, J., Takahashi, K., Yanekubo, J. " Sensitive method for the determination of bisphenol A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography " , J. Chromatogr B. 736: 1255- 1266, (1999).
- [36] Inoue, K., Yamaguchi, A., Wada, M., Yoshimura, Y., Makino, T., Nakazawa, H. " Quantitative detection of BPA and BPA diglycidyl ether metabolites in human plasma by liquid chromatography- electrospray mass spectrometry " , J Chromatogr B. 765: 121-126, (2001).
- [37] Schonfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C.E., Paul, M., Chahoud, I. " Parent BPA accumulation in the human maternal- fetal- placental unit " , Environ Health Perspect. 110: A703- 707, (2002).
- [38] Kuroda, N., Kinoshita, Y., Sun, Y., Wada, M., Kishikawa, N., Nakashima, K., et al. " Measurement of BPA levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent " , J Pharm Biomed Anal, 30:1743-9, (2003).
- [39] Snyder, R.W., Maness, S.C., Gaido, K.W., Welsch, F., Sumner, S.C.J., Fenneli, T.R., " Metabolism and Disposition of Bisphenol A in Female Rats. " Toxicol. Appl. Pharmacol., 168: 225-234 (2000).
- [40] Sun, Y., Irie, M., Kishikawa, N., Wada, M., Kuroda, N., Nakashima, K. "Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column- switching and fluorescence detection " , Biomed Chromatogr. 18: 501-507, (2004).
- [41] Otaka, H., Yasuhara, A., Morita, M. " Determination of bisphenol A and 4-nonylphenol in human milk using alkaline digestion and clean up by solid phase extraction " , Anal. Sci. 19: 1663- 1666, (2003).
- [42] Kuruto- Niwa, R., Tateoka, Y., Usuki, Y., Nozawa, R. " Measurement of BPA concentrations in human colostrum " , Chemosphere. 66: 1160- 1164, (2007).
- [43] Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.Y. " Human exposure to bisphenol " , Reprod. Toxicol. 24 (2): 139-177, (2007).
- [44] Kim, Y.H., Kim, C.S., Park, S., Han, S.Y., Pyo, M.Y., Yang, M. " Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine " , Biochem Biophys Res Commun. 312: 441-448, (2003).
- [45] Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y. " Determination of bisphenol A concentration in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure " , Hum Reprod. 17: 2839- 2841, (2002).

- [46] Tan, B.L.L., Ali Mohd, M. " Analysis of selected pesticides and alkyphenols in human cord blood by gas chromatograph- mass spectrometer " , *Talanta*. 61: 385-391, (2003).
- [47] Nagel, S.C., Vom Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., Boechler, M., Welshons, W.V. " Relative binding affinity-serum modified Access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol " , *Environ. Health Perspect.* 105: 70-76, (1997).
- [48] Gupta, C. " Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals " , *Prop. Soc. Exp. Biol. Med.* 224: 61- 68, (2000).
- [49] Welshons, W.V., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curan, E.M., Vom Saal, F.S. " Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine- disrupting chemicals with estrogenic activity " , *Environ. Health Perspect.* 111: 994-1006, (2003).
- [50] National Toxicology Programme (NTP) " U.S. Department of health and human services, National institute of environmental health sciences, National institutes of health, National toxicology program's report of the endocrine disruptors low dose peer review available on the NTP " , <http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/liason/LowdoseWebPage.html>, (2001).
- [51] Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D. " Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving " , *Endocrin.* 132: 2279- 2286, (1993).
- [52] Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dang, J. " Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells " , *Endocrinology.* 146(2): 624-632, (2005).
- [53] Sohoni, P., Sumpter, J.P. " Several environmental estrogens are also anti-androgens " , *J. Endocrinol.* 158: 327- 339, (1998).
- [54] Wetherill, Y.B., Hess- Wilson, J.K., Comstock, C.E.S., Shah, S.A., Buncher, C.R., Sallans, L., et al. " Bisphenol A facilitates bypass of androgen ablation therapy in prostate cancer " , *Mol Cancer Therap.* 5(12): 3181-3190, (2006).
- [55] Xu, L.C., Sun, H., Chen, J.F., Bian, Q., Qian, J., Song, L., Wang, X.R. " Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro " , *Toxicology.* 216: 197-203, (2005).
- [56] Sun, H., Xu, L.C., Chen, J.F., Song, L., Wang, X.R. " Effects of bisphenol A, tetrachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene " , *Food and Chemical Toxicology.* 44: 1916-1921, (2006).
- [57] Kim, H.S., Han, S.Y., Kim, T.S., et al. " No androgenic/ anti- androgenic effects of bisphenol A in Hersberger assay using immature castrated rats " , *Toxicology Letters.* 135: 111-123, (2002).
- [58] Tiwari, D., Kamble, J., Chilgunde, C., Patil, Prakash, P. and et al. " Cytogenic and mutagenic effects of bisphenol A : An endocrine disruptor " *Mutation Res.* 743: 83-90, (2012).
- [59] Barsiene, J., Syvakiene, J., Bjornstad, A. " Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels exposed to bisphenol A, diallyl

- phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47 " , Aquatic Toxicology. 785: S105- S108, (2006).
- [60] Sueiro, R.A., Suarez, S., Araujo, M., Garrido, M.J. " Study on mutagenic effects of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its derivatives in the Escherichia coli tryptophan reverse mutation assay " , Mutation Research. 609: 11-16, (2006).
- [61] Suarez, S., Sueiro, R.A., Garrido, J. " Genotoxicity of the coating lacquer on food cans, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), its hydrolysis products and chlorohydrin of BADGE " , Mutation Research. 470: 221-228: (2000).
- [62] Tsutsui, T., Tamuro, Y., Hasegawa, K., Takahashi, M., Maizumi, N., et al. " Bisphenol A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells " , Int. J. Cancer. 75: 290-294, (1998).
- [63] Naik, P., Vijayalaxmi, K.K. " Cytogenetic evaluation for genotoxicity of bisphenol-A in bone marrow cells of Swiss albino mice " , Mutation Research. 676: 106-112, (2009).
- [64] NTP, carcinogenesis bioassay of bisphenol A (CAS no: 80-05-7) in F 344 rats and B6C3F mice (feedstudy) National Toxicology Program Technical Report , 215: 1-116, (1982).
- [65] Murray, T.J., Maffani, M.V., Ucci, A.A., Sonnenschein, C., Soto, A.M. " Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure " , Reprod. Toxicol. 23: 383-390, (2007).
- [66] Ho, S.M., Tang, W.Y., Belmonte, J., Prins, G.S. " Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostatic carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4 " , 66: 5624-5632, (2006).
- [67] Izotti, A., Kanitz, S., Agostini, F.D., 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 " , Mutant. Res. 679: 28-32, (2009).
- [68] Fent, G., Hein, W.J., Moendel, M.J., Kubiak, R. " Fate of ¹⁴C - bisphenol A in soils " , Chemosphere. 51: 735-746, (2003).
- [69] Kang, J.H., Kondo, F. " Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water " , Arch. of Environ. Contam. and Toxicol. 43: 265-269, (2002).
- [70] Spivack, J., Leib, T.K., Lobos, J.H. " Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A, rearrangements and stilbene cleavage in bisphenol A metabolism " , J. Biol. Chem. 269:7233-7329, (1994).
- [71] Chai, W., Handa, Y., Suzuki, M., Saito, M., Kato, N., Horiuchi, C.A., " Biodegradation of bisphenol A by fungi " , Appl. Biochem. Biotechnol. 120: 175-182, (2005).
- [72] Hirano, T., Honda, Y., Watanabe, T., Kuwahara, M., " Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete " , Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 1958-1962 (2000).
- [73] Uchida, H., Fukuda, T., Miyamoto, H., Kawabata, T., Suzuki, M., Uwajima, T. " Polymerization of bisphenol A by purified laccase from Trametes villosa. " , Biochem. Biophys. Res. Commun. 287, 355-358 , (2001).

- [74] Nakajima, N., Ohshima, Y., Edmonds, J.S., Morita, M., " Glycosylation of bisphenol A by tobacco BY-2 cells. " , *Phytochemistry* 65, 1383–1387 (2004).
- [75] Lindholst, C., Wynne, P.M., Marriott, P., Pedersen, S.N., Bjerregaard, P., " Metabolism of bisphenol A in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to estrogenic response. " , *Comp. Biochem. Physiol. C* 135, 169–177 (2003).
- [76] Yokota, H., Miyashita, N., Yuasa, A., " High glucuronidation activity of environmental estrogens in the carp (*Cyprinus carpio*) intestine. " , *Life Sci.* 71, 887–898 (2002).
- [77] Snyder, R.W., Maness, S.C., Gaido, K.W., Welsch, F., Sumner, S.C.J., Fennel, T.R. " Metabolism and disposition of BPA in female rats " , *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168:225-234, (2000).
- [78] Volkel, W., Colnot, T., Csanady, G.A., Filser, J.G., Dekant, W. " Metabolism and kinetics bisphenol A in human in low doses following oral administration " *Chem. Res. Toxicol.* 15: 1281- 1287, (2002).
- [79] Inoue, H., Tsuruta, A., Kudo, S., Ishii, T., Fukushima, Y., Iwano, H., Yokota, H., Kato, S. " BPA glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats " , *Drug. Metab. Dispos.* 33:55-59, (2004).
- [80] Capiello, M., Giuliani, L., Rane, A., Pacifici, G.M. " Uridine 5' diphosphoglucuronic acid (UDPGLcUA) in the human fetal liver, kidney and placenta " , *Eur. J. Drug Pharmacokin.* 25:161-163, (2000).
- [81] Nishiyama, T., Ogura, K., Nakano, H., Kaku, T., Takahashi, E., Ohkubo, Y., Sekine, K., Hiratsuka, A. " Sulfation of environmental estrogens by cytosolic human sulfotransferase " , *Drug. Metabol. Pharmacokin.*, 17:221-228, (2002).
- [82] EFSA, " Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission on the toxicokinetics of bisphenol A " , *The EFSA Journal.* 759: 1- 10, (2008).
- [83] Negishi, T., Tominaga, T., Ishii, Y., Kyuwa, S., Hayasaka, I., Kuroda, Y., Yoshikawa, Y., " Comparative study on toxicokinetics of bisphenol A in F344 rats, monkeys (*Macaca fascicularis*), and chimpanzees (*Pan troglodytes*) " , *Exp. Anim.* 53, 391–394 (2004).
- [84] Atkinson, A., Roy, D. " In vitro conversion of environmental estrogenic chemical BPA to DNA binding metabolite(s) " , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210:424-433, (1995a).
- [85] Atkinson, A., Roy, D. " In vivo DNA adduct formation by BPA " , *Environ. Mol. Mutagen.* 26:60-66, (1995b).
- [86] Jaeg, J.P., Perdu, E., Dolo, L., Debrauwer, L., Gravedi, J.P., Zalko, D., " Characterization of new bisphenol a metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions. " , *J. Agric. Food Chem.* 52, 4935–4942 (2004).
- [87] Fenech, M. " The lymphocyte cytokinesis- block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry " , *Health Phys.* 98(2): 234-243, (2010).

- [88] Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T. " Reaktif oksijen partikülleri ve anti oksidan savunma " , Türk Nefroloji Diyaliz ve Tranplantasyon Dergisi / Office Journal of the Turkish Nephrology, Association. 3-4: 92-95, (1997).
- [89] Dusinska, M., Collins, A.R. " The comet assay in human biomonitoring: gene- environment interactions " , Mutagenesis. 23(3): 191-205, (2008).
- [90] Stoper, H., Müller, O.S. " Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview " , Toxicol in vitro. 11: 661-667, (1997).
- [91] Demirel, S., Zamani, A. " Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları " , Genel Tıp Dergisi. 12 (3): 123-127, (2002).
- [92] Şekeroğlu, V., Atlı- Şekeroğlu, Z. " Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi " , Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 68 (4): 241-252, (2011).
- [93] Choy, W.N. " Genetic toxicology and cancer risk assessment " , New York: Marcel Dekker. 163-186, (2001).
- [94] Fenech, M. " The in vitro micronucleus technique " , Mutat. Res. 455: 81-95, (2000).
- [95] Üstüner, D. " Kromozom kırıklıkları ve mikronükleus- apoptoz bağlantısı " , Türk Bilim Araştırma Vakfı Bilim Dergisi. 1(4): 64-69, (2011).
- [96] Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. " Canlılarda tek hücre jel elektroforez yöntemi ile DNA hasar analizi: comet analiz yöntemi " , Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi. 2 -14, (2010).
- [97] Ostling, O., Johanson, K.J. " Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells " , Biochem. Biophys. Res. 123 (1): 291-298, (1984).
- [98] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. " A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells " , Exp. Cell. Res. 175 (1): 184-191, (1988).
- [99] Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnstrom, G. " The comet assay: mechanisms and technical considerations " , Mutation Res. 363: 89-96, (1996).
- [100] Kassie, F., Parzefall, W., Knausmuller, S. " Single cell gel electrophoresis assay : a new technique for human monitoring studies " , Mutat. Res. 463: 13- 31, (2000).
- [101] Eke, D. " Thimerosal' in İnsan Lenfosit Hücre Kültürlerinde Genotoksik, Mutajenik ve Toksik Etkilerinin Belirlenmesi " , Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 45 s., (2007).
- [102] Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D. " Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection " , Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 70: 2081- 2285, (1973).
- [103] Maron, D.M., Ames, B.N. " Revised methods for the Salmonella mutagenicity test " , Mutat. Res. 113: 173- 215, (1983).
- [104] Perry, P., Wolf, S. " New giemsa method for differential staining of sister chromatids" , Nature. 261: 156-158, (1974).
- [105] Gajovik, A., Radzikowska, J., Dobrzynska, M.M. " Genotoxic effects of bisphenol A on somatic cells of female mice, alone and combination with X-rays " , Mutation Research. 757: 120- 124, (2013).

- [106] Gajovik, A., Radzikowska, J. " Genotoxicity and reproductiv toxicity of bisphenol A and X-ray/ bisphenol A combination in male mice " , Drug Chem. Toxicol. 36: 19- 26, (2013).
- [107] Ulutas, O.K., Yildiz, N., Durmaz, E., Ahbab, M.A., Barlas, N., Cok, I. " An assessment of the genotoxic potential of bisphenol A and 4-tert-octyphenol in rats " , Arch. Toxicol. 85: 995-1001, (2011).
- [108] Eid, J.I., Eissa, S.M., El-Ghor, A.A. " Bisphenol A induces oxidative stress and DNA damage in hepatic tissue of female rat offspring " , The Journal of Basic & Applied Zoology. 71: 10- 19, (2015).
- [109] Xin, F., Jiang, L., Liu, X., Geng, C., et al. " Bisphenol A induces oxidative stress- associated DNA damage in INS-1 cells " , Mutation Research. 769: 29-33, (2014).
- [110] Cabaton, N., Dumont, C., Severin, I., et al. " Genotoxic and endocrine activities of bis (hydroxyphenol) methane (bisphenol F) and its derivates in the HepG2 cell line " , Toxicology. 255: 15-24, (2009).
- [111] Johnson, G.E., Parry, E.M. " Mechanistic investigations of low dose exposures to the genotoxic compounds bisphenol A and rotenone " , Mutation Research. 651: 56-63, (2008).
- [112] Battal, D., Cok, I., Unlusayin, I., Aktas, A., Tunctan, B. " Determination of urinary levels of bisphenol A in a Turkish population " , Environ Monit Assess. 186: 8443-8452, (2014).

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Seda Yaprak EKİNCİ

Doğum Tarihi: 06/07/1987

Öğrenim Durumu: Lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Matematik-Fen	19 Mayıs Lisesi	2001-2005
Lisans	Biyoloji	Mustafa Kemal Üniversitesi	2006-2010
Yüksek Lisans	Genetik Toksikoloji	Mersin Üniversitesi	2010-2015

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. Çelik A., Ekinci S.Y., Güler G., Yıldırım S. “*In Vitro* Genotoxicity Of Fipronil Sister Chromatid Exchange, Cytokinesis Block Micronucleus Test And Comet Assay” DNA And Cell Biology, 33(3):148-154 (2014).
2. Çelik A., Eke D., Ekinci S.Y., Yıldırım S., Güler G. “The Protective Role Of Curcumin On Perfluorooctan Sulfonate Induced Genotoxicity Single Cell Gel Electrophoresis And Micronucleus Test” , Food and Chemical Toxicology. 53: 49-55, (2013).
3. Çelik, A., Yıldırım, S., Ekinci, S.Y., Taşdelen, B. “ Bio-Monitoring For The Genotoxic Assessment In Road Construction Workers As Determined By The Buccal Micronucleus Cytome Assay ” , Ecotoxicology and Environmental Safety. 92: 265- 270, (2013).
4. Çelik A., Ekinci S.Y., Yıldırım S., Güler G. “*In Vitro* Genotoxicity Of Fipronil Sister Chromatid Exchange, Cytokinesis Block Micronucleus Test And Comet Assay” 8th Congress of the Turkish Society of Toxicology, Kemer/Antalya, 2012.
5. Çelik A., Eke D., Ekinci S.Y., Yıldırım S., Güler G. “The Protective Role Of Curcumin On Perfluorooctan Sulfonate Induced Genotoxicity Single Cell Gel Electrophoresis And Micronucleus Test” 8th Congress of the Turkish Society of Toxicology, Kemer/Antalya, 2012.