

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BİSFENOL A'NIN TOKSİSİTESİNDE EPİGENETİK
MEKANİZMALARIN ROLÜ**

PINAR TUZCUOĞLU

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SİBEL ÖZDEN**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı YÜKSEK LİSANS Programında Pınar TUZCUOĞLU tarafından hazırlanan Bisfenol A'nın Toksisitesinde Epigenetik Mekanizmaların Rolü başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

04 / 01 / 2016

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

1.Prof.Dr. BUKET ALPERTUNGA

İ. Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

2.Prof.Dr. GÜLDEN Z. OMURTAG

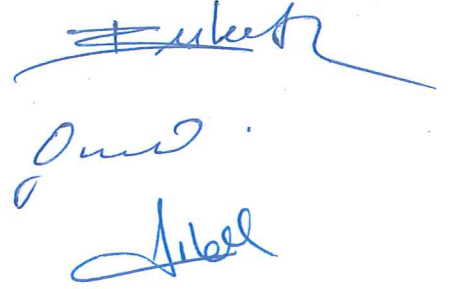
M. Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

3.Doç.Dr. SİBEL ÖZDEN

İ.Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

4.

5.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Pınar Tuzcuoğlu

İTHAF

Sevgili Annem'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Ders dönemim ve tez çalışmam sırasında her zaman yanımda olan, tecrübesini ve yardımlarını benden esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren çok değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Sibel Özden'e sabrı ve desteği için,

Desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Buket Alpertunga'ya ve Prof. Dr. Gül Özhan'a,

Tez çalışmam boyunca her konuda yardımlarını esirgemeyen Mine Şenyıldız'a, ve bana yol gösteren Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma ve Anabilim Dalı personeline,

Her zaman yanımda olan hayatım boyunca desteğini esirgemeyen sevgili annem Aynur Aydemir'e,

Varlıkları ile beni değerli kılan babam Uğur Tuzcuoğlu ve ablam Deniz Tuzcuoğlu'na,

İş hayatımdan yüksek lisans tezimi tamamlayabilmem için beni destekleyen Dr. Soufia Hanna, Ebru Ünver Kulak ve Merve Esendağlı'ya teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 40333.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Epigenetik	3
2.2. DNA Metilasyonu.....	4
2.2.1. DNA Metilasyonu ve Gen İfadesinin Düzenlenmesi.....	6
2.2.2. DNA Metilasyonu ve Kanser.....	8
2.2.3. DNA Metilasyonu ve Çevresel Faktörler.....	11
2.3. Bisfenol A	12
2.3.1. BPA'nın Kimyasal Yapısı.....	12
2.3.2. BPA'nın Fizikokimyasal Özellikleri.....	13
2.3.3. BPA'nın Kullanım Alanları	14
2.3.4. BPA'ya Maruziyet	15
2.3.5. BPA'nın Toksikokinetiği	16
2.3.6. BPA'nın Toksik Etkileri	16
2.3.7. BPA'nın Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkisi	20
2.3.8. BPA ile İlgili Yasal Düzenlemeler.....	22
2.4. Hücre Kültürü	24
2.4.1. Hücre Kültürlerinin Avantajları	26
2.4.2. Hücre Kültürlerinin Dezavantajları.....	26
2.5. Sitotoksikite Testleri.....	27

2.5.1. Laktat Dehidrojenaz Tayini (LDH Testi).....	28
2.5.2. MTT Testi	28
2.5.3. XTT Testi.....	29
2.5.4. Nötral kırmızı alım (NRU) testi	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	31
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	32
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	34
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	35
3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği	35
3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini	36
3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	36
3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması	36
3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)	37
3.4.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	38
3.4.7. Hücrelerin Sayılması.....	38
3.5. Sitotoksik Testleri.....	39
3.5.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması	39
3.5.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması.....	40
3.5.3. Hücre Kültürünün BPA'ya Maruz Bırakılması	41
3.5.4. MTT Testi	43
3.5.4.1. MTT Testinin Esası.....	43
3.5.4.2. MTT Testi Protokolü.....	43
3.5.5. Nötral kırmızı alım (NRU) testi	44
3.5.5.1. NRU Testinin Esası.....	44
3.5.5.2. NRU Testi için Çözeltilerin Hazırlanışı.....	44
3.5.5.3. NRU Testi Protokolü.....	44
3.5.6. Sonuçların Değerlendirilmesi	45
3.6. BPA'nın Hücre Dizilerine Maruziyeti	46
3.7. DNA Metilasyonu Analizi	47
3.7.1. DNA İzolasyonu	47
3.7.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	48
3.7.3. Global DNA Metilasyonunun Tayini.....	49

3.7.4. Gene-özü DNA Metilasyonunun Araştırılması.....	51
3.7.4.1. Bisüfit DNA Modifikasyonu.....	51
3.7.4.2. <i>İn Vitro</i> DNA Metilasyonu.....	54
<i>İn vitro</i> Metillenmiş DNA'nın Saflaştırılması	54
3.7.4.3. Primer Çiftleri	55
3.7.4.4. Metilasyona-özü PCR (MSP).....	55
3.7.4.5. PCR Uygulaması.....	57
3.7.4.6. Agaroz Jel Elektroforezi	57
3.8. Gen Ekspresyonların Tayini	58
3.8.1. Total RNA İzasyonu	58
3.8.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	59
3.8.3. cDNA Sentezi	60
3.8.4. Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile Tayini.....	61
3.9. İstatistiksel Değerlendirme	62
4. BULGULAR.....	63
4.1. BPA'nın NRK-52E Hücrelerinde Sitotoksikite Üzerine Etkileri.....	63
4.2. NRK-52E Hücrelerinden İzole Edilen DNA'ların Miktarları ve Saflıkları.....	63
4.3. Global DNA Metilasyonu Sonuçları.....	65
4.4. Gene-özü Metilasyon PCR (MSP) Tayini Sonuçları.....	66
4.5. NRK-52E Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Miktarları.....	67
4.6. Gen ekspresyonu	69
5. TARTIŞMA	71
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	85

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: BPA'nın genel özellikleri (Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu, 2014).	14
Tablo 2-5: EFSA AFC Panelinde bildirilen BPA'nın günlük tüketim maruziyetleri (EFSA, 2015).	23
Tablo 3-1: MSP için kullanılacak primer çiftleri	55
Tablo 3-2: 'Roche LightCycler 480 Probes' RT-PCR protokolü	62
Tablo 4-1: 1, 10, 100 nM ve 1, 10 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında NRK-52E hücrelerinden izole edilen DNA'ların miktar ve saflıkları	64
Tablo 4-2: 1, 10, 100 nM ve 1, 10 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında NRK-52E hücrelerinden izole edilen RNA'ların A ₂₆₀ /A ₂₈₀ oranındaki miktarları ve saflıkları.	68

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Başlıca epigenetik mekanizmalar (Zaidi ve ark., 2010).....	4
Şekil 2-2: Memeli genomunda sitozinin (DNA) metilasyonu (Herman ve Baylin, 2003).	5
Şekil 2-3: Tümör oluşumunda DNA metilasyonu değişimleri (Esteller, 2007).	7
Şekil 2-4: Normal ve kanserli hücrelerde DNA metilasyon modelleri (Varela-Rey ve ark., 2011).	7
Şekil 2-5: Normal ve kanserli hücrelerin DNA metilasyonu ile ilişkisi (Esteller ve Herman, 2002).	9
Şekil 2-6: DNA hipometilasyonunun potansiyel nedenleri ve sonuçları (Wilson ve ark., 2007).	10
Şekil 2-7: BPA, DES ve 17 β -östradiol'ün kimyasal yapısı.	13
Şekil 3-1: Hücre kültürü ortamlarının flasklardaki görünüşü.....	37
Şekil 3-2: Luna Otomatik Hücre Sayımı cihazı slaytı.	38
Şekil 3-3: a) Hemasitometre lamı. b) Hemasitometre lamında hücrelerin mikroskop altındaki görüntüleri.....	39
Şekil 3-4: 96 kuyucuklu mikropalakaya hücre ekimi.	40
Şekil 3-5: BPA'nın 1/2 oranında seyreltilmesi.	41
Şekil 3-6: 96 kuyucuklu maruziyet mikropalaka düzeni.	42
Şekil 3-7: 5-mC DNA Eliza kitinin temeli.	50
Şekil 3-8: Sitozinin bilsülfite ile deaminasyonu reaksiyonu.	52
Şekil 3-9: Kit ile bisülfite DNA modifikasyonunun şematik gösterimi.	53
Şekil 3-10: Bisülfite modifikasyonu ve PCR amplifikasyonunun metillenmiş ve metillenmemiş dizide şematik olarak gösterilmesi (Zilberman and Henikoff, 2007). ...	56
Şekil 4-1: NRK-52E hücrelerine 0-1000 μ M konsantrasyonlarında BPA maruziyeti sonucu MTT ve NRU testi sonuçları.	63
Şekil 4-2: 5-mC Standardına ait kalibrasyon eğrisi.	65
Şekil 4-3: 100 nM konsantrasyon aralığında 24 saat - 6 gün BPA ile maruz bırakılan NRK-52E hücrelerinde % 5-mC seviyeleri.	65
Şekil 4-4: <i>Rassf-1</i> genine ait kontrol ve BPA uygulanmış NRK-52E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.	66

Şekil 4-5: <i>c-myc</i> Genine ait control ve BPA uygulanmış NRK-52E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.	67
Şekil 4-6: <i>Rassf-1</i> ve <i>c-myc</i> genlerine ait 24 saatlik BPA maruziyetine uğramış NRK-52E hücrelerinin gen ekspersyonu sonuçları.	69
Şekil 4-7: <i>Rassf-1</i> ve <i>c-myc</i> genlerine ait 24, 48, 72, 96 saat ve 6 günlük BPA maruziyetine uğramış NRK-52E hücrelerinin gen ekspersyonu sonuçları.....	70



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
5-hmC	5-hidroksimetilsitozin
5-mC	5-metilsitozin
A	Adenin bazı
A.B.D.	Amerika Birleşik Devletleri
Actb	β-aktin geni
AR	Androjen reseptör
ATCC	Amerikan hücre kültür bankası (American type culture collection)
ATP	Adenozin trifosfat
BPA	Bisfenol A
BSA	Sığır serum albümini
C	Sitozin bazı
cDNA	Komplementer DNA
CMF-PBS	Kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi
c-myc	Genlerin transkripsiyonunu düzenleyen protoonkogen proteini
CO ₂	Karbondioksit
COMT	Katekol-O-metiltransferaz
CpG	Sitozin fosfat guanin
D3	Dopamin reseptör
DES	Dietilstilbestrol
DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri
DMEM/F12	Dulbecco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri /F12
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metiltransferaz
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EMEM	Eagle'ın minimum esansiyel besiyeri
ER	Östrojen reseptör

ERK	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar
EZH2	Histon lizin N-metiltransferaz enzimi ('Enhancer of zeste homolog 2')
FBS	Fetal sığır serumu
G	Guanin bazı
GC	Guanin sitozin
GPR30	G-protein ilişkili reseptör
G-protein	Guanin nükleotidi bağlayıcı proteinler
HAT	Histon asetil transferaz
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HDAC	Histon deasetilaz
HDM	Histon demetilaz
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit (tampon)
HRP	Horseradish peroksidaz enzimi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü
IC ₅₀	%50 İnhibisyon konsantrasyonu
IgG	İmmünglobulin G
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
kg	Kilogram
LAMP3	Lizozomlarla ilişkili membrane protein
LD ₅₀	Medyan letal doz
LDH	Laktat dehidrojenaz
LDS	Lityum dodesil sülfat
M	Molar
MBD	Metil bağlayıcı protein
MeCP2	Metile CpG bağlanma protein
MES	2-(N-morfolin) ethansülfonik asit
mg	Miligram
MGMT	O ⁶ -metilguanin-DNA metiltransferaz
miRNA	Mikro RNA
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA

MSP	Metilasyona özgü PCR
MSRE	Metilasyon duyarlı restriksiyon enzimleri
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NADH	Nikotinamid adenine dinükleotid
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
NMDA	N-metil-D-aspartik asit
NOAEL	Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen değer ('No observed adverse effect level')
NRK-52E	Sıçan böbrek epitel hücresi
NRU	Nötral kırmızı alım testi
O ₂	Oksijen
OD	Optik dansite
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PVC	Polivinil klorür
Rassf1	Ras ilişkili domain içeren protein 1
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki dönüş
RT-PCR	Gerçek zamanlı termal döngü cihazı ('Real-Time PCR')
SAM	S-adenozil metiyonin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
T3	Triiodotironin hormonu
T4	Tiroksin hormone
TBST	Tuzlu ve Tween 20'li tris tamponu
TDI	Tolare edilebilir günlük alım miktarı ('Tolerable daily intake')
TET	Translokasyon metilsitozin dioksijenaz
TR	Tiroid reseptör
t-TDI	Geçici tolare edilebilir günlük alım miktarı ('Temporary tolerable daily intake')
UV	Ultraviyole (Mor ötesi)
XTT	2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid

ÖZET

Tuzcuoğlu, P. (2016). Bisfenol A'nın Toksisitesinde Epigenetik Mekanizmaların Rolü. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Sentetik monomer olarak endüstride polikarbonat plastik ve epoksi reçinesinin üretiminde kullanılan bisfenol A (BPA), endokrin bozucu özelliğinden dolayı özellikle insan sağlığında yüksek risk oluşturmaktadır. Normal koşullarda BPA'nın plastik taşıyıcılardan gıda, içecek ve çevreye salınımı söz konusu olmakta ve bu durum da insanların bu kimyasala maruziyetine yol açmaktadır. Son zamanlarda endokrin etkiler gösteren çevresel kimyasalların gen ifadesindeki değişiklikler üzerindeki rolünün epigenetik mekanizmalar ile ilişkili olabileceği alternatif bir yol olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonunun endokrin bozucu kimyasalların toksisitelerinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasının amacı; sıçan böbrek hücrelerinde (NRK-52E) BPA'nın doza bağlı olarak gelişen toksisitesinde global DNA hipometilasyonu ve bazı genlerin CpG adası promotor hipermetilasyonu ve ekspresyonlarının rolünün araştırılmasıdır. BPA'nın NRK-52E hücreleri üzerine sitotoksik etkisi MTT ve NRU testleriyle araştırılmış olup, 24 saatlik maruziyette IC₅₀ değeri sırasıyla 105 µM ve 88 µM olarak bulunmuştur. DNA metilasyonu analizinde NRK-52E hücreleri doza bağlı toksisiteyi incelemek için 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM ve 10 µM konsantrasyonlarda 24 saat ve süreye bağımlı toksisiteyi incelemek için ise 100 nM konsantrasyonda 24, 48, 72, 96 saat ve 6 gün süre ile BPA'ya maruz bırakıldı. Global 5-metilsitozin (5-mC) düzeyi Eliza kitler kullanılarak ölçüldü ve 100 nM konsantrasyonunda 24, 48, 72 ve 96 saat BPA ile maruziyetlerinde azalma gözlemlendi. BPA ile maruz bırakılmış NRK-52E hücrelerinde bisülfid dönüşümünü takiben metilasyona özgü polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda *Rassf-1* ve *c-myc* genlerinin promotör bölgelerinde metilasyonda ve ekspresyonlarında değişiklikler gözlemlendi. Sonuç olarak, BPA toksisitesinde bir epigenetik mekanizma olarak global ve gene-özü DNA metilasyonunun rolü olabileceği ortaya çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bisfenol A, DNA metilasyonu, Epigenetik mekanizmalar, NRK-52E hücreleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 40333.

ABSTRACT

Tuzcuoğlu, P. (2016). The Role of Epigenetic Mechanism in Bisphenol A Toxicity. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Master Thesis. Istanbul.

Bisphenol A (BPA), as synthetic monomer used in industry in the production of polycarbonate plastic and epoxy resins, has endocrine disruptor properties and high risk on human health. Under normal circumstances, the release of BPA from plastic carrier being concerned and especially new born babies in intensive care units are exposed to high amounts of BPA. It is shown to have estrogenic properties for BPA that transferred to the baby through breast milk, and also during pregnancy the fetus has high risk by trans-placental route. However, more recently, epigenetic-induced alteration in gene expression has emerged as an alternative way in which environmental compounds may exert endocrine effects. Therefore, epigenetic events such as DNA methylation may play an important role in the toxicity of endocrine disrupting chemicals. The aim of this study is to investigate the effects of BPA in global DNA methylation, CpG promoter DNA methylation and gene expressions in rat kidney epithelial cells (NRK-52E). IC₅₀ value of BPA was determined as 105 mM and 88 mM in NRK-52E cells by MTT and NRU test, respectively. For DNA methylation analysis, NRK-52E cells were treated with BPA to investigate dose-dependent toxicity at 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM and 10 µM concentrations for 24 hours, and to investigate time-dependent toxicity at 100 nM concentration for 24, 48, 72, 96 hours and 6 days. It was observed that decrease in global DNA methylation at the concentration of 100 nM BPA after 24, 48, 72 and 96 hours by using 5-methylcytosine Elisa kit. It has been observed alterations on CpG island promoter methylation by methylation specific polymerase chain reaction following bisulfite conversion and expression profile of *Rassf-1* and *c-myc* genes after BPA exposure in NRK-52E cells. In conclusion, it has been suggested that global and gene-specific DNA methylation have a role on BPA's toxicity as epigenetic mechanism.

Key Words: Bisphenol A, DNA methylation, Epigenetic mechanisms, NRK-52E cells

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 40333.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bisfenol A (BPA; [2,2-bis (4-hidroksifenil) propan]), iki fenol ve polikarbonat moleküllerinin birleşmesiyle elde edilen bir tür organik bileşiktir. Polikarbonat plastik ve epoksi reçinesi üretiminde hammadde olarak kullanılan bisfenol A (BPA) yüksek miktarlarda üretilen bir kimyasal maddedir.

İnsanların BPA hakkındaki endişesi BPA'ya maruziyetin yaygın olmasından kaynaklanır. BPA'nın endokrin bozucu özelliğinden dolayı insan sağlığındaki riski büyük önem arz eder (Wolstenholme ve ark., 2011). BPA'nın, çeşitli dokularda enzim aktivitesini ve metabolizmayı etkilediği, hedef dokularda hormon reseptörlerinin sayısında ve hormon reseptör geni aktivitesinde değişikliğe yol açtığı ve endokrin sistemi bozduğu bir çok çalışmada ortaya çıkmıştır. Çalışmalar özellikle östrojenik ve antiandrojenik etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (EFSA, 2008). Yapılan çalışmalarda düşük doz BPA'nın, gelişmekte olan fare ve sıçan beyninin yapısını, gelişimini ve davranışlarını etkilediği görülmüştür (Richter ve ark., 2007). BPA'nın dişi farelerdeki epigenetik etkilerinin kuşaklararası sürdüğü görülmüştür (Singh ve ark., 2012).

BPA bir polikarbonattır ve işlenmesi, kalıplanması ve ısıl olarak şekillenmesi oldukça kolay olduğundan kullanımı çok yaygındır. BPA, gözlük lenslerinde, medikal malzemelerde, CD ve DVD'lerde, yiyecek ve içecek kutularının iç kaplamalarında, cep telefonlarında, bilgisayarlarda, termal faks kağıtlarında, güvenlik kasklarında, kurşun geçirmez malzemelerde, PVC pencerelerde, otomobil parçalarında, koruyucu giysilerde, toz boyalarda, polikarbonat şişeler ve kaplarda (süt ve su şişeleri, bebek biberonları), elektrik malzemeleri ve elektronik parçaların kaplamalarında, diş dolgu malzemelerinde ve yapışkanlar gibi birçok ürünün bileşiminde bulunmaktadır (Olea ve ark., 1996; Meyer, 1997). BPA'nın materyallerden çok küçük miktarlarda yiyecek ve içeceklere geçebildiği görülmüştür. Normal koşullarda dahi BPA'nın plastik taşıyıcılardan salınımının söz konusu olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, yazar kasa fişlerinde kullanılan termal kağıtlar aracılığıyla deri yolu ile de yaygın bir maruziyet söz konusudur (Singh ve Li, 2012). Özellikle yeni doğan yoğun bakım ünitelerinde bebekler yüksek miktarda BPA'ya maruz kalmaktadır. Östrojenik özellikte olan BPA'nın anne sütü ile bebeğe aktarılırken gebelikte de transplental yol ile fetüse ulaştığı bilinmektedir (Zama ve Üzümcü, 2010; LeBaron ve ark., 2010). Canlı organizma üzerinde yaptığı toksik etkileri

ve endokrin sistemi bozduğundan dolayı BPA'nın kullanımına şüpheyile yaklaşılmaktadır (EFSA 2006).

Son yıllarda BPA'nın diyabet, obezite, üreme bozuklukları, kardiyovasküler bozukluklar, doğum anomalileri, kronik solunum ve böbrek bozuklukları ve meme kanseri gibi birçok kronik hastalığın etiyolojisinde rolünün olabileceği üzerinde durulmaktadır. BPA'nın toksisitesinin değerlendirilmesinde birçok çalışma yapılmakta olup, çeşitli sistemler üzerinde toksik etkilerinin değerlendirilmesinde epigenetik mekanizmaların da rolünün olabileceği yapılan araştırmalarda önemle vurgulanmaktadır (Kundakovic ve Champagne, 2011; Rezg ve ark., 2014).

Tez çalışmasında, insanların çeşitli yollar ile maruz kaldığı BPA'nın toksisitesinde DNA metilasyonunun rolü araştırılmıştır. Kimyasalların sebep olduğu epigenetik değişikliklerin incelenmesinde *in vitro* test sistemlerinin kullanılması risk değerlendirmesinde tehlikenin tanımlanması aşamasında farklı sistemlerin kullanılması bakımından önemlidir. Tez çalışmasında elde edilecek sonuçların, risk değerlendirme sürecinde endokrin bozucu kimyasalların toksisitesinde ortaya çıkan anahtar moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epigenetik

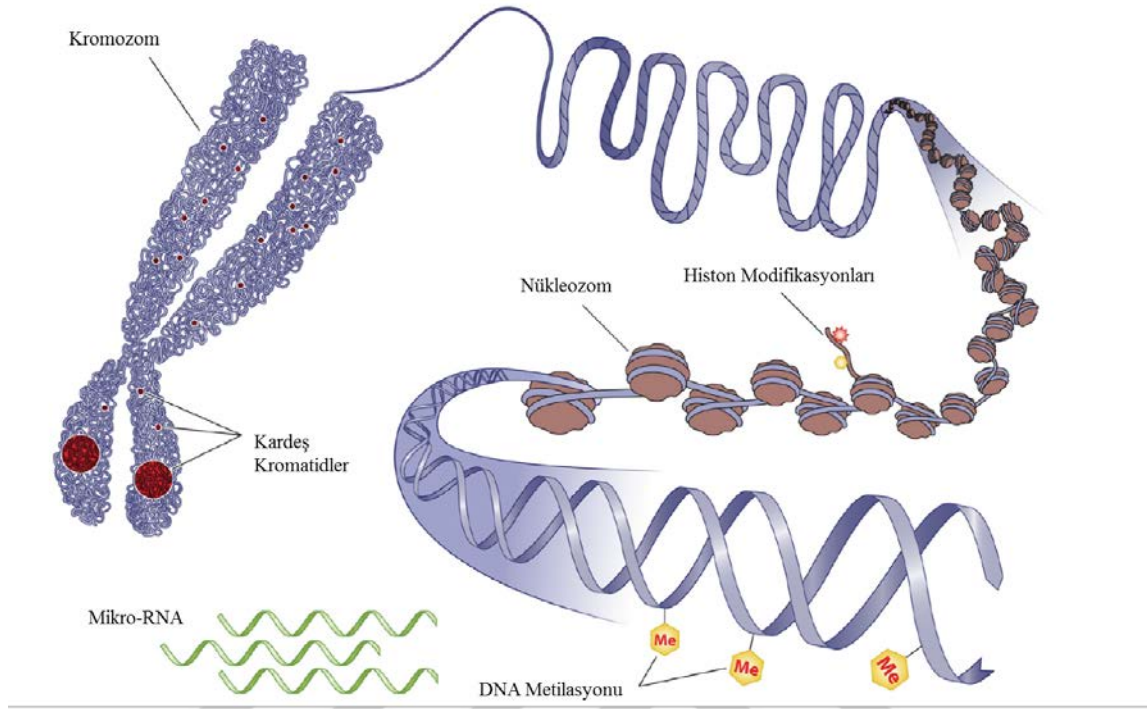
Epigenetik terimi 1940’larda Conrad Waddington tarafından ilk olarak kullanılmıştır. Epigenetik “DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtılabilen, gen fonksiyonundaki değişiklikler” olarak tanımlanmaktadır.

Epigenetik değişiklikler genetik modifikasyonlardan farklı olarak; geri dönüşebilme potansiyellerine sahip olma, genomda yakınındaki bir diğer gen grubunu etkileyebilme ve çevre ile modifiye edebilme gibi ortak özelliklere sahiptirler (Feinberg, 2004). Epigenetik olaylar, özellikle canlıların embriyodan yetişkin bireye doğru ilerleyen gelişim sürecinde gözlenen, hücre farklılaşmaları sırasında ortaya çıkan gen ifadesindeki değişikliklerde önemli rol oynamaktadır. Gen ifadesindeki bu değişiklikler, DNA’nın seçici olarak, farklı epigenetik durumlarda bulunan farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle ortaya çıkmaktadır (Syzyf, 2011).

Epigenetik değişiklikler; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, mikroRNA’ların (miRNA) regülasyonu olmak üzere başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır (Şekil 2-1) (Zaidi ve ark., 2010). Bu mekanizmaların herhangi birindeki hata, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına sebep olarak epigenetik hasarlara neden olmaktadır.

Histon modifikasyonları, histon proteinlerinin kovalent post translasyonel değişimleri olarak tanımlanır. Histonların N-terminal uçlarında meydana gelen bu modifikasyonlar; asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon şeklindedir. Histon modifikasyonları kromatin yapısını değiştirerek gen ifadesinin kontrolünde rol oynamaktadır. Histonlardaki modifikasyonların ve DNA metilasyonunun birlikte çalışarak gen ifadesinin durumunu etkilediği ve bu şekilde hücrenin yazgısının belirlenmesinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir. Kodlanmayan RNA’lar epigenetik mekanizmalar arasında son yıllarda ortaya çıkmakta olup, miRNA’lar olarak da bilinmektedir. miRNA’lar küçük, kodlamayan RNA molekülleridir. Bazı miRNA’lar epigenetik mekanizmalar ile kontrol edilirken, bazıları da doğrudan veya dolaylı olarak epigenetik mekanizmalarda rol oynayan faktörleri hedef alırlar. DNA metilasyonu, CpG

(sitozin fosfat guanin) dinükleotidleri içinde bulunan sitozinlerin metilasyonu olup, epigenetik mekanizmalar arasında en yaygın olanıdır.



Şekil 2-1: Başlıca epigenetik mekanizmalar (Zaidi ve ark., 2010).

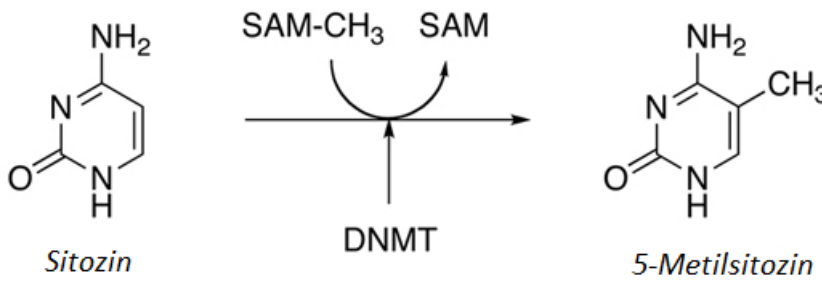
2.2. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu genomun doğal bir modifikasyon mekanizması olup CpG dinükleotitlerinde gerçekleşir (Herman ve Baylin, 2003). DNA metilasyonu gen ifadesinin, kromozomal bütünlüğün ve rekombinasyonel olayların kontrolünde rol oynamaktadır. DNA metilasyon paternleri embriyojenezin erken evrelerinde sıfırlanır ve gelişimin erken dönemlerinde yeniden kurulur. Bundan sonra, nispeten sabit kaldığı düşünülmektedir.

Sitozin ve guaninin genomik bölgelerde tekrarlanan şekillerde bulunduğu bölgeler CpG adaları olarak adlandırılır. CpG adacıkları 1-2 kb uzunluğunda kısa DNA bölgeleridir ve genomun yaklaşık olarak %2'sini oluşturmaktadır. CpG adaları genlerin promotör bölgelerinde ve ilk ekzonlarında bulunur ve bu bölgeler %60-70 oranında guanin ve sitozin (GC) zengin dizilere sahiptir. CpG adaları genellikle tüm normal dokularda metile değil iken; imprinting genler ve inaktif X kromozom genlerinde ise metile halde bulunur. Metillenmemiş durumda bulunan CpG adalarındaki yeniden

metillenmeler yaşlanma süreci ve kanser gibi bazı hastalıkların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, genom boyunca bulunan CpG dinükleotidlerinin ise %70-80'i metile haldedir, çoğunlukla tekrarlayan genomik bölgelerde bulunur ve kromatinin yeniden düzenlenmesine aracılık etmektedir (Herman ve Baylin, 2003).

DNA metilasyonunda DNA metiltransferaz (DNMT) ve s-adenozil metiyonin (SAM) önemli rol oynamaktadır. Şimdiye kadar memelilerde 5 tip DNMT enzimi saptanmış olup; bunlar DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve onun izoformu olan DNMT3L'dir (Robertson, 2002). DNMT'ler, SAM (S-Adenozil Metiyonin) tarafından sağlanan metil grubunu sitozinin 5. konumundaki karbona aktaran enzimlerdir. Genin promotör bölgesinde CpG adalarındaki DNA dizisinde guaninin önünde yerleşmiş sitozinlerin 5. konumundaki, karbonuna metil grubunun bağlanması DNA metiltransferaz enzimi aracılığı ile gerçekleşir (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Memeli genomunda sitozinin (DNA) metilasyonu (Herman ve Baylin, 2003).

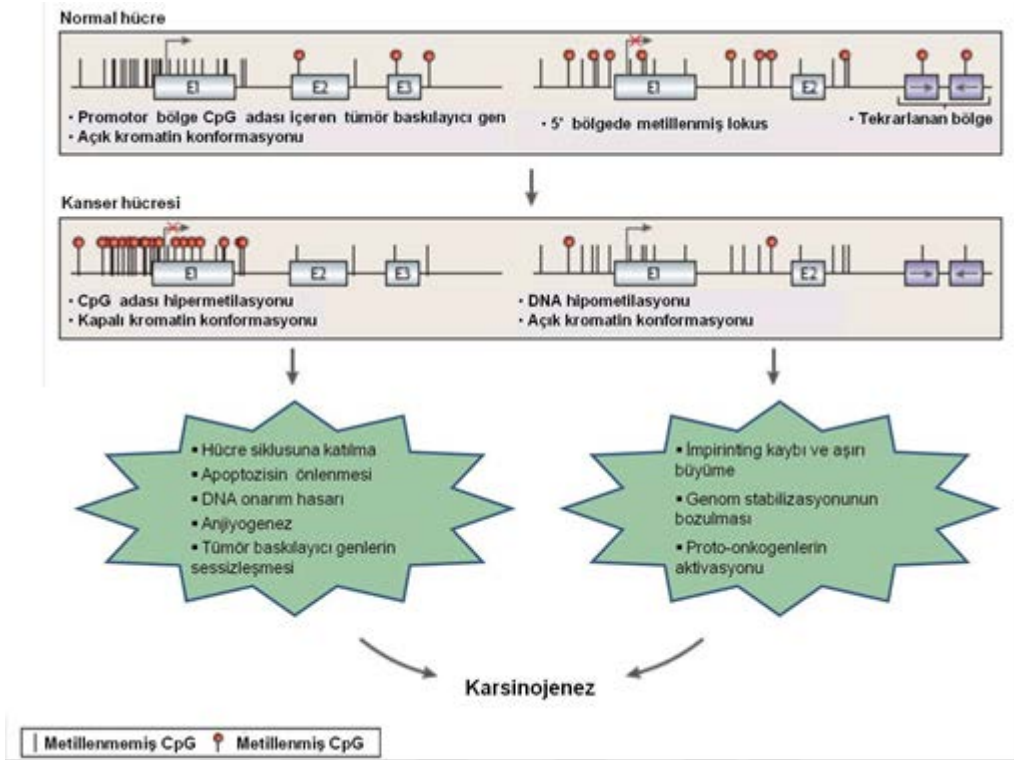
Memeli genomunda sitozinlerin yaklaşık %2-5'i metillenmiş ve guanin ile baz çifti oluşturmuş durumdadır (Bombail ve ark., 2004). İlgili genin promotör bölgesinin metillenmesiyle gen ifadesinde değişimler meydana gelir. Bununla birlikte, DNA metilasyonu embriyonik gelişme, X kromozom inaktivasyonu, ve genomik imprinting gibi birçok normal hücresel olay ile ilişkili halindedir. Kanser olaylarında, gene özgü hipermetilasyon ve global hipometilasyon olmak üzere DNA metilasyonu değişimlerinin 2 tipi gözlenmektedir. Başta tümör baskılayıcı genler olmak üzere genomda hayati fonksiyona sahip olan pek çok genin (DNA onarım genleri, hücre siklus regülatörleri, apoptozis ve detoksifikasyonla ilişkili genler gibi) gene özgü hipermetilasyon ile sessizleştirilerek fonksiyonları bozulur. Global DNA hipometilasyonunda ise hipermetilasyonun aksine tüm genomdaki metil gruplarının

sayısı azalır, buna bağlı olarak hipometilasyon genomun stabilizasyonu bozar ve protoonkogenlerin güçlü bir şekilde anlatımına sebep olarak istenmeyen durumlara yol açar. Böylece gene özgü hipermetilasyon ve global DNA hipometilasyonu karsinogenez oluşumuna zemin hazırlar (Jones ve Baylin, 2002).

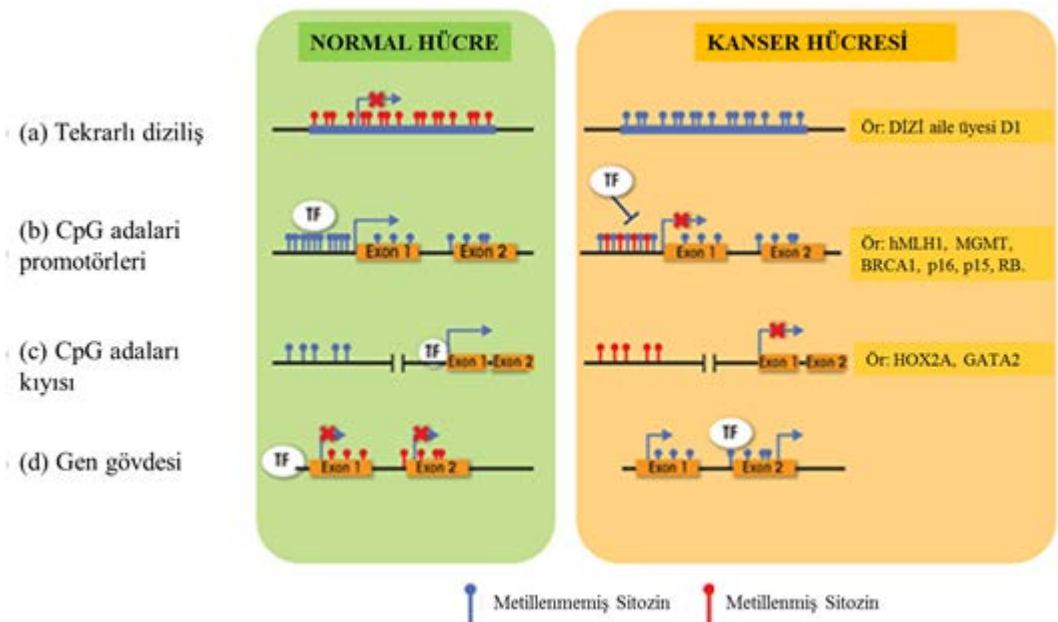
2.2.1. DNA Metilasyonu ve Gen İfadesinin Düzenlenmesi

Genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarında görülen DNA metilasyonu, kromatin yapısının organizasyonunda ve gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Aktif kromatinin (açık yapı) yani transkripsiyon faktörlerinin ve diğer koaktivatörlerin promotore bağlanabildiği kromatin yapısı metillenmemiş CpG dinükleotidleri içerir. Buna karşın, inaktif kromatin (kapalı yapı) yani transkripsiyon faktörlerinin promotore bağlanamadığı kromatin yapısı metillenmiş CpG dinükleotidleri içerir (Şekil 2-3) (Esteller, 2007). Bir genin metillenme derecesi ile ifade edilme derecesi arasında ters bir ilişiki vardır. Yani, düşük derecedeki metilasyon yüksek oranda gen ifadesi ile ve yüksek derecedeki metilasyon ise düşük oranda gen ifadesi ile bağlantılıdır. Hücre farklılaşmasıyla beraber farklı dokularda farklı genlerin ifade edilmesinin temelinde bu düzenlenme yatmaktadır. Ayrıca metilasyon dokuya özgüdür ve bir kere gerçekleşince o dokunun bütün hücrelerine aktarılır. Şekil 2-4'te Normal ve kanserli hücrelerde DNA metilasyon modelleri gösterilmiştir (Varela-Rey ve ark., 2011).

DNA metilasyonu ile transkripsiyonel baskılanmada çeşitli mekanizmaların rol oynadığı öne sürülmüştür. Bunlardan ilki, promotor bölgelerinde tanınma alanlarında spesifik transkripsiyon faktörlerinin direkt bağlanmasının önlenmesini içerir. Bazı transkripsiyon faktörleri (Ap-2, c-Myc/Myn, E2F) CpG kalıntılarını içeren dizileri tanır ve bunların herbirine bağlanmanın metilasyon ile inhibe edildiği gösterilmiştir (Das ve Singal, 2004). Pek çok transkripsiyon faktörünün metilasyon tanıma bölgelerinin bulunduğu ve metilasyona duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Ancak, daha sonra metilasyon tanıma bölgeleri bulunmayan ve metilasyona duyarsız transkripsiyon faktörleri de keşfedilmiştir. Diğer bir mekanizma ise; spesifik transkripsiyonel baskılayıcıların metillenmiş DNA'ya direkt olarak bağlanmasını içerir. Yani, promotore bağlanacak transkripsiyon faktörlerinin tanıyacağı bölgeler, metilsitozine bağlanan proteinler ('metil bağlayıcı protein', MBD) tarafından maskelenir. Bu proteinlerin en iyi tanınmış örnekleri MeCP2, MBD2 ve MBD3'tür. Bu proteinler histon deasetilazlar



Şekil 2-3: Tümör oluşumunda DNA metilasyonu değişimleri (Esteller, 2007).



Şekil 2-4: Normal ve kanserli hücrelerde DNA metilasyon modelleri (Varela-Rey ve ark., 2011).

(HDAC1 ve HDAC2) ile ve kromatin yeniden modellenme aktiviteleri ile birlikte çalışırlar. Tüm bu kompleksler kompakt bir kromatin yapısı meydana getirerek, transkripsiyonu baskırlar. Böylece, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yapısını da etkiler ve bu da gen ifadesinin değişmesiyle ortaya çıkar (Das ve Singal, 2004).

2.2.2. DNA Metilasyonu ve Kanser

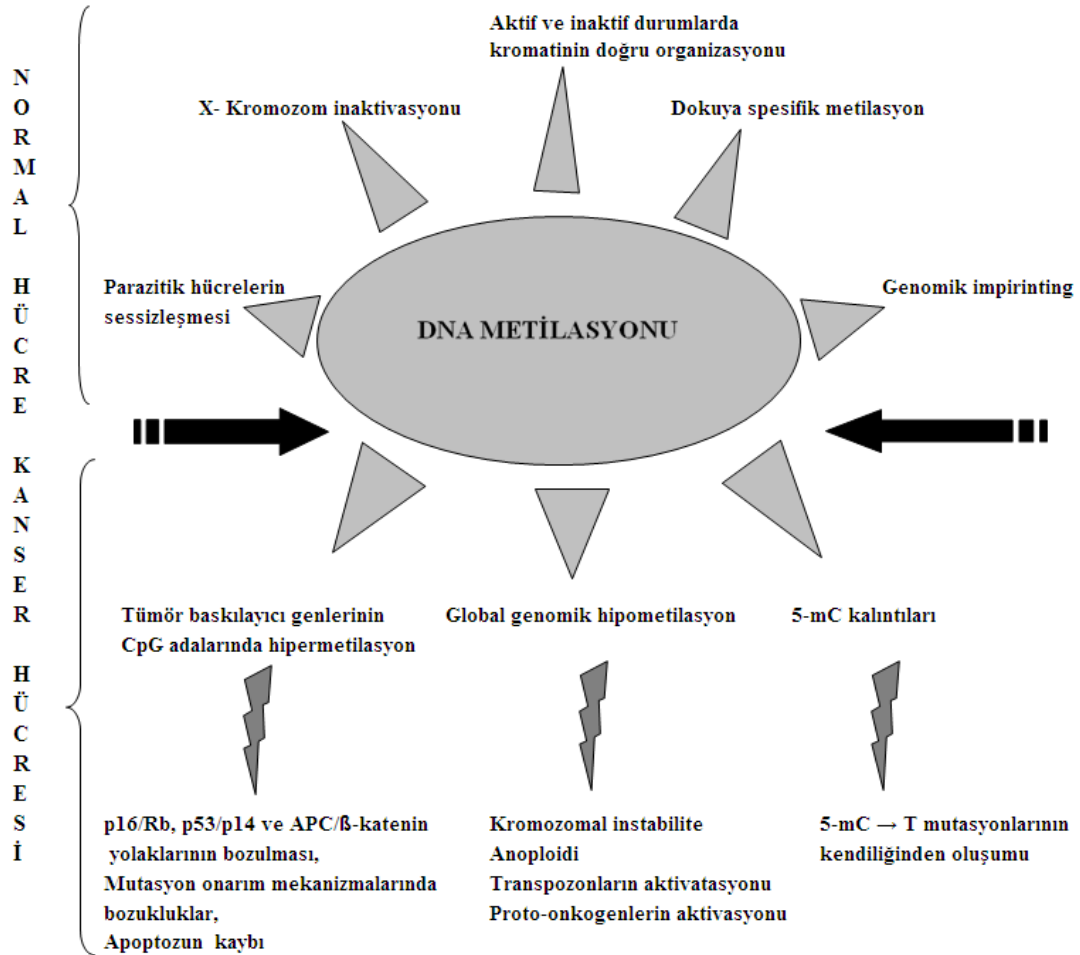
DNA metilasyonu; üç farklı mekanizma ile incelenebilir: 5-metilsitozinin deaminasyonu sonucu mutasyon oluşması; genomun global hipometilasyonu ve tümör baskılayıcı genlerinin promotor bölgelerinde CpG adalarında hipermetilasyon ile baskılanmasıdır (Gonzalzo ve Jones, 1997). Bununla birlikte, DNA metilasyonu embriyonik gelişme, X kromozom inaktivasyonu, ve genomik imprinting gibi birçok normal hücreyel olay ile de ilişki halindedir. CpG dinükleotidlerindeki DNA kaybı kanser hücrelerinde tanımlanmış ilk epigenetik anormallığıdır. Normal ve kanserli hücrelerin DNA metilasyonu ile ilişkisi Şekil 2-5’de gösterilmiştir (Esteller ve Herman, 2002).

Hipometilasyon

Normal DNA metilasyonu düzeylerindeki azalışa hipometilasyon denir. DNA hipometilasyonu kanser ile ilişkilendirilir ve tümör araştırmalarının odak noktası olmuştur. Genom boyunca çoğunlukla tekrarlayan genomik bölgelerde bulunan CpG dinükleotidlerinin %70-80’i metile halledir. Kanserin erken aşamasında sitozin metilasyonunda global bir azalma gösterilmiştir. Hipometilasyon kromozomal instabiliteye, retrotranspozon¹ aktivasyonu ve bazı protoonkogenlerin ekspresyonunda artışa sebep olmaktadır (Das ve Singal, 2004). DNA hipometilasyonunun potansiyel nedenleri ve sonuçları Şekil 2-6’da gösterilmiştir. DNA hipometilasyonu genleri aktive edebilecek özelliğe sahiptir. Kanserli hücre ve normal hücre arasındaki farkı araştıran Feinberg ve Vogelstein (1982) DNA metilasyonunun doku spesifik gen sessizleşmesi ile ilişkisinin olduğunu göstermiştir. DNA’yı analiz etmek için metilasyona özgü restriksiyon enzimleri ile Southern blot tekniğini kullanarak CpG dinükleotidlerin

¹ Hareket edebilen genetik elemanlar

normal hücrelerde önemli oranının metillenmiş ve kanserli hücrelerde ise metillenmemiş olarak bulunduğu gösterilmiştir (Feinberg ve Tycko, 2004).

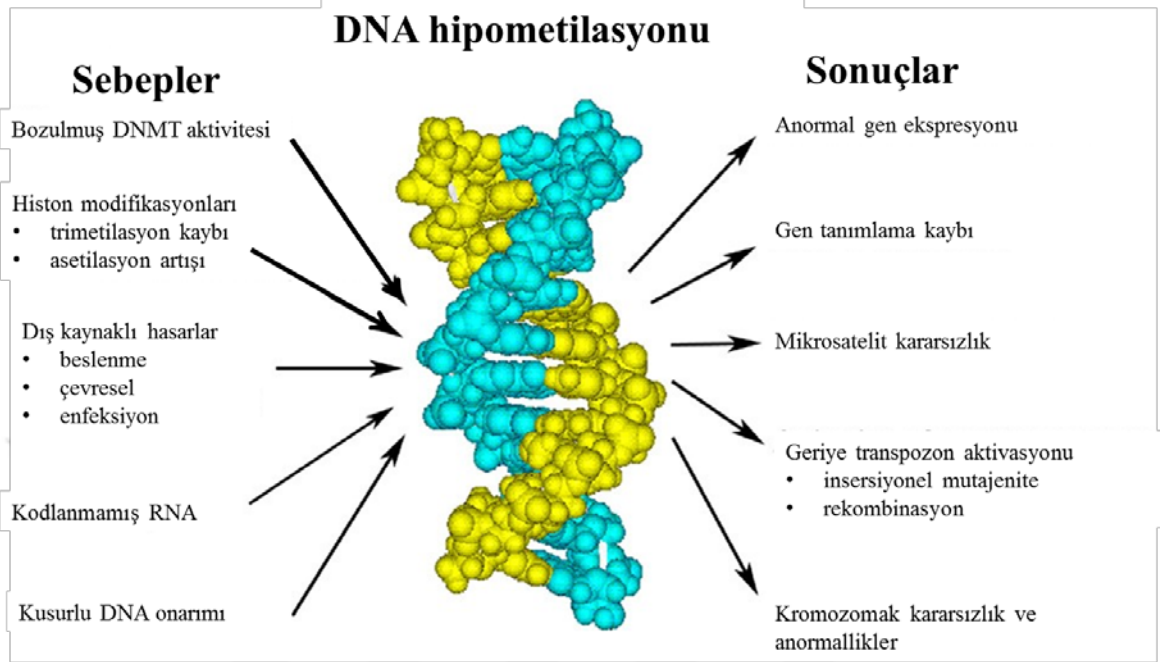


Şekil 2-5: Normal ve kanserli hücrelerin DNA metilasyonu ile ilişkisi (Esteller ve Herman, 2002).

DNA metilasyonu DNA'nın sıkı bir şekilde paketlenmesinde rol oynamaktadır. Bu sıkı paketlenmeden dolayı örneğin, transpozonların genom içerisinde hareket etmeleri engellenmiş olmaktadır. Ancak, metilasyon kaybı ile DNA sıkı bir şekilde paketlenemeyeceğinden transpozonlar genomda rahatlıkla hareket ederek kromozomal instabiliteye neden olmaktadır. Ayrıca, DNA onarım genlerindeki anomaliler de kromozomal instabiliteye neden olmaktadır (Singal ve Ginder, 1999).

Proto-onkogenlerden biri olan c-myc bir transkripsiyon faktörünü kodlamakta olup, hücre çoğalmasını kontrol eder. c-myc Geninde meydana gelen hipometilasyon ile

genin ekspresyonu artar ve bu da karaciğer ve böbrek kanserlerinde hücre çoğalması ile ilişkilidir (Du ve ark., 2009; Tao ve ark., 2000; Tao ve ark., 2005).



Şekil 2-6: DNA hipometilasyonunun potansiyel nedenleri ve sonuçları (Wilson ve ark., 2007).

Hipermetilasyon

Normal DNA metilasyonu seviyelerindeki artışa hipermetilasyon denir. Promotor bölgelerde CpG adası hipermetilasyonu, normalde metillenmemiş olarak bulunan başta tümör baskılayıcı genler olmak üzere genomda hayati fonksiyonu olan pek çok genin (DNA tamir genleri, hücre siklus regülatörleri, apoptozis ve detoksifikasyonla ilişkili genler gibi) hipermetilasyon ile sessizleştirilerek fonksiyonlarının kaybına sebep olur. Kanserde hipermetilasyonda rol oynayan genler; hücre siklusunun regülasyonu (*p16*, *p15*, *Rb*, *p14*), DNA tamir sistemi (*BRCA1*, *MGMT*(*O*(6)-metilguanin-DNA metiltransferaz), apoptozis (ölümle ilişkili *protein kinaz-DAPK*), *transmembran segmenti-TMS1*), ilaç direnci, detoksifikasyon, anjiogenez ve metastaz gibi olaylardan sorumludur. Bununla birlikte; *Rasff1a* ve *p16* gibi belirli genler bir çok çeşit kanserde sıklıkla metile halde iken, diğer genler ise sadece spesifik bazı kanserlerde metiledir.

CpG dalarının metilasyonunun tümör gelişiminin özellikle erken dönemlerinde önemli olduğu, kanser için bir nevi zemin hazırladığı, kanserin prognoz, ve yayılım hızına etki ettiği düşünülmektedir. Bu durum bir tümör göstergesi olarak metilasyonun önemini vurgulamaktadır.

2.2.3. DNA Metilasyonu ve Çevresel Faktörler

Beslenme, sigara, fiziksel aktivite gibi yaşamsal faktörler kanser sebeplerinin ana temellerini oluşturur. Bazı veriler fiziksel aktivite ve enerji dengesi ile DNA metilasyonunun bağlantısını desteklemektedir. DNA metilasyonu çevresel karsinojenler ve bulaşıcı ajanlar tarafından da modifiye edilebilir (Lim ve Song, 2012).

Bazı çalışmalarda non-genotoksik karsinojenlere maruziyet ile DNA metilasyonundaki değişiklikler arasında yakın bir ilişki gözlenmiş ve farklı karsinojenler tarafından deneysel olarak tümör gelişmesinin erken safhalarında DNA hipometilasyonunun indüklendiği gösterilmiştir. Örneğin, Pereira ve arkadaşları non-genotoksik karsinojenlerin (safra asitleri, rutin, bromdiklorometan, 5-aza-2-deoksisitidin) fare ve sıçan bağırsak kolonunda hipometilasyona sebep olduğunu saptamışlardır (Pereira ve ark., 2004). Benzer olarak, tekrarlanan dozlarda dikloroasetik asit ve trikloroasetik asidin fare karaciğerinde DNA hipometilasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Ge ve ark., 2001).

Farelere oral yol ile verilen trihalometanların (kloroform, bromodiklorometan, klorodibromometan, bromoform) karaciğer DNA'sında 5-metilsitozin düzeylerinde azalmaya ve *c-myc* geninin promotor bölgelerinde de hipometilasyona sebep olduğu gösterilmiştir (Coffin ve ark., 2000). Tao ve arkadaşlarının yaptıkları diğer bir çalışmada da kloroform, bromodiklorometan, dikloroasetik asit, trikloroasetik asitin de sıçan ve fare böbreklerinde global DNA hipometilasyonuna ve *c-myc* geninde de hipometilasyona sebep oldukları gösterilmiş olup, DNA hipometilasyonunun bu maddelerin böbrek üzerindeki karsinojenik mekanizmalarda rol aldığı ve karaciğer ve kolon kanserlerinin de bu mekanizma ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Tao ve ark., 2005).

Metapirilen uygulanmış sıçanlarda yapılan araştırmalarda karaciğer DNA'sında 5-metilsitozin düzeyi yüksek bulunmuş olup, yapılan gen anlatımı tayinininde de bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Hernandez ve ark., 1991). Hepa 1c1c7 hücreleri üzerinde yapılan başka bir araştırmada TCDD'nin çeşitli genler üzerindeki etkisinde

hücrel DNA metilasyonunun etkili olduğu gösterilmiştir (Jin ve ark., 2004). Krom indüklü akciğer kanserinde *p16* (Kondo ve ark., 2005) ve *MLH1* (Takahashi ve ark., 2005) genlerinde hipermetilasyon olduğu; daha yeni bir çalışmada ise A549 hücrelerinde histon metilasyonu ile birlikte *MLH1* geninin ifadesinde azalma olduğu (Sun ve ark., 2009) gösterilmiş olup, kromozomun karsinojenik etkisinde epigenetik mekanizmaların rolü olabileceği öne sürülmektedir.

Zhang ve ark. (2011), ilaç indüklü epigenetik değişikliklere dikkat çekmiştir. Non-genotoksik sıçan karaciğer karsinojeni olarak kabul edilen izoniyazid ile yapılan bir çalışmada; 42 gün süre ile 10 mg/kg izoniyazid maruziyetinin sıçan karaciğerinde global DNA metilasyonunda azalmaya ve LINE-1 gibi tekrarlanan dizilerde ise hipometilasyona sebep olduğu gösterilmiş ve bu durumun da genomik stabiliteyi bozabileceği ileri sürülmüştür (Zhang ve ark., 2011).

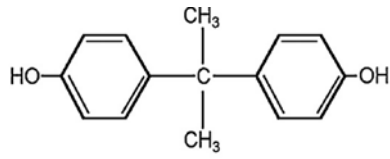
2.3. Bisfenol A

1950'lerden itibaren endüstride polikarbonat plastik ve epoksi reçinesinin üretiminde sentetik monomer olarak kullanılan BPA, endokrin bozucu özelliğinden dolayı özellikle insan sağlığı açısından yüksek risk oluşturmaktadır (Wolstenholme ve ark., 2011). BPA'nın yüksek üretim hacmi, plastiklerin yaygın kullanımı ve sağlık açısından yan etkileri nedeniyle bilimsel çevreler, düzenleyici otoriteler ve halkın dikkatini çekmektedir (Halden, 2010).

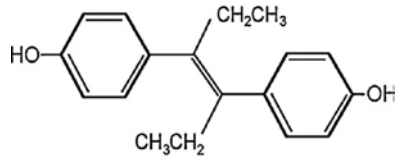
2.3.1. BPA'nın Kimyasal Yapısı

BPA [2,2-bis (4-hidroksifenil) propan] iki molekül fenolün bir molekül aseton ile düşük pH'da ve basınçta ve yüksek sıcaklıkta kondensasyonu ile elde edilen bir bileşiktir. 1891 yılında Kimyager A. P. Dianin tarafından ilk defa sentezi gerçekleştirilen (Lintelmann ve ark., 2003) BPA %99-99,8 oranındaki saflıkta olmaktadır (Prokop ve ark., 2004). Sanayide birçok amaçla üretilen ürünlerde ham madde olarak kullanılan bir maddedir.

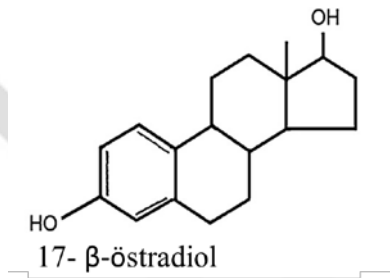
BPA, doymamış iki fenol halka içermesi bakımından güçlü sentetik östrojen olarak bilinen dietilstilbestrol (DES)'e benzer kimyasal yapıya sahiptir. Ancak endojen östrojen hormonu olan 17 β -östradiol ile kimyasal yapıları karşılaştırıldığında aralarında hiçbir benzerlik olmadığı görülmektedir (Gaido ve ark., 1997). Şekil 2-7'de BPA, DES ve 17 β -östradiol'ün kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Bisfenol A



Dietilstilbestrol (DES)



17- β-östradiol

Şekil 2-7: BPA, DES ve 17 β-östradiol'ün kimyasal yapısı.

2.3.2. BPA'nın Fizikokimyasal Özellikleri

BPA'nın fizikokimyasal özellikleri Tablo 2-1'de verilmiştir.

Tablo 2-1: BPA'nın genel özellikleri (Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu, 2014).

Genel Adı	Bisfenol A
IUPAC adlandırması	2,2-bis(4-hidroksifenil)propan
CAS numarası	80-05-7
Endeks numarası	604-030-00-0
Görünüş	Fiziksel hal: kristal; Renk: bej
Koku	Kokusuz
Kimyasal formülü	$C_{15}H_{16}O_2$
Yapısal formülü	$(CH_3)_2-C(C_6H_4-OH)_2$
Moleküler ağırlığı	228,9 g/mol
Erime sıcaklığı	158-159°C-lit
Donma sıcaklığı	-156,5°C
Kaynama sıcaklığı	220°C (0,5 kPa)
Su içerisindeki çözünürlüğü	25°C'de 0,298 g/L
Uçuculuğu	193°C (1 atm basınçta)
Log Kow	3,32
Log Pow (21,5°C)	3,32
Sudaki çözünürlüğü (25°C)	120 mg/L
Bağıl yoğunluk (su=1)	1,2 g/L

BPA hem asit hem de alkaliyle katalizlenebilen reaksiyon sonucu oluşsa da yan ürün miktarının ve sayısının minimuma indirilmesi için endüstriyel üretimde asitle (hidroklorik asit) katalizleme tercih edilmektedir. Reaksiyon sonucu, daha düşük saflıkta ve epoksi reçine imalatında kullanılan BPA ve yüksek saflıkta ve polikarbonat imalatında kullanılan BPA olmak üzere iki farklı kalitede ürün oluşmaktadır (Yıldız, 2009).

2.3.3. BPA'nın Kullanım Alanları

BPA, 1930'lu yıllarda Dodds ve Lawson tarafından sentetik östrojen olarak sentezlenmiş, ancak östrojenik etkinliğinin az olması nedeniyle kullanıma girmemiştir (Frederick ve ark, 2004 ve Dodds ve ark. 1936). 1950'li yıllarda polikarbonatların üretiminde kullanılmaya başlanmıştır. BPA dünya genelinde en fazla üretilen kimyasal maddelerden biridir. Yıllık üretimi 2-3 milyon tonu aşmaktadır.

BPA, gözlük lenslerinde, medikal malzemelerde, CD ve DVD'lerde, yiyecek ve içecek kutularının iç kaplamalarında, cep telefonlarında, bilgisayarlarda, termal faks kağıtlarında, güvenlik kasklarında, kurşun geçirmez malzemelerde, PVC pencerelerde, otomobil parçalarında, koruyucu giysilerde, toz boyalarda, polikarbonat şişeler ve kaplarda (süt ve su şişeleri, bebek biberonları), elektrik malzemeleri ve elektronik parçaların kaplamalarında, diş dolgu malzemelerinde ve yapışkanlar gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Olea ve ark., 1996).

2.3.4. BPA'ya Maruziyet

Gıda ve içeceklerin insan maruziyetinin temel nedeni olduğu düşünülmektedir. Normal koşullarda dahi BPA'nın plastik taşıyıcılardan salınımının söz konusu olduğu belirtilmektedir. Özellikle yeni doğan yoğun bakım ünitelerinde bebekler yüksek miktarda BPA'ya maruz kalmaktadır. Ayrıca, yazar kasa fişlerinde kullanılan termal kağıtlar aracılığıyla deri yolu ile de yaygın bir maruziyet söz konusudur (Singh ve Li, 2012).

BPA polikarbonat içecek şişelerinde yapısal bir bileşendir. Aynı zamanda bu bileşen yiyecekleri koruyabilmek için metal kutuları kaplamada kullanılmaktadır. BPA 1960'lardan beri yiyecek paketlemede kullanılmaktadır. Çoğu zaman yiyecekler bazı ambalaj materyalleri ile indirekt temasta olduğundan, ambalajlama materyallerinden küçük fakat ölçülebilir miktarda yiyeceklere geçip bozulmalarına sebep olabilmektedir.

Avrupa Gıda Güvenliği Uzmanlar Kurulu'nun (European Food Safety Authority, EFSA) BPA maruziyeti ve toksisitesini değerlendirmesi sonucunda; BPA'nın mevcut maruziyet seviyelerinin herhangi bir yaş grubunda risk oluşturmadığı bildirilmiştir. EFSA araştırmalarının sonucunda BPA'nın geçici tolere edilebilir günlük alım seviyesinin ('temporary tolerable daily intake', t-TDI) 50 µg/kg vücut ağırlığı'ndan 4 µg/kg vücut ağırlığı'na indirildiğini vurgulamıştır (EFSA, 2015).

BPA'nın insan serumu, idrarı, amniyotik sıvısı, foliküler sıvısı, plasental dokuları, göbek kordonu kanında ölçülebilir olduğu gösterilmiştir (Vandenberg ve ark., 2007).

BPA'nın çok geniş kullanım alanının olması günlük hayatta kişilerin BPA ile temas etme risklerini arttırmaktadır (Staples ve ark. 1998; Sheedan, 2000).

2.3.5. BPA'nın Toksikokinetiği

BPA insan vücuduna en çok oral yolla alınır (Völkel ve ark. 2002). BPA oral yolla alındıktan sonra sindirim sisteminden hızlıca emilir. Oral ve intravenöz uygulamalardan sonra total BPA plazma konsantrasyon-zaman grafiklerinde eğrinin altındaki alan incelendiğinde, sindirim yolundan yüksek miktarda (sıçan ve maymunlarda %85-86'ya kadar çıkabilen) emilimin gerçekleştiği gösterilmiştir. Benzer olarak insanlarla yapılan çalışmalarda da düşük dozda oral yolla alınan BPA'nın tamamen emildiğini gösterilmektedir (EU-RAR, 2003, 2008). BPA yağda çözünebilen bir maddedir (Fernandez ve ark. 2007). Bu yüzden vücutta yağ tabakasında ve yağdan zengin dokular üzerinde biriktiği düşünülmektedir.

Oral emilimi takiben BPA polimorfik bir enzim olan UDP-glukuroniltransferaz tarafından bağırsak duvarında ve karaciğerde (ilk geçiş etkisi) hızlıca suda çözünür metaboliti olan BPA-glukronid'e dönüşür ve 6 saatten kısa süre içerisinde renal yolla atılmaktadır (Völkel ve ark. 2002). Oral maruziyetten sonra ilk geçiş etkisinden dolayı insanlarda kandaki konjuge olmayan BPA seviyesi genellikle çok düşük olarak rapor edilmiştir (konjuge olmayan BPA insanlarda ve maymunlarda total serumun %5'inden azdır). İnsanlarda oral dozun %75-85'i beş saat içinde idrara geçmektedir. BPA-glukuronid, BPA'nın östrojen reseptörlerindeki inaktif formudur. BPA ayrıca düşük oranda sülfat ile konjugasyona da uğrar. İnsanlarda kemirgenlere benzer olarak sülfat konjugasyonunun sülfotrasferaz enzimleri tarafından sağlandığı gözlenmiştir. (EFSA, 2008; EURAR, 2003, 2008; ANSES, 2011, 2013; EFSA CEF Panel, 2010).

Yapılan çalışmalarda 24 saat içerisinde perkütan yol ile alınan BPA'nın insan derisinden % 2.3-8.6 oranında geçtiğini göstermiştir.

BPA'nın anne sütü ile bebeğe aktarılırken gebelikte de transplental yol ile fetüse ulaştığı bilinmektedir (Zama ve Üzümcü, 2010; LeBaron ve ark., 2010). BPA'ya maruz kalmış dişi sıçanların sütünde konjuge olmayan ve konjuge olan BPA formlarının her ikisinin de varlığı gözlemlenmiştir. İnsan sütünde ise konjuge olmayan BPA varlığı rapor edilmiştir.

2.3.6. BPA'nın Toksik Etkileri

Son yıllarda BPA'nın diyabet, obezite, üreme bozuklukları, kardiyovasküler bozukluklar, doğum anomalileri, kronik solunum ve böbrek bozuklukları ve meme kanseri gibi birçok kronik hastalığın etiyolojisinde rolünün olabileceği üzerinde

durulmaktadır. BPA maruziyeti ve kronik hastalıklar ile ilişkisinde rol oynayan mekanizmaların oksidatif stress, mitokondriyal bozukluklar, hücre sinyal yollarını kapsayan genetik, epigenetik ve endokrin bozucu mekanizmalar ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Rezg ve ark., 2014).

BPA'nın çeşitli dokularda enzim aktivitesini ve metabolizmayı etkilediği, hedef dokularda hormon reseptörlerinin sayısında ve hormon reseptör geni aktivitesinde değişikliğe yol açtığı, özellikle zayıf östrojenik etkileri sebebiyle endokrin sistem üzerine zararlı etkileri çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (EFSA, 2008). BPA'nın östrojen reseptör α ve β 'ya ($ER\alpha$ ve $ER\beta$) bağlanarak hedef genlerde aktivasyona ya da baskılanmaya sebep olduğu belirtilmiştir (Stanisic ve ark., 2010). Bu mekanizmalar da hormon bağlı kanserler kadar doğum kusurları, üreme, gelişim, metabolik, immün ve nörodavranışsal bozuklukları kapsayan sağlık sorunlarına yol açmaktadır.

Çalışmalarda düşük doz BPA'nın, gelişmekte olan fare ve sıçan beyninin yapısını, gelişimini ve davranışlarını etkilediği gösterilmiştir (Richter ve ark., 2007). Farelerde doğum sonrası uzun süreli BPA maruziyetinde çift cinsiyet, beyin fonksiyonlarının etkilenmesi ve yetişkinlerde nöronal fenotiplerde değişimler gözlenmiştir (Patisual ve Polston, 2008). Maternal düşük doz BPA ile maruziyet sonrasında doğan erkek fare yavrularında prostat hiperplazisinin arttığı, anogenital uzaklığın oluştuğu ve epididimal ağırlığın azaldığı gösterilmiş olup, prostat hiperplazisi ile ER arasında ilişki bulunmuş ve bunun antiöstrojenlerle bloke edildiği belirtilmiştir (Timms ve ark. 2005; Gupta, 2000).

BPA sinir sistemi üzerinde direkt ve indirekt etkilere sahiptir. Cinsiyet hormonları nöronların işleyişini düzenleyen nörotrofik faktörlerle bağlantılı çalışmaktadırlar. Bu nedenle BPA'nın cinsiyet hormonlarını etkilemesi beyin gelişimini de etkilemektedir. Tiroid hormonları özellikle fetal dönemde ve yenidoğanda beyin gelişimine doğrudan etki ettiğinden BPA'nın tiroid fonksiyonları üzerindeki olumsuz etkileri, sinir sistemi gelişimini de bozmaktadır. BPA'nın oksidatif stres yarattığı ve sinir hücrelerinde apoptoza sebep olduğu düşünülmektedir. (Lin ve ark. 2006). BPA direkt olarak nörodejenerasyona sebep olmaktadır (Carlisle ve ark. 2009).

Tiroid hormonları tiroksin (T3) ve triiodotironin (T4) vücutta beyin gelişimi, büyüme hormonunu uyararak büyümenin kontrol edilmesi, lipid ve karbonhidrat metabolizmalarının düzenlenmesi ve bazal metabolizma hızının ayarlanmasından

sorumludur. BPA gibi çevresel kimyasallar tiroid aktivitesini bozabilirler. Sıçan karaciğer hücreleri üzerinde yapılan çalışmada BPA'nın tiroid reseptörlerine etki ettiği ve T3 stimüle edici cevabı baskıladığını gösterilmiştir (Moriyama ve ark., 2002). Buna bağlı olarak BPA'nın T3'ün yerine reseptörlere bağlanarak gen baskılanmasına neden olabileceğini anlaşılmıştır. BPA bir tiroid hormonu reseptörü antagonistidir (Zoeller ve ark., 2005; Zoeller, 2007) ve gen ekspresyonu üzerindeki tiroid hormonu etkisini önleyebilir (Moriyama ve ark., 2002). BPA'nın serum T4 konsantrasyonunu da arttırdığı ve artışın sebebi BPA'nın T4 ile yarışarak tiroid reseptörlerine bağlanması olarak açıklanmıştır (Zoeller ve ark., 2005).

İmmün sistem vücudun mikroorganizmalara karşı sahip olduğu temel savunma mekanizmasıdır. İmmün sistemin baskılanması savunmanın zayıflamasına ve vücudun enfeksiyonlara açık hale gelmesine sebep olurken immün sistemin aşırı uyarılması da sağlıklı hücrelerin ölümü gibi hasarlara sebep olmaktadır. İmmün sistemdeki regülasyon bozuklukları otoimmün hastalıklara yol açabilir. Günümüzde sahip olunan veriler BPA'nın immün sistemin çalışma düzenini bozabileceğini; buna bağlı olarak savunma mekanizmasının zayıflayabileceğini ya da immün fonksiyonların aşırı stimüle edilebileceğini göstermiştir. BPA'nın immün sisteme etkisinin direkt veya nöroendokrin sisteme etki yoluyla indirekt olabileceği bildirilmiştir. İmmün sistemin kontrolünde tiroid ve endokrin hormonlarının rolü büyüktür. BPA'nın bu hormonlara etkisi immün sistemi de etkilemektedir (Carlisle ve ark., 2009).

Hormonlar adipoz dokunun oluşumunda ve devamlılığında önemli yere sahiptir. Steroid yapıdaki cinsiyet hormonları ve büyüme hormonu anti-adipoz etki gösterirken kortizol ve insülin lipojenik etki gösterir. Yağ hücrelerindeki lipoprotein lipaz salınımını inhibe ederek lipojenezi azaltmak yağ hücrelerinden salınan östrojenin önemli görevlerinden biridir. BPA östrojen reseptörlerine agonist etki gösterir, bu durumda reseptörler aktive olur, ancak östrojen salınamaz. BPA'nın bu mekanizmaya bağlı obeziteyi tetiklediği görülmüştür. 20 obez kadın üzerinde yapılan çalışmada bu kadınların %55'inin adipoz doku örneklerinde oranında BPA'ya rastlanmıştır (Fernandez ve ark., 2007).

6-18 yaş arasındaki erkek çocuklarda yapılan bir çalışmada çocukların idrarlarında saptanan BPA miktarları obezite ile ilişkilendirilmiştir. En düşük BPA seviyesine sahip grup (<1,5 ng/mL) en yüksek BPA seviyesine sahip grupla kıyaslanmış

(>5,4 ng/mL) ve yüksek BPA konsantrasyonu görülen çocuklardaki obezite oranının düşük BPA seviyesine sahip gruptaki çocuklardan 2,55 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Bhandari ve ark., 2013).

BPA'nın beyindeki dopamine sistemi üzerine etkileri konusunda da çalışmalar yapılmıştır. İlk çalışma dopamin reseptörleri, dopamin taşıyıcıları ve G-proteini (guanin nükleotid-bağlayıcı protein) sinyalizasyonunun uyarılmış dopamin aktivasyonu üzerine olmuştur (Suzuki ve ark., 2003). Hücre membranlarında nörotransmitter reseptörlerinin aktivasyonlarını modifiye eden G-proteinine bağlı membran reseptörünün aksine BPA'nın klasik bir östrojen reseptörü gibi davranıp düşük dozda etki yaratmadığı konusunda hipotezler vardır. Sonraki çalışmalarda, dopamine bağlı G-protein aktivasyonu üzerinde BPA'nın etkisi teyit edilmiştir (Mizuo ve ark., 2004; Narita ve ark., 2006, 2007). Gelişimsel olarak maruz bırakılan farelerde (Mizuo ve ark., 2004) ve *in vitro* çalışmalarda (Miyatake ve ark., 2006) gen ekspresyonunda değişiklik olmaksızın D3 reseptörlerinin bağlanmasıdaki değişim bu değişikliği raporlayan çalışma ile desteklenmiştir.

In vitro çalışmalar, BPA'nın DNA adduktları, anöploidi oluşumu ve insanlarda kısırlık, düşük ve ölü doğumlarla ilişkisi olan mutajeniteyi indüklediğini göstermiştir (George ve ark., 2008; Johnson ve Parry, 2008; Takahashi ve ark., 2001). Kemirgen modelleri ve insan prostat hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda BPA'nın karsinogenezi etkileyebileceği, prostat kanser hücresi proliferasyonunu değiştirebileceği ve bazı tümörler için progresyonu uyarıcı olabileceği gösterilmiştir. Yayınlanan raporlar BPA'ya erken maruziyetin prostat bezinde karsinogeneze duyarlılığı arttırabileceğini kanıtlamıştır (Ho ve ark., 2006; Prins ve ark., 2008). Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (IARC), BPA diglisidil eter'i "İnsandaki karsinojenik etkileri yönünden sınıflandırılabilir olmayanlar: Hiçbir gruba girmeyen etkenler " (Grup 3)' grubunda sınıflandırmıştır (IARC, 1989; 1999).

Akut toksisitesi ile ilgili insanlarda kaydadeğer bir maruziyet etkisi belirtilmemesine rağmen, sıçan ve farelerde oral LD₅₀ değeri 2.000 mg/kg'ın üzerinde ve tavşanlarda dermal LD₅₀ değeri de 2.000 mg/kg'ın üzerinde bulunmuştur (EU Risk Assessment, 2003). 6 saatlik 170 mg/m³ BPA tozuna solunum yolu ile maruz kalındığında burun epitel tabakasında geçici ve hafif enflamasyon ve oranazal boruda da ülserasyon görülmüştür (NTP-CERHR Monografi, 2008).

2.3.7. BPA'nın Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkisi

BPA'nın toksisitesinin değerlendirilmesinde belirtildiği gibi birçok çalışma yapılmakta olup, çeşitli sistemler üzerinde toksik etkilerinin değerlendirilmesinde epigenetik mekanizmaların da rolünün olabileceği son yıllarda yapılan araştırmalarda önemle vurgulanmaktadır (Kundakovic ve Champagne, 2011; Rezg ve ark., 2014).

Son araştırmalarda çevresel kimyasal ksenobiyotiklere maruziyet ile epigenetik etkinin tetiklenmesi arasındaki ilişki sıklıkla incelemektedir ve pek çok toksik maddenin epigenetik mekanizmaları modifiye etmede potansiyel bir rolü olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2008). BPA'ya maruziyetin de epigenetik mekanizmalar aracılığıyla gelişimsel yollar ve hücrel süreçleri değiştirdiği bildirilmiştir (Singh ve Li, 2012).

Düşük dozlarda BPA'nın rahim içine ve yenidoğan maruziyeti sonucu bazı genlerin promotör bölge CpG adalarında DNA hipermetilasyonu ve hipometilasyonuna, histon modifikasyonlarına ve miRNA'ları içeren kodlanmayan RNA'ların ifadesinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. Bu epigenetik değişikliklerin gen ifadelerini yaşam boyu değiştirebileceği ve bunun da bir takım sağlık problemlerini beraberinde getirebileceği gösterilmektedir. Erken gelişimsel dönemde BPA maruziyetinin epigenom değişimi aracılığıyla yavru fenotipini değiştirebildiği gösterilmiştir. (Dolinoy ve ark., 2007).

Perinatal ve trans-jenerasyonel BPA maruziyetinin kalıcı etkilerinin gelişimsel, kanser, davranışsal ve üreme fonksiyonlarında rol oynayan genlerin ekspresyonunun epigenetik programlamasında olası bozucu etkisinin olduğu öne sürülmektedir. Çalışmalar BPA maruziyetinin DNA metilasyonu ve spesifik gen veya genlerin ekspresyonunda değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Ortaya çıkan bu BPA-aracılı metilasyon değişikliklerinin BPA'nın östrojenik aktivitesiyle ilişkili olup olmadığı henüz netliğe kavuşmamıştır. Yine de son zamanlarda yapılan çalışmalar BPA'nın sebep olduğu metilasyonun regülasyonunda rol oynayan DNA metiltransferazların DNMT-1 ve DNMT-3a ekspresyonunun BPA-ER α regülasyonu aracılığıyla olabileceğini göstermiştir (Kundakovic ve ark., 2013).

Neonatal BPA maruziyetinin erkek farelerde DNMT-3a ve DNMT-3b ekspresyonu ve erkek farelerin testislerinde ER α ve ER β 'nin promotör bölgelerinde metilasyon arttırdığı gösterilmiştir (Doshi ve ark., 2011). Farklı bağımsız gruplarda

DNMT'lerde ve metil-CpG bağlayıcı protein 2 (MECP2) seviyelerinde BPA'dan kaynaklanan değişiklikler rapor edilmiştir (Doshi ve ark, 2012; Yeo ve ark, 2013).

24 saat BPA maruziyetini takiben yenidoğan sıçan testislerinde östrojen reseptörlerinin promotor bölgelerinde hipermetilasyonda artış tespit edilmiş, spermatogenez ve fertilité üzerine advers etkilere sebep olabileceği bildirilmiştir (Doshi ve ark., 2011). Weng ve ark. (2010) yaptığı bir çalışmada primer epitel meme hücrelerinde düşük doz BPA maruziyetinin lizozom ilişkili membran protein ('lysosomal associated membrane protein', *LAMP3*) geninin CpG adalarında DNA metilasyonunda artışa sebep olduğu ve beraberinde *LAMP3* geninin ifadesini baskıladığı ve bu durumun meme kanseri riskini arttırabildiği gösterilmiştir. Ayrıca BPA'nın dişi farelerdeki epigenetik etkilerinin kuşaklararası sürebileceği belirtilmiştir. Diğer taraftan, gelişmekte olan hipotalamik hücrelerin BPA maruziyetinde doza bağlı olarak (0,02–200 µM) BPA'nın DNA metiltransferazlar, metil CpG bağlayıcı protein 2 ('*methyl-CpG binding protein 2*', *MECP2*) gibi epigenetik düzenleyici faktörlerin gen ekspresyonunu değiştirdiği bildirilmiştir. Bu çalışmadan BPA'nın epigenetik gen regülasyonunun stabilitesini ve esnekliğini bozduğu sonucuna varılmıştır (Warita ve ark., 2013).

Gebe dişi farelerin BPA'ya geçici maruziyetinin 3. kuşak jenerasyonda DNA metilasyonunda değişikliklere sebep olabileceği gösterilmiştir. (Singh ve Li, 2012). Yenidoğan sıçanların BPA'ya maruziyetinin prostat neoplazinin sıklığında artışa ve prostat dokularında metilasyon değişikliklerine (örn: phosphodiesterase type 4 variant 4, *Pde4d4* geninde hipometilasyon ve gen ifadesinde artış) sebep olduğu gösterilmiştir (Conti ve ark., 2003; Ho ve ark., 2006; Prins ve ark., 2008). Ayrıca, yenidoğan sıçanların BPA'ya maruziyetinin nukleozom binding protein-1 (*Nsbp1*) ve hippocalcin-like 1 (*Hpcal1*) genlerinin metilasyonunda ve ifadesinde değişikliklere sebep olduğu bildirilmiştir (Tang ve ark., 2011).

BPA'ya maruz kalmış insan meme kanseri MCF7 hücrelerinin ve *in utero* BPA'ya maruziyet sonucu 6 haftalık farelerin meme bezlerinde histon metiltransferaz Enhancer of Zeste Homolog 2 (*EZH2*) ifadesinde artış olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda bu enzimin katalize ettiği gen ifadesi ile ilişkili olan histon modifikasyonu H3K27 metilasyonunda da BPA'nın artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Bhan ve ark. 2014; Doherty ve ark., 2010).

İnsan meme epitel hücrelerinde 1 hafta süre ile BPA maruziyetinin (10, 100 nM) tümör ile ilişkili genlerde (*BRCA1*, *CCNA1*, *p16*, *THBS1*, *TNFRSF10C* ve

TNFRSF10D) metilasyonu arttırdığı gösterilmiş olup, BPA'nın genetik ve epigenetik değişikliklere sebep olarak meme epitel hücre fonksiyonlarına zarar verdiği ve bunun hücre çoğalması ve yaşlanma ile ilişkili olabileceği ve bunun sonucunda memelerde karsinogeneze sebep olabileceği bildirilmiştir (Qin ve ark. 2012). İnsan meme epitel hücrelerinde yapılan diğer bir çalışmada ise; DNA onarım genlerinin (*BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *CtIP*, *RAD51*, ve *BRCC3*) ifadelerinin arttığı ve apoptoz ile ilişkili *PDCD5* ve *BCL2L11* genlerinin ise ifadelerinin azaldığı gösterilmiştir.

İnsan meme kanseri hücrelerinde ve sıçan meme bezlerinde gen ifadesinde anahtar bir molekül olan kodlanmayan RNA *HOTAIR* ifadesinin BPA ile indüklendiği gösterilmiş olup, aynı zamanda kromatin (histon metilasyonu ve asetilasyonu) modifikasyonuna sebep olarak gen aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Bhan ve ark., 2014). Dhimolea ve ark. (2014) da sıçanlarda gebelikte BPA'ya maruziyetin meme bezlerinde genom düzeyinde epigenetik değişikliklere sebep olduğunu göstermiştir.

Uzun süreli BPA maruziyetinin N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptör seviyelerini ve yetişkin fare hipokampusundeki histon deasetilaz 2 (HDAC2) ekspresyon ve fonksiyonlarını arttırdığı gösterilmiştir (Zhang ve ark, 2014). Prenatal BPA maruziyetli Wistar-Furth sıçanlarına postnatal 4. günde α -laktalbümin promotör bölgesinde histon H3K4 trimetilasyon pro-aktivasyonunda artış olmuş ve meme bezinde α -laktalbüminin mRNA ekspresyonu artmıştır (Dhimolea ve ark, 2014).

2.3.8. BPA ile İlgili Yasal Düzenlemeler

Dünyada BPA'nın halk sağlığı üzerine riskleri konusunda birçok risk değerlendirme otoriteleri rapor yayınlamıştır.

EFSA Gıda ile temas eden Gıda Katkı Maddeleri, Tat vericiler ve Ambalaj Materyelleri Paneli ('Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food', AFC) 2006 yılında yayınladığı raporda çeşitli populasyon grupları için BPA'nın tolere edilebilir günlük alım değerini ('tolerable daily intake', TDI) 50 $\mu\text{g/kg}$ vücut ağırlığı olarak belirlemiştir (EFSA, 2006). EFSA AFC Panelinde bildirilen BPA'nın günlük tüketim maruziyetleri Tablo 2.5'de gösterilmiştir (EFSA, 2006). EFSA AFC Paneli 2008'de ve 2010 yılında EFSA Gıda ile temas eden Maddeler, Enzimler, Tat vericiler ve İşlem Yardımcıları Paneli (Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids, CEF) Paneli'nde de BPA'nın TDI değeri 50 $\mu\text{g/kg}$ vücut ağırlığı olarak bildirilmiştir. EFSA CEF Paneli 2015'de

yayınladığı son raporda ise geçici tolare edilebilir günlük değeri (t-TDI: temporary Tolerable Daily Intake) 4 µg/kg vücut ağırlığı'na düşürmüştür. EFSA bu değişikliği yeni veriler ve risk değerlendirmesi ve özellikle de meme bezi, üreme, metabolik, nörodavranışsal ve immün sistemler hakkındaki veritabanlarındaki belirsizlikler yüzünden gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak, EFSA gıda maddelerinden alınan BPA seviyelerinin günlük maruziyet seviyesinden çok daha düşük olmasından dolayı BPA'nın insan sağlığı üzerinde risk oluşturmadığı sonucuna varmıştır. Ayrıca, bunun hamile bayan ve yaşlılar için de uygun olduğunu bildirmişlerdir (EFSA, 2015).

Tablo 2-2: EFSA AFC Panelinde bildirilen BPA'nın günlük tüketim maruziyetleri (EFSA, 2015).

Tüketici Yaşı	Tüketilen Yiyecek / İçecek	Mikrogram/kg vücut ağırlığı/günlük olarak BPA'nın korunumlu göç değerine bağlı günlük tüketim maruziyeti
3 aylık yenidoğan bebek	Sadece anne sütü	0,2
3 aylık yenidoğan bebek	PC içermeyen şişe veya cam şişede bebek maması	2,3
3 aylık yenidoğan bebek	PC şişede bebek maması	11* (4 [#])
6 aylık yenidoğan bebek	PC şişede bebek maması ve hazır yiyecek/içecek	13* (8,3 [#])
1,5 yaşındaki çocuk	2 kg hazır yiyecek/içecek	5,3
Yetişkin	3 kg hazır yiyecek/içecek	1,5

* 50 mgBPA/litre'de bebek mamasına bağlı en yüksek değer

[#] 10 mgBPA/litre'de bebek mamasına bağlı tipik değer

28 Ocak 2011 tarihli Avrupa Birliği Direktifi'nde (Commission Directive 2011/8/EU) 1 Mart'tan itibaren tüm Avrupa Birliği üye ülkelerinde BPA içeren polikarbonat biberonların üretiminin artık mümkün olmayacağı ve 1 Haziran ve sonrasında ise bu maddeyi içeren biberonların ithal edilmesine de izin verilmeyeceği bildirilmiştir (Avrupa Birliği Komisyonu, 2011). 2008 yılı Nisan ayında Kanada'da ve 2010 yılı Nisan ayında Danimarka'da BPA içeren bebek biberonlarının kullanımı yasaklanmıştır.

7 Şubat 2011 tarihli ve 27839 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan "Emzik, Biberon, Biberon Başlığı, Ağızta Bardağı, Ağızta Bardağı Kapağı ve Benzeri Ürünlerin Üretimi, İthalatı ve Bildirim Esaslarına Dair" Tebliğ'in ekinde bu tip ürünlerin teknik dosyasında bulunması gereken spesifikasyonlar arasında polikarbonat içeren termoplastik biberonlarda BPA miktarı da yer almaktadır. (27839 sayılı Resmi

Gazete, 2011). Daha sonra 31 Ekim 2013 tarihli ve 28807 sayılı Resmi Gazete’de Tebliğ yayınlanmıştır. (28807 sayılı Resmi Gazete, 2013) Böylelikle bu ürünlerin halk sağlığına ve çevreye zarar vermesini engellemek, topluma güvenli şekilde ulaşmasını teminen piyasaya arz edilmeden önce Bakanlığa yapılacak bildirimin usul ve esasları belirlenmiştir.

Türkiye’de 2013/34 Türk Gıda Kodeksi Gıda İle Temas Eden Plastik Madde Ve Malzemeler Tebliğinde TGK-Bebek Formülleri ve TGK-Devam Formülleri Tebliğlerinde bebek olarak tanımlanan tüketici grubu için kullanılan, polikarbonat madde ve malzemelerin üretiminde kullanılamaz kısıtlaması getirilmiştir. Spesifik migrasyon limit değeri 0,6 mg/kg olarak belirlenmiştir.

2.4. Hücre Kültürü

Hücrelerin, dokudan mekanik yollarla ve bunu takiben de proteolitik enzimlerle muamele edilerek tek hücre veya küçük kümeler halinde ayrıştırılmasına ve bunların bir besiyeri ortamında doku ile bağlantısı olmadan *in vitro* olarak çoğaltılmasına hücre kültürü adı verilmektedir (Davis, 1996). Hücre kültürü ilk kez Harrison tarafından kurbağanın sinir hücrelerinin araştırılmasında 1907 yılında kullanılmıştır. 1912 yılında Burrows Carrel tarafından tavuk embriyosu dokusunun eksplantı elde edilmiştir. 1943’te Earle ve ark. fare lenfosit hücre dizisinin geliştirilmesi yapılmıştır. 1948 yılında Keilova tarafından ilk kez hücre kültürü dokularında antibiyotik kullanılmıştır. 1952’de insan serviks karsinomasından ilk devamlı hücre kültürü (HeLa) elde edilmiştir. 1955–1960 yılları arasında, hücre kültürü çalışmalarında çok önemli bir adım atılarak günümüzde kullanılan anlamda temel hücre kültürü vasatları hazırlanmıştır (Freshney, 1986). Son 20 yıldır hücre kültürü, yalnızca spesifik araştırmalar için kullanılan bir araç olmaktan çıkarak, dünyanın en hızlı gelişen endüstri alanlarından biri olan biyoteknolojinin temel taşlarından biri haline gelmiştir.

Hücre kültürü, toksikolojide, kanser araştırmalarında, sitogenetik, biyokimyasal ve moleküler biyoloji çalışmalarında, kök hücre çalışmalarında ve birçok biyolojik çalışmalarda tanı veya araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Aynı zamanda, hücre kültürleri hayvan deneylerinin yerini alması yolunda alternatif uygulamalar olarak da son yıllarda oldukça önem kazanmıştır.

Doku kültürü primer hücre kültürü olup canlı organizmalardan alınan organ veya doku parçalarının *in vitro* ortamda çalışılmasıdır. Hücre kültürü ise tek bir hücre veya

hücrelerin doku ile bağlantısı olmadan çoğatılarak elde edilmesidir. Bu amaçla çeşitli canlıların (insan, maymun, fare, tavşan gibi) çeşitli dokuları (böbrek, akciğer, tümör, amniyon zarları) parçalanarak tek tek hücrelere ayrılırlar.

Hücre kültürü çalışmalarında iki tip hücre kullanılır. Bunlar primer hücreler ve devamlı hücre dizileridir. Primer hücre kültürleri doku ve organlardan ayrılan hücrelerin 24 saatten daha uzun süre kültür edilmesiyle elde edilir. Primer hücre kültürlerinde çoğalan hücreler buradan alınıp başka kültürler ekilebilir ve çoğaltılabilir. Bu şekilde elde edilen ilk alt kültürler sekonder hücre kültürleri denir ve bir seri kültür işlemlerinden sonra devamlı hücre hatları elde edilir. Fakat primer kültürlerin insandan izole edilmesi ve kültürünün yapılması oldukça zordur. Primer kültürler farklı bireylerden alındığı için fonksiyonel durumları yansıtmaları farklıdır. Primer hücre kültürleri, üretim aşamalarının zor olmasına, hassas hücreler olmalarına, çalışma esnasında ortaya çıkabilecek sorunlara ve kontrollerinin son derece güç olmasına rağmen orijinal fizyolojik durumu ifade etmeleri nedeniyle değer kazanmıştır (Browne, 1988; Mjör, 1983; Özdemir, 2007).

Devamlı hücre hatları süresiz çoğalabilme özelliğine sahip transformasyona uğramış primer hücrelerdir ve daha stabil bir fenotipe sahiptir. Devamlı hücre hatları kolaylıkla çoğaltılabilir. Transformasyonları nedeniyle fizyolojik özelliklerini koruyamamaktadırlar. Tümör dokusundan alınan hücrelerden de elde edilirler. Üç gün ara ile en az 70 defa pasajı yapılan hücre dizileri ‘devamlı hücre dizisi’ olarak kabul edilmektedirler. Hücre dizilerinin primer kültürlerden farkları; kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri, büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim göstermeleri ve sonsuz çoğalma yetenekleri olarak sıralanabilir.

Hücre kültürü üretmek için kullanılan ortamlarda hücresel metabolizma faaliyetlerinin devamı ve hücrelerin çoğalması amacıyla gerekli maddeler ortama ilave edilir. Hücre üretme ortamları, hücrenin organlardan ayrılmasından sonra doku tabakası oluşana kadar hücrelerin üretilmesi için kullanılmakta ve genel olarak serumla birlikte hücrelerin çabuk üremelerini sağlayan diğer maddeleri içermektedir. Ortam içerisinde; glikoz, plazma ve serum, esansiyel aminoasitler, vitamin, mineraller, şeker, tuz ve antibiyotikler yer almaktadır (Freshney, 1986; Davis, 1996).

Günümüzde, hücre kültürleri tek tabaka ve süspansiyon halinde hücre kültürleri olmak üzere iki yolla üretilmektedir. Tek tabaka hücre kültürleri; cam veya plastik

zemin üzerine tutunarak yaşayan, işlevlerini sürdüren ve üreyen hücrelerdir. Hücre kültür malzemesinin yüzeyi, hücrelerin tutunma ve çoğalmalarını kolaylaştırmak amacıyla çeşitli makromoleküller ile kaplanabilir. Bunlar, hücrelerin yüzeylerinde eksprese olan integrin proteinleri ile etkileşerek dokuda var olan hücrelerarası matrikse benzer etki gösterirler. Süspansiyon halindeki hücre kültürlerinde ise; hücreler yaşamsal işlev ve üremelerini süspansiyon halinde bulundukları ortamda sürdürebilir. Kan, dalak, kemik iliği kültürleri ve olgunlaşmamış hücreler bu şekilde kültüre edilir. Bugün için artık tek tabakalı ve süspansiyon hücre kültürlerini ele alarak klinik faydalarını en üst düzeye çıkarmak üzere orijinal doku mikro çevre özelliklerini yansıtan üç boyutlu kültür metodları da geliştirilmiştir. Bunların en önemli avantajları arasında orijinal doku özelliklerini yansıtmaları sayılabilir (Bilir, 2004).

2.4.1. Hücre Kültürlerinin Avantajları

Hücre kültürü ortamında fizikokimyasal çevre ve buna bağlı olarak fizyolojik koşullar daha iyi kontrol edilebilmektedir. Sıcaklık, pH, osmotik basınç, oksijen ve karbondioksit kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar hücre kültüründe daha kolay sağlanırken, canlı vücutunda sabit bir çevre oluşturarak bir takım testleri yapmak daha zordur. Aynı zamanda hücre kültürleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanınmaları, tekrarlanabilme özellikleri, çalışma koşullarının standardize edilebilmesi gibi nedenlerden dolayı da tercih edilmektedir. (Schmalz, 1994; Schmalz, 1997; Browne, 1988). Buna karşın, hücre kültürü testleri ile sadece materyallerin ilk toksisite reaksiyonları konusunda bilgi edinilebilmekte, materyalin uzun süreli doku temasında oluşturacağı sitotoksosite düzeyi konusunda ise veri elde edilememektedir.

Hücre kültürlerinde örnek homojenitesinin kontrolü sağlanabilmektedir. Hücre kültürü teknikleri ile deney hayvanı kullanımının da sayısı azalarak alternatif yöntemler geliştirilmektedir.

2.4.2. Hücre Kültürlerinin Dezavantajları

Primer kültür ile başladığında, birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşmakta ve her zaman bir miktar ölüm gerçekleşmektedir. Yani hücre kültürlerinde zamana bağlı bir kararsızlık söz konusu olabilir. Hücre kültürlerinde hijyen çok önemli olduğundan primer kültürlerin elde edildiği doku ve bunların

bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkilemektedir. Hücre kültürü kontaminasyona hassasiyeti çok yüksektir.

2.5. Sitotoksosite Testleri

Sitotoksosite moleküler olaylar sonucu çeşitli makromolekülerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak bir diğer deyişle, hücrenin aktivitenin geri dönüşümsüz olarak durdurulması ve hücrenin yapısının onarılamaz bozukluğu olarak tanımlanabilir. Sitotoksosite testleri, test maddesinin uygun hücre kültürlerindeki hücre büyüme oranı ve morfolojik özellikleri üzerine etkisinin negatif ve pozitif kontrol grupları kullanılarak değerlendirilmesi amacıyla yapılmaktadır (ISO 7405, ISO 10993).

Sitotoksosite testleri ile genellikle maddelerin; hücre sayısı veya büyümesi, hücre membran bütünlüğü, biyosentez veya enzim aktivitesi ve hücre genetik materyali üzerindeki etkileri ölçülür.

Bir materyalin sitotoksik etkisinin belirlenmesinde kullanılan testler; tekrarlanabilir olmalı, test edilen konsantrasyonları için doz-cevap eğrisini vermeli, hücre sayısı ve test cevabı arasında doğrusal ilişki olmalı ve test sonucunda elde edilen verilerin in vivo koşullara yorumlanabilmelidir (Schmalz 1997).

In vitro sitotoksosite testlerinin avantajları:

- Diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasındaki spesifik bir fonksiyon değerlendirilir.
- Çok sayıda örnek kısa zamanda ve ekonomik olarak incelenebilir.
- Kantitatif sonuçlara ulaşılabilir.
- Test yöntemleri standardize edilebilir.

In vitro sitotoksosite testlerinin dezavantajları:

- Her test için bir tür hücre kullanılması,
- Kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması,
- Kültür ortamında doku koruyucu mekanizmalarının olmamasıdır (Schmalz 1997).

Sitotoksosite çalışmaları için genellikle hücre metabolizmasında oluşan değişikliklerin tespit edildiği testler kullanılır. Metabolizma testlerinde 96-kuyucuklu

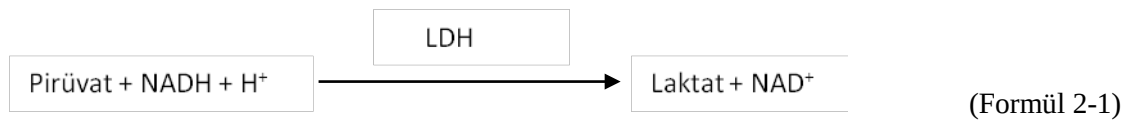
mikroplakalara yerleştirilmiş hücrelerin canlılıkları mikropkaka okuyuculu spektrofotometre yardımıyla tespit edilir. Bu yöntemler çok sayıda örneğin incelenmesine olanak veren, hızlı, besiyeri ortamı ve kullanılan plastik malzeme miktarını azalttığı için ucuz olan ve genellikle tayinleri kolorimetrik olarak yapılan yöntemlerdir.

In vitro hücre topluluğunda, %50 oranında hücre ölümüne neden olan konsantrasyon %50 inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) olarak ifade edilir ve sitotoksitenin gösterilme biçimidir.

2.5.1. Laktat Dehidrojenaz Tayini (LDH Testi)

Kolorimetrik sitotoksite değerlendirme yöntemi olan laktat dehidrojenaz (LDH) test yönteminde hücrede membran hasarı veya sitoliz durumunda açığa çıkan sitozolik bir enzim olan LDH ölçümü yapılarak sitotoksitenin belirlenir.

LDH, tüm hücrelerde var olan stabil bir sitoplazmik enzimdir ve hücre lizisi veya membran hasarı oluştuğunda hızlıca hücre kültürü süpernatantına salınır. Bir test materyeli ile inkübasyon sonrası, plazma membranındaki değişimleri belirleyen hızlı ve basit bir testtir. LDH, nikotinamid adenine dinükleotidin (NADH) NAD^{+} 'ye oksidasyonu ile piruvatı laktata indirger (Formül 2-1). NADH tüketimi spektrofotometrede 340 nm'deki düşüş ile ölçülür. LDH testi ile maddenin IC_{50} , membran bütünlüğü ve hücre canlılığı üzerine etkisi hakkında bilgi edinmek mümkündür.



2.5.2. MTT Testi

Kolorimetrik 3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi sitotoksitenin değerlendirmelerinde çok sık kullanılır. Bu testin esası, MTT'yi mavi, çözünmeyen formazan bileşiğine dönüştürebilen dehidrojenaz enzim aktivitesini ölçmektedir. Test, canlı hücrelerde MTT bileşiğinin tetrazolyum halkasının mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır. Uygulanan materyalin sitotoksik etkisi nedeniyle hücrede dehidrojenaz aktivitesinin etkilendiği durumlarda mavi renkli formazan oluşmamakta, formazan

oluşumu yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Canlı hücrelerde soluk sarı renkli MTT tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüşür (Kawahara ve ark. 1968). Canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluştururken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluşturmaz. Oluşan mavi-mor renkli kristaller isopropil alkol veya dimetilsülfoksit ile çözündürülerek oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm’de ölçülür. Böylece, hücre canlılığındaki değişim formazan miktarında da değişime neden olur ve spektrofotometrik olarak elde edilen değer, %100 canlılığı gösteren değer ile kıyaslanarak test maddesinin sitoksisitesi belirlenir (Alley ve ark., 1988; Fotakis ve Timbrell, 2006; Mosmann, 1983; Van Meerloo ve ark., 2011).

2.5.3. XTT Testi

Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan 2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5- sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT), MTT testinde olduğu gibi metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat tetrazolyum redüktaz enzim sistemi aracılığıyla suda çözünebilen turuncu renkli bir formazan boyaya dönüşür ve elde edilen sonuçlar 450-490 nm’de spektrofotometrede ölçülür. MTT testindeki gibi çözündürme aşamasını içermeyen bu test günümüzde hücre çoğalması ve canlılığının belirlenmesinde ve sitotoksosite analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Smith ve Williams 2001, Wataha 2001). XTT testi ile maddenin IC₅₀, metabolik toksisite ve solunum zinciri üzerine etkisi hakkında bilgi edinmek mümkündür.

2.5.4. Nötral kırmızı alım (NRU) testi

Nötral kırmızı vital bir boyadır. Canlı hücrelerin içerisinde birikir ve bu sayede yaşayan hücrelerin tespitinde kullanılır. Canlı hücreler lizozomlarında nötral kırmızı boyasını tutma kapasitesine sahiptirler. Böylece, hücre canlılığı nötral kırmızı boyasını tutma kapasitelerinin inhibisyonu ile ölçülür. Nötral kırmızı zayıf katyonik bir boya olduğundan kolaylıkla hücre membranına penetre olur ve lizozomlarda intraselüler olarak birikir (lizozomal pH < sitoplazmik pH) ve oradaki anyonik bölgelerle lizozomal matrikse bağlanır. Hücre yüzeyinde ya da duyarlı lizozomal membrandaki değişiklikler nötral kırmızı boyasının alınmasını ve bağlanmasını azaltır. Böylelikle canlı hücreler boyayı tutarken, zarar görmüş ya da ölü hücreleri tutmazlar. Boyanın nüfuz ettiği

hücrelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 540 nm’de ölçülür (Fotakis ve Timbrell, 2006; Repetto ve ark., 2008).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü ve Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Sodyum klorür	J. T. Baker 0278
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Biomatik A3338
Sığır serum albumini	Applichem A7906
Tris hidroklorür	Applichem A3452
5-mC DNA ELISA Kit	Zymo Research D5326
Absolut alkol	Sigma-Aldrich 32221
Bisfenol A (%99)	Sigma-Aldrich 239658
cDNA sentez kiti	Roche Life Science 05091284001
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Biomatik A2424
DNA izolasyon kiti	Roche Life Science 11796828001
Dubelco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri (DMEM) (4,5 g glukoz içeren)	Wisent-Multicell 319020CL
Etilendiamin tetra asetik asid (EDTA)	Sigma E5134
Fetal sığır serumu (FBS)	Wisent-Multicell 080110
Fosfat tamponu (PBS-CMF) (kalsiyum ve magnezyumsuz) (10X)	Wisent-Multicell 311012CL
Gen ekspresyonu probu (<i>Actb</i>) 'RealTime ready custom single assays'	Roche Life Science 05532957001 Assay ID: 500152
Gen ekspresyonu probu (<i>Rassf1</i>) 'RealTime ready custom single assays'	Roche Life Science 05532957001 Assay ID: 505886
Gen ekspresyonu probu (<i>c-myc</i>) 'RealTime ready custom single assays'	Roche Life Science 05532957001

Glasiyel asetik asit	Assay ID: 502650
Nötral kırmızı	Riedel-de Haen 27225
Penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL)	Sigma-Aldrich N7005
çözeltisi	Wisent-Multicell 450201EL
Proteaz inhibitor kokteyli	Sigma P2714-1BTL
RNA izolasyon kiti	Roche Life Science
	11828665001
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich L5750
Tripan mavisi	Fluka 93595
Tripsin (1:250)	Biomatic A4027
Klorofom:izoamil alkol çözeltisi (24:1)	Sigma C0549
Hot-start PCR master karışımı	NEB M04842
Etidyum bromür	Sigma E8751
DNA göstergesi (50 bç)	Fermentas SM0371
DNA göstergesi (100 bç)	Fermentas SM0321
Çinko klorür	Merck 7815
Bisulfit modifikasyon kiti	Zymo Research D5005
CpG Metiltransferaz (M.SssI)	NEB M0226S
	Zymo Research E2011
Amonyum asetat	Riedel 25006
Amonyum bikarbonat	Sigma-Aldrich A6141
Amonyum persülfat	Sigma-Aldrich 248614
Tetra etil metilen diamin (TEMED)	AppliChem A1148
Poliakrilamid/bis-akrilamid çözeltisi (29:1)	Sigma A2792
Agaroz	Sigma A5093

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler	Eppendorf
(0,1-2,5µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	

Ayarlanabilir 8 kanallı pipetler (1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (30-300 µL)	Eppendorf
Blok ısıtıcı	Stuart SBH130D
Buzdolabı (+4°C)	Arçelik 5231 NFY
CO ₂ 'li inkübatör	Thermo-Scientific Heracell 150i
Çalkalamalı blok ısıtıcı	Biosan TS-100C
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik 2041 D
Derin dondurucu (-80 °C)	Daihan-Scientific Wisecry
Elektronik hassas terazi	Precisa XB 220 A
Etüv	Nüve
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus CKX4
Hassas terazi	Mettler H20
Laminar kabin ('Biosafety Level 2')	Tezsan
Mikroplaka okuyucu spektrofotometre	Epoch Biotek
Mikrodalga fırın	Beko MD 1510 S
Mikrosantrifüj aleti	Hettich Micro 120
Mini orbital çalkalayıcı	Stuart SSMI
Dikey Elektroforez Jel Tankı	Life Technologies Invitrogen Mini Gel Tank A25977
Otomatik pipetör	Eppendorf
Otomatik Hücre Sayımı Cihazı	Luna Automated Cell Counter (Logos model: L10001)
Otoklav	Hirayama HV-50L
pH metre	Hanna HI 1131 B
Bidistile su cihazı	Millipore Gradient
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich Micro 200R
Görüntüleme cihazı	Kodak Gel Logic System 1500
Görüntüleme cihazı yazılım programı	Carestream

Su banyosu	Memmert WB14
Blok Isıtıcı	Techne Dri-Block DB-2D
Elektroforez güç kaynağı	EC 300 XL2-Thermo-Scientific
Spin santrifüj	Labnet C1301B
Termal döngü cihazı-Altın blok	Applied Biosystems 9700
Termal döngü cihazı-Gradient	Axygen Therm-1000
Vorteks	NC 28405-Ika
Eş zamanlı-termal döngü cihazı (‘Real-time PCR, RT-PCR)	Roche Life Science Lightcycler 480-II
Jel görüntüleme sistemi	QuantumST4-Vilber Lourmat
Mikrodalga fırın	MD 1510 S-Beko
UV transilluminator	Bencthop 3UV-UVP
Yatay elektroforez sistemi	Owl P81-Thermo-Scientific

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

DNA saklama kutusu	Greiner bio-one
Enjektör (10 mL; 50mL)	Set inject
Enjektör ucu steril filtre (0,22 µm naylon)	Minisart-Sartorius
Falkon tüp (15 mL; 50 mL)	Citotest
Falkon tüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Filtre kağıdı (110 mm)	Schleicher&Schvell
Hücre kültürü flaskı (25 cm ² ; 75 cm ²)	Nest
İnce duvarlı PCR tüpü (0,2 mL)	Greiner bio-one
Kryo vial (2 mL)	Greiner bio-one
Lateks eldiven	Broche
Mikroplaka (6; 24; 96 kuyucuklu)	Nest
Mikrotüp (0,5 mL; 1,5 mL)	Greiner bio-one

Mikrotüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Nitril eldiven	Broche
Otoklav bandı	Sussex
Otoklavlanabilir schott şişe (250 mL; 500 mL; 1 L)	Isolab
Pastör pipeti (2 mL)	Greiner bio-one
Pipet ucu (0,1-10 µl; 30-300 µl)	Eppendorf
Pipet ucu (0,5-10 µl; 2-20 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl)	Nest
Serolojik pipet (10 mL; 50 mL)	Greiner bio-one

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürleri non-genotoksik karsinojenlerin etki mekanizmalarının araştırılması amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır. Tez çalışmasında sıçan böbrek epitel hücrelerinin (NRK-52E) kullanılması planlandı. Bu amaçla ticari olarak satılan hücreler kullanılarak deneysel çalışmalar yapıldı.

3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği

Deneyler İ. Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Cam malzemeler musluk altında 7-8 defa bol su ile çalkalandılar ve sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içeren distile su dolu kovada 1 gece bekletildiler. Ertesi gün tekrar musluk altında 7-8 defa yıkanarak çamaşır suyunun malzemelerden tamamen uzaklaştırılması sağlandı ve 1 gece distile su içeren kovada bekletildi. 40°C'lik etüvde kurutulan cam malzemeler, 165°C'de 2 saat süre ile kuru-sıcak hava sterilizasyonuna tabi tutuldular. Isıya dayanıklı pipet uçları, mikrotüpler, schott şişelerin kapakları gibi plastik malzemelerin ve hazırlanan çözeltilerin sterilizasyonu otoklavda 121°C'de 3 atm basınçta 15 dk.da gerçekleştirildi. Besiyeri ve serum gibi ısıya dayanıksız çözeltiler ise 0,22 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek steril edildi.

Hücre kültürü laboratuvarı çalışma alanları ve laminar kabinin içi %70'lik alkol ile düzenli olarak temizlendi. Çalışma öncesi ve sonrasında belli süreler ile hücre kültürü laboratuvarı ve laminar kabinin UV lambaları açılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı. Hücre kültürü laboratuvarında çalışırken tek kullanımlık galoş ve eldiven

kullanıldı, laboratuvar önlüklerinin ise başka çalışmalarda kullanılmamasına özen gösterildi.

3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini

Normal sıçan böbrek epitel hücreleri (NRK-52E) Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC) bankasından satın alındı. Hücre dizileri kriyovialler içerisinde -196°C de sıvı azot tankı içerisinde saklandı.

3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

Trypsin/EDTA çözeltisi (%0,2 / %0,04): 0,2 g tripsin ve 0,04 g EDTA tartılarak 100 mL bidistile suda çözündürüldü. Otoklavda 120°C’de 15 dk. steril edildi. Porsiyonlanarak -20°C’de saklandı.

Fetal sığır serumu (FBS): Hazır inaktive edilmiş FBS kullanıldı. Ancak, FBS inaktive edilmemiş ise; 56°C’de 30 dk. inkübe edilerek inaktive edildi ve daha sonra kullanıldı. FBS, besiyerine eklenmeden önce 0,2 µm steril filtreden geçirilerek steril edildi. -20 °C’de saklandı ve 37 °C’de çözündürülerek kullanıldı.

Antibiyotik çözeltisi [penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) %1]: 1 mL penisilin (100U) / streptomisin (100 µg/mL) ana stok çözeltisinden alınır, 100 mL’ye CMF-PBS ile tamamlanır.

Hücre dondurma çözeltisi: 10 mL DMSO, 10 mL FBS ve 1 mL %1’lik antibiyotik çözeltisi hücreler için uygun besiyeri ile 100 mL’ye tamamlanarak hazırlandı.

Böbrek epitel hücreleri için besiyeri: DMEM (4,5 g glukoz içeren) besiyerine 10 mL inaktive edilmiş FBS (%10), 1 mL %1’lik antibiyotik çözeltisi eklenerek 100 mL’ye tamamlanarak hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce besiyeri 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 15 dk. inkübe edilerek pH ve sıcaklık ayarlaması yapıldı. Taze olarak hazırlandı.

3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması

Sıvı azot tankından çıkarılan donmuş haldeki hücreler 37°C’lik su banyosunda 1-2 dk. çözülene kadar bekletildi. Vial kapağının su ile temas etmemesi için dikkat edildi. Vial %70’lik alkol ile silindi ve laminar kabin içine alındı. Hücreler, %10 FBS içeren besiyeri bulunan 15 mL’lik falkon tüpe aktarıldı, besiyerinde süspande edildi ve

1500 rpm’de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelleti besiyerinde tekrar süspande edildi ve DMSO’nun toksik etkisinden kurtulmak amacıyla işlem tekrar edildi. Daha sonra, hücre pelletine 1 mL besiyeri eklendi, yavaşça pipetleme yapılarak hücreler süspanse edildi ve 7-10 mL besiyeri içeren 25cm²’lik ya da 75 cm²’lik flasklara ekildi. Flasklar 37 °C’de % 5 CO₂’li inkübatörde inkübasyona bırakıldılar (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Hücre kültürü ortamlarının flasklardaki görünüşü

3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)

Hücre kültür flasklarının tüm yüzeyini kaplamış halde bulunan yoğunlaşmış hücreler için ‘konfluent durumda’ ifadesi kullanılır. Hücreler konfluent duruma geldiğinde pasajlandılar. Pasajlama için flask inkübatörden alındı, laminar kabinde flask içerisindeki besiyeri döküldü. Hücrelerin yüzeyi 2 mL kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi (CMF-PBS) ile yıkandı. Bu adım, tripsin aktivitesini azaltacak serum protein kalıntıları uzaklaştırmak amaçlı yapılır. Yıkama işleminden sonra PBS döküldü ve 2 mL tripsin/EDTA çözeltisi ilave edildi, flask 37°C’de %5CO₂’li inkübatörde 5-10 dk. bekletildi. Tripsin ile hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması sağlanır. Hücrelerin tripsin içinde gereğinden fazla beklememesi için mikroskop ile yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmelidir. Tripsin aktivasyonunu durdurmak amacıyla flaska 2-3 mL besiyeri eklendi, pipetleme yapıldı ve hücreler 15 mL’lik falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm’de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pellet 2 mL besiyeri ile süspande edildi. Hücreler hemasitometrede sayılarak, yaklaşık 10⁵ hücre/mL olacak şekilde içerisinde besiyeri bulunan flasklara ekildi. Flasklar, %90 bağıl nem, 37°C’de %5CO₂’li inkübatörde inkübe edildiler. Hücre dizisinin devamlılığının sağlanması için pasajlama işlemi ortalama haftada 2 kez tekrarlandı.

3.4.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücre kültüründe meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklar ile dondurularak saklandılar. Elde edilen hücre pelletinin üzerine 800 µL FBS, 200 µL 55°C'ye ısıtılmış gliserin eklendi. Pastör pipeti ile pipetleme yapılarak karıştırıldı. Yaklaşık 10^7 hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stokları soğuğa dayanıklı kriyoviallere aktarıldı, sırasıyla -20°C'de 30 dk., -80°C'de 16-24 saat bekletildikten sonra sıvı azot tankına kaldırılarak saklandı.

3.4.7. Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin sayımı tripan mavisi testi ile yapıldı. Test, canlı hücrelerin tripan mavisi boyasını hücre içine almazken, ölü hücrelerin bozulmuş hücre membranlarından boyayı hücre içerisine alabilmeleri esasına dayanır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde; canlı hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenirken, ölü hücreler tamamıyla mavi renge boyanmış halde gözlenirler.

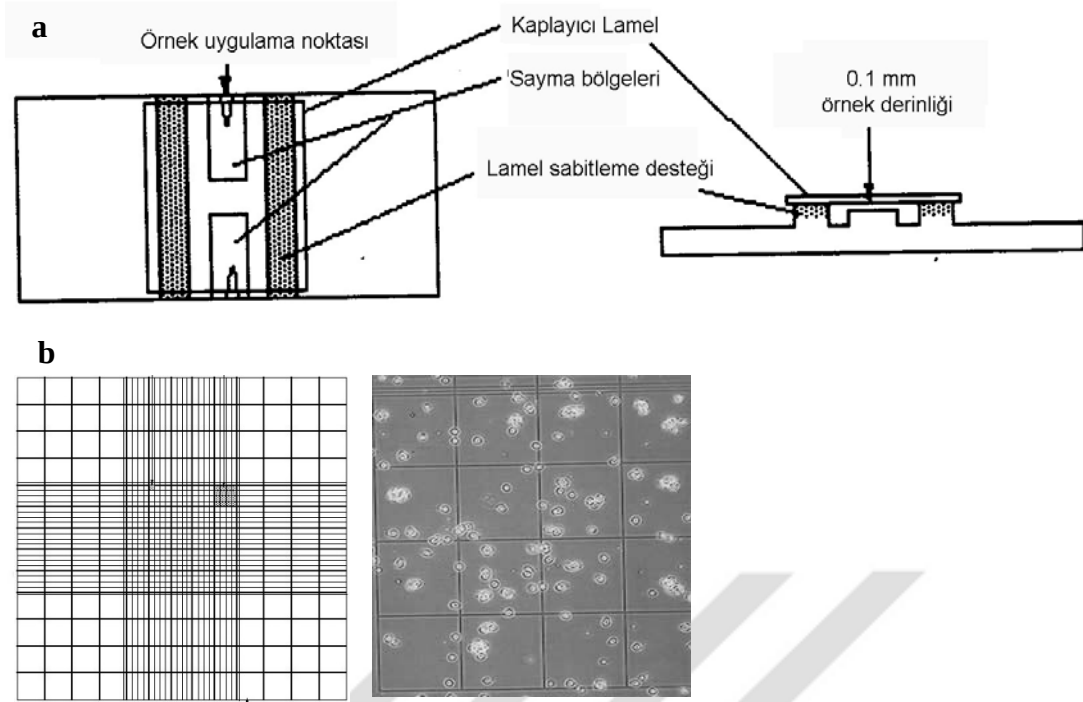
Hücre sayımı otomatik hücre sayım cihazı ile gerçekleştirildi (Şekil 3-2). Ayrıca, kontrol etme amacıyla hücre sayımı thoma lamı (hemositometre) adı verilen 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4x16 küçük kareden oluşan özel sayım lamı kullanılarak da ışık mikroskobunda gerçekleştirildi (Şekil 3-3). Hücre süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı (Formül 3-1):

$$\text{Toplam hücre sayısı/mL} = \text{Sayım sonucu} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10^4 \times \text{Besiyeri miktarı (mL)}$$

(Formül 3-1)



Şekil 3-2: Luna Otomatik Hücre Sayımı cihazı slaytı.



Şekil 3-3: a) Hemasitometre lamı. b) Hemasitometre lamında hücrelerin mikroskop altındaki görüntüleri.

3.5. Sitotoksiste Testleri

BPA'ya maruz bırakılan hücrelerin canlılığının tespiti MTT ve NRU testi uygulanarak gerçekleştirildi.

3.5.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

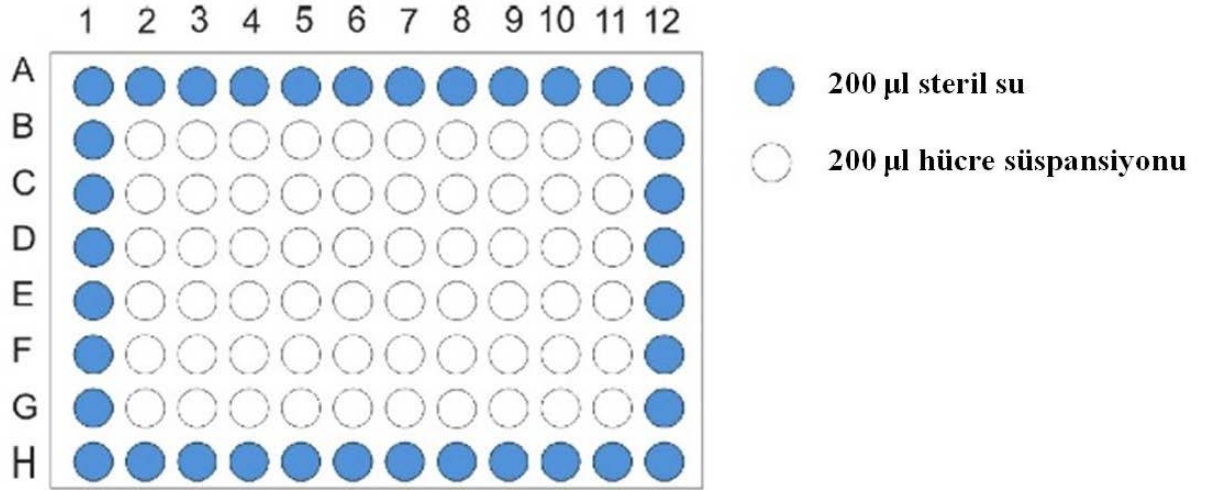
Hücre kültürlerinin mikroplakalara uygulanması esnasında kuyucuklarda düzensiz hücre yoğunluğu gerçekleşebilir. Hücre süspansiyonunun homojen olduğundan emin olunmalı ve hücre topaklarının oluşumu engellenmelidir. Aynı zamanda, testin uygun hassasiyette olması için test esnasında hücrelerin yakın bitişiklikte olması gerekir. Hücrelerin kuyucuklar arasında düzenli ve eşit dağılıp dağılmadıkları ve sağlıklı olup olmadıkları mikroskopta incelenmelidir. Hücre kültürleri aşağıda belirtildiği şekilde 96 kuyucuklu mikroplakalarda hazırlandı:

1. Bir rezervuar içerisine steril bidistile su konuldu ve inkübasyon sırasında kültür besiyerinin buharlaşmasını azaltmak amacıyla 96 kuyucuklu mikroplakanın A ve H sıraları ile 1. ve 12. sütunlarındaki her bir kuyucuğuna 100 μ L su dağıtıldı (Şekil 3-4).

2. Her bir kuyucukta 10^4 hücre 100 μ L besiyeri içinde olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplakalara hücreler dağıtıldı: $6,5 \times 10^5$ hücre 6,5 mL besiyerinde

süspande edildi ve steril rezervuar içerisine hücre süspansiyonu konuldu. 96 kuyucuklu mikrolakalara Şekil 3.4’de gösterildiği şekilde 100 µL hücre süspansiyonu dağıtıldı.

3. 96 kuyucuklu mikrolakadaki hücre süspansiyonu 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi.



Şekil 3-4: 96 kuyucuklu mikrolakaya hücre ekimi.

3.5.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Sitotoksikite testleri için BPA stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mM konsantrasyonda olacak şekilde cam vial içinde 22,829 mg BPA 1 mL DMSO’da çözülerek stok çözelti hazırlandı.

%10’luk DMSO çözeltisinin hazırlanışı: 10 mL DMSO besiyeri ile 100 mL’ye tamamlandı. Maruziyet plakalarına uygulama sırasında 1/10 oranında seyreltilerek maruziyet sırasında konsantrasyonunun %1 olması sağlandı.

%1’lik SDS ana stok çözeltisinin hazırlanışı: 0,1 g SDS, PBS ile 10 mL’ye tamamlandı.

%0,1’lik SDS çalışma çözeltisinin hazırlanışı: %1’lik SDS ana stok çözeltisinden 1 mL alınıp besiyeri ile 10 mL’ye tamamlandı. Maruziyet plakalarına uygulama sırasında 1/10 oranında seyreltilerek hücrelere 0,1 mg/mL konsantrasyonunda SDS (~IC₅₀) pozitif kontrol olarak uygulandı (ISO-10993-5) ve çözelti içindeki PBS konsantrasyonunun da %1 olması sağlandı.

BPA'nın çözündürüldüğü DMSO'nun hücrelere maruziyet sırasında konsantrasyonunun %1'i geçmemesi gerektiğinden dolayı BPA 100 katı konsantrasyonda stok çözeltisi halinde DMSO içerisinde hazırlandı. Daha sonra BPA çözeltisinin farklı konsantrasyonları besiyerinde seyreltilerek aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı:

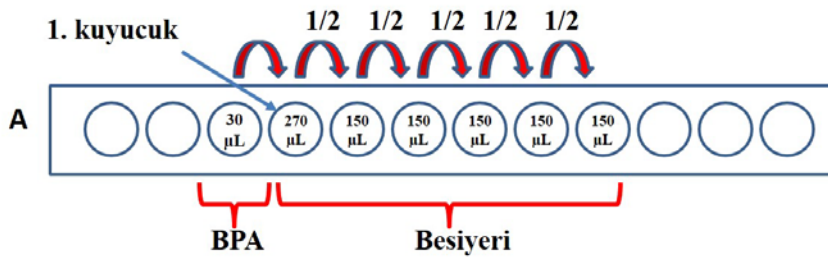
BPA çözeltisinin seyreltilmesi

Stok BPA çözeltisi 96 kuyucuklu mikrolakada 1/10 oranında besiyeri ile seyreltildi. Daha sonra hazırlanan bu çözeltiden 1/2 oranında seyreltme yapılarak toplam 6 konsantrasyonda BPA standard çözeltileri hazırlandı. Seyreltme işlemi için uygulanan plaka düzeni Şekil 3-5'de gösterildi:

1. A sırasındaki 1. kuyucuğa 270 μ L besiyeri 2.-6. kuyucuklara 150 μ L besiyeri konuldu.

2. A sırasındaki 1. kuyucuğa BPA'nın DMSO içinde hazırlanan çözeltisinden 30 μ L konuldu ve iyice karıştırıldı.

3. 1. kuyucuktan 150 μ L alınarak 2. kuyucuğa aktarıldı (1/2 oranında seyreltme), iyice karıştırıldı ve bu kuyucuktan 150 μ L alınarak 3. kuyucuğa aktarıldı. Bu işlem 5. kuyucuk da dahil olmak üzere yapıldı. En son 6. kuyucuktaki fazla olan 150 μ L atıldı. Bu şekilde toplam 6 konsantrasyonda olmak üzere BPA seyreltmeleri hazırlanmış oldu.



Şekil 3-5: BPA'nın 1/2 oranında seyreltilmesi.

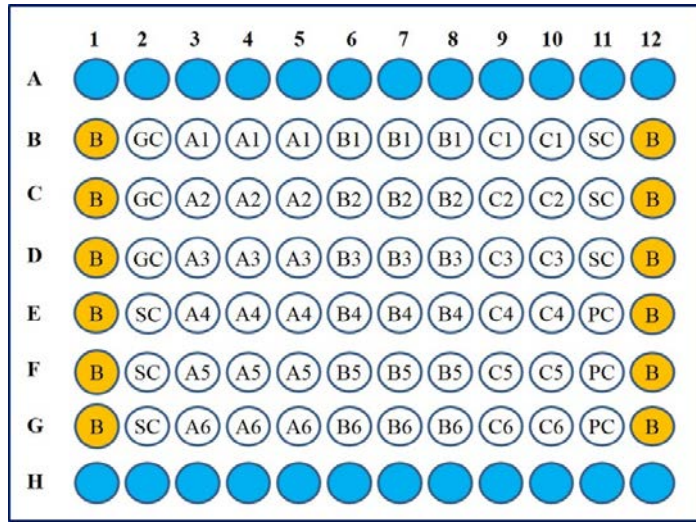
3.5.3. Hücre Kültürünün BPA'ya Maruz Bırakılması

1. Bölüm 3.5.1'de belirtilen 24 saatlik inkübasyonun sonunda hücre kültür mikrolakasındaki kuyucuklardan (A ve H sırası hariç) 8 kanallı pipet kullanılarak kültür besiyeri uzaklaştırıldı.

2. Bu kuyucuklara 50 μ L PBS ilave edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi (kuyucuk yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin kazınmamasına, zarar görmemesine dikkat edilmelidir).

3. Vakit kaybetmeden her bir kuyucuğa 90 μ L taze hücre kültürü besiyeri eklendi (hücre katmanının kurumasından dolayı oluşabilecek hücre ölümü veya stresini engellemek için hızlı yapılmalıdır).

4. Maruziyet mikrolakası Şekil 3.6'te gösterildiği şekilde düzenlendi:



A + H sıraları: Steril bidistile su
 B: Kültür besiyeri + hücre yok (blank, negatif kontrol)
 GC: Kültür besiyeri + hücre (hücre büyüme kontrolü)
 SC: Kültür besiyeri + hücre + DMSO (%1) (çözücü kontrolü)
 PC: Kültür besiyeri + hücre + SDS (0,1 mg/mL) (pozitif kontrol)
 A1, A2, ..., A6: Kültür besiyeri + hücre + BPA'nın 6 farklı konsantrasyonu

Şekil 3-6: 96 kuyucuklu maruziyet mikrolakası düzeni.

5. 1 ve 12. Sütunların B-G kuyucuklarına 10 μ L %10'lık DMSO içeren besiyeri konuldu (blank, negatif kontrol).

6. B2, C2 ve D2 kuyucuklarına 10 μ L hücre kültürü besiyeri konuldu (hücre büyümesi kontrolü, GC).

7. E2, F2, G2, B11, C11 ve D11 kuyucuklarına 10 μ L %10'luk DMSO çözeltisi konuldu (çözücü kontrolü, SC).

8. E11, F11 ve G11 kuyucuklarına 10 μ L %0,1'lik SDS çözeltisi konuldu (pozitif kontrol, PC).

9. A1-A6 şeklinde işaretlenmiş kuyucuklara Bölüm 3.5.2'da belirtildiği üzere seyreltmeleri yapılmış BPA çözeltilerinden 10'ar μ L tatbik edildi (6 konsantrasyon, her konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı). Her test 1 mikrolakada 24 saatlik maruziyet için

hazırlandı. Aynı düzende 2. farklı bir günde çalışılmak üzere toplam her konsantrasyon için 6 tekrar yapıldı.

10. 96 kuyucuklu mikrolapla 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

MTT testi ve nötral kırmızı testleri için yukarda belirtildiği şekilde ayrı maruziyet plakaları oluşturuldu.

NRK-52E hücreleri için yukarıda belirtilen koşullarda çalışıldı.

3.5.4. MTT Testi

3.5.4.1. MTT Testinin Esası

MTT bileşiğinin tetrazolyum halkasının hücredeki (canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış) mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır (Mosmann, 1983; Alley ve ark., 1988). Canlı hücrede soluk sarı renkli MTT, enzim ile tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu koyu mavi-mor renkli çözünmeyen formazan ürününe dönüşür. Böylece canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmaz. Hücreler organik çözücü (örn. isopropanol, DMSO) ile çözündürüldükten sonra, oluşan formazan çözeltisine ait rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm’de (670 nm referans dalga boyuna karşı) ölçülür. MTT’nin redüksiyonu sadece metabolik olarak aktif olan hücrelerde meydana gelir ve bu aktivitenin seviyesi hücrelerin canlılıklarıyla ölçülür (Alley ve ark., 1988; Fotakis ve Timbrell, 2006; Mosmann, 1983; Van Meerloo ve ark., 2011).

3.5.4.2. MTT Testi Protokolü

MTT çözeltisinin hazırlanışı: 5 mg MTT, 1 mL 1 x CMF-PBS içinde çözündürüldü. Çözelti +4°C’de karanlıkta saklandı.

Deneyin yapılışı:

1. Bölüm 3.5.3’de anlatıldığı gibi BPA ile inkübe edilen hücre kültürünü içeren 96 kuyucuklu mikrolapkanın her kuyucuğuna 20 µL MTT çözeltisi eklendi.

2. 150 rpm’de inkübatör dışında 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi.

3. 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 3 saat inkübe edildi.

4. Kuyucuklardaki üstteki sıvı atıldı ve kuyucuklara 100 µL %100’lük DMSO ilave edildi.

5. 150 rpm’de inkübatör dışında 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi.

6. Oluşan rengin şiddeti 590 nm’de (670 nm referans dalga boyuna karşı) mikropilaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

3.5.5. Nötral kırmızı alım (NRU) testi

3.5.5.1. NRU Testinin Esası

Canlı hücreler lizozomlarında nötral kırmızı boyasını tutma kapasitesine sahiptirler. Böylece, hücre canlılığı nötral kırmızı boyasını tutma kapasitesi ile ölçülür. Nötral kırmızı boyası zayıf katyonik bir boya olduğundan kolaylıkla hücre mebranına penetre olur ve lizozomlarda intraselüler olarak birikir (lizozomal pH < sitoplazmik pH) ve oradaki anyonik bölgelerle lizozomal matrikse bağlanır. Hücre yüzeyinde ya da duyarlı lizozomal membrandaki değişiklikler nötral kırmızı boyasının alınmasını ve bağlanmasını azaltır. Böylelikle canlı hücreler boyayı tutarken, zarar görmüş ya da ölü hücreleri tutamazlar. Boyanın nüfuz ettiği hücrelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 540 nm’de ölçülür (Fotakis ve Timbrell, 2006; Repetto ve ark., 2008).

3.5.5.2. NRU Testi için Çözeltilerin Hazırlanışı

Nötral kırmızı boyası ana stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg nötral kırmızı boyası 10 mL hücre kültürü besiyerinde çözüldü. Çözelti steril 0,22 µm naylon enjektör ucu filtreden geçirildi. Porsiyonlanarak -20°C’de saklandı. Boya kristallerinin iyi çözündürülmesi için çözelti çalışma gününden önce 37°C’de 1 gece inkübe edildi.

Nötral kırmızı boyası çalışma çözeltisinin hazırlanışı: 100 µL nötral kırmızı ana stok çözeltisinden alındı, hücre kültürü besiyeri ile 10 mL’ye tamamlandı ve 0,22 µm naylon enjektör ucu filtreden geçirildi (Bu aşamada boya kristallerinin iyi çözündürülmesi sağlanmalıdır).

Nötral kırmızı boyası çözündürme çözeltisinin hazırlanışı: 150 µL glasiyel asetik asit, 7,35 mL distile su ve 7,5 mL absolu alkol karıştırılarak hazırlandı. Kullanmadan hemen önce hazırlanmalı ve 1 saat içerisinde kullanılmalıdır.

3.5.5.3. NRU Testi Protokolü

1. Bölüm 3.5.3’de anlatıldığı gibi BPA ile inkübe edilen hücre kültürünü içeren 96 kuyucuklu mikropilakanın kuyucuklarındaki besiyeri atıldı ve kuyucuklar 150 µL PBS ile yıkandı.

2. Her kuyucuğa 100 μ L nötral kırmızı boyası çalışma çözeltisi eklendi ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi.

3. Mikroplakanın kuyucuklarındaki boya çözeltisi atıldı ve 150 μ L PBS ile dikkatlice yıkandı (nötral kırmızı boyası çalışma çözeltisinden kaynaklanabilecek boya kristallerinin kalmamasına dikkat edildi).

4. Her kuyucuğa 150 μ L nötral kırmızı çözündürme çözeltisi eklendi.

5. 150 rpm'de 10 dk. inkübatör dışında orbital çalkalayıcıda bekletildi.

6. Oluşan rengin şiddeti 540 nm'de mikropłaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

3.5.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

1. Çözücü kontrol grubundan (SC) elde edilen absorbans değeri %100 canlılığı ifade eder. Örneklerde canlı hücre oranı, çözücü kontrol grubunun (SC) absorbans değeri ile kıyaslanarak % cinsinden hesaplandı.

2. Çözücü kontrollerinin (SC) 96 kuyucuklu mikropłakanın sağ ve sol kenarında bulunması sistematik hataların belirlenmesini sağlar. Testin anlamlı olabilmesi için, sağ ve sol taraftaki çözücü kontrollerin ortalamaları ile tüm çözücü kontrollerin ortalamaları arasında %15'ten fazla fark olmaması gerekir.

3. Hücre büyüme kontrolleri (GC) çözücünün etkisini belirlemeyi sağlar. Eğer çözücü kontrollerin değerleri hücre büyüme kontrolleri ile belirgin bir fark gösterirse, test bileşiklerinin inhibisyon değerleri dikkatle yorumlanmalı, mümkünse farklı bir çözücü seçilmelidir.

4. Testin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla her maruziyet mikropłakasına SDS çözeltisi (son konsatrasyonu 0,1 mg/mL olacak şekilde) eklenerek pozitif kontrol grubu (PC) oluşturuldu. Çalışılan koşullarda, SDS çözeltisine (0,1 mg/mL) ait hücre ölümünün yaklaşık %50 olması gerekir (ISO-10993-5).

5. Her çözücü kontrol (SC) ve örnek absorbans değerlerinden, blank (B) değerlerine ait ortalama absorbans değeri çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değerleri elde edildi.

6. Düzeltilmiş çözücü kontrol (düzeltilmiş OD_{SC}) ve örnek (düzeltilmiş OD_{Örnek}) absorbans değerlerinin ortalaması alındı.

7. % Relatif inhibisyon (% hücre ölümü) değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Formül 3-2):

$$\% \text{ Relatif inhibisyon} = 100 - (\text{düzeltilmiş ort. OD}_{\text{Örnek}} \times 100 / \text{düzeltilmiş ort. OD}_{\text{SC}})$$

(Formül 3-2)

8. X ekseninde maruziyet konsantrasyonu, Y ekseninde % relatif inhibisyon (% hücre ölümü) olacak şekilde excel programı kullanılarak konsantrasyona karşı % inhibisyon (% hücre ölümü) eğrisi çizildi.

9. Eğriden %50 inhibisyona (hücre ölümüne) karşılık gelen konsantrasyon hesaplanarak çalışılan maddelerin IC₅₀ (%50 oranında hücre ölümüne sebep olan konsantrasyon) değeri belirlendi.

3.6. BPA'nın Hücre Dizilerine Maruziyeti

10 mM BPA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 22,829 mg BPA 10 mL DMSO'da çözülerek hazırlandı.

1 mM BPA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 10 mM BPA çözeltisinden 1 mL alınarak DMSO ile 10 mL'ye tamamlandı.

0,1 mM BPA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 1 mM BPA çözeltisinden 1 mL alınarak DMSO ile 10 mL'ye tamamlandı.

0,01 mM BPA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 0,1 mM BPA çözeltisinden 1 mL alınarak DMSO ile 10 mL'ye tamamlandı.

0,001 mM BPA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 0,01 mM BPA çözeltisinden 1 mL alınarak DMSO ile 10 mL'ye tamamlandı.

Her bir 25cm²'lik flaska 1,5x 10⁶ hücre 5 mL besiyeri içinde ekildi. CO₂'li inkübatörde 24 saat bekletildi. Flaskın içindeki besiyeri döküldü ve tekrar 5 mL taze besiyeri konuldu. Aşağıda belirtildiği şekilde BPA maruziyetleri gerçekleştirildi:

10 µM BPA maruziyeti: 5 µL 10 mM BPA çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

1 µM BPA maruziyeti: 5 µL 1 mM BPA çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

100 nM BPA maruziyeti: 5 µL 0,1 mM BPA çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

10 nM BPA maruziyeti: 5 µL 0,01 mM BPA çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

1 nM BPA maruziyeti: 5 µL 0,001 mM BPA çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

Kontrol grupları: 5 µL %100 DMSO içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

Bu şekilde BPA 1, 10, 100 nM ve 1, 10 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde NRK-52E hücrelerine uygulandı ve 24 saat maruz bırakıldı. Ayrıca, zamana bağlı değişimi görmek amacıyla 100 nM konsantrasyondaki BPA 24, 48, 72, 96 saat ve 6 gün olarak maruz bırakıldı. 48 ve 96 saatlik maruziyetler için 48. saatte maruziyet flasklarındaki BPA içeren besiyeri yenisi ile değiştirildi. Aynı ortam koşullarında kontrol grupları da oluşturuldu. BPA'nın her bir konsantrasyonda maruziyeti için 3'şer adet flaska ekim yapıldı ve deneyler 2. farklı bir günde tekrar edildi. En son maruziyet süreleri tamamlandıktan sonra BPA'ya maruz bırakılan hücreler pasajlandı ve sayıldı. Besiyeri içindeki hücreler 4°C'de 1000 x g'de 5 dk. santrifüj edildi, üstteki besiyeri atıldı ve hücreler PBS ile yıkanarak 4°C'de 1000 x g'de 5 dk. tekrar santrifüj edildi. Hücreler PBS'de süspand edildi ve DNA ve RNA izolasyonunu yapabilmek amacıyla yaklaşık 1×10^6 sayıda hücre 200 µL PBS içinde olacak şekilde kısımlara ayrıldı.

3.7. DNA Metilasyonu Analizi

3.7.1. DNA İzolasyonu

Hücre kültüründen genomik DNA izolasyonu 'High Pure PCR Template Preparation Kit' (Roche Life Science) ile üretici firmanın vermiş kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit İçeriği:

Bağlama tamponu: 6 M Guanidin HCl / 10 mM üre / 10 mM Tris HCl / % 20 Triton-X 100 (v/v) (pH 4.4).

Proteinaz K

İnhibitör temizleme: 5 M Guanidin HCl / 20 mM Tris HCl / alkol (pH 6.6).

Yıkama tamponu: 2 mM Tris HCl / alkol (pH 7.5).

Elüsyon tamponu: 4 M üre / 200 mM Tris / 20 mM NaCl / 200 mM EDTA (pH 7.4).
Filtreli tüp, toplama tüpü

Deney protokolü:

1. Bölüm 3.6'da belirtildiği üzere hazırlanan 1×10^6 hücre 200 μ l PBS içinde süspande edildi.
2. Üzerine 200 μ L bağlama tamponu, 40 μ L proteinaz K eklendi. Hemen karıştırıldı ve 70°C'de 10 dk. inkübe edildi.
3. Üzerine 100 μ L isoproponal eklendi ve iyice karıştırıldı.
4. Kitin içerisinden çıkan toplama tüpüne filtreli tüp yerleştirildi.
5. Yukarıda hazırlanan çözelti filtreli tüpe konuldu ve 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.
6. Filtreli tüpe 500 μ L inhibitör temizleme tamponu eklendi ve 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.
7. Filtreli tüpe 500 μ L yıkama tamponu eklendi ve 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
8. Yıkama tamponunun kalıntılarını temizlemek üzere bir kez daha 10 sn. santrifüj edildi.
9. Toplama tüpü atıldı, filtreli tüp 1,5 mL'lik mikrotüp içine yerleştirildi.
10. Önceden 70°C'ye getirilmiş elüsyon tamponundan 100 μ L filtreli tüpe eklendi. 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.
11. Elde edilen DNA'lar daha sonraki aşamalarda kullanılmak -20°C'de buzdolabında saklandı.

3.7.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

0,1-10 μ M konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında NRK-52E hücrelerinden izole edilen DNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikropłaka okuyucu spektrofotometrede de ölçüldü. 260 nm'de ölçülen absorbans değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng ya da μ g düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. 260 nm dalga boyunda okunan değer ile 280 nm ve 230 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi verir. Saflaştırılmış DNA'da A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranı yaklaşık 1,75-1,8 üzerinde olmalıdır.

3.7.3. Global DNA Metilasyonunun Tayini

5-metilsitozin (5-mC) içeriğinin tayini, global olarak DNA metilasyonundaki değişiklikleri tayin etmede hızlı ve kullanışlı bir parametredir (Christman, 1982; Ramsahoye, 2002; Fuke ve ark. 2004). Bu amaçla, DNA'da 5-mC'nin tayini 5-mC DNA Eliza kit (Zymo Research) ile üretici firmanın vermiş kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit İçeriği

5-mC Kaplama tamponu (15 mL): 4°C'de saklanmalıdır.

5-mC Eliza tamponu (250 mL): 4°C'de saklanmalıdır.

Anti-5-metilsitozin monoklonal antikoru (1 µg/µL, 30 µL): - 20°C'de saklanmalıdır.

Sekonder antikor (1 µg/µL, 30 µL): 4°C'de saklanmalıdır.

HRP geliştirici (15 mL): 4°C'de saklanmalıdır.

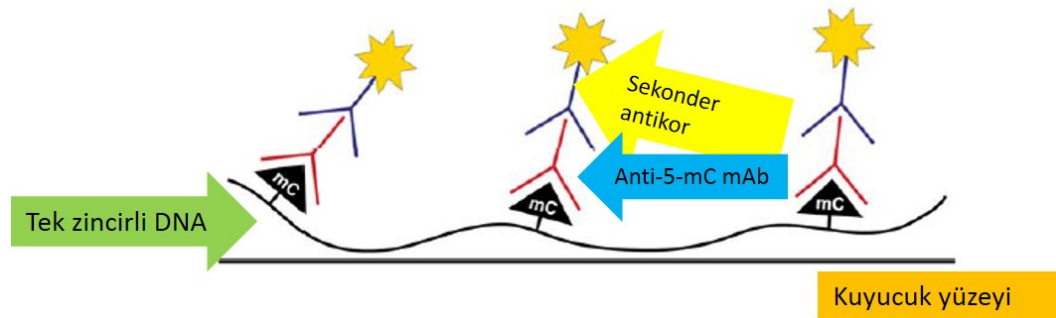
Negatif kontrol (100 ng/µL, 50 µL): - 20°C'de saklanmalıdır.

Pozitif kontrol (100 ng/µL, 50 µL): - 20°C'de saklanmalıdır.

96-kuyucuklu mikrolapla: Oda sıcaklığında saklanmalıdır.

Deneyin esası

5-mC DNA Eliza kitinin temeli dolaylı eliza tekniğidir. Denatüre, tek zincirli DNA örnekleri 5-mC kaplama tampon içinde mikrolapla kuyucuk yüzeylerine kaplanır. Anti-5mC monoklonal antikoru ve HRP bağlı sekonder antikor 5-mC Eliza tamponunda hazırlanır ve kuyucuklara eklenir. HRP geliştiricinin eklenmesi sonucu oluşan rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile 5-mC tayini gerçekleştirilir (Şekil 3-7) .



Şekil 3-7: 5-mC DNA Eliza kitinin temeli.

Deneyin yapılışı

Bölüm 3.7.1’de izole edilen ve Bölüm 3.7.2’de miktarı tespit edilen DNA örnekleri 100 ng konsantrasyonda olacak şekilde 100 µL 5-mC kaplama tampon içinde hazırlandı.

DNA örnekleri ile birlikte kit ile tedarik edilen negatif kontrol (100 ng/100 µL) ve pozitif kontrollerin (100 ng/100 µL) karışımıyla hazırlanan metilasyon standartları (% 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100 oranında 5-mC) da paralel olarak çalışıldı. Blank olarak herhangi bir DNA örneği içermeyen 100 µL 5-mC kaplama tamponu kullanıldı.

DNA bağlama

1. Gerektiği kadar kuyucuk standart ve örnekler için mikrolakadan ayrıldı.
2. 0,2 µL’lik PCR tüpüne 100 ng örnek DNA’ları ve negatif ve pozitif DNA’lar konuldu ve üzerine 100 µL 5-mC kaplama tamponu eklendi.
3. DNA’lar 98°C’de 5 dk. denatüre edildi ve denatürasyondan sonra hızlıca 10 dk. buzda bekletildi.
4. Denatüre edilmiş DNA’lar kit ile tedarik edilen mikrolaka kuyucuklarına eklendi ve üzeri mikrolaka filmi ile kapatıldı. Mikrolaka 37°C’de 1 saat inkübe edildi.

Bloklama

5. Kuyucuklardaki tampon uzaklaştırıldı ve tüm kuyucuklar 200 µL 5-mC Eliza tamponu ile 3 kez yıkandı.
6. Kuyucuklara 200 µL 5-mC Eliza tamponu eklendi ve üzeri mikrolaka filmi ile kapatıldı. Mikrolaka 37°C’de 30 dk. inkübe edildi.

Antikor eklenmesi

7. Kuyucuklardaki tampon uzaklaştırıldı.
8. Antikor karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı (18 kuyucuk için):

5-mC Eliza tamponu	2000 µL
Anti-5-metilsitozin	1 µL
Sekonder antikor	2 µL

9. Kuyucuklara antikor karışımından 100 µL eklendi ve üzeri mikrolaka filmi ile kapatıldı. Mikrolaka 37°C’de 1 saat inkübe edildi.

Renk gelişimi

10. Antikor karışımı kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve tüm kuyucuklar 200 µL 5-mC Eliza tamponu ile 3 kez yıkandı.

11. Kuyucuklara 100 µl HRP geliştirici eklendi. Mikroplaka oda sıcaklığında renk gelişimi için 20 dk. bekletildi.

12. Oluşan rengin şiddeti 405 nm’de mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

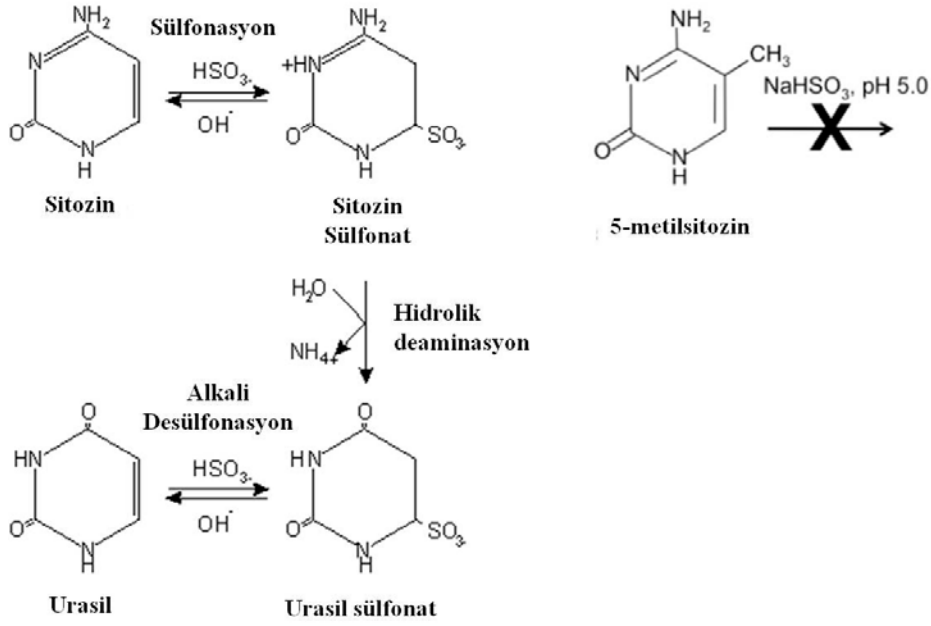
Sonuçların değerlendirilmesi

13. Metilasyon standartları (%0, %5, %10, %25, %50, %75, %100) ile hazırlanan ölçü eğrisi yardımıyla DNA örneklerindeki metilasyon oranı % olarak belirlendi.

3.7.4. Gene-özü DNA Metilasyonunun Araştırılması

3.7.4.1. Bisülfite DNA Modifikasyonu

DNA örneklerinin bisülfite modifikasyonu, ilk olarak Frommer ve ark. (1992) tarafından tarif edilen ve Clark ve ark. (1994) tarafından modifiye edilen yöntem esas alınarak yapıldı. Yöntemin esası, tek iplikli DNA’daki tüm metillenmemiş sitozinleri sodyum bisülfite urasile deamine etmesine dayanır. Diğer yandan, metillenmiş sitozinler değişmeden kalır (Şekil 3-8). Böylece metillenmiş ve metillenmemiş DNA’lar arasındaki dizi farklılıklarından yola çıkılarak tayin yapılabilmektedir. Daha sonra, modifiye edilmiş DNA, metillenmiş ve metillenmemiş diziler için özgün olan primer çifti kullanılarak PCR ile amplifiye edilir.



Şekil 3-8: Sitozinin bilsülfıt ile deaminasyonu reaksiyonu.

Bisülfıt modifikasyonu ‘EZ DNA Methylation Gold Kit’ (Zymo Research-D5005) kullanılarak yapıldı (Şekil 3-9).

Kit içeriği

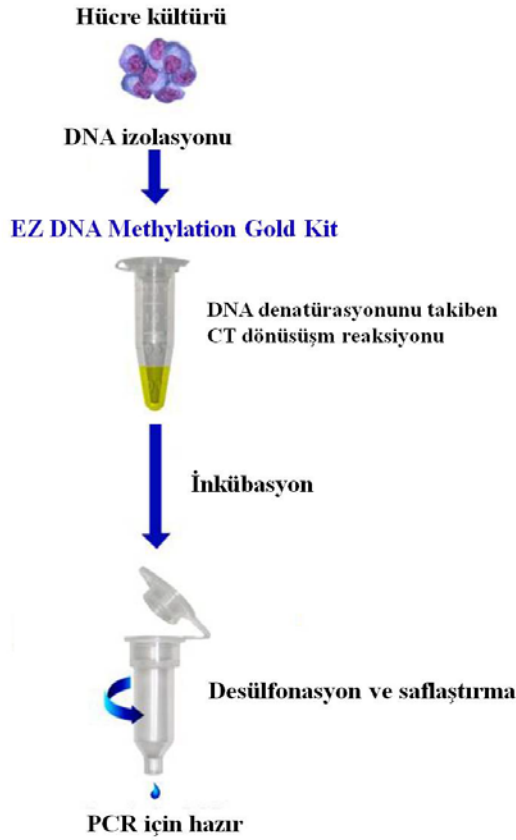
Bağlama tamponu

CT Dönüşüm (modifikasyon) belirtecinin hazırlanması: Kit içinde bulunan toz halindeki CT Dönüşüm belirteci aşağıdaki şekilde hazırlandı:

900 μL su	}	CT dönüşüm belirteci tüpüne eklendi.
300 μL M-seyreltme tamponu		
50 μL M-çözücü tampon		

Vorteks ile oda sıcaklığında karıştırıldı ya da 10 dk. çalkalandı.

M-Yıkama tamponunun hazırlanması: 24 mL %100'lük etanol 6 mL M-yıkama tamponuna eklendi ve karıştırıldı.



Şekil 3-9: Kit ile bisüfit DNA modifikasyonunun şematik gösterimi.

Deney Protokolü

1. 0,5 mL mikrotüpe 20 μ L DNA örneği (0,05 μ g/ μ L) ve 130 μ L CT dönüşüm belirteci eklendi. Eğer DNA örneğinin hacmi 20 μ L den az ise aradaki fark su ile tamamlanmalıdır.

2. Örnek tüpleri, ısıtıcı blokta 98°C’de 10 dk. ve 64°C de 2.5 saat süre ile inkübe edildi.

3. Filtreli tüp toplama tüpüne yerleştirildi. Üzerine 600 μ L bağlayıcı tampon kondu.

4. İkinci basamakta inkübasyon sonrası elde edilen örnek bağlayıcı tampon içeren filtreli tüpe kondu. Toplama tüpünün kapağı kapatıldı ve alt üst edilerek karıştırıldı.

5. 14.000 x rpm’de 30 sn. santrifüj edildi. “Toplama tüpünün içindeki sıvı atıldı.

6. 100 μ L yıkama tamponu filtreli tüp eklendi. 14.000 x rpm’de 30 sn. santrifüj edildi.

7. 200 µL desülfonasyon tamponu filtreli tüpe eklenir ve oda sıcaklığında (20-30°C) 15-20 dk. bekletildi. İnkübasyondan sonra 14.000 x rpm'de 30 sn. santrifüj edildi.

8. 200 µl yıkama tamponu filtreli tüpe eklendi. 14.000 x rpm'de 30 sn. santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.

9. Toplama tüpü atıldı, filtreli tüp 1,5 mL'lik mikrotüp içine yerleştirildi.

10. 10 µL elüsyon tamponu direkt olarak filtreli tüpe eklendi. 14.000 x rpm'de 30 sn. santrifüj edildi.

11. Elde edilen bisülfıt modifiye DNA'lar daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere 20°C'de saklandı.

3.7.4.2. *İn Vitro* DNA Metilasyonu

Pozitif kontrol olarak *in vitro* metillenmiş DNA; genomik DNA'nın SssI-CpG metiltransferaz enzimi (Zymo Research; New England Biolabs) katalizörlüğünde SAM'ı substrat olarak kullanarak *in vitro* metillenmesi ile hazırlandı.

Reaksiyon Bileşenleri:

10 x CpG Reaksiyon tampon	2 µL
20 x SAM (12 mM)	1 µL
DNA (1µg/µL)	1 µL
CpG Metilaz (4 unite/µL)	1 µL
Nükleaz-free su	15 µL

Sırasıyla yukarıdaki reaksiyon içerikleri mikrosantrifüj tübüne konuldu. 30°C'de 1 gece inkübasyon gerçekleştirildi.

İn vitro Metillenmiş DNA'nın Saflaştırılması

Sodyum asetat çözeltisi: 2,4 g sodyum asetat tartılarak 10 mL bidistile suda çözüldü. pH asetik asit ile 6.0'ya ayarlandı. 0,2 µm steril filtreden geçirilerek steril edildi. +4 °C'de buzdolabında saklandı.

1. 20 µL *in vitro* metile edilmiş DNA çözeltisine 20 µL nükleaz-free su eklendi.

2. İçerisinde jel bulunan 1,5 mL'lik tüp ('phase lock gel light') kullanılmadan önce 11.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi ve DNA çözeltisi jelin üzerine konuldu.

3. Üzerine 1 hacim (40 µl) kloroform:izoamil alkol (24:1) karışımı eklendi.

4. 1 dk. boyunca çalkalandı ve 11.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.

5. Üstteki sıvı (40 µL) jel tabakasına değmeden yeni bir ependorf tübüne alındı.

6. Üzerine 0,1 hacim (4 µL) 3M sodyum asetat (pH=6) tamponu ve 2 hacim (80 µL) soğuk absolüt etanol eklendi. -80°C'de 1 saat ya da -20°C'de 1 gece bekletildi.
7. 4°C'de, 10.000 x g'de 30 dk. santrifüj edildi.
8. Üstteki sıvı kısım atıldı.
9. DNA pelleti %90'lık soğuk etanol ile yıkandı ve 4°C'de 10.000 x g'de 30 dk. santrifüj edildi.
10. Oda sıcaklığında 10 dk. kurutuldu.
11. DNA pelleti üzerine 20 µL nükleaz-free su eklendi ve 55°C'de 1 saat inkübe edildi.
12. Metillenmiş DNA sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.7.4.3. Primer Çiftleri

Bazı genlere ait primer çiftleri, "Methyl Primer Ekspres (Applied Biosystems)" ve "Meth Primer" gibi metilasyon analizleri için özgün primer tasarım programları kullanılarak, metillenmiş ve metillenmemiş diziler için genlerin promotor bölgelerinde CpG adalarındaki dizilere uygun olarak tasarlandı. Kullanılan primer çiftleri Tablo 3-1'de gösterilmiştir. Primer çiftleri Elips firması aracılığıyla sağlandı (Integrated DNA Technologies, Amerika Birleşik Devletleri). Tüm primerler 100 pmol/µL konsantrasyonunda olacak şekilde nükleaz-free suda çözülerek stok çözeltiler hazırlandı. Daha sonra PCR uygulamalarında kullanılmak üzere 10 pmol/µL olacak şekilde seyreltildi ve porsiyonlara ayrılarak -20°C'de saklandı.

Tablo 3-1: MSP için kullanılacak primer çiftleri

Primer set	İleri primer 5' → 3'	Geri primer 3' → 5'	Annealing Sıcaklığı (°C)	Kaynak
<i>Rassf-1</i> – M	ggg ttt tgc gag agc gcg	gct aac aaa cgc gaa ccg	64	Williams ve ark., 2006
<i>Rassf-1</i> – U	ggg ttt tgc gag agc gcg	cac taa caa aca caa acc aaa ca	59	
<i>c-myc</i> – M	ttt gtt ttt tcg att tta gag aga c	tta tcc tac gta tat taa tca ccg c	55	Meth-Primer Design
<i>c-myc</i> – U	tgt ttt ttt gat ttt aga gag atg a	ctt atc cta cat ata tta atc acc aca	55	

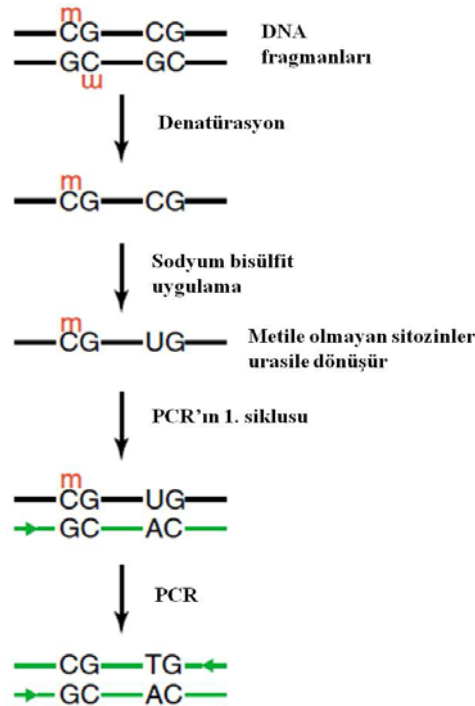
3.7.4.4. Metilasyona-özgü PCR (MSP)

Rassf-1 ve *c-myc* genlerinin promotor bölgelerindeki CpG adalarında metilasyon tayini, Herman ve ark., 1996 tarafından tarif edilen yöntem esas alınarak yapıldı. Bu

yöntemde bisülfite modifikasyonu ile urasile dönüşen sitozinler PCR sırasında adeninle eşleşirler. Metillenmiş ve metillenmemiş dizilere uygun primer çiftleri ile hot-start PCR amplifikasyonu, bisülfite ile modifiye edilmiş DNA (50ng) kullanılarak yapıldı. Oluşan PCR ürünü, poliakrilamid jel elektroforezi (etidyum bromür ile boyanmış) ile yürütüldükten sonra jel görüntüleme sisteminde UV ışığı altında bakılarak analiz edildi.

Metodun özgünlüğünü konfirmere etmek için, genomik DNA SssI-CpG metiltransferaz enzimi (New England Biolabs) katalizörlüğünde s-adenozil metiyonini substrat olarak kullanılarak in-vitro olarak metillenecektir. Metillenmiş DNA PCR amplifikasyonunda metillenmiş primer çifti için pozitif kontrol olarak kullanılacaktır. Negatif kontrol olarak ise, her iki primer çifti (metillenmiş ve metillenmemiş) için PCR uygulaması bisülfite modifikasyonu yapılmamış DNA'lar kullanılarak yapılacak ve böylece tamamlanmamış modifikasyon durumunda modifiye olmamış DNA'lar kontrol edilecektir.

Rassf-1 ve *c-myc* genlerinin promotor bölgelerindeki CpG adalarında metilasyon tayini, Herman ve ark. (1996) tarafından tarif edilen yöntem esas alınarak yapılmıştır. Bu yöntemde bisülfite modifikasyonu ile urasile dönüşen sitozinler PCR sırasında adeninle eşleşirler (Şekil 3-10).



Şekil 3-10: Bisülfite modifikasyonu ve PCR amplifikasyonunun metillenmiş ve metillenmemiş dizide şematik olarak gösterilmesi (Zilberman and Henikoff, 2007).

3.7.4.5. PCR Uygulaması

50 ng bisülfıt ile modifiye edilmiş DNA'dan (1000 ng/20 µL) 1 µL alındı, üzerine 12,5 µL hot-start PCR master karışımı, 2'şer µL 10 pmol "ileri" ve "geri" primerler ve 7,5 µL su eklenerek PCR amplifikasyonu başlatıldı.

PCR koşulları:

Enzim aktivasyonu	95 °C	4 dk.	
Parçalanma	95 °C	30 s.	
Annealing *		30 s.	35 siklus
Uzama	72 °C	30 s.	
Final uzama	72 °C	7 dk.	1 siklus

* Her gene ait "annealing sıcaklığı" Tablo 3-1'de verilmiştir.

Her bir PCR ürünü (10 µL) %5 lik poliakrilamid jellerde yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV transluminatör ve jel görüntüleme sisteminde incelendi.

PCR uygulaması, pozitif kontrol örnekleri kullanılarak her gene ait metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primer çiftleri ile farklı annealing sıcaklıkları denenerek optimize edildi. Her gen için PCR metodu optimize edildikten sonra; BPA uygulanmış NRK-52E hücrelerinden izole edilen DNA örneklerine MSP uygulamalar 2'şer tekrarlı olarak yapıldı.

Metodun özgünlüğünü konfirme etmek amacıyla; her PCR uygulamasında hem metillenmiş (M), hem de metillenmemiş (U) primer çiftleri için, pozitif kontrol olarak *in vitro* metillenmiş DNA, negatif kontrol olarak ise bisülfıt modifikasyonu yapılmamış DNA kullanıldı.

3.7.4.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel yükleme tamponu: 0,25 g Brom fenol mavisi, 0,25 g ksilen siyanol tartıldı. 30 mL Gliserin ve 70 mL steril su ilave edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

10 x TBE çözeltisi: 108 g Trizma baz, 55 g borik asit, 9.3 g EDTA tartılarak 1000 mL'ye bidistile su ile tamamlandı. Otoklavda 120°C'de 15 dk. steril edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

1 x TBE çözeltisi: 10xTBE tamponundan 100 mL alınıp 1000 mL'ye steril su ile tamamlandı.

Etidyum bromür: 10 mg etidyum bromür 10 mL bidistile suda çözündürüldü. +4°C’ de saklandı.

DNA göstergeleri: Çalışmada 50 ve 100 bç’lik DNA göstergeleri kullanıldı. 4 µL DNA göstergesi, 1 µL 6xDNA yükleme boyası ve 1 µL steril su 0,5 mL’lik mikrotüpte karıştırıldı. +4 °C’de saklandı.

Agaroz jel (%1,5) hazırlanışı: 0,75 g Agaroz tartılıp 50 mL’ye 1xTBE ile tamamlanıp, mikrodalga fırında çözündürüldü. Ilıkken, PCR ürünlerini görünür hale getirmek için, 2 µL etidyum bromür eklenip karıştırıldı ve taraklar konulmuş olan plağa döküldü. Jellerin donması için 20 dk. beklendi. Taraklar çıkartılarak jeller hemen kullanıldı ya da +4°C’de saklandı.

Enzim amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü için örnekler, PCR işlemi bitiminde %1,5’lik rutin agaroz jellere tatbik edildi.

Agaroz jele uygulama: Her 7 µL PCR ürünü için 2 µL yükleme tamponu ilave edildi. Jel, 1xTBE tamponu içeren elektroforez tankına alındı. Yükleme tamponu ile karıştırılmış olan PCR ürünleri, tarak dişleri sayesinde oluşan boşluklara teker teker uygulandı. 1 Jele 13 örnek ve oluşan ürünün büyüklüğünü ölçebilmek için uygun DNA göstergesi uygulandı. Yatay elektroforez, güç kaynağına takılarak PCR ürünleri direkt olarak 150 volt, 85 miliamper varlığında 40 dk. yürütüldü. İşlem sonunda amplifiye edilen genlerin spesifik bantları UV-transilluminatörde 254 veya 301 nm’de görüntülendi ve jel dökümantasyon sistemi ile elde edilen resimler kaydedildi

3.8. Gen Ekspresyonların Tayini

3.8.1. Total RNA İzolasyonu

Hücre kültüründen total RNA izolasyonu ‘High Pure RNA Isolation Kit’ (Roche Life Science) ile üretici firmanın vermiş kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

Lizis/Bağlama tamponu: 4,5 M Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, %30 Triton X-100 (ağırlık/hacim) (pH 6,6). 25°C’de saklandı.

DNaz I (rekombinant, liyofilize): 10 KU liyofilize DNaz I. Çözündürüldükten sonra porsyonlarak -20°C’de saklandı.

DNaz inkübasyon tamponu: 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,0). 25°C’de saklandı.

Yıkama tamponu I: 5 M Guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl (pH 6,6). 25°C’de saklandı.

Yıkama tamponu II: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl (pH 7,5). 25°C’de saklandı.

Elüsyon tamponu: PCR kalitede su.

Filtreli tüp, toplama tüpü

Deney protokolü

1. Bölüm 3.6’da belirtildiği üzere hazırlanan 1×10^6 hücre 200 μ L PBS içinde süspande edildi.

2. Üzerine 200 μ L bağlama tamponu eklendi ve 15 sn. vorteks ile karıştırıldı.

3. Kitin içerisinden çıkan toplama tüpüne filtreli tüp yerleştirildi.

4. Yukarıda hazırlanan çözelti filtreli tüpe konuldu ve 8000 x g’de 15 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

5. Steril bir mikrotüpte her bir örnek için 90 μ L DNaz inkübasyon tamponu ve 10 μ L DNaz I eklendi ve karıştırıldı.

6. 100 μ L DNaz I çözeltisi filtreli tüpün üst yüzeyine konuldu. 15-25°C’de 15 dk. inkübe edildi.

7. Filtreli tüpe 500 μ L Yıkama tamponu I eklendi ve 8000 g’de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

8. Filtreli tüpe 500 μ L Yıkama tamponu II eklendi ve 8000 g’de 15 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

9. Filtreli tüpe 200 μ L Yıkama tamponu II eklendi ve en yüksek devirde (yaklaşık 13000 g) 2 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı.

10. Filtreli tüp 1,5 mL’lik mikrotüp içine yerleştirildi.

11. Elüsyon tamponundan 50 μ L filtreli tüpe eklendi. 8000 x g’de 1 dk. santrifüj edildi.

12. Elde edilen RNA’lar, cDNA sentezi için -80°C’de saklandı.

3.8.2. RNA’nın Saflık ve Miktar Tayini

0,1-10 μ M konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında NRK-52E hücrelerinden izole edilen RNA’ların miktarı ve saflığı ‘Take-3 Plate’ kullanılarak mikropilaya okuyucu spektrofotometrede de ölçüldü. 260 nm’deki ölçümler RNA

miktarının belirlenmesinde kullanıldı. RNA'nın saflığının belirlenmesinde kullanılan A_{260}/A_{280} oranı ise yaklaşık $1,95 \pm 0,1$ olmalıdır.

3.8.3. cDNA Sentezi

cDNA tek veya çift sarmallı olabilir ve mRNA kalıbından ters transkriptaz enzimi kullanılarak sentezlenir. Eğer yapılan deney çift sarmallı cDNA gerektiriyorsa, bir başka DNA sentez basamağı ile gerçekleştirilebilir.

Ölçüm sonucunda elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi için total 500 ng olacak şekilde 'Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit' (Roche Life Science) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kitin içeriği

Transkriptör ters transkriptaz: 50 μ L; 200 mM potasyum fosfat, 2 mM ditiyotritol, %0,2 Triton X-100, %50 gliserol (pH 7,2)

Transkriptör ters transkriptaz reaksiyon tamponu (x5): 1 mL; 250 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 40 mM $MgCl_2$ (pH 8,5)

Koruyucu RNaz inhibitörü: 50 μ L; 20 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 8 mM ditiyotritol, %50 gliserol (pH 7,6)

Deoksinükleotid karışımı: 200 μ L; 10 mM, dATP, dGTP, dCTP, dTTP

Anchored-oligo (dT)₁₈ primer: 100 μ L

Random heksamer primer: 100 μ L

Kontrol RNA: 20 μ L

Kontrol primer, insan porfobilinojen deaminaz (PBGD) karışımı: PBGD için 5 μ M ileri ve geri primer

PCR kalitede su

Deney protokolü

1. Steril, nükleaz içermeyen, ince duvarlı PCR tüpü buz içine konuldu ve içerisinde kalıp primer karışımı hazırlandı:

Toplam RNA: 1000 ng

Anchored-oligo(dT)₁₈ primer (vial 5): 1 μ L

Random heksamer primer (vial 6): 1 μ L

Su (vial 8): Reaksiyonun toplam hacmi 13 μ L olacak şekilde su eklendi.

2. Kalıp primer karışımını denatüre etmek için karışım 65°C’de 10 dk. inkübe edildi ve tüp hızlı bir şekilde buz üstüne alındı.

3. Kalıp primer karışımını içeren tüpe ters transkriptaz karışımının geri kalan bileşenleri aşağıdaki belirtildiği sırayla eklendi:

Ters transkriptaz reaksiyon tamponu (x 5):	4 µL
Koruyucu RNaz inhibitörü:	0,5 µL
Deoksinükleotid karışımı:	2 µL
Transkriptoz ters transkriptaz:	0,5 µL
Toplam hacim:	20 µL

4. Tüp içindeki maddeler dikkatli bir şekilde karıştırıldı ve spin santrifüj yapıldı. Vorteks yapılmamalıdır.

5. Daha sonra ters transkriptaz karışımı 55°C’de 30 dk. boyunca inkübe edildi.

6. Transkriptoz ters transkriptaz 85°C’de 5 dk inkübe edilerek inactive edildi.

7. Tüp buz üstüne alınarak reaksiyon durduruldu.

8. cDNA saflaştırmaya gerek olmaksızın PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

3.8.4. Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile Tayini

Rassf1 ve *c-myc* genlerinin ekspresyonları ‘RealTime ready custom single assays’ primer prob karışımı kullanılarak RT-PCR ile gerçekleştirildi.

Gereken malzemeler:

‘LightCycler 480 Probes Master’ PCR karışımı, x 2: 1mL; FastStart Taq DNA polimeraz reaksiyon tamponu, dNTP karışımı, 6,4 mM MgCl₂

‘RealTime ready custom single assays’ primer prob karışımı

PCR kalitede su

Deney protokolü

1. Malzemeler açılmadan önce dikkatlice spin yapıldı. Çalışma buz üzerinde gerçekleştirildi.

2. PCR primerleri ve hidroliz probu içeren x10 konsantrasyonlu çözelti hazırlandı.

3. Buz üstündeki her bir 1.5 mL’lik reaksiyon tüpüne aşağıdaki gösterildiği gibi uygun miktarlarda bileşenler ilave edilerek PCR karışımı hazırlandı ve dikkatlice pipetleme yapıldı:

‘RealTime ready custom single assays’ primer prob karışımı:	2 µL
‘LightCycler 480 Probes Master’ PCR karışımı:	10 µL
PCR kalitede su:	3 µL
Toplam hacim:	15 µL

4. Hazırlanan PCR karışımından 15 µL mikropiakanın her kuyucuğuna ilave edildi.

5. cDNA örnekleri steril su ile 1:10 oranında seyreltilti.

6. Hazırlanan cDNA örneklerinden 5 µL her bir kuyucuğai eklendi ve mikropiakanın üzeri mikropiaka filmi ile kapatıldı.

7. Mikropiaka 1500 g’de 2 dk. santrifüj edildi.

8. Mikropiaka LightCycler 480 RT-PCR cihazına konularak ölçüm yapıldı. RT-PCR protokolü Tablo 3-2’de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: ‘Roche LightCycler 480 Probes’ RT-PCR protokolü

Program adı	Siklus	Analiz modu	Sıcaklık °C	Süre
Pre-inkübasyon	1	None	95	5 dk.
			95	10 sn.
Amplifikasyon	45	Quantification	50	15 sn.
			72	1 sn.
Soğuma	1	None	-	10 sn.

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

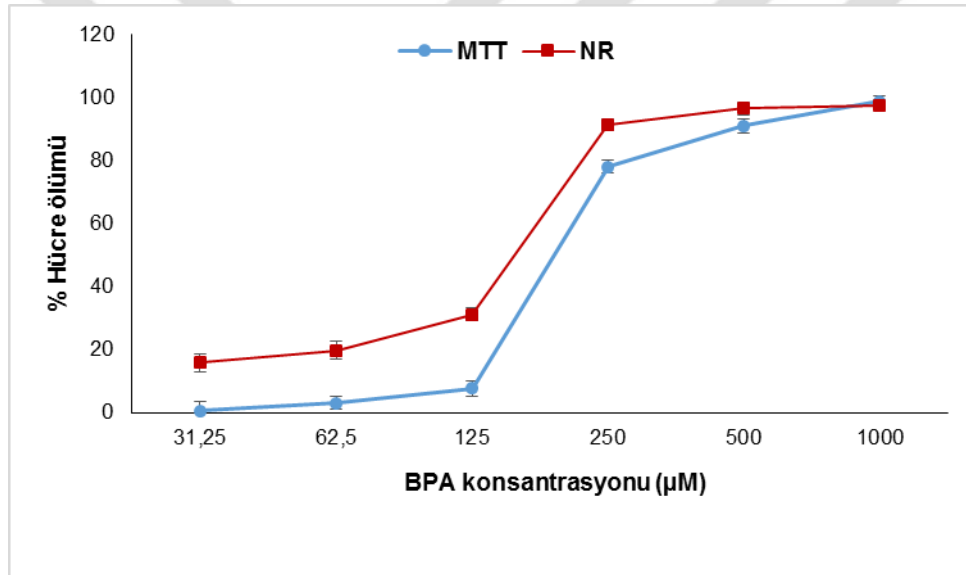
Veriler “ortalama ± standart sapma” olarak verildi. Verilerin istatistiksel olarak “SPSS 21.0 for Windows” paket programı kullanılarak değerlendirildi. Tüm parametreler için öncelikle normalite testi ve varyansların homojenliği testi uygulandıktan sonra, normal dağılım gösteren veriler için ‘Tek Yönlü Varyans’ (ANOVA) analizi ile çoklu karşılaştırma ve ikili gruplar arasında ise bağımsız t-testi kullanıldı. $p < 0,001$ ve $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. BPA'nın NRK-52E Hücrelerinde Sitotoksik Etkisi Üzerine Etkileri

BPA'nın NRK-52E hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi hücre canlılığının kantitatif ölçümüne dayanan MTT ve NRU testi ile gerçekleştirildi (Şekil 4-1).

BPA maruziyeti sonrası konsantrasyona karşı MTT ve NRU testleri ile % hücre ölümü grafiği NRK-52E hücrelerinde Şekil 4.1'de gösterilmiştir. BPA'nın 0; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 μ M konsantrasyonlarındaki maruziyetinin NRK-52E hücrelerinde MTT ve NRU testlerine göre IC50 değerleri sırası ile 105 ve 88 μ M olarak belirlendi.



Şekil 4-1: NRK-52E hücrelerine 0-1000 μ M konsantrasyonlarında BPA maruziyeti sonucu MTT ve NRU testi sonuçları.

4.2. NRK-52E Hücrelerinden İzole Edilen DNA'ların Miktarları ve Safılıkları

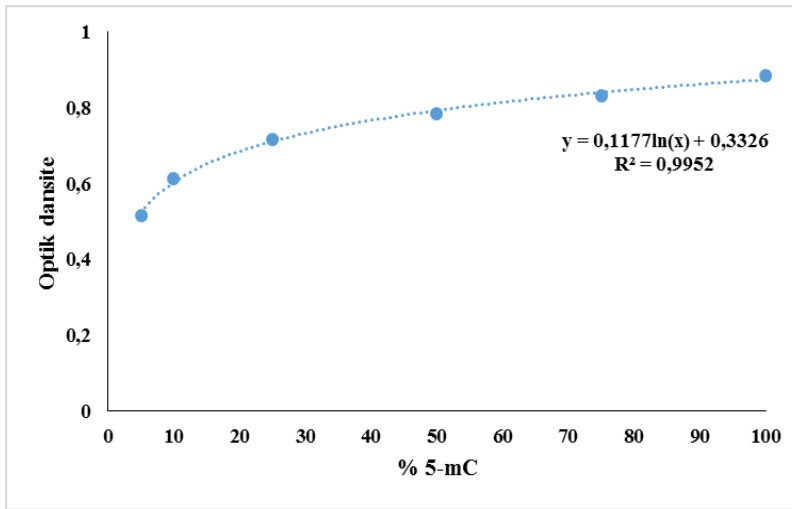
1, 10, 100 nM ve 1, 10 μ M konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında NRK-52E hücrelerinden izole edilen DNA'lar bisülfid modifikasyonu öncesinde miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikropilaka okuyucu spektrofotometrede de ölçüldü. İzole edilen DNA'ların A260/A280 ve A260/A230 oranlarında saflıklarının iyi olduğu görüldü (Tablo 4-1) ve DNA metilasyonu analizleri için uygulamalara başlandı.

Tablo 4-1: 1, 10, 100 nM ve 1, 10 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında NRK-52E hücrelerinden izole edilen DNA'ların miktar ve saflıkları

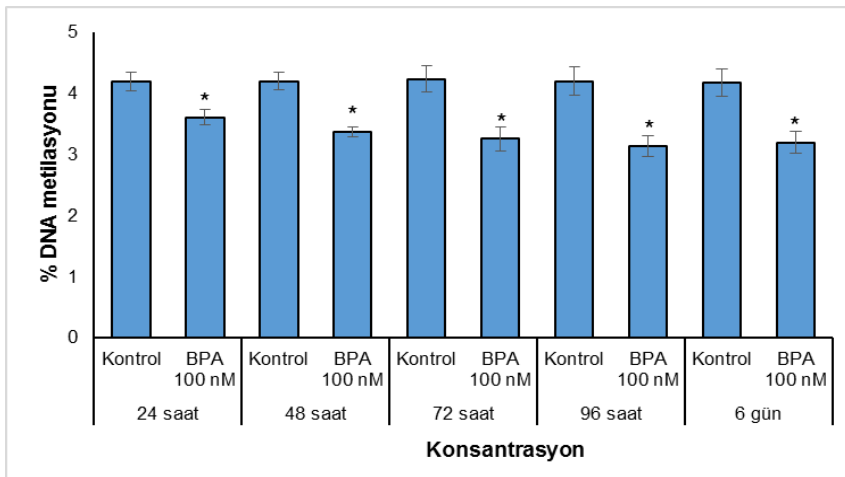
BPA'ya Maruziyet Süresi	Örnek No	Örnek Grubu	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	ng/µL
24 saat	1	Kontrol	1,892	1,785	170,815
	2	Kontrol	1,879	1,755	125,73
	3	Kontrol	2,011	1,974	120,737
	4	1 nM	1,92	1,67	108,304
	5	1 nM	-	-	-
	6	1 nM	1,938	1,753	138,963
	7	10 nM	1,901	1,682	152,482
	8	10 nM	1,965	1,968	117,334
	9	10 nM	1,931	1,728	202,637
	10	100 nM	1,984	1,79	209,306
	11	100 nM	1,938	1,903	226,176
	12	100 nM	1,942	1,863	144,79
	13	1 µM	1,953	1,937	138,997
	14	1 µM	1,868	1,734	205,744
	15	1 µM	1,924	1,848	226,737
	16	10 µM	1,953	1,792	169,381
	17	10 µM	1,923	1,922	410,357
	18	10 µM	1,786	1,773	167,06
48 saat	19	Kontrol	1,886	1,94	154,169
	20	Kontrol	1,877	2,105	216,312
	21	Kontrol	1,881	1,794	196,076
	22	100 nM	1,884	1,853	157,637
	23	100 nM	1,887	1,67	115,298
	24	100 nM	1,899	1,764	145,708
72 saat	25	Kontrol	1,894	2,117	167,148
	26	Kontrol	1,832	1,775	115,202
	27	Kontrol	1,91	1,765	164,414
	28	100 nM	1,897	1,946	90,015
	29	100 nM	1,825	1,887	113,42
	30	100 nM	1,741	1,705	7,241
96 saat	31	Kontrol	1,847	2,027	131,115
	32	Kontrol	1,838	1,22	147,511
	33	Kontrol	1,824	2,181	172,09
	34	Kontrol	1,834	2,077	180,772
	35	100 nM	1,955	1,632	127,006
	36	100 nM	1,822	1,977	158,932
	37	100 nM	1,865	1,653	114,374
6 gün	38	Kontrol	1,888	2,022	130,916
	39	Kontrol	1,857	1,989	131,31
	40	Kontrol	1,884	1,909	137,017
	41	100 nM	1,931	2,267	143,676
	42	100 nM	1,941	2,035	117,351
	43	100 nM	1,967	2,257	141,986

4.3. Global DNA Metilasyonu Sonuçları

Global 5-mC tayini Eliza kiti kullanılarak yapıldı. Bölüm 3.7.3’de anlatıldığı şekilde %5-mC miktarı kit ile temin edilen standartlar ile hazırlanan standart eğri üzerinden hesaplandı (Şekil 4-2). Şekil 4-3’de 100 nM konsantrasyonda 24 saat-6 gün BPA uygulanan NRK-52E hücrelerinde %5-mC seviyeleri gösterilmiştir. %5-mC seviyeleri kontrol grubuna kıyasla 100 nM 24, 48, 72, 96 saat ve 6 gün BPA uygulanan NRK-52E hücrelerinde sırasıyla %14,08; %19,76; %23,13; %25,3; %23,50 oranında azaldığı görülmüştür.



Şekil 4-2: 5-mC Standardına ait kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4-3: 100 nM konsantrasyon aralığında 24 saat - 6 gün BPA ile maruz bırakılan NRK-52E hücrelerinde % 5-mC seviyeleri.

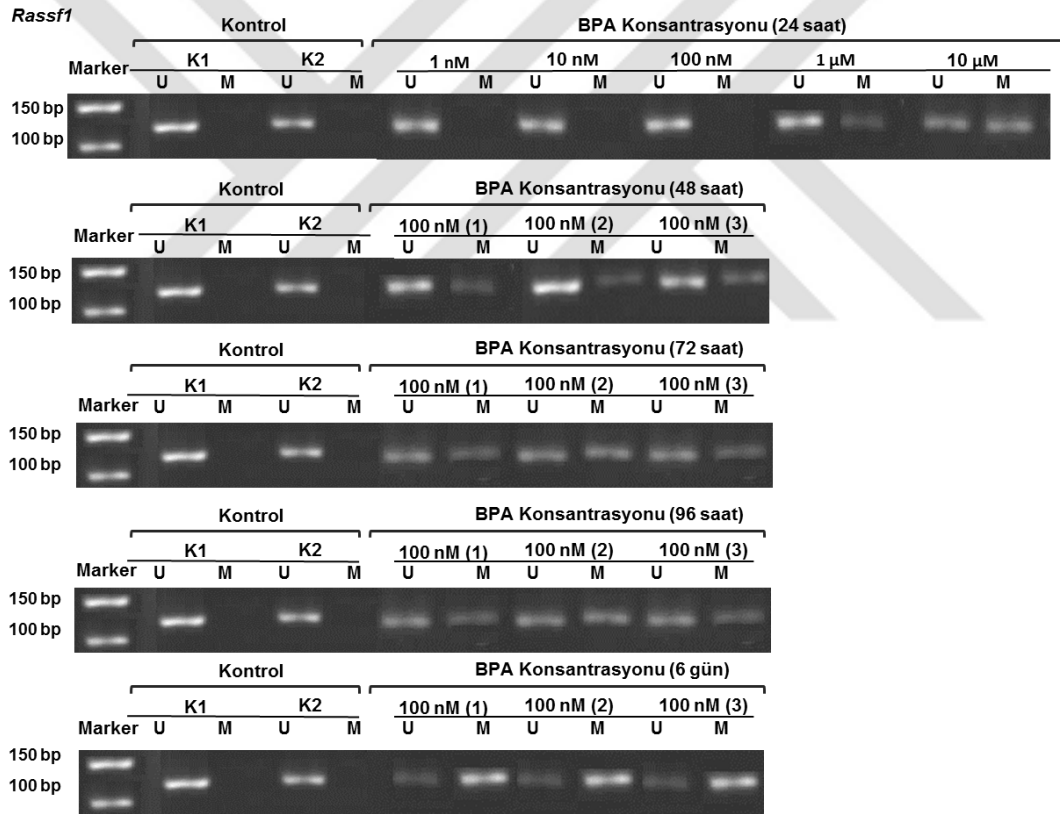
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

4.4. Gene-özü Metilasyon PCR (MSP) Tayini Sonuçları

Rassf-1 ve *c-myc* genlerinin promotor bölgelerindeki CpG adalarında metilasyon tayini BPA uygulanan NRK-52E hücrelerinden elde edilen DNA örneklerinde MSP yöntemi ile yapıldı. MSP tayini her bir örnek için hem metillenmiş (M), hem de metillenmemiş (U) primer çiftleri kullanılarak yapıldı.

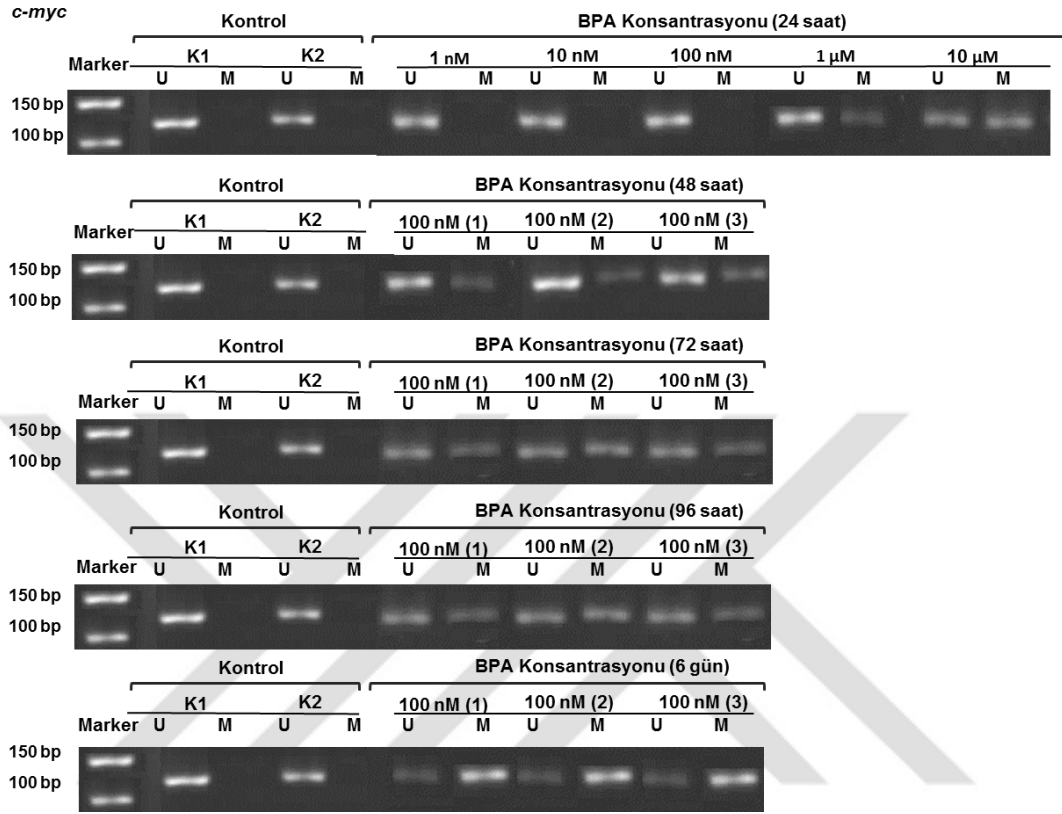
Rassf-1 geninin promotor bölgesindeki CpG adalarında metilasyon NRK-52E hücrelerinde kontrol örneklerinde gözlenmemiştir. 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda 24 saat BPA uygulanan NRK-52E hücrelerinde *Rassf-1* geninde metilasyon gözlemlendi (Şekil 4-4). Ayrıca, 100 nM konsantrasyonda 48, 72, 96 saat ve 6 gün BPA maruziyetinin de *Rassf1* geninde metilasyona sebep olduğu gösterildi (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: *Rassf-1* genine ait kontrol ve BPA uygulanmış NRK-52E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.

c-myc geninin promotor bölgesindeki CpG adalarında metilasyon NRK-52E hücrelerinde kontrol örneklerinde gözlenmemiştir. 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda 24 saat BPA uygulanan NRK-52E hücrelerinde *c-myc* geninde metilasyon gözlemlendi (Şekil

4-5). Ayrıca, 100 nM konsantrasyonda 48, 72, 96 saat ve 6 gün BPA maruziyetinin de *c-myc* geninde metilasyona sebep olduğu gösterildi (Şekil 4-5).



PCR ürünü büyüklüğü: 127 baz çifti (bp).

Şekil 4-5: *c-myc* Genine ait control ve BPA uygulanmış NRK-52E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.

4.5. NRK-52E Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Miktarları

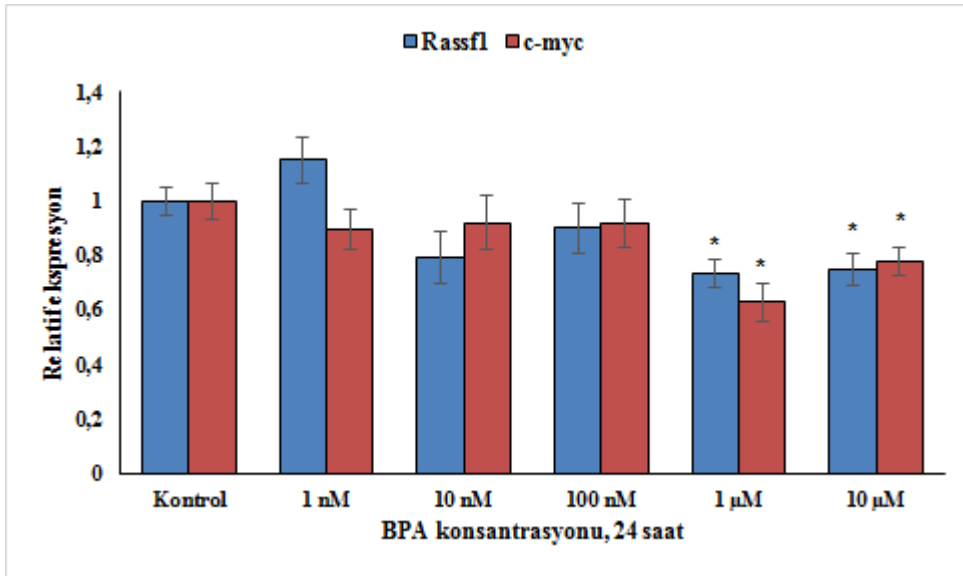
1, 10, 100 nM ve 1, 10 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında NRK-52E hücrelerinden RNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikropilaka okuyucu spektrofotometrede de ölçüldü. İzole edilen RNA'ların A260/A280 oranında saflıklarının iyi olduğu görüldü (Tablo 4-2) ve cDNA sentezi yapıldı.

Tablo 4-2: 1, 10, 100 nM ve 1, 10 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında NRK-52E hücrelerinden izole edilen RNA'ların A_{260}/A_{280} oranındaki miktarları ve saflıkları.

BPA'ya Maruziyet Süresi	Örnek No	Örnek Grubu	A_{260}/A_{280}	ng/µL
24 saat	1	Kontrol	2,037	641,877
	2	Kontrol	1,912	491,656
	3	Kontrol	2,043	482,539
	4	1 nM	2,05	330,944
	5	1 nM	1,987	334,004
	6	1 nM	2,057	344,778
	7	10 nM	2,071	412,43
	8	10 nM	2,066	325,998
	9	10 nM	2,05	262,531
	10	100 nM	2,059	342,946
	11	100 nM	2,043	299,493
	12	100 nM	2,041	324,193
	13	1 µM	2,06	206,776
	14	1 µM	2,032	244,794
	15	1 µM	2,05	306,044
	16	10 µM	1,999	406,884
	17	10 µM	2,039	170,542
	18	10 µM	2,065	308,939
48 saat	19	Kontrol	1,953	265,749
	20	Kontrol	2,054	529,1
	21	Kontrol	2,004	412,678
	22	100 nM	2,001	466,225
	23	100 nM	2,013	317,158
	24	100 nM	2,008	484,235
72 saat	25	Kontrol	2,047	759,984
	26	Kontrol	2,071	710,707
	27	Kontrol	1,998	828,508
	28	100 nM	2,025	858,449
	29	100 nM	1,968	659,988
	30	100 nM	2,018	582,687
96 saat	31	Kontrol	2,07	483,016
	32	Kontrol	2,047	675,928
	33	Kontrol	2,064	268,529
	34	Kontrol	2,048	454,345
	35	100 nM	2,065	393,101
	36	100 nM	2,063	481,489
	37	100 nM	2,086	347,305
6 gün	38	0 nM	2,078	209,39
	39	0 nM	2,065	250,287
	40	0 nM	2,049	148,581
	41	100 nM	2,054	174,904
	42	100 nM	2,01	204,659
	43	100 nM	2,047	279,07

4.6. Gen ekspresyonu

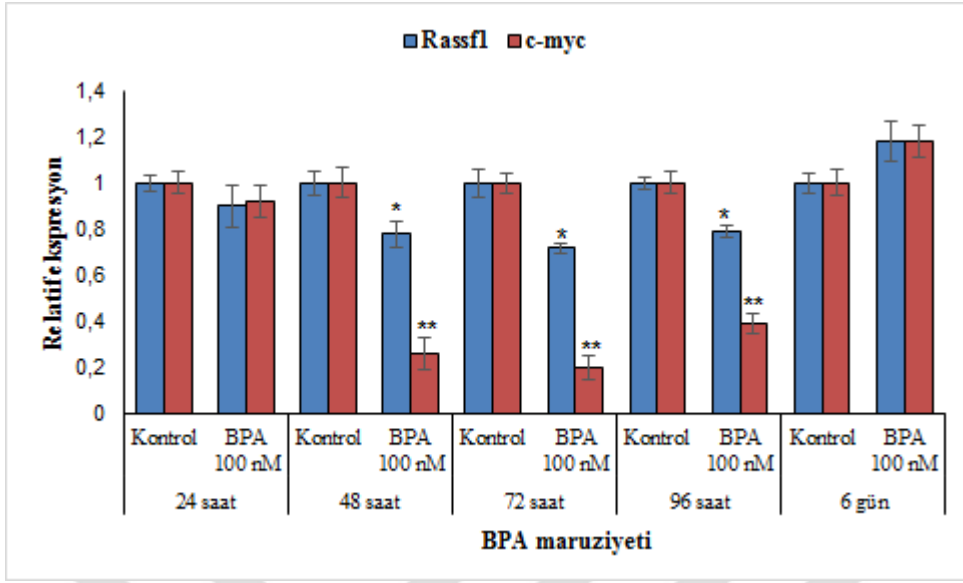
Rassf1 ve *c-myc* genlerine özgü hazır probler kullanılarak gen ekspresyonları RT-PCR’da tayin edildi. Referans gen olarak β -aktin kullanıldı. 24 saatlik maruziyette 1 μ M konsantrasyonda *Rassf1* ve *c-myc* geninin ekspresyonunda sırasıyla %26,66 ve %37,3 oranında azalma gözlenirken ve 10 μ M konsantrasyonda *Rassf1* ve *c-myc* geninin ekspresyonunda sırasıyla %25,11 ve %22,24 oranında azalma gözlemlendi (Şekil 4-6). Süreye bağlı maruziyetlerde ise; 100 nM 48, 72 ve 96 saatlik BPA maruziyetinin her iki genin ekspresyonunda kontrole göre istatistiksel olarak azalmaya sebep olduğu gösterilirken, 6 günlük maruziyette ise anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi (Şekil 4-7).



Şekil 4-6: *Rassf-1* ve *c-myc* genlerine ait 24 saatlik BPA maruziyetine uğramış NRK-52E hücrelerinin gen ekspresyonu sonuçları.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).



Şekil 4-7: *Rassf-1* ve *c-myc* genlerine ait 24, 48, 72, 96 saat ve 6 günlük BPA maruziyetine uğramış NRK-52E hücrelerinin gen ekspersyonu sonuçları.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

Sonuç olarak;

NRK-52E hücrelerinde MTT ve NRU testleriyle BPA'nın IC_{50} değeri sırasıyla 105 μM ve 88 μM bulundu.

5-mC Elisa kiti kullanılarak 100 nM BPA konsantrasyonunda 24, 48, 72, 96 saat ve 6 gün BPA maruziyeti sonucunda global DNA metilasyonunda azalma gözlemlendi.

24 saatlik yüksek konsantrasyonlarda ve 100 nM 48, 72 ve 96 saat BPA maruziyetinde NRK-52E hücrelerinde bisülfid dönüşümüne takiben MSP tekniği kullanılarak *Rassf-1* ve *c-myc* genlerinin promotör bölgelerinde metilasyonda artış gösterildi.

24 saatlik yüksek konsantrasyonlarda ve 100 nM 48, 72 ve 96 saat BPA maruziyetinde NRK-52E hücrelerinde *Rassf-1* ve *c-myc* genlerinin ekspresyonunda azalma gösterildi.

5. TARTIŞMA

Polikarbonat plastik ve epoksi reçinesi üretiminde hammadde olarak kullanılan bisfenol A (BPA) yüksek miktarlarda üretilen bir kimyasal maddedir. İnsanların BPA hakkındaki endişesi BPA'ya maruziyetin yaygın olmasından kaynaklanır. BPA'nın endokrin bozucu özelliğinden dolayı insan sağlığındaki riski büyük önem arz eder (Wolstenholme ve ark., 2011). BPA'nın, çeşitli dokularda enzim aktivitesini ve metabolizmayı etkilediği, hedef dokularda hormon reseptörlerinin sayısında ve hormon reseptör geni aktivitesinde değişikliğe yol açtığı ve endokrin sistemi bozduğu bir çok çalışmada ortaya çıkmıştır. Çalışmalar özellikle östrojenik ve antiandrojenik etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (EFSA, 2008).

Son yıllarda BPA'nın diyabet, obezite, üreme bozuklukları, kardiyovasküler bozukluklar, doğum anomalileri, kronik solunum ve böbrek bozuklukları ve meme kanseri gibi birçok kronik hastalığın etiyolojisinde rolünün olabileceği üzerinde durulmaktadır. BPA'nın toksisitesinin değerlendirilmesinde birçok çalışma yapılmakta olup, çeşitli sistemler üzerinde toksik etkilerinin değerlendirilmesinde epigenetik mekanizmaların da rolünün olabileceği yapılan araştırmalarda önemle vurgulanmaktadır (Kundakovic ve Champagne, 2011; Rezg ve ark., 2014).

Tez çalışmasında, insanların çeşitli yollar ile maruz kaldığı BPA'nın toksisitesinde DNA metilasyonunun rolü araştırılmıştır. Bu kapsamda; BPA'nın global DNA metilasyonu ve hücre siklusu regülasyonunda önemli rol oynayan *c-myc* ve *Rassf-1* genlerinin promotor bölgelerinde CpG adalarındaki metilasyonu ve gen ekspresyonları *in vitro* koşullarda NRK-52E hücrelerinde araştırıldı.

Tez çalışmasında, BPA'ya maruz bırakılmış NRK-52E hücrelerinde global DNA metilasyonu tayini DNA Eliza kit ile gerçekleştirilmiş olup, 5-mC seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla 100 nM 24, 48, 72, 96 saat ve 6 gün BPA uygulanan NRK-52E hücrelerinde azaldığı görülmüştür. Yapılan literatür taramaları neticesinde tez çalışmasının BPA'nın böbrek hücrelerinde global DNA metilasyonu üzerine yapılan ilk çalışma olduğu görülmektedir.

Proto-onkogenlerden biri olan *c-myc* bir transkripsiyon faktörünü kodlamakta olup, hücre çoğalmasını kontrol eder. *c-myc* Geninde meydana gelen hipometilasyon

ile genin ekspresyonu artar ve bu da karaciğer ve böbrek kanserlerinde hücre çoğalması ile ilişkilidir (Du ve ark., 2009; Tao ve ark., 2000; Tao ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda global DNA metilasyonu ve *c-myc* geninde hipometilasyon arasında bir ilişki olabileceği gösterilmiştir. *Rassf-1* de bir onkogendir ve hücre çoğalması kontrolünde görev alır. NRK-52E hücrelerinde *Rassf-1* ve *c-myc* genlerinin promotor bölgelerindeki CpG adalarındaki metilasyonda 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda 24 saat BPA uygulanan NRK-52E hücrelerinde metilasyon gözlemlendi. Ayrıca 100 nM konsantrasyonda 48, 72, 96 saat ve 6 gün BPA maruziyetinin de *Rassf1* ve *c-myc* genlerinde metilasyona sebep olduğu gösterildi. Aynı zamanda, bu genlerin ekspresyonlarında da değişiklikler saptanmış olup, ekspresyonlardaki azalmanın promotor bölge metilasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

İnsan meme epitel hücrelerinde 1 hafta süre ile BPA maruziyetinin (10, 100 nM) tümör ile ilişkili genlerde (*BRCA1*, *CCNA1*, *p16*, *THBS1*, *TNFRSF10C* ve *TNFRSF10D*) metilasyonu arttırdığı gösterilmiş olup, BPA'nın genetik ve epigenetik değişikliklere sebep olarak meme epitel hücre fonksiyonlarına zarar verdiği ve bunun hücre çoğalması ve yaşlanma ile ilişkili olabileceği ve bunun sonucunda memelerde karsinogeneze sebep olabileceği bildirilmiştir (Qin ve ark. 2012). İnsan meme epitel hücrelerinde yapılan diğer bir çalışmada ise; DNA onarım genlerinin (*BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *CtIP*, *RAD51*, ve *BRCC3*) ifadelerinin arttığı ve apoptoz ile ilişkili *PDCD5* ve *BCL2L11* genlerinin ise ifadelerinin azaldığı gösterilmiştir (Fernandez ve ark, 2012). İnsan meme kanseri hücrelerinde ve sıçan meme bezlerinde gen ifadesinde anahtar bir molekül olan kodlanmayan RNA *HOTAIR* ifadesinin BPA ile indüklendiği gösterilmiş olup, aynı zamanda kromatin (histon metilasyonu ve asetilasyonu) modifikasyonuna sebep olarak gen aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Bhan ve ark., 2014). Dhimolea ve ark. (2014) da sıçanlarda gebelikte BPA'ya maruziyetin meme bezlerinde genom düzeyinde epigenetik değişikliklere sebep olduğunu göstermiştir.

24 saat BPA maruziyetini takiben yenidoğan sıçan testislerinde östrojen reseptörlerinin promotor bölgelerinde hipermetilasyonda artış tespit edilmiş, spermatojenez ve fertilite üzerine advers etkilere sebep olabileceği bildirilmiştir (Doshi ve ark., 2011). Weng ve ark. (2010) yaptığı bir çalışmada primer epitel meme hücrelerinde düşük doz BPA maruziyetinin lizozom ilişkili membran protein ('lysosomal associated membrane protein', *LAMP3*) geninin CpG adalarında DNA

metilasyonunda artışa sebep olduğu ve beraberinde *LAMP3* geninin ifadesini baskıladığı ve bu durumun meme kanseri riskini arttırabildiği gösterilmiştir. Yenidoğan sıçanların BPA'ya maruziyetinin prostat neoplazinin sıklığında artışa ve prostat dokularında metilasyon değişikliklerine (örn: phosphodiesterase type 4 variant 4, *Pde4d4* geninde hipometilasyon ve gen ifadesinde artış) sebep olduğu gösterilmiştir (Conti ve ark., 2003; Ho ve ark., 2006; Prins ve ark., 2008). Ayrıca, yenidoğan sıçanların BPA'ya maruziyetinin (10 µg/kg vücut ağırlığı) nukleozom binding protein-1 (*Nsbp1*) ve hippocalcin-like 1 (*Hpcal1*) genlerinin metilasyonunda ve ifadesinde değişikliklere sebep olduğu bildirilmiştir (Tang ve ark., 2011). Bu çalışma ile yaşamın erken evrelerindeki BPA maruziyetin düzenleyici genlerin ekspresyon ve metilasyon durumlarını değiştirdiği görülmüştür (Tang ve ark., 2011).

Yukarıda da belirtildiği üzere BPA'nın çeşitli dokularda hücre fonksiyonunda önemli role sahip genlerde DNA metilasyonuna sebep olduğu gösterilmektedir. Tez çalışmasında elde edilen bulgular doğrultusunda; BPA'nın *in vitro* olarak NRK-52E hücrelerine maruziyeti sonucunda kanserle ilişkili olan bazı genlerin promotor bölgelerindeki CpG adalarında metilasyonda ve gen ekspresyonlarında değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlardan hareketle, BPA'nın toksisitesinde epigenetik bir mekanizma olarak DNA metilasyonundaki değişikliklerin rolünün olabileceği öne sürülmektedir. Sonuç olarak BPA'nın toksisitesinde DNA metilasyonunun gen ifadesi ve histon modifikasyonları ile ilişkisi konuları üzerine çalışmalar yapılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Ayrıca, devamlı hücre kültürleri kanser çalışmalarında ve hatta epigenetik mekanizmaların aydınlatılmasında sıklıkla kullanılmaktadırlar. NRK-52E hücreleri nefrotoksik ajanların hedef aldığı proksimal tübül epitel hücrelerinin karakteristik özelliklerine sahiptirler, bu hücre sistemlerinde epigenetik çalışmaların yapılması ve *in vitro* modellerin oluşturulması toksikoloji alanında önemli bir yere sahiptir. Tez çalışmasında, normal hücre kültürlerinde kanserde rol oynayan önemli genlerin metilasyonlarının belirlenmesinin gelecekte yapılacak olan epigenetik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Aynı zamanda kimyasalların sebep olduğu epigenetik değişikliklerin incelenmesinde *in vitro* test sistemlerinin kullanılması risk değerlendirmesinde tehlikenin tanımlanması aşamasında farklı sistemlerin kullanılması bakımından önemlidir.

KAYNAKLAR

- ANSES (Agence Nationale de Sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail), (2011). Effets sanitaires du bisphénol A and Connaissances relatives aux usages du bisphénol A. 383 pp.
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., & Boyd, M.R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, **48**(3), 589-601.
- Bhan, A., Hussain, I., Ansari, K.I., Bobzean, S.A., Perrotti, L.I., & Mandal, S.S. (2014). Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOTAIR in vitro and in vivo. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **141**, 160-170.
- Bhandari R, Xiao J, Shankar A. (2013). Urinary Bisphenol A and Obesity in US Children, *American Journal of Epidemiology*, **177**,1263-1270
- Bilir, A., Solakoglu, S., Ahışalı, B. (2004). Uygulamalı Flow Sitometri-PCR ve Hücre Kültürü Kursu, İstanbul.
- Bombail, V., Moggs, J.G., Orphanides, G. (2004). Perturbation of epigenetic status by toxicants. *Toxicology Letters*, **149**(1-3), 51-58.
- Browne, R.M. (1988). The In Vitro Assessment of the Cytotoxicity of Dental Materials - Does It Have a Role? *International Endodontic Journal*, **21**, 50-58.
- Carlisle, J., Chan, D., Golub, M., Henkel, S., Painter, P., Lily W.K. (2009). Toxicological Profile for Bisphenol A. September 2009. *Office of Environmental Health Hazard Assessment Ocean Protection Council under an Interagency Agreement*, Number 07-055.
- Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L., Frommer, M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research*, **22**(15), 2990-2997.
- Coffin, J.C., Ge, R., Yang, S., Kramer, P.M., Tao, L. ve Pereira, M.A. (2000). Effect of trihalomethanes on cell proliferation and DNA methylation in female B6C3F1 mouse liver. *Toxicological Sciences*, **58**(2), 243-252.
- Conti, M., Richter, W., Mehats, C., Livera, G., Park, J.Y., & Jin, C. (2003). Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(8), 5493-5496.

- Das, P.M., Singal, R. (2004). DNA Methylation and Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **22**, 4632-4642.
- Davis, J.M. (1996). Basic Cell Culture. A Practical Approach. Oxford University Press INC., New York
- Dhimolea, E., Wadia, P.R., Murray, T.J., Settles, M. L., Treitman, J.D., Sonnenschein, C., Shioda, T., & Soto, A.M. (2014). Prenatal exposure to BPA alters the epigenome of the rat mammary gland and increases the propensity to neoplastic development. *PLoS One*, Doi: 10.1371/journal.pone.0099800.
- Dodds EC, Lawson W. (1936). Synthetic oestrogenic agents without phenanthrene nucleus. *Nature*; **137**:996–7.
- Doherty, L.F., Bromer, J.G., Zhou, Y., Aldad, T.S., & Taylor, H.S. (2010). In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Hormones and Cancer*, **1**(3), 146-155.
- Dolinoy, D.C., Huang, D., & Jirtle, R.L. (2007). Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(32), 13056-13061.
- Doshi, T., D'Souza, C., Dighe, V., & Vanage, G. (2012). Effect of neonatal exposure on male rats to bisphenol a on the expression of DNA methylation machinery in the postimplantation embryo. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **26**(9), 337-343.
- Doshi, T., Mehta, S. S., Dighe, V., Balasinor, N., & Vanage, G. (2011). Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A. *Toxicology*, **289**(2), 74-82.
- Du, Y.P., Peng, J.S., Sun, A., Tang, Z.H., Ling, W.H. ve Zhu, H.L. (2009). Assessment of the effect of betaine on p16 and c-myc DNA methylation and mRNA expression in a chemical induced rat liver cancer model. *BMC Cancer*., **9**, 261.
- Earle, W. R. (1943) Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, **4**, 165-212.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2006). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on

a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A). *The EFSA Journal*, **428**, 1-75.

EFSA (European Food Safety Authority). (2008). 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 pp.

EFSA Panel on Food Contact Materials Enzymes Flavourings and Processing Aids (CEF). (2010). Scientific Opinion on bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of bisphenol A. *EFSA Journal*, **8**(9):1829, 110 pp.

EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). (2015). Bisphenol A (BPA) in foodstuffs: PART II - Toxicological assessment and risk characterisation. *EFSA Journal*, **13**(1):3978.

Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, **8**(4), 286-298.

Esteller, M. ve Herman, J.G.(2002). Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *The Journal of Pathology*, **196**(1), 1-7.

EU-RAR (European Union Risk Assessment Report). (2003). European Union Risk Assessment Report: 4,4'-Isopropylendiphenol (bisphenol-A). *EUR - Scientific and Technical Research Reports*, **37**, 1-302.

Feinberg, A.P. (2004). The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biology*, **14**(6), 427-432

Feinberg, A.P. ve Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, **301**, 89-92.

Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufik J, ve ark. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol*; **24**: 259-264.

Fotakis, G., & Timbrell, J.A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, **160**(2), 171-177.

Frederick S. vom Saal, Catherine A. Richter, Rachel R. Ruhlen, Susan C. Nagel, and Wade V. Welshons. (2004). Disruption of Laboratory Experiments Due to Leaching

of Bisphenol A from Polycarbonate Cages and Bottles and Uncontrolled Variability in Components of Animal Feed. Disruption of Laboratory Experiments Due to Leaching of Bisphenol A from Polycarbonate Cages and Bottles and Uncontrolled Variability in Components of Animal Feed.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK25416/>

Freshney R.I. (1986). Animal cell culture: A practical approach. Oxford: IRL Press Limited.

Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W. ve ark. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**(5), 1827-1831.

Gaido, K. W., Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babai, D., Portier, C. J., and McDonnell, D. P. (1997) Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol* **143**(1):205-12

Ge, R., Wang, W., Kramer, P.M., Yang, S., Tao, L. ve Pereira, M.A. (2001). Wy-14,643-induced hypomethylation of the c-myc gene in mouse liver. *Toxicological Sciences*, **62**(1), 28-35.

Gonzalzo, M.L. ve Jones, P.A. (1997). Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Research*, **25**(12), 2529-2531.

Gupta, C. (2000). Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **224**(2), 61-68.

Halden, R.U. (2010). Plastics And Health Risks. *Annual Review Of Public Health*, **31**, 179-94.

Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D. ve Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(18), 9821-9826.

Herman, J.G. ve Baylin, S.B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, **349**(21), 2042-2054.

- Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D. ve Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(18), 9821-9826.
- Hernandez, L., Petropoulos, C.J., Hughes, S.H. ve Lijinsky, W. (1991). DNA methylation and oncogene expression in methapyrilene-induced rat liver tumors and in treated hepatocytes in culture. *Molecular Carcinogenesis*, **4**(3), 203-209.
- Ho, S.M., Tang, W.Y., de Frausto, J.B., & Prins, G.S. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research*, **66**(11), 5624-5632.
- IARC, 1989. Some Organic Solvents, Resin Monomers and Related Compounds, Pigments and Occupational Exposures in Paint Manufacture and Painting. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Vol: **47**, Lyon, France.
- IARC, 1999. Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Vol: **71**, Lyon, France.
- Jin, B., Kim, G., Park D.W. ve Ryu, D.Y. (2004). Microarray analysis of gene regulation in the Hepa1c1c7 cell line following exposure to the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology In Vitro*, **18**(5), 659-664.
- Jones, P.A. ve Baylin, S.B., (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, **3**(6), 415-428.
- Jun, Z., Jing, Z., MengJie, L., YouJun, W., YingYing, F., Yang, Z. ve ark. (2011). Methylation of *RAR-β2*, *RASSF1A*, and *CDKN2A* genes induced by nickel subsulfide and nickel-carcinogenesis in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, **24**(2), 163-171.
- Kawahara, H., Yamagami, A. ve Nakamura, M. (1968). Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Journal of Dental Hygiene*, **18**, 443-467.
- Kehe, K., Reichl, F.X., Durner, J., Walther, U., Hickel, R. ve Forth, W. (2001). Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials*, **22**, 317-322.

- Kostka, G., Olejnik, K.U. ve Wiadrowska, B. (2010). Di-butyl phthalate- induced hypomethylation of the c-myc gene in rat liver. *Toxicology and Industrial Health*, **26**(7) 407-416
- Kundakovic, M., Gudsruk, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R.L., Perera, F.P., & Champagne, F.A. (2013). Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(24), 9956-9961.
- Kundakovic, M., Champagne, F.A. (2011). Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain, Behavior, and Immunity*, **25**(6), 1084-1093.
- LeBaron M.J., Rasoulpour R.J., Klapacz J., Ellis-Hutchings R.G., Hollnagel H.M., Gollapudi B.B. (2010) Epigenetics and chemical safety assessment. *Mutat Res.*; **705**(2):83-95.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., & Wenzel, A.(2003). Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure. Appl. Chem.*, **75**, 631-681.
- Liu, G.F., Ma, J., Guan, C.Y., Li, X. C., Qin, Q.D., & Li, G.B. (2008). Study on adsorption of bisphenol A from aqueous solution on modified activated Carbons. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue/[bian ji, Zhongguo ke xue yuan huan jing ke xue wei yuan hui" Huan jing ke xue" bian ji wei yuan hui.]*, **29**(2), 349-355.
- Miyatake, M., Miyagawa, K., Mizuo, K., Narita, M., & Suzuki, T. (2006). Dynamic Changes in Dopaminergic Neurotransmission Induced by a Low Concentration of Bisphenol-A in Neurones and Astrocytes. *Journal of Neuroendocrinology*, **18**(6), 434-444.
- Mizuo, K., Narita, M., Yoshida, T., Narita, M., & Suzuki, T. (2004). Functional changes in dopamine D3 receptors by prenatal and neonatal exposure to an endocrine disruptor bisphenol-A in mice. *Addiction Biology*, **9**(1), 19-25.
- Mjör, I.A. ve Hensten-Pettersen A. (1983). The Biological Compatibility of Alternative Alloys. *The International Dental Journey*, **33**, 35–40.
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hayata, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., & Nakao, K. (2002). Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **87**(11), 5185-5190.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**(1), 55-63.
- Narita, M., Miyagawa, K., Mizuo, K., Yoshida, T., & Suzuki, T. (2006). Prenatal and neonatal exposure to low-dose of bisphenol-A enhance the morphine-induced hyperlocomotion and rewarding effect. *Neuroscience Letters*, **402**(3), 249-252.
- Narita, M., Miyagawa, K., Mizuo, K., Yoshida, T., & Suzuki, T. (2007). Preclinical Study: Changes in central dopaminergic systems and morphine reward by prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A in mice: evidence for the importance of exposure period. *Addiction Biology*, **12**(2), 167-172.
- NTP-CERHR (National Toxicological Program - Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction). (2008). Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. *NTP CERHR MON*, **22**, No. 08-5994, v, vii-ix, 1-64 passim.
- Olea N., Pulgar R., Perez 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**(1996) 298-305.
- Özdemir, G.K. (2007). Farklı yumuşak astar mataryellerinin sitotoksik etkilerinin fare fibroblastları üzerinde hücre kültürü yöntemi ile in vitro olarak değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara Üniversitesi. Ankara
- Pälmke, N., Santacruz, D. ve Walter, J. (2011). Comprehensive analysis of DNA-methylation in mammalian tissues using MeDIP-chip. *Methods*, **53**(2):175-184.
- Patisaul, H.B., & Polston, E.K. (2008). Influence of endocrine active compounds on the developing rodent brain. *Brain Research Reviews*, **57**(2), 352-362.
- Pereira, M.A., Wang, W., Kramer, P.M. ve Tao, L. (2004). DNA hypomethylation induced by non genotoxic carcinogens in mouse and rat colon. *Cancer Letters*, **212**(2), 145-151.
- Prins, G.S., Tang, W.Y., Belmonte, J., & Ho, S.M. (2008). Developmental exposure to bisphenol A increases prostate cancer susceptibility in adult rats: epigenetic mode of action is implicated. *Fertility and Sterility*, **89**(2 Suppl), e41.

- Prins, G.S., Tang, W.Y., Belmonte, J., & Ho, S.M. (2008). Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **102**(2), 134-138.
- Prokop, Z., Hanková, L., & Jeřábek, K. (2004). Bisphenol A synthesis—modeling of industrial reactor and catalyst deactivation. *Reactive and Functional Polymers*, **60**, 77-83.
- Qin, X.Y., Fukuda, T., Yang, L., Zaha, H., Akanuma, H., Zeng, Q., Yoshinaga, J., & Sone, H. (2012). Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Biology & Therapy*, **13**(5), 296-306.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, **3**(7), 1125-1131.
- Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, Mornagui B. (2014). Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environ Int*; **64**:83–90.
- Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walser-Kuntz DR, Vom Saal FS (2007). In Vivo Effects of Bisphenol A in Laboratory Rodent Studies, *Reprod Toxicol*; **24**:199-224
- Roche High Pure PCR Template Preparation Kit Instruction Manual Version 16.0
- Roche High Pure RNA Isolation Kit Instruction Manual Version 12
- Roche LightCycler 480 Probes Master Instruction Manual Version 9.0
- Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit Instruction Manual Version 6.0
- Schmalz, G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials—advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, **22**, 6-11.
- Schmalz, G. (1997). Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clinical Oral Investigations*, **1**, 154-162.
- Sheehan, D.M. (2000). Activity of environmentally relevant low doses of endocrine disruptors and the bisphenol A controversy: initial results confirmed. *Experimental Biology and Medicine*, **224**(2), 57-60.
- Sigma-Aldrich Bisphenol A Ürün Güvenlik Bilgi Formu (2014), Aldrich 239658
- Singal, R. ve Ginder, G.D. (1999). DNA methylation. *Blood*, **93**, 4059-4070.
- Singh S, Shoen-Lung Li S. (2012) Epigenetic Effects of Environmental Chemicals Bisphenol A and Phthalates. *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 10143-10153

- Smith, D.C. ve Williams, D.F. (2001). Biocompatibility of dental materials. (Vol II). Florida: Boca Raton Crc.
- Stanisic, V., Lonard, D.M., & O'Malley, B.W. (2010). Modulation of steroid hormone receptor activity. *Progress in Brain Research*, **181**, 153-176.
- Staples, C.A., Dome, P.B., Klecka, G.M., Oblock, S.T., & Harris, L.R. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, **36**(10), 2149-2173.
- Sun, H., Zhou, X., Chen, H., Li, Q. ve Costa, M. (2009). Modulation of histone methylation and MLH1 gene silencing by hexavalent chromium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **15**, **237**(3), 258-266.
- Suzuki, K., Hirai, H., Murata, H., & Nishida, T. (2003). Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Research*, **37**(8), 1972-1975.
- Szyf, F.M. (2011). The implications of DNA methylation for toxicology: toward toxicomethylomics, the toxicology of DNA methylation, *Toxicological Sciences*, **120**(2), 235-255.
- Takahashi, O., & Oishi, S. (2001). Testicular toxicity of dietary 2, 2-bis (4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A) in F344 rats. *Archives of Toxicology*, **75**(1), 42-51.
- Takahashi, Y., Kondo, K., Hirose, T., Nakagawa, H., Tsuyuguchi, M., Hashimoto, M. ve ark. (2005). Microsatellite instability and protein expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1, of lung cancer in chromate-exposed workers. *Molecular Carcinogenesis*, **42**(3), 150-158
- Tang, W.Y., Morey, L.M., Cheung, Y.Y., Birch, L., Prins, G.S., & Ho, S. M. (2011). Neonatal Exposure to Estradiol/Bisphenol A Alters Promoter Methylation and Expression of Nsbp1 and Hpcal1 Genes and Transcriptional Programs of Dnmt3a/b and Mbd2/4 in the Rat Prostate Gland Throughout Life. *Endocrinology*, **153**(1), 42-55.
- Tao, L., Wang, W., Li, L., Kramer, P.K. ve Pereira, M.A. (2005). DNA hypomethylation induced by drinking water disinfection by-products in mouse and rat kidney. *Toxicological Sciences*, **87**, 344-352.
- Tao, L., Yang, S., Xie, M., Kramer, P.M. ve Pereira, M.A. (2000). Hypomethylation and overexpression of c-jun and c-myc protooncogenes and increased DNA

- methyltransferase activity in dichloroacetic and trichloroacetic acid-promoted mouse liver tumors. *Cancer Letters*, **158**, 185-193.
- Timms, B.G., Howdeshell, K.L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C.A., & Vom Saal, F.S. (2005). Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(19), 7014-7019.
- T.C. Resmi Gazete, 31 Ekim 2013. Sayı: 28807. Emzik, Biberon, Biberon Başlığı, Ağız Barı, Ağız Barı Kapağı Ve Benzeri Ürünlerin Üretimi, İthalatı, Piyasa Gözetimi Ve Denetimi İle Bildirim Esaslarına Dair Tebliğ.
- T.C. Resmi Gazete, 7 Şubat 2011. Sayı: 27839. Emzik, Biberon, Biberon Başlığı, Ağız Barı, Ağız Barı Kapağı ve Benzeri Ürünlerin Üretimi, İthalatı ve Bildirim Esaslarına Dair Tebliğ.
- Türk Gıda Kodeksi, 17 Temmuz 2013. Sayı: 28710. Türk Gıda Kodeksi Gıda İle Temas Eden Plastik Madde Ve Malzemeler Tebliği. Tebliğ No: 2013/34.
- Ushijima, T. ve Okochi, T.E. (2005). Aberrant methylations in cancer cells: where do they come from?. *Cancer Science*, **96**(4), 206-211.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G.J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer Cell Culture* (pp. 237-245). Humana Press.
- Vanderberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. (2007). Human Exposure of Bisphenol A. *Reprod Toxicol*. **24**; 139-77
- Varela-Rey, M., Woodhoo, A., Martinez-Chantar, M.L., Mato, J.M., Lu, S.C. (2011). Alcohol, DNA Methylation, and Cancer. *Alcohol Research: Current Reviews*, Volume **35**, Issue Number 1
- Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G.A., Filser, J.G., & Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chemical Research in Toxicology*, **15**(10), 1281-1287.
- Warita, K., Mitsuhashi, T., Ohta, K. I., Suzuki, S., Hoshi, N., Miki, T., & Takeuchi, Y. (2013). In vitro evaluation of gene expression changes for gonadotropin-releasing hormone 1, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2, in response to bisphenol A treatment. *Congenital Anomalies*, **53**(1), 42-45.
- Wataha, J.C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *Journal of Prosthetic Dentistry*, **86**, 203-209.

- Weng, Y.I., Hsu, P.Y., Liyanarachchi, S., Liu, J., Deatherage, D.E., Huang, Y. W., Zuo, T., Rodriguez, B., Lin, C.H., Cheng, A. L., & Huang, T.H.M. (2010). Epigenetic influences of low-dose bisphenol A in primary human breast epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **248**(2), 111-121.
- Williams MD, Chakravarti N, Kies MS, Maruya S, Myers JN, Haviland JC, Weber RS, Lotan R, El-Naggar AK. (2006). Implications of methylation patterns of cancer genes in salivary gland tumors. *Clin Cancer Res.* **12**(24):7353-8.
- Wolstenholme, J.T., Rissman, E.F. , Connelly, J.J., The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Hormones and Behavior* **59** (2011) 296–305.
- Zaidi, S.K., Young, D.W., Montecino, M., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J. ve Stein G.S. (2010) Architectural epigenetics: mitotic retention of mammalian transcriptional regulatory information. *Mol Cell Biol.*, **30**(20):4758-66.
- Zama, A.M., Uzumcu, M. (2010). Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: an ovarian perspective. *Front Neuroendocrinol.*; **31**(4):420-39.
- Zhang X, Ho SM (2011) Epigenetics meets endocrinology. *J Mol Endocrinol* **46**:R11–R32
- Zhang, Q., Xu, X., Li, T., Lu, Y., Ruan, Q., Lu, Y., Ruan, Q., Lu, Y., Wang, Q., Dong, F., Yang, Y., & Zhang, G. (2014). Exposure to bisphenol-A affects fear memory and histone acetylation of the hippocampus in adult mice. *Hormones and Behavior*, **65**(2), 106-113.
- Zoeller RT, Bansal R, Parris C. (2005). Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* **146** (2): 607-612.
- Zoeller, R. T. (2007). Environmental chemicals impacting the thyroid: targets and consequences. *Thyroid* **17**(9): 811-7.
- ZYMO Research 5-mC DNA ELISA Kit Instruction Manual Version 1.2.0
- ZYMO Research ZymoTaq DNA Polymerase Kit Instruction Manual Version 1.0.3
- ZYMO Research EZ DNA Methylation Gold Kit Instruction Manual Version 2.1.3

burs sağlanmıştır.) 2014 EUROTOX Edinburgh Kongresi. 7– 10 Eylül 2014 Edinburgh, İskoçya.

2. Tuzcuoğlu P, Abuyyak M. Kozmetik ve Kişisel Bakım Ürünlerinin Güvenilirliklerinin Değerlendirilmesinde In Vitro Toksisite Testleri, *III. Kozmetik Kongresi*, Antalya (TUBITAK tarafından kongreye katılım için burs sağlamıştır.), 2013.
3. Polat S, Tuzcuoğlu P, Aroğuz AZ. Politiyofen Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Optik Özelliklerinin İncelenmesi, *Balıkesir III. Fiziksel Kimya Günleri Kongresi*, 2012.
4. Tuzcuoğlu P, Aroğuz AZ. İkili Biyopolimer Karışımları Üzerinde Pantoprazol İlaçaktif Maddesinin Salım Profilinin İncelenmesi, *Balıkesir III. Fiziksel Kimya Günleri Kongresi*, 2012.

Uluslararası Katılımları

1. Eastern Partnership: European Youth's Perspectives, *EU Youth in Action Programı*, Köln, Almanya, 16.03.2013-23.03.2013.
2. Grenzerfahrung fängt an, wo andere aufhören!, AEGEE-Europe, Aachen, ALMANYA, 17.08.2012 - 01.09.2012, Language Course Plus (LC+) Theme ist Erlebe deutsche Sprache unter den besonderen Aspekten des Rheinlandes, der Euregio und des Ruhrgebietes als Grenzregionen.
3. English Plus Course (IELTS), *The New School of English*, Cambridge, İngiltere, 23.10.2011-17.12.2011.
4. Gender Equality and Diversity in European Youth Initiatives, *EU Youth inAction Programı*, Schoorl, Hollanda, 20.11.2011 - 27.11.2011.
5. Clash of the PEIRans: HERA's Revenge, *AEGEE-Europe*, Atina ve Girit, Yunanistan, 14.07.2011 - 28.07.2011, Travel Summer University.
6. So Far, So Close, *EU Youth in Action Programı*, Strumica, Makedonya, 22.02.2009 - 03.03.2009.
7. Action 3.1 partnership building activity project, *EU Youth in Action Programı*, Bakü, Azerbaycan, 21.11.2008 - 25.11.2008.
8. General English Language, *St. Clare's , Oxford*, İngiltere 17.08.2008 - 31.08.2008 – British Council Bursu.

Özel İlgi Alanları (Hobileri)

Yüzme, paten, inline hokey, buz hokeyi, tüplü dalış, piyano, gitar, snowboard