



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BİSFENOL BİLEŞİKLERİNİN NEDEN OLDUĞU DNA HASARI
ÜZERİNDE SELENYUMUN KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN
IN-VITRO ARAŞTIRILMASI**

Ekin ERDOĞMUŞ

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ**

**ANKARA
2024**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİSFENOL BİLEŞİKLERİNİN NEDEN OLDUĞU DNA HASARI
ÜZERİNDE SELENYUMUN KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN
IN-VITRO ARAŞTIRILMASI

Ekin ERDOĞMUŞ

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

Bu Araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün
TDK-2022-2702 Proje Numarası ile Desteklenmiştir.

ANKARA
2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Bisfenol Bileşiklerinin Neden Olduğu DNA Hasarı Üzerinde Selenyumun Koruyucu Etkinliğinin *In-Vitro* Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımda yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ekin ERDOĞMUŞ

Tarih: 04.12.2024

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasotik Toksikoloji Anabilim Dalı'nda Ekin ERDOĞMUŞ tarafından hazırlanan “Bisfenol Bileşiklerinin Neden Olduğu DNA Hasarı Üzerinde Selenyumun Koruyucu Etkinliğinin *In-Vitro* Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04.12.2024

Prof. Dr. Yalçın DUYDU

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL

İstanbul Okan Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ

Hacettepe Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Sezen YILMAZ SARIALTIN

Ankara Üniversitesi

Üye

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

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Bisfenol Bileşiklerinin Neden Olduğu DNA Hasarı Üzerinde Selenyumun Koruyucu Etkinliğinin *In-Vitro* Araştırılması

Bisfenol A, yaygın olarak kullanılan bir endüstriyel kimyasal olup, özellikle plastik ve reçine üretiminde rol oynamaktadır. Ancak, endokrin bozucu etkileri ve insan sağlığı üzerindeki potansiyel zararlı etkilerinin ortaya çıkmasıyla Bisfenol A'nın kullanımı tartışmalı hale gelmiş ve sınırlanmaya başlanmıştır. Bu durum, Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF ve Bisfenol Z gibi alternatif bisfenol türevlerinin geliştirilmesine ve kullanımına yol açmıştır. Bu yeni türevlerin de insan sağlığı ve çevre üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemekte olup, güvenlikleri araştırılmaktadır. Selenyum, vücutta önemli bir antioksidan ve hücrel koruyucu rol üstlenen bir eser elementtir. Hücrelerde oksidatif stresi azaltıcı etkisi ile bilinen selenyum, DNA hasarını engelleme ve hücre sağlığını koruma potansiyeli ile dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, bisfenol türevlerinin yol açtığı genotoksik etkiler üzerine selenyumun olası koruyucu etkileri, özellikle östrojen reseptörüne sahip olan ve meme kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan MCF7 hücre hattı üzerinde incelenmiştir. Bisfenol A, Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF, Bisfenol Z ve sodyum selenitin sitotoksik etkilerini araştırmak için MTT testi, genotoksik etkilerini araştırmak için ise Komet testi kullanılmıştır. Çalışmada farklı bisfenol türevleri belirli konsantrasyonlarda uygulanarak sitotoksisite ve genotoksisite potansiyelleri değerlendirilmiştir. Ayrıca bisfenollerin oluşturduğu DNA hasarının önlenmesi veya azaltılması amacıyla, selenyumun sitotoksik ve genotoksik etki göstermediği konsantrasyonlardaki koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Tezimizden elde edilen sonuçlara göre Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF ve Bisfenol Z de Bisfenol A gibi sitotoksik ve genotoksik etkiler göstermektedir. Ayrıca seçilen 3 nM ve 10 nM sodyum selenit, bisfenollerin oluşturduğu genotoksik etkilere karşı koruyucu etki göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Bisfenol, Genotoksisite, Hücre Kültürü, Komet, Selenyum

SUMMARY

***In-Vitro* Investigation of the Protective Effect of Selenium on DNA Damage Induced by Bisphenol Compounds**

Bisphenol A is a widely used industrial chemical, particularly in the production of plastics and resins. However, with the emergence of endocrine disrupting effects and potential harmful effects on human health, the use of Bisphenol A has become controversial and limited. This has led to the development and use of alternative bisphenol derivatives such as Bisphenol S, Bisphenol F, Bisphenol AF and Bisphenol Z. The effects of these new derivatives on human health and the environment are not fully known and their safety is under investigation. Selenium is a trace element that plays an important antioxidant and cellular protective role in the body. Selenium, which is known to reduce oxidative stress in cells, draws attention with its potential to prevent DNA damage and protect cell health. In this study, the possible protective effects of selenium on the genotoxic effects caused by bisphenol derivatives were investigated on the MCF7 cell line, which has estrogen receptor and is widely used in breast cancer research. MTT test was used to investigate the cytotoxic effects of Bisphenol A, Bisphenol S, Bisphenol F, Bisphenol AF, Bisphenol Z and sodium selenite and Comet test was used to investigate their genotoxic effects. In the study, cytotoxicity and genotoxicity potentials were evaluated by applying different bisphenol derivatives at certain concentrations. In addition, in order to prevent or reduce DNA damage caused by bisphenols, the protective effect of selenium at concentrations that do not show cytotoxic and genotoxic effects was investigated. According to the results obtained from our thesis, Bisphenol S, Bisphenol F, Bisphenol AF and Bisphenol Z also show cytotoxic and genotoxic effects like Bisphenol A. In addition, the selected 3 nM and 10 nM sodium selenite showed a protective effect against the genotoxic effects of bisphenols.

Keywords: Bisphenol, Cell Culture, Comet, Genotoxicity, Selenium

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Bisfenol A Özellikleri ve Kullanım Alanları	1
1.2. Bisfenol A Toksisitesi	3
1.3. Bisfenol A Regülasyonları	5
1.4. Bisfenol A'ya Alternatif Kullanılan Türevler	7
1.4.1. Bisfenol S Özellikleri ve Toksisitesi	7
1.4.2. Bisfenol F Özellikleri ve Toksisitesi	9
1.4.3. Bisfenol AF Özellikleri ve Toksisitesi	12
1.4.4. Bisfenol Z Özellikleri ve Toksisitesi	13
1.5. Genotoksisite Testleri	14
1.5.1. Komet Testi	17
1.6. Hücre Kültürü	20
1.6.1. MCF7 Hücre Hattı	22
1.7. Selenyum Özellikleri ve Koruyucu Etkisi	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Gereç	28
2.1.1. Kullanılan Maddeler	28
2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	29
2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	29
2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılması	30
2.4. Test Materyallerinin Hazırlanması ve Hücrelere Maruziyeti	32
2.5. Sitotoksik Etkilerin Araştırılması: MTT Testi	35
2.6. Genotoksik Etkilerin Araştırılması: Komet Testi	37
2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler	40
3. BULGULAR	41
3.1. Sitotoksisite Testi (MTT) Sonuçları	41
3.2. Genotoksisite Testi (Komet) Sonuçları	42
3.2.1. Bisfenol Türevlerinin Komet Sonuçları	42
3.2.2. Sodyum Selenit Komet Sonuçları	46
3.2.3. Sodyum Selenitin Koruyucu Etkisinin Araştırıldığı Komet Sonuçları	47
4. TARTIŞMA	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	89

ÖNSÖZ

Bisfenoller, endüstride özellikle plastik ve reçine üretiminde yaygın olarak kullanılan kimyasal maddelerdir. Yapılan çalışmalar ile Bisfenol A'nın organizma üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu kanıtlanmış ve dünya çapında kullanımına sınırlamalar getirilmiştir. Bu kısıtlamalar sebebiyle endüstride Bisfenol A yerine alternatif türevler kullanılmaya başlanmıştır. Ancak kullanılan türevlerin Bisfenol A benzeri etkileri olabileceği düşünülerek bu türevler üzerinde de çalışmalar yapılmaya başlanmış ve benzer olumsuz etkilerin görülebileceği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, genotoksik etkileri daha önce kanıtlanmış olan Bisfenol A ve potansiyel genotoksik etkileri halen araştırılmakta olan türevleri Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF ve Bisfenol Z'nin, MCF7 hücre hattı üzerindeki DNA hasarını indükleme potansiyellerinin değerlendirilmesi ve güçlü antioksidan özellikleri ile bilinen selenyumun, bu DNA hasarına karşı koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması “Bisfenol Bileşiklerinin Neden Olduğu DNA Hasarı Üzerinde Selenyumun Koruyucu Etkinliğinin *In-vitro* Araştırılması” konulu TDK-2022-2702 numaralı proje ile Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından desteklenmiştir.

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini paylaşmakla kalmayıp özverisi ve desteğiyle her adımda yanımda olan değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte desteklerini ve katkılarını her zaman hissettiğim Ankara Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Tülay ÇOBAN'a ve anabilim dalı öğretim üyeleri hocalarım ve öğretim görevlisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca disiplinli yaklaşımı ve değerli rehberliğiyle bana yol gösteren ve desteklerini esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimin her aşamasında bana destek olan ve tecrübeleri ile yol gösteren sevgili hocam Doç. Dr. Deniz YİĞİT'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimin proje olarak desteklenmesini sağlayan Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin deneysel kısımlarında her zaman yanımda olan, özverisiyle bana destek veren sevgili arkadaşım Arş. Gör. Seda İPEK TEKNECİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimin zor zamanlarında güç veren, beni motive edip bu yolda yalnız olmadığımı hissettiren ve bu çalışmayı bitirmem için beni sabırla teşvik eden Öğr. Gör. Ahsen Sevde ÇINAR KOÇ'a, Arş. Gör. Ceren ADALI'ya, Kadir Selçuk ÜNAL'a, Arş. Gör. M. Beyza ŞEN'e ve Öğr. Gör. Ofcan OFLAZ'a yürekten teşekkür ederim.

Bu tez sürecinde her zorluğa karşı bana güç veren, sevgisi, sabrı ve anlayışıyla her an yanımda olan sevgili annem Melahat ERDOĞMUŞ'a ve kardeşim Emre ERDOĞMUŞ'a; yaşamımdaki yeri ve bana kazandırdıkları ile daima yanımda hissettiğim sevgili babam Mustafa ERDOĞMUŞ'a tüm emekleri ve bana olan inançları için en içten teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

2D	2 Boyutlu
3D	3 Boyutlu
BPA	Bisfenol A
BPAF	Bisfenol AF
BPF	Bisfenol F
BPS	Bisfenol S
BPZ	Bisfenol Z
CAT	Katalaz
DEHP	Di (2-etilheksil) ftalat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
EFSA	European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
ER	Östrojen Reseptörü
FBS	Fötal Bovin Serum
FDA	Food and Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi)
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
IC ₅₀	%50 Inhibitory Concentration (%50 İnhibitör Konsantrasyon)
LMA	Düşük Erime Noktalı Agar
MCF7	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (Michigan Cancer Foundation-7)
MDA	Malondialdehit
MEHP	Mono (2-etilheksil) ftalat
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)2,5-difeniltetrazolyum bromür
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NMA	Normal Erime Noktalı Agar
NTP	National Toxicology Program (Ulusal Toksikoloji Programı)

OECD	Organization for Economic Cooperation and Development (Ekonomik İş Birliği ve Kalkınma Örgütü)
PBS	Fosfat Tamponu Çözeltisi
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis (Tek Hücre Jel Elektroforezi)
SEM	Ortalamanın Standart Hatası
SOD	Süperoksit Dismutaz
TG	OECD Test Guidelines (OECD Test Kılavuzları)
TNF α	Tümör Nekroz Faktörü α
TR	Tiroid Reseptörü
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
TRxR	Tiyoredoksin Redüktaz
UNEP	United Nations Environment Programme (Birleşmiş Milletler Çevre Programı)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. BPA'nın yapısal formülü.	2
Şekil 1.2. BPS'nin yapısal formülü.	8
Şekil 1.3. BPF'nin yapısal formülü.	10
Şekil 1.4. BPAF'nin yapısal formülü.	12
Şekil 1.5. BPZ'nin yapısal formülü.	14
Şekil 2.1. MCF7 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (%80-85 dolulukta).	31
Şekil 2.2. Çalışmamızda kullanılan test kimyasalları.	33
Şekil 2.3. Test kimyasalları ile yapılan MTT testi basamakları.	36
Şekil 2.4. Test kimyasalları ile yapılan Komet testi basamakları.	39
Şekil 2.5. Sodyum selenitin koruyucu etkinliğinin araştırıldığı Komet testi basamakları.	40
Şekil 3.1. Bisfenol türevlerinin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) ± standart hata değerleri (SEM).	44
Şekil 3.2. Bisfenol türevlerinin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) ± standart hata değerleri (SEM).	45
Şekil 3.3. Sodyum selenitin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) ± standart hata değerleri (SEM).	47
Şekil 3.4. Sodyum selenitin 3 nM konsantrasyonunun 16 saatlik ön maruziyeti sonrası, bisfenol türevlerinin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) ± standart hata değerleri (SEM).	49
Şekil 3.5. Sodyum selenitin 10 nM konsantrasyonunun 16 saatlik ön maruziyeti sonrası, bisfenol türevlerinin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) ± standart hata değerleri (SEM).	50
Şekil 3.6. BPA'nın test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı sonuçları.	52
Şekil 3.7. BPS'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı sonuçları.	53
Şekil 3.8. BPF'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı sonuçları.	54
Şekil 3.9. BPAF'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı sonuçları.	55

Şekil 3.10. BPZ'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı sonuçları.

56



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Avrupa Birliği, Amerika Birleşik Devletleri ve Türkiye’de BPA ile ilgili yürürlüğe giren regülasyonlar.	5
Çizelge 1.2. OECD kılavuzlarında yer alan genotoksisite testleri (OECD, 2017).	16
Çizelge 3.1. Çalışılan bisfenol türevlerinin MTT sonuçlarına göre % canlılık değerleri.	41
Çizelge 3.2. Çalışılan sodyum selenitin MTT sonuçlarına göre % canlılık değerleri.	41
Çizelge 3.3. Çalışılan test materyallerinin MTT testi sonrası hesaplanan IC ₅₀ değerleri.	42
Çizelge 3.4. Bisfenol türevlerinin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) ± standart hata değerleri (SEM).	43
Çizelge 3.5. Sodyum selenitin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) ± standart hata değerleri (SEM).	46
Çizelge 3.6. Sodyum selenitin seçilen konsantrasyonlarının 16 saatlik ön maruziyeti sonrası, bisfenol türevlerinin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) ± standart hata değerleri (SEM).	48

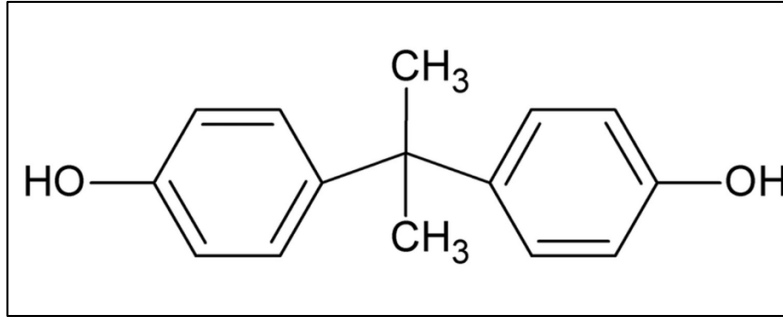
1. GİRİŞ

1.1. Bisfenol A Özellikleri ve Kullanım Alanları

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP) tarafından hazırlanan "State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals" raporuna göre, endokrin bozucu kimyasallar, vücutta hormon sistemini etkileyen dış kaynaklı maddeler veya karışımlardır. Bu kimyasallar, hormon reseptörleri, hormon sentezi ve dönüşümü üzerindeki etkileri ile hormonların doğal işlevlerini bozarak, insanlarda ve hayvanlarda üreme, gelişim, metabolizma ve davranış gibi süreçlerde olumsuz sağlık etkilerine yol açabilir (WHO, 2002).

Endokrin bozucu kimyasalların neden olabileceği başlıca sağlık sorunları arasında sperm kalitesinde düşüş, genital malformasyonlar, düşük doğum ağırlığı ve gebelik komplikasyonları gibi üreme sağlığı sorunları; tiroid bozukluklarıyla ilişkilendirilen nörodavranışsal bozukluklar; meme, prostat ve tiroid gibi endokrin ilişkili kanserlerin artışı; obezite ve tip 2 diyabet gibi metabolik bozukluklar yer almaktadır (Bergman vd., 2013; WHO, 2002).

UNEP ve WHO'nun endokrin bozucu kimyasallar listesinde bulunan Bisfenol A (BPA) (UNEP, 2017), ilk olarak A.P. Dianin tarafından 1891'de sentezlenmiş ve 1936'da östrojenik aktivitesi bulunmuştur (Eladak vd., 2015). BPA, $C_{15}H_{16}O_2$ kimyasal formülüne ve 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan kimyasal isimlendirmesine sahip, 228,29 g/mol molekül ağırlığında sentetik bir organik bileşiktir ve özellikle polikarbonat plastiklerin ve epoksi reçinelerin üretimindeki rolü ile bilinir (Şekil 1.1.). İki hidroksifenil grubu içeren bisfenoller olarak bilinen bileşikler grubuna aittir ve asidik koşullar altında asetonun iki eşdeğer fenol ile yoğunlaştırılması yoluyla sentezlenir. BPA tipik olarak oda sıcaklığında beyaz, kristalimsi bir katıdır. Suda az çözünen BPA'nın etanol, metanol, aseton ve toluen gibi organik çözücülerdeki çözünürlüğü yüksektir (Abraham ve Chakraborty, 2020; Padberg vd., 2019; Staples vd., 1998). Genel olarak BPA'nın sitokrom P450 tarafından katalize edilen oksidasyon reaksiyonları ile biyoaktif edildiği ve glukuronidasyon reaksiyonları ve sülfasyon reaksiyonları ile detoksifiye edildiği öne sürülmektedir. BPA'nın toksik etkilerinin alkol dehidrogenaz, aldehit dehidrogenaz 2 ve sülfotransferaz 1E1 varlığında azaldığı ve sitokrom P450 2E1 varlığında arttığı gösterilmiştir (Lee vd., 2016).



Şekil 1.1. BPA'nın yapısal formülü.

Endüstriyel alanda ve günlük hayatta sertlikleri, şeffaflıkları ve ısıya dayanıklılıkları nedeniyle sık olarak kullandığımız polikarbonat plastiklerin üretiminde anahtar bir role sahip olan BPA, su şişeleri, bebek biberonları, oyuncaklar, termal kağıtlar, ev aletleri ve tıbbi ekipmanlar gibi çeşitli malzemelerde kullanılmaktadır. BPA ayrıca epoksi reçinelerinin üretiminde de önemli bir bileşendir. Bu reçineler, güçlü yapışkan özellikleri ve kimyasal dirençleri nedeniyle yiyecek ve içecek kapları, yapıştırıcılar, boyalar, elektrikli ve elektronik laminatlar için iç koruyucu kaplamalar olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Abraham ve Chakraborty, 2020; Ma vd., 2019). Havada, toprakta, suda, gıdalarda, hayvanlarda ve suda yaşayan organizmalarda bulunan BPA'ya maruziyet esas olarak sindirim, solunum ve dermal emilim yoluyla gerçekleşir.

Plastiklerden gıdalara BPA geçişi, çoğunlukla konserve kapları sterilizasyon için ısıtıldığında görülür (Catenza vd., 2021). Asit, ısı ve sıcaklık gibi faktörler, BPA moleküllerini polikarbonata ve epoksi reçineye bağlayan ester bağlarının hidrolizini artırdığı için, pH değeri düşük besinler ve kullanılan kaplara ısı uygulanması BPA'nın gıdalara geçişini artırmaktadır (Ayazgök ve Küçükkinç, 2017). Plastiklerin bozulmasıyla oluşan tozların solunması ve iç mekanlardaki düşük hava kalitesi önemli maruziyet yolları arasındadır. BPA bulunan makbuz ve termal kağıtların kullanımı da ciltten emilimi artırabilir (Catenza vd., 2021).

Isıya maruz kaldığında siyaha dönüşen termal kağıtta renk geliştirici olarak da kullanılan BPA, genellikle makbuzlarda, biletlerde ve etiketlerde bulunur. Tıp alanında, BPA bazlı malzemeler sterilizasyon sırasındaki stabiliteyi ve tıbbi alet ve cihazların üretiminde; dayanıklılıkları ve ağız koşullarına dirençleri nedeniyle dolgu macunları ve kompozitler gibi dişçilik malzemelerinde değerlendirilmektedir (Ma vd., 2019; Rochester ve Bolden, 2015).

1.2. Bisfenol A Toksisitesi

BPA yıllar içerisinde üreme sistemi hastalıkları, gelişim ve davranış bozuklukları, metabolik rahatsızlıkları ve kanser gibi pek çok rahatsızlık ile ilişkilendirilmiştir (Eladak vd., 2015). Östrojen reseptör (ER) α ve β gibi endokrin reseptörlerine bağlanarak hormonal sistem üzerinde önemli etkiler gösteren BPA, reseptörleri hem aktive veya bloke ederek hücre sinyal yollarını doğrudan etkilemektedir. Ayrıca plasenta bariyerinden geçerek fetüs üzerinde de potansiyel riskler oluşturmaktadır. Özellikle yumurtalık granüloza hücreleri ana hedef hücreler arasında yer alırken, androjen reseptörlerine bağlanma yeteneği ile reseptör antagonisti olarak da bilinmektedir (Lee vd., 2013; Lee vd., 2016; Perera vd., 2015).

BPA'nın üreme sistemi üzerinde olumsuz etkileri olduğu epidemiyolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır. BPA, cinsiyet hormonlarının aktivitesini kesintiye uğratarak üreme sisteminin gelişimini ve işlevini olumsuz yönde etkilemektedir. Araştırmalar, BPA'nın estradiol, progesteron, luteinize edici hormon ve testosteron seviyelerini artırabileceğini, kortizol seviyelerini ise düşürebileceğini göstermiştir. BPA, polikistik over sendromu, düşük, erken doğum ve erken membran rüptürü gibi olumsuz gebelik sonuçlarıyla ilişkilendirilmiştir (Ma vd., 2019; Shoorei vd., 2023). BPA'nın erkeklerde sperm kalitesini düşürdüğü, cinsel işlevi azalttığı ve doğurganlığı olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Sperm hareketliliği, hızı ve konsantrasyonu ve erkek üreme işlevinde bozulma ile yakından ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, erektil ve ejakülasyon zorluklarını artırdığı ve cinsel memnuniyeti azalttığı belirtilmiştir (Catenza vd., 2021; Santiago vd., 2024) Genel olarak, BPA, seks hormonlarının aktivitesini bozarak üreme fonksiyonlarını olumsuz etkilemekte ve kısırlığa kadar giden etkiler yaratmaktadır.

BPA'nın gelişimsel etkileri, özellikle fetüsün beyin, bağışıklık sistemi ve üreme organlarının gelişimini olumsuz etkileyebileceğinden endişe vericidir. BPA'nın anne yolu ile fetüse geçmesi gelişimsel bozukluklara veya doğum kusurlarına yol açabilmektedir. Araştırmalar, doğum öncesi BPA maruziyetinin ergenliğe geçiş sürelerinde etkili olabildiğini göstermiştir. Ayrıca düşük doğum ağırlığı, organ gelişimi sorunları ve çocuklukta davranışsal bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. BPA'nın, fetüste beyin gelişimini etkilediği ve hiperaktivite, uyku sorunları ve dil gelişimi gibi davranışsal sorunlara yol açabildiği gözlemlenmiştir (Guignard vd., 2022; Ma vd., 2019). BPA'nın, erken kemik hücrelerinde apoptozu

indükleyerek iskelet sistemi gelişimini bozduğu ve embriyolarda morfolojik değişikliklere yol açtığı belirtilmiştir (Chanemougavally vd., 2023).

BPA, nöroendokrin fonksiyonları bozması sebebiyle, fizyolojik süreçleri ve hormonal düzenlemeyi olumsuz etkileyerek obezite, diyabet ve kardiyovasküler sorunlar gibi metabolik bozukluklara yol açmaktadır. BPA'nın yağ depolanması ve insülin düzenlemesi üzerindeki etkisi, özellikle kronik maruziyeti olan bireylerde bu hastalıkların riskini artırabilmektedir (Catenza vd., 2021; Ma vd., 2019). Çeşitli hücre sinyal yolları aracılığıyla metabolik hastalıklarla ilgili dokularda bozukluklara neden olarak kan damarları, iskelet kası, yağ dokusu, karaciğer, pankreas, böbrek ve kalpte işlev bozukluklarına yol açmaktadır (Kang vd., 2023). BPA'nın, yağ dokusunda proinflatuar yolları indükleyerek interlökin 6, interlökin 1 β ve tümör nekroz faktörü α (TNF α) gibi sitokinleri uyardığı ve kronik inflamasyona ve obezite ile ilişkili metabolik bozukluklara katkıda bulunduğu görülmüştür (González-Casanova vd., 2023). Ayrıca adipogenezi indüklediği, lipid birikimini artırdığı ve hücrel homeostazı bozduğu, bu etkilerin de oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonla sonuçlandığı belirtilmiştir (Maniradhan ve Calivarathan, 2023). BPA'nın tiroid hormonlarına yapısal olarak benzerliği sebebiyle tiroid reseptörlerine yarışmalı olarak bağlandığı ve gen ekspresyonunu bozduğu gözlenmiştir (Zhang vd., 2018). BPA maruziyeti karaciğer yağlanması, hepatotoksisite, oksidatif stres, malondialdehit (MDA) seviyelerinde artış ve glutatyon seviyelerinde azalma ile ilişkilendirilmiş (Hassani vd., 2018).

BPA, meme, prostat, yumurtalık, rahim ağzı ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerin gelişimi için bir risk faktörü olabilmektedir. BPA maruziyeti yumurtalık ve meme kanseri hücrelerinin göçünün, invazivliğinin ve metastazının artışı ile ilişkilendirilmiş, kanser kök hücre farklılaşmasını indükleyerek tümör yayılma potansiyelini artırdığı belirtilmiştir (Catenza vd., 2021). BPA'nın östrojenik aktivitesinin, meme kanseri gelişimini başlatabilecek meme bezi proliferasyonunu ve hiperplazisini indüklediği ve potansiyel kanserojen özellikleri gösterilmiştir (Winz vd., 2024). BPA'nın, ER α ve ER β 'ya bağlanarak hücre çoğalmasını ve apoptozu etkilediği ve onkojenik sinyal yollarını aktive ettiği gözlemlenmiştir (Dumitrascu vd., 2020). BPA'nın prostat spesifik antijeni ile doğru orantılı olarak ilişkili olduğu ve potansiyel bir prostat kanseri etkeni olduğu belirtilmiştir (Li vd., 2024a). BPA maruziyetinin akciğer hücrelerinde G2/M hücre döngüsünün durmasına neden olarak hücre proliferasyonun azalmasına ve nekrozun artmasına yol açtığı gösterilmiştir (Aysin, 2024).

BPA üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, 2008 yılında Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) ve 2010 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) BPA maruziyetinin gösterdiği olumsuz etkiler hakkında endişelerini bildirmiştir (Ayazgök ve Küçükkilinç, 2017). Yıllar içerisinde bu endişeler, BPA kullanımının dünya çapında sınırlandırılması ve yasaklanmasına giden yolu açmıştır.

1.3. Bisfenol A Regülasyonları

BPA ile yapılan çalışmalar sonucunda insan sağlığı üzerindeki olası olumsuz etkileri nedeniyle dünya çapında bir dizi düzenleme yapılmış ve BPA'nın kullanımı her yeni regülasyon ile daha da kısıtlanmıştır. Avrupa Birliği'nin plastik malzemelerden gıdaya geçebilecek BPA migrasyon limitini 0,6 mg/kg olarak sınırlandırmasını takiben BPA içeren bebek biberonlarının yasaklanması ile bisfenol türevleri arayışları hızlanmıştır (EU, 2011a; EU, 2011b). Avrupa Birliği'nin bu kararını FDA ve Türkiye de takip etmiş BPA'nın biberonlarda ve bebekler için kullanılan malzemelerde kullanımını yasaklamıştır (FDA, 2012; FDA, 2013; TGK, 2019a). Yine Avrupa Birliği'nin aldığı kararları takiben Türkiye'de de oyuncaklarda ve gıda ile temasta olan kaplamalarda BPA migrasyon limitleri sırasıyla 0,04 mg/L ve 0,05 mg/kg olarak düzenlenmiştir (EC, 2009; EU, 2018; TGK, 2019b). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından 2015'te BPA için 4 µg/kg olarak belirlenen geçici Tolere Edilebilir Günlük Alım Miktarı, 2023'teki yeni karar ile 0,2 ng/kg olarak tekrar düzenlenmiştir (EFSA 2015; EFSA, 2023a). Avrupa Birliği, Amerika Birleşik Devletleri ve Türkiye'de BPA ile ilgili yürürlüğe giren regülasyonlar Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Avrupa Birliği, Amerika Birleşik Devletleri ve Türkiye'de BPA ile ilgili yürürlüğe giren regülasyonlar.

Ülke	Regülasyon Tarihi	Regülasyon
Avrupa Birliği	2011	EU 10/2011 numaralı yönetmelik ile plastik malzemelerden gıdaya geçebilecek BPA miktarı 0,6 mg/kg olarak sınırlandırılmıştır (EU, 2011a).
	2011	2011/8/EU numaralı düzenleme ile BPA içeren polikarbonat bebek biberonlarının üretim, ithalat ve satışı yasaklanmıştır (EU, 2011b).
	2015	BPA için geçici Tolere Edilebilir Günlük Alım Miktarı 4 µg/kg olarak belirlenmiştir (EFSA, 2015).

Çizelge 1.1. (Devam) Avrupa Birliği, Amerika Birleşik Devletleri ve Türkiye’de BPA ile ilgili yürürlüğe giren regülasyonlar.

Ülke	Regülasyon Tarihi	Regülasyon
Avrupa Birliği	2016	REACH kapsamında yapılan 1907/2006 numaralı düzenleme ile 2020 itibariyle termal kağıtlardaki BPA oranı ağırlıkça en fazla %0,02 olacak şekilde sınırlandırılmıştır (REACH, 2006).
	2017	Oyuncak Güvenliği Direktifi kapsamında 2009/48/EC numaralı yönergede düzenleme yapılmış ve BPA’nın oyuncaklardaki migrasyon limiti 0,04 mg/L olarak belirlenmiştir (EC, 2009).
	2018	2018/213 numaralı yönetmelik ile gıda ile temas etmesi amaçlanan vernik ve kaplamalarda BPA’nın migrasyon limiti 0,05 mg/kg olarak sınırlandırılmıştır (EU, 2018).
	2023	Güncellenen yeni karar ile BPA için Tolere Edilebilir Günlük Alım Miktarı 0,2 ng/kg olarak belirlenmiştir (EFSA, 2023a).
Amerika Birleşik Devletleri	2012	BPA içeren polikarbonat reçinelerin bebek biberonlarında kullanılması yasaklanmıştır (FDA, 2012).
	2013	BPA bazlı epoksi reçinelerin bebek maması ambalajlarında kaplama olarak kullanılması yasaklanmıştır (FDA, 2013).
Türkiye	2019	Polikarbonat reçinelerin bebekler için kullanılan malzemelerde kullanımı yasaklanmıştır (TGK, 2019a).
	2019	36 aydan küçük çocuklar tarafından kullanıma yönelik veya ağza alınan oyuncaklarda BPA limiti 0,1 mg/L’den 0,04 mg/L’ye düşürülmüştür (TB, 2019).
	2019	BPA’nın spesifik migrasyon limiti 0,05 mg/kg olarak belirtilmiştir (TGK, 2019b).

BPA ile ilgili regülasyonlar, özellikle sağlık üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle ülkemizde de dahil olmak üzere son yıllarda artmıştır. BPA, plastiklerin ve reçinelerin üretiminde yaygın olarak kullanılsa da endokrin sistemini bozabileceği ve hormonal dengesizliklere yol açabileceği yönündeki bilimsel bulgular, çeşitli ülkelerdeki regülasyonların sıklaştırılmasına yol açmıştır. Özellikle gıda ambalajları ve bebek ürünleri gibi hassas tüketici ürünlerinde BPA’nın kullanımına sınırlamalar getirilmiştir. Bu düzenlemeler, endüstride alternatif maddeler arayışını hızlandırmıştır. Bu bağlamda, BPA’ya yapısal olarak benzeyen bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF), bisfenol AF (BPAF) ve bisfenol Z (BPZ) gibi yeni bisfenol türevleri geliştirilmiştir. “BPA-içermez” ibarelerinin yer aldığı yeni plastik malzemelerde bisfenol türevlerinin hala kullanılıyor olması, bu türevlerin de sağlık üzerindeki etkilerini tartışma konusu haline getirmiştir. Endüstri, BPA’nın yerini alacak daha güvenli ve çevre dostu malzemeler ararken, aynı zamanda üretim süreçlerini ve maliyetlerini

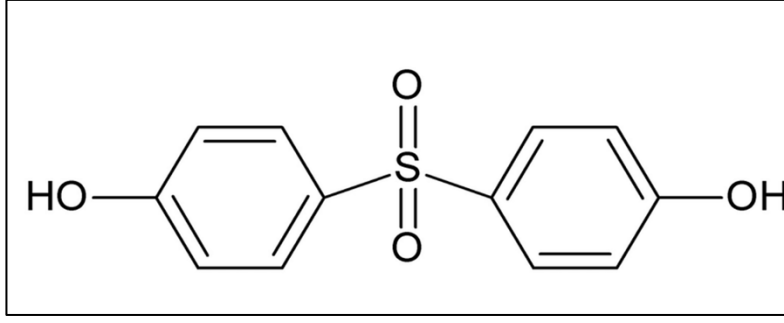
optimize etmek zorunda kalmıştır. Bu süreç, hem kimya sektöründe inovasyonu teşvik etmiş hem de regülasyonların getirdiği zorunluluklarla denge kurmayı gerektirmiştir. BPA yerine kullanılmakta olan türevlerin organizma üzerindeki BPA benzeri etkileri araştırılmaya devam etmektedir.

1.4.Bisfenol A'ya Alternatif Kullanılan Türevler

1.4.1. Bisfenol S Özellikleri ve Toksisitesi

BPS, BPA'nın sağlık risklerine ilişkin endişeler nedeniyle BPA'ya alternatif olarak kullanılan kimyasal bir bileşiktir. UNEP ve WHO'nun endokrin bozucu kimyasallar listesinde bulunan BPS'nin (UNEP, 2017) kimyasal isimlendirmesi bis (4-hidroksifenil) sülfon şeklindedir ve yapısal olarak BPA'nın karbon bağlantısından farklı olarak bir sülfonil grubu ile bağlanmış iki fenol grubu içermektedir (Şekil 1.2.). Bu değişiklik benzer fiziksel özellikler kazandırarak BPS'yi polikarbonatlar, epoksi reçineler ve termal kağıt üretimi gibi uygulamaların çoğunda kullanışlı hale getirmiştir. Çoğu özelliği BPA'ya benzer olan BPS, 250,27 g/mol molekül ağırlığında, oda sıcaklığında beyaz, kristalimsi bir tozudur ve etanol gibi organik çözücülerde çözünmektedir. Bununla birlikte, BPS ısıya ve ışığa karşı BPA'dan daha dayanıklıdır, bu da onu tüketici ürünlerinde daha kullanışlı hale getirmiştir ancak aynı zamanda potansiyel olarak çevrede daha kalıcıdır (Padberg vd., 2019; Rochester ve Bolden, 2015; Zenata vd., 2017).

BPS metabolizması ve detoksifikasyonunda glukuronidasyonun ana yolak olduğu ve üridin difosfat glukuronil transferaz 1A9'un bu süreçte önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Skledar vd., 2016). BPS'ye maruziyet de BPA gibi sindirim, solunum ve dermal emilim yollarıyla olmaktadır. BPA'ya alternatif olarak en sık kullanılan ve en çok araştırılan bu türev, gıda ambalajlarında, içecek kaplarında, termal kağıt ürünlerinde, vücut ve saç bakım ürünleri, makyaj malzemeleri, losyonlar, diş macunu gibi kişisel bakım ürünlerinde, konservelede, biberonlarda, korozyon önleyici kaplamalar ve yapıştırıcılarda bulunabilmektedir (Thoene vd., 2020; Wang vd., 2022).



Şekil 1.2. BPS'nin yapısal formülü.

BPA'ya yapısal olarak benzediği için endokrin bozucu aktivite gösterdiği, östrojen reseptörlerine bağlanabildiği ve kardiyovasküler sistem, metabolik bozukluklar ve üreme sağlığı üzerinde olumsuz etkilere yol açtığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, BPS'yi çoğunlukla kanser, metabolik bozukluklar, obezite, DNA hasarı, karaciğer hasarı, nöral hasar, oksidatif stres, endokrin etkiler ve üreme etkileri ile ilişkilendirmiştir.

BPS maruziyetinin reaktif oksijen türlerini (ROS) ve MDA seviyelerini artırarak sinyal yolları aracılığıyla hücre hasara ve apoptoza yol açtığı görülmüştür (Gao vd., 2024; Pu vd., 2024). Oksidatif stresi indükleyerek, kırmızı kan hücresi membran lipidlerini değiştirerek ve hiperlipidemiye neden olup kırmızı kan hücresi agregasyonu ve venöz tromboz riskini artırarak potansiyel olarak insan sağlığını olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir (Li vd., 2023). BPS'nin, tiroid reseptörlerine (TR) bağlanıp tiroid hormonlarını taklit ederek transkripsiyonel aktivitenin değişmesine yol açabildiği, sinyal yollarını bozarak T3 gibi tiroid hormonlarında gözlemlenen etkilere benzer şekilde, proliferasyon ve farklılaşma gibi hücresel süreçlerin değişmesine neden olabildiği gösterilmiştir (Aprilett vd., 1998; García-Silva ve Aranda, 2004).

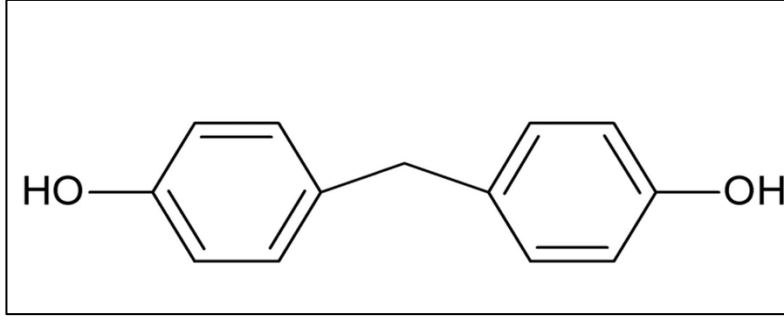
BPS, endometriyal epitel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu teşvik ederek, insan üreme sistemi gelişimi ve işlevi üzerinde BPA maruziyetinde gözlemlenenlere benzer potansiyel olumsuz etkilere işaret etmektedir (Benjamin vd., 2023). BPS'nin, yumurtalık granüloza hücrelerinde folikül uyarıcı hormon reseptörü ve siklik adenosin monofosfat/protein kinaz A sinyal yolunu aktive ederek östrojen sentezinin artmasına neden olduğu (Zhang vd., 2024), germ hücre kistlerinin parçalanmasını hızlandırması, oosit kalitesini bozması, oksidatif stres ve otofaji disfonksiyonu gibi yollar ile üreme sağlığını bozduğu bildirilmiştir (Gao vd., 2024). BPS'ye uzun süreli düşük dozda maruz kalınması, hormon salgılanmasını bozabilmekte ve insan yumurtalık epitel hücrelerinde hücre döngüsünün durmasına neden olarak üreme sistemi gelişimini ve işlevini potansiyel olarak etkileyebilmektedir (Li vd., 2024b). BPS'nin,

diğer bisfenol analogları gibi, androjen reseptörü ile etkileşime girerek işlevini engelleyebileceği gösterilmiştir. Testosteron seviyelerini değiştirerek spermatogenez süreci, sperm kalitesi, sperm hareketliliği gibi parametrelerde bozulmaya neden olduğu, testis işlev bozukluğuna yol açabildiği ve doğurganlık sorunlarına neden olabildiği belirtilmiştir. BPS'nin anti-androjenik etkilere sahip olabildiği ancak genellikle BPA ile karşılaştırıldığında daha az güçlü olduğu düşünülmektedir (Kitamura vd., 2005; Leisegang vd., 2014; Torres-Badia vd., 2023).

Östrojenik aktivitesinden dolayı özellikle hormonlara duyarlı kanser türleriyle ilişkilendirilen BPS, hücrelerin aşırı büyümesine ve kanser hücrelerinin gelişmesine yol açabilmektedir. BPS'nin özellikle meme kanseri gibi östrojen bağımlı kanser türlerinde tümör gelişimini teşvik edebileceği (Molina vd. 2024) ve prostat hücrelerinin proliferasyonunu artırarak kanser riskini artırabileceği gösterilmiştir (Ju vd., 2024). Ayrıca, BPS maruziyetinin DNA hasarına, oksidatif strese ve hücrel mutasyonlara neden olabileceği, bu etkilerin de kanser gelişimine katkı sağlayabileceği belirtilmiştir (Catenza vd., 2021). Çalışmalar, TR'lerin onkojenik yolları baskılayabildiğini ve BPS'nin TR'ler üzerinde etkisinin bu baskılamayı bozarak potansiyel olarak tümör oluşumunu teşvik edebileceğini göstermektedir (García-Silva ve Aranda, 2004).

1.4.2. Bisfenol F Özellikleri ve Toksisitesi

BPA'ya diğer bir alternatif olarak sentezlenen ve UNEP ve WHO'nun endokrin bozucu kimyasallar listesinde bulunan BPF'nin (UNEP, 2017) kimyasal isimlendirmesi 1,1-bis (4-hidroksifenil) metan şeklindedir ve molekül ağırlığı 200,23 g/mol'dür. İki fenol halkasının bir metilen grubu ile bağlanmasıyla oluşan BPF, beyaz, kristal yapıya sahiptir (Şekil 1.3.). BPA gibi suda düşük çözünürlüğe organik çözücülerde ise yüksek çözünürlüğe sahiptir. Isıya ve ışıığa karşı orta derecede dayanıklıdır ancak yüksek sıcaklıklara maruz kaldığında bozunmaya başlayabilmektedir. Ayrıca BPF'nin, BPA'ya kıyasla çevrede daha az kalıcı olduğu ve daha hızlı bir şekilde bozunabileceği bazı kaynaklar tarafından belirtilmektedir (Fic vd., 2013; Fouyet vd., 2021; Padberg vd., 2019)



Şekil 1.3. BPF'nin yapısal formülü.

BPF vücutta metabolize edilerek biyotransformasyon süreçlerine tabi tutulur ve esas olarak karaciğerin detoksifikasyon enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Bu süreçte, BPF glukuronidasyona ve sülfatasyona uğrar, bu da onu daha suda çözünebilir hale getirerek vücuttan idrar yoluyla atılmasını kolaylaştırır. (Zühlke vd., 2020) Endüstride ve günlük hayatta birçok malzemede kullanılan BPF, polimerlerin ve epoksi reçinelerinin sertleştirilmesi gibi uygulamalarda sıklıkla yer alır ve dayanıklılık ve kimyasal direnç gerektiren ürünlerde tercih edilir. Su boruları, endüstriyel zemin kaplamaları, su depoları, elektrik kabloları ve kimyasal maddelere karşı dirençli tank kaplamalarında kullanılır. Ayrıca BPF, yapışkanlar, dış dolgu malzemeleri, gıda paketleri, koruyucu kaplamalar, losyon kutuları, bilet, makbuz, termal kağıt gibi kağıt ürünleri gibi daha yaygın tüketici ürünlerinde bulunabilir. Ayrıca ortamdaki havada da bulunarak solunum yolu ile maruz kalınabilir (Fouyet vd., 2021; Liao ve Kannan, 2013; Zühlke vd., 2020).

BPF'nin birçok çalışmada, yapısal olarak östrojene benzerliği nedeniyle zayıf östrojenik aktivite gösterdiği ve östrojen reseptörlerine bağlanarak zayıf bir hormon benzeri etki yaratma potansiyeli ile endokrin sistem üzerinde etkiler yaratabildiği belirtilmiştir. Bu özellik, BPF'nin hormonal dengeleri bozma riskini artırabilmektedir, ancak BPA gibi diğer bisfenollerle kıyaslandığında daha düşük bir östrojenik etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Komarowska vd., 2021). Bu etkilerinden dolayı metabolik hastalıklarla, üreme sistemi bozuklukları ve kanser gibi birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir.

BPF'nin endokrin bozucu etkileri, özellikle hormonal dengeleri bozarak metabolik süreçlerde sorunlara yol açabilmektedir. BPF'nin, diyabet, obezite ve kalp-damar hastalıkları gibi metabolik bozukluklarla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. BPF, vücutta östrojen benzeri aktivite göstererek hormon dengesini bozabilir ve yağ birikimini tetikleyebilir, bu da kilo alımına ve insülin direncine yol açabilir. Çalışmalar, BPF'nin yağ dokusunda lipid birikimini

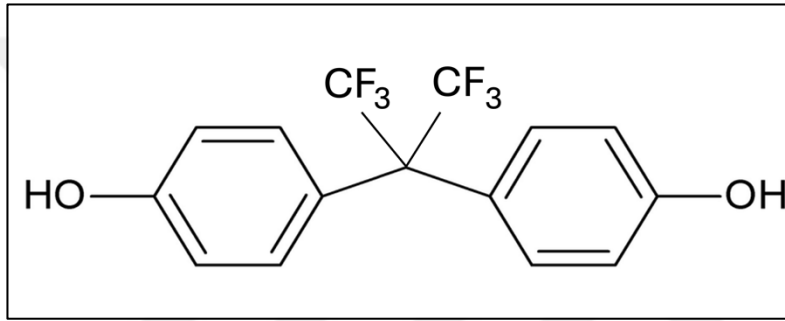
artırabileceğini ve glukoz metabolizmasını bozarak diyabete katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Ayrıca, BPF'nin tiroid fonksiyonlarını bozarak tiroid hormon dengesizliklerine neden olduğu ve bu durumun metabolik hız ve enerji dengesini etkilediği de belirtilmiştir. BPF'nin oksidatif stres ve inflamasyon oluşturduğu, bu nedenle kalp-damar hastalıklarına ve diğer kronik hastalıklara katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Alharbi vd., 2022; Fouyet vd., 2021; Liao ve Kannan, 2013; Wang vd., 2022).

BPF, tıpkı BPA gibi, kadın üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. BPF, östrojen reseptörleriyle etkileşime girerek ve hormonal dengeyi bozarak doğurganlık sorunları, polikistik over sendromu ve erken menopoz riskini artırabilmektedir (Wang vd., 2024). Yumurtalık foliküllerinin gelişimini inhibe edebilmekte, folikül sayısında azalmaya yol açabilmekte ve böylece düşük yumurta kalitesine ve doğurganlığın azalmasına sebep olabilmektedir. Ayrıca hormon düzensizlikleri ve inflamasyon süreçlerinin tetiklenmesiyle endometriyozis ile ilişkilendirilmektedir (Silva vd., 2023). BPF'nin plasenta bariyerinden geçebilmesinden dolayı gebelik sırasında BPF'ye maruz kalmanın, fetal gelişimi olumsuz etkileyebileceği ve erken doğum riskini artırabileceği görülmüştür. Ayrıca, BPF'nin plasentadaki fonksiyonları bozarak fetüs üzerinde kalıcı etkiler bırakabileceği rapor edilmiştir (Algonaima vd., 2023). Çalışmalar, BPF'nin de BPA gibi androjen reseptörleri üzerinde androjenik ve anti-androjenik etkiler yaratabildiğini ve testosteron seviyelerini düşürebildiğini, sperm üretimi ve fonksiyonları üzerinde bozulmalara neden olabileceğini ortaya koymaktadır. BPF'nin testosteron üretimini azaltarak ve artan oksidatif stresin sperm DNA'sında hasar oluşturmasıyla testis fonksiyonlarını bozabileceği, erkeklerde kısırlık riskinde artışa, sperm hareketliliği ve sayısında azalmaya neden olabileceği bildirilmiştir (Odetauo vd., 2023; Ullah vd., 2019)

BPF'nin östrojen reseptörlerini özellikle de ER α 'yı aktive ettiği ve bu yolla hücre çoğalmasını teşvik ederek meme kanseri gelişiminde rol oynayabileceği belirtilmiştir. Ayrıca çalışmalar BPF'nin BPA'ninkine benzer yolları aktive edebileceğini ve östrojen reseptörlerini içeren mekanizmalar yoluyla potansiyel olarak karaciğer hasarının ve kanser riskinin artmasına yol açabileceğini göstermektedir (Fouyet vd., 2021; Recchia vd., 2004; Stillwatvd., 2020).

1.4.3. Bisfenol AF Özellikleri ve Toksisitesi

BPA yerine kullanılan bir diğer türev olan BPAF, 2,2-bis(4-hidroksifenil) hekzafloropropan kimyasal isimlendirmesine sahiptir ve molar kütlesi 336,23 g/mol olan bir bileşiktir (Şekil 1.4.). Genellikle beyaz veya açık gri renkte bir toz halinde bulunur ve ısıya ve ışığa karşı nispeten dirençli olup, yüksek sıcaklıklara dayanabilecek şekilde sentezlenmiştir. Suda çözünürlüğü oldukça düşük olmasına rağmen, organik çözücülerde çözünürlüğü daha yüksektir. Bu özellikleri, bileşiğin BPA yerine çeşitli kimyasal ve endüstriyel uygulamalarda kullanılmasında önemli rol oynamaktadır (Akash vd., 2023; Escrivá vd., 2021).



Şekil 1.4. BPAF'nin yapısal formülü.

BPAF, genellikle yüksek ısı ve kimyasal dayanıklılık özellikleri nedeniyle elektronik cihazlar, otomotiv parçaları ve optik disklerde kullanılan polimerler gibi yüksek performans gerektiren plastik ve polimerlerin üretiminde; koruyucu kaplamalar, yapıştırıcılar ve kompozit malzemelerde yer alan kimyasal ve mekanik direnç gerektiren epoksi reçinelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca su ve içecek şişeleri, konserve gıdalar, sterilizasyona dayanıklı tıbbi cihazlar ve laboratuvar ekipmanları üretiminde de yer almaktadır (Escrivá vd., 2021; García-Recio vd., 2023; Maćczak vd., 2017; Mokra vd., 2017)

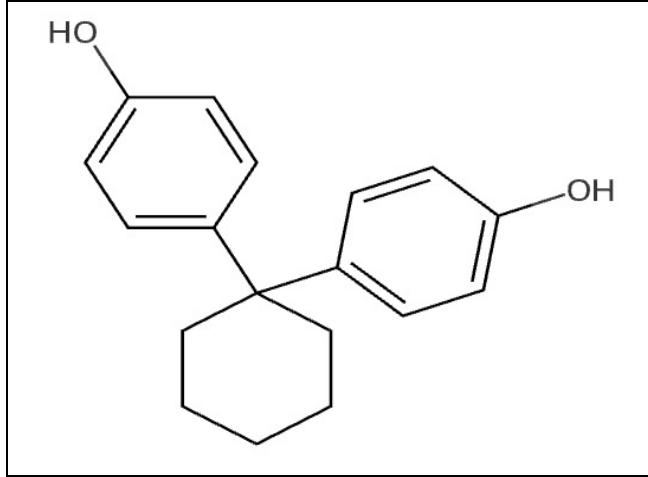
BPAF'nin de diğer bisfenol türevleri gibi karaciğer enzimleri tarafından metabolize edildiği ve çoğunlukla glukuronidasyon reaksiyonları ile konjugatları şeklinde atıldığı görülmüştür. Biyotransformasyon sonucu oluşan konjugatlarının BPAF'ye göre daha düşük östrojenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Li vd., 2013).

BPAF'nin östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenik aktivite gösterdiği ve bu yolla hormonal sinyalleri etkileyerek üreme sistemi, meme dokusu ve diğer östrojen bağımlı sistemlerde bozulmalara yol açabileceği çalışmalarda belirtilmiştir. Özellikle, östrojen reseptör alt tiplerinden ER α 'yı aktive ederek östrojen benzeri etkiler oluşturduğu ve ER β üzerinde antagonistik etkiler gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca androjenik reseptörler üzerinde de etkili olabilen BPAF'nin, androjen reseptörlerine bağlanarak bu reseptörlerin aktivitesini inhibe edebileceği ve androjen hormonlarının etkilerini zayıflatabileceği belirlenmiştir. Bu durum, BPAF'nin testosteron seviyelerini düşürebileceğini ve androjen bağımlı süreçleri bozabileceğini göstermektedir (Li vd., 2013; Skledar vd., 2019)

BPAF, bir endokrin bozucu olarak, birçok metabolik hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Obezite ve diyabet üzerindeki etkileri, BPAF'nin hormonal sinyalleri bozma kapasitesinden kaynaklanmaktadır. BPAF, yağ dokusu ve insülin üretimi üzerindeki etkileriyle, vücudun metabolik dengesini bozabilmekte ve insülin direncine katkıda bulunabilmektedir. BPAF'nin, özellikle insülin üreten pankreas hücrelerinin işlevini bozarak kan şekeri regülasyonunu etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca, BPAF'ye uzun süreli maruziyetin, kalp kası fonksiyonlarını zayıflatarak kalp krizi, inme ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıkların riskini artırabildiği belirtilmiştir. Bunun yanında, BPAF'nin damar sertliği ve koroner arter hastalığı gibi durumlara yol açabileceği de rapor edilmiştir. BPAF'nin tiroid hormonlarını etkileyerek ve tiroid bezinin fonksiyonlarını bozarak, metabolik hızın yavaşlamasına ve metabolik dengesizliklere neden olabildiği gözlenmiştir (Akash vd., 2023; Escrivá vd., 2021)

1.4.4. Bisfenol Z Özellikleri ve Toksisitesi

BPZ, 1,1-bis(4-hidroksifenil) sikloheksan olarak da bilinir ve moleküler ağırlığı 268,35 g/mol'dür (Şekil 1.5.). Beyaz katı bir madde olan BPZ, suda çözünmez ancak metanol, etanol gibi organik çözücülerde çözünmektedir. Fiziksel olarak dayanıklı bir yapıya sahip olan BPZ, ısıya ve ışığa karşı oldukça dirençlidir bu nedenle polimer üretimi gibi uygulamalarda tercih edilmektedir. Anestezi bileşenlerin sentezinde, plastik ürünlerde, elektrik yalıtım malzemelerinde, kişisel ürünlerde, gıda paketlerinde ve kağıt ürünlerinde kullanılmaktadır (Kovačič vd., 2019; Lee vd., 2019; Schmidt vd., 2013).



Şekil 1.5. BPZ'nin yapısal formülü.

Çalışmalar, BPZ'nin diğer bisfenol analogları gibi karaciğerde sitokrom P450 enzimleri ve glutatyon konjugasyonu ile metabolize edildiğini ve metabolitlerin oluştuğunu göstermiştir (Schmidt vd., 2013). Diğer bisfenol analogları gibi, BPZ'nin de östrojen reseptörlerini taklit ettiği, östrojenik yolları bozarak üreme sağlığı, metabolizma ve diğer vücut fonksiyonları üzerinde potansiyel olarak olumsuz etkilere yol açtığı gösterilmiştir (Akash vd., 2023; Zühlke vd., 2020). Yapılan bir çalışmada BPZ'nin tiroid hormonları üzerindeki etkisi araştırılmış ve T3 ve T4 seviyelerinde düşüşler gözlenmiştir (Lee vd., 2018).

BPZ, genellikle daha az tüketici ürününde bulunduğu ve nispeten daha özel endüstriyel uygulamalarda kullanıldığı için BPS, BPF ve BPAF'ye göre üzerinde daha az çalışılan bir türevidir ve BPZ'nin potansiyel etkileri konusunda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

1.5. Genotoksisite Testleri

Mutajenite, bir kimyasalın ya da bir etkenin, somatik veya germ hücrelerinde DNA düzeyinde baz çifti değişiklikleri, eklemeler veya silmeleri içeren ve potansiyel olarak kalıtsal olan yapısal kromozom hasarlarını ifade etmektedir. Genellikle bir maddenin mutajenik özelliği kanserojenitesi ile yüksek oranda ilişkilidir. Genotoksisite ise mutajeniteden daha geniş bir terimdir ve hücrenin DNA'sı, kromozomları veya replikasyon mekanizması üzerindeki herhangi bir hasar veya etkiyi ifade etmektedir (Maurici vd., 2005; Turkez vd., 2017; Umbuzeiro vd., 2017).

Pestisitler, çevresel kirleticiler, ağır metaller ve gıda toksinleri, sigara, diyet, tıbbi görüntüleme, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar gibi çevresel faktörlerin DNA hasar seviyelerini değiştirdiği gösterilmiştir. (Naik vd., 2024; Prakarsh ve Mansi, 2024; Turkez vd., 2017). Birçok şekilde maruz kalınan kimyasallar sonucu vücutta oluşan DNA hasarının, kısırlık, kardiyovasküler hastalık, erken yaşlanma, kök hücre disfonksiyonu, kronik enflamatuvar durumlar ve metabolik sendromlar dahil olmak üzere birçok insan patolojisinde rol oynadığı bilinmektedir (Turkez vd., 2017).

DNA, gen ve kromozomlarda veya replikasyon süreçlerinde meydana gelen hasarları veya değişiklikleri belirlemek ve olası kanserojen ve mutajen maddeleri tespit etmek için hem *in-vitro* hem de *in-vivo* yöntemler ile yapılan testlere genotoksisite testleri adı verilmektedir. Genotoksik potansiyelin belirlenmesi için tek bir test yeterli olmadığından, *in-vitro* bakteri ve memeli hücre kültürü testleriyle birlikte *in-vivo* kemirgen deneyleri de yapılmaktadır. Bu testler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, pestisitler ve kimyasalların geliştirilmesinde erken tarama amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, çevresel numunelerde tehlikeli maddeleri tarayarak hava, su, toprak gibi ortamlardaki mutajenik ve kanserojen maddelerin tespitine yardımcı olmaktadır. Genotoksisite değerlendirmesi, uluslararası mevzuatlar çerçevesinde çeşitli maddelerin güvenlik değerlendirmesinin önemli bir parçasıdır (Corvi ve Madia, 2017; Turkez vd., 2017; Mohamed vd., 2017; Umbuzeiro vd., 2017).

Genotoksisitenin değerlendirilmesi, onarılabilen ve dolayısıyla geri döndürülebilen birincil DNA hasarının ölçülmesinin yanı sıra kararlı ve geri döndürülemez hasarın (gen mutasyonları ve kromozomal anormallikler gibi) tanımlanmasını da kapsamaktadır. Geri döndürülemez hasarlar özellikle germ hücrelerinde ortaya çıktığında, genomik bütünlüğü koruyan mekanizmaların bozulmasının yanı sıra sonraki nesillere aktarım potansiyeline sahiptir. Genotoksisitenin kapsamlı bir değerlendirmesi karsinogenez ve kalıtsal bozukluklarla bağlantılı olan gen mutasyonları, yapısal kromozomal sapmalar ve sayısal kromozomal sapmalar olmak üzere üç temel noktanın incelenmesini gerektirmektedir. OECD (Ekonomik İş Birliği ve Kalkınma Örgütü) Sağlık Etkileri Test Kılavuzları (TG), kimyasal maddelerin yarattığı potansiyel tehlikeleri tespit etmek ve karakterize etmek için devlet kurumları, sanayi sektörleri ve bağımsız laboratuvarlar tarafından kullanılan testlere ilişkin kılavuzlar sunmaktadır (Corvi ve Madia, 2017; Mohamed vd., 2017; Turkez vd., 2017). OECD kılavuzlarında yer alan genotoksisite testleri Çizelge 1.2.'de yer almaktadır.

Çizelge 1.2. OECD kılavuzlarında yer alan genotoksisite testleri (OECD, 2017).

OECD Kodu	Test Adı
TG 471	Bakteriyel Ters Mutasyon Testi (Ames Testi)
TG 472	Genetik Toksikoloji: Escherichia coli, ters analiz
TG 473	<i>In-Vitro</i> Memeli Kromozomal Aberasyon Testi
TG 474	Memeli Eritrosit Mikronükleus Testi
TG 475	Memeli Kemik İliği Kromozomal Aberasyon Testi
TG 476	Hprt and xpprt Genleri ile <i>In-Vitro</i> Memeli Hücresi Gen Mutasyon Testi
TG 477	Genetik Toksikoloji: Drosophila melanogaster'de Cinsiyete Bağlı Resesif Letal Test
TG 478	Genetik Toksikoloji: Kemirgen Dominant Letal Testi
TG 479	Genetik Toksikoloji: Memeli Hücrelerinde <i>In-Vitro</i> Kardeş Kromatid Değişimi Testi
TG 480	Genetik Toksikoloji: Saccharomyces cerevisiae, Gen Mutasyon Testi
TG 481	Genetik Toksikoloji: Saccharomyces cerevisiae, Mitotik Rekombinasyon Testi
TG 482	Genetik Toksikoloji: DNA Hasarı ve Onarımı, <i>In-Vitro</i> Memeli Hücrelerinde Planlanmamış DNA Sentezi
TG 483	Memeli Spermatogonial Kromozomal Aberasyon Testi
TG 484	Genetik Toksikoloji: Fare Spot Testi
TG 485	Genetik Toksikoloji: Fare Kalıtsal Translokasyon Testi
TG 486	Fare Karaciğer Hücreleri ile <i>In-Vitro</i> Programlanmamış DNA Sentezi (UDS) Testi
TG 487	<i>In-Vitro</i> Memeli Hücresi Mikronükleus Testi
TG 488	Transgenik Kemirgen Somatik ve Germ Hücre Gen Mutasyon Testi
TG 489	<i>In-Vivo</i> Memeli Alkali Komet Testi
TG 490	<i>In-Vitro</i> Memeli Hücresi Gen Mutasyon Testi

In-vitro testler birincil genotoksisiteyi değerlendirmek için uygunken, *in-vivo* yaklaşım çoğunlukla inflamasyon, oksidatif stres yoluyla ikincil genotoksik etkiler hakkında bilgi sağlamaktadır. Testlerin çoğu kendi özel sınırlamalarını sergilemektedir. Örneğin AMES testi veya farklı hücrelerde hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz mutasyonlarının analizi ve transgenik kemirgenlerin kullanılması mutajenitenin tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Ancak, komet, kromozomal aberasyon, mikronükleus, kardeş kromatid değişimi ve programlanmamış DNA sentezi dahil olmak üzere diğer testler genotoksisiteyi tespit edebilirken mutajeniteyi tespit edememektedir (Turkez vd., 2017).

Avrupa Birliği'nde kozmet ürünler için *in-vivo* testlerin yapılması yasaklanmıştır ancak endüstriyel kimyasallar ve biyolojik ürünler için *in-vitro* genotoksisite testlerinden bir veya daha fazlasının pozitif sonuç vermesini takiben uygun *in-vivo* test ile tayin gerekmektedir. *In-vitro* testlerde negatif sonuç çıkan kimyasalların genotoksik etkiye sahip olmadığı kabul edilmekte ve *in-vivo* çalışmalara devam edilmemektedir (Corvi vd., 2017). *In-vivo* hayvan testleri, yüksek maliyetler ve yanıt elde etme süresinin uzun olması nedeniyle çevresel numunelerle nadiren gerçekleştirilmektedir. Balık, midye, kemirgenler ve tarla veya kafes hayvanlarını kullanarak çevredeki mutajeniteyi tespit etmek için önerilen stratejiler oldukça pahalı, zahmetli, uzun sürelidir ve yüksek eğitimli personel gerektirmektedir (Umbuzeiro vd., 2017).

Bisfenol A ve endüstride kullanılan diğer türevlerinin de yapılan çalışmalar ile genotoksik etkiler gösterdiği belirtilmiştir. BPA'nın DNA zincir kırılmalarını ve mikronükleus oluşumunu indüklediği, yapısal kromozom sapmalarına neden olduğu ve uzun süreli maruziyette anöploidiye yol açtığı, apoptozu tetikleyerek hücre canlılığı ve işlevi üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu gözlenmiştir (Iso vd., 2006; Tiwari vd., 2012; Turra vd., 2024; Yu ve Liu, 2022). Ayrıca inflamatuvar yolları aktive edebilecek hücre içi serbest radikallerin oluşmasını artırabileceğine, oksidatif stres yoluyla ve hücre onarım mekanizmalarına müdahale ederek DNA hasarını indükleyebileceğine, kromozomal değişiklikleri ve mutasyon oluşturma ve potansiyel kanserojen etkileri olabileceğine işaret edilmiştir (Charles ve Prince, 2024; Ďurovcová vd., 2022; Tsutsui vd., 1998). BPS'nin ise BPA'ya göre daha az genotoksik olduğu ancak yine de kromozomal bozukluklara ve DNA çift zincir kırılmalarına yol açtığı (Lee vd., 2013), 24 saatlik maruziyette DNA hasarını indüklediği gösterilmiştir (Fic vd., 2013). Bir diğer türev olan BPF'nin hücreler üzerinde kromozomal sapmalar, DNA hasarı ve hücre işlev bozukluğu gibi etkiler gösterebildiği belirtilmiştir (Fic vd., 2013; Rochester ve Bolden, 2015). BPA'ya göre daha fazla DNA zincir kırıklarına neden olduğu gözlenen BPAF'nin, östrojen reseptörlerine daha güçlü bağlandığı ve daha güçlü genotoksik etkileri olduğu görülmüştür (Mokra vd., 2017).

1.5.1. Komet Testi

Rydberg ve Johanson, 1978'de, DNA onarım mekanizmalarına yönelik araştırmaların bir parçası olarak memeli hücrelerinde DNA tek zincir kırıklarının belirlenmesi için elektroforez kullanarak tek hücre jel elektroforezi (SCGE) olarak da bilinen komet testinin

erken tekniklerini geliştirmişlerdir (Rydberg ve Johanson, 1978). 1984 yılında DNA hasarını, özellikle de hücrelerde radyasyon kaynaklı DNA zincir kırıklarını görselleştirmek için Östling ve Johanson, bu yöntemi nötral pH şartlarında uygulayarak geliştirmiştir (Ostling ve Johanson, 1984). 1988’de ise Singh, DNA'daki hem tek zincir kırıklarının hem de alkaliye dayanıklı bölgelerin tespit edilmesine olanak tanıyan alkali komet tekniğini geliştirerek yöntemi çok daha hassas ve çok yönlü hale getirmiştir (Singh vd., 1988). Kimyasallar, radyasyon ve nanomateriyaller de dahil olmak üzere çeşitli ajanların neden olduğu DNA hasarını tespit etmede önemli bir araç haline gelmiş olan Komet testi, farklı organizmalarda hem *in-vitro* hem de *in-vivo* çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Komet testi hücrelerin cam lam üzerinde agaroz yayılması ile başlar ve daha sonra çözünür hücre bileşenlerini, membranları ve histonları ortadan kaldırmak için yüksek tuz ve deterjanda lizis edilir. Hasarlı hücrelerde DNA bütünlüğü bozulur ve agara yayılır. DNA sarmalı belirlenen pH’da gevşetilir ve elektroforez uygulaması yapılır. Elektroforez sırasında negatif yüklü olan DNA zincir kırıkları pozitif yüklü anota göç ederek, yöntemde adını veren, adeta bir kuyruklu yıldız kuyruğu oluşturur. Nötralizasyon sonrası hücreler fluoresan boya ile boyanır ve mikroskop altında hasar ölçümü yapılır. Kuyruk yoğunlu DNA hasarı ile doğru orantılıdır (Azqueta ve Collins, 2006; Cordelli ve Pacchierotti, 2021; Turkez vd., 2017).

Komet testinin, nötr komet testi ve alkali komet testi olarak isimlendirilen iki varyasyonu ortaya çıkardıkları DNA hasarı türleri bakımından farklılık göstermektedir. Nötral komet testi, DNA'yı çift sarmal formunda tutan ve sadece çift zincir kırıklarının tespit edilmesini sağlayan nötr pH'da (pH 7 civarında) gerçekleştirilmektedir. İyonlaştırıcı radyasyon gibi DNA sarmalının her iki ipliğini de doğrudan etkileyen DNA hasarına odaklanan çalışmalar için değerli bir yöntemdir. Alkali komet testi ise DNA'yı denatüre eden, çift sarmallı DNA'yı tek sarmallara ayıran ve tek zincir kırıklarını ortaya çıkaran alkali koşullar altında (pH > 13) gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem ile DNA-protein, DNA-DNA çapraz bağlanmaları, çift ve tek zincir kırıkları, alkali işaretli bölgeler, oksidatif baz hasarları ve DNA onarımları tespit edilebilmektedir. Nötr komet testine göre daha hassas ve çok yönlüdür. (Azqueta ve Collins, 2006; Cordelli ve Pacchierotti, 2021; Piperakis, 2009).

Komet yönteminin uygulanmasında bazı dezavantajlar ile karşılaşılabilir. Deney sonuçları, özellikle manuel puanlamada, okuma yapan kişiye bağlı olduğu için yanlılığa eğilimli olabilmektedir. Bunun önlenmesi için bilgisayar programları kullanılarak

standardizasyon sağlanmaya çalışılmaktadır ancak farklı yazılım paketlerinde kullanılan algoritmalarındaki farklılıklar ölçümlerde tutarsızlıklara yol açabilmektedir. Deney koşullarının standardize olmaması nedeniyle laboratuvarlar arası sonuçlar farklılık gösterebilmektedir. Apoptozun karakteristik özelliği olan küçük DNA parçaları elektroforez başlamadan dağıldığı için apoptotik DNA bozulması ve mitokondriyal DNA çok küçük ve nükleer matrise bağlı olmadığından test sırasında dağıldığı için mitokondriyal DNA'daki hasar bu yöntem ile doğru analiz edilememektedir. DNA hasarının çok yüksek seviyelerde olduğu durumlarda hasarlı DNA parçaları kuyrukta yoğunlaşacağı için ölçüm sonuçlarında hata riski artmaktadır. Ayrıca çakışan veya üst üste binen hücrelerin analizi ve buna uygun hücre yoğunluğu ayarlaması zorlayıcı olabilmektedir. Farklı boyama yöntemleri farklı sonuçlar verebilmekte ve ölçümlerin doğruluğunu etkileyebilmektedir (Azqueta ve Collins, 2006; Collins vd., 2008; Kumaravel vd., 2009).

Bunların yanında komet testi, genotoksik araştırmalar ve hücre hasarının tespiti için yaygın olarak kullanılan basit, öğrenmesi kolay, hassas ve maliyet açısından ekonomik bir yöntemdir. Bu test hem bitkiler hem de birçok prokaryotik hücre türü de dahil olmak üzere geniş bir yelpazedeki ökaryotik hücrelerde *in-vivo*, *in-vitro* ve *ex-vivo* olarak başarıyla uygulanabilmektedir. Bu özelliği, araştırmacıların farklı deneysel koşullarda uygulama yapmalarını kolaylaştırmaktadır. Testin en önemli avantajlarından biri, tek hücre seviyesinde DNA hasarını tespit edebilme yeteneğidir; bu, daha derinlemesine ve kesin analizler yapılmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca, non-invazif bir yöntem olması bu testin tercih edilme sebeplerinden biridir. Çalışmalarda taze ya da dondurulmuş numunelerle çalışılabilmesi de araştırma koşullarında esneklik sağlamaktadır. Testin gerçekleştirilmesi için düşük miktarda hücre ile (örneğin, 10.000-50.000 hücre gibi) çalışılabiliyor olması, araştırmacılar açısından büyük bir avantajdır. Bunun yanı sıra, komet testi hem kalitatif hem de kantitatif sonuçlar verebilmesiyle, elde edilen verilerin geniş bir perspektifte değerlendirilmesine imkan sunmaktadır. Tüm bu özellikler, komet testinin genotoksik testler arasında yaygın olarak tercih edilen ve sıklıkla kullanılan bir yöntem haline gelmesini sağlamıştır. (Azqueta ve Collins, 2006; Piperakis, 2009; Turkez vd., 2017).

Test kimyasallarına maruz kalan hayvanların çeşitli dokularından alınan hücrelerdeki DNA zincir kırıklarını değerlendirmek için kullanılan *in-vivo* memeli alkalın komet testi, 2016 yılında OECD'nin test kılavuzlarına OECD TG 489 kodu ile dahil edilerek valide edilmiştir (OECD, 2016).

1.6. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin organizmalardan izole edilmesi ve hücrelerin doğal ortamlarının dışında, uygun bir yapay ortamda kontrollü bir şekilde yetiştirilmesini içeren temel bir tekniktir (Betsy ve Siva, 2023; Salauddin, 2022). Hücre kültürü çalışmaları ile ilgili ilk girişimlerden biri, 1885 yılında Wilhelm Roux'un civeiv embriyoları ile hücrelerin organizma dışında muhafaza edilmesine yönelik çalışmaları olmuştur. Dokuların *in-vitro* olarak yetiştirilmesinde öncülerden biri olan Ross Granville Harrison, 1907 yılında kurbağa sinir hücrelerinin bir lenf ortamında büyümesini başarıyla göstererek hücrelerin doğal ortamlarının dışında büyüüp bölünebileceğini kanıtlamıştır (Jedrzejczak-Silicka, 2017).

Hücre kültüründe yeni alet ve malzemelerin üretilmesi, yeni hücre kültürü tekniklerinin, aseptik tekniklerin, tripsinleme methodlarının ve antibiyotik kullanımının öne sürülmesi ile hızla devam eden bu çalışmaların dönüm noktalarından biri, 1951 yılında Henrietta Lacks isimli bir hastanın rahim ağzı kanseri hücrelerinden HeLa hücreleri olarak bilinen ilk ölümsüz insan hücre hattının oluşturulması olmuştur (Jedrzejczak-Silicka, 2017; Landecker, 2000).

Penisilin ve streptomisin gibi antibiyotiklerin hücre kültüründe kullanılması, araştırmacıların bakteriyel kontaminasyonu sınırlamasına olanak tanıyarak daha uzun ve daha istikrarlı kültürler elde edilmesini kolaylaştırmıştır. 1998 yılında Thomson ve Gearhart, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen insan embriyonik kök hücrelerini başarılı bir şekilde izole etmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında son yıllarda yaşanan en büyük sıçramalardan biri ise, iki boyutlu (2D) hücre kültürünün yanı sıra hücrelerin daha doğal ortamlarda büyümesine ve gerçek dokuları taklit etmesine olanak tanıyan üç boyutlu (3D) hücre kültürlerinin ve organoid teknolojisinin geliştirilmesidir. Bu gelişmeler hastalıkların incelenmesi, ilaç testleri ve doku mühendisliği için daha gerçekçi modeller sağlamaktadır (Edmondson vd., 2014); Jedrzejczak-Silicka, 2017).

Hücre kültürü tekniği, farmasötik biyokimyasalların üretimi, embriyolojik çalışmalar, rekombinant biyomateriyaller ve aşı üretimi, ilaçların test edilmesi, ilaç duyarlılığı ve hücrelerin sitotoksitesi, farklı enzimlerin, sentetik hormonların, immüno-biyolojik ve antikanser ajanların üretimi, mikrobiyolojik çalışmalar, yaşlanma, toksik bileşik çalışmaları, hücre morfolojisi ve fizyolojisi çalışmaları gibi daha birçok alanda kullanılmaktadır (Hudu vd., 2016; Salauddin, 2022; Wang vd., 2016).

Yaygın olarak kullanılan 2D hücre kültürü, hücrelerin polipropilen ve polistiren gibi plastik bir yüzey üzerinde, bir petri kabında veya flaskta düz, tek tabakalı kültürler halinde çoğaltılması işlemidir. Bu kültür türü hücre davranışını incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak canlı organizmalardaki dokuların karmaşık ortamını tam olarak taklit edememektedir. Hücrelerin kolajen ve matrigel içeren hidrojeller gibi hücre dışı matrisi taklit eden bir substrat veya iskele içinde çoğalmasını sağlayan 3D hücre kültürü modeli ise *in-vivo* koşulları daha iyi taklit etmektedir ancak daha karmaşık cihaz ve materyallerin gerekliliği nedeniyle 2D hücre kültürü çalışmaları daha ekonomiktir (Edmondson vd., 2014; Vieira vd., 2024; Yang vd., 2024).

Hücre kültürü çalışmalarında primer hücreler, devamlı hücreler ve kök hücreler olmak üzere 3 farklı hücre tipi kullanılmaktadır. Dokulardan taze olarak izole edilen ve sınırlı bir yaşam süresine sahip olan primer hücreler genellikle orijinal dokunun özelliklerini korumak için kullanılmaktadır. Ölümsüzleştirilmiş devamlı hücreler, doğru koşullar altında süresiz olarak çoğalacak şekilde modifiye edilmiştir ve bu hücreler uzun süreli deneyler ve yüksek verimli taramalar için kullanılmaktadır. Çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip olan embriyonik ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler ise rejeneratif tıp ve hastalık modellemesi çalışmaları için sıklıkla tercih edilmektedir (Jedrzejczak-Silicka, 2017; Masters ve Stacey, 2007).

Hücrelerle çalışırken hücrelerin enfekte olmaması için laminar akış kabininde çalışılmalı, kullanılan tüm malzemeler steril olmalı ve işlemler sırasında aseptik tekniklere sadık kalınmalıdır. Hücrelerin sağlığını korumak adına, düzenli aralıklarla hücre morfolojisi mikroskop altında kontrol edilmeli, besin tükenmesi ve metabolik atık birikmesi sonucu hücre ölümünün engellenmesi için hücrelerin kapladığı yüzey alanı oranı izlenmelidir. Pasaj sırasında tripsinizasyon gibi işlemler sırasında aşırı bekleme sürelerinden kaçınılmalıdır. Pasaj oranı, hücre büyüme hızına göre ayarlanmalı, kullanılan besi yeri, hücre tipine uygun olarak seçilmeli ve sık aralıklarla değiştirilmelidir. İnkübatörde ise 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ ortamı sağlanarak hücrelerin optimum koşullarda büyümesi garanti altına alınmalıdır (Jedrzejczak-Silicka, 2017; Salauddin, 2022).

1.6.1. MCF7 Hücre Hattı

MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7) hücre hattı, meme kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir insan meme adenokarsinomu hücre hattıdır. MCF7 hücre hattı, 1973 yılında Dr. Herbert Soule ve çalışma arkadaşları tarafından, metastatik meme kanseri olan 69 yaşındaki bir kadından alınan meme tümöründen izole edilmiştir. Hücrelerin orijini, metastatik bir meme adenokarsinomu olduğu için MCF7 olarak adlandırılmıştır (Comşa vd., 2015). MCF7 hücre hattı ER pozitif ve progesteron reseptörü pozitif ve luminal A moleküler alt tipine aittir. Normalde düşük metastatik potansiyele sahip olduğu düşünülen, düşük seviyede agresif olan ve invazif olmayan bir hücre hattıdır (ATCC, 2024; Comşa vd., 2015).

MCF7 hücreleri, ER pozitif olduğu için, östrojenin meme kanseri hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkilerini incelemek için ideal bir modeldir. Araştırmacılar, bu hücreler üzerinde östrojen reseptörlerinin rolünü, hormon bağımlı hücre proliferasyonunu ve tümör gelişimini araştırmaktadır. Bu hücre hattı, östrojenin hücre içindeki sinyal yollarını nasıl aktive ettiğini ve bu yolların meme kanserinde nasıl etkili olduğunu yani östrojen reseptör sinyallemesinin moleküler mekanizmalarını araştırmak için de kullanılmaktadır (Aniogo vd., 2022; Comşa vd., 2015; Li vd., 2014).

Meme kanseri hücrelerinde östrojen reseptörlerini bloke eden bir ilaç olan tamoksifen, östrojen reseptör pozitif meme kanserlerinin tedavisinde önemli bir yere sahiptir. MCF7 hücre hattı, tamoksifen gibi anti-östrojen ilaçlara yanıtı araştırmak, tedavilerin etkilerini incelemek ve tedavi stratejilerini optimize etmek amacıyla çalışmalarda kullanılmaktadır. Ayrıca uzun süreli hormon tedavileri sonucunda gelişen ilaç direnç mekanizmalarının anlaşılması için önemli bir model oluşturmaktadır (Comşa vd., 2015; Li vd., 2017; Morgan vd., 2018; Neevedh vd., 2024). Yeni kanser ilaçlarının geliştirilmesinde, hücrelerin ilaçlara nasıl yanıt verdiğinin ve hangi dozlarda etkili olduğunun araştırılmasında kullanılan bu hücre hattı, kemoterapi ilaçlarının yanı sıra hedefe yönelik biyolojik ajanların etkinliğini değerlendirmek için ve farklı ilaç kombinasyonlarının etkinliği ve güvenliğinin değerlendirilmesi çalışmalarında da kullanılmaktadır (Chen vd., 2022; Comşa vd., 2015; Holiar vd., 2019).

Gen ekspresyonu, genetik mutasyonlar, sinyal iletim yolları ve hücre döngüsünün kanser gelişimindeki rolünün araştırılması; DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik değişikliklerin meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesi üzerindeki etkileri için

yapılan çalışmalar da MCF7 hücre hattı kullanılarak yapılmaktadır (Abramczyk vd., 2016; Du vd., 2014; Khan vd., 2012). Meme kanseri hücrelerinin diğer dokulara nasıl yayıldığını ve metastaz yapma mekanizmalarını, tümör hücreleri ile tümör mikroçevresi arasındaki etkileşimlerin nasıl olduğunu, kanser hücrelerinde apoptozun nasıl tetiklendiğini, hangi sinyal yollarının rol oynadığını ve kanser hücrelerinin apoptozdan nasıl kaçındığını anlamak için ve bunlara karşı geliştirilen apoptotik ilaçların etkinliği ile ilgili MCF7 hücre hattı üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Gupta vd., 2017; Isnaini vd., 2028; Kaplan ve Pazarcı, 2024; Morgan vd., 2018).

Meme kanseri, genotoksik çalışmalar için önemli bir model sistem olarak kullanılmaktadır çünkü bu kanser türünde meydana gelen genetik değişiklikler, tümör oluşumunun ve ilerlemesinin temel nedenlerinden biridir. MCF7 gibi meme kanseri hücre hatları, benzo[a]pyrene ve pestisit gibi çevresel kirleticilerin, bisfenoller ve ftalatlar gibi endokrin bozucu kimyasalların (Blom vd., 1998; Coppola vd., 2022; Zhang vd., 2012), x-ray ışınları, aflatoksin gibi kanserojen maddelerin yol açtığı DNA kırıkları, mutasyonlar ve kromozomal anormalliklerin belirlenmesi için ideal araçlardır. Bu çalışmalar, kanserin gelişiminde rol oynayan genetik ve epigenetik değişiklikleri anlamada kritik veriler sağlayarak, daha hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (Luparello vd., 2021; Mahmoud vd., 2023; Tchounwou vd., 2014).

1.7. Selenyum Özellikleri ve Koruyucu Etkisi

Selenyum atom numarası 34 olan bir elementtir. Yaygın olarak hem selenit ve selenat gibi inorganik formlarda hem de selenometiyonin ve selenosistein gibi organik formlarda bulunmaktadır. Selenyumun çözünürlüğü ve biyoyararlanımı formuna bağlı olarak değişmektedir. Selenometiyonin gibi organik selenyum bileşikler, inorganik formlara kıyasla daha kolay emilmekte ve biyolojik olarak kullanılabilir (Avery ve Hoffman, 2018; Kieliszek ve Błażej, 2013).

Selenyum, çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunur ve en zengin kaynaklarından biri brezya cevizi olup, selenyum içeriği 0,2 ile 512 µg/g arasında değişmektedir. Mayalar da özellikle selenyum ile zenginleştirildiğinde 500 ile 4000 µg/g arasında selenyum içerebilmektedir. Balık ve deniz ürünleri, yumurta, tavuk, sığır eti, domuz eti, süt ve süt ürünleri de selenyum içeren besin kaynaklarıdır. Genel olarak sebzelerde selenyum oranı

düşük olmakla birlikte mantarlar ve sarımsak gibi bitkisel kaynaklar iyi bir selenyum kaynağı olabilmektedir. Selenyum içeriği, yetiştirildiği toprağın zenginliğine bağlı olarak gıdalarda farklılık göstermektedir. Ayrıca vücuttaki selenyum eksikliğini gidermek için gıda takviyelerinde ve güçlendirilmiş gıdalarda kullanılmaktadır. (Kieliszek, 2019).

Selenyum, selenatların selenitlere dönüşümü şeklinde indirgenme reaksiyonları ve daha az toksik olan dimetilselenit ve trimetilselenonyuma dönüşümü şeklinde metilasyon reaksiyonları ile metabolize olmaktadır. Selenosistein ve selenometiyonin, selenyumun biyolojik olarak aktif formlarıdır ve bu aktif formlar proteinlerin yapısında bulunabildiği gibi protein sentezi için selenite metabolize de edilmektedir (Kieliszek, 2019; Kieliszek ve Błażej, 2013).

Selenyum vücutta kaslar, karaciğer, böbrek ve tiroid dahil olmak üzere çeşitli dokularda dağılmakta ve selenoprotein P yoluyla diğer dokulara taşınmaktadır. Ayrıca eritrositlerde, bağışıklık hücrelerinde, testislerde ve beyinde bulunmaktadır. Selenyum, tRNA ve ribozomal mekanizmaları içeren özel bir mekanizma aracılığıyla 21. amino asit olan selenosistein olarak proteinlere dahil edilmektedir (Avery ve Hoffman, 2018; Kieliszek ve Błażej, 2013; Sobolev vd., 2018).

Selenyum, özellikle zararlı serbest radikalleri ve lipid peroksidleri nötralize eden, oksidatif hasara karşı koruma sağlayan glutatyon peroksidaz (GPx) ve hücre içi redoks dengesini koruyan tiyoredoksin redüktaz (TRxR) gibi selenoproteinlerdeki rolü nedeniyle çeşitli fizyolojik işlevler için gereklidir. Ayrıca inaktif tiroid hormonlarını aktif formlarına dönüştürmeye yardımcı olan iyodotironin deiyodinaz yoluyla tiroid hormon metabolizmasında da rol oynamaktadır (Genchi vd., 2023; Kieliszek ve Błażej, 2013; Kim vd., 2021).

Selenyumun tiroid hormon regülasyonu, kas fonksiyonu, oksidatif stresi önleme, bağışıklık fonksiyonunu destekleme ve potansiyel olarak kanser risklerini azaltmada etkileri olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stresi azaltarak çevresel toksinlerin, iltihaplanmanın ve hatta viral enfeksiyonların zararlı etkilerini azaltmaya yardımcı olmaktadır. Selenyum, cıva, kadmiyum ve uranyum gibi metallerin zararlı biyolojik reaksiyonlara katılmasını önleyen kararlı kompleksler oluşturarak vücudun ağır metal toksisitesine karşı korunmasında rol almaktadır (Kieliszek ve Błażej, 2013; Kim vd., 2021; Zhang vd., 2023; Zgorelec vd., 2023).

Selenyumun genotoksisiteye karşı koruyucu etkileri, selenyum bileşiklerinin özellikle uygun dozlarda kullanıldığında kansere yol açan zararlı DNA eklentilerinin oluşumunu, DNA, lipid ve proteinlerdeki oksidatif hasarı engelleyebildiğini gösteren hem *in-vitro* hem de hayvan modellerinde yapılan çalışmalarla vurgulanmaktadır (El-Bayoumy, 2001). Selenyum içeren enzimlerin DNA'yı hasardan koruduğu, antioksidan savunmaya katkıda bulunduğu, apoptozu düzenlediği ve hücre çoğalmasını etkilediği gösterilmiştir (Bubnova vd., 2023). Selenyum takviyelerinin, DNA hasarını azaltarak sperm DNA bütünlüğü üzerinde koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Moya vd., 2020). Ancak selenyum genel olarak koruyucu olsa da aşırı selenyum alımı paradoksal olarak oksidatif hasara neden olabilmekte ve genomik dengesizlik riskini artırabilmektedir. Selenyumun şekli ve dozu, koruyucu veya potansiyel olarak zararlı etkilerini belirlemede kritik öneme sahiptir (El-Bayoumy, 2001).

Selenyum seviyesinin optimal değerlerin üzerine çıkması, "selenoz" adı verilen toksik bir duruma yol açmakta ve bu durum çeşitli sağlık sorunlarını beraberinde getirmektedir. En yaygın olarak gözlemlenen etkiler arasında saç dökülmesi, tırnaklarda kırılma ve kalınlaşma, şekil bozuklukları gibi patolojik değişiklikler yer almaktadır. Sindirim sistemi üzerinde de olumsuz etkiler görülmekte olup, aşırı selenyum alımı bulantı, kusma ve ishal gibi semptomlara neden olabilmektedir. Selenyumun toksik seviyeleri, uzun vadede oksidatif stresi artırarak hücrelere zarar vermekte ve bağışıklık sisteminin zayıflamasına yol açmaktadır. Selenyumun plazma düzeyleri aşırı yüksek olduğunda, vücutta toksik bileşiklerin birikmesi gözlemlenmektedir. Hayvan çalışmaları, aşırı selenyumun vücut ağırlığında azalma, karaciğer hasarı ve böbrek fonksiyonlarında bozulmalar gibi ciddi etkilere yol açabileceğini göstermiştir (Cheng, 2021; MacFarquhar vd., 2010; Spallholz, 1994). EFSA, selenyum üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda yetişkinler için günlük Yeterli Alım Düzeyini 70 µg/gün olarak (EFSA, 2014) ve Tolere Edilebilir Üst Alım Seviyesini 255 µg/gün olarak belirlemiştir (EFSA, 2023b).

Selenyum yeterliliğini yansıtmak için araştırmacılar tarafından 70-100 µg/L (0,9- 1,3 µmol/L) arasında plazma selenyum konsantrasyonları referans olarak önerilmiştir (EFSA, 2014). Türkiye'de de yetişkinlerde kan selenyum seviyelerinin ölçümüne yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yetişkin erkek ve kadın bireylerin rastgele seçildiği bu çalışmalardan birinde 19-61 yaş arası 274 gönüllüden elde edilen verilerde ortalama selenyum plazma düzeyi 71 ± 15 µg/L olarak bildirilmiştir (Giray ve Hincal, 2004). Bir diğer çalışmada ise 20-45 yaş arasındaki kişilerde ortalama kan selenyum seviyesi 78,99 µg/L olarak tespit edilmiştir (Bal vd., 2021). Genel popülasyon üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise 68 gönüllüde ortalama selenyum konsantrasyonu kadınlarda 0,94 µmol/L ve erkeklerde 1,00 µmol/L olarak rapor

edilmiştir (Coşkun vd., 2022). Bir başka çalışmada ise sağlıklı kadınlarda ortalama serum selenyum seviyesi $55,38 \pm 8,81 \mu\text{g/L}$ ve sağlıklı erkeklerde $72,24 \pm 9,28 \mu\text{g/L}$ olarak belirlenmiştir (Kilinc vd., 2010). Bu değerler, genel olarak sağlıklı bireylerde önerilen normal kan selenyum referans değerleri aralıklarında olmakla birlikte seviyelerin alt sınıra yakın olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, selenyum içeren gıda takviyelerinin kullanımı, özellikle düşük selenyum seviyeleri nedeniyle yetersiz antioksidan savunma ve bağışıklık sistemi desteği ihtiyacı göz önüne alındığında, bu seviyeleri artırmak ve sağlıklı bir denge sağlamak adına mantıklı bir seçenek olarak düşünülebilir.

Bu tez çalışmasında endüstride ve günlük hayatta çoğu plastik malzemede kullanılan Bisfenol A ve türevleri Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF ve Bisfenol Z'nin farklı konsantrasyonlarda MCF7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki genotoksik etkilerinin ve Sodyum Selenit'in bu etkiler üzerindeki koruyuculuğunun *in-vitro* hücre kültürü yöntemi ile test edilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda tezimizin hedefleri 3 basamaktan oluşmaktadır.

1. Çalışmamızda Bisfenol A, Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF ve Sodyum Selenit'in MCF7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile analiz edilecek ve hücre canlılıkları değerlendirilecektir.
2. Çalışmamızın ikinci kısmında Bisfenol A, Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF ve Sodyum Selenit'in MCF7 hücre hattı üzerindeki genotoksik etkileri komet testi ile araştırılacak ve kuyruk yoğunluğu değerleri kullanılarak bisfenol türevlerinin DNA hasar potansiyelleri karşılaştırılacaktır.
3. Çalışmamızın son kısmında ise selenyumun sitotoksisite ve genotoksisite göstermediği seçilen dozları ile MCF7 hücre hattına ön maruziyet yapılarak, Bisfenol A, Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF ve Bisfenol Z'nin potansiyel olarak oluşturduğu DNA hasarına karşı koruyucu etkinliği komet testi ile karşılaştırılacaktır.

Tez çalışmamız kapsamında elde edilecek tüm sonuçlardan sonra çevresel bir kirletici olarak bilinen ve endokrin bozucu özelliklere sahip BPA'nın ve kullanımının sınırlandırılmasından sonra yerine kullanılan türevleri olan BPS, BPF, BPAF ve BPZ'nin meme kanseri hücresi olan MCF7 hücre hattında oluşturduğu genotoksik etkiler ve bu etkilerin sodyum selenit ile nasıl azaltılabileceği veya önlenileceği değerlendirilecektir. Tez çalışmamızdan elde edilecek sonuçlar BPA yerine kullanılan türevlerinin insan sağlığı üzerinde BPA benzeri etkiler oluşturup oluşturmadığını ve gözlenen olumsuz etkileri azaltmada sodyum selenitin potansiyel bir koruyucu ajan olarak kullanımını araştırarak literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır. Bu bulgular, çevresel kirleticilerin genotoksik etkilerinin azaltılmasına yönelik gelecekteki tedavi ve önleme stratejilerine ışık tutabilmektedir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Maddeler

Fötal Bovin Serum (FBS) (Biological Industries, İsrail)
Penisilin-Streptomisin (Gibco, ABD)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sartorius, İsrail)
Trypsin-EDTA (Sartorius, İsrail)
Trypan mavisi (Sigma, Almanya)
Fosfat Tamponu Çözeltisi (PBS) (Sigma, Almanya)
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Serva, ABD)
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (Sigma, Almanya)
Hidrojen peroksit (H₂O₂) (Sigma, Almanya)
Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya)
Hidroklorik asit (HCl) (Merck, Almanya)
Sodyum klorür (NaCl) (Zag Kimya, Türkiye)
Na₂EDTA (VWR Chemicals, ABD)
Tris (VWR Chemicals, ABD)
Sodyum lauril sarkosinat (Amresco, ABD)
Triton x-100 (Merck, Almanya)
Etanol (Merck, Almanya)
Etidyum bromür (Amresco, ABD)
Düşük erime noktalı agar (LMA) (Sigma, Almanya)
Normal erime noktalı agar (NMA) (Amresco, ABD)
Sodyum selenit (Sigma, Almanya)
Bisfenol A (Sigma, Almanya)
Bisfenol S (Sigma, Almanya)
Bisfenol F (Sigma, Almanya)
Bisfenol AF (Sigma, Almanya)
Bisfenol Z (Sigma, Almanya)

2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Karbondioksit inkübatörü (Heal Force HF240, Çin)
Santrifuj cihazı (Hettich Rotina 90, Almanya)
pH metre cihazı (WTW pH 330i, Almanya)
Hücre sayım cihazı (Bio-Rad TC20, Singapur)
İnverted Mikroskop (Micros MCX 7600, Avusturya)
Fluoresan Mikroskobu (Leica DM 1000, Almanya)
COMET Assay IV yazılımı (Perceptive Instruments, UK)
Plaka çalkalayıcı (Heidolph Titramax 101, Almanya)
Su banyosu (Boeco, Ultraterm BWT-U, Almanya)
Derin Dondurucu (-20°C) –(-80°C), (Scancool, Almanya)
Steril çalışma kabini (Esco, Class II Biological Safety Cabinet, Singapur)
Sterilizatör (Sanyo MAC 235EX, Japonya)
Hassas terazi (Sartorius CP225D, Türkiye)
Sıvı azot tankı (International Cryogenics, ABD)
Vorteks (Nüve NM110, Türkiye)
Multiplaka okuyucu (Thermo Scientific Mutiskan Co., Finlandiya)
Buz makinası (Hoshizaki, Avrupa)

2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

DMEM besi yeri: DMEM ortamına %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin eklenerek +4°C’de saklandı. Deney sırasında ise 37°C’ye ısıtılarak kullanıldı.

Stop medyum çözeltisi: %60 DMEM ve %40 FBS karışımı hazırlanarak +4°C’de saklandı. Deney öncesinde 37°C’ye ısıtılarak kullanıma hazır hale getirildi.

MTT stok çözeltisi: 5 mg MTT boyası, 1 ml PBS içerisinde çözüldü ve +4°C’de karanlık ortamda muhafaza edildi.

Düşük erime noktalı agar (LMA): %0,75'lik çözeltisi PBS ile hazırlanıp +4°C'de saklandı. Deney esnasında agar mikrodalgada eritildikten sonra 37°C'ye ısıtılarak kullanıma hazır hale getirildi.

Normal erime noktalı agar (NMA): %1'lik çözeltisi PBS ile hazırlanarak, sıcak haldeyken lamalar bu çözeltiye batırıldı ve ön yüzeyleri agar ile kaplandı. Oda sıcaklığında kurutulduktan sonra lamalar saklama kutularında saklandı.

Lizing çözeltisi: 100 mM Na₂EDTA, 2,5 M NaCl ve 10 mM Tris tartılarak distile su içinde çözülüp pH 10'a ayarlandı. pH ayarının ardından çözeltiye %1 sodyum lauril sarkosinat eklenerek, 1-2 gün boyunca tamamen homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırıldı. Stok çözelti, kullanılacağı gün %1 Triton ve %10 DMSO taze olarak eklenip +4°C'de soğutulduktan sonra kullanıma hazır hale getirildi.

Elektroforez çözeltisi: 1 mM Na₂EDTA ve 300 mM NaOH distile suda çözülerek, deney günü taze olarak hazırlandı. Çözelti, pH >13 olacak şekilde ayarlandıktan sonra +4°C'de soğutulup kullanıldı.

Nötralizasyon çözeltisi: 0,4 M Tris distile suda çözülerek pH 10'a ayarlandı. Çözelti, daha sonra oda sıcaklığında saklandı.

Etidyum bromür çözeltisi: 200 µg/ml stok çözeltisi distile suda hazırlanıp oda sıcaklığında muhafaza edildi. Boyama işlemi sırasında 1:10 oranında seyreltildi ve 20 µg/ml konsantrasyona getirildi. Hücre sayımı için her bir lam üzerine 60 µl çözelti damlatıldı ve lamel ile kapatıldı.

2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılması

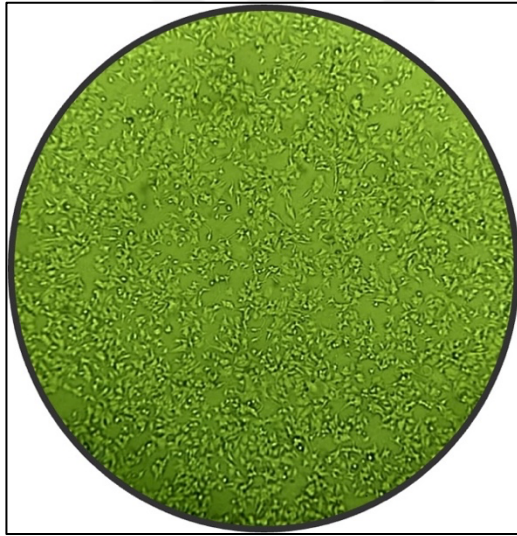
MCF7 insan epitel meme kanseri hücresi (HTB-22, ATCC, Almanya) -80°C'den çıkarıldı.

- -80°C'den çıkarılan hücreler, hızlıca 37°C'de çözündü.

- Hücresler, laminar akış kabini altında, 10 ml 37°C DMEM besi ortamı içeren steril 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1300 rpm'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrasında, üst faz steril koşullarda pastör pipeti ile uzaklaştırıldı ve alt fazdaki hücelere yaklaşık 5-6 ml DMEM medyum eklendi. Hüceler, pipetle çek-bırak yöntemiyle homojenize edildikten sonra 25 cm²'lik flasklara ekildi ve 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.

- Hücelerin ürememe ve çoğalmama olasılığına karşı, birkaç kez pasajlama işlemi tekrarlandı ve hücelerin düzenli çoğalması kontrol edildi. Her 3-4 günde bir, hüceler tripsinle yüzeyden ayrılarak yeni besi ortamına aktarıldı. Hücelerin düzenli şekilde çoğalmasının ardından deneyler başlatıldı. Deneyler tamamlanana kadar hücre pasajlama işlemi devam ettirildi. MCF7 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 2.1.'de verilmiştir.



Şekil 2.1. MCF7 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (%80-85 dolulukta).

MCF7 hücresinin pasaj işlemi:

- Flasktaki DMEM besi ortamı aspire edilerek uzaklaştırıldı.

- Hücelere 2 ml 37°C'de ısıtılmış tripsin/EDTA eklendi ve 3-4 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi.

- Trypsin etkisini durdurmak için 2 ml stop medyum çözeltisi eklendi ve hafifçe karıştırıldı.

- Elde edilen 4 ml'lik hücre süspansiyonu pastör pipeti ile 15 ml'lik steril tüpe aktarıldı.

- Hücreler 1300 rpm hızında, oda sıcaklığında 5-6 dakika santrifüj edildi.

- Üst faz, tüpün dibindeki pellete zarar vermeden pastör pipeti ile dikkatlice uzaklaştırıldı.

- Pellet üzerine yaklaşık 2 ml DMEM eklendi ve pastör pipeti ile çek-bırak yöntemiyle karıştırıldı.

- Hücre sayımı TC-20 cihazı kullanılarak yapıldı.

- Yeni pasaj için, 300.000-400.000 hücre içeren 5 ml DMEM medyum T25 flask'a aktarıldı.

2.4. Test Materyallerinin Hazırlanması ve Hücrelere Maruziyeti

Tezimizde MCF7 hücre hattı üzerinde potansiyel sitotoksik ve genotoksik etkileri test edilen Bisfenol A, Bisfenol S, Bisfenol Z, Bisfenol F, Bisfenol AF, Sodyum Selenit ve bu etkilere karşı potansiyel koruyucu etkisi test edilen Sodyum Selenit Şekil 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Çalışmamızda kullanılan test kimyasalları.

Tez çalışmamızda kullandığımız kimyasalların hazırlanışı ve hücelere maruziyeti:

Bisfenol A çözeltisi: 500 mM Bisfenol A stok çözeltisi steril DMSO içerisinde hazırlandı. 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 mM seyreltmeler yapıldıktan sonra hücelere %0,1 maruziyet ile aşağıdaki şekillerde test edildi:

MTT testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Komet testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Sodyum selenitin koruyucu etkinliğinin araştırıldığı komet testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Bisfenol S çözeltisi: 500 mM Bisfenol S stok çözeltisi steril DMSO içerisinde hazırlandı. 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 mM seyreltmeler yapıldıktan sonra hücelere %0,1 maruziyet ile aşağıdaki şekillerde test edildi:

MTT testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Komet testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Sodyum selenitin koruyucu etkinliğinin araştırıldığı komet testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Bisfenol F çözeltisi: 500 mM Bisfenol F stok çözeltisi steril DMSO içerisinde hazırlandı. 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 mM seyreltmeler yapıldıktan sonra hücrelere %0,1 maruziyet ile aşağıdaki şekillerde test edildi:

MTT testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Komet testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Sodyum selenitin koruyucu etkinliğinin araştırıldığı komet testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Bisfenol AF çözeltisi: 500 mM Bisfenol AF stok çözeltisi steril DMSO içerisinde hazırlandı. 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 mM seyreltmeler yapıldıktan sonra hücrelere %0,1 maruziyet ile aşağıdaki şekillerde test edildi:

MTT testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Komet testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Sodyum selenitin koruyucu etkinliğinin araştırıldığı komet testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Bisfenol Z çözeltisi: 500 mM Bisfenol Z stok çözeltisi steril DMSO içerisinde hazırlandı. 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 mM seyreltmeler yapıldıktan sonra hücrelere %0,1 maruziyet ile aşağıdaki şekillerde test edildi:

MTT testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Komet testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Sodyum selenitin koruyucu etkinliğinin araştırıldığı komet testi için: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Sodyum selenit çözeltisi: 300 mM Sodyum selenit stok çözeltisi steril distile su içerisinde hazırlandı. 1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M ve 1, 3, 10, 30, 100 mM seyreltmeler yapıldıktan sonra hücrelere %0,1 maruziyet ile aşağıdaki şekillerde test edildi:

MTT testi için: 3, 10, 30, 100, 300 nM ve 1, 3, 10, 30, 100 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Komet testi için: 1, 3, 10, 30, 100, 300 nM ve 1 μ M konsantrasyonlarda test edildi.

Sodyum selenitin koruyucu etkinliğinin araştırıldığı komet testi için: 3 ve 10 nM konsantrasyonlarda test edildi.

DMSO çözeltisi: MTT testinde pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere %0,1 oranında doğrudan hücrelere maruziyet uygulandı.

H₂O₂ çözeltisi: Komet testinde pozitif kontrol olarak 1 M H₂O₂ stok çözeltisi steril distile su içerisinde hazırlandı ve %0,1 maruziyet ile 50 μ M konsantrasyon uygulandı.

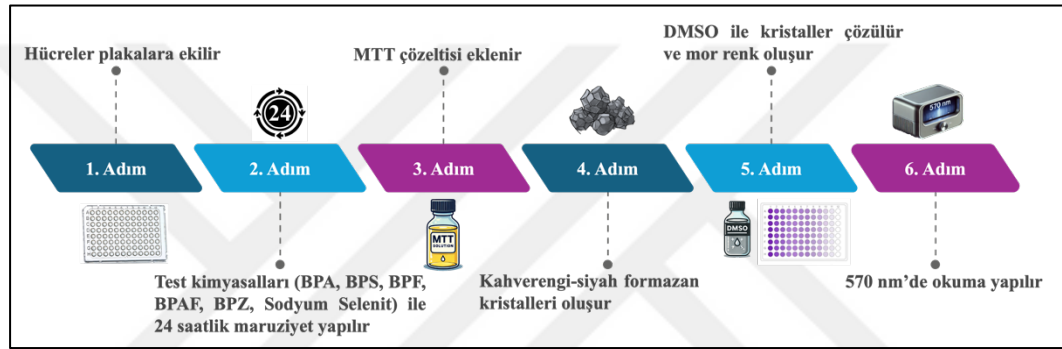
2.5. Sitotoksik Etkilerin Araştırılması: MTT Testi

Test edilecek tüm kimyasalların MCF-7 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla MTT testi uygulanmıştır. MTT testi basamakları Şekil 2.3.'de gösterilmiştir.

Bu test, canlı hücrelerin mitokondrilerinde tetrazolium bileşiği olan MTT'nin çözünmez koyu kahverengi-siyah renkteki formazan ürününe dönüştürülmesi esasına dayanan, kantitatif bir kolorimetrik yöntemdir. Formazan kristallerinin çözünmesi ile oluşan mor renk, hücre canlılık oranını doğrudan yansıtır. Bu yöntem, hücre metabolizmasının canlılığına dayanarak

in vitro koşullarda sitotoksiteyi ölçmek için kullanılır ve hızlı, pratik, aynı zamanda yüksek doğruluk oranına sahiptir.

Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan MTT, canlı hücrelerde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimi ile spesifik olarak etkileşime girer. Bu etkileşim sonucunda, çözünmeyen koyu kahverengi-siyah renkli kristaller oluşur ve bu kristaller, DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde mor renk oluşturarak kolayca çözülür. Çözünen boyanın absorbansı, konsantrasyona bağlı olarak spektrofotometrik yöntemle ölçülür ve elde edilen absorbans değeri, hücrelerin metabolik aktivitesi ve yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir.



Şekil 2.3. Test kimyasalları ile yapılan MTT testi basamakları.

MTT testinin yapılışı:

1. Gün:

- Her bir kuyucuğa 4.000 hücre / 200 µl DMEM olacak şekilde hücreler ekildi.

2. Gün:

- Kuyucuklardaki DMEM ortamı aspire edildi ve hücreler test kimyasalları olan BPA, BPS, BPZ, BPF, BPAF, Sodyum Selenit ve pozitif kontrol olan DMSO ile hazırlanan taze besi ortamlarına maruz bırakıldı.

- Plakalar 37°C'de CO₂ inkübatöründe 24 saat inkübe edildi.

3. Gün:

- Kuyucuklardaki medyum aspire edilip uzaklaştırıldı.

- Her kuyucuğa, 5 mg/ml PBS'de hazırlanan MTT çözeltisinden 20 µl alınıp 180 µl DMEM ile karıştırılarak son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde eklendi. Ardından plakalar çalkalandı ve 37°C'de CO₂ inkübatöründe 3 saat bekletildi.

- Sürenin sonunda plakalar inkübatörden çıkarıldı ve medyum aspire edilerek formazan kristallerini çözmek için kuyucuklara 200 µl DMSO ilave edildi.

- Çözeltinin homojen olması için plakalar 10 dakika boyunca mikropilaka çalkalayıcısında karıştırıldı.

- Kuyucuklardaki absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda ölçüldü.

- MCF7 hücrelerinin canlılığına olan etkiler grafikler yardımıyla değerlendirildi ve IC₅₀ (%50 inhibitör konsantrasyon) değerleri hesaplandı.

2.6. Genotoksik Etkilerin Araştırılması: Komet Testi

DNA'ya zarar veren kimyasal maddelere maruz kalmanın biyogösterge olarak tespiti genotoksisite testleri ile yapılmaktadır. Bu testler arasında, nötral ya da alkali pH ortamında gerçekleştirilen elektroforez işlemine dayanan Komet testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi) en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Komet testi, kimyasalların genetik materyal üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla biyoizleme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. *In-vivo* ve *in-vitro* ortamlarda, çeşitli hücre türleri ile uygulanan bu test, DNA hasarının yanı sıra DNA onarımını değerlendirmek için de sıkça tercih edilen bir yöntemdir.

Diğer testlere göre daha hızlı, hassas ve ekonomik olan Komet testi, ilk kez 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA kırıklarının tespit etmek amacıyla geliştirilmiştir. 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından nötral pH şartlarında uygulanabilir hale getirilen bu

teknik, mikroskop altında DNA'nın kuyruğu kuyruklu yıldıza benzediği için 'komet' adıyla anılmıştır. Singh ve ekibi, 1988'de yöntemi alkali pH ortamında kullanarak geliştirmiştir. Günümüzde küçük uyarlamalarla Komet testi, dünya çapında en yaygın kullanılan genotoksisite testleri arasında yer almaktadır.

Komet testinin yapılışı:

Hücreleri agara alma işlemi: T25 flaskta çoğaltılan hücreler TC-20 cihazında sayıldı ve 200.000 hücre/2 ml DMEM olacak şekilde 6'lı plakalara ekildi ve çoğalmaları için 1 gün bekletildi. Bisfenol A ve türevlerine ve sodyum selenite ayrı ayrı olarak yapılan komet testinin 2. gününde hiçbir işlem yapılmadı. Sodyum selenitin koruyucu etkinliğinin araştırıldığı komet testinde ise 2. gün hücrelere, belirlenen sodyum selenit konsantrasyonları 16 saat (over-night) süre ile 37°C'lik CO₂ inkübatörde ön maruziyet yapıldı. 3. gün hücrelere, test kimyasallarının belirlenen konsantrasyonları 2 saat süre ile, pozitif kontrol olan H₂O₂ ise 1 saat süre ile 37°C'de maruz bırakıldı. Maruziyet sonunda hücreler tripsin ile kaldırıldı ve her lamda 20.000-30.000 arasında hücre olacak şekilde hesap yapılarak 100 µl hücre süspansiyonu ile 37°C'de eritilmiş 200 µl LMA ile karıştırıldı. Deney öncesinde NMA ile kaplı lamlara hazırlanan karışım yayıldı ve agar donmadan üzeri lamel ile kapatıldı. Agar, donması için altında buz kalıpları bulunan metal bir yüzeyde bekletildi.

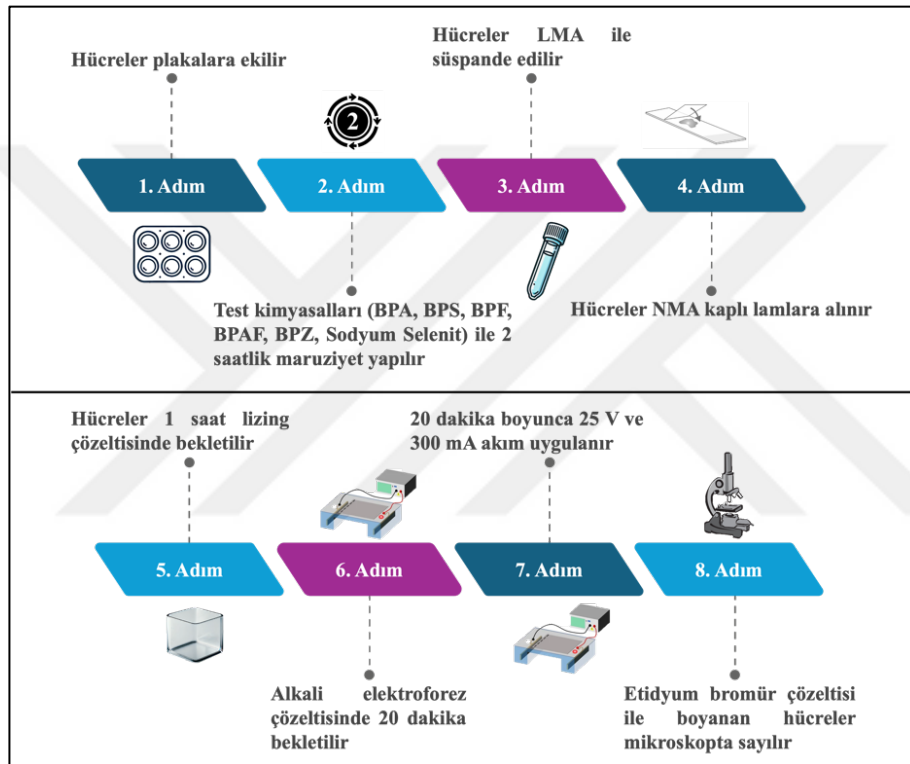
Lizing işlemi: Üzerinden lamelleri dikkatlice çıkarılan lamlar, deney günü hazırlanıp buzdolabından bekletilen soğuk lizing çözeltisine şaleler içinde daldırıldı ve 1 saat boyunca +4°C'de bekletildi.

Alkali pH'da elektroforez uygulanması: Elektroforez tankına, hazırlanan alkali elektroforez çözeltisi uygun miktarda dolduruldu. Lizing çözeltisinden çıkarılan lamlar distile su ile yıkandıktan sonra elektroforez tankına agarla kaplı yüzeyleri üste gelecek şekilde dizildi. İlk önce 20 dakika akım uygulamadan tampon çözeltide bekletilen lamlara, daha sonra 25 V ve 300 mA akım uygulanarak 20 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

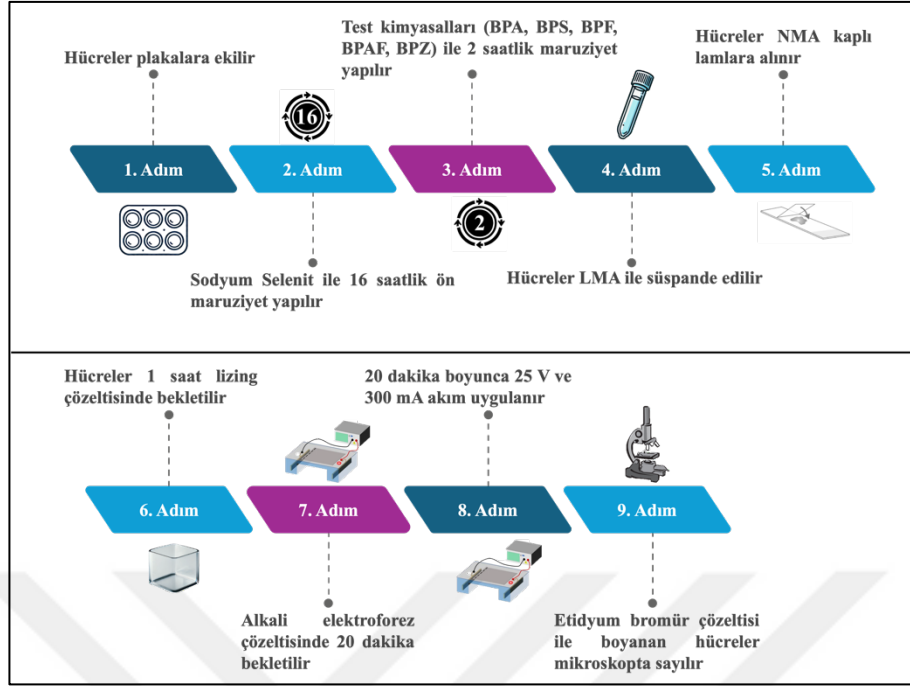
Nötralizasyon işlemi: Elektroforez aşamasından sonra şalelere dizilen lamlar 5'er dakika süre ile toplam 3 kez nötralizasyon çözeltisi ile yıkandı. Hücrelerin lamlara fiks edilmesi için sırasıyla %50, %70 ve %99 etanolde 5'er dakika bekletildi ve okuma işlemine kadar oda sıcaklığında lam kutularına dizilerek saklandı.

Boyama ve mikroskopta değerlendirme: Lamların üzerine 60 µl etidyum bromür çözeltisi ilave edildi ve 10 dakika bekledikten sonra mikroskopta okuma yapıldı. Komet testi sonuçlarının değerlendirilmesinde her bir lam için 100'er hücre Comet Assay IV programı kullanılarak sayıldı.

Komet testinin basamakları Şekil 2.4.'te ve sodyum selenitin koruyucu etkinliğinin araştırıldığı Komet testinin basamakları Şekil 2.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Test kimyasalları ile yapılan Komet testi basamakları.



Şekil 2.5. Sodyum selenitin koruyucu etkinliğinin araştırıldığı Komet testi basamakları.

2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS programı (SPSS Windows Release 23.0) kullanılarak yapılmıştır.

MTT testi sonuçları, herhangi bir kimyasala maruz bırakılmamış kontrollerle karşılaştırılarak canlı hücrelerin ortalama yüzdesi $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılıkları kontrol grubu canlılığının %100 olduğu varsayılarak hesaplanmıştır. Hücre canlılığını %50'ye düşüren (IC_{50}) değerleri konsantrasyon-cevap eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır.

Komet testi sonuçlarının değerlendirilmesinde her bir lam için tüm 100 sayıma ait DNA kuyruk yoğunluğu değerleri kontrol ve test kimyasalları grupları olarak kullanılmış ve one-way analysis of variance Anova (One-Way ANOVA) testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde ifade edilmiştir.

Post-hoc analizler (gruplar arasındaki fark) Fischer's least significant difference (LSD) test ile yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Sitotoksosite Testi (MTT) Sonuçları

Tezimizde kullanılan test materyalleri, kontrol ve solvan kontrol olarak kullanılan DMSO için MTT test sonuçları 2 kez tekrar edilmiş ve MTT sonuçlarına göre hücre canlılıkları kontrol grubu canlılığının %100 olduğu varsayılarak hesaplanmıştır. Test materyallerinin ortalama % canlılık değerleri $\pm$ standart sapma şeklinde Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışılan bisfenol türevlerinin MTT sonuçlarına göre % canlılık değerleri.

Çalışılan Doz	% Canlılık Değeri $\pm$ Standart Sapma				
	Bisfenol A	Bisfenol S	Bisfenol F	Bisfenol AF	Bisfenol Z
0,1 μ M	99,7 $\pm$ 0,12	100,9 $\pm$ 0,11	96,4 $\pm$ 0,32	99,3 $\pm$ 0,08	96,2 $\pm$ 0,32
0,5 μ M	91,5 $\pm$ 0,09	103,4 $\pm$ 0,07	89,9 $\pm$ 0,31	101,2 $\pm$ 0,34	97,6 $\pm$ 0,22
1 μ M	93,7 $\pm$ 0,07	102,2 $\pm$ 0,10	90,9 $\pm$ 0,33	98,5 $\pm$ 0,21	97,8 $\pm$ 0,42
5 μ M	89,3 $\pm$ 0,12	98,5 $\pm$ 0,10	91,7 $\pm$ 0,34	99,6 $\pm$ 0,22	99,3 $\pm$ 0,24
10 μ M	83,0 $\pm$ 0,08	91,7 $\pm$ 0,05	90,3 $\pm$ 0,26	86,8 $\pm$ 0,36	86,9 $\pm$ 0,07
50 μ M	35,9 $\pm$ 0,16	91,5 $\pm$ 0,06	89,5 $\pm$ 0,60	59,9 $\pm$ 0,33	42,4 $\pm$ 0,42
100 μ M	2,8 $\pm$ 0,04	66,1 $\pm$ 0,11	78,9 $\pm$ 0,10	15,8 $\pm$ 0,07	0,3 $\pm$ 0,11
500 μ M	0,4 $\pm$ 0,04	46,8 $\pm$ 0,04	52,8 $\pm$ 0,26	0,9 $\pm$ 0,03	1,7 $\pm$ 0,12

Çizelge 3.2. Çalışılan sodyum selenitin MTT sonuçlarına göre % canlılık değerleri.

Çalışılan Doz	% Canlılık Değeri $\pm$ Standart Sapma
	Sodyum Selenit
3 nM	96,0 $\pm$ 0,20
10 nM	96,9 $\pm$ 0,14
30 nM	95,2 $\pm$ 0,08
100 nM	91,3 $\pm$ 0,07
300 nM	89,2 $\pm$ 0,18
1 μ M	96,8 $\pm$ 0,06
3 μ M	86,6 $\pm$ 0,08
10 μ M	82,3 $\pm$ 0,11
30 μ M	80,5 $\pm$ 0,06
100 μ M	67,8 $\pm$ 0,09

Test materyallerinin MCF7 hücre canlılığını %50 düşüren (IC_{50}) değerleri konsantrasyon-cevap eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplanan IC_{50} değerleri Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışılan test materyallerinin MTT testi sonrası hesaplanan IC_{50} değerleri.

Test Materyali	IC_{50} Değeri
Bisfenol A	45 μ M
Bisfenol S	450 μ M
Bisfenol F	Hesaplanamamıştır
Bisfenol AF	56 μ M
Bisfenol Z	45 μ M
Sodyum Selenit	Hesaplanamamıştır

MTT testleri sonucunda hücre canlılığını %50 azaltan BPA konsantrasyonu 45 μ M; BPS konsantrasyonu 450 μ M; BPAF konsantrasyonu 56 μ M ve BPZ konsantrasyonu 45 μ M olarak hesaplanmıştır. BPF'nin yüksek konsantrasyonlarında MCF7 hücre hattında hücre canlılığında azalma görülmüş ancak canlılık %50 inhibitör konsantrasyona düşmediği için IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Bisfenol türevlerinin IC_{50} değerleri BPF>BPS>BPAF>BPZ=BPA şeklinde ifade edilebilir. Tezimizde kullanılan tüm bisfenol türevleri çalışılan konsantrasyonlarda MCF7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstererek hücre canlılıklarını azaltmıştır.

Sodyum selenitin çalışılan konsantrasyonlarında hücre canlılığında azalma görülmüş ancak canlılık %50 inhibitör konsantrasyona düşmediği için IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Test ettiğimiz konsantrasyonlarda sitotoksik etki gözlenmiştir.

3.2. Genotoksisite Testi (Komet) Sonuçları

3.2.1. Bisfenol Türevlerinin Komet Sonuçları

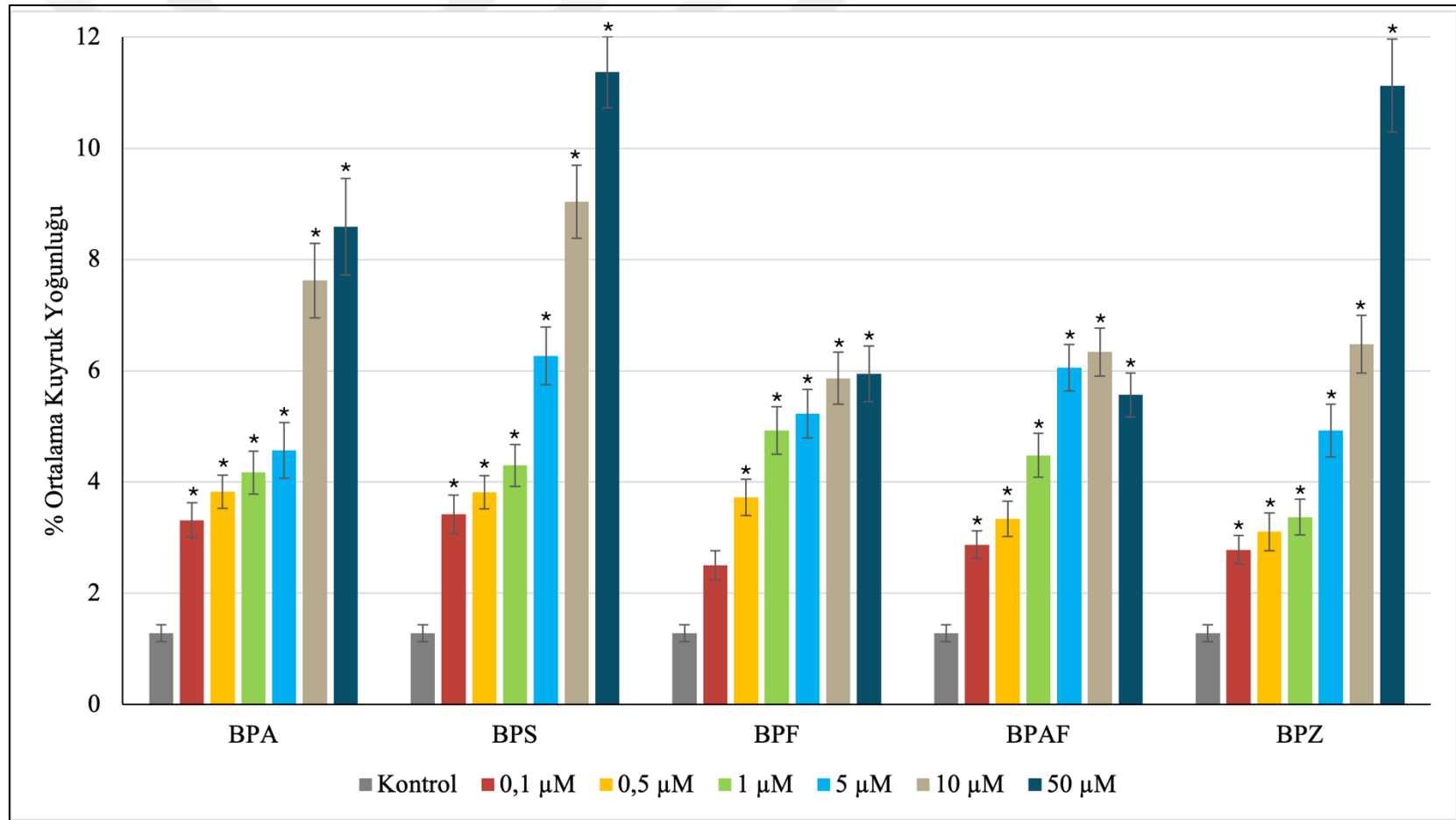
Fluoresan mikroskop altında her test materyalinin çalışılan konsantrasyonlarına denk gelen lamlarda rastgele seçilen 100'er hücreye ait Comet Assay IV programı ile elde edilen sonuçlar Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (Mean Tail Intensity) değerleri $\pm$ standart hata (SEM: Standart Sapma/n; n=100) şeklinde verilmiştir. Her bir test materyali konsantrasyonu için ikişer kez okuma yapılmıştır. Komet testinde pozitif kontrol olarak 50 μ M konsantrasyonda H_2O_2 , MCF7 hücrelerine 1 saatlik 37°C'de maruziyet ile kullanılmıştır. Test materyalleri

MCF7 hücre hattı üzerinde 2 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4., Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Bisfenol türevlerinin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) $\pm$ standart hata değerleri (SEM).

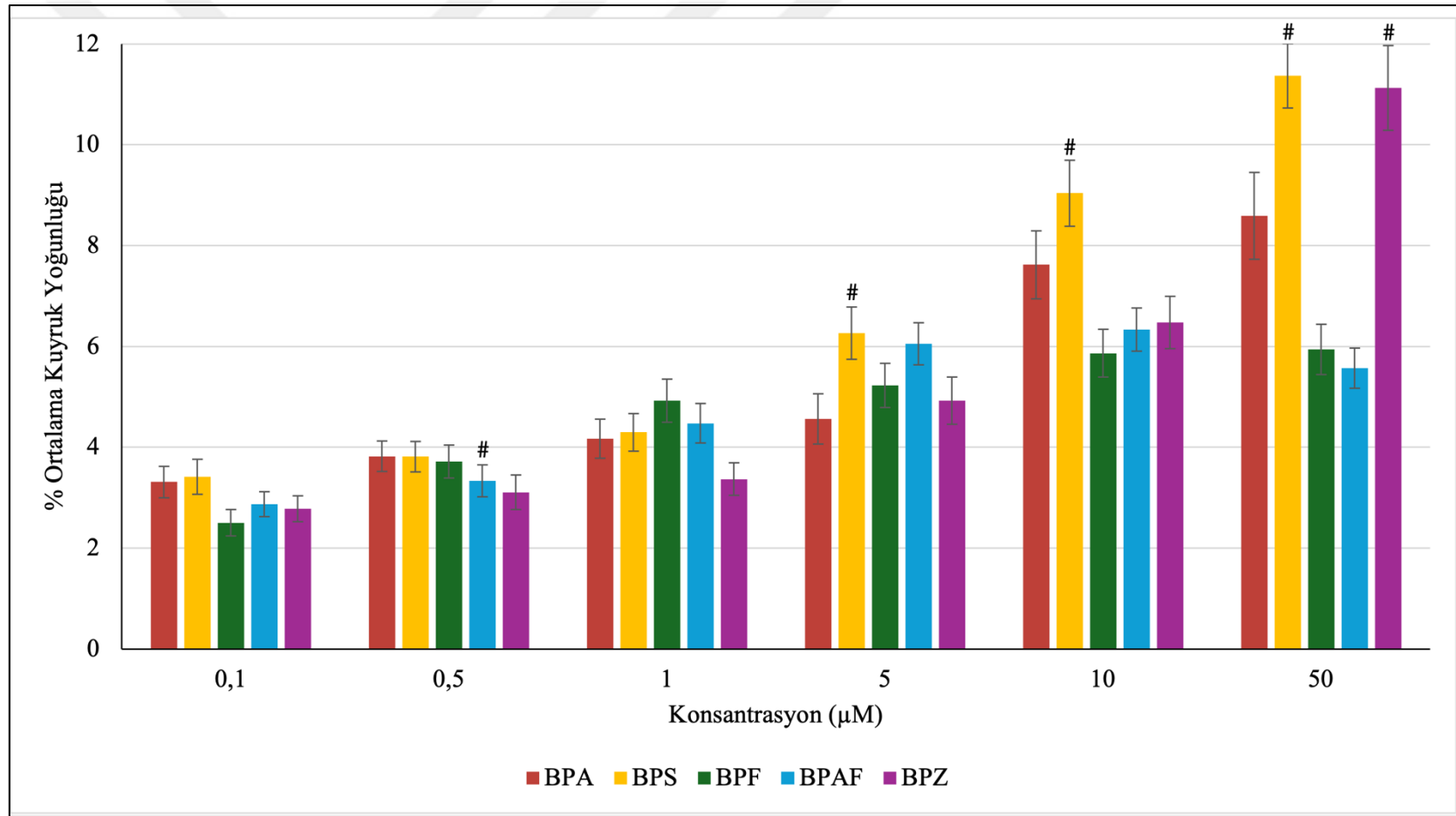
Test Materyali	Konsantrasyon μ M	Ortalama Kuyruk Yoğunluğu $\pm$ SEM
BPA	0,1	3,31 $\pm$ 0,3132*
	0,5	3,82 $\pm$ 0,3006*
	1	4,17 $\pm$ 0,3898*
	5	4,57 $\pm$ 0,4982*
	10	7,62 $\pm$ 0,6732*
	50	8,59 $\pm$ 0,8653*
BPS	0,1	3,42 $\pm$ 0,3438*
	0,5	3,82 $\pm$ 0,3005*
	1	4,30 $\pm$ 0,3750*
	5	6,27 $\pm$ 0,5177*#
	10	9,04 $\pm$ 0,6559*#
	50	11,37 $\pm$ 0,6394*#
BPF	0,1	2,50 $\pm$ 0,2613
	0,5	3,72 $\pm$ 0,3262*
	1	4,92 $\pm$ 0,4264*
	5	5,23 $\pm$ 0,4387*
	10	5,87 $\pm$ 0,4704*
	50	5,94 $\pm$ 0,4984*
BPAF	0,1	2,87 $\pm$ 0,2490*
	0,5	3,34 $\pm$ 0,3170*
	1	4,48 $\pm$ 0,3958*
	5	6,05 $\pm$ 0,4195*#
	10	6,34 $\pm$ 0,4309*
	50	5,57 $\pm$ 0,3965*
BPZ	0,1	2,78 $\pm$ 0,2578*
	0,5	3,11 $\pm$ 0,3399*
	1	3,37 $\pm$ 0,3213*
	5	4,92 $\pm$ 0,4707*
	10	6,48 $\pm$ 0,5154*
	50	11,13 $\pm$ 0,8369*#
Kontrol		1,28 $\pm$ 0,1513
H₂O₂ (Pozitif Kontrol)		25,21 $\pm$ 9,4795*

*Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır (p<0,05, one-way Anova). #Aynı konsantrasyonlarda BPA ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır (p<0,05, one-way Anova).



Şekil 3.1. Bisfenol türevlerinin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) ± standart hata değerleri (SEM).

*Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır ($p < 0,05$, one-way Anova).



Şekil 3.2. Bisfenol türevlerinin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) ± standart hata değerleri (SEM).

#Aynı konsantrasyonlarda BPA ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır (p<0,05, one-way Anova)

Komet testi sonuçlarına göre BPF'nin 0,1 μM konsantrasyonu hariç çalışılan tüm bisfenol türevleri ve konsantrasyonları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ve MCF7 hücre hattı üzerinde DNA hasarını artırmaktadır.

Bisfenol türevleri olan BPS, BPF, BPAF ve BPZ, BPA'ya göre kıyaslandığında ise; BPA'nın çalışılan aynı konsantrasyonlarında BPS 5, 10 ve 50 μM dozda, BPAF 5 μM dozda ve BPZ 50 μM dozda BPA'ya göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ve MCF7 hücre hattı üzerinde DNA hasarını BPA'dan daha fazla artırmaktadır.

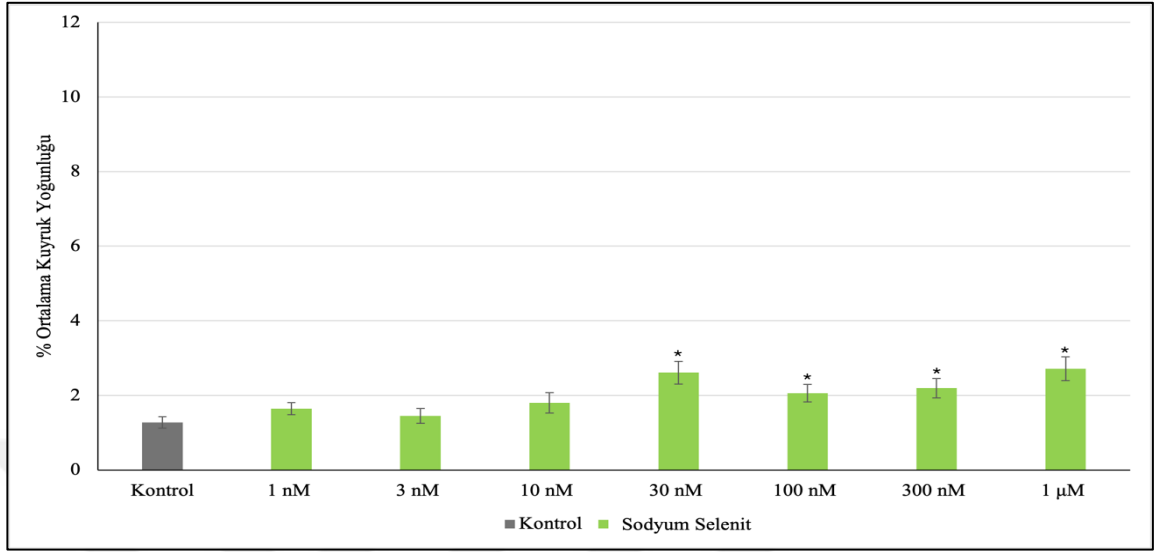
3.2.2. Sodyum Selenit Komet Sonuçları

Fluoresan mikroskop altında sodyum selenitin çalışılan konsantrasyonlarına denk gelen lamlarda rastgele seçilen 100'er hücreye ait Comet Assay IV programı ile elde edilen sonuçlar Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (Mean Tail Intensity) değerleri $\pm$ standart hata (SEM:Standart Sapma/n; n=100) şeklinde verilmiştir. Her bir konsantrasyon için ikişer kez okuma yapılmıştır. Komet testinde pozitif kontrol olarak 50 μM konsantrasyonda H_2O_2 , MCF7 hücrelerine 1 saatlik 37°C'de maruziyet ile kullanılmıştır. Sodyum selenitin çalışılan konsantrasyonları MCF7 hücre hattı üzerinde 2 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Her bir örneğin MCF7 hücrelerindeki maruziyeti sonucunda elde edilen ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) $\pm$ SEM Çizelge 3.5. ve Şekil 3.3.'te sunulmuştur.

Çizelge 3.5. Sodyum selenitin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) $\pm$ standart hata değerleri (SEM).

Test Materyali	Konsantrasyon	Ortalama Kuyruk Yoğunluğu $\pm$ SEM
Sodyum Selenit	1 nM	1,64 $\pm$ 0,1625
	3 nM	1,45 $\pm$ 0,1998
	10 nM	1,80 $\pm$ 0,2723
	30 nM	2,60 $\pm$ 0,3027*
	100 nM	2,05 $\pm$ 0,2349*
	300 nM	2,19 $\pm$ 0,2562*
	1 μM	2,71 $\pm$ 0,3182*
Kontrol		1,28 $\pm$ 0,1513
H_2O_2 (Pozitif Kontrol)		25,21 $\pm$ 9,4795*

*Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır ($p<0,05$, one-way Anova).



Şekil 3.3. Sodyum selenitin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) ± standart hata değerleri (SEM).

*Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır (p<0,05, one-way Anova).

Komet testi sonuçlarına göre sodyum selenitin 30 nM, 100 nM, 300 nM ve 1 µM konsantrasyonları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05) ve MCF7 hücre hattı üzerinde DNA hasarını artırmaktadır.

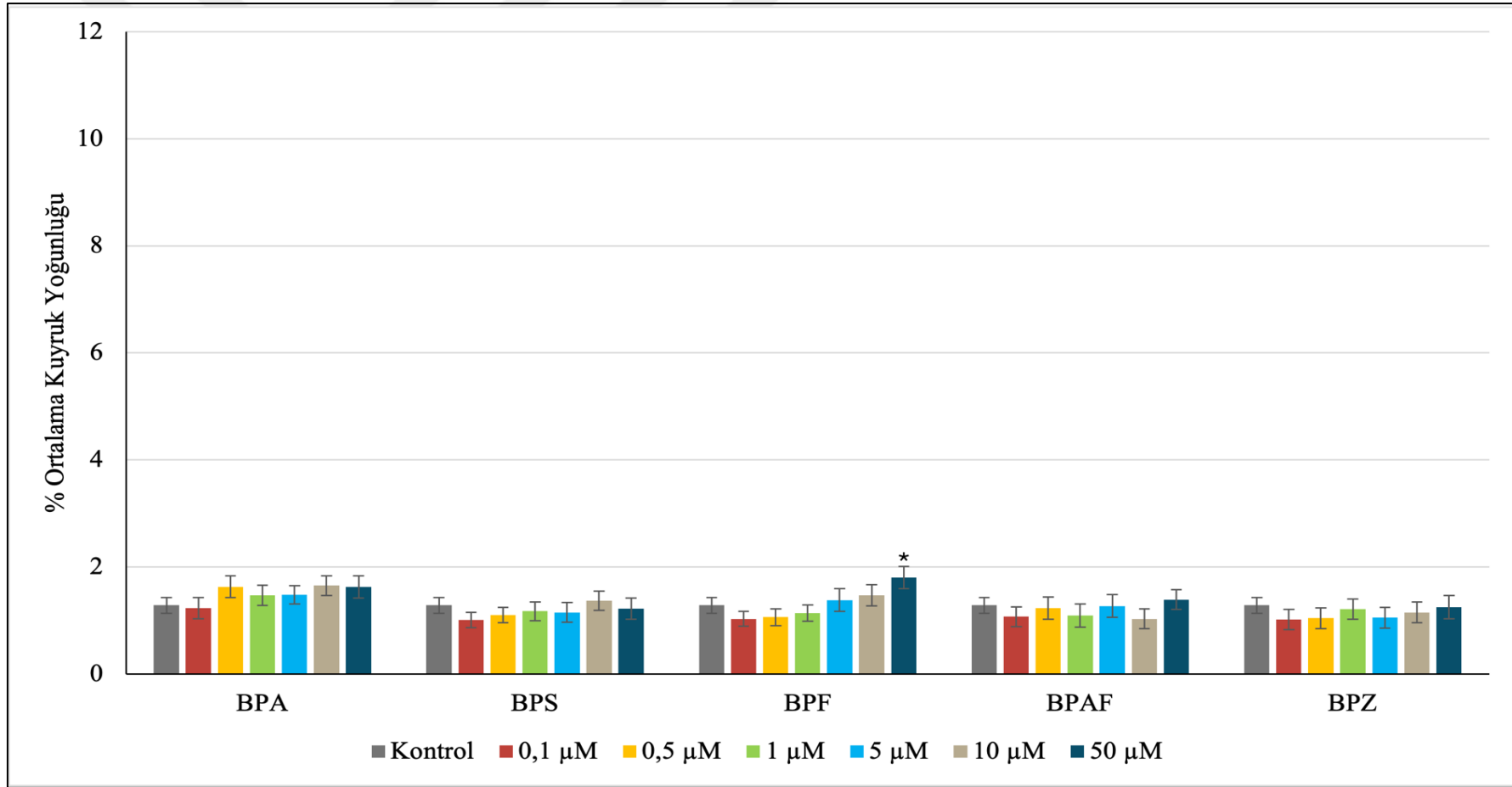
3.2.3. Sodyum Selenitin Koruyucu Etkinliğinin Araştırıldığı Komet Sonuçları

Fluoresan mikroskop altında her test materyalinin çalışılan konsantrasyonlarına denk gelen lamlarda rastgele seçilen 100'er hücreye ait Comet Assay IV programı ile elde edilen sonuçlar Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (Mean Tail Intensity) değerleri ± standart hata (SEM: Standart Sapma/n; n=100) şeklinde verilmiştir. Her bir test materyali konsantrasyonu için ikişer kez okuma yapılmıştır. Komet testinde pozitif kontrol olarak 50 µM konsantrasyonda H₂O₂, MCF7 hücrelerine 1 saatlik 37°C'de maruziyet ile kullanılmıştır. Sodyum selenitin belirlenen konsantrasyonları MCF7 hücrelerine 16 saatlik ön maruziyet ile uygulanmış, daha sonra hücreler bisfenol türevlerinin seçilen konsantrasyonlarına 2 saat maruz bırakılmıştır. Her bir örneğin MCF7 hücrelerindeki maruziyeti sonucunda elde edilen ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM Çizelge 3.6., Şekil 3.4. ve Şekil 3.5.'te sunulmuştur.

Çizelge 3.6. Sodyum selenitin seçilen konsantrasyonlarının 16 saatlik ön maruziyeti sonrası, bisfenol türevlerinin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri (n=100) ± standart hata değerleri (SEM).

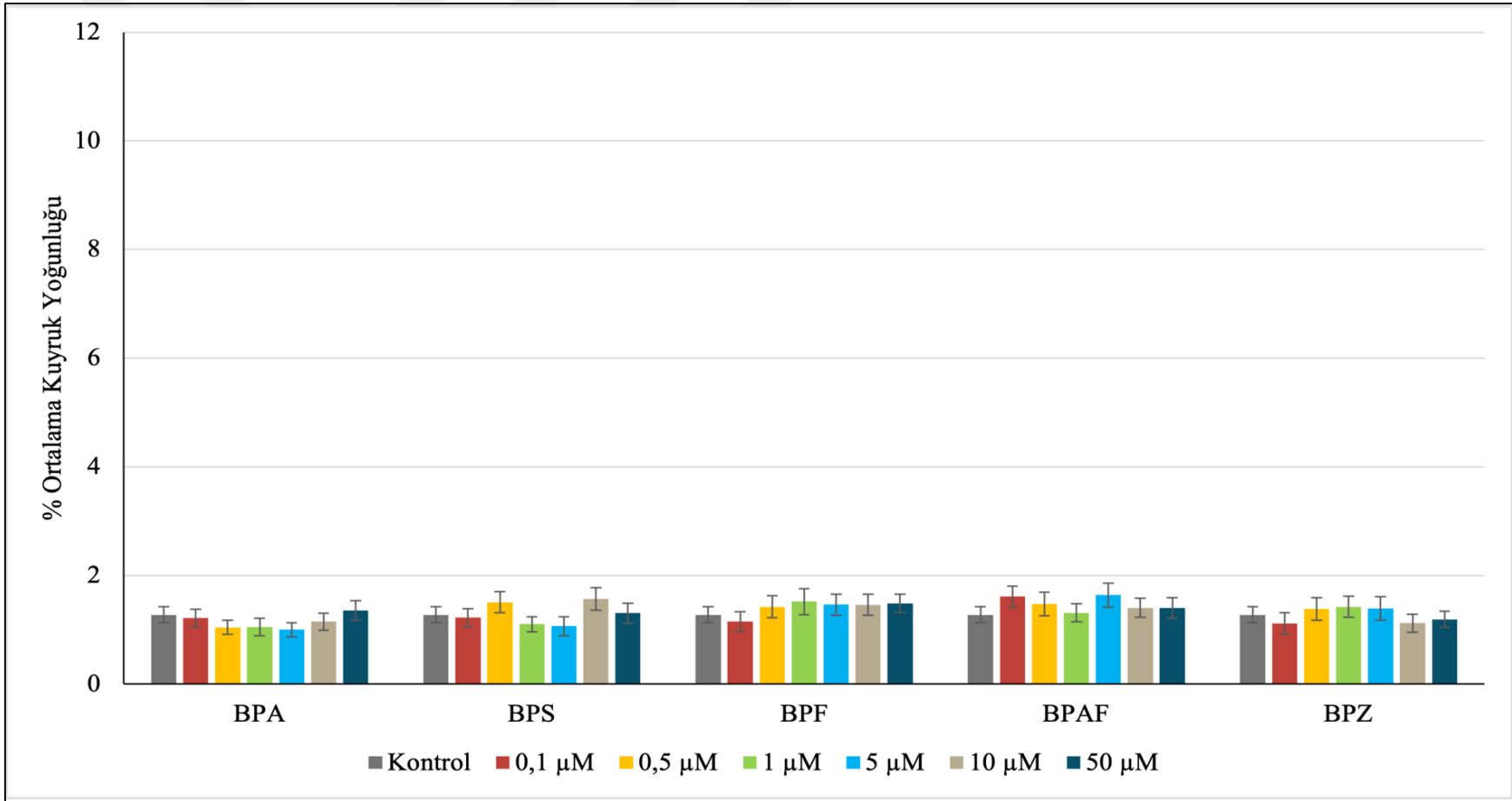
Test Materyali	Bisfenol Konsantrasyon (µM)	Ortalama Kuyruk Yoğunluğu ± SEM (Sodyum Selenit 3 nM ile ön maruziyet)	Ortalama Kuyruk Yoğunluğu ± SEM (Sodyum Selenit 10 nM ile ön maruziyet)
BPA	0,1	1,23±0,1977	1,21±0,1624
	0,5	1,63±0,2010	1,04±0,1305
	1	1,47±0,1883	1,05±0,1574
	5	1,48±0,1728	1,00±0,1296
	10	1,65±0,1840	1,15±0,1537
	50	1,63±0,2078	1,35±0,1792
BPS	0,1	1,01±0,1446	1,22±0,1652
	0,5	1,10±0,1445	1,51±0,1917
	1	1,17±0,1788	1,10±0,1411
	5	1,15±0,1839	1,06±0,1743
	10	1,37±0,1804	1,57±0,2115
	50	1,22±0,1941	1,31±0,1869
BPF	0,1	1,03±0,1402	1,15±0,1825
	0,5	1,06±0,1588	1,42±0,2025
	1	1,14±0,1515	1,52±0,2380
	5	1,38±0,2113	1,46±0,1912
	10	1,47±0,1978	1,46±0,1937
	50	1,80±0,2058*	1,49±0,1701
BPAF	0,1	1,07±0,1853	1,60±0,1968
	0,5	1,23±0,2111	1,47±0,2177
	1	1,09±0,2175	1,31±0,1653
	5	1,27±0,2088	1,64±0,2228
	10	1,03±0,1862	1,40±0,1765
	50	1,39±0,1812	1,40±0,1925
BPZ	0,1	1,02±0,1894	1,12±0,1996
	0,5	1,04±0,1964	1,38±0,2047
	1	1,21±0,1900	1,42±0,1967
	5	1,05±0,1934	1,39±0,2168
	10	1,15±0,1954	1,12±0,1682
	50	1,25±0,2160	1,19±0,1468
Kontrol		1,28±0,1513	
H₂O₂ (Pozitif Kontrol)		25,21±9,4795*	

*Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır (p<0,05, one-way Anova).



Şekil 3.4. Sodyum selenitin 3 nM konsantrasyonunun 16 saatlik ön maruziyeti sonrası, bisfenol türevlerinin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri ($n=100$) $\pm$ standart hata değerleri (SEM).

*Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır ($p<0,05$, one-way Anova).



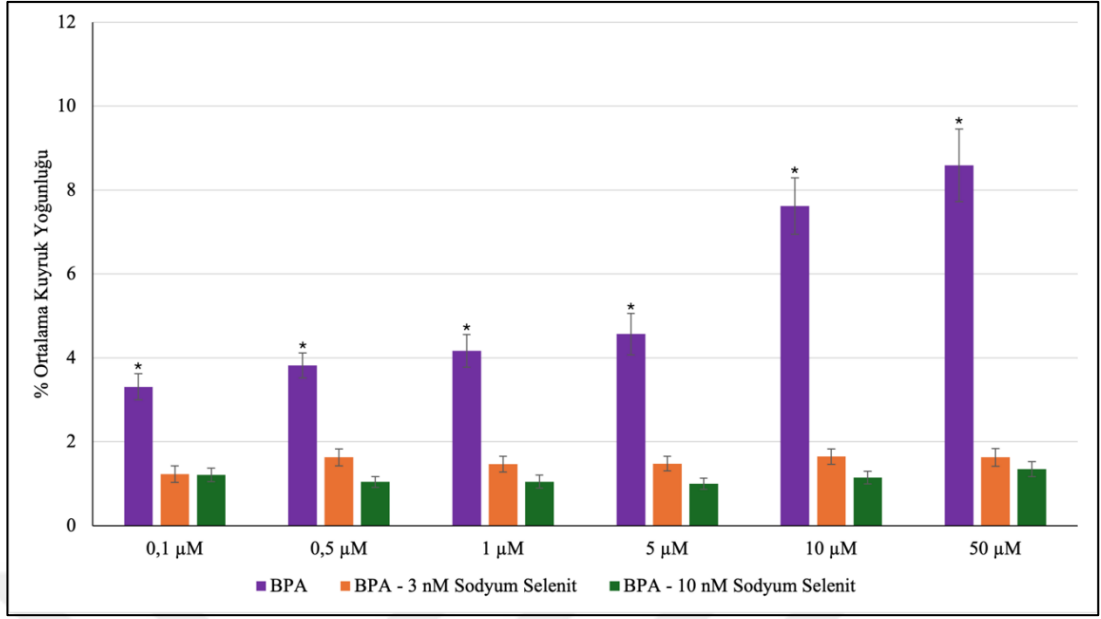
Şekil 3.5. Sodyum selenitin 10 nM konsantrasyonunun 16 saatlik ön maruziyeti sonrası, bisfenol türevlerinin 2 saatlik maruziyetleri ile MCF7 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri ($n=100$) $\pm$ standart hata değerleri (SEM).

*Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır ($p<0,05$, one-way Anova).

Komet testi sonuçlarına göre, sodyum selenitin 3 nM ön maruziyetinden sonra yapılan bisfenol türevlerinin maruziyetinde sadece BPF'nin 50 µM konsantrasyonu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Çalışılan diğer tüm bisfenol türevi konsantrasyonlarında 3 nM sodyum selenit birlikte maruziyeti sonucu DNA hasarı oranı kontrol düzeyine inerek DNA hasarına karşı koruyuculuk gözlenmiştir.

Komet testi sonuçlarına göre, sodyum selenitin 10 nM ön maruziyetinden sonra yapılan bisfenol türevlerinin maruziyetinde çalışılan hiçbir konsantrasyon kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çalışılan tüm bisfenol türevi konsantrasyonlarında 10 nM sodyum selenit birlikte maruziyeti sonucu DNA hasarı oranı kontrol düzeyine inerek DNA hasarına karşı koruyuculuk gözlenmiştir.

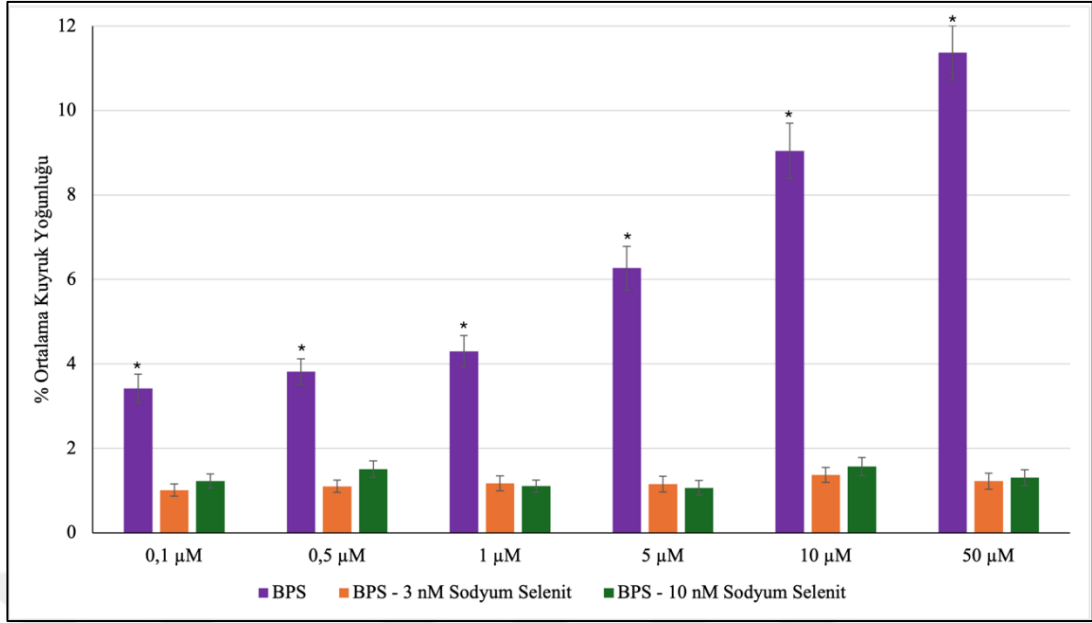
Her bir bisfenol türevinin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı sonuçları karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar Şekil 3.6., Şekil 3.7., Şekil 3.8., Şekil 3.9. ve Şekil 3.10.'da sunulmuştur.



Şekil 3.6. BPA'nın test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı sonuçları.

*Aynı konsantrasyonlarda BPA'nın 3 nM ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır ($p < 0,05$, one-way Anova).

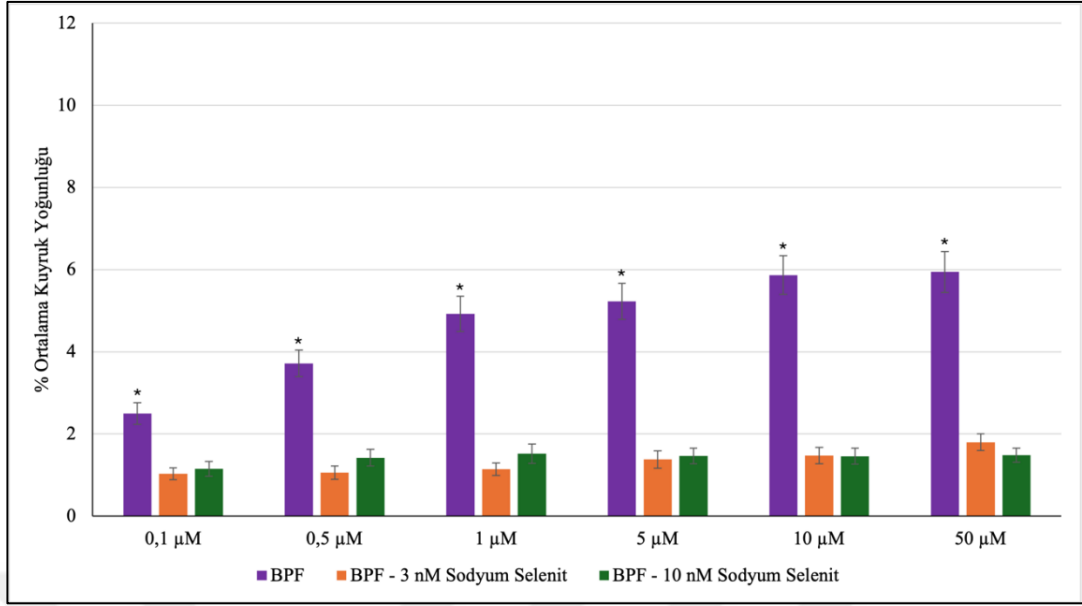
BPA'nın test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, BPA'nın 3 nM ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) ve 3 nM ve 10 nM sodyum selenitin varlığı DNA hasar oranını düşürmüştür.



Şekil 3.7. BPS'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı sonuçları.

*Aynı konsantrasyonlarda BPS'nin 3 nM ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır ($p < 0,05$, one-way Anova).

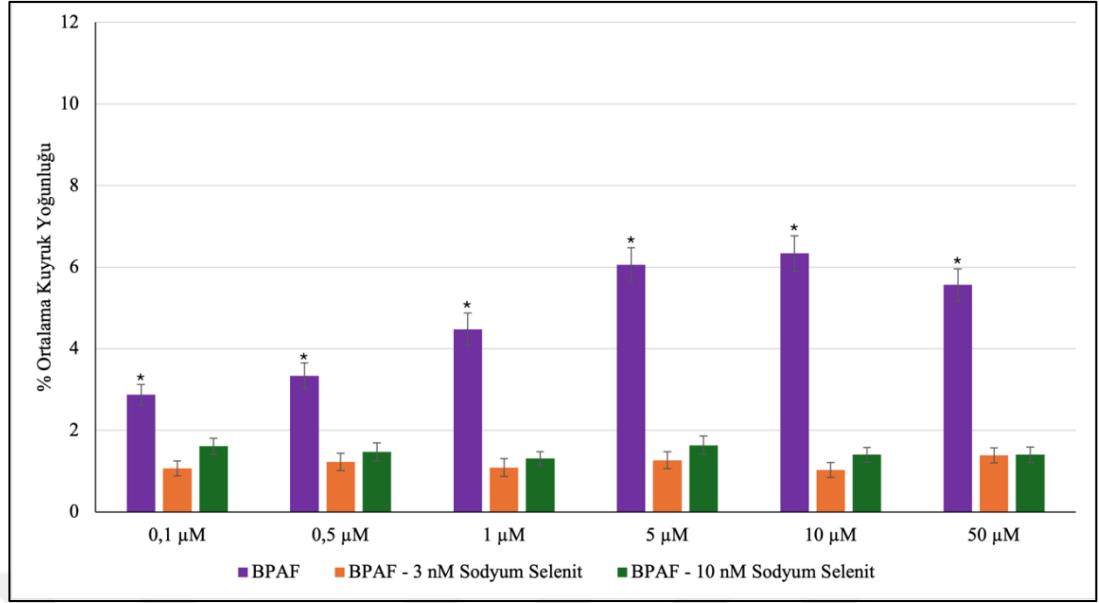
BPS'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, BPS'nin 3 nM ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) ve 3 nM ve 10 nM sodyum selenitin varlığı DNA hasar oranını düşürmüştür.



Şekil 3.8. BPF'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı sonuçları.

*Aynı konsantrasyonlarda BPF'nin 3 nM ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır ($p < 0,05$, one-way Anova).

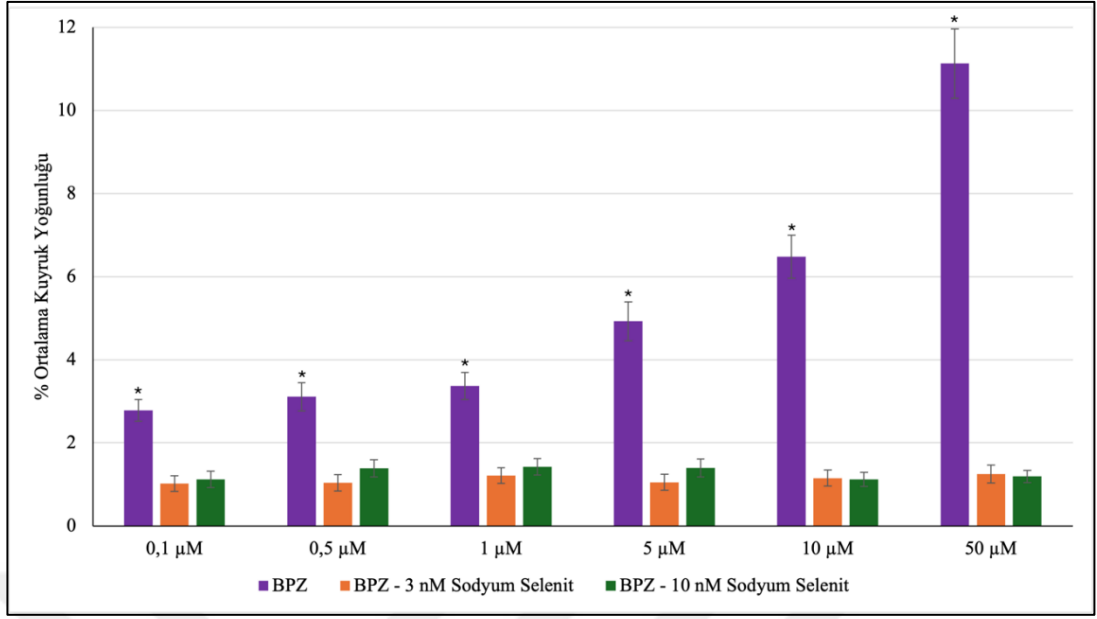
BPF'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, BPF'nin 3 nM ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) ve 3 nM ve 10 nM sodyum selenitin varlığı DNA hasar oranını düşürmüştür.



Şekil 3.9. BPAF'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı sonuçları.

*Aynı konsantrasyonlarda BPAF'nin 3 nM ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır ($p < 0,05$, one-way Anova).

BPAF'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, BPAF'nin 3 nM ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) ve 3 nM ve 10 nM sodyum selenitin varlığı DNA hasar oranını düşürmüştür.



Şekil 3.10. BPZ'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı sonuçları.

*Aynı konsantrasyonlarda BPZ'nin 3 nM ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak DNA hasarını artırmaktadır ($p < 0,05$, one-way Anova).

BPZ'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, BPZ'nin 3 nM ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) ve 3 nM ve 10 nM sodyum selenitin varlığı DNA hasar oranını düşürmüştür.

Komet testi sonuçlarına göre 3 nM sodyum selenit'in tüm bisfenol türevlerinin oluşturduğu DNA hasarını azaltma potansiyeli ile 10 nM sodyum selenit'in tüm bisfenol türevlerinin oluşturduğu DNA hasarını azaltıcı etkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

4. TARTIŞMA

Endokrin bozucu kimyasallar, hormon sistemini bozarak insan ve hayvan sağlığında ciddi etkiler yaratabilmektedir. Bu kimyasalların üreme sağlığında düşüş, nörodavranışsal bozukluklar ve kanser gibi sağlık sorunlarına yol açtığına dair kanıtlar giderek artmaktadır (WHO, 2002; Bergman vd., 2013). Endokrin bozucu kimyasallar listesinde olan BPA gibi maddelerin yaygın kullanımı ve maruziyet yolları göz önüne alındığında, bu kimyasalın hem çevresel hem de biyolojik etkileri dikkatle ele alınmalıdır (UNEP, 2017). BPA'nın polikarbonat plastiklerde ve epoksi reçinelerde yaygın kullanımı, günlük yaşamda sıklıkla karşılaşılan maruziyet durumlarını da beraberinde getirmektedir. Termal kağıtlardan yiyecek kaplarına kadar geniş bir yelpazede bulunması, BPA'ya dermal, solunum ve sindirim yoluyla maruziyet riskini artırmaktadır (Abraham ve Chakraborty, 2020; Catenza vd., 2021; Ma vd., 2019).

BPA, hormon sistemini bozarak üreme sağlığı, gelişim ve metabolizma üzerinde olumsuz etkiler göstermektedir. Üreme sisteminde hormon dengelerini bozarak kısırlık ve gebelik komplikasyonlarına yol açarken, plasenta bariyerini geçerek fetüs üzerinde gelişimsel riskler oluşturmaktadır (Eladak vd., 2015; Guignard vd., 2022). Ayrıca, obezite ve diyabet gibi metabolik bozukluklarla da ilişkilendirilmiştir (Catenza vd., 2021). BPA'nın, meme ve prostat kanseri gibi hormon ilişkili kanserlerde rol oynadığı görülmüştür (Winz vd., 2024; Ayazgök ve Küçükkilinç, 2017).

BPA'nın toksik etkileri ve bu etkilerin vücutta metabolize edilme süreçleri detaylı olarak incelenmiştir. Bu süreçlerin bazı enzimlerin varlığıyla arttığı ya da azaldığı gözlenmiştir (Lee vd., 2016). Ayrıca, BPA'nın biyoaktivasyon ve detoksifikasyon mekanizmalarının hormon sistemine olan etkileri ve bu kimyasalın sağlık üzerindeki olumsuz sonuçları gelecekteki araştırmalar için önemli bir alan oluşturmaktadır. Özellikle yiyecek kaplarının ısıtılması gibi günlük alışkanlıklar, BPA'nın besinlere geçişini kolaylaştırarak maruziyet riskini artırmaktadır (Ayazgök ve Küçükkilinç, 2017). Tüm bu bulgular, BPA gibi kimyasallara olan maruziyetin azaltılması ve bu konuda daha katı düzenlemelerin getirilmesine sebep olmuştur.

BPA'nın insan sağlığına olumsuz etkileri nedeniyle dünya genelinde bir dizi düzenleme yapılmış ve kullanım alanları kısıtlanmıştır. Avrupa Birliği ve diğer ülkeler, özellikle bebek ürünlerinde ve gıda ambalajlarında BPA'nın kullanımını yasaklamış ve migrasyon limitlerini sıkılaştırmıştır (EU, 2011a; EU, 2011b; FDA, 2012; FDA, 2013; TB, 2019; TGK, 2019b).

BPA'nın endokrin sistemine zararları hakkındaki bilimsel bulgular, bisfenol türevlerinin geliştirilmesine yol açmıştır, ancak bu türevlerin de sağlık üzerindeki etkileri tartışılmakta ve güvenliği hâlâ araştırılmaya devam edilmektedir.

BPA'ya alternatif olarak kullanılan BPS, yapısal benzerliği nedeniyle benzer endokrin bozucu etkiler göstermektedir. BPS, gıda ambalajlarından kişisel bakım ürünlerine kadar geniş bir kullanım alanına sahip olup, metabolik bozukluklar, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve üreme sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yaratabilmektedir (Thoene vd., 2020; Wang vd., 2022). BPS'nin özellikle östrojenik ve anti-androjenik aktiviteler sergilediği, kanser, oksidatif stres ve üreme sağlığına yönelik riskleri artırdığı belirtilmiştir (Molina vd., 2024; Ju vd., 2024). BPA'nın yerine geçmesi için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, BPS'nin de sağlık üzerindeki olumsuz etkileri, dikkatle değerlendirilmesi gereken önemli bir konudur.

BPA'ya alternatif olarak kullanılan bir diğer türev olan BPF, östrojenik aktivite göstererek hormon dengesini bozabilmekte ve bu durum metabolik hastalıklar, üreme bozuklukları ve kanser gibi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (Komarowska vd., 2021; Fouyet vd., 2021). Araştırmalar, BPF'nin diyabet, obezite, tiroid disfonksiyonları ve kalp-damar hastalıklarıyla ilişkili olduğunu ve üreme sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinin, düşük doğurganlık ve plasenta fonksiyon bozukluklarına yol açabileceğini ortaya koymuştur (Alharbi vd., 2022; Wang vd., 2024). BPF'nin ayrıca, östrojen reseptörlerini aktive ederek meme kanseri riskini artırabileceği ve erkeklerde sperm kalitesini düşürebileceği belirtilmiştir (Recchia vd., 2004; Odetauo vd., 2023).

Çalışmamızda etkilerini araştırdığımız bir başka türev olan BPAF, yüksek ısı ve kimyasal dayanıklılığı nedeniyle endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak tercih edilmektedir (Akash vd., 2023). BPAF, östrojen ve androjen reseptörlerine bağlanarak hormon sinyal yollarını bozabilir ve üreme sağlığı, metabolik süreçler ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Li vd., 2013; Skledar vd., 2019). Özellikle obezite, diyabet ve tiroid fonksiyon bozukluklarına katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (Escrivá vd., 2021).

Diğer bir türev olan BPZ, ısıya dayanıklılığı nedeniyle çeşitli endüstriyel uygulamalarda tercih edilen bir bisfenol türevidir. Östrojen reseptörlerine bağlanarak hormon dengesini bozabileceği ve üreme sağlığı ile metabolizma üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceği gösterilmiştir (Akash vd., 2023). Ayrıca, BPZ'nin tiroid hormonları seviyelerinde düşüşe neden

olabileceği belirtilmiştir (Lee vd., 2018). BPZ ile ilgili çalışmaların diğer türevlerle kıyaslandığında daha sınırlı olması, bu bileşiğin potansiyel etkilerinin dikkatle incelenmesi gereken önemli bir mesele olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda DNA hasarını araştırmak için uyguladığımız Komet testi, tek hücre düzeyinde DNA hasarını ölçme yeteneğine sahip olduğu için bisfenollerin genotoksik etkilerini araştırmada ideal bir araçtır. Bisfenoller gibi kimyasalların DNA üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılan komet testi, DNA kırıkları, oksidatif baz hasarları ve onarım süreçlerini tespit edebilmektedir. Özellikle alkali komet testi, tek ve çift zincir kırıklarını, DNA-protein çapraz bağlarını ve oksidatif hasarı hassas bir şekilde tespit edebildiği için tercih edilmektedir (Azqueta ve Collins, 2006; Piperakis, 2009). Komet testinin hassasiyeti sayesinde, bisfenollerin genotoksik etkileri ortaya konabilmekte, bu da bisfenollerin olası sağlık risklerini anlamada kritik bir rol oynamaktadır. Komet testinin hem *in-vivo* hem de *in-vitro* sistemlerde uygulanabilirliği, geniş kullanım alanı ve düşük sayıda hücre gereksinimi, bisfenoller gibi kimyasalların genotoksik etkilerinin araştırılmasında yaygın olarak tercih edilmesini sağlamaktadır (Turkez vd., 2017).

Çalışmamızda kullanılan MCF7 hücre hattı, meme kanseri çalışmalarında önemli bir model olarak öne çıkmaktadır çünkü hücre hattının ER pozitif olması, bu hücre hattını özellikle hormon bağımlı kanserlerin moleküler mekanizmalarını incelemek için ideal kılmaktadır (Comşa vd., 2015). Bisfenoller gibi endokrin bozucuların östrojenik aktivitelerini incelemek için sıklıkla kullanılan bu hücre hattı, östrojenin hücre büyümesi ve tümör gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmak için tercih edilmektedir. MCF7 hücreleri, bisfenollerin östrojen reseptörlerine bağlanarak hücre sinyallemesini nasıl etkilediğini anlamak ve bu kimyasalların kanser gelişimine katkılarını incelemek açısından kritik bir rol oynamaktadır (Gupta vd., 2017; Isnaini vd., 2028; Kaplan ve Pazarci, 2024; Morgan vd., 2018). Bu nedenle, MCF7 hücre hattı bisfenol çalışmalarında hem kanser hem genotoksik etkiler hem de hormonal dengesizlikler üzerindeki etkilerin analizinde temel bir araçtır.

Bisfenollerin etkilerine karşı koruyucu potansiyelini araştırdığımız selenyum, özellikle antioksidan özellikleri ve oksidatif stresi azaltma yeteneği sayesinde bisfenol gibi endokrin bozucu kimyasallara karşı koruyucu etkileriyle dikkat çekmektedir. GPx ve TRxR gibi selenyum içeren enzimler, serbest radikalleri nötralize ederek hücre hasarını önlemekte ve hücrelerdeki redoks dengesini korumaktadır (Genchi vd., 2023; Kim vd., 2021). Selenyumun

bu özelliklerinin, bisfenollerin neden olduğu oksidatif stres ve DNA hasarını önlemede kritik bir rol oynayacağı ve dolayısıyla genotoksisiteye karşı koruyucu bir etki sağlayacağı düşünülmüştür (El-Bayoumy, 2001). Bu nedenle, bisfenollerin olumsuz etkilerine karşı yapılan çalışmalarda selenyumun koruyucu etkilerinin araştırılması önemlidir.

Tez çalışmamızda, genotoksik etkileri daha önce kanıtlanmış olan BPA ve potansiyel genotoksik etkileri halen araştırılmakta olan türevleri BPS, BPF, BPAF ve BPZ'nin, MCF7 hücre hattı üzerindeki DNA hasarını indüklenme potansiyelleri değerlendirilmiş ve güçlü antioksidan özellikleri ile bilinen selenyumun, bu DNA hasarına karşı koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, literatürde bildirilen dozlar göz önünde bulundurularak düşük bisfenol dozlarının hücresel düzeydeki etkileri incelenmiştir. Bu yaklaşım, hücre kültürü çalışmalarında bisfenollerin düşük konsantrasyonlarda bile potansiyel toksik etkiler gösterebileceği hipotezini test etmek amacıyla yapılmıştır. Bisfenollerin düşük dozlarda hücresel mekanizmalar üzerindeki etkilerini incelemek, çevresel maruziyet seviyelerinde karşılaşılabilecek risklerin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamaktadır.

BPA'nın sitotoksik ve genotoksik etkileri üzerine odaklanan bir çalışma, rhesus maymunu embriyo böbrek epitel hücre hattı olan Marc-145 hücrelerini 10^{-1} M- 10^{-6} M arası konsantrasyonlarda BPA'ya maruz bırakmıştır. Sitotoksisite, apoptoz, ROS seviyeleri ve oksidatif stres değerlendirilmek için süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon (GSH) seviyeleri ölçülmüş; DNA hasarı ise komet testi ile analiz edilmiştir. BPA'ya maruz kalan hücrelerde, doza bağlı olarak hücre canlılığında azalma ve apoptozda artış görülmüştür; bu da sitotoksisiteyi göstermektedir. Ayrıca BPA, ROS seviyelerini artırarak oksidatif stres tetiklemiş ve SOD ile GSH seviyelerinin düşmesine neden olmuştur. Komet testinde artan kuyruk uzunlukları DNA hasarını göstermekte ve artan oksidatif stres, hücre hasara ve antioksidan savunmanın azalmasına yol açarak genotoksisiteye katkıda bulunmaktadır (Yuan vd., 2019).

BPA'nın insan akciğer fibroblastları (MRC5) ve sıçan akciğer ve trakea hücreleri üzerindeki etkileri, BPA'nın 450-3600 μ M arası konsantrasyonlarında araştırılmış ve hücre canlılığı, apoptoz ve nekroz, kaspaz-3 aktivitesi ölçülmüştür. BPA, MRC5 ve sıçan akciğer hücrelerinde apoptoza neden olurken; trakea hücrelerinde nekrotik hücre ölümünü

indüklemiştir. Hücre döngüsü analizi, BPA'nın G2/M fazında hücre döngüsü duraksaması yaparak hücre proliferasyonunu engellediğini göstermiştir (Aysin, 2024).

BPA'nın MCF7 hücre hattı, ER-pozitif ve ER-negatif amniyositler üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkilerini inceleyen bir diğer çalışma, BPA'yı 0,4-100 µg/mL konsantrasyonlarında hücrelere uygulamıştır. Sitotoksisite MTT testi ile; kromozomal anormallikler ise klasik sitogenetik yöntemle değerlendirilmiştir. BPA, özellikle ER-pozitif amniyositlerde yüksek sitotoksisite göstermiştir. 1 µg/mL BPA konsantrasyonunda her iki amniyosit türünde de yapısal kromozomal hasarlar gözlenmiştir (Aghajanpour-Mir vd., 2016).

BPA'nın insan meme epitelyal hücrelerindeki (MCF10A ve 184A1) DNA hasarı ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini, özellikle c-Myc onkogeninin rolünü inceleyen bir çalışmada BPA, nanomolar dozlarda (10-100 nM) hücrelere uygulanmış; DNA hasarı komet testi ve γ-H2AX immünofloresan boyama ile, hücre çoğalması ise hücre sayımı ve MTT testi ile değerlendirilmiştir. Bulgular, düşük doz BPA'nın DNA çift sarmal kırıklarını indükleyerek DNA hasarına yol açtığını ve c-Myc ekspresyonunu artırarak hücre proliferasyonunu desteklediğini göstermiştir. c-Myc baskılandığında ise BPA'nın DNA hasarı ve hücre çoğalması üzerindeki etkileri azalmıştır (Pfeifer vd., 2015).

Başka bir çalışma da, BPA ve alternatiflerinin insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemiş, BPA'yı 2-100 µg/mL aralığında konsantrasyonlarda hücrelere uygulamış ve hücre canlılığını MTT testi ile değerlendirmiştir. BPA, yüksek dozlarda (50 ve 100 µg/mL) HaCaT hücrelerinde belirgin bir sitotoksik etki göstererek hücre canlılığını %80'e kadar azaltmıştır (Son vd., 2018).

BPA'nın Çin hamsteri over hücreleri (CHO) üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştıran bir çalışmada BPA, 40-120 µM konsantrasyon aralığında uygulanmış; hücre canlılığı MTT testiyle, DNA hasarı komet testiyle, kromozomal anormallikler mikronükleus analiziyle ve mutajenik potansiyel Ames testiyle değerlendirilmiştir. Çalışma, BPA'nın hücre canlılığını azalttığını, DNA çift sarmal kırıklarına ve mikronükleus oluşumuna neden olarak genotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak, Ames testi sonuçlarına göre BPA mutajenik bir etki göstermemiştir (Xin vd., 2015).

BPF'nin insan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştıran bir çalışmada, 200–800 μ M konsantrasyon aralığı uygulanmış ve hücre canlılığı, ROS, GSH ve lipid peroksidasyonu düzeyleri ölçülmüştür. DNA hasarı komet testi ile değerlendirilmiştir. Çalışma BPF'nin hücre canlılığını azalttığını, ROS seviyelerini artırarak oksidatif stres oluşturduğunu ve DNA hasarına yol açarak BPA'ya benzer toksik özellikler sergilediği belirlemiştir (Ikhlas vd., 2019).

BPA ve BPS'nin insan bronşiyal epitel hücreleri (BEAS-2B) üzerindeki sitotoksik ve genotoksik potansiyelinin incelendiği bir çalışma, BPA ve BPS'yi 12,5-200 μ M konsantrasyon aralığında 24 saat boyunca hücrelere uygulamıştır. Sitotoksisite MTS testi ile, DNA hasarı ise γ -H2AX immünofloresan boyama ve komet testi ile değerlendirilmiştir. BPA, hücrelerde DNA çift sarmal kırıkları ve artan ROS üretimi ile yüksek sitotoksisite ve genotoksisite göstermiştir. Ayrıca, kaspaz-3 aktivasyonunu tetikleyerek apoptotik hücre ölümüne yol açmıştır. BPS ise daha düşük toksisite göstermiş, ancak belirgin DNA hasarına neden olmuştur (George ve Rupasinghe, 2018).

Başka bir çalışma BPA ve BPF'nin genotoksisite ve sitotoksisite potansiyelini insan hücre hatları (insan hepatoma hücre hattı (HepG2), insan renal karsinom hücre hattı (ACHN) ve insan kolon adenokarsinom (LS174T)) üzerinde incelemiştir. BPA ve BPF, 1, 5, 10, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Bulgulara göre, BPA genotoksik bulunmazken; BPF, özellikle HepG2 hücrelerinde DNA çift sarmal kırıklarını artırarak genotoksik etki göstermiştir (Audebert vd., 2011).

BPA ve analogları olan BPS ve BPF'nin sitotoksik ve obezogenik etkilerini preadiposit hücre hattı (3T3-L1) üzerinde inceleyen bir çalışmada, hücre canlılığını değerlendirmek için MTT testi uygulanmıştır. BPA, BPS ve BPF'nin hücre canlılığı üzerindeki etkileri 0-400 μ M arası konsantrasyonlarda test edilmiş ve BPA'nın BPS ve BPF'ye kıyasla daha yüksek sitotoksisite gösterdiği ortaya konulmuştur (Martínez vd., 2020).

BPA, BPS ve BPF'nin prostat hücreleri (RWPE-1) üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve oksidatif stres oluşturan etkilerini karşılaştırmalı olarak araştıran bir çalışmada bisfenol türevleri 0-600 μ M konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. Sitotoksisite MTT testiyle, oksidatif stres enzimleri ve GSH seviyeleri ölçülerek değerlendirilmiştir. DNA hasarı, komet testiyle analiz edilmiştir ve DNA onarım proteinleri kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

(qPCR) ile incelenmiştir. BPA, BPF ve BPS'nin sitotoksik etkilerinin sırasıyla BPA > BPF > BPS olduğu bulunmuştur. BPS, en yüksek DNA hasarını indüklemiştir (Kose vd., 2020).

BPA, BPS ve BPF'nin HepG2 üzerindeki apoptotik, genotoksik ve immünotoksik etkilerini *in-silico* ve *in-vitro* yöntemlerle karşılaştırmalı olarak inceleyen bir çalışmada BPA, BPF ve BPS, sırasıyla 397.27 μ M, 371.89 μ M ve 191.52 μ M IC₃₀ konsantrasyonlarında hücrelere uygulanmıştır. Apoptotik etkiler çeşitli kaspaz aktiviteleriyle; genotoksisite ve immünolojik etkiler değerlendirilmiştir. Çalışma, BPF ve BPS'nin kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitelerini artırarak apoptosis yolunu tetiklediğini göstermiştir. BPA, kaspaz aktivitesini artırarak apoptosis yolunu tetiklemiş ve TNF- α düzeylerini etkileyerek immünotoksisiteye yol açmıştır. Ayrıca BPS, TNF- α seviyelerini artırarak immün yanıtı diğer bisfenollerden daha fazla etkilemiştir (Balci-Ozyurt vd., 2024).

BPA, BPS ve BPAF'nin sıçan adipoz türevli kök hücreleri (rASC) ve insan mezenkimal kök hücreleri (hMSC) üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştıran bir çalışmada, uygulanan maruziyet konsantrasyonları BPA için 1 μ M-10 μ M, BPS için 1 μ M-100 μ M ve BPAF için 3×10^{-4} -30 μ M arasında değişmektedir. Bulgular, en sitotoksik bisfenol türevinin BPAF olduğunu, bunu BPA ve BPS'nin izlediğini ve özellikle BPAF için düşük konsantrasyonlarda önemli hücre ölümü gözlemlendiğini göstermiştir. Sitotoksisite ve apoptoz açısından hMSC hücre hattında rASC hücre hattına kıyasla daha yüksek hassasiyet kaydedilmiştir (Harnett vd., 2021).

Bir diğer çalışma, BPA ve analoglarının sitotoksik ve genotoksik etkilerini 3D HepG2 hücre modeli üzerinde incelemiştir. Çalışmada BPA, BPS, BPAF ve diğer bisfenol türevleri kullanılmıştır. Uygulanan konsantrasyonlar, 24 saatlik kısa süreli ve 96 saatlik uzun süreli maruziyetlerde 2,5 μ M-160 μ M arasında değişmektedir. Sitotoksisite MTS testi ile, DNA tek sarmal kırıkları komet testi ile, DNA çift sarmal kırıkları ise γ H2AX ve fosfo-histon H3 (p-H3) boyama ile analiz edilmiştir. Bulgulara göre BPA ve BPAF, DNA çift sarmal kırıklarını artırırken, BPAF p-H3 pozitif hücre yüzdesini artırarak anöjenik aktiviteye işaret etmiştir. Çalışmada incelenen tüm bisfenoller DNA tek sarmal kırıklarına neden olmuştur (Sendra vd., 2023).

BPA, BPS ve BPAF'nin fare testis hücreleri üzerinde oluşturduğu toksik etkileri 3D testis hücre ortak kültürü modeli kullanarak inceleyen bir çalışmada, BPA ve BPS 5-100 µM, BPAF ise 1-15 µM konsantrasyon aralığında hücrelere uygulanmıştır. Sitotoksikite nötral kırmızı boyama ile; DNA hasarı γ-H2AX immüno Floresan boyama ile; hücre iskelet yapısı ise F-aktin boyama ile değerlendirilmiştir. Çalışma, BPAF'nin yüksek sitotoksikite ve DNA hasarına yol açarak toksisite açısından en güçlü etkiyi gösterdiğini belirtmiştir. BPA ve BPS ise hücre canlılığını ve DNA hasarını daha düşük seviyelerde etkilemiştir (Yin vd., 2020).

BPA, BPS ve BPF'nin HaCaT üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve biyotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada bisfenol türevleri 1 nM-100 µM konsantrasyon aralığında hücrelere uygulanmış; HaCaT hücrelerinde metabolik aktivite resazurin indirgeme testi ile, proliferasyon, apoptoz ve oksidatif stresle ilişkili gen ekspresyonu ise qPCR ile değerlendirilmiştir. Bulgular, BPA ve BPF'nin HaCaT hücrelerinde proliferasyon ve DNA hasarına yol açtığını göstermiştir. BPS'nin ise sitotoksik potansiyeli, BPA ve BPF'ya kıyasla daha düşük olarak gözlemlenmiştir (Rybczyńska-Tkaczyk vd., 2023).

Başka bir çalışma, BPA, BPS ve BPAF'nin HepG2 üzerindeki mutajenik ve genotoksik etkilerini incelemiştir. BPA ve analogları 0,1-10 µmol/L konsantrasyon aralığında uygulanmış ve 4 ile 24 saatlik maruziyet süreleriyle test edilmiştir. DNA hasarı komet testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, BPA ve BPAF'nin doz-bağımlı olarak DNA sarmal kırıklarını artırdığını ve genotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle BPAF, BPA'ya kıyasla daha yüksek genotoksikite sergilemiştir. BPS ise daha düşük genotoksik etki göstermiştir (Yu vd., 2021).

BPA ve analogları BPS, BPF, BPAF'nin sitotoksik ve genotoksik etkileri HepG2 hücre hattı üzerinde incelemiş olan bir çalışmada bisfenoller için 5–20 µg/mL aralığında konsantrasyonlar kullanılmıştır. Hücre canlılığı MTS testiyle, DNA çift sarmal kırıkları γH2AX testiyle, gen ekspresyon analizleri ise qPCR ile değerlendirilmiştir. Bulgular, BPAF'nin sitotoksik ve genotoksik etkiler açısından en yüksek riske sahip olduğunu ve DNA hasarını artırarak, BPA ve BPF'den daha fazla toksisite gösterdiğini ortaya koymuştur. BPS en düşük sitotoksikiteyi gösterirken DNA çift sarmal kırıklarını indüklememiştir. Tüm bisfenoller, özellikle BPAF, ksenobiyotik metabolizmayla ilişkili genlerde yukarı regülasyona yol açmıştır (Hercog vd., 2019).

BPA, BPS, BPF ve BPAF'nin insan eritrositlerinde oksidatif stres üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışma 0,1-500 µg/mL aralığında konsantrasyonlarda ve 1, 4 ve 24 saatlik inkübasyon sürelerinde bisfenol türevleri maruziyeti uygulamıştır. ROS düzeyleri, lipid peroksidasyonu, GSH düzeyleri ve SOD, katalaz (CAT), GPx enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Bulgular, BPAF'nin ROS seviyelerinde, lipid peroksidasyonunda ve antioksidan enzim aktivitelerinde belirgin değişiklikler yaparak en güçlü oksidatif etkiyi gösterdiğini, BPA'nın ise GSH tükenmesi üzerinde en fazla etkiye sahip olduğunu göstermiştir. BPS'nin ise minimal oksidatif değişimlere neden olduğu ve daha düşük bir oksidatif potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir (Maćczak vd., 2017).

Bir diğer çalışma BPA, BPS, BPF ve BPAF'nin insan granüloza hücre hattı (KGN) üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini incelemiştir. BPA, BPS, BPF ve BPAF, 0,1-100 µM konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. Hücre canlılığı ve ROS düzeyleri incelenmiş, antioksidan aktivite CAT, SOD ve GSH analizleri ile ölçülmüştür. Sonuçlar, özellikle BPA ve BPAF'nin KGN hücrelerinde belirgin bir ROS artışı ve antioksidan kapasitede azalma ile sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. BPS ve BPF ise ROS artışına neden olmuş ancak diğer türevlere göre daha düşük seviyede etki göstermiştir (Huang vd., 2020).

Başka bir çalışma, BPA, BPS, BPF ve BPAF'nin PBMC hücre hattında DNA hasarını indükleyici etkilerini incelemiş ve 0,01–10 µg/mL konsantrasyon aralığında 1 ve 4 saat süreyle bisfenol türevleri hücrelere uygulamıştır. DNA hasarı, alkali ve nötral komet testi kullanılarak tek ve çift sarmal kırıklar şeklinde değerlendirilmiştir. Bulgular, BPAF'nin en yüksek DNA hasarını indükleyerek toksisite açısından en güçlü etkiyi gösterdiğini, ardından BPA'nın geldiğini göstermiştir. BPF orta seviyede tek ve çift sarmal kırıklar oluşturarak DNA üzerinde hasar yaratmıştır. BPS, en düşük DNA hasarını oluşturmuş, ancak uzun süreli inkübasyonda tek ve çift sarmal kırıklara yol açmıştır (Mokra vd., 2017).

BPA, BPS, BPF, BPAF ve diğer birçok bisfenol bileşiklerinin tavuk DT40 hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik potansiyellerini karşılaştırmalı olarak inceleyen bir çalışmada bisfenoller, 7,8-250 µM konsantrasyon aralığında hücrelere uygulanmıştır. BPA, tavuk DT40 hücrelerinde DNA çift sarmal kırıklarına neden olmuş ve sitotoksik etkiler göstermiştir. BPF, BPA'ya kıyasla daha düşük sitotoksisite göstermiştir, ancak yüksek konsantrasyonlarda DNA hasarına neden olabilmektedir. BPS, sitotoksik etkiler açısından daha düşük toksisite potansiyeline sahip olup, DNA kırıklarına yol açmamıştır. BPAF, en yüksek sitotoksisite ve

genotoksik potansiyeli göstermiştir. DNA çift sarmal kırıkları indüklemiş ve hücrelerde belirgin DNA hasarına neden olmuştur. Bu etkiler, özellikle yüksek konsantrasyonlarda belirgin hale gelmiştir (Lee vd., 2013).

BPA ve BPS, BPF, BPAF, BPZ ve daha birçok bisfenol türevinin HepG2 üzerindeki mutajenik ve genotoksik potansiyelinin incelendiği bir çalışmada bisfenoller, 0,1 µM-10 µM arasında değişen konsantrasyonlarda 4 ve 24 saatlik sürelerle uygulanmıştır. Mutajenik etkiler Ames testi ile, DNA hasarı ise komet testi ile değerlendirilmiştir. BPA ve BPS, 24 saatlik maruziyet sonrasında DNA hasarına yol açarken; BPF, BPAF ve BPZ ise DNA hasarını indüklememiştir (Fic vd., 2013).

Literatürde BPAF, incelenen bisfenol türevleri arasında genellikle en toksik olarak rapor edilmekte olup, BPZ ile ilgili sınırlı sayıda çalışmanın bulunması bu türev hakkında daha fazla araştırma gerekliliğini ortaya koymaktadır. BPF ve BPS'nin toksisite dereceleri ise çalışmalar arasında değişkenlik göstermekte; bazı araştırmalarda BPA'ya kıyasla daha yüksek toksik etkiye sahip oldukları bildirilirken, diğer çalışmalarda BPA'nın daha güçlü bir toksik etki sergilediği görülmektedir. Çalışmamızda ise BPA, BPS, BPF, BPAF ve BPZ'nin hepsinin çalışılan dozlarda genotoksik etkiler gösterdiği, özellikle BPS, BPZ ve BPAF'nin bazı konsantrasyonlarda BPA'dan daha yüksek genotoksisiteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, BPAF'nin yüksek toksisite potansiyelini desteklerken; BPF, BPS ve BPZ'nin genotoksisite derecelerine dair literatürden farklı ya da eksik kalan noktaları tamamlamaktadır.

Selenyum dozları seçilirken yine kapsamlı bir literatür incelemesi yapılmış ve bu doğrultuda uygun dozlar belirlenmiş ve seçilen bu dozlarla sitotoksisite ve genotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir. Bisfenollerin hücrel toksisitesine karşı selenyumun koruyucu etkinliğini değerlendirebilmek amacıyla, sitotoksik ve genotoksik etkiler göstermeyen iki doz tercih edilmiştir. Bu yaklaşım, selenyumun hücrelere zarar vermeden potansiyel koruyucu etkisini ortaya koymayı hedefleyerek, doz-seçimi sürecinde bilimsel veriler doğrultusunda optimal dozların kullanılmasına dayanmıştır.

BPA'nın östrojen pozitif MCF7 ve östrojen negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde TRPV1 kanalı aracılığıyla tetiklediği oksidatif stres ve apoptoza karşı selenyumun koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada BPA 0,1 mM ve sodyum selenit 1 µM dozlarında uygulanmıştır. BPA maruziyeti, MCF-7 hücrelerinde ROS üretimini, lipid

peroksidasyonunu ve Ca^{2+} girişini artırarak oksidatif stres oluşturmaktadır. Bu durum, hücre çoğalması ve apoptoz oranlarının yükselmesine neden olmuştur. Sodyum selenit tedavisi, TRPV1 kanalı aktivasyonunu engelleyerek oksidatif hasarı ve hücre ölüm oranlarını azaltmış; GSH ve GPx aktivitelerini destekleyerek hücresel bütünlüğü korumuştur. MDA-MB-231 hücrelerinde ise BPA'nın bu etkilerinin gözlenmemesi, selenyumun özellikle östrojen reseptörü pozitif hücrelerde koruyucu bir ajan olarak daha etkin rol oynayabileceğini göstermektedir (Güzel vd., 2020).

BPA'nın insan nöroblastoma hücre hattında (SH-SY5Y) indüklediği oksidatif stres, mitokondriyal depolarizasyon ve apoptoza karşı selenyumun koruyucu etkilerinin incelendiği bir çalışmada, BPA 100 μM ve sodyum selenit 1 μM dozlarında uygulanmıştır. BPA uygulaması, hücre içi ROS seviyelerinde ve mitokondriyal zar potansiyelinde artışa yol açarak hücrelerde oksidatif stres oluşturmuş, kaspaz-3 ve kaspaz-9 enzim aktiviteleri ile interlökin 1 β ve TNF- α gibi proinflatuvar sitokin düzeylerini artırmıştır. Selenyum tedavisi, oksidatif stres belirteçlerini ve inflamatuvar yanıtı azaltarak hücre canlılığını artırmış ve apoptozu önlemiştir. (Yıldızhan, 2020).

BPA'nın domuz bağırsak epitel hücreleri (IPEC-J2) üzerindeki toksik etkilerine karşı selenyum nanoparçacıkları ve inorganik selenyumun koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada BPA 50 μM , selenyum nanoparçacıkları ve inorganik selenyum ise 15 $\mu\text{g/mL}$ dozlarında uygulanmıştır. BPA, bağırsak bariyer bütünlüğünü bozmuş, oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtı tetikleyerek hücre apoptozunda artışa neden olmuştur. Selenyum nanoparçacıkları ve inorganik selenyum uygulamaları, BPA kaynaklı oksidatif stresi, iltihaplanmayı ve ER stres belirteçlerini azaltarak bağırsak hücre bütünlüğünü korumuştur. Bu çalışmada selenyum nanoparçacıklarının, inorganik selenyuma kıyasla daha etkili olduğu gözlenmiştir (Pan vd., 2023).

Endokrin bozucu kimyasallardan olan di (2-etilheksil) ftalat (DEHP) ve mono (2-etilheksil) ftalat (MEHP)'in insan prostat kanseri hücre hattı (LNCaP) üzerinde yol açtığı sitotoksikite ve DNA hasarına karşı selenyumun koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada DEHP 3 mM, MEHP 3 μM , sodyum selenit 30 nM ve selenometiyonin 10 μM dozlarında kullanılmıştır. Hücre canlılığı MTT testi ile ölçülmüş, DNA hasarı komet testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, antioksidan enzim aktiviteleri (GPx, TrxR, glutatyon redüktaz) ve GSH seviyeleri ölçülmüştür. DEHP ve MEHP uygulamaları, GPx aktivitesini düşürüp

oksidatif stres seviyesini artırarak hücre canlılığını azaltmış ve DNA hasarına yol açmıştır. Komet testi sonuçlarına göre, DEHP ve MEHP'nin neden olduğu DNA kuyruk yoğunluğu artışı saptanmıştır. Selenyum desteği (sodyum selenit ve selenometiyonin), bu toksik etkileri kısmen azaltarak hücre canlılığını korumuş ve antioksidan savunmayı güçlendirmiş ancak DNA hasarını tamamen engelleyememiştir (Erkekoğlu vd., 2010).

Selenometiyonin ve selenitin insan tiroisitleri ve tiroit fibroblastlarında, H_2O_2 tarafından oluşturulan oksidatif stres ve apoptoz etkilerine karşı koruyucu özelliklerinin incelendiği bir çalışmada H_2O_2 maruziyeti, hücrelerde ROS artışına, MDA seviyelerinde yükselmeye ve DNA bütünlüğünde bozulmaya neden olarak hücre canlılığını azaltmıştır. Apoptoz sürecinde BAX gen ekspresyonunun artışı ve BCL-2'nin azalması, kaspaz-3 aktivitesinde belirgin artışlarla gözlemlenmiştir. Selenometiyonin 2,5-20 μM dozları arasında ve selenit 0,05-2,5 μM dozları arasında test edilmiştir. İki selenyum türevi de BAX ekspresyonunu düşürüp BCL-2 seviyelerini yükselterek apoptozu baskılamış, oksidatif stres belirteçlerini azaltmıştır. Selenitin, selenometiyonine kıyasla daha düşük dozlarda etkili olduğu gözlenmiş, bu da selenitin tiroit hücrelerinde oksidatif hasara karşı daha güçlü bir koruma sağladığını göstermektedir (Ruggeri vd., 2020).

Yine H_2O_2 'nin civciv miyokard hücrelerinde tetiklediği oksidatif stres ve inflamasyona karşı selenyumun koruyucu etkileri bir başka çalışmada araştırılmıştır. H_2O_2 maruziyeti, hücre canlılığını düşürmüş ve inflamatuvar yanıtı tetiklemiştir. 100 nM sodyum selenit tedavisi, Selenoprotein W ekspresyonunu yükselterek oksidatif hasarı azaltmış ve inflamatuvar genlerin seviyelerini düşürmüştür. Bu sonuçlar, selenyumun miyokard hücrelerindeki oksidatif strese karşı koruyucu etkisinde Selenoprotein W'nin önemli bir rol oynadığını ve bu proteinin, selenyumun kardiyomiyositlerde inflamasyon düzenleyici bir unsur olarak görev aldığını göstermektedir (Liu vd., 2016).

Arseniğin balık hepatoma hücre hattında (PLHC-1) tetiklediği oksidatif stres ve genotoksik etkilere karşı selenyumun koruyucu özellikleri incelenmiş ve sodyum selenit 1, 5 ve 10 μM dozlarında uygulanmıştır. Arsenik uygulaması, hücrelerde ROS seviyelerinde artışa, mitokondriyal membran potansiyelinde düşüşe ve DNA hasarına neden olmuş; kaspaz-3 aktivitesinde artış ile apoptozu tetiklemiştir. Selenyum tedavisi, ROS seviyelerini düşürerek oksidatif stresi azaltmış, mitokondriyal bütünlüğü korumuş ve DNA hasarını hafifletmiştir. Özellikle düşük ve orta dozlarda selenyum, arsenik kaynaklı toksik etkileri önlemede etkili

bulunmuştur ve bu sonuç selenyumun çevresel toksinlere maruz kalan organizmaların korunmasında kullanılabileceğini öne sürmektedir (Selvaraj vd., 2012).

Albino sıçanlarda BPA kaynaklı oksidatif hasar ve apoptoza karşı selenyumun koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, BPA, 10 mg/kg/gün dozda uygulanmış ve testislerde lipid peroksidasyonunu artırarak antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaya neden olmuştur. Ayrıca histolojik olarak seminifer tübüllerde dejenerasyon ve spermatogenezde bozulma gibi yapısal hasarlar gözlemlenmiştir. Lipid peroksidasyonunu ölçmek için MDA düzeyleri analiz edilmiş, ayrıca antioksidan enzim aktiviteleri (CAT, SOD, GPx) belirlenmiştir. Histolojik ve ultrastrüktürel değerlendirmeler, ışık ve elektron mikroskopları ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan sodyum selenit formundaki selenyum, 10 mg/kg/gün dozunda uygulanmış ve BPA ile birlikte alındığında oksidatif stres belirteçlerini azaltıp antioksidan enzim aktivitelerini artırarak testis yapısını ve fonksiyonunu korumuştur (Zaki vd., 2020).

Başka bir çalışmada, selenyum ve vitamin E'nin Wistar sıçanlarının karaciğerinde BPA kaynaklı oksidatif stres ve doku hasarına karşı koruyucu etkileri incelenmiştir. 10 mg/kg/gün dozda BPA uygulaması, karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunu artırmış ve antioksidan enzim aktivitelerinde (GPx, CAT, glutatyon transferaz) anlamlı bir düşüşe neden olmuştur. Ayrıca, karaciğer hücrelerinde inflamasyon, nekrotik odaklar ve hepatosit dejenerasyonu gibi yapısal değişiklikler gözlenmiştir. Ancak, 0,5 mg/kg/gün dozda selenyum ve 100 mg/kg/gün dozda vitamin E kombinasyonu ile bu oksidatif stres belirteçlerinde azalma ve antioksidan savunma mekanizmalarının aktivitesinde artış sağlanarak karaciğer dokusunun bütünlüğü korunmuştur ve bu kombinasyonun BPA kaynaklı karaciğer hasarını azaltmada etkili olduğunu göstermiştir (Amraoui vd., 2018).

Albino erkek sıçanlarda BPA kaynaklı testis toksisitesine karşı selenyum ve nano-selenyumun koruyucu etkilerinin incelendiği bir çalışmada, 150 mg/kg/gün dozda BPA uygulaması, testis dokusunda lipid peroksidasyonunu artırmış, CAT ve GSH seviyelerinde düşüşe neden olmuştur. Aynı zamanda, COX-2 ve ER-2 gen ekspresyonlarında artış gözlenmiş ve DNA fragmantasyonu belirgin şekilde artmıştır. Selenyum (3 mg/kg/gün) ve nano-selenyum (2 mg/kg/gün) takviyesi, oksidatif stres belirteçlerini azaltarak ve antioksidan savunmayı güçlendirerek testis dokusunda koruyucu etkiler sağlamıştır. Nano-selenyumun, DNA bütünlüğünü koruma ve gen ekspresyon seviyelerini düzenlemede selenyumdan daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (Khalaf vd., 2019).

Yine yetişkin erkek sıçanlarda BPA kaynaklı testis toksisitesine karşı selenyumun koruyucu etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada 10 µg/kg /gündoza BPA maruziyeti sonucu, seminifer tübüllerde yapısal dejenerasyon, kan damarlarında genişleme ve kollajen lif birikimi gibi hasarlar gözlenmiş ve anti-apoptotik Bcl-2 protein ekspresyonun düşerek apoptozu tetiklediği belirtilmiştir. 10 µg/kg/gün selenyum uygulaması, testis dokusunun histolojik yapısında iyileşme sağlayarak seminifer tüböl epitelinin korumuş ve oksidatif stresin azalmasına katkı sağlamıştır (Ali vd., 2021).

NMRI farelerinden alınan testiküler mitokondri ve sperm örnekleri üzerinde yapılmış bir çalışmada, BPA 0,8 mM; selenyum ise 50, 100 ve 200 µM dozlarda kullanılmıştır. BPA, testiküler mitokondriyal fraksiyonlarda ROS ve MDA seviyelerini artırarak oksidatif strese yol açmış, antioksidan enzim aktivitelerinde (GSH ve SOD) ve mitokondriyal membran potansiyelinde (MMP) düşüşe neden olmuştur. Ayrıca, BPA uygulaması sperm canlılığı ve hareketliliğini önemli ölçüde azaltmıştır. Selenyum ise çalışılan tüm dozlarda oksidatif stresi azaltarak, mitokondriyal membran potansiyelini ve sperm hareketliliğini koruma etkisi göstermiştir (Rafie vd., 2021).

BPA'nın testislerde yol açtığı toksik etkilere karşı selenyumun koruyucu etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada, BPA ve selenyum 10 µg/kg/gün dozlarda erkek sıçanlara verilmiştir. BPA maruziyeti, testis dokusunda lipid peroksidasyonu seviyesini artırarak oksidatif stres oluşturmuş ve antioksidan enzim aktivitelerinde (CAT, SOD, GPx) azalmaya neden olmuştur. Ayrıca, testosteron ve luteinize edici hormon düzeylerinde düşüş, foliköl uyarıcı hormon düzeyinde ise artış gözlenmiştir. Histolojik olarak, BPA kaynaklı yapısal hasarların selenyum takviyesi ile önemli ölçüde azaltıldığı ve testis dokusunun bütünlüğünün korunduğu tespit edilmiştir. Selenyum, BPA'nın neden olduğu oksidatif stresin azaltılması, antioksidan enzim aktivitelerinde artış sağlaması ile savunma mekanizmalarının desteklenmesi ve hormon seviyelerinin düzenlenmesi yoluyla testis dokusunda koruyucu bir etki göstermiştir (Al-Amoudi, 2018).

Yetişkin erkek sıçanlarda, BPA'nın spinal kord ve submandibular bez üzerindeki toksik etkilerine karşı vitamin E ve selenyumun koruyucu etkileri araştırılmıştır. 25 mg/kg/gün dozda BPA uygulaması sonucunda spinal kord gri maddesinde piknotik nükleuslu nöronlar ve beyaz maddede nöropil dejenerasyonu meydana gelirken, submandibular bezde acinar hücrelerde vakuolizasyon ve PCNA ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Ayrıca, BPA uygulaması spinal

kordda lipid peroksidasyonu seviyelerini artırmış ve submandibular bezde antioksidan savunma enzimlerinden CAT aktivitesini azaltmıştır. 1 ml/L olarak uygulanan vitamin E ve selenyum kombinasyonu ise bu oksidatif stres göstergelerini azaltarak hücresel yapıyı korumuş ve dejeneratif değişiklikleri hafifletmiş, hem spinal kord hem de submandibular bez dokusunda iyileşme sağlamıştır (Bashi vd., 2023).

Literatürde hem *in-vivo* hem de *in-vitro* çalışmalarda, selenyumun BPA ve çeşitli çevresel kimyasalların oluşturduğu toksik etkilere karşı güçlü bir antioksidan görevi üstlenerek koruyucu bir rol sergilediği ve bu kimyasalların neden olduğu hücresel hasarı azalttığı veya tamamen ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde, BPA ve türevlerinin MCF7 hücre hattında oluşturduğu genotoksik etkilere karşı koruyucu bir etki sağladığı gözlemlenmiştir. Ancak mevcut literatürün BPA'nın olumsuz etkilerine karşı selenyumun koruyucu potansiyeli üzerine yoğunlaştığı görülmekte ve BPA türevlerinin (BPS, BPF, BPAF ve BPZ) toksik etkilerine karşı selenyumun etkinliğine dair sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bu tez çalışması ile, BPA türevlerine karşı selenyumun koruyucu etkisi araştırılarak literatürdeki bu boşluk doldurulmuş ve bisfenol türevlerinin genotoksik etkilerine dair kapsam genişletilmiştir. Bu bağlamda, çalışmamız literatürdeki selenyumun antioksidan kapasitesine dayanan koruyucu rolüne dair mevcut verileri desteklemekte ve literatüre yeni bir perspektif sunarak BPA dışındaki türevler üzerinde de selenyumun koruyucu potansiyelinin değerlendirilebileceğine dair önemli bir katkı sağlamaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda, genotoksik etkileri daha önce kanıtlanmış olan BPA ve potansiyel genotoksik etkileri halen araştırılmakta olan türevleri BPS, BPF, BPAF ve BPZ'nin, MCF7 hücre hattı üzerindeki DNA hasarını indüklenme potansiyelleri değerlendirilmiş ve güçlü antioksidan özellikleri ile bilinen selenyumun, bu DNA hasarına karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Çalışmamızın ilk kısmında Bisfenol A, Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF ve Sodyum Selenit'in MCF7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Yapılan MTT testi sonucunda, hücre canlılığını %50 azaltan BPA konsantrasyonu 45 μ M; BPS konsantrasyonu 450 μ M; BPAF konsantrasyonu 56 μ M ve BPZ konsantrasyonu 45 μ M olarak hesaplanmıştır. BPF'nin yüksek konsantrasyonlarında MCF7 hücre hattında hücre canlılığında azalma görülmüş ancak canlılık %50 inhibitör konsantrasyona düşmediği için IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır. Bisfenol türevlerinin IC₅₀ değerleri BPF>BPS>BPAF>BPZ=BPA şeklinde ifade edilebilir. Tezimizde kullanılan tüm bisfenol türevleri çalışılan konsantrasyonlarda MCF7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstererek hücre canlılıklarını azaltmıştır. Sodyum selenitin çalışılan konsantrasyonlarında hücre canlılığında azalma görülmüş ancak canlılık %50 inhibitör konsantrasyona düşmediği için IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır. Test ettiğimiz konsantrasyonlarda sitotoksik etki gözlenmiştir.

2. Çalışmamızın ikinci kısmında Bisfenol A, Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF ve Sodyum Selenit'in MCF7 hücre hattı üzerindeki genotoksik etkileri araştırılmıştır. Yapılan komet testi sonucunda, BPF'nin 0,1 μ M konsantrasyonu hariç çalışılan tüm bisfenol türevleri ve konsantrasyonları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ve MCF7 hücre hattı üzerinde DNA hasarını artırmaktadır. Bisfenol türevleri olan BPS, BPF, BPAF ve BPZ, BPA'ya göre kıyaslandığında ise; BPA'nın çalışılan aynı konsantrasyonlarında BPS 5, 10 ve 50 μ M dozda, BPAF 5 μ M dozda ve BPZ 50 μ M dozda BPA'ya göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ve MCF7 hücre hattı üzerinde DNA hasarını BPA'dan daha fazla artırmaktadır. Sodyum selenitin ise 30 nM, 100 nM, 300 nM ve 1 μ M konsantrasyonları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ve MCF7 hücre hattı üzerinde DNA hasarını artırmaktadır.

3. Çalışmamızın son kısmında ise selenyumun sitotoksikite ve genotoksikite göstermediği seçilen dozları ile MCF7 hücre hattına ön maruziyet yapılarak, Bisfenol A, Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF ve Bisfenol Z'nin oluşturduğu DNA hasarına karşı koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Yapılan komet testi sonucunda, sodyum selenitin 3 nM ön maruziyetinden sonra yapılan bisfenol türevlerinin maruziyetinde sadece BPF'nin 50 µM konsantrasyonu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Çalışılan diğer tüm bisfenol türevi konsantrasyonlarında 3 nM sodyum selenit birlikte maruziyeti sonucu DNA hasarı oranı kontrol düzeyine inerek DNA hasarına karşı koruyuculuk gözlenmiştir. Sodyum selenitin 10 nM ön maruziyetinden sonra yapılan bisfenol türevlerinin maruziyetinde çalışılan hiçbir konsantrasyon kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çalışılan tüm bisfenol türevi konsantrasyonlarında 10 nM sodyum selenit birlikte maruziyeti sonucu DNA hasarı oranı kontrol düzeyine inerek DNA hasarına karşı koruyuculuk gözlenmiştir. Her bir bisfenol türevinin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarı sonuçları karşılaştırıldığında ise tüm bisfenol türevlerinin test edilen tüm konsantrasyonlarında neden olduğu DNA hasarı, 3 nM ve 10 nM sodyum selenit varlığında yaptığı DNA hasarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ve 3 nM ve 10 nM sodyum selenitin varlığı tüm bisfenol türevlerinde DNA hasar oranını düşürmüştür. 3 nM sodyum selenit'in tüm bisfenol türevlerinin oluşturduğu DNA hasarını azaltma potansiyeli ile 10 nM sodyum selenit'in tüm bisfenol türevlerinin oluşturduğu DNA hasarını azaltıcı etkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tezimizden elde ettiğimiz sonuçlara göre BPA ve çalışılan türevlerinin (BPS, BPF, BPAF ve BPZ) çalışılan konsantrasyonlarda sitotoksik ve genotoksik olduğu bulunmuştur. Sodyum selenitin sitotoksik ve genotoksik etki göstermediği 3 nM ve 10 nM konsantrasyonların ise bisfenol türevlerinin oluşturduğu genotoksik etkilere karşı koruyucu etkisi olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, BPA ve türevlerinin BPA benzeri zararlı etkiler yaratma potansiyeli, bu kimyasalların güvenliği ve insan sağlığı üzerindeki etkilerinin daha kapsamlı bir şekilde incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Aynı zamanda, selenyumun bisfenol türevlerine karşı koruyucu etkisinin daha fazla çalışmayla desteklenmesi, halk sağlığının korunması için önemli bir adım olacaktır. Sonuç olarak, bu tür zararlı kimyasallara karşı toplumun korunması amacıyla gerekli regülasyonlar gözden geçirilmeli, bireylerin beslenme alışkanlıkları ve selenyum destekleri konusundaki bilinç artırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abraham, A. and Chakraborty, P. (2020). A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Reviews on environmental health*, 35(2), 201-210. <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0034>
- Abramczyk, H., Surmacki, J., Kopeć, M., Olejnik, A. K., Kaufman-Szymczyk, A., & Fabianowska-Majewska, K. (2016). Epigenetic changes in cancer by Raman imaging, fluorescence imaging, AFM and scanning near-field optical microscopy (SNOM). Acetylation in normal and human cancer breast cells MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231. *Analyst*, 141(19), 5646-5658. <https://doi.org/10.1039/C6AN00859C>
- Aghajanianpour-Mir, S. M., Zabihi, E., Keyhani, E., Akhavan-Niaki, H., Bagherizadeh, I., Biglari, S., & Behjati, F. (2016). The genotoxic and cytotoxic effects of bisphenol-A (BPA) in MCF-7 cell line and amniocytes. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine (IJMCM)*, 5(1), 19-29.
- Akash, M. S. H., Rasheed, S., Rehman, K., Imran, M., & Assiri, M. A. (2023). Toxicological evaluation of bisphenol analogues: preventive measures and therapeutic interventions. *RSC advances*, 13(31), 21613-21628. <https://doi.org/10.1039/D3RA04285E>
- Al-Amoudi, W. M. (2018). Antioxidant activity of selenium on bisphenol-induced apoptosis and testicular toxicity of rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 12(21), 278-289. <https://doi.org/10.5897/AJPP2018.4930>
- Algonaiman, R., Almutairi, A. S., Al Zhrani, M. M., & Barakat, H. (2023). Effects of Prenatal Exposure to Bisphenol A Substitutes, Bisphenol S and Bisphenol F, on Offspring's Health: Evidence from Epidemiological and Experimental Studies. *Biomolecules*, 13(11), 1616. <https://doi.org/10.3390/biom13111616>
- Alharbi, H. F., Algonaiman, R., Alduwayghiri, R., Aljutaily, T., Algheshairy, R. M., Almutairi, A. S., ... & Barakat, H. (2022). Exposure to Bisphenol A substitutes, Bisphenol S and Bisphenol F, and its association with developing obesity and diabetes mellitus: a narrative review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(23), 15918. <https://doi.org/10.3390/ijerph192315918>
- Ali, A. M., Shalaby, S. A., Abosaif, G. M. M., & El Banna, E. A. (2021). Possible Protective Role of Selenium on Testicular Toxicity Induced by Bisphenol A in Adult Male Albino Rats: Histological and Immunohistochemical Study. *Benha Journal of Applied Sciences*, 6(6), 211-222. <https://doi.org/10.21608/BJAS.2021.214415>
- Amraoui, W., Adjabi, N., Bououza, F., Boumendjel, M., Taibi, F., Boumendjel, A., ... & Messarah, M. (2018). Modulatory role of selenium and vitamin E, natural antioxidants, against bisphenol A-induced oxidative stress in Wistar albinos rats. *Toxicological research*, 34, 231-239. <https://doi.org/10.5487/TR.2018.34.3.231>
- Aniogo, E. C., George, B. P., & Abrahamse, H. (2022). Characterization of resistant MCF-7 breast cancer cells developed by repeated cycles of photodynamic therapy. *Frontiers in pharmacology*, 13, 964141. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.964141>
- Apriletti, J. W., Ribeiro, R. C., Wagner, R. L., Feng, W., Webb, P., Kushner, P. J., ... & Baxter, J. D. (1998). Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 25(S1), S2-S11. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1998.tb02293.x>

- ATCC (American Type Culture Collection). (2024, 25 Ekim). HTB-22 MCF7 Cell Line Product Sheet. <https://www.atcc.org/products/htb-22>
- Audebert, M., Dolo, L., Perdu, E., Cravedi, J. P., & Zalko, D. (2011). Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Archives of toxicology*, 85(11), 1463-1473. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0721-2>
- Avery, J. C., and Hoffmann, P. R. (2018). Selenium, selenoproteins, and immunity. *Nutrients*, 10(9), 1203. <https://doi.org/10.3390/nu10091203>
- Ayazgök, B., and Küçükkinç, T. T. (2017). Düşük doz bisfenol A'nın büyük etkileri. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(2), 139.
- Aysin, F. (2024). Bisphenol A promotes cell death in healthy respiratory system cells through inhibition of cell proliferation and induction of G2/M cell cycle arrest. *Environmental Toxicology*, 39(5), 3264-3273. <https://doi.org/10.1002/tox.24203>
- Azqueta, A., and Collins, A. R. (2006). The comet assay: a sensitive and quantitative method for analysis of DNA damage. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a919>
- Bal, C., Erdogan, S., Gök, G., Nural, C., Özbek, B., Ercan, M., ... & Erel, Ö. (2021). Biological variation and reference change value data for serum copper, zinc and selenium in Turkish adult population. *Turkish Journal of Biochemistry*, 46(5), 587-592. <https://doi.org/10.1515/tjb-2020-0298>
- Balci-Ozyurt, A., Yirun, A., Cakır, D. A., Ozcelik, İ., Bacanlı, M., Ozkemahli, G., ... & Erkekoglu, P. (2024). Comparative in silico and in vitro evaluation of possible toxic effects of bisphenol derivatives in HepG2 cells. *Toxicology Research*, 13(4). <https://doi.org/10.1093/toxres/tfae127>
- Bashir, D. W., Ahmed, Y. H., & El-Sakhawy, M. A. (2023). Ameliorative effect of vitamin E and selenium against bisphenol A-induced toxicity in spinal cord and submandibular salivary glands of adult male albino rats. *International Journal of Environmental Health Research*, 33(10), 993-1009. <https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2067327>
- Benjamin, K., Marquez, C. M., Morta, M., Reyes, E. M., Aragones, L., & Velarde, M. (2023). Bisphenol S increases cell number and stimulates migration of endometrial epithelial cells. *Journal of the ASEAN Federation of Endocrine Societies*, 38(Suppl 1), 13. <https://doi.org/10.15605/jafes.037.S7>
- Bergman, Å., Heindel, J. J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, T. R., & World Health Organization. (2013). *State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012*. World Health Organization.
- Betsy, C. J., and Siva, C. (2023). Animal Cell Culture. *Fisheries Biotechnology and Bioinformatics*, 85–89. https://doi.org/10.1007/978-981-99-6991-3_11
- Blom, A., Ekman, E., Johannisson, A., Norrgren, L., & Pesonen, M. (1998). Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34, 306-310. <https://doi.org/10.1007/s002449900322>
- Bubnova, N. V., NYu, T., & OYu, K. (2023). The biological role of selenium (literature review). *Acta Medica Eurasia*, 2, 114-123. <https://doi.org/10.47026/2413-4864-2023-2-114-123>
- Catenza, C. J., Farooq, A., Shubear, N. S., & Donkor, K. K. (2021). A targeted review on fate, occurrence, risk and health implications of bisphenol analogues. *Chemosphere*, 268, 129273. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129273>

- Chanemougavally, J., Thotakura, B., & Janaki, C. S. (2023). Effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on skeletal system development: a review. *Cureus*, 15(9). <https://doi.org/10.7759/cureus.46109>
- Charles, D. A., and Prince, S. E. (2024). Deciphering the molecular mechanism of NLRP3 in BPA-mediated toxicity: Implications for targeted therapies. *Heliyon*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28917>
- Chen, G., Liu, W., & Yan, B. (2022). Breast cancer MCF-7 cell spheroid culture for drug discovery and development. *Journal of cancer therapy*, 13(3), 117. <https://doi.org/10.4236/jct.2022.133009>
- Cheng, W. H. (2021). Revisiting selenium toxicity. *The Journal of Nutrition*, 151(4), 747-748. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa433>
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., ... & Štětina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143-151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>
- Comşa, Ş., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer research*, 35(6), 3147-3154.
- Coppola, L., Tait, S., Fabbri, E., Perugini, M., & La Rocca, C. (2022). Comparison of the toxicological effects of pesticides in non-tumorigenic MCF-12A and tumorigenic MCF-7 human breast cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(8), 4453. <https://doi.org/10.3390/ijerph19084453>
- Cordelli, E., Bignami, M., and Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*, 10(1), 68-78. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa093>
- Corvi, R., and Madia, F. (2017). In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced?. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 600-608. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.02>
- Coşkun, A., Carobene, A., Aarsand, A. K., Aksungar, F. B., Serteser, M., Sandberg, S., ... & European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Biological Variation and Task Group for the Biological Variation Database. (2022). Within-and between-subject biological variation data for serum zinc, copper and selenium obtained from 68 apparently healthy Turkish subjects. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 60(4), 533-542. <https://doi.org/10.1515/cclm-2021-0886>
- Du, M., Su, X. M., Zhang, T., & Xing, Y. J. (2014). Aberrant promoter DNA methylation inhibits bone morphogenetic protein 2 expression and contributes to drug resistance in breast cancer. *Molecular Medicine Reports*, 10(2), 1051-1055. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2276>
- Dumitrascu, M. C., Mares, C., Petca, R. C., Sandru, F., Popescu, R. I., Mehedinu, C., & Petca, A. (2020). Carcinogenic effects of bisphenol A in breast and ovarian cancers. *Oncology letters*, 20(6), 1-1. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12145>
- Đurovcová, I., Kyžek, S., Fabová, J., Makuková, J., Gálová, E., & Ševčovičová, A. (2022). Genotoxic potential of bisphenol A: A review. *Environmental Pollution*, 306, 119346. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119346>
- EC (European Commission). (2009, 18 Haziran). Directive No 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the safety of toys. *Official Journal of the European Union*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:02009L0048-20221205>

- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*, 12(4), 207-218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
- EFSA CEF Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids). (2015). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. *EFSA Journal*, 13(1), 3978. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.397>
- EFSA CEF Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids). (2023a). Scientific Opinion on the re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 21(4), 6857. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.6857>
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). (2014). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA Journal*, 12(10), 3846. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3846>
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens). (2023b). Scientific opinion on the tolerable upper intake level for selenium. *EFSA Journal*, 21(1), 7704. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7704>
- El-Bayoumy, K. (2001). The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1-2), 123-139. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00075-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00075-6)
- Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., ... & Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and sterility*, 103(1), 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.005>
- EPA (United States Environmental Protection Agency) (1988, 26 Eylül). Bisphenol A IRIS Assessments. https://iris.epa.gov/ChemicalLanding/&substance_nmbr=356
- Erkekoğlu, P., Rachidi, W., De Rosa, V., Giray, B., Favier, A., & Hincal, F. (2010). Protective effect of selenium supplementation on the genotoxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate and mono (2-ethylhexyl) phthalate treatment in LNCaP cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 559-566. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.038>
- Escrivá, L., Zilliacus, J., Hessel, E., & Beronius, A. (2021). Assessment of the endocrine disrupting properties of bisphenol AF: a case study applying the European regulatory criteria and guidance. *Environmental Health*, 20(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12940-021-00731-0>
- EU (European Union). (2011a, 14 Ocak). Commission Regulation No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of the European Union*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:02011R0010-20230831>
- EU (European Union). (2011b, 28 Ocak). Commission Directive No 2011/8/EU of 28 January 2011 amending Directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of Bisphenol A in plastic infant feeding bottles. *Official Journal of the European Union*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32011L0008>
- EU (European Union). (2018, 12 Şubat). Commission Regulation No 2018/213 of 12 February 2018 on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact

materials. *Official Journal of the European Union*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32018R0213>

- FDA (Food and Drug Administration). (2012, 17 Temmuz). Amendment to Food Additive Regulations Regarding Abandonment of Bisphenol A in Polycarbonate Resins Used in Baby Bottles and Sippy Cups. *The Daily Journal of the United States of Government*. <https://www.federalregister.gov/documents/2012/07/17/2012-17366/indirect-food-additives-polymers>
- FDA (Food and Drug Administration). (2013, 12 Temmuz). Amendment of the Food Additive Regulations to No Longer Provide for the Use of BPA-Based Epoxy Resins as Coatings in Packaging for Infant Formula. *The Daily Journal of the United States of Government*. <https://www.federalregister.gov/documents/2013/07/12/2013-16684/indirect-food-additives-adhesives-and-components-of-coatings>
- Fic, A., Sollner Dolenc, M., Filipič, M., & Peterlin Mašić, L. (2013). Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 64(2), 189-199. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2319>
- Fouyet, S., Olivier, E., Leproux, P., Dutot, M., & Rat, P. (2021). Bisphenol A, bisphenol F, and bisphenol S: the bad and the ugly. Where is the good?. *Life*, 11(4), 314. <https://doi.org/10.3390/life11040314>
- Gao, Z., He, W., Liu, Y., Gao, Y., Fan, W., Luo, Y., ... & Song, S. (2024). Perinatal bisphenol S exposure exacerbates the oxidative burden and apoptosis in neonatal ovaries by suppressing the mTOR/autophagy axis. *Environmental Pollution*, 349, 123939. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123939>
- García-Recio, E., Costela-Ruiz, V. J., Melguizo-Rodríguez, L., Ramos-Torrecillas, J., Illescas-Montes, R., De Luna-Bertos, E., & Ruiz, C. (2023). Effects of bisphenol F, bisphenol S, and bisphenol AF on cultured human osteoblasts. *Archives of toxicology*, 97(7), 1899-1905. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03523-2>
- García-Silva, S., and Aranda, A. (2004). The thyroid hormone receptor is a suppressor of ras-mediated transcription, proliferation, and transformation. *Molecular and cellular biology*, 24(17), 7514-7523. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7514-7523.2004>
- Genchi, G., Lauria, G., Catalano, A., Sinicropi, M. S., & Carocci, A. (2023). Biological activity of selenium and its impact on human health. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2633. <https://doi.org/10.3390/ijms24032633>
- George, V. C., and Rupasinghe, H. V. (2018). DNA damaging and apoptotic potentials of Bisphenol A and Bisphenol S in human bronchial epithelial cells. *Environmental toxicology and pharmacology*, 60, 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.04.00>
- Giray, B., and Hincal, F. (2004). Selenium status in Turkey. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 259, 447-451. <https://doi.org/10.1023/B:JANC.0000020916.24769.41>
- González-Casanova, J. E., Bermúdez, V., Caro Fuentes, N. J., Angarita, L. C., Caicedo, N. H., Rivas Muñoz, J., & Rojas-Gómez, D. M. (2023). New evidence on BPA's role in adipose tissue development of proinflammatory processes and its relationship with obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8231. <https://doi.org/10.3390/ijms24098231>
- Guignard, D., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Chaillou, E., Gautier, R., Gayrard, V., ... & Cabaton, N. J. (2022). Gestational exposure to bisphenol A induces region-specific changes in brain metabolomic fingerprints in sheep. *Environment International*, 165, 107336. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107336>

- Gupta, S., Roy, A., & Dwarakanath, B. S. (2017). Metabolic cooperation and competition in the tumor microenvironment: implications for therapy. *Frontiers in oncology*, 7, 68. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00068>
- Güzel, K. G. U., Nazıroğlu, M., & Ceyhan, D. (2020). Bisphenol A-induced cell proliferation and mitochondrial oxidative stress are diminished via modulation of trpv1 channel in estrogen positive breast cancer cell by selenium treatment. *Biological trace element research*, 198(1), 118-130. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02057-3>
- Harnett, K. G., Chin, A., & Schuh, S. M. (2021). BPA and BPA alternatives BPS, BPAF, and TMBPF, induce cytotoxicity and apoptosis in rat and human stem cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 216, 112210. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112210>
- Hassani, F. V., Abnous, K., Mehri, S., Jafarian, A., Birner-Gruenberger, R., Robati, R. Y., & Hosseinzadeh, H. (2018). Proteomics and phosphoproteomics analysis of liver in male rats exposed to bisphenol A: Mechanism of hepatotoxicity and biomarker discovery. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 26-38. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.021>
- Hercog, K., Maisanaba, S., Filipič, M., Sollner-Dolenc, M., Kač, L., & Žegura, B. (2019). Genotoxic activity of bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF and their mixtures in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Science of the total environment*, 687, 267-276. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.486>
- Holiar, V. V., Gotsulyak, N. Y., Khoruzhenko, A. I., & Zaiets, I. V. (2019). Generation and characterization of the MCF-7 cell line with a knockout of a p85-S6K1 isoform of the ribosomal protein S6 kinase 1. *Biopolymers and Cell*, 35(4), 303-312. <https://doi.org/10.7124/bc.000A0B>
- Huang, M., Liu, S., Fu, L., Jiang, X., & Yang, M. (2020). Bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce oxidative stress and biomacromolecular damage in human granulosa KGN cells. *Chemosphere*, 253, 126707. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126707>
- Hudu, S. A., Alshrari, A. S., Syahida, A., & Sekawi, Z. (2016). Cell culture, technology: enhancing the culture of diagnosing human diseases. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(3), DE01. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15837.7460>
- Ikhlas, S., Usman, A., & Ahmad, M. (2019). In vitro study to evaluate the cytotoxicity of BPA analogues based on their oxidative and genotoxic potential using human peripheral blood cells. *Toxicology in vitro*, 60, 229-236. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.06.00>
- Isnaini, I., Permatasari, N., Mintaroem, K., Prihardina, B., & Widodo, M. A. (2018). Oxidants-antioxidants profile in the breast cancer cell line MCF-7. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 19(11), 3175. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.11.3175>
- Iso, T., Watanabe, T., Iwamoto, T., Shimamoto, A., & Furuichi, Y. (2006). DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(2), 206-210. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.206>
- Jedrzejczak-Silicka, M. (2017). History of cell culture. *New insights into cell culture technology*, 1, 13. <https://doi.org/10.5772/66905>
- Ju, G., Zhan, X., Chen, X., Zhang, T., Zhai, X., Chu, C., ... & Xu, D. (2024). Bisphenol S enhances the cell proliferation ability of prostate cancer cells by regulating the expression of SDS. *Toxicology in Vitro*, 98, 105827. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2024.105827>
- Kang, J. H., Asai, D., & Toita, R. (2023). Bisphenol A (BPA) and cardiovascular or cardiometabolic diseases. *Journal of Xenobiotics*, 13(4), 775-810. <https://doi.org/10.3390/jox13040049>

- Kaplan, H. M., and Pazarci, P. (2024). Antiproliferative and Apoptotic Effects of Tempol, Methotrexate, and Their Combinations on the MCF7 Breast Cancer Cell Line. *ACS omega*, 9(6), 6658-6662. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c07624>
- Khalaf, A. A., Ahmed, W. M. S., Moselhy, W. A., Abdel-Halim, B. R., & Ibrahim, M. A. (2019). Protective effects of selenium and nano-selenium on bisphenol-induced reproductive toxicity in male rats. *Human & experimental toxicology*, 38(4), 398-408. <https://doi.org/10.1177/0960327118816134>
- Khan, S. I., Aumsuwan, P., Khan, I. A., Walker, L. A., & Dasmahapatra, A. K. (2012). Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. *Chemical research in toxicology*, 25(1), 61-73. <https://doi.org/10.1021/tx200378c>
- Kieliszek, M. (2019). Selenium—fascinating microelement, properties and sources in food. *Molecules*, 24(7), 1298. <https://doi.org/10.3390/molecules24071298>
- Kieliszek, M., and Błażej, S. (2013). Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*, 29(5), 713-718. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.11.012>
- Kilinc, M., Coskun, A., Bilge, F., Imrek, S. S., & Atli, Y. (2010). Serum reference levels of selenium, zinc and copper in healthy pregnant women at a prenatal screening program in southeastern Mediterranean region of Turkey. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(3), 152-156. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.01.004>
- Kim, S. J., Choi, M. C., Park, J. M., & Chung, A. S. (2021). Antitumor effects of selenium. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11844. <https://doi.org/10.3390/ijms222111844>
- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., ... & Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences*, 84(2), 249-259. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi074>
- Komarowska, M. D., Grubczak, K., Czerniecki, J., Hermanowicz, A., Hermanowicz, J. M., Debek, W., & Matuszczak, E. (2021). Identification of the Bisphenol A (BPA) and the Two Analogues BPS and BPF in Cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 694669. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.694669>
- Kose, O., Rachidi, W., Beal, D., Erkekoglu, P., Fayyad-Kazan, H., & Kocer Gumusel, B. (2020). The effects of different bisphenol derivatives on oxidative stress, DNA damage and DNA repair in RWPE-1 cells: A comparative study. *Journal of applied toxicology*, 40(5), 643-654. <https://doi.org/10.1002/jat.3934>
- Kovačič, A., Gys, C., Kosjek, T., Covaci, A., & Heath, E. (2019). Photochemical degradation of BPF, BPS and BPZ in aqueous solution: Identification of transformation products and degradation kinetics. *Science of The Total Environment*, 664, 595-604. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.064>
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., & Jha, A. N. (2009). Comet assay measurements: a perspective. *Cell biology and toxicology*, 25, 53-64. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>
- Landecker, H. (2000). Immortality, in vitro: A history of the HeLa cell line. *Biotechnology and Culture: Bodies, Anxieties, Ethics*, 53-72.
- Lee, D. W., Oh, W. Y., Yi, S. H., Ku, B., Lee, M. Y., Cho, Y. H., & Yang, M. (2016). Estimation of bisphenol A—Human toxicity by 3D cell culture arrays, high throughput alternatives to animal tests. *Toxicology letters*, 259, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.71>

- Lee, J., Kim, S., Choi, K., & Ji, K. (2018). Effects of bisphenol analogs on thyroid endocrine system and possible interaction with 17 β -estradiol using GH3 cells. *Toxicology in Vitro*, 53, 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.08.005>
- Lee, S., Kim, C., Shin, H., Kho, Y., & Choi, K. (2019). Comparison of thyroid hormone disruption potentials by bisphenols A, S, F, and Z in embryo-larval zebrafish. *Chemosphere*, 221, 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.019>
- Lee, S., Liu, X., Takeda, S., & Choi, K. (2013). Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: a comparison study employing chicken DT40 cells. *Chemosphere*, 93(2), 434-440. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.029>
- Leisegang, K., Udodong, A., Bouic, P. J. D., & Henkel, R. R. (2014). Effect of the metabolic syndrome on male reproductive function: a case-controlled pilot study. *Andrologia*, 46(2), 167-176. <https://doi.org/10.1111/and.12060>
- Li, J., Li, Z., Zhu, Y., Peng, H., Du, Z., Ru, S., & Wang, W. (2023). Bisphenol S remodels red blood cell membrane lipids by altering plasma lipid levels, causing the risk of venous thrombosis in SD rats and zebrafish embryos. *Environment International*, 182, 108331. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108331>
- Li, M., Yang, Y., Yang, Y., Yin, J., Zhang, J., Feng, Y., & Shao, B. (2013). Biotransformation of bisphenol AF to its major glucuronide metabolite reduces estrogenic activity. *PloS one*, 8(12), e83170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083170>
- Li, Q., Gao, S., Zhang, Y., Xie, Z., Wang, L., Li, Y., ... & He, J. (2024a). Association between Bisphenol A and Prostate-Specific Antigen (PSA) among US Older Males: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 2003–2012. *Nutrients*, 16(16), 2589. <https://doi.org/10.3390/nu16162589>
- Li, Q., Wang, H., Yu, L., Zhou, J., Chen, J., Zhang, X., ... & Li, Q. (2014). ChIP-seq predicted estrogen receptor binding sites in human breast cancer cell line MCF7. *Tumor Biology*, 35, 4779-4784. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1627-4>
- Li, W., Shi, X., Xu, Y., Wan, J., Wei, S., & Zhu, R. (2017). Tamoxifen promotes apoptosis and inhibits invasion in estrogen-positive breast cancer MCF-7 cells. *Molecular medicine reports*, 16(1), 478-484. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6603>
- Li, X., Yu, M., Tian, L., Xiong, W., Zhang, L., Yang, Z., & Chen, J. (2024b). Toxicity of bisphenol S on human normal ovarian epithelial cells mediated by ER β -MAPK signaling pathway. *Wei Sheng yan jiu = Journal of Hygiene Research*, 53(3), 441-454. <https://doi.org/10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2024.03.015>
- Liao, C., and Kannan, K. (2013). Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(19), 4655-4662. <https://doi.org/10.1021/jf400445n>
- Liu, W., Yao, H., Zhao, W., Shi, Y., Zhang, Z., & Xu, S. (2016). Selenoprotein W was correlated with the protective effect of selenium on chicken myocardial cells from oxidative damage. *Biological trace element research*, 171, 419-426. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0529-7>
- Luparello, C., Cruciata, I., Joerger, A. C., Ocasio, C. A., Jones, R., Tareque, R. K., ... & Caradonna, F. (2021). Genotoxicity and epigenotoxicity of carbazole-derived molecules on mcf-7 breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3410. <https://doi.org/10.3390/ijms22073410>

- Ma, Y., Liu, H., Wu, J., Yuan, L., Wang, Y., Du, X., ... & Zhang, H. (2019). The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environmental research*, 176, 108575. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108575>
- Maćczak, A., Cyrkler, M., Bukowska, B., & Michałowicz, J. (2017). Bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce different oxidative stress and damage in human red blood cells (in vitro study). *Toxicology in vitro*, 41, 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.02.018>
- MacFarquhar, J. K., Broussard, D. L., Melstrom, P., Hutchinson, R., Wolkin, A., Martin, C., ... & Jones, T. F. (2010). Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Archives of internal medicine*, 170(3), 256-261. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.495>
- Mahmoud, A., Casciati, A., Bakar, Z. A., Hamzah, H., Ahmad, T. A. T., & Noor, M. H. M. (2023). The Detection of DNA Damage Response in MCF7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines after X-ray Exposure. *Genome Integrity*, 14. <https://doi.org/10.14293/genint.14.1.001>
- Maniradhan, M., and Calivarathan, L. (2023). Bisphenol a-induced endocrine dysfunction and its associated metabolic disorders. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 23(4), 515-529. <https://doi.org/10.2174/1871530322666220928144043>
- Martínez, M. Á., Blanco, J., Rovira, J., Kumar, V., Domingo, J. L., & Schuhmacher, M. (2020). Bisphenol A analogues (BPS and BPF) present a greater obesogenic capacity in 3T3-L1 cell line. *Food and Chemical Toxicology*, 140, 111298. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111298>
- Masters, J. R., and Stacey, G. N. (2007). Changing medium and passaging cell lines. *Nature protocols*, 2(9), 2276-2284. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.319>
- Maurici, D., Aardema, M. J., Corvi, R., Kleber, M., Krul, C., Laurent, C., Loprieno, N., Pasanen, M., Pfuhrer, S., Phillips, B., Sabbioni, E., Sanner, T., & Vanparys, P. (2005). Genotoxicity and mutagenicity. *Atla-Alternatives To Laboratory Animals*, 33, 117-130. <https://doi.org/10.1177/026119290503301s13>
- Mohamed, S., Sabita, U., Rajendra, S., & Raman, D. (2017). Genotoxicity: mechanisms, testing guidelines and methods. *Glob J Pharm Pharm Sci*, 1(5), 1-6. <https://doi.org/10.19080/GJPPS.2017.02.555575>
- Mokra, K., Kuźmińska-Surowaniec, A., Woźniak, K., & Michałowicz, J. (2017). Evaluation of DNA-damaging potential of bisphenol A and its selected analogs in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food and chemical toxicology*, 100, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.003>
- Molina, L., Figueroa, C. D., & Ehrenfeld, P. (2024). Bisphenols and Their Interaction with GPER-1: The Invisible Enemy Behind Breast Cancer and Its Societal Impact. <https://doi.org/10.5772/intechopen.112880>
- Morgan, M. M., Livingston, M. K., Warrick, J. W., Stanek, E. M., Alarid, E. T., Beebe, D. J., & Johnson, B. P. (2018). Mammary fibroblasts reduce apoptosis and speed estrogen-induced hyperplasia in an organotypic MCF7-derived duct model. *Scientific reports*, 8(1), 7139. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25461-1>
- Moya, C. F., Piagentini, M., Silva, D. D. C., Fernandes, F. H., Salvadori, D. M. F., & Oba, E. (2020). Selenium supplementation prevents DNA damage in ram spermatozoa. *Ciência Rural*, 51(1), e20200102. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200102>

- Naik, S. R., Gamare, D., & Bhopatrao, A. (2024). Chemical health hazards and toxicity of environmental pollutants on humans, animals and others: An overview. *Journal of Toxicological Studies*, 2(1), 1135-1135. <https://doi.org/10.59400/jts.v2i1.1135>
- Neevedha, K., Anitha, E., Gokul, T., & Priestlyvivekkumar, S. (2024). Comparison Of Anticancer Activity Between Thymoquinone And Tamoxifen, Thymoquinone+ Tamoxifen On MCF-7 Cell Line Of Human Breast Cancer–An Invitro Study. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 17(2). <https://doi.org/10.13005/bpj/2946>
- Odetayo, A. F., Adeyemi, W. J., & Olayaki, L. A. (2023). In vivo exposure to bisphenol F induces oxidative testicular toxicity: role of Erβ and p53/Bcl-2 signaling pathway. *Frontiers in Reproductive Health*, 5, 1204728. <https://doi.org/10.3389/frph.2023.1204728>
- OECD. (2016). Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. *OECD Publishing*, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264885-en>
- OECD. (2017). Overview on genetic toxicology TGs, OECD Series on Testing and Assessment, No. 238. *OECD Publishing*, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264274761-e>
- Ostling, G., and Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123(1), 291-298. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X)
- Padberg, F., Tarnow, P., Luch, A., & Zellmer, S. (2019). Minor structural modifications of bisphenol A strongly affect physiological responses of HepG2 cells. *Archives of toxicology*, 93, 1529-1541. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02457-y>
- Pan, Z., Huang, J., Hu, T., Zhang, Y., Zhang, L., Zhang, J., ... & Wu, Q. (2023). Protective effects of selenium nanoparticles against bisphenol A-induced toxicity in porcine intestinal epithelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7242. <https://doi.org/10.3390/ijms24087242>
- Perera, L., Li, Y., Coons, L. A., Houtman, R., van Beuningen, R., Goodwin, B., ... & Teng, C. T. (2017). Binding of bisphenol A, bisphenol AF, and bisphenol S on the androgen receptor: Coregulator recruitment and stimulation of potential interaction sites. *Toxicology in Vitro*, 44, 287-302. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.020>
- Pfeifer, D., Chung, Y. M., & Hu, M. C. (2015). Effects of low-dose bisphenol A on DNA damage and proliferation of breast cells: the role of c-Myc. *Environmental health perspectives*, 123(12), 1271-1279. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409199>
- Piperakis, S. M. (2009). Comet assay: a brief history. *Cell biology and toxicology*, 25, 1-3. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9081-y>
- Prakarsh, P., and Mansi, C. (2024). Genetic Mutation Due to Pollution. *International Journal For Multidisciplinary Research*, 6(4). <https://doi.org/10.36948/ijfmr.2024.v06i04.23870>
- Pu, C., Liu, Y., Wang, L., Ma, J., Lv, H., Song, J., ... & Zhang, C. (2024). Exploring the mechanism of intestinal injury induced by Bisphenol S in freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*): Molecular and biochemical approaches. *Aquatic Toxicology*, 274, 107035. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.107035>
- Rafiee, Z., Rezaee-Tazangi, F., Zeidooni, L., Alidadi, H., & Khorsandi, L. (2021). Protective effects of selenium on Bisphenol A-induced oxidative stress in mouse testicular mitochondria and sperm motility. *JBRA Assisted Reproduction*, 25(3), 459. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20210010>

- REACH. (2006, 18 Aralık). Regulation No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency. *Official Journal of the European Union*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:02006R1907-20240606>
- Recchia, A. G., Vivacqua, A., Gabriele, S., Carpino, A., Fasanella, G., Rago, V., ... & Maggiolini, M. (2004). Xenoestrogens and the induction of proliferative effects in breast cancer cells via direct activation of oestrogen receptor α . *Food additives and contaminants*, 21(2), 134-144. <https://doi.org/10.1080/02652030310001641177>
- Rochester, J. R., and Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environmental health perspectives*, 123(7), 643-650. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>
- Ruggeri, R. M., D'Ascola, A., Vicchio, T. M., Campo, S., Giani, F., Giovino, S., ... & Trimarchi, F. (2020). Selenium exerts protective effects against oxidative stress and cell damage in human thymocytes and fibroblasts. *Endocrine*, 68, 151-162. <https://doi.org/10.1007/s12020-019-02171-w>
- Rybczyńska-Tkaczyk, K., Skóra, B., & Szychowski, K. A. (2023). Toxicity of bisphenol A (BPA) and its derivatives in diverse biological models with the assessment of molecular mechanisms of toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(30), 75126-75140. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27747-y>
- Rydberg, B., and Johanson, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. *DNA Repair Mechanisms*, 465-468. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-322650-1.50090-4>
- Salaudin, M. (2022). A brief concept of cell culture: challenges, prospects and applications. *Cell Culture: Adv Technol Appl Med Life Sci*, 1-24. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99387>
- Santiago, J., Simková, M., Silva, J. V., Santos, M. A., Vitku, J., & Fardilha, M. (2024). Bisphenol A Negatively Impacts Human Sperm MicroRNA and Protein Profiles. *Exposure and Health*, 1-19. <https://doi.org/10.1007/s12403-024-00627-7>
- Schmidt, J., Kotnik, P., Trontelj, J., Knez, Ž., & Mašič, L. P. (2013). Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicology in vitro*, 27(4), 1267-1276. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.02.01>
- Selvaraj, V., Yeager-Armstead, M., & Murray, E. (2012). Protective and antioxidant role of selenium on arsenic trioxide-induced oxidative stress and genotoxicity in the fish hepatoma cell line PLHC-1. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(12), 2861-2869. <https://doi.org/10.1002/etc.202>
- Sendra, M., Štampar, M., Fras, K., Novoa, B., Figueras, A., & Žegura, B. (2023). Adverse (geno) toxic effects of bisphenol A and its analogues in hepatic 3D cell model. *Environment international*, 171, 107721. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107721>
- Shoorei, H., Seify, M., Talebi, S. F., Majidpoor, J., Koohestanidehaghi, Y., & Shokoohi, M. (2023). Different types of bisphenols alter ovarian steroidogenesis: Special attention to BPA. *Heliyon*, 9(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16848>
- Silva, A. B. P., Carreiró, F., Ramos, F., & Sanches-Silva, A. (2023). The role of endocrine disruptors in female infertility. *Molecular biology reports*, 50(8), 7069-7088. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08583-2>

- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Skledar, D. G., Carino, A., Trontelj, J., Troberg, J., Distrutti, E., Marchianò, S., ... & Mašič, L. P. (2019). Endocrine activities and adipogenic effects of bisphenol AF and its main metabolite. *Chemosphere*, 215, 870-880. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.129>
- Skledar, D. G., Schmidt, J., Fic, A., Klopčič, I., Trontelj, J., Dolenc, M. S., ... & Mašič, L. P. (2016). Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S. *Chemosphere*, 157, 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.027>
- Sobolev, O., Guttyj, B., Petryshak, R., Pivtorak, J., Kovalskyi, Y., Naumyuk, A., ... & Semeniv, B. (2018). Biological role of selenium in the organism of animals and humans. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(1), 654-665. <https://doi.org/10.15421/2017-263>
- Son, S., Nam, K., Kim, H., Gye, M. C., & Shin, I. (2018). Cytotoxicity measurement of Bisphenol A (BPA) and its substitutes using human keratinocytes. *Environmental research*, 164, 655-659. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.03.043>
- Spallholz, J. E. (1994). On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(1), 45-64. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90007-8)
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)10133-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)10133-3)
- Stillwater, B. J., Bull, A. C., Romagnolo, D. F., Neumayer, L. A., Donovan, M. G., & Selmin, O. I. (2020). Bisphenols and risk of breast cancer: a narrative review of the impact of diet and bioactive food components. *Frontiers in nutrition*, 7, 581388. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.581388>
- TB (Ticaret Bakanlığı). (2019, 24 Aralık). Resmi Gazete Sayısı: 30988. Oyuncak Güvenliği Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. *Resmi Gazete*. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2019/12/20191224-11.htm>
- Tchounwou, C. K., Yedjou, C. G., Farah, I., & Tchounwou, P. B. (2014). D-glucose-induced cytotoxic, genotoxic, and apoptotic effects on human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells. *Journal of cancer science & therapy*, 6, 156. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000265>
- TGK (Türk Gıda Kodeksi). (2019a, 2 Temmuz). Tebliğ No: 2019/14. Türk Gıda Kodeksi Bebek Formülleri ve Devam Formülleri Tebliği. *Resmi Gazete*. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2019/07/20190702-5.htm>
- TGK (Türk Gıda Kodeksi). (2019b, 25 Aralık). Tebliğ No: 2019/44. Gıda Maddeleri ile Temasta Bulunan Plastik Madde ve Malzemeler Tebliği. *Resmi Gazete*. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2019/12/20191225M1-10.htm>
- Thoene, M., Dzika, E., Gonkowski, S., & Wojtkiewicz, J. (2020). Bisphenol S in food causes hormonal and obesogenic effects comparable to or worse than bisphenol A: a literature review. *Nutrients*, 12(2), 532. <https://doi.org/10.3390/nu12020532>
- Tiwari, D., Kamble, J., Chilgunde, S., Patil, P., Maru, G., Kawle, D., ... & Vanage, G. (2012). Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: an endocrine disruptor. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 743(1-2), 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.023>

- Torres-Badia, M., Martin-Hidalgo, D., Serrano, R., Garcia-Marin, L. J., & Bragado, M. J. (2023). Bisphenol S reduces pig spermatozoa motility through different intracellular pathways and mechanisms than its analog bisphenol A. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9598. <https://doi.org/10.3390/ijms24119598>
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E., Hasegawa, K., Takahashi, M., Maizumi, N., ... & Barrett, J. C. (1998). Bisphenol-A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells. *International journal of cancer*, 75(2), 290-294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980119\)75:2<290::AID-IJC19>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980119)75:2<290::AID-IJC19>3.0.CO;2-H)
- Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 13(10), 1089-1098. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>
- Turra, B. O., Bonotto, N. C. A., Teixeira, C. F., Chelotti, M. E., Rodrigues, J. R., Mastella, M. H., ... & Cruz, I. B. M. (2024). Bisphenol-A induced cyto-genotoxicity on retinal pigment epithelial cells is differentially modulated by a multi-supplement containing guarana, selenium, and L-carnitine. *Brazilian Journal of Biology*, 84, e282840. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.282840>
- Ullah, A., Pirzada, M., Afsar, T., Razak, S., Almajwal, A., & Jahan, S. (2019). Effect of bisphenol F, an analog of bisphenol A, on the reproductive functions of male rats. *Environmental health and preventive medicine*, 24, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12199-019-0797-5>
- Umbuzeiro, G. D. A., Heringa, M., & Zeiger, E. (2017). In vitro genotoxicity testing: significance and use in environmental monitoring. *In vitro Environmental Toxicology-Concepts, Application and Assessment*, 59-80. https://doi.org/10.1007/10_2015_5018
- UNEP (United Nations Environment Programme) & The International Panel on Chemical Pollution. (2017, 30 Temmuz). Overview Report I: Worldwide initiatives to identify endocrine disrupting chemicals (EDCs) and potential EDCs as of July 2017. <https://www.unep.org/resources/report/overview-reports-endocrine-disrupting-chemicals-and-potential-edcs>
- Vieira, J. P. J., Souza, I. F., Pedras, M. B., Oliveira, D. B., González-Torres, L. A., & Avelar-Freitas, B. A. (2024). Morphology of Adherent Cells of the Line Vero Cultivated in a Three-Dimensional Environment inside a Microfluidic Device Differs from their Morphology when Cultivated in Monolayers. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 36(8), 230-237. <https://doi.org/10.9734/jammr/2024/v36i85542>
- Wang, J., Zhao, C., Feng, J., Sun, P., Zhang, Y., Han, A., ... & Ma, H. (2024). Advances in understanding the reproductive toxicity of endocrine-disrupting chemicals in women. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 12, 1390247. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1390247>
- Wang, R., Fei, Q., Liu, S., Weng, X., Liang, H., Wu, Y., ... & Jing, C. (2022). The bisphenol F and bisphenol S and cardiovascular disease: results from NHANES 2013–2016. *Environmental Sciences Europe*, 34, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00586-9>
- Wang, Y., Li, W., Phay, J. E., Shen, R., Pellegata, N. S., Saji, M., ... & He, H. (2016). Primary cell culture systems for human thyroid studies. *Thyroid*, 26(8), 1131-1140. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0518>
- WHO (World Health Organization). (2002). International Programme on Chemical Safety. *Global assessment on the state of the science of endocrine disruptors*. <https://iris.who.int/handle/10665/67357>

- Winz, C., Liu, B., Xie, C., Rohatagi, S., Li, E., Furmanski, P., & Suh, N. (2024). The estrogenic endocrine disrupting compounds bisphenol-a (BPA) and alpha-zeranol (aZAL) induce early mammary hyperplasia in female ACI rats. *Cancer Research*, 84(6_Supplement), 3575-3575. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2024-3575>
- Xin, L., Lin, Y., Wang, A., Zhu, W., Liang, Y., Su, X., ... & Tian, H. (2015). Cytogenetic evaluation for the genotoxicity of bisphenol-A in Chinese hamster ovary cells. *Environmental toxicology and pharmacology*, 40(2), 524-529. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.08.002>
- Yang, S., Lee, S., and Kwon, Y. (2024). Differential curcumin absorption and curcumin-induced STAT3 inhibition during 3T3-L1 cell adipogenesis in 2D and 3D cultures. *Discover Applied Sciences*, 6(1), 13. <https://doi.org/10.1007/s42452-024-05675-x>
- Yin, L., Siracusa, J. S., Measel, E., Guan, X., Edenfield, C., Liang, S., & Yu, X. (2020). High-content image-based single-cell phenotypic analysis for the testicular toxicity prediction induced by bisphenol A and its analogs bisphenol S, bisphenol AF, and tetrabromobisphenol A in a three-dimensional testicular cell co-culture model. *Toxicological Sciences*, 173(2), 313-335. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz233>
- Yıldızhan, K. (2020). Protective role of selenium against bisphenol-A induced oxidative stress, cytokine generation and apoptosis in SH-SY5Y neuronal cell line. *Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress*, 12(3), 955-962. <https://doi.org/10.37212/jcnos.1005692>
- Yu, H., and Liu, Y. (2022). Impact of Extended and Combined Exposure of Bisphenol Compounds on Their Chromosome-Damaging Effect— Increased Potency and Shifted Mode of Action. *Environmental Science & Technology*, 57(1), 498-508. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c06064>
- Yu, H., Song, M., Hu, K., Wang, Y., Fan, R., Yang, Z., ... & Liu, Y. (2021). Influence of bisphenol compounds at nanomolar concentrations on chromosome damage induced by metabolically activated carcinogens in HepG2 cells. *Environmental Science & Technology*, 55(14), 10001-10011. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02189>
- Yuan, J., Kong, Y., Ommati, M. M., Tang, Z., Li, H., Li, L., ... & Wang, J. (2019). Bisphenol A-induced apoptosis, oxidative stress and DNA damage in cultured rhesus monkey embryo renal epithelial Marc-145 cells. *Chemosphere*, 234, 682-689. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.125>
- Zaki, M. S. A., Haidara, M. A., Heitham, M., Asim, A., Massoud, E. E. S., & Eid, R. A. (2020). Antioxidant activity of selenium on bisphenol-induced apoptosis and testicular toxicity of Albino rats. *Int J Morphol*, 38(6), 1786-1796. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022020000601786>
- Zeiger, E., Mitchell, C. A., Pfuhler, S., Liao, Y., & Witt, K. L. (2024). Within-laboratory reproducibility of Ames test results: Are repeat tests necessary?. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 65(3-4), 116-120. <https://doi.org/10.1002/em.22597>
- Zenata, O., Dvorak, Z., & Vrzal, R. (2017). Profiling of bisphenol S towards nuclear receptors activities in human reporter cell lines. *Toxicology letters*, 281, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.09.006>
- Zgorelec, Ž., Vujnović, A., Prevendar Crnić, A., & Medunić, G. (2023). Biotechnological methods of selenium bioremediation from various compartments of environment: A review. *Journal of Central European Agriculture*, 24(2), 531-551. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/24.2.3879>
- Zhang, S. S., Liu, Y., Liu, S. S., & Zhu, X. W. (2012). Detecting the cytotoxicities of five bisphenol A analogues to the MCF-7 human breast carcinoma cell line through different endpoints. *Huan Jing ke Xue= Huanjing Kexue*, 33(11), 3935-3940.

- Zhang, T., Qi, M., Wu, Q., Xiang, P., Tang, D., & Li, Q. (2023). Recent research progress on the synthesis and biological effects of selenium nanoparticles. *Frontiers in nutrition*, 10, 1183487. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1183487>
- Zhang, X., Zhang, X., Zhang, Z., Shi, Y., Wang, J., Ru, S., & Tian, H. (2024). Bisphenol S causes excessive estrogen synthesis by activating FSHR and the downstream cAMP/PKA signaling pathway. *Communications Biology*, 7(1), 844. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06449-2>
- Zhang, Y. F., Ren, X. M., Li, Y. Y., Yao, X. F., Li, C. H., Qin, Z. F., & Guo, L. H. (2018). Bisphenol A alternatives bisphenol S and bisphenol F interfere with thyroid hormone signaling pathway in vitro and in vivo. *Environmental pollution*, 237, 1072-1079. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.027>
- Zühlke, M. K., Schlüter, R., Mikolasch, A., Henning, A. K., Giersberg, M., Lalk, M., ... & Schauer, F. (2020). Biotransformation of bisphenol A analogues by the biphenyl-degrading bacterium *Cupriavidus basilensis*-a structure-biotransformation relationship. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 3569-3583. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10406-4>

