

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

**BİSFENOL A’NIN HEPG2 HÜCRELERİNE OLAN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Esin ÖZ

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2020

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm yüksek lisans eğitimim süresince bilgi, birikim ve yardımlarını benden esirgemeyen tüm öğretim üyelerine ve tez çalışmamı planlanmamda ve sürdürmemde her daim desteğini esirgemeyen, bilgisini ve deneyimlerini paylaşan değerli danışmanım Doç. Dr. Z. Tuba TÜYLÜ KÜÇÜKKILINÇ'a,

Deneyisel çalışmalarım sırasında laboratuvar imkânlarından ve çok değerli bilgilerinden faydalandığım Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine,

Hayatım boyunca beni maddi ve manevi her konuda koşul gözetmeksizin destekleyen, sevgilerini ve ilgilerini hep hissettiğim sevgili annem Şakire ÖZ'e, sevgili babam Mehmet ÖZ'e, kardeşim Ersin ÖZ'e ve biricik yeğenlerim Ayaz ve Aysima ÖZ'e

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Öz, E. Bisfenol A' nın HepG2 Hücrelerine Olan Etkilerinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2020. Bu çalışmada, Bisfenol A (BPA) ve Fulvestrant (ICI) kimyasalının HepG2 insan hepatoma hücrelerine uygulanarak hücrelerdeki proliferasyon, yara iyileşmesi, E-kaderin, N-kaderin, vimentin proteinleri ve apoptoza (kaspaz 3/7) etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. BPA endüstride sıklıkla kullanılan bir endokrin bozucu maddedir ve östrojen benzeri etkiye sahiptir. Fulvestrant, östrojen reseptör antagonistidir. BPA, ICI, BPA ve ICI kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde hücre canlılığı MTT deneyi ile belirlenmiştir. BPA ve ICI kombinasyonunun HepG2 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Talalay-Chou metoduna göre değerlendirilmiştir. HepG2 hücrelerindeki migrasyon yara iyileşme yöntemiyle belirlenmiştir. Hücrelerdeki E-kaderin, N-kaderin ve vimentin protein düzeyleri Elisa kitiyle ölçülmüştür. HepG2 hücrelerinde apoptoz ApoTox-Glo™ Tripleks Testiyle ölçülmüştür. HepG2 hücrelerine uygulanan 8 nM BPA'nın hücre canlılığını arttırdığı, 160 nM ICI ile BPA ve ICI kombinasyon uygulamasının hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir. Talalay-Chou metoduyla, HepG2 hücre canlılığına karşı BPA ve ICI kombinasyonu sonucu gözlenen etkinin sinerjistik bir etkileşimden kaynaklandığı açıklanmıştır. Ayrıca BPA'nın ICI'nin sitotoksik etkisini arttırdığı belirlenmiştir. Yara oluşturulmuş HepG2 hücrelerinde, BPA ile BPA ve ICI kombinasyon uygulamasında % yara büyüklüğünün azaldığı gözlenmiştir. HepG2 hücrelerinde E-kaderin protein düzeyi BPA ve ICI kombinasyon uygulamasında azalmıştır. N-kaderin protein düzeyi ICI ile BPA ve ICI kombinasyon uygulamasında artmıştır. Vimentin protein düzeyinde değişiklik gözlenmemiştir. Apoptoz lüminesans verileri değerlendirildiğinde BPA ve ICI kombinasyon uygulamasının apoptozu arttığı belirlenmiştir ve BPA uygulamasının nekroptozu etkilediği görülmüştür. Bu tez çalışmanın sonuçları HepG2 hücrelerine 8 nM BPA ve 160 nM ICI uygulanmasının hücrelerdeki proliferasyonu, yara iyileşmesini ve apoptozu etkilediği açıklanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Bisfenol A, epitelyal mezenkimal geçiş, HepG2, E-kaderin, vimentin

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje No: 17804

ABSTRACT

Öz, E. Examination of the Effects of Bisphenol A on HepG2 Cells. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Biochemistry Program, Master Thesis, Ankara, 2020. In this study, it was aimed to determine the effect of application Bisphenol A (BPA) and Fulvestrant (ICI) chemical to HepG2 human hepatoma cells on proliferation, wound healing, E-cadherin, N-cadherin, vimentin proteins and apoptosis (caspase 3/7) in cells. BPA is an endocrine disrupter commonly used in the industry and has an estrogen-like effect. Fulvestrant is an estrogen receptor antagonist. The% cell viability in HepG2 cells treated with BPA, ICI, BPA and ICI combination was determined by MTT assay. The effects of BPA and ICI combination on HepG2 cell viability were evaluated according to the Talalay-Chou method. Migration in HepG2 cells was determined by wound healing method. The protein levels of E-cadherin, N-cadherin and vimentin in cells were measured with the Elisa kits. Apoptosis in HepG2 cells was measured by ApoTox-Glo™ Triplex Test. It was observed that 8 nM BPA applied to HepG2 cells increased cell viability, while 160 nM ICI and BPA and ICI combination treatment reduced cell viability. The Talalay-Chou method explained that the effect observed as a result of the combination of BPA and ICI against HepG2 cell viability is due to a synergistic interaction. It was also determined that BPA increased the cytotoxic effect of ICI. In wound-formed HepG2 cells, BPA, BPA and ICI combination treatment showed that % wound size is decreased. The protein level of E-cadherin in HepG2 cells decreased in BPA and ICI combination treatment. The protein level of N-cadherin increased with the combination of ICI and BPA; and ICI. No changes in the protein level of vimentin were observed. When apoptosis luminescence data were evaluated, it was determined that BPA and ICI combination application increased apoptosis and BPA application was found to affect necroptosis. The results of this thesis study explain that applying 8 nM BPA and 160 nM ICI to HepG2 cells affects the proliferation, wound healing and apoptosis in the cells.

Keywords: Bisphenol A, epithelial mesenchymal transition, HepG2, E-cadherin, vimentin

This thesis was supported by Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit.
Project Number: 17804

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hepatosellüler Karsinom	3
2.1.1. HepG2 Hücreleri	5
2.2. Fulvestrant	5
2.3. Hücre İskeleti	6
2.3.1. E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin Yapısı	7
2.4. Endokrin Bozucu Kimyasallar	9
2.5. Bisfenol A'nın Yapısı ve Özelliği	10
2.5.1. Bisfenol A'ya Maruziyet Yolları	13
2.5.2. Memelilerde BPA Metabolizması	16
2.5.3. BPA Maruziyetinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	17
2.5.4. Bisfenol A'nın Östrojen Yapısı	19
2.5.5. BPA'nın Kanserle İlişkili Hücre Sinyal Yolları	20
2.5.6. BPA'nın Karaciğere Etkileri	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	24
3.2. Hücre Kültürü	24
3.2.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü	24
3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması	25
3.2.3. Hücre Sayımı	26

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması	28
3.2.5. Bisfenol A (BPA) Kimyasalın Hazırlanması	28
3.2.6. Fulvestrant (ICI 182,780) Hazırlanması	28
3.2.7. Hücre Canlılık Testi	28
3.3. İlaç Kombinasyon Testi	30
3.4. Yara İyileşmesi Testi	30
3.5. Protein Tayini	31
3.6. E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin ELISA Testi	32
3.7. Apoptoz Testi	35
3.8. İstatistiksel Değerlendirilme	36
4. BULGULAR	37
4.1. BPA ve Fulvestrant'ın Hücre Canlılık Etkisi	37
4.2. Bisfenol A ve Fulvestrant Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	41
4.3. Yara İyileşme Yöntemiyle Hücre Migrasyon Potansiyeli	42
4.4. Bikinkoninik (BCA) Asit Yöntemiyle Protein Miktarının Belirlenmesi	44
4.5. Elisa Yöntemiyle Epitelyal ve Mezenkimal Hücrelerin Biyobelirteçlerinin Belirlenmesi	46
4.5.1. N-Kaderin Protein Seviyesi	49
4.5.2. Vimentin Protein Seviyesi	51
4.6. HepG2 Hücrelerinde Apoptozun Belirlenmesi	53
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER	
EK 1. Dijital Makbuz	
EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrad derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
BAD	Bcl-2 ile ilişkili ölüm promotör
Bax	Bcl-2-ilişkili X proteini
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2
BSA	Sığır Serum Albumin
Casp	Kaspaz
CI	Kombinasyon indeksi
cm²	Santimetre kare
cm³	Santimetre küp
CO₂	Karbondioksit
CREB	Siklik adenosin monofosfat yanıt elemanı bağlayıcı protein
dk	Dakika
dm³	Desimetre küp
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DRI	Doz azalım indeksi
EDC	Endokrin bozucu kimyasal
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent
EMT	Epitelyal-mezenkimal geçiş
ER	Östrojen Reseptör
ERK	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
ERα	Östrojen Reseptör alfa
ERβ	Östrojen Reseptör beta
Fa	Ölen hücre oranı
FasL	Fas ligandı
FBS	Fetal bovin serum

g	gram
GPER	G protein bağlı östrojen reseptörü
HCC	Hepatosellüler Karsinom
HepG2	İnsan Hepatosellüler Karsinoma Hücreleri
ICI	Fulvestrant
IKK-β	IκB kinaz-β
JAK	Janus kinaz
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
kg	kilogram
L	litre
log	logaritma
M	molar
m³	metre küp
MEK	Mitojenle aktifleştirilen protein/ ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz kinaz
mg	miligram
ml	mililitre
mm²	milimetre kare
mm³	milimetre küp
MMP	Matriks metalloproteinazlar
mTOR	Rapamisin
MTT	3- (4,5-Dimetiltiyazol-2-İl)-2,5 Difenil Tetrazolyum Bromid
NF-κB	Aktifleştirilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa hafif zincirli güçlendirici
ng	nanogram
nm	nanometre
nM	nanomolar
PC	Polikarbonat
pH	Hidrojenin Gücü
PI3K	Fosfoinositid 3-kinaz
PKA	Protein kinaz A
ppb	mikrogram/litre

RNA	Ribonükleik asit
s	saat
SOS	<i>Son of sevenless homolog</i>
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü-beta
w/v	ağırlık/hacim
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. HepG2 hücre hattının 10X ve 40X mikroskopik görüntüleri	5
2.2. Fulvestrant'ın kimyasal yapısı	6
2.3. E-kaderin ve N-kaderin yapısı	8
2.4. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı	11
2.5. Bisfenol A ve yapısal analogları	12
2.6. BPA'nın memelilerde metabolizması	17
2.7. BPA maruziyetinin hastalıklar üzerine etkileri	18
2.8. BPA ve kansere ilişkili hücre sinyal yolları	22
3.1. HepG2 hücrelerin proliferasyon ışık mikroskopu altındaki görüntüsü (10X büyütme)	26
3.2. Thoma lamının mikroskopta görünümü	27
3.3. 6 kuyucuklu plakalarda HepG2 hücrelerine ilaç uygulaması	31
3.4. Sandviç ELİSA yöntemi	33
4.1. 1-16000 nM aralığında artan konsantrasyonlarda uygulanan BPA'nın HepG2 hücrelerinde yüzde canlılık grafiği	38
4.2. Artan konsantrasyonlarda fulvestrant (2,5-160 nM) uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde canlılık grafiği	39
4.3. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde canlılık grafiği	40
4.4. BPA ve ICI kombinasyonu (1:20) için DRI grafiği	42
4.5. Yara oluşturulmuş HepG2 hücrelerinde, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) + ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasından hemen ve 48 saat sonra yara büyüklüğü İmage J programıyla analiz görüntüleri	43
4.6. Yara oluşturulmuş HepG2 hücrelerinde, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasından hemen ve 48 saat sonra yara büyüklüğü grafiği	44
4.7. Protein tayininde standart eğri grafiği	45
4.8. E-kaderin proteinin standart eğrisi	47
4.9. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde E-kaderin düzeyi (% kontrole göre) grafiği	48
4.10. N-kaderin protein seviyesinin standart eğrisi	49
4.11. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) + ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde N-kaderin düzeyi (% kontrole göre) grafiği	50

4.12.	Vimentin protein seviyesinin standart eğrisi	51
4.13.	8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde Vimentin düzeyi (% kontrole göre) grafiği	52
4.14.	8 nM BPA, 160 nM ICI, BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu ve bu kimyasallara ilaveten 50 µM NEC uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde apoptoz lüminesans (% kontrole göre) grafiği	54

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. 2019'da her iki cinsiyette en yaygın 10 kanser vakalarının tahmini ölüm dağılımı	3
3.1. Standart çözeltisinin seri solüsyonu	32
4.1. 1-16000 nM aralığında artan konsantrasyonlarda uygulanan BPA'nın HepG2 hücrelerinde yüzde canlılık verileri	37
4.2. Artan konsantrasyonlarda Fulvestrant (2,5-160 nM) uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde canlılık verileri	39
4.3. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde canlılık değerleri	40
4.4. HepG2 hücrelerinde BPA ve ICI kombinasyonuna ait İnhibitor Etki (Fa), Kombinasyon İndeksi (CI) ve Doz Azalım İndeksi (DRI) değerleri	41
4.5. Yara oluşturulmuş HepG2 hücrelerinde, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasından hemen ve 48 saat sonra yüzde yara büyüklüğü değeri	43
4.6. HepG2 hücrelerine uygulanan kimyasallardan sonra hesaplanan protein miktarları	46
4.7. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM)+ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde E-kaderin protein miktarı	48
4.8. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) + ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde N-kaderin protein miktarı	50
4.9. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde vimentin protein miktarı	52
4.9. 8 nM BPA, 160 nM ICI, BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu ve bu kimyasallara ilaveten 50 µM NEC uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde apoptoz lüminesans verileri	53

1. GİRİŞ

Kanser epigenetik ve genetik kusurların birikmesi sonucunda, vücudun diğer bölgelerine invazyon ve metastaz yapma potansiyeline sahip ve hücre döngüsü bileşenlerinin düzensizliğine bağlı olarak aktif hücre bölünmesi ile anormal bir şekilde çoğalan öldürücü bir hastalıktır. Bu bakımdan, kanser dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur (1). Dünyada en sık görülen malign tümörlerden biri olan Hepatosellüler Karsinom (HCC), karaciğer kanseri vakalarının yaklaşık % 80'inin üzerinde görülür. Çevresel ve genetik faktörler arasındaki etkileşim HCC gelişiminden sorumludur (2).

Endokrin bozucu kimyasallar (EDC), endojen hormonların üretimini, salınmasını ve taşınmasının yanı sıra hücre metabolizmasını, bağlanmasını ve eliminasyonunu etkileyen kimyasal karışımlar olarak tanımlanır. Bunlar heterojendir, doğal veya yapay kimyasal bileşikler grubu içerir, endüstriyel çözücüler, plastikler, plastikleştiriciler, fungusitler, böcek ilaçları, ağır metaller ve farmasötik ajanlar olarak kullanılan sentetik kimyasalları içerir. Endokrin bozucu kimyasallara hava, su, yiyecek ve tüketici ürünleri olmak üzere maruz kalmanın çok fazla yolu vardır. Bazıları insan vücudunda (bisfenol A, ftalatlar) düşük birikime sahipken diğerleri çok lipofiliktir ve yağ dokusunda kolayca birikir. EDC'ler ayrıca serum, idrar, amniyotik sıvı ve anne sütü gibi çeşitli biyolojik sıvılarda bulunabilir (3).

Bisfenol A (BPA) bir karbon atomu olan bir köprü atomu ile birbirine bağlanmış iki fenol halkası içeren bir kimyasal maddedir. BPA, epoksi reçineler ve plastik ürünlerin üretiminde plastikleştirici olarak kullanılır. BPA, gıda ambalajı, dış malzemeleri, tıbbi cihazlar, çocuk oyuncakları ve bebek ürünleri gibi birçok yerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle insan vücudu oral, solunum ve transdermal yolla BPA'ya maruz kalmaktadır. BPA'nın östrojen reseptörleri ile etkileşime girmesi nedeniyle birçok endokrin hastalığının patogeneğinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. BPA metabolize edilir, karaciğerde BPA-glukuronide dönüştürülerek idrarla atılır. Metabolik süreçte oksidatif stres, inflamasyon yanıtı veya apoptozu tetikleyerek karaciğer hasarına neden olur. Bir mitojen olan BPA'nın neoplastik transformasyona duyarlılığı indüklediği ileri sürülmüştür (4). BPA'nın üreme, gelişme, diyabet, obezite ve karsinogenez gibi birçok hastalıkta istenmeyen etkileri rapor edilmiştir. BPA'nın sağlık üzerinde olumsuz etkilerinden endişe edilmiş, BPA

kullanımının denetlenmesine ve hatta bazı ülkelerde kullanılmasının yasaklanmasına karar verilmiştir (5). Yapılan çalışmalarda BPA'nın kanser hücrelerinin migrasyonuna ve invazyonuna neden olduğu birçok kanser hücrelerinde tanımlanmıştır. BPA maruziyeti sonrası kanser hücrelerinin migrasyonu ve invazyonu çeşitli faktörlerin etkisiyle uyarılır. Bunlar; matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) gibi proteazların artması, E-kaderin gibi epitelyal hücre bağlantılı proteinlerinin kaybı ile N-kaderin, fibronektin ve vimentin gibi mezenkimal göstergelerin artmasıdır.

Fulvestrant (Faslodex, ICI 182,780), dokulardaki östrojen sentezini önleyen östrojen reseptör blokörleri olarak adlandırılmaktadır. Antagonist etkisi olmasına rağmen agonist etkisi yoktur. Postmenopozal kadınlarda ilerlemiş meme kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır (6). Yapılan bir in vitro çalışmada fulvestrantın HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve HCC için terapötik olabileceği açıklanmıştır (7).

Sunulan tez çalışmasının amacı, Fulvestrant ve BPA kimyasalının HepG2 insan hepatoma hücrelerine uygulanarak hücrelerdeki proliferasyon, yara iyileşmesi, E-kaderin, N-kaderin, vimentin proteinleri ve apoptoza (kaspaz 3/7) etkisi belirlenmesidir.

Böylece Bisfenol A'nın fulvestrantın yarattığı karaciğer hasarına hangi dozlarda ve nasıl etkideği, E-kaderin, N-kaderin ile vimentin proteinleri ve apoptoz üzerinden aydınlatılacaktır. Tez çalışması ile elde edilecek bulgular sıklıkla maruz kalınan BPA'nın karaciğerde ortaya çıkabilecek istenmeyen etkilerinin ve östrojen sinyal yollarıyla hepatoma kanser hücrelerin proliferasyonuna, migrasyonuna, invazyonuna ve apoptoza etki edip etmediği açıklanarak bilimsel birikim için önemli düzeyde katkı elde edilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatosellüler Karsinom

Kanser, genetik mutasyonlar, kopya sayısı sapmaları ve epigenetik değişimlerle seyreden hücre proliferasyonu, canlılık, ölüm, yenilenme, invazyon ve farklı hücrelerde sinyal yollarının bozulmasına neden olan kompleks ve farklılaşmış hastalıklardır (8).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nün 2018'deki raporuna göre karaciğer kanseri, en sık teşhis edilen altıncı kanser ve kansere bağlı ölümlerin dördüncü nedeni olduğu tahmin edilmektedir (9). Yaklaşık olarak yılda 841.000 vaka teşhis edilmekte ve 782.000 ölüm meydana gelmektedir. 2019 yılındaki verilere göre karaciğer kanser insidansı, hem erkeklerde hem de kadınlarda diğer kanserlere göre daha hızlı artmaktadır (10).

Tablo 2.1. 2019'da her iki cinsiyette en yaygın 10 kanser vakalarının tahmini ölüm dağılımı (10).

Erkekler			Kadınlar		
Kanser	Tahmini ölüm	Yüzde	Kanser	Tahmini ölüm	Yüzde
Akciğer ve Bronş	76,650	24%	Akciğer ve Bronş	66,020	23%
Prostat	31,620	10%	Meme	41,760	15%
Kolon ve Rektum	27,640	9%	Kolon ve Rektum	23,380	8%
Pankreas	23,800	7%	Pankreas	21,950	8%
Karaciğer	21,600	7%	Over	13,980	5%
Lösemi	13,150	4%	Uterus Korpus	12,160	4%
Özofagus	13,020	4%	Karaciğer	10,180	4%
Mesane	12,870	4%	Lösemi	9,690	3%
Non-hodgkin lenfoma	11,510	4%	Non-hodgkin lenfoma	8,460	3%
Beyin	9,910	3%	Beyin	7,850	3%
Toplam	321,670	100%	Toplam	285,210	100%

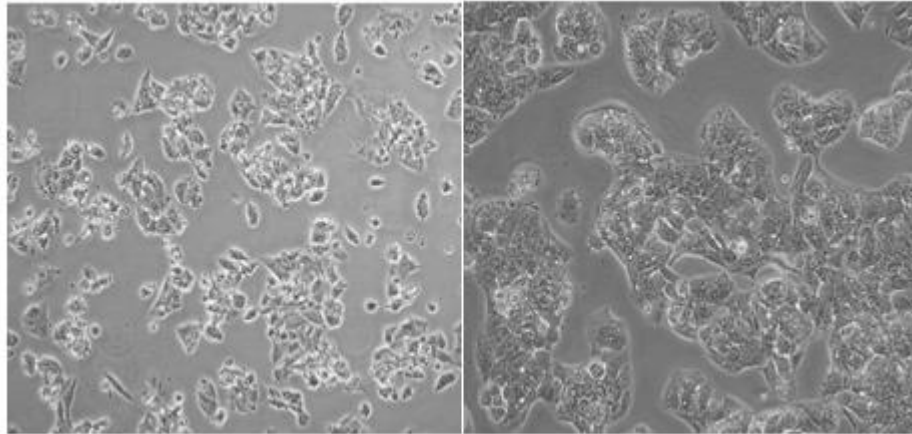
Primer karaciğer kanseri, HCC ve intrahepatik kolanjiyokarsinomu içerir. HCC dünyadaki en yaygın maligniteler arasında altıncı sıradadır ve kanser hastaları arasında en yüksek dördüncü ölüm oranına sahiptir. HCC gelişimine neden olabilecek etiyolojik faktörler arasında kronik hepatit B ve hepatit C (HBV, HCV), alkol bağımlılığı, metabolik karaciğer hastalığı, aflatoksinler ve aristoloşik asit gibi diyet toksinlerine maruz kalma sayılabilir (11). HCC'nin erken teşhis ve takibi potansiyel olarak tedavi şansını artırır. HCC erken evresi, lokal ablasyon, cerrahi rezeksiyon veya karaciğer transplantasyonu ile tedavi edilebilir. Tedavi seçimi tümör özelliklerine, altta yatan karaciğer fonksiyon bozukluğunun şiddetine, yaşa, diğer tıbbi ek hastalıklara, mevcut tıbbi kaynaklara ve yerel uzmanlığa bağlıdır. HCC vakalarının yaklaşık % 85'inin, özellikle Doğu Asya ve Sahra altı Afrika gibi düşük veya orta gelirli ülkelerde olduğu tahmin edilmektedir (12).

HCC, epitel hücre tipleri olan hepatositlerin ve progenitör hücrelerin neoplastik transformasyonu ile hücresel seviyede heterojenite gösterir. Genellikle, kronik karaciğer hastalığı, genetik ve epigenetik olaylar, karsinom hücrelerinin farklılaşması ve ayırt edici özelliklerin ekspresyonu, tümör mikroçevrenin etkisi ve etiyolojiden kaynaklanan heterojenitedir. Hücresel heterojenitenin kompleksliği genellikle epitel hücrelerinin plastisitesindeki değişikliklerle artar. Heterojenite, tümör nodüllerinin eş zamanlı oluşumundan veya primer kanserin intrahepatik metastazlarından kaynaklanan HCC multifokal gelişimiyle genetik seviyede sağlanır. Primer HCC, portal ven tümör trombisi ve intrahepatik metastaz arasında görülen genetik değişimler iken, multipl HCC nodülleri farklı genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi ile meydana gelmektedir (13).

Dünya çapında sanayileşmiş alanların gelişmesi ile hızlı ve ucuz gıda talebinin artması nedeniyle, birçok hastalığı tetikleyebilen veya seyrini kötüleştirebilen kimyasal maddelere maruziyet artmaktadır. Bu olay kronik karaciğer hastalıklarının doğal seyrinde ve epidemiyolojisinde önemli değişiklik gözlemlene olasılarına neden olmaktadır. EDC fizyolojik hormonal sinyalizasyonla etkileşen heterojen bir madde grubudur, böylece çeşitli patolojilerin gelişme riskini artırır (14).

2.1.1. HepG2 Hücreleri

İnsan hepatosellüler karsinoma hücre hattı olan HepG2, 15 yaşındaki beyaz bir Amerikalı erkeğin hepatosellüler karsinomasından elde edilmiş olan epitel morfolojisine sahip, yapışkan yapılı bir hücre hattıdır. Ölümsüz hücre hatları olan HepG2 insan hepatoma hücreleri, diğer hücre hatlarına nazaran kolay kullanımlarından dolayı in vitro modellemelerde kullanılmaktadır. HepG2, ilaç metabolizması ve hepatotoksisite çalışmalarında en sık kullanılan bir insan hepatomudur (15). Ayrıca plazma proteinlerinin çoğunu üretebilmesi, hücre yüzey reseptörlerini koruyabilmesi, biyosentetik özelliklerinin normal hepatositlerle aynı olması, sitokrom p450 (CYP450)'ye ait monooksijenaz enzimlerinin olmasında dolayı tercih edilmektedir. HepG2 insan hepatoma hücre hatları glukuronat-sülfatla birleşme tepkimeleri sonucunda biyotransformasyon etkilerinin büyük bir kısmını yapmakta bu sayede in vitro toksisite modellemesinde kullanılmaktadır (16).

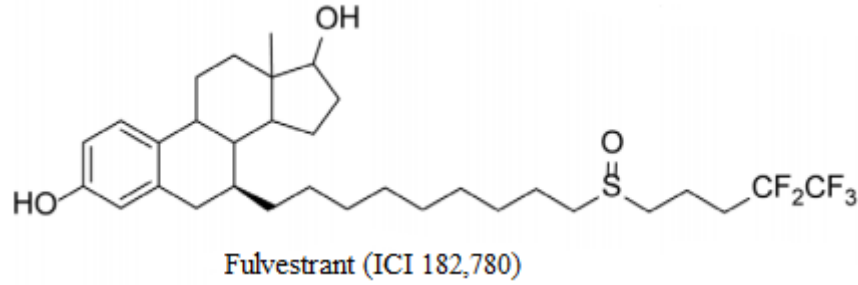


Şekil 2.1. HepG2 hücre hattının 10X ve 40X mikroskobik görüntüleri (17).

2.2. Fulvestrant

Fulvestrant 7-alfa- (9 - ((4,4,5,5,5 penta fluoro pentil) sülfenil) nonil) estra-1,3,5 (10) -trien, 3,7 beta-diol olan steroidal bir yapıdadır ve östradiol analogudur. Ayrıca agonist etkisi olmayan bir antiöstrojendir. Fulvestrant'ın afinitesi, östradiole yakın olacak derecede yüksektir (18). Fulvestrant östrojen reseptör (ER) dimerizasyonunu ve nükleer lokalizasyonu bozar, ER aracılı transkripsiyonel aktiviteyi tamamen engeller ve reseptörün bozulmasını hızlandırır. Sonuç olarak

fulvestrant, meme tümörü ilerlemesi, invazyon, metastaz ve anjiyogenez ile ilişkili östrojen- düzenleyici genlerin aktivitesini de engeller (19).



Şekil 2.2. Fulvestrant'ın kimyasal yapısı (20).

2.3. Hücre İskeleti

Hücre iskeleti, ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında hücre şeklini belirleyen ağ yapılarının keşfedilmesinden sonra ortaya çıkmıştır (21). Hücre iskeleti, hücrelerin sitoplazmasında bulunur ve hücrelerin hareketlerini yönlendirip koordine etmelerini sağlayan kompleks, dinamik bir protein filamanları ağıdır.

Hücre iskeleti hücre hareketinden sorumlu olmasının yanında yapısal görevleri de vardır. Hücre hareketleri ile hücrenin bütünsel hareketini ve organeller ile diğer bazı yapıların (mitotik kromozomlar) sitoplazma boyunca hücre içinde taşınmasını sağlar. Hücre iskeleti hücre içindeki bulunış yerleri ve şekilleri farklı olan 3 tip filamentten (mikrotübüller, ara filamentler ve mikrofilamentler) oluşur (22). Bu filamentlerin hepsi farklı protein alt birimlerden meydana gelmiştir. Mikrotübüller tübülün, ara filamentler; vimentin veya lamin ve aktin filamentler; aktin gibi proteinler tarafından meydana getirilirler (21). Mikrotübüller, eritrositler hariç bütün ökaryotik hücrelerde sitoplazma içinde bulunurlar ve aynı moleküler organizasyona sahiptirler (23). En kararlı hücre iskelet bileşeni olan ara filamentler, mikrotübüllere göre daha inceyken, mikrofilamentlerden daha kalın yapıya sahiptirler. Ayrıca bu filamentler farklı tipteki protein iplik yapılarının üst üste sarılmasıyla oluşur (24). Omurgalı hücrelerde sitoplazmik ara filamentler, vimentin ve vimentin benzeri filamentler, keratin filamentler ile nörofilamentler olmak üzere 3 sınıfa ayrılır. Bunlara ilaveten, nükleus içerisinde yer alan nükleolar laminler de ara filamentlerin özel bir sınıfıdır. Aktin filamentleri olarak da bilinen mikrofilamentler, genellikle hücrenin toplam

proteinlerinin %5 veya daha fazlasını oluştururlar ve çoğu hücre için ana hücre iskelet proteini aktin'dir (25).

Hücre iskeletinin görevleri arasında hücreyi şekillendirmek, hücreyi fiziksel ve biyokimyasal olarak dış ortama bağlamak, mekanik etkiye karşı korumak ve dokuları stabilize etmek bulunmaktadır. Bununla birlikte hücre iskeleti büzülerek hücre ve hücre çevresinin şeklini değiştirir ve hücre göçüne olanak sağlar (26).

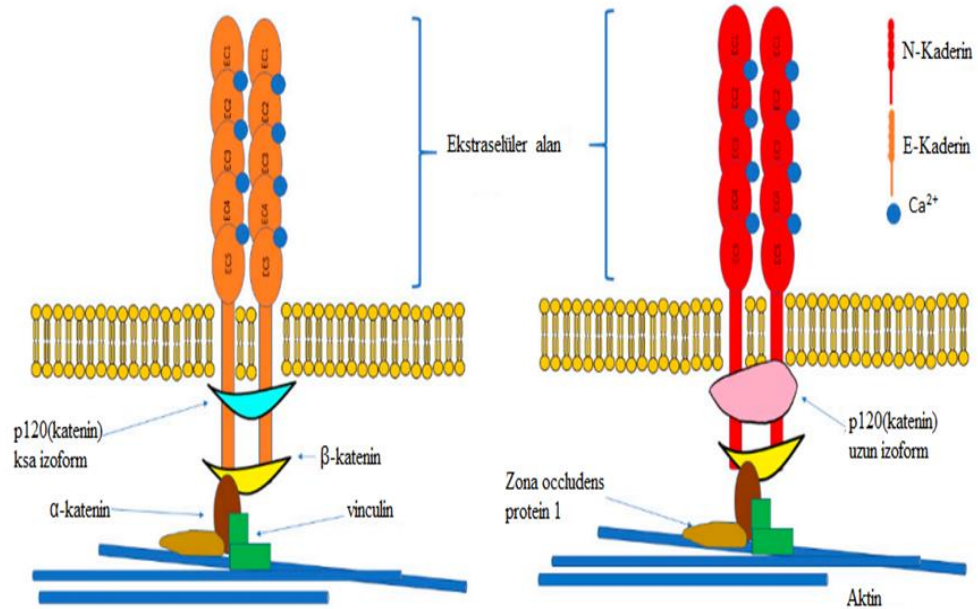
2.3.1. E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin Yapısı

Kalsiyuma bağlı hücre adezyon molekülleri olan kaderinler çeşitli dokuların epitel yapısının korunmasında, normal doku mimarisinin embriyonik gelişimi ve korunmasında önemli roller oynarlar. Epitel hücreleri E-kaderin ifade ederken, mezenkimal hücreleri N-kaderin, R-kaderin ve kaderin-11 gibi çeşitli kaderinler ifade eder (27).

E-kaderin, 16. kromozomda q22 de yer alan ve CDH-1 geni tarafından kodlanan homofilik hücre yüzey proteinleridir. Bununla birlikte E-kaderin hücre bağlantısında önemli bir rol oynayan kalsiyum (Ca^{2+}) bağımlı bir transmembran proteindir. E-kaderin proteini, intraselüler adezyon kompleksleriyle epitelyumun oluşmasında, farklılaşmasında, polarize edilmesinde ve korunmasında önemli rol oynar. E-kaderin ekspresyonundaki değişiklik, epitel hücreleri yarı mezenkimal hücre durumuna geçişini sağlayan geri dönüşümlü bir hücre program olan epitelyal mezenkimal geçiş (EMT)'in prototipik epitel hücre belirteci olarak görev görür. E-kaderin epitelyal hücrelerde eksprese edilir ve embriyonik gelişim, doku fibrozu ve kanserde EMT sırasında ekspresyonu azalır. Ayrıca, E-kaderin fonksiyonunun kaybı EMT'yi kolaylaştırır (28).

N-Kaderin, 18. kromozomda q11 de yer alan ve CDH-2 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Fibroblastlarda, iskelet kasında, endotelial hücrelerde ve ağırlıklı olarak nöral dokularda N-kaderin bulunur (29). Mezenkimal bir kaderin olan N-kaderin, hem metastaz hem de kemoterapi direncine etki ederek kanserin ilerlemesine neden olur. E-kaderin ve N-kaderin birçok yapısal ve fonksiyonel özellikler paylaşır. E-kaderin downregülasyonu, mezenkimal nöral kaderin (N-kaderin) ekspresyonunun artmasına neden olur bu da hücre adezyon değişikliğiyle bir 'kaderin anahtar' ile sonuçlanır. Bu anahtar aracılığıyla, geçiş hücreleri epitelyal

hücrelerle ilişkilerini kaybeder ve homotipik N-kaderin etkileşimleri yoluyla mezenkimal hücreler için bir afinite kazanırlar. N-kaderin hücre iskeletine α - katenin ve β -katenin yoluyla bağlanır. Ayrıca p120 katenin, sinyal araçları ve trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFRs) gibi reseptör tirozin kinazlar (RTKs) ile etkileşir. Mezenkimal hücreler, fibroblastlar, kanser hücreleri ve nöral dokuda eksprese edilen E-kaderinden N-kaderine kadar kaderinler, sıklıkla embriyonik gelişim ve kanser ilerlemesi sırasında EMT'nin ilerlemesini izlemek için kullanılmıştır (30, 31).



Şekil 2.3. E-kaderin ve N-kaderin yapısı (32).

Ökaryot hücrelerde temel iskelet bileşeninden biri olan ara filamanlar, en sağlam hücre iskeleti filamanlarıdır. Vimentin 57 kDal'lık ara filament proteinidir ve fibroblastlar, endotelial hücreler, hematopoietik kök hücreleri ile glial hücreler olmak üzere çeşitli hücrelerde eksprese edilir. Vimentin sitoplazmada, özellikle plazma zarının çevresinde bulunur. Ayrıca vimentinin hücre yüzeyi üzerinde de eksprese edildiği bulunmuştur. Vimentin hücre bütünlüğünün korunmasında görev alır (33). Vimentin, embriyogenez ve metastaz sırasında meydana gelen EMT belirteci olarak

kullanılmaktadır (34). Vimentinin hücre içi işlevi, protein kinazların ve fosfatazların kontrolü altındadır. Protein kinaz A, protein kinaz C ve p21 ile aktive edilen kinaz (PAK) gibi kinazlar, vimentin fosforilasyonunu sağlayarak vimentin filamentlerinin yeniden düzenlenmesini sağlar (35).

2.4. Endokrin Bozucu Kimyasallar

Endokrin bozucu kimyasallar, endojen hormonları taklit eden veya farmakokinetiklerine müdahale eden spesifik kimyasallardır. Birçok doğal ve sentetik kimyasallar endokrin sisteminin normal fonksiyonu bozar. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından endokrin bozucu bir bileşik, “vücutta bulunan kan kaynaklı hormonların sentezine, salgılanmasına, taşınmasına, metabolizmasına, bağlanma etkisine veya ortadan kaldırılmasına müdahale eden ve homeostaz, üreme ve gelişim sürecinden sorumlu ekzojen bir ajan olarak tanımlanır”(36). Endokrin bozucu kimyasallar, östrojen reseptör, androjen reseptör, progesteron reseptör, tiroid reseptör ve retinoid reseptör gibi nükleer hormon reseptörleriyle etkileşebilirler. Ayrıca endokrin bozucular, nükleer olmayan steroid hormon reseptörleri (membran östrojen reseptörleri), nonsteroid reseptörler (serotonin reseptörü, dopamin reseptörü, norepinefrin reseptörü gibi nörotransmitter reseptörler) ve orfan (yetim) reseptörler (aril hidrokarbon reseptörü) gibi nükleer olmayan reseptörlerle de etkileşir (37).

Endokrin bozucu molekül grupları oldukça heterojendir. Bunlar doğal ya da sentetik yapıda olabilirler. Sentetik endokrin bozucular, başlıca endüstride ve tarımda kullanılır. Bunlar endüstriyel çözücüler/yağlayıcılar ve yan ürünler olarak da poliklorlanmış bifeniller, dioksinler, plastik additifleri (bisfenol A), plastikleştiriciler (ftalatlar), pestisitler (metoksiklor, klorpirifos, diklorodifeniltrikloroetan (DDT)), fungusitler (vinklozolin) ve farmasötik ajanlar (dietilstilbestrol) olarak kullanılan sentetik kimyasallardır. İnsan ve hayvan yiyeceklerinde bulunan doğal endokrin bozucular ise kimyasal fitoöstrojenlerdir. Bu bileşiklere örnek olarak genistein, kumarestrol, enterodiol ve daidzein gibi endokrin bozucu maddeler verilebilir (38).

EDC' ler agonist ve antagonist rol oynayabilir. Bu kimyasallar, reseptör antagonistleri olarak endojen hormonların etkilerini inhibe edebilir veya engelleyebilir. Agonist olarak da doğrudan veya taklit ederek hormon reseptörlerine

bağlanabilirler (39). EDC'ler, vücudun endokrin reseptörlerine bağlanarak “yanlış” veya anormal hormonal sinyallerle sonuçlanan çok sayıda mekanizmayı bozar. Endokrin sistem, tüm omurgalılarda metabolizma, gelişme, üreme ve davranış gibi biyolojik fonksiyonları düzenler. Epidemiyolojik çalışmalar sonucunda endokrin bozucu kimyasalların kadın ve erkek üreme sistemi, nörodavranışsal ve nörogelişimsel değişiklikler, metabolik sendrom, kemik bozuklukları, bağışıklık bozuklukları ve kanserlerle ilişkilendirir (40, 41).

Yirminci yüzyıldan beri dünya genelinde kanser ve alerjik hastalıklar, şeker hastaları, obez bireyler ve endokrin, nörolojik ve cinsel bozuklukların sayısında bir artış olmuştur ve artan bir eğilim göstermeye devam etmektedir. Bu gözlem çevrenin hızla büyüyen kimyasal kirliliği sonucu ortaya çıkabilir. İnsanlar sürekli olarak doğal ve sentetik kimyasal bileşiklere maruz kalırlar. Bunlar arasında, ekzojen kökenli endokrin bozucu bileşiklerin östrojene benzer etki gösteren ksenoöstrojenler önemli bir rol oynar. Ksenoöstrojenler hormonal sistemle etkileşime girebilir ve işlevlerini östrojenler için karakteristik bir şekilde modüle edebilirler. Ksenoöstrojen kaynakları arasında farmasötik bileşikler, metaller, deterjanlar ve plastikleri sertleştirmek için kullanılan bazı kimyasallar bulunur. Plastik ürünlere olan talebin artması BPA'nın yaygın kullanımına yol açmıştır. BPA, yüksek sıcaklıklarda veya ambalajlama sırasında meydana gelen hasarın bir sonucu olarak yiyecek ve içeceklere kolayca nüfuz edebilir (42). İnsanlar bu bileşiğe esas olarak gıda ürünleri yoluyla maruz kalmaktadır ve emilimin çocuklarda özellikle yüksek olduğu bulunmuştur (43). BPA'nın düşük konsantrasyonlarda bile insan sağlığı üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Bu kimyasal, organizmanın hormonal homeostazisini bozarak infertilite ve kanserlere yol açar (44).

2.5. Bisfenol A'nın Yapısı ve Özelliği

Bisfenol A (BPA), 1940'tan beri polikarbonat plastiklerin ve epoksi reçinelerinin üretilmesinde yaygın olarak kullanılan kimyasal maddedir. BPA, dünya çapında en yüksek üretim hacmine sahiptir. BPA şişeler, tabaklar, kompakt diskler, makbuz kâğıdı, kendinden yapışkanlı etiketler, faks kâğıdı, oyuncaklar, gözlük camları, spor güvenlik malzemeleri, tıbbi malzemeler ve diş dolgu maddesi üretiminde

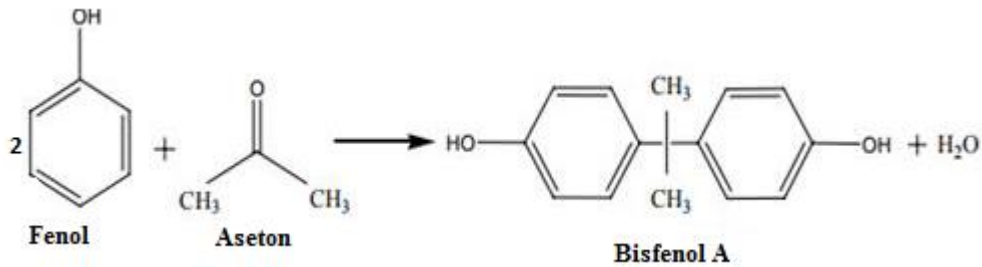
kullanılmaktadır. Ayrıca epoksi reçineler, metal ürünlerin (örneğin yiyecek ve içecek kutuları) ve su borularının iç kaplamalarında kullanılır (45).

Bisfenol A (4,4-izopropilidenedifenol; 2,2-bis (4-hidroksifenil)-propan) kimyasal formülü $C_{15}H_{16}O_2$ ve yapısal formülü $(CH_3)_2-C-(C_6H_4-OH)_2$ olan kimyasalın moleküler ağırlığı $228,29 \text{ g/cm}^3$ 'tür. BPA'da hidroksil grupları reaktiviteyi gösterir (46).

Bisfenol A ilk kez 1891 yılında Rus kimyager olan Alexander P. Dianin, iki fenol ve bir aseton moleküllerinin hidrojen klorür katalizör varlığında kondansasyon reaksiyonu ile sentezlenmiştir ve 1930'lu yıllarda sentetik östrojen araştırmaları sırasında östrojenik etkisi analiz edilmiştir (47, 48).

1940'tan beri BPA;

- polikarbonat (PC), epoksi reçineleri, polisülfon veya poliakrilat gibi polimerlerin imalatında bir monomer olarak
- polivinil klorür plastiklerinde (PVC) bir antioksidan ve polimerizasyon inhibitörü olarak
- alev geciktirici tetrabromobisfenol-A sentezinin öncüsü olarak kullanılmıştır (49).



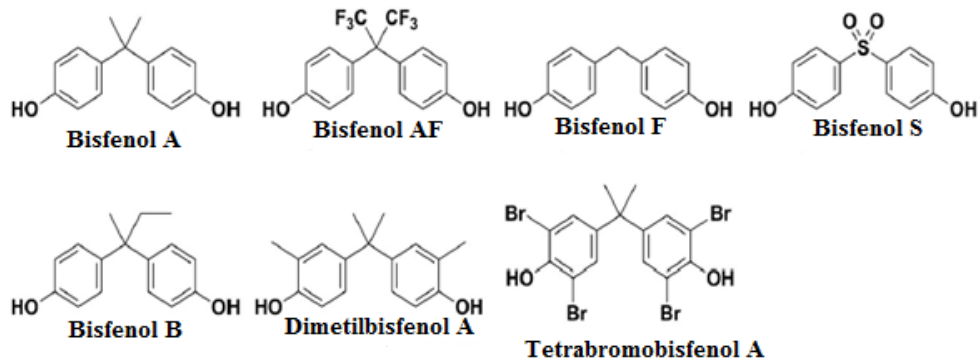
Şekil 2.4. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı (46).

Bisfenol A, ilk kez 1950 yılında plastik imalat endüstrisinde kullanılmıştır ve her yerde çok kullanılan ticari ürün haline gelmiştir. BPA her yıl 6 milyar kilodan fazla üretilen ve 100 tonun üzerinde atmosfere salındığı tahmin edilen kimyasallar arasındadır (50). Dünya çapında insan popülasyonları rutin olarak BPA'ya maruz kaldığından, çoğu bireyde tespit edilebilir. 1980'lerde Amerika Birleşik Devletleri

Çevre Koruma Ajansı (EPA), insan popülasyonları için BPA'nın en düşük olumsuz etki seviyesini 50 mg/kg/gün olarak belirlemiştir. Kabul edilen günlük alım ve referans dozu, Dünya Sağlık Örgütü tarafından tahmin edilen yetişkinler için BPA alım seviyesinin % 95 (1.5 µg/kg/gün) fazlasıdır (51).

BPA'nın analogları; 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2,2-bis (4-hidroksifenil) propan (bisfenol AF; BPAF), bis (4-hidroksifenil) metan (bisfenol F; BPF), bis (4-hidroksifenil) sülfon (bisfenol S; BPS), 2,2-bis (4-hidroksifenil) bütan (bisfenol B; BPB) ve dimetil-BPA (DMBPA) gibi BPA alternatifleri olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca halojenli bir BPA analogu, alev geciktirici olarak kullanılan 2,2',6,6'-tetrabromo-4,4'-izopropilidenedi fenol (tetra bromo bisfenol A; TBBPA) dır (52).

Endokrin bozucu özelliğinden dolayı BPA kullanımı Avrupa Birliği, ABD ve Kanada'da bebek biberonları dahil olmak üzere çocuk bakım ürünlerinin üretiminde ve termal kağıtta kullanılması yasaklanmıştır (45). Bu kısıtlamalardan dolayı, BPA'nın analogları olan bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF) ve bisfenol AF (BPAF) gibi kimyasalların BPA ile yer değiştirilmesine karar verilmiştir.



Şekil 2.5. Bisfenol A ve yapısal analogları (53).

Bisfenoller, iki benzen halkasını bir merkez karbon atomu ile ayıran, iki benzen halkası üzerinde 4-OH grubu taşıyan difenilmetanlar olarak bilinen kimyasallardır. BPS, BPF ve BPAF kimyasalları BPA ile benzer yapıya sahiptir. BPS, BPA içermeyen ürünlerde en sık kullanılan monomerdır (54).

Bisfenol S (4,4'-sülfonildifenol, BPS) bir sülfonil grubuyla bağlı iki hidroksifenil grubuna sahip organik bir bileşiktir. BPS yüksek ısıdaki stabilitesi ve güneş ışığına dirençlidir ve deniz suyunda bisfenol analoglarına göre biyobozunurluğu en düşüktür. Bisfenol S genellikle epoksi reçineleri ve polikarbonat plastiklerin üretimi için bir ara madde olarak kullanıldığından, tüketici ürünlerimizde bulunur. Örneğin, yiyecek ve içeceklerde kullanılan teneke kutularında, termal fatura kağıtlarında, el ilanları ve gazete gibi endüstriyel ürünlerde ayrıca bromlu alev geciktiricilerde kullanılmaktadır (55).

Bisfenol F, (bis(4-hidroksifenil)metan, BPF) BPA'nın yapısal bir türevi olan ve endokrin bozucu etki gösteren şeffaf ile açık pembe arasında renge sahip katı bir maddedir. BPF vernikler, astarlar, plastik yapıştırıcılar, su borusu gibi geniş bir endüstriyel uygulama yelpazesine sahiptir ve ayrıca diş dolgu maddelerinde, oral protez cihazlarında ve gıda ambalajlama kaplamalarında kullanılır (56).

BPAF, floroelastomerler, elektronik ve optik fiberlerde çapraz bağlayıcı olarak ve membranlar ve plastik optik fiberler olmak üzere yüksek performanslı monomer polimerler olarak kullanılır (57).

2.5.1. Bisfenol A'ya Maruziyet Yolları

Bisfenol A'nın hava, su, toprak ve biyolojik örneklerde yaygın olarak tespit edilebilir olduğu bilimsel yayında belirtilmiştir (58). Bisfenol A'nın kullanımının kontrolsüz olarak artması ve kullanıldığı ürünlerden çevreye sızması kronik maruziyet yaratmaktadır. İnsanlar için BPA maruziyetinin birden fazla yolu vardır. Bunlar besinsel (gıda, içme suyu) ve besinsel olmayan (toz, hava, termal kağıt, kozmetik, oyuncak vb.) kaynaklardır. İnsanlar ayrıca cilt teması, inhalasyon, diş dolguları ve mesleki maruziyet yoluyla da BPA'ya maruz kalabilirler. BPA, insan serumu, süt, tükürük, idrar ve amniyotik sıvıda bulunmuştur (59, 60). İnsanlarda günlük BPA alımına katkıda bulunan maddeler arasında termal kağıt (54.000–79 ng/cm²), toz (0,8-10 µg/g), et (17-602 ng/g) ve et ürünleri, balıklar (5-109 ng/g), meyve ve sebzeler (9-76 ng/g), içecekler (1-18 ng/g), süt ürünleri (21–43 ng/g), diş materyali (0,013–30 mg), bebek mamaları (0,1–13 ng/g) ve plastik (0,2-26 ppb), tespit edilmiştir (61, 62). Ayrıca BPA, karton kutularda paketlenmiş gıda ürünlerinde de tespit edilmiştir.

Günümüzde birçok insan BPA'ya maruz kalmaktadır. Bu maruziyet yolları ise epoksi reçinelerle kaplı teneke kaplarından ve polikarbonat (PC) kutulardaki yiyecek ve içecekler içerisinde BPA'nın sızmasından kaynaklanmaktadır (51). Polikarbonatlara ve epoksi reçinelere, BPA moleküllerinin bağlanmasını sağlayan ester bağlarının hidrolizi sıcaklık, ısı ve pH gibi faktörlerle artabileceği açıklanmıştır (63). Ayrıca BPA'nın birkaç (3-7) yıl içinde değişen ve artan sıcaklığa maruz kalan polikarbonat şişelerden (su kapları olarak kullanılan) daha hızlı göç ettiği kanıtlanmıştır (64). Yapılan bir çalışmada, zeytinyağı (PC hidrolizini etkilemeyen) içeren PC plastik şişelerden BPA sızıntısının az miktarda olmasına rağmen etanol ve su karışımı içerisinde BPA sızıntısı sadece su içeren PC plastik şişelere kıyasla daha hızlı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre PC şişelerinden diğer çözeltilere BPA sızma oranının sıvının kimyasal özelliklerine bağlı olarak değişkenlik gösterebildiğini açıklamaktadır (65). Başka bir çalışmada bebekler için kullanılan polikarbonat şişelerden içeriğe BPA göç oranını değerlendirmiştir. Artan sıcaklık ve özellikle uzun şişe kullanımının polimerin hidrolizini arttırdığını, suya daha çok BPA sızdığını göstermişlerdir (64). Polikarbonatlardan gıda ve suya olası BPA sızıntısının ve bu bileşiğin önemli toksisitesi göz önüne alındığında, bazı ülkeler BPA polimerlerinden yapılan biberonların üretimi durdurulmuştur. Biberonlarda BPA kullanımını yasaklayan ilk ülke Kanada'dır, BPA'nın yerini BPS almıştır. 2011 yılında, Avrupa Komisyonu plastik bebek biberonlarında BPA kullanımını kısıtlamıştır (46). Son zamanlarda, Gıda ve İlaç İdaresi bebek maması ambalajında BPA kullanımını yasaklamıştır. Çocuk ve bebeklerin bazı oyuncaklarının BPA maruziyetine önemli ölçüde katkıda bulunduğu gösterilmektedir (66).

Gıdalar arasında, konserve gıdalarda yüksek BPA seviyeleri tespit edilmiştir ve maksimum tespit edilen konsantrasyonu 842 ng/g'dır (67). Konserve yiyecekler, tenekelerde bulunan vernik kaplamalarından salınan BPA'ya önemli ölçüde maruz kalmaktadır. Bu vernikler epoksi reçinelerinden yapılır. Korozyona karşı metalin içi reçine ile kaplanır. Sterilizasyon ve depolama sırasında yiyecekleri metal kontaminasyonundan da korur. Yapılan çalışmalarla sıcaklık artışının epoksi reçinelerden BPA salınımını artırdığı gösterilmiştir (68).

BPA nehir sularının diplerinde, kanalizasyon sularında ve yüzey sularında farklı oranlarda tespit edilmiştir. BPA'ya maruziyetin yolu nehir ve deniz sularına

BPA içeren ürünlerin atılması bir diğeri de arıtma tesisleri ve depolama alanlarından BPA'nın doğal su kaynaklarına sızmasıdır. Almanya'da yürütülen araştırmada, Elba nehrinin ($4-92 \text{ g/dm}^3$) sularında ve tortularında ($10-380 \text{ g/kg}$) yüksek BPA konsantrasyonlarını ortaya çıkarılmıştır (69). Bir araştırmaya göre atık su arıtma tesislerinden çıkan sulardaki BPA düzeyi 370 µg/L iken yüzey sularındaki düzeyi ise 56 µg/L 'a kadar çıkabildiği açıklanmıştır (70).

BPA'nın endüstriyel faaliyet sonucunda yılda 100 ton olarak atmosfere yayıldığı tahmin edilmektedir. Atmosferdeki BPA'nın varlığıyla ilgili çalışmalar açık havada, iş yerlerindeki ve evlerdeki iç ortam havasında ve plastik fabrikalarındaki mesleki maruziyet araştırılmıştır. Çin Halk Cumhuriyeti'nde en yüksek BPA konsantrasyonu ($>50.000 \text{ ng/m}^3$) reçine fabrikalarının iç havasında en düşük BPA konsantrasyonları ($<100 \text{ ng/m}^3$) ise ticari binalarda ve konutlarda tespit edilmiştir. Ofis ve ev ortamındaki BPA kaynağının epoksi temelli zemin malzemeleri, elektronik malzemeler, yapıştırıcılar ve boyalar gibi ürünlerde yardımcı olarak kullanıldığı ve bu ürünlerden buharlaşarak havaya salınan BPA olduğu düşünülmektedir (71). BPA, 56 farklı toz örneğinin % 95'inde (konsantrasyonu $0,8-10 \text{ mg/g}$) mevcuttur. Bebekler ve çocuklar arasındaki maruziyet, oral veya inhalasyon yollarıyla olmaktadır. İnhalasyon yoluyla BPA maruziyeti yetişkinlerde $<0,4 \text{ ng/kg/gün}$ ve bebeklerde $5,3 \text{ ng /kg /gün}$ 'dür (72).

Termal kağıtlardaki BPA, kolaylıkla salınabilen bağlanmamış formlarda ve serbest şekilde bulunur. Çoğu insan günlük olarak termal kağıtla temas eder (örneğin fişler); bu nedenle termal kağıttaki BPA'ya, oral alım (yıkınmamış ellerin yiyecek veya ağızla doğrudan teması) veya dermal yolla maruz kalabilir (73). Örneğin, kasiyerler termal makbuzları rutin olarak kullandıklarından genel popülasyona kıyasla idrarlarında daha yüksek BPA seviyesine sahiptirler. Termal kağıt makbuzu, besinsel alımdan sonra ikinci yaygın BPA maruziyeti kaynağıdır (74).

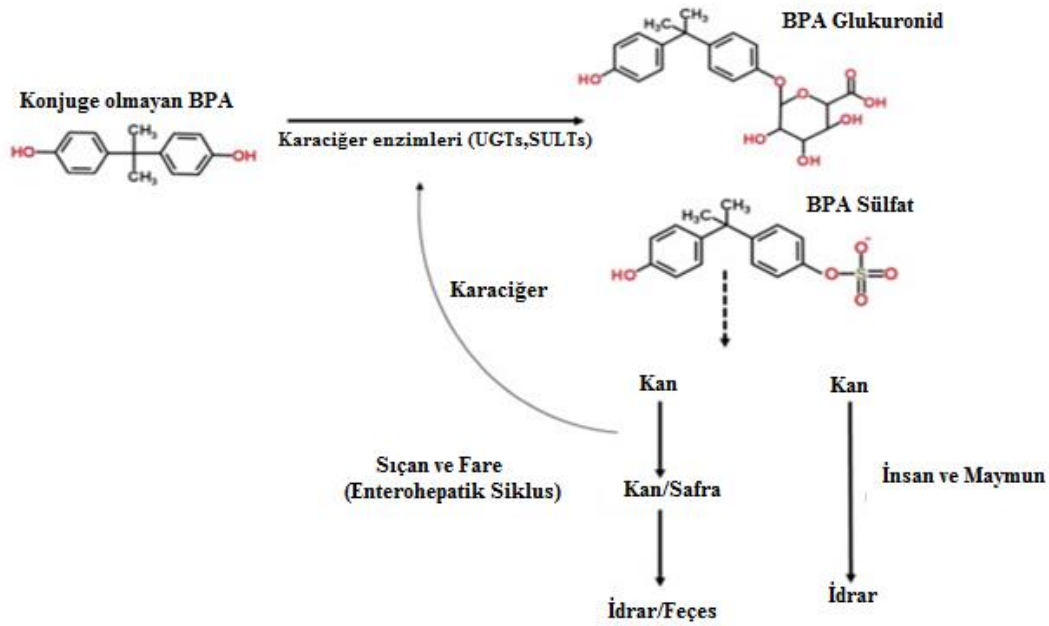
Diş malzemeleri, çoğunlukla BPA-glisidil metakrilat formunda BPA içeren monomerlerden oluşur. BPA sıklıkla diş macunlarından, dolgulardan ve diş kronlarından vücuda sızar (75). Bu nedenle, birden fazla diş dolgusu olan hastaların BPA maruziyeti riski daha yüksektir. Polisülfon veya polikarbonat plastikleştiricilerden oluşan tıbbi cihazlarda düşük konsantrasyonda ($0,3$ ile $0,35 \text{ mg}$) BPA sızıntısı olabilir. Bu cihazlara kontakt lensler, problemler, intravenöz kanüller,

solunum cihazı, kateterler, hemodiyaliz aparatı veya yenidoğan inkübatörleri örnek verilebilir (76). Kronik BPA maruziyetinin bir başka önemli kaynağı, küçük çocuklar ve bebekler tarafından kullanılan emzikler ve diş çıkarma yardımcıları gibi kullanılan oyuncaklar ve diğer ürünlerdir (77).

1997 öncesinde ise BPA için risk değerlendirmesinde en düşük doz, yan etki görülen en düşük düzey (LOAEL) olarak kabul edilen 50 mg/kg (vücut ağırlığı)/gün idi (78). Yapılan çalışmalarda BPA'nın LOAEL değeri altında da sağlığı olumsuz etkilediği gösterilmiştir (79) bu nedenle 2009' da Ulusal Çevresel Sağlık Bilimleri Enstitüsü (NIEHS) BPA'nın en düşük dozunu 10^{-7} M olarak belirlemiştir (80). 2015 yılında Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, BPA'nın tolere edilebilen alım düzeyini 50 µg/kg/gün'den 4 µg/kg/gün'e düşürmüştür (81).

2.5.2. Memelilerde BPA Metabolizması

Yapılan çalışmalarda BPA'nın, memeliler tarafından glukuronidasyon ve sülfatlama yoluyla metabolize edilebileceği açıklanmıştır (82). Oral olarak alınan BPA, rahim, testis veya fetus gibi dokulara ulaşmadan önce gastrointestinal sistemden ve karaciğerden geçmelidir. Hepatointestinal yol, üç ana kategoride sınıflandırılan ksenobiyotik metabolize edici enzimlerin (XME) aktivitesiyle zararlı kimyasallara karşı koruyucu bir bariyer görevi görür. Birinci kategori, sitokrom P450 (CYP) ailesinden faz I enzimlerinden oluşur. İkinci XME kategorisi, faz II enzimlerden oluşur. Bu enzimler genellikle faz I ürünlerini konjüge eder, aynı zamanda diğer ara bileşikleri, steroidler ve bilirubin gibi hücre içi substratları konjüge edebilir. Üçüncü XME kategorisi ise ilaç taşıyıcılarından oluşur (83). Karaciğerde BPA, glukuronidasyon yoluyla faz II enzimleri tarafından metabolize edilir. Glukuronidasyon, UGT (üridin 5'-difosfo-glukuronil transferaz, UDP glukuronosiltransferaz) izoformu olan UGT2B1 ile katalize edilebilir (84). Glukuronidasyon lipofilik substratları hidrofilik moleküllere dönüştürerek safra ve idrar yoluyla atmasını sağlayan eliminasyon işlemidir. Glukuronidasyon, BPA'nın östrojenik aktivite içermeyen bir hidrofilik forma metabolize edildiği ana yoldur. Oral olarak alınan BPA, karaciğerde eliminasyonuna uğradıktan sonra glukuronik asit ve sülfat (sülfotransferaz, (SULT)) ile konjüge olarak ana metaboliti BPA glukuronit (BPAG) ve BPA sülfata dönüşür ve idrar yoluyla atılır (85).



Şekil 2.6. BPA'nın memelilerde metabolizması (86).

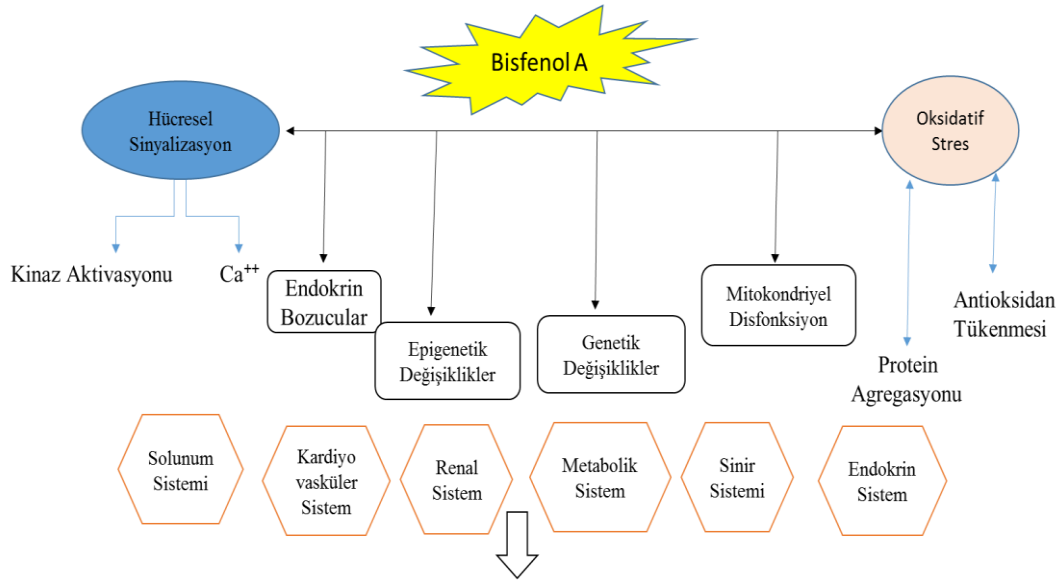
Serbest BPA esas olarak dışkıda atılırken (% 56-82) metabolitleri idrardadır (% 13-28) (87). Hızlı metabolizmalarına rağmen, yetişkinlerin ve çocukların idrarının yanı sıra (kreatininle ayarlanmamış konsantrasyon; <0,1–822 ng/ml) hamile kadınların serumunda (<0.1-154 ng/ml), göbek kordonu serumu (<0,05–52 ng/ml) ve anne sütünde (<0.04–11 ng/ml) serbest BPA görülmüştür (88-91). Sonuç olarak, insan sıvıları ve dokularında konjuge olmayan BPA veya serbest BPA (östrojenik aktiviteye sahip) konsantrasyonları, mililitre başına nanogram aralığında bulunmaktadır. BPA, çevrede ve günlük hayatta her yerde bulunabileceğinden, insanlar potansiyel olarak gıda alımı, cilt teması ve soluma yoluyla düşük BPA dozlarına maruz kalırlar. Vücuda girdikten sonra BPA, fetal dokular gibi çeşitli insan dokularında birikebilir. İnsanlarda özellikle konjuge olmayan BPA veya serbest BPA birikimi ve dağılımı, insan sağlığındaki riski önemli ölçüde artırabilir.

2.5.3. BPA Maruziyetinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Yapılan deneysel çalışmalarda BPA'nın insan sağlığı üzerinde ciddi olumsuz etkileri olabileceğini göstermiştir. Düşük dozlarda BPA endokrin sistemi, merkezi sinir ve immün sistemi olumsuz yönde etkilediği belirtilmektedir (92). BPA maruziyetinin diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklara neden olduğu

açıklanmıştır (93, 94). Ayrıca organizmada oksidatif stres ve peroksidasyon sonucu organ (beyin, böbrek, testis) hasarı yaptığı (95) ; tiroid, adrenal ve üreme hormonları üzerinde endokrin bozucu etkileri olduğu ve davranış bozukluklarına yol açan dopaminerjik sisteme müdahale ettiği gösterilmiştir (47, 96). BPA maruziyeti sonucu kardiyovasküler sistem (97), renal sistem hastalıkları (98) ve solunum sistemi (99) gibi birçok kronik hastalıkların ortaya çıktığı; fetusta merkezi sinir sistemine etki ederek doğum defektleri ile konjenital veya gelişimsel bozukluklara yol açabildiği bildirilmiştir (79) . BPA'nın üreme sistemini etkilediği (100) ; meme kanseri ve meme kanseri dışında farklı kanser türlerine neden olduğu açıklanmıştır (101).

Bisfenol A'nın endokrin bozucu etkisi dışında başka bir özelliği de genotoksik etki potansiyelleridir. Yapılan çalışmalarda BPA'nın insanlarda kısırlık, düşükler ve doğum kusurlarına katkıda bulunabilecek gen mutasyonu, DNA katımı ve anöploidi indüklediği belirlenmiştir (102, 103). Ayrıca DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlayıcı olmayan RNA'ların (mikroRNA'lar gibi) ekspresyonuna etki ederek epigenetik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (104).



Diabet, Obezite, Üreme Bozuklukları, Kardiyovasküler Hastalıklar, Doğum Defektler, Davranış Bozuklukları, Solunum Hastalıkları, Kronik Böbrek Hastalıkları, Meme Kanseri

Şekil 2.7. BPA maruziyetinin hastalıklar üzerine etkileri (105).

2.5.4. Bisfenol A'nın Östrojen Yapısı

Endokrin bozucuların insanda sentezlenen endojen östrojenin etkileri gibi davranabileceği öne sürülmüştür bundan dolayı BPA, endojen hormonların etkilerini taklit etme kapasitesi nedeniyle endokrin bozucu olarak bilinmektedir. Östrojen reseptörlerine (ER) bağlanma kapasitesi nedeniyle bir ksenoöstrojen olarak da sınıflandırılır. Endokrin bozucu kimyasalların endokrin fonksiyonları bozup fertilitede azalmaya ve üreme kanalında konjenital malformasyona neden olabileceği açıklanmıştır. Ayrıca bunların östrojen ile etkileşen dokulardaki kanser riskinin artmasına neden olduğu anlaşılmıştır (106). BPA'nın etkisi dietilstilbestrol (DES) ve etinilestradiol gibi diğer endokrin bozucu kimyasallardan 10-1000 kat daha azdır (107). HepG2 insan hepatoma hücre hattında, BPA'nın sadece östrojen taklit edici özelliğinin yanında östrojen reseptörlerinden ER α ile etkileştiği ve östrojenik aktivite gösterdiği yapılan çalışmada açıklanmıştır (108). BPA'nın doğal östrojen-17-östradiole (E2) benzer şekilde davrandığı kanıtlanmıştır. Yapısı nedeniyle, BPA hem ER α hem de ER β sinyal yoluyla agonist veya antagonist etkisi olduğu gösterilmiştir. Bisfenol A, 100-1000 nM konsantrasyonlarda ER α ve ER β 'e bağlanarak transkripsiyonel aktivitesini uyarır (109). Ancak ER β 'ya afinitesi ER α 'ya göre 10 kat daha fazladır. Ligand bağlandıktan sonra bu reseptörler, östrojen hedef genlerinin ekspresyonunu düzenlemek için çekirdeğe göç eder.

ER α sinyali hücreleri proliferasyona gönderirken, ER β sinyali hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Kanserde, BPA aracılı ER α aktivasyonu, kanser hücrelerinin büyümesi, hayatta kalmasını, proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu, apoptozu ve ilaç direncini etkilerken; ER β , ER α 'nın işlevini inhibe eder (110). BPA hem östrojene bağlı hem de bağımsız yollarla hareket eder. Östrojenler eylemlerini esas olarak nükleer ER'lere ve G proteini ile bağlanmış reseptör 30 (GPR30) adı verilen transmembran reseptörüne bağlanarak uygularlar. BPA'nın hem ER'nin membran bağlı formuna (mER) hem de GPR30'a bağlandığı gösterilmiştir ve bu membrana bağlı reseptörlerin, nongenomik steroid eylemleri yapabildiği belirlenmiştir (111). BPA birçok endokrin sinyal yolağını değiştirir. Örneğin, BPA'nın anti-androjenik etkileri vardır, ancak bunlar tüm model sistemlerde gösterilmemiştir (112). BPA ayrıca glukokortikoid reseptörü üzerinde agonist aktiviteye sahiptir ve adipogenez uyarıcı yolları aktive edebilir. Östrojen, androjen ve glukokortikoid

yolakları üzerindeki etkilere ek olarak, BPA tiroid hormonu sinyallerine müdahale eder (113). BPA, çeşitli hücre sinyal yollarıyla kanserojenezi, üreme toksisitesini, beyin ve sinir sistemini, inflamatuvar ve bağışıklık yanıtını etkiler.

2.5.5. BPA'nın Kanslerle İlişkili Hücre Sinyal Yolları

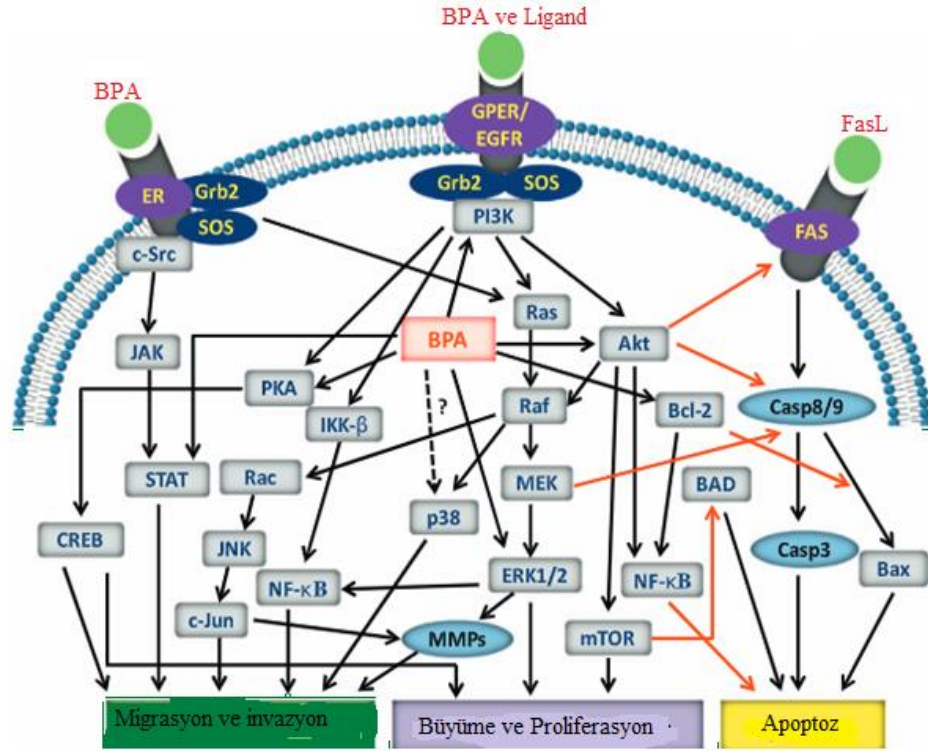
BPA kanser hücrelerinin büyümesi, hayatta kalması, proliferasyonu, göçü, invazyonu ve apoptozu ile çeşitli sinyal yollarıyla ilaç direncini düzenlemede rol oynar. Bu düzenlemeler, BPA'nın nükleer ve membran reseptörlerine bağlanması veya bu reseptörlerin BPA aracılı stimülasyonu ile aktif edilir (114, 115). Östrojen reseptörü α/β (ER α/β), androjen reseptörü (AR), G protein bağlı östrojen reseptörü (GPER; G proteini bağlı reseptör 30, GPR30), insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü (IGF-1R) ve östrojene bağlı reseptör gamma (ERR γ) bu reseptörlerdir. ER pozitif yumurtalık ve meme kanseri hücrelerine BPA eklenmesiyle, mitojenle etkinleşen protein kinaz / ekstraselüler regüle edici kinaz 1/2 (MARK/ERK1/2) ve fosfoinositid -3-kinaz / Akt (protein kinaz B) / memeli rapamisin (PI3K/Akt /mTOR) sinyal yollarının hücre büyümesi ve çoğalmasında kilit rol oynadıkları gösterilmiştir (110, 116, 117). Akt ve ERK sinyal yolları, BPA maruziyetiyle prostatiferler içindeki prostat kök progenitör hücrelerini uyardığı açıklanmıştır (118). Yapılan çalışmalarda, BPA'nın p38 MAPK ve Jun N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonunun azaltmadığı veya hiç etkilemediği gösterilmiştir (119). BPA maruziyeti p53, siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve hücre nükleer antijeni (PCNA) gibi hücre döngüsü proteinlerini uyarır. Çünkü BPA maruziyeti, ER sinyal yolağıyla kanser hücrelerinin çoğalması ve büyümesi ile ilişki göstermektedir (120, 121).

Rahim ağzı ve kolorektal kanser hücre hatlarına BPA uygulamasından sonra, matriks metaloproteinazlar (MMP'ler) gibi proteazların aktivasyonun artması, E-kaderin ve benzeri epitelyal hücre bağlantı proteinlerinin kaybı ve N-kaderin, fibronektin ve vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin artması sonucunda kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonu uyarılmaktadır (122, 123). BPA maruziyetiyle TGF- β sinyal yolağını inhibe ederek kanser hücrelerinin büyümesini uyardığı BG-1 yumurtalık kanser hücrelerinde gösterilmiştir (124). GPER aracılı sinyal yolağı, kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu ile yakından ilişkilidir. Akciğer kanseri A549 hücrelerine uygulanan BPA'nın MMP'leri up-regülasyonu sağladığı ve GPER/ EGFR

/ERK1/2 sinyal yollarını aktive ederek kanser hücrelerinde migrasyon ve invazyonu tetiklediği gösterilmiştir (125). BPA hücre migrasyonu sağlayan aktivatör protein-1 (AP-1)/(nükleer faktörü kappa B) NFκB-DNA bağlanma aktivitesine aracılık eden sinyal iletim yollarının aktivasyonunu indüklediği MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında gösterilmiştir (126).

Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, fizyolojik bir süreçtir. İmmün reaksiyonda ya da hücre hasarında tetiklenen bir savunma mekanizması olmasının yanı sıra dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizmadır. BPA uygulaması, B hücre lenfoma 2 (Bcl-2) ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik proteinleri up-regüle ederken, p53, Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax) ve BAD gibi pro-apoptotik proteinleri down-regüle eder (110, 127, 128).

Nekroptoz, apoptoza mekanik ve nekroza morfolojik bir benzerlik gösteren yeni bir programlanmış nekrotik hücre ölüm şeklidir. Fas ligand aktivasyonu ve tümör nekrozis faktör reseptörü (TNFR) ile nekroptoz başlar. Reseptör aracılı protein kinaz 1 (RIPK1), reseptör aracılı protein kinaz 3 (RIPK-3) ve mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) nekroptozun en önemli karakteristik özelliğidir. Ayrıca RIPK1 inhibitörü olan Nekrostatin-1 (Nec-1) ile inhibe edilmektedir (129). Nekroptoz, onkogeneze, kanser metastazı, kanser bağışıklığı gibi kanser biyolojisinin düzenlenmesinde ve nörodejenerasyon gibi hastalıklarda rol oynar (130).



Şekil 2.8. BPA ve kansere ilişkili hücre sinyal yolları. Siyah oklar etkinleştirme kaskadını gösterirken kırmızı oklar inhibisyon kaskadını gösterir (131).

2.5.6. BPA'nın Karaciğere Etkileri

Karaciğer, BPA dahil olmak üzere ksenobiyotiklerin metabolizması ve detoksifikasyonu için majör organdır (132). BPA karaciğerde BPA'nın glukuronidasyonunu katalize eden üridin 5'-difosfo-glukuronil transferaz (UGT) enzimi tarafından metabolize edilir. BPA ayrıca BPA-sülfat veya bisfenol-3,4-kinon gibi diğer maddelere metabolize edilebilir (133). Bu nedenle, karaciğer büyük ölçüde BPA'ya maruz kalabilir ve diğer organlardan daha düşük dozlara duyarlı olabilir (134).

Fenolik bileşiklerden biri olan BPA'nın sıçan ve farelerin karaciğerinde anormalliklere, DNA hasarına ve genotoksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (135, 136). Yine yapılan diğer çalışmalarda, yüksek dozda BPA'nın farelerde veya sıçanlarda karaciğer ağırlığını değiştirdiği ve sıçan hepatositlerinin canlılığını azalttığı rapor edilmiştir (137, 138). Kesitsel klinik bir çalışmada yüksek BPA konsantrasyonları ile artmış γ -glutamil transferaz (γ -GT), alkalen fosfataz (ALP) ve laktat dehidrojenaz (LDH) gibi karaciğer enzimleri arasında önemli bir ilişki olduğu bulunmuştur (139). Ayrıca BPA, adenilat kinaz aktivasyonu, TNF- α gen ekspresyonu

ve Ca^{+2} homeostazının disregölasyonu ile apoptozise neden olabilir(140). Ancak BPA'nın karaciğer fonksiyon bozukluğu ve apoptoz üzerindeki olumsuz etkisinin mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (132).

Bu tez kapsamında Fulvestrant ve BPA kimyasalının HepG2 insan hepatoma hücrelerine uygulanarak hücrelerdeki proliferasyon ve migrasyon etkisinin belirlenmesi sonrasında hücre adezyon proteinleri olan E-kaderin ile N-kaderin, vimentin ara filament proteinlerine ve apoptoza (kaspaz 3/7) etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2 (ATCC, HB-8065), American Type Cell Collection (ATCC)'den temin edildi. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) kimyasalı Serva, Bisfenol A kimyasalı Sigma-Aldrich, Dimetil Sülfoksit (DMSO) Merck, Fulvestrant (ICI 182,780) kimyasalı ChemCruz firmasında temin edildi. Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose) Biological Industries, DMEM (L-glutamin, sodyum pirüvat ve fenol red içermeyen DMEM high glucose) Sigma, Fetal Sığır Serumu (FBS) Biowest, Fosfat Tamponlu Salin (1X) 0,0067M (PO₄) Thermo Scientific, %0,25 (w/v) Tripsin-EDTA, Penisilin-Streptomisin ve L-Glutamin ise Biological Industries firmasından temin edildi. Hücre Liziz Tamponu Abcam (ab39401), Protein Miktar Tayin kiti (BCA Protein Quantification Kit ab102536) Abcam, Apoptoz Kiti (ApoTox-Glo™ Triplex Assay) Promega firmasından temin edildi. Nekrostatin-1 (N9037) kimyasalı Sigma Aldrich firmasından temin edildi.

Vimentin, E- kaderin ve N- kaderin ELİSA Kitleri (SEB040Hu 96 Tests, SEA017Hu 96 Tests, SEB481Hu 96 Tests) Cloud-Clone firmasından temin edildi.

Cihaz olarak ise; BMG Labtech Fluostar Omega mikroparka okuyucusu, Mettler Toledo hassas terazi, Hettich Zentrifügen 32R santrifüj, , Panasonic inkübatör (CO₂'li), Nikon Eclipse TS100 mikroskop kullanıldı.

3.2. Hücre Kültürü

3.2.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü

Çalışmada kullanılan insan hepatoselüler karsinom hücre hatları (HepG2, HB-8065TM, ATCC®) Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'ndan alındı.

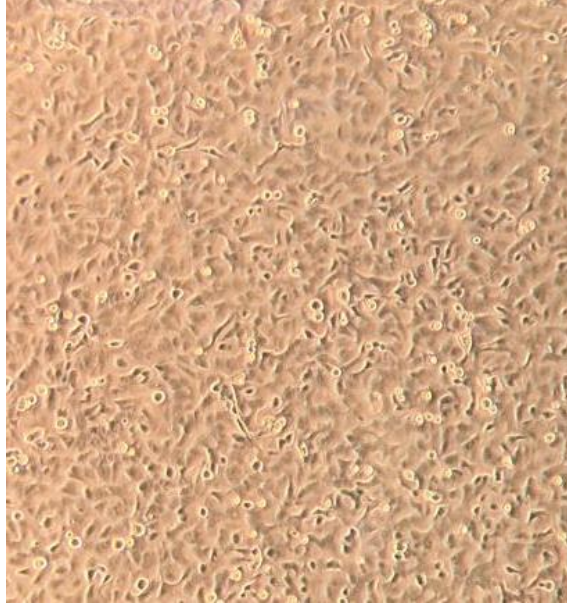
- Aseptik teknik olarak, çalışmaya başlamadan önce laminar kabin ve içerisine bırakılan tüm kimyasallar ve malzemeler % 70 'lik etanol (70 ml etanol+30 ml distile su) ile temizlendi.
- Öncelikle su banyosundaki distile su 37°C'ye kadar ısıtıldı.

- HepG2 hücreleri için önceden 37°C de bekletilen besiyerinden (%1 penisilin-streptomisin, %1 glutamin ve %10 inaktive edilmiş Fetal Bovin Serum (FBS) içeren yüksek glukozlu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (500 ml))13 ml alınarak 75 cm²'lik flaska konuldu.
- -86°C'de saklanan HepG2 hücreleri kutudan alındı.
- Alınan kriyoviyal (dondurma tüpü) tüp önceden ısıtılmış su banyosunun içerisinde 1 dk bekletilerek tamamen çözülmesi sağlandı. Kriyoviyal tüp su banyosundan alınarak %70 etanol ile temizlendi.
- Kriyoviyal tüpteki çözünen hücreler pipetle çekilerek 75 cm²'lik flask içerisindeki besiyerine yavaşça ekildi.
- Flask üzerine hücre tipi, tarih, pasaj sayısı ve kimin yaptığı yazıldı.
- Işık mikroskopta hücreler kontrol edildi. Daha sonra flask etanolle temizlenerek %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de inkübe edildi.
- Kültürün devamlılığını sağlamak için haftada 2 gün besiyeri değiştirilerek pasajlamaya uygun sayıya (%70-80 doygunluğa) erişmeleri beklendi. Işık mikroskopta hücreler incelendi ve % 80 doygunluğa ulaşan hücreler tripsinlenerek pasajlandı (Şekil 3.1).

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

- Flaskdaki HepG2 hücreleri mikroskopta incelendi.
- Hücre yoğunluğuna pasaj yapılacak sayıya erişmiş ise kültür kabındaki besiyeri, vakum pompası ile çekildi.
- Hücreler 4 ml PBS (0,0067 M tuzlu fosfat tamponu pH:7,4) ile yıkandı ve vakum pompası ile çekildi.
- Flask içerisine 2 ml %0,25 (w/v) Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Hücreler kalkana kadar beklenildi.
- Tripsin ile muamele sonrası kalkan hücrelere 2 ml besiyeri eklenerek pipetle yavaşça karıştırıldı. Toplam hacim 4 ml oldu.
- Temiz kültür kabına 12 ml besiyeri bırakıldı. Kalkan hücrelerden pipetle 2 ml alınarak temiz kültür kabına bırakıldı.
- Geriye kalan 2 ml hücrelere de 12 ml besiyeri bırakıldı.
- Flaskların üzerine hücre tipi, tarih, pasaj sayısı ve kimin yaptığı yazıldı.

- Mikroskopta hücreler kontrol edildikten sonra %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C’de inkübe edildi.



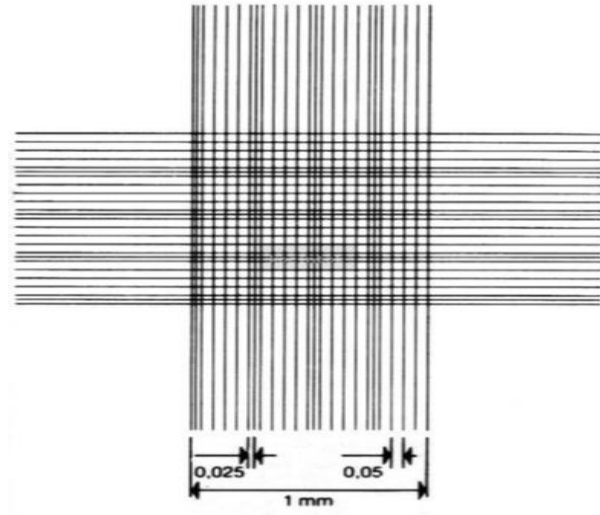
Şekil 3.1. HepG2 hücrelerin proliferasyon ışık mikroskopu altındaki görüntüsü (10X büyütme).

3.2.3. Hücre Sayımı

Tripan mavisi adı verilen bir boya ile hücre sayımı yapıldı. Tripan mavisi canlı hücrelerden içeri giremezler çünkü membran bütünlüğü korunur fakat ölü hücrelerde membran bütünlüğü bozulduğundan dolayı boya sitozole geçerek hücreleri mavi renge boyar. Hücreler, Thoma lamında mikroskop altında sayılır.

İşlem aşağıdaki şekildedir:

- Hücreler inkübatörden çıkarıldı, yukarıda anlatılan tripsinizasyon işleminden sonra hücreler 2 ml besiyeri eklenerek süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon steril falkon tüpüne alındı.
- Lamel, thoma lamının ortasına gelecek şekilde bırakıldı.



Şekil 3.2. Thoma lamının mikroskopta görünümü

- Hücre yoğunluğuna göre seyreltilen örnekten 30 µl ve tripan mavisi'nden 30 µl alınarak parafilm üzerine bırakıldı, karışımın homojen olması için otomatik pipet ile 2-3 defa pipetleme yapıldı.
- 30 µl hücre ve tripan mavisi karışımı pipetle çekildi ve thoma lamının kenarından pipet ucuyla lam ve lamel arasında pipetlendi.
- Işık mikroskobuna yerleştirilen thoma lamının çizgileri mikroskobun 10X objektif ile bulundu. Sadece merkezde çizgilerin kesiştiği 9 karenin içindeki canlı hücreler sayıldı. Hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$\text{Canlı hücre sayısı (hücre/ml)} = \text{Hücre sayısı} \times \text{Seyreltme katsayısı} \times 10^4$$

Her 1 mm² alan hacim olarak 0,1 mm³'e denk gelmektedir. 0,1 mm³'de 10⁻⁴ ml'ye eşit olduğundan ml'deki hücre sayısı 10⁴ ile çarpılır.

- Hücre sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyulu plakanın her kuyusuna 5000 hücre/100 µl besiyeri ve 6 kuyulu plakanın her kuyusuna 3x10⁵ hücre/3 ml besiyeri olacak şekilde hücreler ekildi.
- Hücre sayımı yapıldıktan sonra ve hücre plakası ekildikten sonra geriye kalan hücreler donduruldu.

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması

- ✓ Yukarıda anlatılan tripsinizasyon işleminden sonra hücelere 10 ml DMEM eklendi, pipetlenerek 15 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. Hücre süspansiyonu 180xg'de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası dikkatli bir şekilde tüpün altında oluşan hücre pelletinin üstündeki süpernatant vakum pompasıyla çekilerek atıldı. Önceden hazırlanan dondurma çözeltisinden 1000 µl eklendi pellet tamamen çözünene kadar yavaş bir şekilde al ver yapıldı. Dikkatli bir şekilde hücelere zarar verilmeden hepsi çekilerek, dondurma tüpüne alındı.
- ✓ -20°C 'de 2-4 saat bekletildikten sonra -86°C'ye alındı.
- ✓ **Dondurma çözeltisi hazırlama:**50 ml için, 40 ml DMEM(%10 FBS, %1 glutamin ve %1 penisilin-streptomisin), 5 ml FBS ve 5 ml DMSO eklendi. Kullanılmak üzere -20°C 'de saklandı. Kullanmadan önce 37°C su banyosunda çözündürülür.

3.2.5. Bisfenol A (BPA) Kimyasalın Hazırlanması

Satın alınan BPA, 3,2 mM konsantrasyonda 10 ml hacimde stok şeklinde hazırlandı. BPA, dimetil sülfoksit (DMSO) te çözüldü. 0,20 µm'lik filtre ile süzülerek steril edildi ve kullanılmak üzere +4°C de saklandı.

3.2.6. Fulvestrant (ICI 182,780) Hazırlanması

Satın alınan 1 mg fulvestrant, konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde hesaplama yapıldı ve DMSO da çözümlenerek stok çözelti hazırlandı. Kullanılmak üzere +4°C de saklandı.

3.2.7. Hücre Canlılık Testi

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid)) yöntemiyle canlı hücrelerin miktarı belirlenerek hücre çoğalması izlendi. Bu yöntemde canlı hücredeki mitokondri, sarı renkli MTT boyasındaki tetrazolyum halkasını mitokondriyal dehidrogenaz reaksiyon ile suda çözünmeyen formazana indirir. Mor renkli formazanın çözünmesiyle açığa çıkan renk değişikliği değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır.

- Hücre sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyulu plakanın her kuyusuna 5000 hücre/100 µl besiyeri olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.
- 37 °C ve % 5 CO₂'li inkübatöre bırakıldı ve 1 gün inkübe edildikten sonra plaklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 100 µl fenol kırmızı içermeyen DMEM (%2 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 glutamin içeren) eklendi.
- Belirli konsantrasyonlarda BPA, ICI ve ICI'nın BPA ile kombinasyonu (BPA+ICI) plaklara ilave edildi.
- Kontrol grubuna DMSO eklendi. 48 saat inkübasyona bırakıldı.
- Sonra 10 mg MTT boyası 2 ml hacimde PBS çözülerek 5mg/ml'lik MTT solüsyonu taze hazırlandı. Solüsyon 0,20 µm'lik filtre ile süzülerek steril edildi.
- Doksan altı kuyucuklu plaka 10 µl MTT solüsyonu eklendi.
- Işıktan korumak için plak alüminyum folyo ile sarıldı ve 37°C çalkalamalı inkübatörde kristaller oluşuncaya kadar yaklaşık 3 saat inkübe edildi.
- Daha sonra plaklardaki sıvı kısım çoklu pipetle çekildi ve kristallerin üzerine 100 µl DMSO bırakıldı ve tekrar inkübe edildi (yaklaşık 10 dk). Kristallerin tamamı çözüldükten sonra okuma yapıldı. DMSO, çözünürlük verimliliği yüksek ve uçuculuğu düşük olması nedeniyle çözünme için en uygun çözücü olarak kabul edilmektedir.
- Spektrofotometre de 570 nm dalga boyunda ve 690 nm referans aralığında ölçüm yapıldı. 570 nm absorbans değeri 690 nm absorbans değerinden çıkartıldı. Kontrol grubunun absorbans ortalaması alındı. Sonuç olarak absorbans değerlerine ait veriler ile canlılık oranları ve IC₅₀ (Maksimum inhibisyonun yarısını oluşturan inhibitor konsantrasyonu) değerleri hesaplandı. IC₅₀ değeri GraphPad Prism 7.0 programı kullanılarak konsantrasyona (log) karşı canlılık oranları yazılarak XY analyses, Nonlinear regression (curve fit), Dose response-Inhibition programından hesaplandı.
- Hücre canlılığı yüzdesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.
- % Hücre Canlılığı =(Elde edilen absorbans değeri)/(Kontrol ortalama absorbans değeri)x100
- MTT testi belirli konsantrasyonlardaki BPA, ICI ve BPA+ICI için en az 3 kez tekrarlandı.

3.3. İlaç Kombinasyon Testi

HepG2 hücre hattında BPA+ICI kombinasyonu ve olası sinerjistik etkilerini incelemek için Talalay-Chou kombinasyon indeks metodu kullanıldı. Kombinasyon indeksi (CI), sinerjizm ve antagonizm açısından ilaç etkileşim derecesinin nicel bir ölçüsüdür. $CI < 1$ sinerjizm (beklenenden daha fazla katkı etkisi), $CI=1$ katkı etkisini ve $CI > 1$ antagonizmi (beklenenden daha küçük katkı etkisi) göstermektedir. CI, ölen hücre oranı (Fa) ve doz azalım indeksi (DRI) CompuSyn software ile değerlendirildi. Kombinasyondaki her ilaç için $DRI = 1$ doz azaltma yok, $DRI > 1$ uygun doz azaltma ve $DRI < 1$ doz azaltımı uygun olmadığını gösterir.

3.4. Yara İyileşmesi Testi

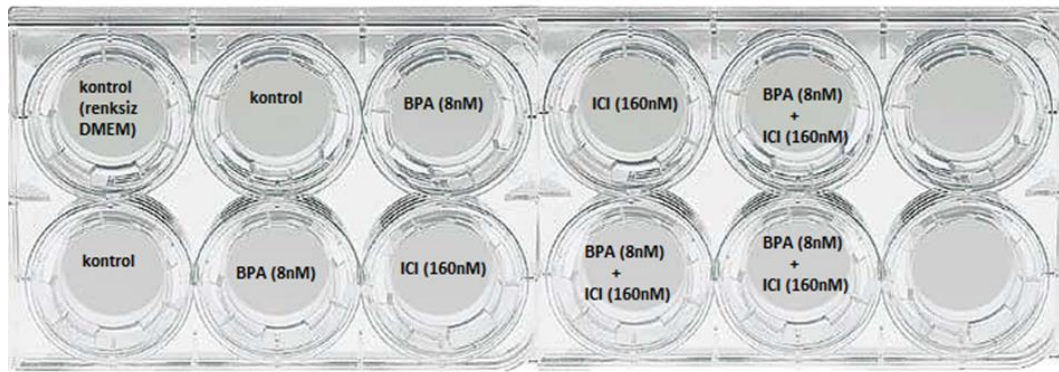
Yara iyileştirme testi (çizilme deneyi) in vitro hücre invazyonunu ve migrasyonu ölçmek için kullanılan maliyeti düşük bir yöntemdir. Testin amacı, hücre üzerinde yapay bir boşluk oluşturulması ve boşluğun kenarındaki hücrelerin yeni hücre-hücre kontakları kuruluncaya kadar göç etmeye başlamasına dayanmaktadır. Bu testle ekili hücrelerin yüzeylerinde yara bölgeleri oluşturulur daha sonra başlangıçtaki yara genişliği ve belirlenen sürelerdeki yara genişliği ölçülür.

Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 3×10^5 hücre/3 ml besiyeri olacak şekilde ekildi. Hücrelerin plaklara tutunması için 24 saat %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. Hücrelerin plakalara tutunması mikroskop altında kontrol edildikten sonra 1000 µl'lik pipet ucuyla dik bir çizgi çizilerek yara oluşturuldu. Yara bölgesini belirlemek için plakanın alt kısmına bir belirteç çizildi ve böylece aynı bölgeden görüntü alınması sağlandı. Yara oluşturulan plakalardaki besiyerleri çekildikten sonra hücre kalıntılarının giderilmesi için hücreler PBS ile yıkandı. PBS yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı ve sonra kimyasal uygulaması (konsantrasyonları, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA+ICI) yapıldı ve kontrol grubuna DMSO uygulandı. Toplam hacim 3ml olacak şekilde fenol kırmızı içermeyen DMEM (%2 FBS, %1 glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren) eklendi. Uygulama yapıldıktan sonra (0. saat) ve 48 saat sonra yaralardaki büyüklük mikroskopta 10X objektif kullanılarak görüntülendi. Görüntüler cep telefonu ile çekildi ve Image J (141) programıyla yara bölgelerinin alanları analiz edildi.

3.5. Protein Tayini

Biyokimyasal araştırmalarda kullanılan en yaygın işlemlerden biridir. Diğer protein tayinlerine göre pek çok avantaja sahip olan Bikinkoninik asit (BCA) tayini; kullanımını kolaydır, oluşan renk kompleksi kararlı haldedir ve çok çeşitli protein konsantrasyonlarında uygulanabilir.

Hücreler 6 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra inkübasyona bırakıldı. Birgün sonra DMEM fenol kırmızı içermeyen DMEM'le değiştirilerek aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi ilaç uygulaması (8 nM BPA,160 nM ICI ve BPA+ICI) yapıldı. 100 l ilaç ve 900 l fenol kırmızı içermeyen DMEM kuyucuklara bırakıldı.



şekil 3.3. 6 kuyucuklu plakalarda HepG2 hücrelerine ilaç uygulaması

Daha sonra 48 saat %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. 2 gün sonra plakalardaki besiyeri etiketlenen ependorflara alındı ve buz üzerinde bekletildi. Hücreler tripsin ile kaldırıldı. Etiketlenen yeni ependorflara alındı ve tripsin uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelere 50l Cell Lysis Buffer (%1 Triton-X-100 ve % 0,015 DTT içeren) eklenerek buz üzerinde pipetle al ver yapılarak 10 dakika boyunca inkübe edildi. 1 dakika, 10,000 x g'de, +4°C santrifüj edildi. Süpernatant etiketlenen yeni ependorflara alındı ve buz üzerine bırakıldı.

Protein tayini için BCA Protein Quantification Kit ab102536 (abcam) kullanıldı.

Reaktif Hazırlama: 50 l BCA Reaktifine 1 l Bakır Reaktifi ekleyerek çalışma solüsyonu hazırlanır. Her örneğe ve standartta 100 l çalışma solüsyonu bırakılır. Bundan dolayı örnek sayısı hesaplandığında 7 ml BCA Reaktifi falkon tüpüne alınarak üzerine 140 l Bakır Reaktifi eklendi ve çalışma solüsyonu hazırlandı.

Standart Hazırlama:1 den 8 e kadar 8 tüp etiketlendi. 1 mg/ml sığır serum albümin (BSA) standartından stok çözelti (40 µl BSA standart + 360 µl DMSO) seyreltilerek hazırlandı. Tablodaki gibi seri solüsyon hazırlandı.

Tablo 3.1. Standart çözeltisinin seri solüsyonu

Tüp	BSA Solüsyon(µl)	DMSO(µl)	50 µl =
8	Stok çözelti(256)	144	32µg
7	Tüp 8 (200)	200	16 µg
6	Tüp 7 (200)	200	8 µg
5	Tüp 6 (200)	200	4 µg
4	Tüp 5 (200)	200	2 µg
3	Tüp 4 (200)	200	1 µg
2	Tüp 3 (200)	200	0,5 µg
1	-	200	0 µg

Standartlar 0,01-0,6 mg/ml aralığında olacak şekilde seyreltildi.96 kuyucuklu plakada her bir kuyucuğa 50 µl standart ve örnek çift tekrarlı olacak şekilde bırakıldı. Standart ve örnek içeren her kuyucuğa 100 µl çalışma solüsyonu çoklu pipetle eklendi. Hafifçe çalkalandı ve 37°C de 30 dakika bekletildi. 562 nm absorbans değeri ölçüldü. Protein standartlarından elde edilen absorpsiyon değerleri sayesinde çizilen standart eğri kullanılarak örneklerin protein miktarları hesaplandı.

3.6. E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin ELISA Testi

ELISA (enzime bağlı immünosorbent testi), enzime bağlı konjugat ve enzim substratı kullanılarak elde edilen renk değişimi yoluyla antijen-antikor reaksiyonlarını gösteren ve biyolojik sıvılardaki moleküllerin varlığını ve konsantrasyonunu belirlemeye yarayan kantitatif analitik yöntemlere denir. Peptitler/proteinler, hormonlar, vitaminler ve ilaçlar gibi çok düşük konsantrasyon moleküllere uygun geliştirilen antikorlar veya antijenlere karşı yüksek bir spesifite seviyesini gösterir. Çünkü bir antikoron kendi antijeni dışında bir moleküle bağlanması neredeyse imkansızdır. Bu nedenle, bu yöntem çok düşük konsantrasyonlarda bile neredeyse hiç interferans riski olmayan maddeleri ölçmek için kullanılabilir. Başka bir deyişle,

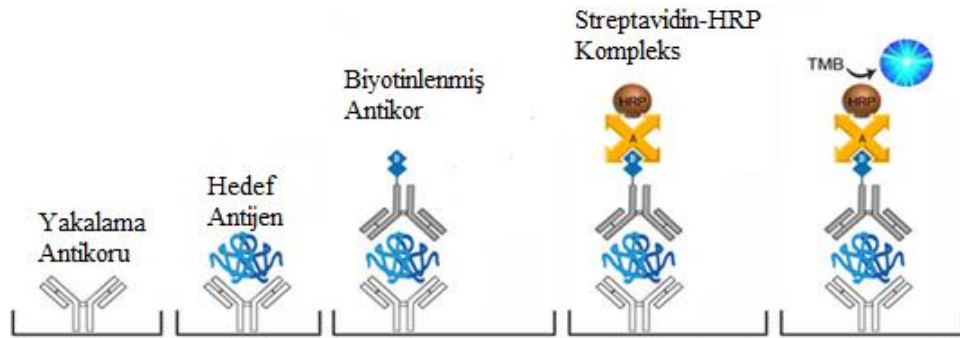
belirli bir maddeye özgü olduğunu bildiğimiz antijene sahip olduğumuzda, antikorunun tipini ve miktarını belirleyebiliriz ve antikora sahip olduğumuzda, bu yöntemi kullanarak spesifik antijenini ve antijen miktarını bulabiliriz. Dört farklı ELISA yöntemi vardır.

1.Direkt ELISA yöntemi (antijen taraması) yüksek molekül ağırlıklı antijenlerin miktarını belirlemek için uygundur.

2.Dolaylı ELISA yöntemi, ölçülecek antijeni belirleyen ve ayıran şeyin birincil antikor değil, ortama yerleştirilen başka bir antikor olmasıdır.

3.Sandviç ELISA (antikor taraması) yönteminde antijen veya ligand üzerindeki farklı bölgelere bağlanan iki antikorun olmasıdır. İlgili protein iki antikor molekülü arasında sıkıştığından, bu yönteme Sandviç ELISA denir. Antijen için spesifik olan yakalama antikoru, katı bir yüzeye tutturulur. Örnek, antikor ile kaplanmış mikro plaka kuyularına eklenir, daha sonra plaka bir süre inkübe edilir ve yıkanır. Yıkama, bağlanmamış antijenleri giderir. Yıkamadan sonra, antijene özgü enzim ile hedeflenen antikorlar eklenir ve inkübe edilir. Enzim aktivitesini ortaya çıkarmak için, ortama enzim substratı eklenir ve renklendirme sağlanır. Renklenme varsa sonuç olumlu fakat renklenme eksikliği enzimlerin gevşekliğini veya olumsuz bir sonucu gösterir.

4.Kompetitif ELISA (antijen / antikor taraması) yöntemi, bu test sandviç ELISA'ya benzer, fakat ikinci antikor eklendiğinde rakip antikorların veya proteinlerin eklenmesini içerir.



Şekil 3.4. Sandviç ELISA yöntemi

Protein tayini yapılan hücre lizatlarının E-kaderin, N-kaderin ve vimentin protein seviyeleri sandviç elisa testiyle (SEA017Hu 96 Tests, SEB481Hu 96 Tests ve

SEB040Hu 96 Tests, Cloud-Clone) ölçüldü. EMT biyobelirteçleri için aynı ELISA protokolü uygulandı.

-20°C'de saklanan ELISA kiti çözünene kadar oda sıcaklığında bekletildi. BCA ile protein miktarı belirlenen hücre lizat örnekleri ile çalışıldı. -80°C'de saklanan hücre lizat örnekleri buz üzerine alınarak çözünmesi sağlandı. Örnekler 10 kat kadar seyreltildi. Seyreltme işlemi steril olmayan PBS ile yapıldı (20 µl örnek+ 180 µl PBS). Protokole göre standartlar, yıkama çözeltisi, belirleme reaktifi A ve B hazırlandı. Plaka kuyucuklarında standart, kör ve örneklerin yerleri belirlendi. Her kuyucuğa 100 µl bırakıldı. Plaka yapıştırıcısıyla plakaların üstü kaplandı ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

1.İnkübasyon işleminden sonra her kuyucuğun çözeltisi pipetle alındı.

2.Her kuyucuğa 100µl belirleyici reaktif A çalışma çözeltisi ilave edildi üzeri plaka yapıştırıcısıyla kaplandı ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

3.Daha sonra kuyucuklardaki çözelti alındı ve kuyucuklara 350 µl 1X yıkama çözeltisi ilave edildi. Yıkama çözeltisi 1-2 dakika bekledikten sonra pipetle alındı ve bu işlem 3 defa tekrarlandı, son yıkamadan sonra plaka temiz bir kağıt üzerine ters döndürülerek çözeltinin kuyucuklardan uzaklaşması sağlandı.

4.Her kuyucuğa 100 µl belirleyici reaktif B çalışma çözeltisi ilave edildi üzeri plaka yapıştırıcısı ile kaplandı ve 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

5. Daha sonra kuyucuklardaki çözelti alındı ve kuyucuklara 350 µl 1X yıkama çözeltisi ilave edildi. Yıkama çözeltisi 1-2 dakika bekledikten sonra pipetle alındı ve bu işlem 3 defa tekrarlandı, son yıkamadan sonra plaka temiz bir kağıt üzerine ters döndürülerek çözeltinin kuyucuklardan uzaklaşması sağlandı.

6. 90 µL Substrat Solüsyonu plakadaki her kuyucuğa eklendi. Yeni bir plaka yapıştırıcısıyla kapatıldı. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Substrat solüsyonu eklendikten sonra çözelti mavi renge dönüştü.

7. 50 µL Durdurma Solüsyonu plakadaki her kuyucuğa eklendi. Durdurma çözeltisi eklendiğinde çözeltinin rengi sarıya döndü.

8.Plakanın alt tarafında su damlası ve parmak izi olmaması gerekir. Plakanın altı peçeteyle silindi. Ardından, mikropilaka okuyucusunda 450 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

450 nm de okunan konsantrasyonları bilinen standartların absorban değerleri GraphPad Prism 7.0 programında nonlinear regression uygulamasıyla kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrisinden, örneklerin absorbans değerine karşı konsantrasyonları hesaplandı ve protein düzeylerine göre normalize edildi. Elisa sonuçlarının belirlenmesinde kontrol grubu %100 kabul edilerek, diğer gruplardakiler kontrole göre % olarak hesaplandı. One way ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.7. Apoptoz Testi

ApoTox-Glo™ Tripleks Testi, tek bir test kuyusu içinde canlılığı, sitotoksiteyi ve kaspaz aktivasyon olaylarını değerlendirmeye yarayan üç analizin birleşimidir. Testin ilk kısmı aynı anda iki proteaz aktivitesini ölçer ve bunlardan biri hücre canlılığının belirteci, diğeri ise sitotoksitenin bir belirtecidir. Testin ikinci kısmında ise kaspaz aktivitesi ölçülür, substrat olarak tetrapeptid dizisi DEVD içeren bir lüminojenik kaspaz-3/7 substratı Caspase-Glo® Analiz Teknolojisi kullanır. Caspase-Glo® 3/7 Reaktifi hücre lizisine neden olur, substratın kaspaz tarafından yıkılması ve hidrolizi sonucunda lusiferaz tarafından üretilen "ışılmalı tipi" lüminesans sinyal üretilir. Lüminesans mevcut kaspaz aktivitesi ile orantılıdır.

- Hücre sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyulu plakanın her kuyusuna 5000 hücre/100 µl besiyeri olacak şekilde hücre ekildi.
- 37 °C ve % 5 CO₂'li inkübatöre bırakıldı ve 1 gün inkübe edildikten sonra plaklardaki besiyeri uzaklaştırıldı.
- Bir grup konsantrasyonu 8 nM BPA, 160 nM ICI ve ICI'nın BPA ile kombinasyonu (BPA+ICI) plaklara ilave edildi ve son hacim 100 µl olacak şekilde fenol kırmızı içermeyen DMEM eklendi.
- Diğer gruba da konsantrasyonu 50µM olan nekrostatin-1 (Nec) ilave edildi. Kontrol+ Nec (50µM), BPA (8nM)+ Nec (50µM), ICI (160 nM)+ Nec (50µM) ve BPA (8nM)+ ICI (160 nM)+ Nec (50µM) kombinasyonu plaklara ilave edildi.
- Kontrol grubuna fenol kırmızı içermeyen DMEM eklendi. 24 saat inkübasyona bırakıldı.

- -20°C’de saklanan ApoTox-Glo™ Tripleks Testi çıkarılarak çözülmesi sağlandı. ApoTox-Glo™ Tripleks Test protokolü hücrelere uygulandı. Kit içerisinde; Assay Buffer, GF-AFC Substrat, bis-AAF-R110 Substrat, Caspase-Glo® 3/7 Buffer ve Caspase-Glo® 3/7 Substrat bulunur.
- Caspase-Glo® 3/7 reaktifi hazırlanması: Caspase-Glo® 3/7 Buffer içerisine Caspase-Glo® 3/7 Substrat ilave edildi.
- 96 kuyucuklu plak için, bir ependorf tüpüne 2 ml Assay Buffer ve 10 µl her substrattan ilave edildi ve vorteks yapıldı.
- Kimyasal uygulamasından sonra 24 saat inkübe edilen hücrelere 20 µl canlılık / sitotoksosite reaktifi eklendi ve 1 saat 37°C de inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra plakadaki hücrelere 100 µl Caspase-Glo® 3/7 reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat inkübe edildi.
- Lüminesans ölçen mikropalak okuyucuda apoptoz için absorbans ölçümü yapıldı. Veriler GraphPad 7.0 programı ile analiz edildi.

3.8. İstatistiksel Değerlendirilme

Elde edilen veriler GraphPad Prism 7.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm çalışmalar en az 3 kere tekrar edildi. Gruplar arasındaki farklılıklar One way ANOVA testi veya non-parametrik t test ile değerlendirildi. İstatistiksel fark ortalama ve ortalamanın standart hatası (mean±SEM) olarak verildi. p değerleri olarak $p > 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını ifade ederken, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ ifadeleri de istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

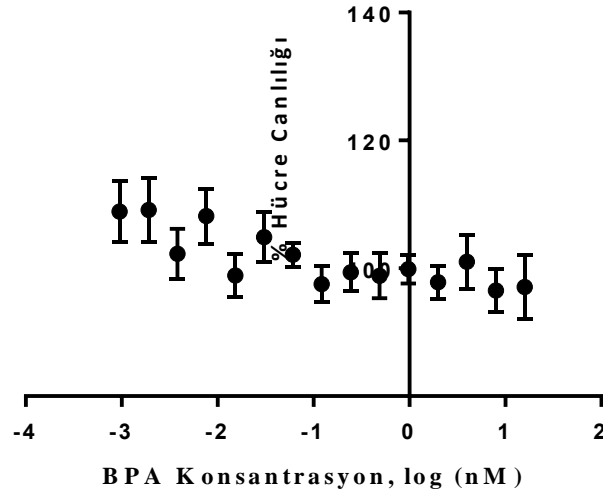
4. BULGULAR

4.1. BPA ve Fulvestrant'ın Hücre Canlılık Etkisi

MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid) yöntemiyle HepG2 insan hepatoma hücrelerinin hücre canlılığı izlenildi. Hücreler çoğaltıldı, 96 kuyucuklu plakalara 5000 hücre ekildikten 24 saat sonra BPA uygulaması (1- 16000 nM) yapıldı. 48 saatlik uygulama sonrasında yapılan MTT testi sonucuna göre canlı hücre düzeyi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 7.0 programı kullanılarak veriler elde edildi ve veriler Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. 1-16000 nM aralığında artan konsantrasyonlarda uygulanan BPA'nın HepG2 hücrelerinde yüzde canlılık verileri ($p>0,05$).

Uygulanan BPA Derişimi (nM)	Hücre Canlılığı (%)
0	100
1	108,868 ±4,79
2	109,121±5,07
4	102,271±3,91
8	108,194±4,32
16	103,851±3,39
32	104,877±3,90
64	102,117±1,89
125	97,532±2,80
250	99,369±2,94
500	98,835±3,53
1000	99,861±2,25
2000	97,836±2,59
4000	101,032±4,19
8000	96,507±3,42
16000	97,078±5,02



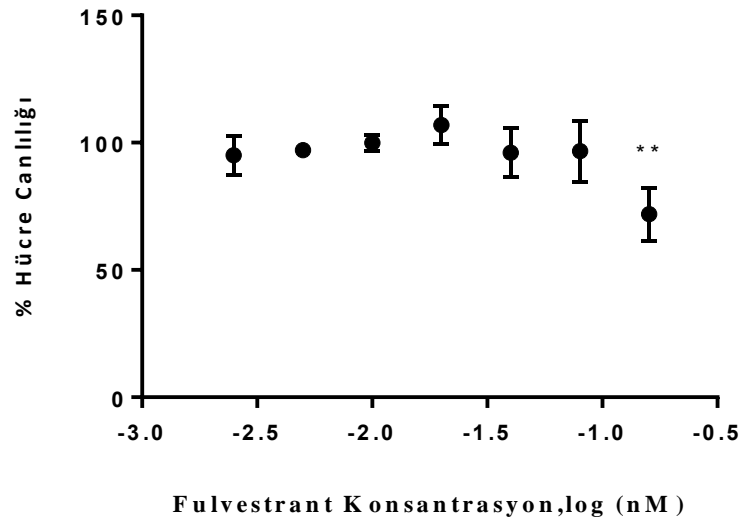
Şekil 4.1. 1-16000 nM aralığında artan konsantrasyonlarda uygulanan BPA'nın HepG2 hücrelerinde yüzde canlılık grafiği ($p>0,05$).

Artan konsantrasyonlarda BPA uygulanmış HepG2 hücrelerinde yapılan MTT hücre canlılık testinin yüzde hücre canlılık verilerine bakıldığında, hücre canlılık yüzdesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Fakat Tablo 4.1 verilerden elde edilen sonuçlara göre canlılık yüzdesi değerlerindeki artışın 8nM, 4nM, 2nM ve 1nM BPA uygulaması ile olduğu görülmektedir. Çalışma için uygun doz olarak 8 nM BPA uygulaması belirlenmiştir.

Fulvestrant, 17β -östradiolün 7α -alkilsülfinil analogudur. Fulvestrant, seçici östrojen reseptörü downregülatörüdür (SERD) ve tamoksifen veya aromataz inhibitör terapilerinin aksine hormona duyarlı meme kanserlerine karşı oldukça etkili bir antagonisttir. Hücre canlılığı çalışması için fulvestrant doz miktarları 2,5-160 nM aralığında seçildi (112, 142-144). Çoğaltılan ve 96 kuyucuklu plakalara ekilen HepG2 hücrelerine belirli konsantrasyonlarda fulvestrant (ICI) uygulandı. 48 saatlik uygulama sonrasında yapılan MTT testi sonucuna göre canlı hücre miktarı hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Graph Pad Prism 7.0 programı kullanılarak grafik olarak çizildi. Canlılık yüzdeleri hesaplandı, değerlendirilen verileri Tablo 4.2'de ve veriler sonucu elde edilen grafik ise Şekil 4.2'de sunulmuştur.

Tablo 4.2. Artan konsantrasyonlarda Fulvestrant (2,5-160 nM) uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde canlılık verileri (**p<0,01).

Uygulanan Fulvestrant Derişimi (nM)	% Hücre Canlılığı
0	100
2,5	95,025±3,86
5	97,048±1,21
10	99,979±1,57
20	106,978±3,82
40	96,091±5,60
80	96,642±6,93
160	71,924±5,98**



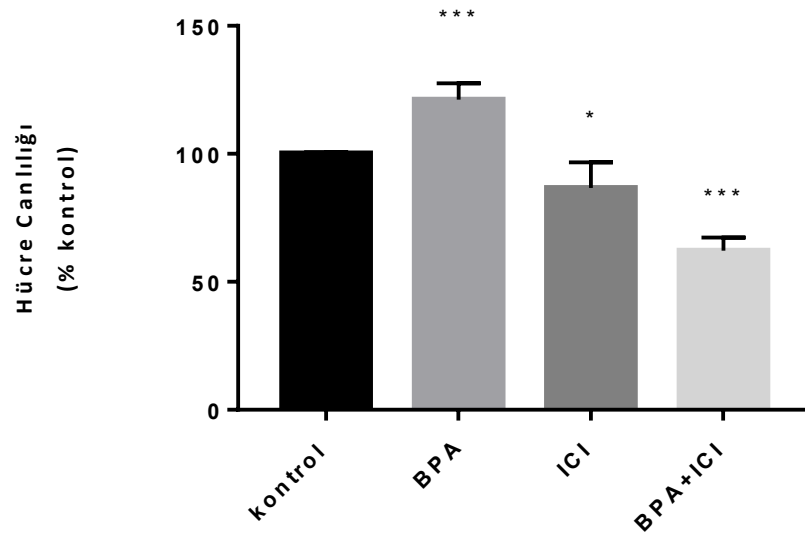
Şekil 4.2. Artan konsantrasyonlarda fulvestrant (2,5-160 nM) uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde canlılık grafiği (**p<0,01).

Artan konsantrasyonlarda Fulvestrant uygulanmış HepG2 hücrelerinde yapılan MTT hücre canlılık testinin yüzde canlılık verilerine bakıldığında, hücre canlılık yüzdesinde kontrol grubuna göre 160 nM Fulvestrant uygulamasının hücre canlılık yüzdesini istatistiksel olarak anlamlı bir derecede azalttığı belirlenmiştir (**p<0,01). Çalışma için uygun ICI dozu 160 nM konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

Karaciğer HepG2 hücrelerinde, konsantrasyonları belirlenen BPA, ICI ve BPA+ICI (1:20 oranında) kombinasyonunun hücre canlılığına etkileri MTT yöntemiyle izlendi. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 7.0 programında non-parametrik t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi ve sonuçlar Şekil.4.3’de ve Tablo 4.3’te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde canlılık değerleri (*p<0,05,***p<0,001).

Uygulanan kimyasallar	% Hücre Canlılığı
BPA(8 nM)	121,153±2,84***
ICI (160 nM)	86,783±4,47*
BPA(8 nM)+ ICI (160 nM)	62,196±2,27***



Şekil 4.3. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde canlılık grafiği (* p < 0,05; *** p < 0,001).

8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yapılan MTT hücre canlılık deneyinin yüzde canlılık verileri incelendiğinde, canlılık yüzdesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. 8 nM BPA uygulamasının hücre canlılık yüzdesini

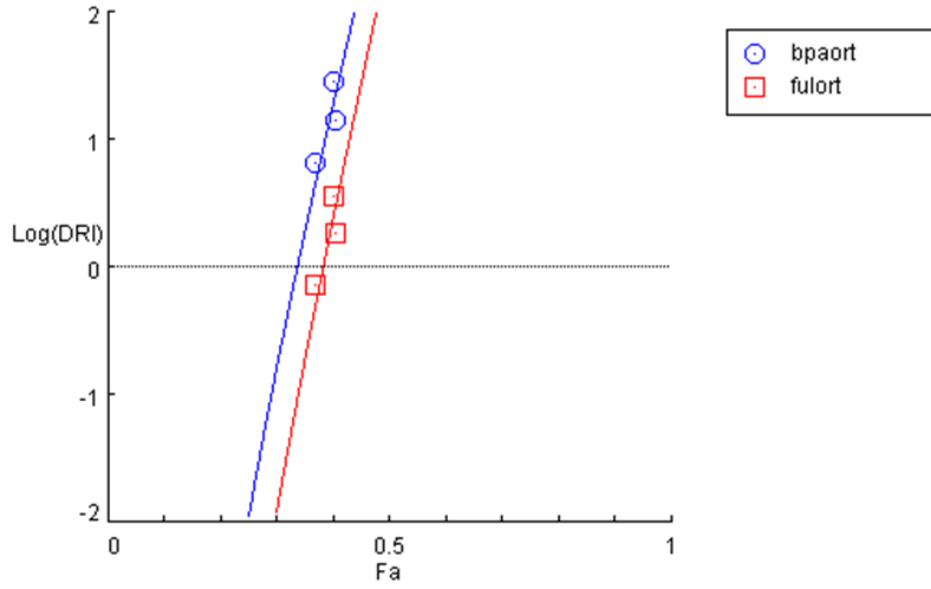
istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir (**p<0,001). Fulvestrant (160 nM) ve BPA+ICI birleşiminde hücre canlılığında kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa neden olduğu görülmüştür (ICI için p değeri *p<0,05, BPA+ICI için p değeri **p<0,001).

4.2. Bisfenol A ve Fulvestrant Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

BPA ve ICI kombinasyonu HepG2 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Talalay-Chou metoduna göre değerlendirilmiştir (145). Kombinasyon indeksi (CI) ve doz azalım indeksi (DRI) değerlerini hesaplamak için MTT deneyinden elde edilen hücre canlılığı sonuçları CompuSyn software kullanılarak analiz edilmiştir ve veriler Tablo 4.4 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. BPA ve ICI kombinasyonuna ait CI değerleri 0,30 ile 0,60 arasında bulundu. Bu durum HepG2 hücre canlılığına karşı BPA ve ICI kombinasyonu sonucu gözlenen etkinin additif bir etki değil, sinerjistik bir etkileşimden kaynaklandığını göstermektedir. Ayrıca, HepG2 hücreler canlılığını azaltmak için gerekli olan BPA ve ICI'nın uygun doz azalımını sağlayan DRI değerleri >1 olarak gözlemlenmiş, bu da BPA'nın ICI'nın sitotoksik etkisini 3 kat arttırdığını göstermiştir.

Tablo 4.4. HepG2 hücrelerinde BPA ve ICI kombinasyonuna ait İnhibitor Etki (Fa), Kombinasyon İndeksi (CI) ve Doz Azalım İndeksi (DRI) değerleri.

Toplam Doz nM BPA+ICI	İnhibitör Etki (Fa)	Kombinasyon İndeksi (CI)	DRI ICI ortalaması
336,0	0,404	0,60816	1,85975
168,0	0,402	0,30795	3,66855



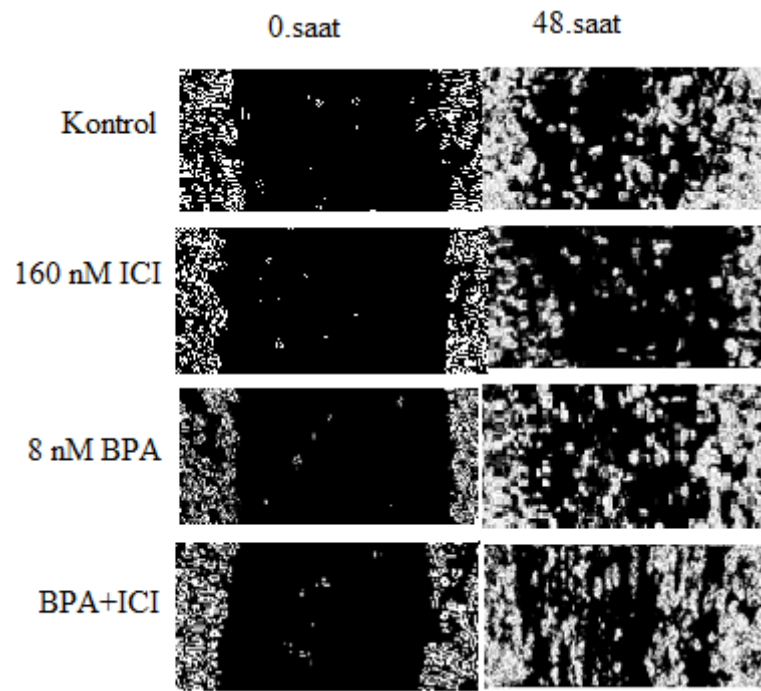
Şekil 4.4. BPA ve ICI kombinasyonu (1:20) için DRI grafiği

4.3. Yara İyileşme Yöntemiyle Hücre Migrasyon Potansiyeli

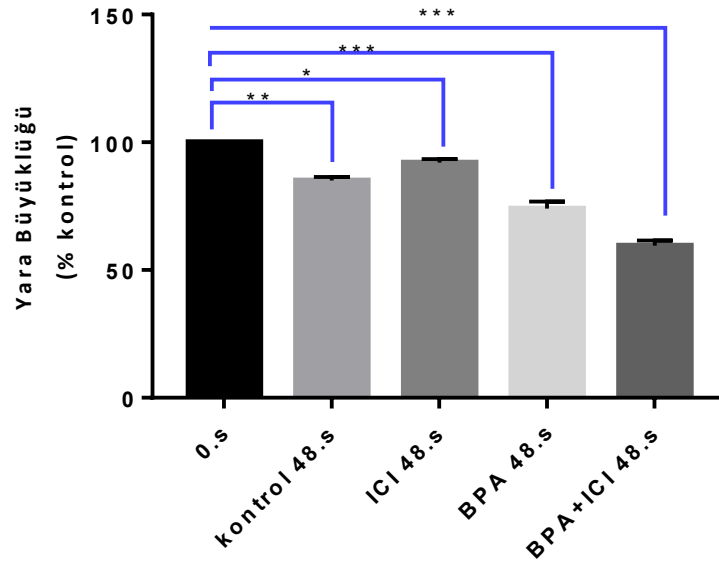
Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 3×10^5 hücre/3 ml olacak şekilde ekildi. HepG2 hücrelerine pipet ucu ile yara oluşturuldu. Daha sonra hücrelere 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA+ICI kombinasyonu verilmesinden hemen ve 48 saat sonra yara genişlikleri 10X büyütme ile mikroskopta görüntülendi. İmage J programıyla görüntüler analiz edildi (Şekil 4.5). Yara büyüklüğü oranlarını hesaplamak için her örneğin 0. saatteki uygulaması kontrol olarak kabul edildi. Her örnek kendi kontrolleri ile karşılaştırılarak hesaplandı (Şekil 4.6). Yara oluşturulmuş HepG2 hücrelerinde, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasından hemen ve 48 saat sonra İmage J programıyla analiz edilen yara büyüklüğünün alanı Tablo 4.5 sunulmuştur.

Tablo 4.5. Yara oluşturulmuş HepG2 hücrelerinde, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasından hemen ve 48 saat sonra yüzde yara büyüklüğü değeri (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).

Uygulanan kimyasallar	0.saat % Yara Alanı	48.saat % Yara Alanı
Kontrol (DMSO)	100	85±1,1**
160 nM ICI	100	92±1,0*
8 nM BPA	100	74±2,3***
BPA (8nM)+ICI (160 nM)	100	59,5±1,5***



Şekil 4.5. Yara oluşturulmuş HepG2 hücrelerinde, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) + ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasından hemen ve 48 saat sonra yara büyüklüğü İmage J programıyla analiz görüntüleri.

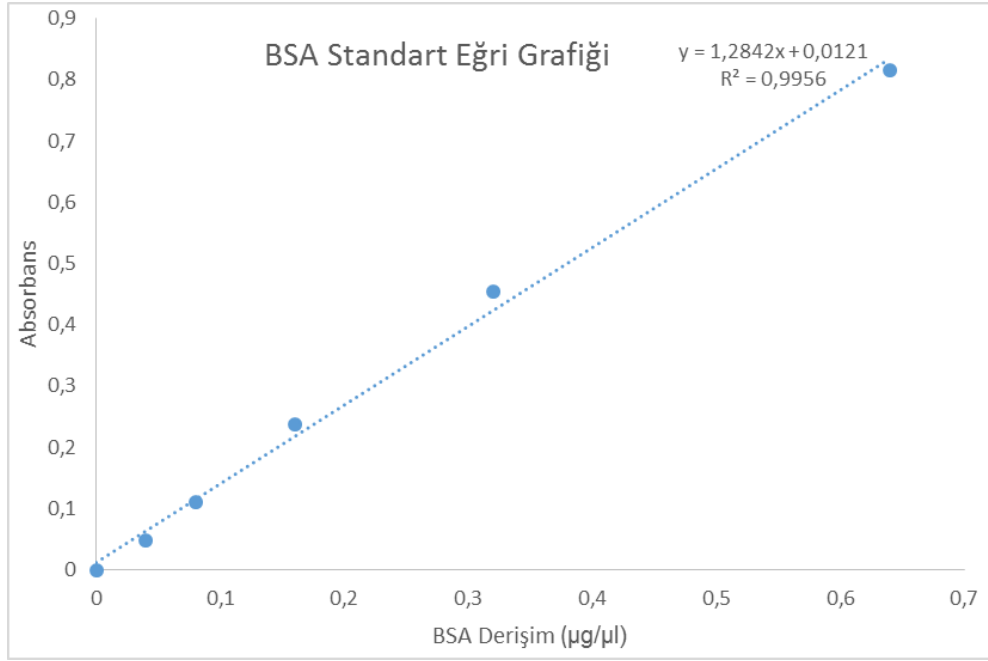


Şekil 4.6. Yara oluşturulmuş HepG2 hücrelerinde, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasından hemen ve 48 saat sonra yara büyüklüğü grafiği (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Şekil 4.6'daki yara büyüklüğü sonuçlarına göre, kontrole kıyasla 48. saatteki yara büyüklüğünün 160 nM ICI, 8 nM BPA ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.4. Bikinkoninik (BCA) Asit Yöntemiyle Protein Miktarının Belirlenmesi

6 kuyucuklu plakalara 3×10^5 hücre ekildi ve HepG2 hücreleri çoğaltıldıktan sonra 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA+ICI (168nM) uygulamaları yapılmıştır. 48 saat uygulama sonucunda HepG2 hücrelerine Hücre lizis tamponu eklenerek inkübe edilmiştir. *BCA Protein Quantification Kit* kullanılarak hücre lizat ve besiyerlerin proteinleri tayin edilmiştir. BCA tayini için 1 mg/ml konsantrasyonundaki stok BSA ile hazırlanan farklı konsantrasyonlara sahip BSA solüsyonlarıyla elde edilen standart eğri grafiği Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Protein tayininde standart eğri grafiği

Standart eğri grafiğindeki denkleme göre protein miktarı hesaplanmıştır ve Tablo 4.6'da gösterilmiştir. M:Besiyeri, CL: hücre lizat, B:Bisfenol A, I: ICI 182 780 (steroidal östrojen antagonisti), K: Kontrol.

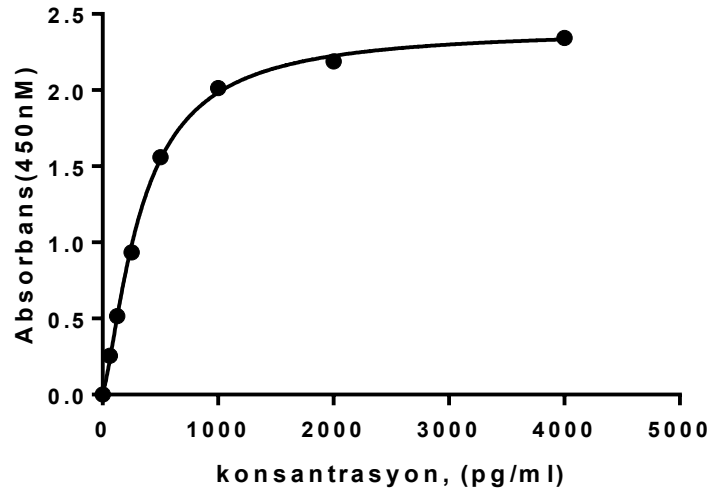
Tablo 4.6. HepG2 hücrelerine uygulanan kimyasallardan sonra hesaplanan protein miktarları.

Örnek	Protein Miktarı ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
M-K1	3,25
M-K2	3,12
M-K3	2,87
M-B1	3,22
M-B2	2,96
M-ICI1	3,92
M-ICI2	3,88
M-B+I 1	3,77
M-B+I2	4,36
M-B+I3	4,09
CL-K1	6,90
CL-K2	6,92
CL-K3	6,94
CL-B1	5,70
CL-B2	5,73
CL-ICI1	6,91
CL-ICI2	7,26
CL-B+I1	6,41
CL-B+I2	6,51
CL-B+I3	8,42

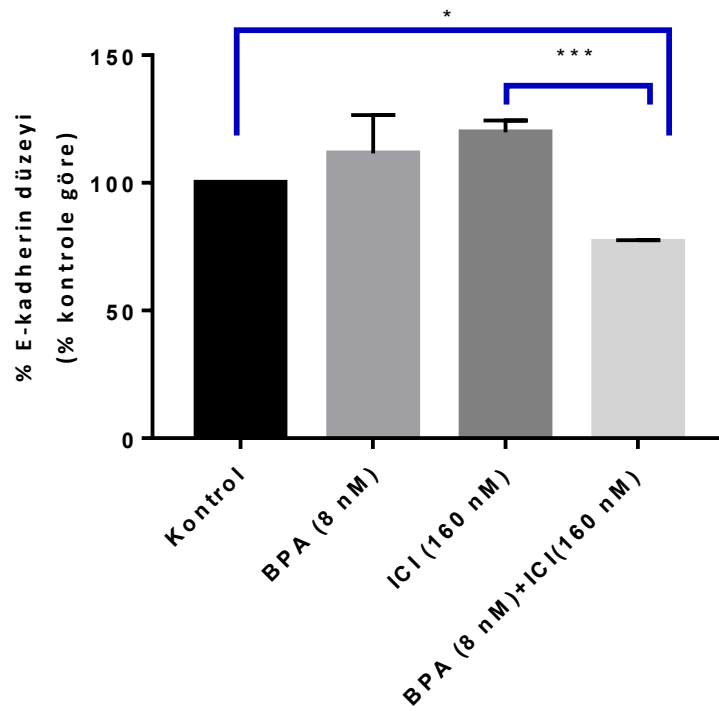
4.5. Elisa Yöntemiyle Epitelyal ve Mezenkimal Hücrelerin Biyobelirteçlerinin Belirlenmesi

Enzime bağlı immünosorban testi (ELISA), peptitler / proteinler, hormonlar, vitaminler ve ilaçlar gibi çok düşük konsantrasyon moleküllere uygun geliştirilen antikolar veya antijenlere karşı yüksek bir spesifite seviyesini gösteren kantitatif analitik yöntemlere denir. Epitelyal ve mezenkimal hücrelerin biyobelirteçleri olan E-kaderin, N-kaderin ve vimentin proteinleri belirlemek için ELISA yöntemi kullanıldı. Bikinkoninik (BCA) asit yöntemiyle protein miktarları belirlenen HepG2 hücre lizatları ELISA yönteminde kullanıldı. 450 nm de okunan örnek absorbansları GraphPad Prism 7.0 programında nonlinear regression uygulamasıyla örneklerin konsantrasyonları hesaplandı (Şekil 4.8, Şekil 4.10 ve Şekil 4.12 gösterilen

kalibrasyon eğrisine göre), protein düzeylerine göre normalize edildi. Elisa sonuçlarının belirlenmesinde kontrol grubu %100 kabul edilerek, diğer gruptakiler kontrole göre % olarak hesaplandı. One way ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirilip Şekil 4.9, Şekil 4.11 ve Şekil 4.13'te gösterilmiştir. E-kaderin proteinin standart eğrisi Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. E-kaderin proteinin standart eğrisi ($R^2=0,99$)



Şekil 4.9. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde E-kadherin düzeyi (% kontrole göre) grafiği (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Tablo 4.7. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde E-kadherin protein miktarı (* $p < 0,05$).

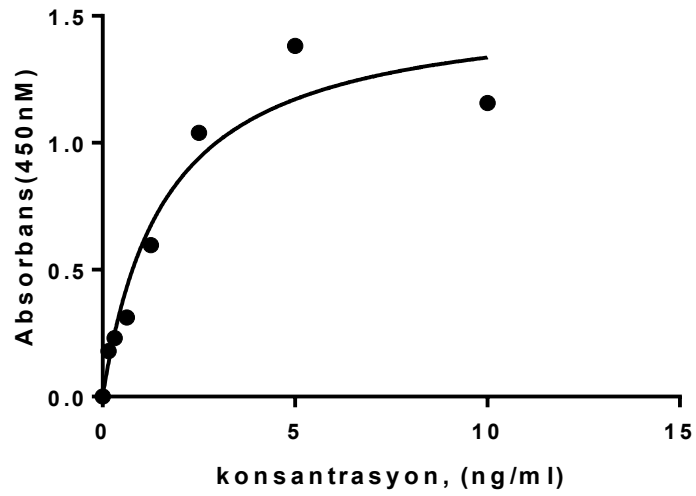
E-Kadherin protein miktarı ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	
Kontrol	6,94 \pm 1,23
BPA (8 nM)	7,69 \pm 7,50
ICI (160 nM)	8,27 \pm 2,63
BPA (8 nM)+ICI(160 nM)	5,30 \pm 0,42*

8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yapılan ELISA testinin yüzde E-kadherin düzeyi verileri incelendiğinde, 8 nM BPA ve 160 nM ICI uygulamasının kontrol grubuna göre E-kadherin düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Fakat BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasının kontrol grubuna göre E-kadherin düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir (* $p < 0,05$). BPA

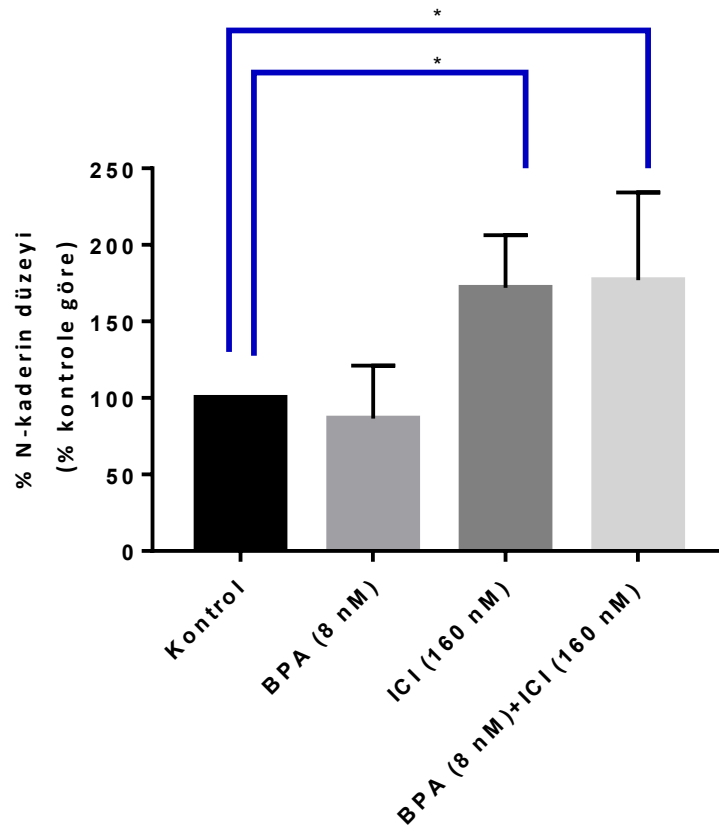
(8nM)+ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasının ICI grubuna kıyasla E-kaderin düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı görülmektedir (**p<0,001).

4.5.1. N-Kaderin Protein Seviyesi

N-kaderin proteinin standart eğrisi Şekil 4.10'da, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde N-kaderin düzeyi Şekil 4.12'de ve N-kaderin protein miktarı da Tablo 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. N-kaderin protein seviyesinin standart eğrisi ($R^2=0,94$)



Şekil 4.11. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) + ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde N-kaderin düzeyi(% kontrole göre) grafiği (* p < 0,05).

Tablo 4.8. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) + ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde N-kaderin protein miktarı (*p<0,05).

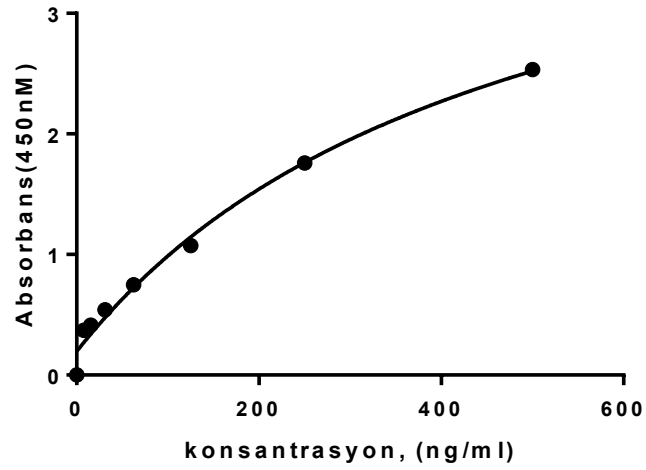
N-Kaderin protein miktarı (µg/µl)	
Kontrol	7,03±2,05
BPA (8 nM)	5,93±17,33
ICI (160 nM)	11,86±17,19*
BPA (8nM)+ICI (160 nM)	12,14±28,65*

8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yapılan ELISA testinin yüzde N-kaderin düzeyi verileri incelendiğinde, 8 nM BPA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla N-kaderin

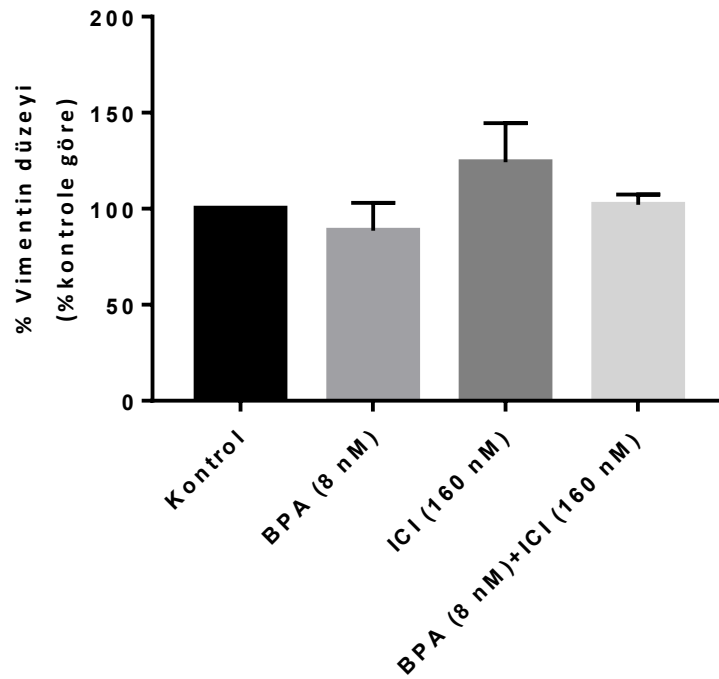
düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyon uygulamalarının kontrol grubuna göre N-kaderin düzeyini istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir (*p<0,05).

4.5.2. Vimentin Protein Seviyesi

Vimentin proteinin standart eğrisi Şekil 4.12’de, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde Vimentin düzeyi Şekil 4.13’te ve vimentin protein miktarı da Tablo 4.9’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Vimentin protein seviyesinin standart eğrisi ($R^2=0,98$)



Şekil 4.13. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde Vimentin düzeyi (% kontrole göre) grafiği ($p > 0,05$).

Tablo 4.9. 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde vimentin protein miktarı ($p > 0,05$).

Vimentin protein miktarı ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	
Kontrol	7,56±1,62
BPA (8nM)	6,07±7,23
ICI (160 nM)	8,55±11,03
BPA (8nM)+ICI (160 nM)	7,03±3,08

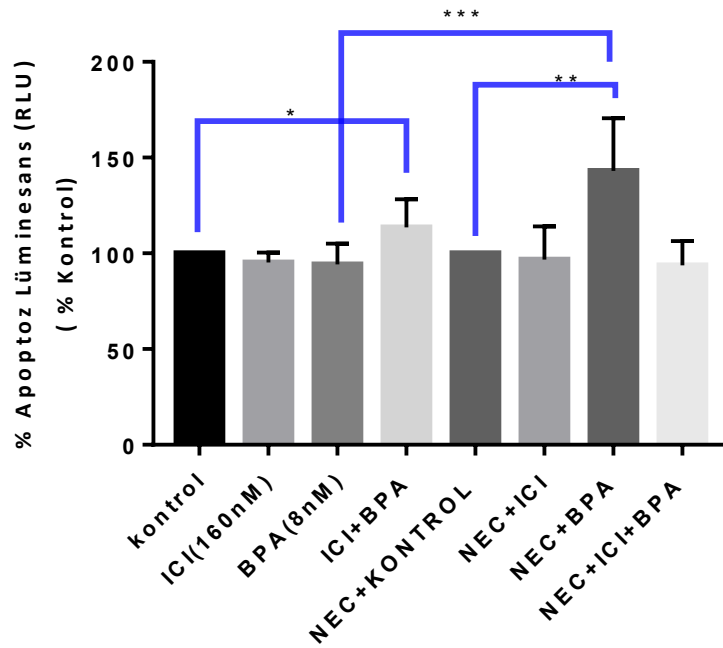
8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yapılan ELISA testinin yüzde vimentin düzeyi verileri incelendiğinde, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyon uygulamalarının kontrol grubuna göre Vimentin düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterilmiştir ($p > 0,05$).

4.6. HepG2 Hücrelerinde Apoptozun Belirlenmesi

ApoTox-Glo™ Tripleks Testi, tek bir test kuyusu içinde canlılığı, sitotoksiteyi ve kaspaz aktivasyon olaylarını değerlendirmeye yarayan üç analizin birleşimidir. 6 kuyucuklu plakalara 3×10^5 hücre ekildi ve HepG2 hücreleri çoğaltıldıktan sonra 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyon uygulamaları ve ikinci grup olarak bu kimyasallara ilaveten 50 μ M Nekrostatin 1 (NEC) uygulaması yapılmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir kimyasal uygulaması yapılmamıştır. 24 saat uygulama sonrasında ApoTox-Glo™ Tripleks testiyle HepG2 hücrelerinde apoptoz lüminesans değeri belirlenmiştir. Değerlendirilen veriler Tablo 4.10'da ve veriler sonucu elde edilen grafik ise Şekil 4.14'te sunulmuştur.

Tablo 4.9. 8 nM BPA, 160 nM ICI, BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu ve bu kimyasallara ilaveten 50 μ M NEC uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde apoptoz lüminesans verileri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Uygulanan Kimyasallar	% Apoptoz lüminesans
Kontrol	100
160 nM ICI	95,177 \pm 2,31
8 nM BPA	94,308 \pm 4,82
BPA (8nM)+ICI (160 nM)	113,62 \pm 6,53*
50 μ M NEC+Kontrol	100
50 μ M NEC+160 nM ICI	96,75 \pm 7,04
50 μ M NEC+8 nM BPA	143,08 \pm 13,77**
50 μ M NEC+160 nM ICI+8 nM BPA	93,811 \pm 6,28



Şekil 4.14. 8 nM BPA, 160 nM ICI, BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu ve bu kimyasallara ilaveten 50 µM NEC uygulanmış HepG2 hücrelerinde yüzde apoptoz lüminesans (% kontrole göre) grafiği (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu ve NEC+ICI, NEC+BPA ve NEC+ICI+BPA kombinasyonları uygulanmış HepG2 hücrelerinde yapılan ApoTox Tripleks testinin apoptoz lüminesans verileri incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı bir derecede arttığı görülmüştür (*p<0,05). Ayrıca 50 µM NEC+Kontrol grubuna göre 50 µM NEC+8 nM BPA uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmektedir (**p<0,01). 50 µM NEC+8 nM BPA kombinasyonun 8 nM BPA göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (***p<0,001). Kontrole göre 8 nM BPA uygulamasıyla apoptoz değişmezken, nekroptozu inhibe eden Nekrostatin 1 (NEC) ilave edilince apoptozun arttığı gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Kanser hücreleri, vücudun diğer bölgelerine invazyon ve metastaz yapma potansiyeline sahiptirler ve hücre döngüsü bileşenlerinin düzensizliğine bağlı olarak aktif hücre bölünmesi ile anormal bir şekilde çoğalırlar (146). HCC, karaciğer kanseri vakalarının yaklaşık % 80'inin üzerinde görülür. Karaciğer, ksenobiyotik metabolizma ve detoksifikasyon süreçlerinde yer alan önemli bir organdır. HepG2 insan hepatoma hücreleri, yüksek proliferasyon oranlarına ve birçok farklı karaciğer fonksiyonlarını yerine getiren epitel benzeri bir morfolojiye sahip tumorjenik olmayan hücrelerdir (15). BPA'nın biyotransformasyonu sağlayan başlıca organ karaciğerdir. Yüksek nanomolar konsantrasyonlarda BPA, östrojenik aktivitenin yanı sıra karaciğer ve böbrek toksisitesi gösterdiği açıklanmıştır (147).

Endokrin bozucu kimyasallar (EDC) adı verilen çevresel kirleticiler ve ticari ürünler, endojen hormonların işlevlerini taklit edebilirler veya bunlara müdahale edebilirler. Bu müdahale hormon işlevini değiştirebilir veya engelleyebilir. En çok bilinen EDC ise bisfenol A'dır.

Bisfenol A polikarbonat plastiklerin ve epoksi reçinelerinin üretiminde kullanılan bir kimyasaldır. BPA bazlı polimerlerde ester bağları hidrolize maruz kaldığı için, serbest BPA'nın gıda, içecek ve çevreye salınmasına neden olur. Bu nedenle gıda tüketimi ve çevresel alımlar yoluyla insan vücudunda birikir. BPA'nın nanomolar konsantrasyonlarda dünyanın her yerinden toplanan serum, süt, tükürük, idrar gibi insan dokularında tespit edilebileceğini ortaya koymuştur (148).

BPA, klasik nükleer östrojen reseptörleri yoluyla östrojenik etkiler uygular ve seçici bir östrojen reseptör modülatörü görevi görür. BPA'nın östrojenik aktivitesi östradiol aktivesi kadar olmamakla birlikte karşılaştırılabilir düzeydedir. Yapılan in vivo çalışmada düşük dozda BPA'nın istenmeyen sonuçlara neden olduğu gösterilmiştir. BPA, 1pM ve 1nM arasındaki konsantrasyonlarda bazı hücre fonksiyonlarında değişikliklere neden olurken hamile kadın, fetal ile yetişkin kanında ve diğer dokularda yapılan ölçümler sonucunda ortalama ve konjuge olmayan BPA aralığının bu seviyeleri aştığı gösterilmiştir (149). Yetişkin erkek fare yavrularına 2 µg/kg/gün veya 20 µg/kg/gün BPA uygulanmıştır, prostat boyutunun ve ağırlığının arttığı, 20µg/kg/gün BPA'ya maruz kalma da ise sperm üretim etkinliğinin %20 oranında azaldığı görülmüştür (150). Düşük doz BPA aynı zamanda beynin

nörokimyasını ve yapısını, saldırganlık, hiperaktivite ve öğrenme kusurları gibi davranış değişikliklerine ve kansere yol açar. Bu düşük dozlu etkilerin reseptör aracılı yanıtlarla ilişkili olduğu varsayılır, ancak kesin moleküler mekanizmalar bilinmemektedir.

Fulvestrant (ICI), ER downregüle eden ve ER antagonisti olan yeni bir antiöstrojen türüdür. Fulvestrant ER'ye bağlanarak ER dimerizasyonunu azaltır ve ER'ye bağımlı progesteron reseptörü (PgR) ekspresyonundaki azalma ile birlikte ER proteinin hızlı bir şekilde bozulmasına ve kaybına yol açar (151).

Tez çalışmasının ilk aşamasında BPA'nın ve Fulvestrant'ın HepG2 insan hepatoma hücrelerindeki hücre canlılığını anlayabilmek için 1 nM - 16 µM aralığında artan dozlarda BPA uygulanmasıyla ve 2,5 nM – 160 nM aralığında artan dozlarda ICI uygulanmasıyla hücre canlılık deneyleri yapılmıştır.

Artan dozlarda BPA (1 nM- 16 µM) uygulanan HepG2 hepatoma hücrelerde 48 saat uygulamadan sonra yüzde hücre canlılığının, kontrol grubuna kıyaslandığında 8 nM, 4 nM, 2 nM ve 1 nM derişimlerdeki BPA uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür fakat kullanılan diğer konsantrasyonlardaki BPA uygulamalarına göre hücre canlılığı daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarımızda 8 nM BPA uygulamasının kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde % 121'e arttığı belirlenmiştir. Deneylerde kullanılan BPA dozu 8 nM konsantrasyon olarak seçilmiştir. BPA'nın hepatositler üzerindeki etkilerini incelendiğinde düşük dozda BPA maruziyetinin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığını arttırdığı görülmüştür (152). Yapılan bir in vitro çalışmasına göre düşük doz BPA'nın meme hücrelerinin proliferasyonunu etkilediği açıklanmıştır (153). Bu sonuçlara göre BPA, kanser hücrelerinin büyümesine ve çoğalmasında etkili olabilir.

Artan dozlarda ICI (2,5 nM- 160 nM) uygulanan HepG2 hepatoma hücrelerde 48 saat uygulamadan sonra yüzde hücre canlılığının, kontrol grubuna kıyaslandığında 160 nM ICI uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı şekilde % 71,9'a kadar düşürdüğü belirlenmiştir ($p < 0,01$). Deneylerde kullanılan ICI dozu 160 nM konsantrasyon olarak seçilmiştir. Yapılan bir in vitro çalışmada, 0,04-625 nM aralığında artan dozda fulvestrant uygulanmış HepG2 hücrelerinde, fulvestrantın ER α ve Wnt sinyal yolları aracılığıyla hücre proliferasyonunu inhibe ettiği açıklanmıştır (154).

8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yapılan MTT hücre canlılık deneyine göre 8 nM BPA'nın yüzde canlılık değeri %121,5'e istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artarken ($p<0,001$), 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyon değerleri sırasıyla % 86,7'e ve % 62,1'e istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,001$).

Talalay-Chou metoduyla, BPA ve ICI kombinasyonu HepG2 hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. MTT deneyinden elde edilen hücre canlılığı sonuçları CompuSyn yazılımı kullanılarak kombinasyon indeksi (CI) ve doz azalım indeksi (DRI) değerleri hesaplanmıştır. BPA+ ICI kombinasyonuna (1:20) ait CI değerleri 0,30 ile 0,60 arasında bulunmuştur. Bu durum HepG2 hücre canlılığına karşı gözlenen etkinin additif bir etki değil, sinerjistik bir etkileşimden kaynaklandığını göstermektedir. Ayrıca DRI >1 olarak gözlemlenmiş, bu da BPA'nın Fulvestrant'ın sitotoksik etkisini arttırdığını göstermiştir.

Yara oluşturulmuş HepG2 hücrelerinde, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyonu uygulamasından 48 saat sonraki yüzde yara alanı kontrole kıyasla, 8 nM BPA ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasıyla hücre göçünde artma gözlenmiştir. 8 nM BPA uygulamasının 48.saatteki kontrole kıyasla yüzde yara alanını istatistiksel olarak anlamlı şekilde % 10 azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$). BPA (8nM) +ICI (160 nM) kombinasyonun ise 48.saatteki kontrole kıyasla yüzde yara alanını %30 azaldığı belirlenmiştir ($p<0,01$). BPA uygulamasının kanser hücrelerinde çeşitli faktörler etkisiyle migrasyon ve invazyonu uyardığı açıklanmıştır. Bu faktörler ise E-kaderin gibi epitelyal hücre bağlantılı proteinlerinin kaybı (123) ile N-kaderin ve vimentin gibi mezenkimal biyobelirteçlerin artmasıdır (155) . Elde ettiğimiz verilere dayanarak HepG2 hücrelerinde BPA, fulvestrant, BPA ve fulvestrant kombinasyonunun hücre proliferasyonunda ve migrasyonunda etkili olduğu görülmüştür.

Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, kaspaz aktivasyonu ile başlatıcı ve ölüme götürücü özelliğe sahiptir. Aktif kaspaz-3, kaspaz-7'nin aktivasyonu programlanmış hücre ölümünü indükler (156). Diğer bir programlanmış hücre ölümü olan nekroptoz ise kaspaz bağımlı değildir ve nekrostatin-1 ile inhibe edilmektedir (157). Çalışmanın ikinci aşamasında ise, ApoTox-Glo™ Tripleks testiyle 8 nM BPA,

160 nM ICI ve BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyon uygulamaları ve ikinci grup olarak bu kimyasallara ilaveten 50 μ M Nekrostatin 1 (NEC) uygulanmış HepG2 hücrelerinde apoptoz belirlenmiştir.

Apoptoz lüminesans verileri incelendiğinde, yüzde apoptoz oranı kontrol grubuna kıyasla BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde %113'e kadar arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Bu veriler sonucunda HepG2 hepatoma hücrelerine uygulanan kimyasallardan sadece BPA+ICI kombinasyon uygulaması apoptozun artmasına neden olmaktadır. SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattına uygulanan nanomolar dozda BPA'nın nekroptozu aktive ettiği in vitro çalışmayla gösterilmiştir (158). OVCAR-3 over kanser hücre hattında yapılan bir çalışmada, doza bağlı BPA'nın hücre proliferasyonunu arttırdığı ve kaspaz-3 aktivitesini azalttığı açıklanmıştır (128).

Ayrıca 50 μ M nekrostatin ilave edilen kontrol grubuna göre kıyaslandığında 50 μ M NEC+8 nM BPA uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı şekilde %139'a kadar arttığı görülmektedir ($p<0,01$). 50 μ M NEC+8 nM BPA kombinasyonun 8 nM BPA göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmektedir ($p<0,001$). Kontrole göre kıyaslandığında 8 nM BPA uygulamasıyla apoptoz değişmezken, nekroptozu inhibe eden Nekrostatin 1 (NEC) ilave edilince apoptozun arttığı gözlemlenmiştir. Bu veriler sonucunda HepG2 hepatoma hücrelerine uygulanan kimyasallardan sadece BPA uygulamasının nekroptozu etkilediği ve NEC ilavesiyle nekroptoz inhibe olarak apoptozun artmasına neden olduğu görülmektedir.

Tez çalışmasının üçüncü aşamasında ise 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8 nM) + ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde yapılan ELISA testinin yüzde E-kaderin, N-kaderin ve vimentin proteinlerin düzey verileri incelenmiştir.

E-kaderin düzeyi verileri incelendiğinde, 8 nM BPA ve 160 nM ICI uygulamasının E-kaderin düzeyinde kontrol grubuna kıyaslandığında belirgin bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Fakat BPA (8 nM) + ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasının kontrol grubuna kıyasla E-kaderin düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde % 76,8'e azalttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). BPA (8 nM) +ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasının ICI grubuna kıyasla E-kaderin düzeyini anlamlı şekilde azalttığı görülmektedir ($p<0,001$).

Yüzde N-kaderin düzeyi verileri incelendiğinde ise 160 nM ICI ve BPA (8 nM)+ICI (160 nM) kombinasyon uygulamalarının kontrol grubuna göre N-kaderin düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde sırasıyla % 172'e ve % 176,9' a kadar arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

Vimentin düzeyi verileri incelendiğinde, 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyon uygulamalarının kontrol grubuna göre Vimentin düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Hücre adezyon proteini olan E-kaderin, epitelyal hücre belirteçidir. E-kaderin fonksiyonunun kaybı epitelyal hücrelerin mezenkimal hücrelere farklılaşmasına neden olur. Bu durum mezenkimal hücre belirteçleri olan N-kaderin ve vimentin ekspresyonunu artırır (123).

Yapılan yöntemler sonucunda elde edilen bulgulara göre düşük dozda BPA'nın hücre proliferasyonu ve migrasyonu arttırdığı, ICI'nin sitotoksik etkisinin artmasına neden olduğu ve programlanmış hücre ölümü olan nekroptozu etkilediği açıklanmıştır. ICI uygulamasının ise hücre proliferasyonunu azalttığı ve hücre adezyon proteini olan N-kaderin protein düzeyini azalttığı görülmüştür. HepG2 hücre canlılığına karşı gözlenen BPA+ICI kombinasyon etkisi sinerjistik bir etkileşim göstermektedir. Ayrıca hücre proliferasyonunu azaltırken hücre migrasyonunu arttırmaktadır. BPA+ICI kombinasyonu hücre adezyon proteinlerinden E-kaderin düzeyini azaltırken N-kaderin düzeyini de arttırmıştır. Apoptoz lüminesans verileri incelendiğinde ise BPA+ICI kombinasyonda apoptozun arttığı görülmektedir. Bu sonuçlar hücre ölümünün yan etkileri nedeniyle oluşmaktadır. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), hücre-hücre adezyonu ve hücre-matriks adezyonu kaybı yoluyla kanser hücrelerinin metastazını teşvik eden fizyolojik bir süreçtir. EMT birçok morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sonucu epitel hücrelerin epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazanmaları durumudur. E-kaderin proteinin kaybı N-kaderin protein artması epitel hücrelerin mezenkimal özellik kazanmasını sağlar. Apoptoz ve EMT'nin; farklılaşma, morfogenez ve organogenez, yara iyileşmesi, doku yeniden şekillenmesi ve homeostaz gibi hastalıklarla ilişkili süreçlerde önemli roller oynadığı bilinmektedir. Apoptoz ve EMT'nin deregülasyonu, karaciğer ve böbrek fibrozu, vasküler hastalıklar, embriyoların anormal gelişimi, tümör oluşumu ve ilerlemesi gibi çeşitli patolojik süreçlerle bağlantılıdır (159).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında ICI (Fulvestrant) ve BPA kimyasalının HepG2 insan hepatoma hücrelerine uygulanarak hücrelerdeki proliferasyon, yara iyileşmesi, E-kaderin, N-kaderin, vimentin ve apoptoza (kaspaz 3/7) etkisi incelenmiştir. Elde edilen veriler aşağıda değerlendirilmiştir:

- Artan dozlarda BPA (1 nM- 16 µM) uygulanan HepG2 hepatoma hücrelerde % hücre canlılığı 8nM BPA uygulamasıyla arttığı tespit edilmiştir.
- Artan dozlarda ICI (2,5 nM- 160 nM) uygulanan HepG2 hepatoma hücrelerde % hücre canlılığı 160 nM uygulamasıyla azaldığı tespit edilmiştir.
- BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde % hücre canlılığı azaldığı belirlenmiştir.
- Talalay-Chou metoduyla, BPA ve ICI kombinasyonunun HepG2 hücre canlılığına karşı gözlenen etkinin additif bir etki değil, sinerjistik bir etkileşimden kaynaklandığı ve BPA'nın ICI'nin sitotoksik etkisini arttırdığı gösterilmiştir.
- Yara oluşturulmuş HepG2 hücrelerinde 8 nM BPA, 160 nM ICI ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmasıyla % yara büyüklüğü 8 nM BPA ve BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyon uygulamasıyla azaldığı gözlemlenmiştir.
- BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyon ve 50 µM NEC+8 nM BPA uygulanmış HepG2 hücrelerinde apoptozun arttığı belirlenmiştir.
- BPA (8nM)+ICI (160 nM) kombinasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinde, hücre adezyon proteinleri olan E-kaderin protein düzeyinin azaldığı, N-kaderin protein düzeyi arttığı tespit edilmiştir. Vimentin protein düzeyinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir.

Bu bulgular sonucunda düşük dozda BPA maruziyeti ve ICI uygulaması HepG2 hepatoma hücrelerinde hangi sinyal yollarını etkileyeceği daha iyi açıklanabilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Örneğin, hücre büyümesi, apoptoz ve hücre homeostaz gibi hücresel sistemde önemli olan Transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) sinyal yolağı ve c-Jun N-terminal kinazların (JNK) etkisi araştırılarak açıklanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34.
2. Tunissioli NM, Castanhole-Nunes MMU, Biselli-Chicote PM, Pavarino ÉC, da Silva RF, da Silva RdCMA, et al. Hepatocellular Carcinoma: a Comprehensive Review of Biomarkers, Clinical Aspects, and Therapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP.* 2017;18(4):863-72.
3. Papalou O, Kandaraki EA, Papadakis G, Diamanti-Kandarakis E. Endocrine Disrupting Chemicals: An Occult Mediator of Metabolic Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10(112).
4. Piao X, Liu Z, Li Y, Yao D, Sun L, Wang B, et al. Investigation of the effect for bisphenol A on oxidative stress in human hepatocytes and its interaction with catalase. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy.* 2019;221:117149.
5. Sartain CV, Hunt PA. An old culprit but a new story: bisphenol A and "NextGen" bisphenols. *Fertility and sterility.* 2016;106(4):820-6.
6. Howell A, Robertson JF, Abram P, Lichinitser MR, Elledge R, Bajetta E, et al. Comparison of fulvestrant versus tamoxifen for the treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women previously untreated with endocrine therapy: a multinational, double-blind, randomized trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2004;22(9):1605-13.
7. Wang CJ, Guo DK, You TG, Shen DW, Wang C, Tang L, et al. Inhibition of hepatocellular carcinoma by fulvestrant involves the estrogen receptor alpha and Wnt pathways in vitro and in patients. *Molecular medicine reports.* 2014;10(6):3125-31.
8. Clarke MA, Fisher J. Executable cancer models: successes and challenges. *Nature Reviews Cancer.* 2020.
9. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
10. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2019;69(1):7-34.
11. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2019;16(10):589-604.
12. Tang A, Hallouch O, Chernyak V, Kamaya A, Sirlin CB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis. *Abdominal radiology (New York).* 2018;43(1):13-25.
13. Singh AK, Kumar R, Pandey AK. Hepatocellular Carcinoma: Causes, Mechanism of Progression and Biomarkers. *Curr Chem Genom Transl Med.* 2018;12:9-26.

14. Dallio M, Diano N, Masarone M, Gravina AG, Patane V, Romeo M, et al. Chemical Effect of Bisphenol A on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *International journal of environmental research and public health*. 2019;16(17).
15. Donato MT, Tolosa L, Gomez-Lechon MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2015;1250:77-93.
16. Dehn PF, White CM, Conners DE, Shipkey G, Cumbo TA. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2004;40(5-6):172-82.
17. Collection ATC. Hep G2 [HEPG2] (ATCC® HB-8065™). 2016.
18. Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *British Journal of Cancer*. 2004;90(1):S2-S6.
19. Croxtall JD, McKeage K. Fulvestrant. *Drugs*. 2011;71(3):363-80.
20. Sola B, Poirot M, Medina P, Bustany S, Marsaud V, Poirot S, et al. Supplementary Material 1. 2013.
21. Pilhofer M, Jensen GJ. The bacterial cytoskeleton: more than twisted filaments. *Current opinion in cell biology*. 2013;25(1):125-33.
22. Bretscher A. Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annual review of cell biology*. 1991;7(1):337-74.
23. Blain EJ. Involvement of the cytoskeletal elements in articular cartilage homeostasis and pathology. *Int J Exp Pathol*. 2009;90(1):1-15.
24. Pan X, Hobbs RP, Coulombe PA. The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia. *Current opinion in cell biology*. 2013;25(1):47-56.
25. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003;112(4):453-65.
26. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010;463(7280):485-92.
27. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *Journal of cell science*. 2008;121(6):727-35.
28. Malek R, Wang H, Taparra K, Tran PT. Therapeutic Targeting of Epithelial Plasticity Programs: Focus on the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cells, tissues, organs*. 2017;203(2):114-27.
29. Mialhe A, Levacher G, Champelovier P, Martel V, Serres M, Knudsen K, et al. Expression of E-, P-, n-cadherins and catenins in human bladder carcinoma cell lines. *The Journal of urology*. 2000;164(3 Pt 1):826-35.
30. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology*. 2005;17(5):548-58.

31. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1429-37.
32. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*. 2019;8(10).
33. Wang ZJ, Xu CM, Song ZB, Wang M, Liu QY, Jiang P, et al. Vimentin modulates infectious porcine circovirus type 2 in PK-15 cells. *Virus research*. 2018;243:110-8.
34. Liu C-Y, Lin H-H, Tang M-J, Wang Y-K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*. 2015;6(18):15966-83.
35. Turowski P, Myles T, Hemmings BA, Fernandez A, Lamb NJ. Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55. *Mol Biol Cell*. 1999;10(6):1997-2015.
36. Hewitt S. Endocrine-Disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice. *Environ Health Perspect*. 2008;116(4):A178-A.
37. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009;30(4):293-342.
38. Acerini CL, Hughes IA. Endocrine disrupting chemicals: a new and emerging public health problem? *Arch Dis Child*. 2006;91(8):633-41.
39. La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, Goodson W, Browne P, Patisaul HB, et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(1):45-57.
40. Birnbaum LS. State of the science of endocrine disruptors. *Environ Health Perspect*. 2013;121(4):A107-A.
41. Gore AC. Endocrine-Disrupting Chemicals. *JAMA Internal Medicine*. 2016;176(11):1705-6.
42. Laura NV, Patricia AH, John Peterson M, Frederick SvS. Human exposures to bisphenol A: mismatches between data and assumptions. *Reviews on Environmental Health*. 2013;28(1):37-58.
43. Shelnutt S, Kind J, Allaben W. Bisphenol A: Update on newly developed data and how they address NTP's 2008 finding of "Some Concern". *Food and Chemical Toxicology*. 2013;57:284-95.
44. Ratajczak-Wrona W, Rusak M, Nowak K, Dabrowska M, Radziwon P, Jablonska E. Effect of bisphenol A on human neutrophils immunophenotype. *Scientific Reports*. 2020;10(1).
45. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)*. 2007;24(2):139-77.

46. Michałowicz J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014;37(2):738-58.
47. Rubin BS. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;127(1):27-34.
48. Dodds EC, Lawson W. Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature*. 1936;137(3476):996-.
49. Geens T, Goeyens L, Covaci A. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *Int J Hyg Environ Health*. 2011;214(5):339-47.
50. Inadera H. Neurological Effects of Bisphenol A and its Analogues. *Int J Med Sci*. 2015;12(12):926-36.
51. Cwiek-Ludwicka K. Bisphenol A (BPA) in food contact materials - new scientific opinion from EFSA regarding public health risk. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*. 2015;66(4):299-307.
52. Gramec Skledar D, Peterlin Mašič L. Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016;47:182-99.
53. Gramec Skledar D, Peterlin Mašič L. Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;47:182-99.
54. Qiu W, Zhan H, Hu J, Zhang T, Xu H, Wong M, et al. The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;173:192-202.
55. Wu L-H, Zhang X-M, Wang F, Gao C-J, Chen D, Palumbo JR, et al. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. *Science of The Total Environment*. 2018;615:87-98.
56. Liao C, Kannan K. Concentrations and Profiles of Bisphenol A and Other Bisphenol Analogues in Foodstuffs from the United States and Their Implications for Human Exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(19):4655-62.
57. Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng Z, Feng Y-L, Wu Y, et al. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environmental Science & Technology*. 2016;50(11):5438-53.
58. Kang JH, Asai D, Katayama Y. Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Critical reviews in toxicology*. 2007;37(7):607-25.
59. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee D-H, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*. 2012;33(3):378-455.

60. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJR, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect*. 2010;118(8):1055-70.
61. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon J-P, Goeyens L, Lecomte P, et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(10):3725-40.
62. Valentino R, D'Esposito V, Ariemma F, Cimmino I, Beguinot F, Formisano P. Bisphenol A environmental exposure and the detrimental effects on human metabolic health: is it necessary to revise the risk assessment in vulnerable population? *J Endocrinol Invest*. 2016;39(3):259-63.
63. KANG J-H, KONDO F. Determination of Bisphenol A in Milk and Dairy Products by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Food Protection*. 2003;66(8):1439-43.
64. Nam S-H, Seo Y-M, Kim M-G. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*. 2010;79(9):949-52.
65. Mercea P. Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate. *Journal of Applied Polymer Science*. 2009;112(2):579-93.
66. Kirchnawy C, Hager F, Osorio Piniella V, Jeschko M, Washuttl M, Mertl J, et al. Potential endocrine disrupting properties of toys for babies and infants. *PLoS One*. 2020;15(4):e0231171.
67. Sajiki J, Miyamoto F, Fukata H, Mori C, Yonekubo J, Hayakawa K. Bisphenol A (BPA) and its source in foods in Japanese markets. *Food additives and contaminants*. 2007;24(1):103-12.
68. Nam SH, Seo YM, Kim MG. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*. 2010;79(9):949-52.
69. Stachel B, Ehrhorn U, Heemken O-P, Lepom P, Reincke H, Sawal G, et al. Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environmental Pollution*. 2003;124(3):497-507.
70. Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, et al. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose Response*. 2015;13(3):1559325815598308-.
71. Hanaoka T, Kawamura N, Hara K, Tsugane S. Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occupational and Environmental Medicine*. 2002;59(9):625-8.
72. Loganathan SN, Kannan K. Occurrence of Bisphenol A in Indoor Dust from Two Locations in the Eastern United States and Implications for Human Exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2011;61(1):68-73.

73. Geens T, Goeyens L, Kannan K, Neels H, Covaci A. Levels of bisphenol-A in thermal paper receipts from Belgium and estimation of human exposure. *Science of The Total Environment*. 2012;435-436:30-3.
74. Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, Bernert JT, Ye X, Silva MJ, et al. Variability and Predictors of Urinary Bisphenol A Concentrations during Pregnancy. *Environ Health Perspect*. 2011;119(1):131-7.
75. Drozd K, Wysokinski D, Krupa R, Wozniak K. Bisphenol A-glycidyl methacrylate induces a broad spectrum of DNA damage in human lymphocytes. *Archives of Toxicology*. 2011;85(11):1453-61.
76. Haishima Y, Hayashi Y, Yagami T, Nakamura A. Elution of bisphenol-A from hemodialyzers consisting of polycarbonate and polysulfone resins. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001;58(2):209-15.
77. Konieczna A, Rutkowska A, Rachoń D. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2015;66:5-11.
78. vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect*. 2005;113(8):926-33.
79. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 2006;147(6 Suppl):S56-69.
80. Vandenberg LN. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose Response*. 2014;12(2):259-76.
81. EFSA Panel on Food Contact Materials E, Flavourings, Aids P. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*. 2015;13(1):3978.
82. Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect*. 2010;118(9):1196-203.
83. Iwano H, Inoue H, Nishikawa M, Fujiki J, Yokota H. Biotransformation of Bisphenol A and Its Adverse Effects on the Next Generation. 2018.
84. Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S, et al. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J*. 1999;340 (Pt 2)(Pt 2):405-9.
85. Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. *Ntp cerhr mon*. 2008(22):v, vii-ix, 1-64 passim.
86. Thayer KA, Doerge DR, Hunt D, Schurman SH, Twaddle NC, Churchwell MI, et al. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environment International*. 2015;83:107-15.

87. Kang J-H, Katayama Y, Kondo F. Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. *Toxicology*. 2006;217(2):81-90.
88. Covaci A, Hond ED, Geens T, Govarts E, Koppen G, Frederiksen H, et al. Urinary BPA measurements in children and mothers from six European member states: Overall results and determinants of exposure. *Environmental Research*. 2015;141:77-85.
89. Teeguarden JG, Twaddle NC, Churchwell MI, Doerge DR. Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens I: Bisphenol A in pregnant women. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2016;92:129-42.
90. Geron R, Woodruff TJ, Dickenson CA, Pan J, Schwartz JM, Sen S, et al. Bisphenol-A (BPA), BPA Glucuronide, and BPA Sulfate in Midgestation Umbilical Cord Serum in a Northern and Central California Population. *Environmental Science & Technology*. 2013;47(21):12477-85.
91. Hines EP, Mendola P, von Ehrenstein OS, Ye X, Calafat AM, Fenton SE. Concentrations of environmental phenols and parabens in milk, urine and serum of lactating North Carolina women. *Reproductive Toxicology*. 2015;54:120-8.
92. Almeida S, Raposo A, Almeida-González M, Carrascosa C. Bisphenol A: Food Exposure and Impact on Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018;17(6):1503-17.
93. Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. 2011;7(6):346-53.
94. Carwile JL, Michels KB. Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003–2006. *Environmental Research*. 2011;111(6):825-30.
95. Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sciences*. 2004;74(24):2931-40.
96. Jones DC, Miller GW. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochemical Pharmacology*. 2008;76(5):569-81.
97. Melzer D, Gates P, Osborne NJ, Henley WE, Cipelli R, Young A, et al. Urinary bisphenol a concentration and angiography-defined coronary artery stenosis. *PLoS One*. 2012;7(8):e43378.
98. Krieter DH, Canaud B, Lemke H-D, Rodriguez A, Morgenroth A, von Appen K, et al. Bisphenol A in Chronic Kidney Disease. *Artificial Organs*. 2013;37(3):283-90.
99. Donohue KM, Miller RL, Perzanowski MS, Just AC, Hoepner LA, Arunajadai S, et al. Prenatal and postnatal bisphenol A exposure and asthma development among inner-city children. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(3):736-42.

100. Li D, Zhou Z, Qing D, He Y, Wu T, Miao M, et al. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of Self-Reported Male Sexual Dysfunction. *Human Reproduction*. 2009;25(2):519-27.
101. Smith-Bindman R. Environmental causes of breast cancer and radiation from medical imaging: findings from the Institute of Medicine report. *Archives of internal medicine*. 2012;172(13):1023-7.
102. Johnson GE, Parry EM. Mechanistic investigations of low dose exposures to the genotoxic compounds bisphenol-A and rotenone. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2008;651(1):56-63.
103. Takahashi S, Chi X-J, Yamaguchi Y, Suzuki H, Sugaya S, Kita K, et al. Mutagenicity of bisphenol A and its suppression by interferon- α in human R5a cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2001;490(2):199-207.
104. Singh S, Li SS. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(8):10143-53.
105. Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, Mornagui B. Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment International*. 2014;64:83-90.
106. Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect*. 1993;101(5):372-7.
107. Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)*. 2007;24(2):199-224.
108. Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, et al. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Molecular and cellular endocrinology*. 1998;142(1-2):203-14.
109. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998;139(10):4252-63.
110. Dairkee SH, Luciani-Torres MG, Moore DH, Goodson WH, III. Bisphenol-A-induced inactivation of the p53 axis underlying deregulation of proliferation kinetics, and cell death in non-malignant human breast epithelial cells. *Carcinogenesis*. 2012;34(3):703-12.
111. Wang Z, Liu H, Liu S. Low-Dose Bisphenol A Exposure: A Seemingly Instigating Carcinogenic Effect on Breast Cancer. *Adv Sci (Weinh)*. 2016;4(2):1600248-.
112. Acconcia F, Pallottini V, Marino M. Molecular Mechanisms of Action of BPA. Dose Response. 2015;13(4):1559325815610582-.
113. Cooke PS, Simon L, Denslow ND. Chapter 37 - Endocrine Disruptors. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2013. p. 1123-54.

114. Dong S, Terasaka S, Kiyama R. Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2011;159(1):212-8.
115. Kang NH, Hwang KA, Lee HR, Choi DW, Choi KC. Resveratrol regulates the cell viability promoted by 17 β -estradiol or bisphenol A via down-regulation of the cross-talk between estrogen receptor α and insulin growth factor-1 receptor in BG-1 ovarian cancer cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2013;59:373-9.
116. Ptak A, Gregoraszczyk EL. Bisphenol A induces leptin receptor expression, creating more binding sites for leptin, and activates the JAK/Stat, MAPK/ERK and PI3K/Akt signalling pathways in human ovarian cancer cell. *Toxicology letters*. 2012;210(3):332-7.
117. Goodson WH, III, Luciani MG, Sayeed SA, Jaffee IM, Moore DH, II, Dairkee SH. Activation of the mTOR pathway by low levels of xenoestrogens in breast epithelial cells from high-risk women. *Carcinogenesis*. 2011;32(11):1724-33.
118. Prins GS, Hu WY, Shi GB, Hu DP, Majumdar S, Li G, et al. Bisphenol A promotes human prostate stem-progenitor cell self-renewal and increases in vivo carcinogenesis in human prostate epithelium. *Endocrinology*. 2014;155(3):805-17.
119. Zhang X-L, Wang H-S, Liu N, Ge L-C. Bisphenol A stimulates the epithelial mesenchymal transition of estrogen negative breast cancer cells via FOXA1 signals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2015;585:10-6.
120. Hwang K-A, Park M-A, Kang N-H, Yi B-R, Hyun S-H, Jeung E-B, et al. Anticancer effect of genistein on BG-1 ovarian cancer growth induced by 17 β -estradiol or bisphenol A via the suppression of the crosstalk between estrogen receptor alpha and insulin-like growth factor-1 receptor signaling pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013;272(3):637-46.
121. Kang N-H, Hwang K-A, Lee H-R, Choi D-W, Choi K-C. Resveratrol regulates the cell viability promoted by 17 β -estradiol or bisphenol A via down-regulation of the cross-talk between estrogen receptor α and insulin growth factor-1 receptor in BG-1 ovarian cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;59:373-9.
122. Ma XF, Zhang J, Shuai HL, Guan BZ, Luo X, Yan RL. IKKbeta/NF-kappaB mediated the low doses of bisphenol A induced migration of cervical cancer cells. *Arch Biochem Biophys*. 2015;573:52-8.
123. Chen Z-J, Yang X-L, Liu H, Wei W, Zhang K-S, Huang H-B, et al. Bisphenol A modulates colorectal cancer protein profile and promotes the metastasis via induction of epithelial to mesenchymal transitions. *Archives of Toxicology*. 2015;89(8):1371-81.
124. Park MA, Choi KC. Effects of 4-nonylphenol and bisphenol A on stimulation of cell growth via disruption of the transforming growth factor-beta signaling pathway in ovarian cancer models. *Chemical research in toxicology*. 2014;27(1):119-28.

125. Zhang K-S, Chen H-Q, Chen Y-S, Qiu K-F, Zheng X-B, Li G-C, et al. Bisphenol A stimulates human lung cancer cell migration via upregulation of matrix metalloproteinases by GPER/EGFR/ERK1/2 signal pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2014;68(8):1037-43.
126. Castillo Sanchez R, Gomez R, Perez Salazar E. Bisphenol A Induces Migration through a GPER-, FAK-, Src-, and ERK2-Dependent Pathway in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Chemical research in toxicology*. 2016;29(3):285-95.
127. Bujnakova Mlynarcikova A, Macho L, Fickova M. Bisphenol A alone or in combination with estradiol modulates cell cycle-and apoptosis-related proteins and genes in MCF7 cells. *Endocrine regulations*. 2013;47:189-99.
128. Ptak A, Wróbel A, Gregoraszczyk EL. Effect of bisphenol-A on the expression of selected genes involved in cell cycle and apoptosis in the OVCAR-3 cell line. *Toxicology letters*. 2011;202(1):30-5.
129. Degtarev A, Hitomi J, Germesheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature chemical biology*. 2008;4(5):313-21.
130. Gong Y, Fan Z, Luo G, Yang C, Huang Q, Fan K, et al. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Mol Cancer*. 2019;18(1):100.
131. Murata M, Kang J-H. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnology Advances*. 2018;36(1):311-27.
132. Kourouma A, Quan C, Duan P, Qi S, Yu T, Wang Y, et al. Bisphenol A Induces Apoptosis in Liver Cells through Induction of ROS. *Advances in Toxicology*. 2015;2015:901983.
133. Konieczna A, Rutkowska A, Rachoń D. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*. 2015;66(1):5-11.
134. Moon MK, Kim MJ, Jung IK, Koo YD, Ann HY, Lee KJ, et al. Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *Journal of Korean medical science*. 2012;27(6):644-52.
135. Iso T, Watanabe T, Iwamoto T, Shimamoto A, Furuichi Y. DNA Damage Caused by Bisphenol A and Estradiol through Estrogenic Activity. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006;29:206-10.
136. Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T. Exposure to Bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life sciences*. 2004;74:2931-40.
137. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Sloan CS, Castillo NP, Veselica MM, et al. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2008;104(2):362-84.
138. Nakagawa Y, Tayama S. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol*. 2000;74(2):99-105.

139. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, et al. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama*. 2008;300(11):1303-10.
140. Kovacic P. How safe is bisphenol A? Fundamentals of toxicity: Metabolism, electron transfer and oxidative stress. *Medical hypotheses*. 2010;75:1-4.
141. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671-5.
142. Choi BI, Harvey AJ, Green MP. Bisphenol A affects early bovine embryo development and metabolism that is negated by an oestrogen receptor inhibitor. *Sci Rep*. 2016;6:29318.
143. Kim JY, Choi HG, Lee HM, Lee GA, Hwang KA, Choi KC. Effects of bisphenol compounds on the growth and epithelial mesenchymal transition of MCF-7 CV human breast cancer cells. *Journal of biomedical research*. 2017;31(4):358-69.
144. Wang CJ, Guo DK, You TG, Shen DW, Wang C, Tang L, et al. Inhibition of hepatocellular carcinoma by fulvestrant involves the estrogen receptor α and Wnt pathways in vitro and in patients. *Molecular medicine reports*. 2014;10(6):3125-31.
145. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research*. 2010;70(2):440-6.
146. Champeris Tsaniras S, Kanellakis N, Symeonidou IE, Nikolopoulou P, Lygerou Z, Taraviras S. Licensing of DNA replication, cancer, pluripotency and differentiation: an interlinked world? *Seminars in cell & developmental biology*. 2014;30:174-80.
147. Authority EFS, Gundert-Remy U, Bodin J, Bosetti C, FitzGerald R, Hanberg A, et al. Bisphenol A (BPA) hazard assessment protocol. *EFSA Supporting Publications*. 2017;14(12):1354E.
148. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2012;50(10):3725-40.
149. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure. *Endocrinology*. 2006;147(6):s56-s69.
150. vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, et al. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicology and industrial health*. 1998;14(1-2):239-60.
151. Osborne C, Wakeling A, Nicholson R. Fulvestrant: An oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *British journal of cancer*. 2004;90 Suppl 1:S2-6.
152. Kim S, Mun G-i, Choi E, Kim M, Jeong JS, Kang KW, et al. Submicromolar bisphenol A induces proliferation and DNA damage in human hepatocyte cell

- lines in vitro and in juvenile rats in vivo. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;111:125-32.
153. Pfeifer D, Chung Young M, Hu Mickey CT. Effects of Low-Dose Bisphenol A on DNA Damage and Proliferation of Breast Cells: The Role of c-Myc. *Environ Health Perspect*. 2015;123(12):1271-9.
 154. Wang C-J, Guo D-K, You T-G, Shen D-W, Wang C, Tang L, et al. Inhibition of hepatocellular carcinoma by fulvestrant involves the estrogen receptor α and Wnt pathways in vitro and in patients. *Molecular medicine reports*. 2014;10(6):3125-31.
 155. Park M-A, Choi K-C. Effects of 4-nonylphenol and bisphenol A on stimulation of cell growth via disruption of the transforming growth factor- β signaling pathway in ovarian cancer models. *Chemical research in toxicology*. 2014;27(1):119-28.
 156. Cullen SP, Martin SJ. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death & Differentiation*. 2009;16(7):935-8.
 157. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*. 2012;19(1):107-20.
 158. Ayazgök B, Tüylü Küçükkılınç T. Low-dose bisphenol A induces RIPK1-mediated necroptosis in SH-SY5Y cells: Effects on TNF- α and acetylcholinesterase. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2019;33(1):e22233.
 159. Song J. EMT or apoptosis: a decision for TGF-beta. *Cell research*. 2007;17(4):289-90.