



<http://dx.doi.org/10.17776/csj.64101>

## Albino Farelerde Bisfenol A Tarafından Teşvik Edilen Genotoksositeye Karşı Yeşil Kahvenin Koruyucu Rolünün Araştırılması

Burhan İŞTAR<sup>1</sup>, Kürşad YAPAR<sup>2</sup>, Ali ACAR<sup>3\*</sup>, Emine YALÇIN<sup>1</sup>, Baran SEVEN<sup>1</sup>,

Kültiğin ÇAVUŞOĞLU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 28100 Güre Yerleşkesi, Giresun

<sup>2</sup>Giresun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji A.B.D., 28100, Giresun

<sup>3</sup>Giresun Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikleri Bölümü, 28100 Güre Yerleşkesi, Giresun

Received: 03.08.2016; Accepted: 01.09.2016

**Özet.** Bu çalışmada gıda ve içecek ambalajlama materyallerinde sıkça kullanılan kimyasal maddelerden biri olan Bisfenol A (BFA)'nın Swiss albino farelerde muhtemel fizyolojik ve genotoksik etkileri ile bu etkilere karşı yeşil kahvenin koruyucu rolü araştırılmıştır. Fizyolojik etkiler; canlı ağırlık ve karaciğer-böbrek organ ağırlıklarının ölçümü ile genotoksik etkiler ise; eritrosit ve yanak mukoza epitelyum hücrelerindeki mikronukleus (MN) sıklığının, kemik iliği hücrelerinde ise kromozomal hasar oluşumunun tespitiyle değerlendirilmiştir. Fareler her grupta altı (6) hayvan olacak şekilde toplam altı (6) gruba ayrılmış, kontrol grubundaki fareler çeşme suyu, uygulama grubundaki fareler ise yeşil kahvenin 100 mg/kg c.a ve 400 mg/kg c.a dozlarıyla ve BFA'nın 50 mg/kg c.a dozuyla beslenmişlerdir. Sonuçta BFA uygulaması canlı ağırlıklarda ve organ ağırlıklarında istatistiksel açıdan önemli bir azalmaya neden olurken, MN ve kromozomal anormallik sıklığında ise önemli bir artışa neden olmuştur. Yeşil kahve uygulaması ise BFA'nın söz konusu olumsuz etkilerini iyileştirerek, tüm parametrelerde doza bağlı bir iyileşme göstermiştir. BFA'nın belli bir doz eşliğinden sonra toksisiteye sebep olduğu, yeşil kahvenin ise bu toksisiteyi azaltmada etkili bir antioksidant ürün olduğu anlaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bisfenol A, Fizyoloji, Genotoksosite, Kromozomal Anormallikler, Mikronukleus, Yeşil Kahve.

## Investigation of Protective Role of Green Coffee Against Genotoxicity Induced by Bisphenol A in Albino Mice

**Abstract.** This study researches into the potential physiologic and genotoxic effects of Bisphenol A, which is one of the most frequent chemical substance used in food and beverage packaging materials, on Swiss Albino mice and the protective role of green coffee against these effects. The study analyzes the physiologic effects by measuring the live weight, liver and kidney weight, whilst determining the genotoxic effects by frequency of micronucleus (MN) on erythrocyte and buccal mucosal epithelium cells and determining the chromosomal damage on bone marrow cells. Mice used in this research were divided into six groups in total comprising of 6 mice in each group, while the mice in control group were fed with tap water, the mice in treatment group were fed with 100 mg/kg b.w. and 400 mg/kg b.w. doses of green coffee and 50 mg/kg b.w. dose of Bisphenol A. As a result, while application of the Paraben led to a significant statistical decrease in live and organ weights, caused to a significant increase in MN and chromosomal abnormalities frequency. Application of green coffee healed the potential negative effects of Bisphenol A and revealed an important recovery in all parameters depending on doses. It was determined that Bisphenol A induced toxicity after certain dose threshold and green coffee is an effective antioxidant in reducing the toxicity.

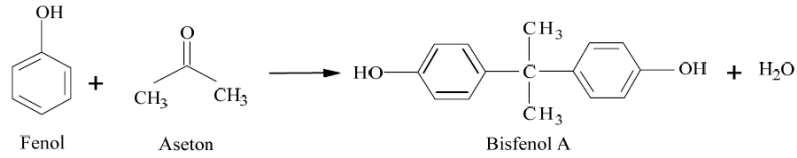
**Keywords:** Bisphenol A, Physiology, Genotoxicity, Chromosomal abnormalities, Micronucleus, Green coffee.

\* Corresponding author. Email address: ali.acar@giresun.edu.tr

## 1. GİRİŞ

Bisfenol A (BFA), ilk defa 1891 yılında sentezlenmiş, 1930'larda sentetik östrojen olarak adını duyurmuş ve sonraki yıllarda dietilstilbestrolün östrojenik etkisinin daha güçlü olduğu farkedilince 1950'lere kadar arka planda kalmıştır. 1950'lerde ise BFA, plastik sanayisinde kullanılmaya başlanarak, zamanla en çok üretilen kimyasallardan biri haline gelmiştir [1].

BFA, polikarbonat plastikler ile epoksi reçinelerin monomeri olan ve dünyada yaygın olarak kullanılan endüstriyel bir kimyasaldır. BFA, normal şartlar altında renksiz, kokusuz ve katı yapıya sahip bir kimyasaldır [2,3]. Gıda ve içecek ambalajlama materyalleri ile bebek biberonlarında hammadde olarak kullanılmaktadır [4,5]. Dünyada üretilen BFA'nın % 70'i polikarbonat plastiklerin üretiminde, % 25'i ise epoksi reçinelerin üretiminde kullanılmaktadır [6]. Epoksi reçineler; deniz ürünleri, sebzeler, bira, alkolsüz içecekler ve süt tozu gibi gıdaların ambalajlanmasında, metal gıda kutularının iç yüzeyinin kaplanmasında, şarap ve su gibi sıvıların bulunduğu büyük depolama kapları ile değişik tiplerdeki gıda taşıyıcılarının yapımında [7], polikarbonatlar ise, biberonlar ve su şişeleri gibi değişik plastik ürünlerin yapımında kullanılmaktadır [8,9]. Bu ambalaj materyallerinin yapımında kimyasal süreç gerektiği gibi oluşmazsa BFA tipi reçineler ve reaksiyon ürünlerinin gıdanın yapısına karışması söz konusu olabilmekte, bazı durumlarda ise bu maddeler gıda bileşenleri ile reaksiyona girerek yeni bileşiklerin sentezini de tetikleyebilmektedir [8]. Bisfenol A [2,2-bis(4-hidroksifenil)propan] Şekil 1.1'de de gösterildiği gibi aseton ve fenolün kondensasyonu ile sentezlenmektedir [10,11].



Şekil 1.1. Bisfenol A'nın sentezi [11]

BFA, Amerikan Ulusal İş Güvenliği ve Sağlığı Enstitüsü (National Institute for Occupational Safety and Health- NIOSH) tarafından primer bir irritan, mutajen ve üreme sistemini etkileyen bir ajan olarak tanımlanmıştır. Son yıllarda birçok bilimsel çalışma, BFA'nın düşük dozlarda bile endokrin sistemi olumsuz yönde etkileyebildiğini göstermiştir [12,13]. Ayrıca yapılan çalışmalarda Bisfenol A'nın düşük dozlarda bile vücuda alınmasının farklı dokularda çok çeşitli biyolojik etkiler meydana getirebildiği ve lipofilik özellikte olduğu için yağlı bölgelerde birikebildiği gösterilmiştir [14,15]. Örneğin 10 yıl süresince gıda ürünleri ambalajlanmasında çalışan bir kadının, ellerini korumak için 4 yıl süresince BFA içeren eldiven kullanımından sonra ellerinde egzema geliştiği rapor edilmiştir [16]. Bunun dışında BFA'nın tiroid hormon fonksiyonunda bozukluk, merkezi sinir sistemi fonksiyonunda farklılık ve immün sistemin baskılanmasında da rol oynadığı belirlenmiştir [14].

Son yıllarda yaşamımızın her alanında önemli bir yer tutan kimyasal maddelerin neden olduğu toksisiteyi azaltmak için, biyolojik kökenli ürünlerin kullanımı oldukça yaygın ve popüler hale gelmiştir. Örneğin farelerde 12-O-tetradekanolforbol-13-asetat'ın oluşturduğu oksidatif hasara karşı *Mangifera indica* L. ekstresi [17], ratlarda parasetamol'un hepatoksik etkilerine karşı *Garcinia kola* Heckel tohum ekstresi [18], rat primer hepatositlerindeki tert-bütül hidroperoksit'in sebep olduğu oksidatif stresi azaltmak için ise *Hibiscus sabdariffa* L. kurutulmuş çiçek ekstresi [19] kullanılmıştır. Bu çalışmada ise, BFA'nın sebep olduğu toksisiteye karşı ise günümüzde kullanımı oldukça yaygınlaşan ve popüler bir ürün olan yeşil kahve kullanılmıştır.

Yeşil kahve, kahvenin kavrulmamış, işlenmemiş ve doğal halidir. Günümüzde özellikle zayıflama çabası olan insanların tercih ettiği yeşil kahve, antioksidan ve diğer sağlığa yararlı özellikleri nedeniyle tercih nedeni olmaktadır. Kahvenin hastalık riskini azaltması ve koruyucu özelliği, bileşiminde yer alan kafein, klorojenik asit ve kafeik asit gibi zengin fitokimyasallar ile ilişkilendirilmektedir. Kafein, amiloid beta protein üretimini baskılamakta, ayrıca antioksidan ve antiinflamatuvar ajan olarak nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu bir rol oynamaktadır. Aynı zamanda içerdiği kafein ile glukoz kullanımı uyarıcısı ve mitokondriyal aktivatör olarak görev yapmaktadır. Kafeik asit oksidatif stresi azaltmakta ve trigonellin dentrit ile akson rejenerasyonunda görev almaktadır. Klorojenik asit ise oksidatif stresi azalttığı gibi, glukoz homeostazında da önemli bir rol oynamaktadır. Klorojenik asitin bir diğer özelliği ise antiinflamatuvar etkiye sahip olmasıdır. Ayrıca nöron hücre ölümüne karşı koruyucu bir etki göstermektedir [20,21].

Bu çalışmanın amacı, endüstriyel bir kimyasal olarak gıda ve içecek ambalajlama materyallerinde yaygın olarak kullanılan BFA'nın muhtemel fizyolojik ve genotoksik etkilerini Swiss albino fareler üzerinde gözler önüne sermek ve bu etkilere karşı yeşil kahvenin koruyucu rolünü test etmektir.

## **2. MATERYAL VE METOT**

Bu çalışmada, Giresun Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Araştırma Laboratuvarı'nda bakımları yapılan 36 adet Swiss albino fare kullanılmıştır. Hayvanlar bir (1) kontrol ve beş (5) uygulama olmak üzere toplam altı (6) gruba ayrılmış, 12 saat ışık 12 saat karanlık döngüde, oda sıcaklığında ve %50 nem ortamında bakımları sağlanmıştır. On (10) haftalık uygulama periyodu süresince, kontrol grubundaki fareler çeşme suyu, uygulama grubundaki fareler ise 50 mg/kg c.a dozunda Bisfenol A ile yeşil kahvenin 100 mg/kg c.a ve 400 mg/kg c.a dozlarıyla beslenmişlerdir. Uygulanan dozlar literatürdeki diğer çalışmalar incelenerek uygun olan en düşük doz seviyeleri belirlenmiş olup, Bisfenol A için 50 mg/kg c.a. dozu [22,23], yeşil kahve için ise 100 mg/kg ve 400 mg/kg [24] dozları uygulanmıştır. Uygulama periyodundan bir hafta önce fareler standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslenerek ortama adaptasyonları sağlanmıştır. Bu çalışmada uygulanan yöntem ve teknikler Dünya Sağlık Örgütü (Cenevre, İsviçre) ve Giresun Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Yerel Etik Kurulu tarafından belirlenen esaslara göre yürütülmüştür (Etik Kurul Karar Tarihi: 25.03.2015 Karar No: 2015/05).

### **2.1. Ürün ve Kimyasallar**

Bisfenol A Bend Mühendislik ve Teknik Cihazlar (Samsun)'dan, Kolşisin Solüsyonu Biostar Kimya Medikal Laboratuvar Ürünleri Ltd. (Ankara)'den, FastGreen ve Grünwald Giemsa boyaları ise Interlab A.Ş (İstanbul)'den temin edilmiştir.

### **2.2. Canlı Ağırlık ve Organ Ağırlıklarının Tespiti**

Albino fareler eter anestezisi altında bayıldıktan sonra, uygulama periyodu öncesi ve sonrasında hassas terazi yardımıyla canlı ağırlıkları, sakrifiye edildikten sonra ise organ ağırlıkları ölçülmüştür.

### **2.3. Eritrosit Mikronukleus (MN) Testi**

Fare Eritrosit Mikronukleus (MN) testi, kemik iliği polikromatik eritrositlerinde uygulanan geleneksel MN testinin modifiye bir şeklidir. Bu testte, farelerin kuyruklarından elde edilen dolaşım kanındaki olgun normakromatik eritrositler sayılmaktadır. Fare eritrosit MN testi Te-Hsiu ve arkadaşlarının [25] bildirdiği yöntemle yapılmıştır. Kısaca, fareler eter anestezisi altında bayıltılmış ve farelerin kuyruk venlerinden küçük bir iğne yardımıyla kan örnekleri alınmıştır. Her bir fareden toplanan periferik kanın yaklaşık 5 µL'si % 3 EDTA çözeltisi ile karıştırılmış ve temiz lam üzerine yayılmıştır. Eritrositler 2 dakika süreyle %70'lik etanol içinde fiske edilmiş ve hazırlanan slaytlar oda sıcaklığında bir gece

kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, slaytlar % 5'lik May-Grünwald Giemsa ile 15 dakika süresince boyanarak, süre sonunda saf su ile yıkanmıştır. Genellikle her bir grup için üç ya da dört slayt hazırlanmış ve her bir slayttaki MN sıklığı iki farklı gözlemci tarafından art arda iki defa sayılmıştır. Hazırlanan slaytlardan her bir grup için toplam 1000 normakromatik eritrosit araştırma mikroskobu (model BX51, Olympus, Tokyo, Japan) altında X500 büyütmede sayılarak MN'li hücrelerin sayısı tespit edilmiş ve X500 büyütme de ise fotoğraflandırılmıştır.

### 2.4. Yanak Mukoza Epitel Hücrelerinde Mikronukleus (MN) Testi

Yanak mukozası epitel hücrelerinde mikronukleus (MN) varlığını belirlemek için, fareler eter anestezi altında bayıltılmış, her bir farenin ağzı saf su ile yıkandıktan sonra, sağ ve sol yanak mukozası nemli bir kürdan yardımıyla taranarak epitel hücre örnekleri toplanmıştır. Toplanan örnekler, önceden temizlenmiş lamalar üzerine alınarak 30 dakika süresince kurumaya bırakılmıştır. Süre sonunda dokular metanol: asetik asit (3:1) solüsyonu ile 10 dakika fikse edilerek literatürlerde [26,27] tanımlandığı gibi sırasıyla Feulgen ve Fast Green boyaları ile boyanarak kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra örnekler Entellen yardımıyla lamelle kapatılarak daimi preparat haline getirilmiştir. Yanak mukoza epitelindeki MN sıklığını belirlemek amacıyla, araştırma mikroskobu altında, her gruptaki her bir fare için hazırlanan slaytlardan iki farklı gözlemci tarafından 1000 hücre sayılarak X500 büyütmede fotoğraflandırılmıştır.

Eritrosit ve Yanak Mukoza Epitel hücrelerindeki MN analizleri Fenech ve arkadaşları [28] tarafından belirlenen kriterlere göre yapılmıştır. Bu kriterlere göre;

- (i) MN çapı ana nukleusun 1/3 olmalı,
- (ii) MN ile hücrenin temel çekirdeğinin kenarları birbirlerine temas edebileceği gibi etmeyebilirde, fakat temas ettiği durumlarda bu aradaki sınırın belirgin bir şekilde ayırt edilmesi gerekmektedir,
- (iii) MN boyandığında temel çekirdeğin aldığı renge yakın bir renk almalıdır.

### 2.5. Kromozom Analiz Yöntemi

Farelere sakrifiye edilmeden 2 saat önce intraperitoneal (ip) yolla 0.025% kolşisin verilmiş ve süre sonunda eter anestezi altında sakrifiye edilmişlerdir. Daha sonra sırasıyla femurdan kemik iliği aspire edilmiş, serum fizyolojik ile yıkanmış, 0.075 M KCl ile muamele edilmiş, Carnoy's ile fikse edilerek, % 5'lik Grünwald-Giemsa boyası ile boyanmıştır. Son olarak ise kromozomal hasarlar araştırma mikroskobu (Model BX51, Olympus) altında X100 büyütmede belirlenmiş ve Savage [29]'nin bildirdiği kriterlere göre sınıflandırılmıştır.

### 2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel verilerin analizi için SPSS for Windows V 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA, 2013) paket programı kullanılmıştır. Gruplar arasında istatistiksel farklılıkların değerlendirilmesi One-way ANOVA ve Duncan testleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  Standart Sapma (SD) değerleri olarak verilmiş ve P değeri 0.05'den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bisfenol A uygulamasının canlı ağırlık üzerine etkisi Tablo 3.1'de verilmiştir. Tablo'daki sonuçlar incelendiğinde, uygulama periyodunun sonunda en fazla ağırlık artışı kontrol grubu ile sadece yeşil kahve özütünün iki farklı dozu ile muamele edilen Grup II ve Grup III'de tespit edilmiştir. Söz konusu gruplarda sırasıyla 10.54 gr, 9.06 gr ve 7.50 gr'lık bir ağırlık artışı belirlenmiş, ayrıca gruplar arasındaki bu ağırlık farklarının istatistiksel açıdan önemli olmadığı da gözlenmiştir ( $P > 0.05$ ). En az ağırlık artışı ise sadece 50 mg/kg c.a dozunda Bisfenol A uygulanan Grup IV'de gözlenmiştir. Söz konusu grupta

0.79 gr'lık bir ağırlık artışı belirlenmiştir. Bisfenol A uygulaması ile birlikte yeşil kahve özütü ile beslemenin Grup V ve Grup VI'da ağırlık kazanımında tekrar bir artış neden olduğu, bu artışın ise uygulanan yeşil kahve özütü dozuyla doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 3.1.** Bisfenol A'nın canlı ağırlık (gr) üzerine etkileri.

Gruplar	Başlangıç Ağırlığı	Son Ağırlık	Ağırlık Artışı
Grup I	28.79±2.50 <sup>cd</sup>	39.33±2.57 <sup>a</sup>	+10.54
Grup II	28.59±2.52 <sup>cd</sup>	37.65±2.52 <sup>a</sup>	+9.06
Grup III	29.32±2.37 <sup>cd</sup>	36.82±1.91 <sup>a</sup>	+7.50
Grup IV	28.34±2.30 <sup>d</sup>	29.13±1.90 <sup>cd</sup>	+0.79
Grup V	28.94±2.50 <sup>cd</sup>	31.64±1.88 <sup>bc</sup>	+2.70
Grup VI	28.22±3.08 <sup>d</sup>	33.19±1.90 <sup>b</sup>	+4.97

Grup I: Kontrol, Grup II: 100 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup III: 400 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup IV: 50 mg/kg c.a Bisfenol A, Grup V: 50 mg/kg c.a Bisfenol A +100 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup VI: 50 mg/kg c.a Bisfenol A +400 mg/kg c.a yeşil kahve. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 6). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem "Duncan" testini takiben "one-way" ANOVA varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütün içerisinde farklı harfler ile belirtilen ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05).

Bisfenol A'nın karaciğer organ ağırlığında meydana getirdiği değişiklikler Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Karaciğer organ ağırlığındaki en fazla azalmanın Bisfenol A uygulanan Grup IV'de, en az ise kontrol ve yeşil kahve özütünün iki farklı dozu ile beslenen Grup II ve Grup III'de olduğu tespit edilmiştir. Bu gruplarda sırasıyla 1.39 gr, 2.33 gr, 2.26 gr ve 2.13 gr organ ağırlığı ölçülmüştür. Bisfenol A ile birlikte yeşil kahve özütünün iki farklı dozu ile besleme Grup V ve Grup VI'deki farelerin karaciğer organ ağırlıklarında doza bağlı olarak tekrar bir artışa sebep olmuş, söz konusu artışın ise kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir (P<0.05).

**Tablo 3.2.** Bisfenol A'nın karaciğer organ ağırlığı (gr) üzerine etkileri.

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama Organ Ağırlığı
Grup I	2.12	2.52	2.33±0.15 <sup>a</sup>
Grup II	2.10	2.45	2.26±0.14 <sup>a</sup>
Grup III	1.95	2.36	2.13±0.15 <sup>a</sup>
Grup IV	1.16	1.62	1.39±0.18 <sup>c</sup>
Grup V	1.25	1.86	1.55±0.24 <sup>c</sup>
Grup VI	1.68	1.98	1.84±0.11 <sup>b</sup>

Grup I: Kontrol, Grup II: 100 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup III: 400 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup IV: 50 mg/kg c.a Bisfenol A, Grup V: 50 mg/kg c.a Bisfenol A +100 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup VI: 50 mg/kg c.a Bisfenol A +400 mg/kg c.a yeşil kahve. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 6). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem "Duncan" testini takiben "one-way" ANOVA varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütün içerisinde farklı harfler ile belirtilen ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05).

Bisfenol A'nın böbrek organ ağırlığında meydana getirdiği değişimler Tablo 3.3'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, böbrek ağırlığındaki en fazla azalmanın Bisfenol A uygulanan Grup IV'de meydana geldiği, bu azalmanın da kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli olduğu (P<0.05) belirlenmiştir.

## Albino Farelerde Bisfenol A Tarafından Teşvik

Bisfenol A ile birlikte iki farklı dozda yeşil kahve özütü uygulaması ise Grup V ve Grup VI'da böbrek ağırlıklarında tekrar bir artışa neden olmuş ve bu artışın ise uygulanan yeşil kahve özütü dozu ile doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 3.3.** Bisfenol A'nın böbrek organ ağırlığı (gr) üzerine etkileri

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama Organ Ağırlığı
Grup I	0.54	0.82	0.69±0.11 <sup>a</sup>
Grup II	0.52	0.80	0.66±0.10 <sup>ab</sup>
Grup III	0.48	0.74	0.62±0.10 <sup>ab</sup>
Grup IV	0.38	0.52	0.43±0.05 <sup>d</sup>
Grup V	0.42	0.55	0.51±0.05 <sup>cd</sup>
Grup VI	0.48	0.65	0.56±0.07 <sup>bc</sup>

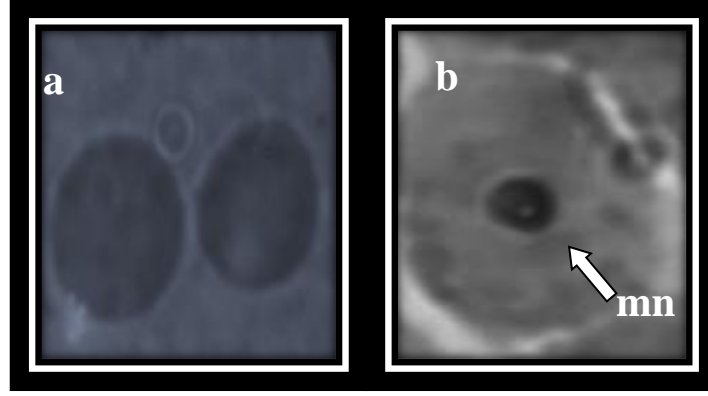
Grup I: Kontrol, Grup II: 100 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup III: 400 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup IV: 50 mg/kg c.a Bisfenol A, Grup V: 50 mg/kg c.a Bisfenol A +100 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup VI: 50 mg/kg c.a Bisfenol A +400 mg/kg c.a yeşil kahve. Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem "Duncan" testini takiben "one-way" ANOVA varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile belirtilen ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05).

Bisfenol A'nın eritrosit hücrelerinde teşvik ettiği Mikronükleus (MN) sıklığı Tablo 3.4'te ve Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde, Bisfenol A uygulamasının eritrosit hücrelerinde MN oluşumuna sebep olduğu belirlenmiştir. Sadece Bisfenol A ile beslenen Grup IV'deki farelerin eritrosit hücrelerinde ortalama 60.83 oranında MN oluşumuna rastlanırken, kontrol ve sadece yeşil kahve özütünün iki farklı dozu ile beslenen Grup II ve Grup III'deki farelerin eritrosit hücrelerinde ise her hangi bir MN oluşumuna rastlanılmamıştır. Bisfenol A ile birlikte yeşil kahve özütünün iki farklı dozu ile besleme ise Grup V ve Grup VI'deki farelerin eritrosit hücrelerindeki MN sayılarında doza bağlı olarak tekrar bir azalmaya sebep olmuş, söz konusu azalmanın ise Grup IV'e göre istatistiksel açıdan önemli olduğu (P<0.05) tespit edilmiştir.

**Tablo 3.4.** Bisfenol A'nın eritrosit hücrelerinde teşvik ettiği Mikronükleus (MN) sıklığı.

Gruplar	Hesaplanan Hücre Sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama MN
Grup I	1000	0	0	0.00±0.00 <sup>d</sup>
Grup II	1000	0	0	0.00±0.00 <sup>d</sup>
Grup III	1000	0	0	0.00±0.00 <sup>d</sup>
Grup IV	1000	45	75	60.83±9.91 <sup>a</sup>
Grup V	1000	35	60	45.00±9.25 <sup>b</sup>
Grup VI	1000	20	34	26.17±5.60 <sup>c</sup>

Grup I: Kontrol, Grup II: 100 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup III: 400 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup IV: 50 mg/kg c.a Bisfenol A, Grup V: 50 mg/kg c.a Bisfenol A +100 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup VI: 50 mg/kg c.a Bisfenol A +400 mg/kg c.a yeşil kahve. Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem "Duncan" testini takiben "one-way" ANOVA varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile belirtilen ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05).



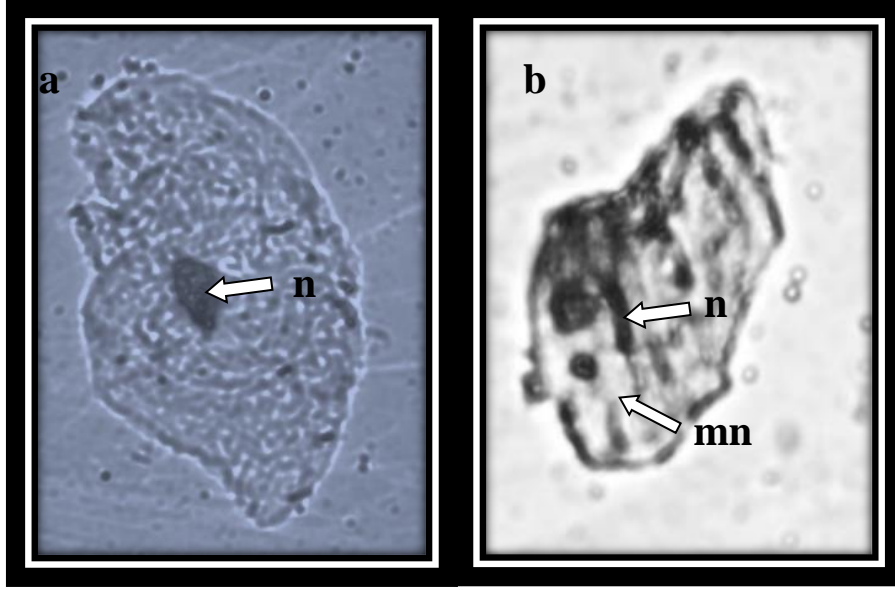
Şekil 3.1. Eritrosit hücrelerinde mikronukleusun görünümü, mn: mikronukleus (a: kontrol grubu, b: uygulama grubu)

Bisfenol A'nın yanak mukoza epitel hücrelerinde teşvik ettiği Mikronukleus (MN) sıklığı Tablo 3.5'de ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde Bisfenol A uygulanan Grup IV'deki farelerin yanak mukoza epitel hücrelerinde 23.33 oranında MN oluşumu gözlenirken, kontrol grubu ve yeşil kahve özütünün iki farklı dozuyla muamele edilen Grup II ve Grup III'de ise her hangi bir MN oluşumuna rastlanılmamıştır. Bisfenol A ile birlikte yeşil kahve özütü uygulaması Bisfenol A tarafından teşvik edilen MN oluşumunu azaltmıştır. Bu azalmanın ise Bisfenol A dozu ile ters orantılı olduğu görülmüştür.

Tablo 3.5. Bisfenol A'nın yanak mukoza epitel hücrelerinde teşvik ettiği mikronukleus (MN) sıklığı

Gruplar	Hesaplanan Hücre Sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama MN
Grup I	1000	0	0	0.00±0.00 <sup>d</sup>
Grup II	1000	0	0	0.00±0.00 <sup>d</sup>
Grup III	1000	0	0	0.00±0.00 <sup>d</sup>
Grup IV	1000	15	30	23.33±5.72 <sup>a</sup>
Grup V	1000	10	24	18.50±5.13 <sup>b</sup>
Grup VI	1000	8	15	10.67±2.50 <sup>c</sup>

Grup I: Kontrol, Grup II: 100 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup III: 400 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup IV: 50 mg/kg c.a Bisfenol A, Grup V: 50 mg/kg c.a Bisfenol A +100 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup VI: 50 mg/kg c.a Bisfenol A +400 mg/kg c.a yeşil kahve. Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem "Duncan" testini takiben "one-way" ANOVA varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile belirtilen ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05).



Şekil 3.2. Yanak mukoza epitel hücrelerinde mikronukleusun görünümü, n: nukleus, mn: mikronukleus (a: kontrol grubu, b: uygulama grubu).

Bisfenol A uygulamasının kemik iliği hücrelerinde teşvik ettiği kromozomal hasarlar Tablo 3.6’da gösterilmiştir. Gruplar karşılaştırıldığında, kontrol grubu ve yeşil kahve özütünün iki farklı dozu ile muamele edilen Grup II ve Grup III’de kromozomal hasar oluşumu gözlenmezken, Bisfenol A uygulanan Grup IV’de ise en fazla kromozomal hasar oluşumu tespit edilmiştir. Bu hasarlar sırasıyla kromatit kırığı > fragment > gap > ring > asentrik kromozom > disentrik kromozom şeklinde gerçekleşmiştir. Bisfenol A ile birlikte yeşil kahve özütü uygulaması, Bisfenol A’nın sebep olduğu kromozomal hasarlar sayılarında, uygulanan yeşil kahve özütünün dozuna bağlı olarak azalmaya neden olmuş, bu azalmanın da istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ).

Tablo 3.6. Kemik iliği hücrelerinde Bisfenol A tarafından teşvik edilen kromozomal hasarlar

Gruplar	Kromatit Kırığı	Fragment	Gap	Ring	Asentrik Kromozom	Disentrik Kromozom
Grup I	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>
Grup II	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>
Grup III	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>
Grup IV	45.67±6.98 <sup>a</sup>	30.00±6.57 <sup>a</sup>	11.67±2.94 <sup>a</sup>	7.83±1.60 <sup>a</sup>	6.33±1.21 <sup>a</sup>	5.00±1.41 <sup>a</sup>
Grup V	35.33±6.06 <sup>b</sup>	23.50±7.84 <sup>b</sup>	8.17±2.93 <sup>b</sup>	5.33±1.21 <sup>b</sup>	4.00±1.10 <sup>b</sup>	3.17±0.98 <sup>b</sup>
Grup VI	26.00±7.92 <sup>c</sup>	14.67±6.68 <sup>c</sup>	4.67±2.07 <sup>c</sup>	2.17±1.17 <sup>c</sup>	1.33±1.03 <sup>c</sup>	1.50±1.05 <sup>c</sup>

Grup I: Kontrol, Grup II: 100 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup III: 400 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup IV: 50 mg/kg c.a Bisfenol A, Grup V: 50 mg/kg c.a Bisfenol A +100 mg/kg c.a yeşil kahve, Grup VI: 50 mg/kg c.a Bisfenol A +400 mg/kg c.a yeşil kahve. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 6). Kromozomal hasarlar için her hayvan başına 100 hücre, her grupta 6 hayvan bulunduğu için toplamda 600 hücre sayıldı. Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” ANOVA varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile belirtilen ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0.05$ ).



#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, BFA'nın albino farelerde meydana getirdiği fizyolojik vejenotoksik değişimler ile bu değişimlere karşı yeşil kahvenin koruyucu rolü araştırılmıştır. BFA'nın, günlük hayatımızda sıkça kullandığımız ürünlerin yapısında yer alması çalışmamızın önemini bir kat daha arttırmaktadır.

Deneyelçalışmalar sonucunda, BFA uygulamasının Swiss albino farelerde fizyolojik parametreler olan canlı ağırlık ve organ ağırlıklarında azalmaya neden olduğu, yeşil kahve özütü uygulamasının ise fizyolojik parametrelerde iyileşmeye neden olarak doza bağlı tekrar bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. Litarütürde BFA'nın canlı ve organ ağırlığı parametreleri üzerine etkilerini inceleyen benzer tarzda bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Miyawaki ve arkadaşları [30] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, hamile ICR fareler hamileliklerinin onuncu (10) gününden itibaren laktasyon döneminin sonuna kadar günlük diyetlerine ek olarak 1 ug/ml ve 10 ug/ml dozlarında Bisfenol A ile beslenmiş, yavru fareler ise sütten kesildikten sonra 11 gün süresince Bisfenol A ile beslenmiş ve sonuçta uygulamaya bağlı olarak her iki dozda da yavru dişi farelerin vücut ağırlıklarında kontrol grubuna göre artış meydana geldiği rapor edilmiştir. Honma ve arkadaşları [31] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise, ICR/Jcl fareler gebeliğin on birinci (11) ve on yedinci (17) günleri arasında subkütan enjeksiyon ile farklı dozlarda Bisfenol A uygulanmış, dişi yavrularda doğumdan 22 gün sonra ölçülen yavru vücut ağırlıklarının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu, erkek yavrularda ise doğumdan hemen sonra ve doğumdan 11 gün sonra ölçülen yavru vücut ağırlıklarının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Kobayashi ve arkadaşları [32] tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise, Sprague Dawley ratlar günlük 4, 40 ve 400 mg/kg dozlarında Bisfenol A ile beslenmiş, her üç dozda da gebelik döneminde farelerin vücut ağırlıklarında kontrol grubuna göre azalma meydana geldiği rapor edilmiştir. Tan ve arkadaşları [33] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise, erkek SpragueDawley ratlar100 mg/kg dozunda Bisfenol A ile beslenmiş, sonuçta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında uygulamaya bağlı olarak vücut ağırlık artışlarının etkilenmediği, karaciğer ağırlığının azaldığı ve böbrek ağırlığının ise arttığı rapor edilmiştir. Takahashi ve Oishi [34] tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise, erkek Wistar ratlar, Holtzman SD ratlar, CD-1 fareler ve C57BL/6CrSlc fareler 2 ay süresince %0.25 oranında Bisfenol A ile beslenmiş, sonuçta Bisfenol A ile beslemenin fare ve rat gruplarının tamamında canlı ağırlık kazanımlarını etkilemediği, karaciğer ve böbrek ağırlıklarının ise CD-1 farelerde önemli ölçüde arttığı, Wistar ratlarda ise karaciğer ağırlığının önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir.Fare ve ratlarda yapılan bir diğer çalışmada ise, 90 gün süresince inhalasyon yoluyla 150 mg/m<sup>3</sup> konsantrasyonunda Bisfenol A'ya maruz kalınmanın karaciğer ve böbrek ağırlığında artmaya neden olduğu belirlenmiştir [35].

Bu çalışmada ayrıca BFA'nın genotoksik etkileri ve bu etkilere karşı yeşil kahvenin koruyucu rolüde araştırılmıştır. Bu amaçla mikronukleus (MN) sıklığı ve kromozomal hasarlar genotoksisite indikatörleri olarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, BFA uygulamasının gerek eritrosit hücrelerinde gerekse de yanak mukoza epitelyum hücrelerinde MN oluşumuna sebep olduğu ve kromozomal hasarları teşvik ettiği belirlenmiştir. Litaratürde elde ettiğimiz bulguları destekleyen tarzda BFA ile gerçekleştirilmiş bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Naik ve Vijayalaxmi [36] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Swiss albino farelere 10, 50 ve 100 mg/kg c.a dozlarında BFA 6, 24, 48 ve 72 saat süresince uygulanmış, sonuçta BFA'nın 6 saatlik süre sonunda toplam kromozomal anormallik sıklığını önemli ölçüde arttırmadığı, fakat 24 saatlik süre sonunda gap oluşumunu arttırdığı, 48 ve 72 saatlik süre sonunda ise gap oluşumu ile toplam kromozomal hasar miktarını önemli oranda arttırdığı rapor edilmiştir. Pfeiffer ve arkadaşları [37] tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise, Chinese hamster V79 hücrelerine BFA, BP-2, BP-3, BP-4 ve BP-5 uygulanmış, sonuçta BP-2 dışında uygulanan tüm kimyasalların MN oluşumunu teşvik ettiği rapor edilmiştir. Pacchierotti ve arkadaşları [38] tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise, fareler 0.36 mg/l dozunda BFA ile beslenmiş, sonuçta

uygulamanın belirtilen dozda polikromatik eritrositler hücrelerinde MN oluşumuna neden olmadığı rapor edilmiştir.

BFA ile birlikte yeşil kahve özütü uygulaması, BFA'nın sebep olduğu toksisiteyi azaltmış, canlı ağırlık ve organ ağırlığı değerlerinde tekrar bir artışa, MN oluşumu ve kromozomal hasar sayılarında ise tekrar bir azalmaya sebep olmuştur. Literatürde antioksidan özellikteki biyolojik kökenli ürünlerin, kimyasalların sebep olduğu toksisiteyi azalttığı ve araştırılan parametrelerde iyileşmeye sebep olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin aflatoxin B<sub>1</sub>'in rat karaciğerlerinde sebep olduğu genotoksisiteye karşı kahveye özgü diterpenler olan kafestol ve kahveol'un kemoprotektif rolü [39], adriamisin'in sebep olduğu kardiyotoksisite ve nefrotoksisiteye karşı likopenin koruyucu rolü [40], Sisplatin'in ratlarda sebep olduğu oksidatif strese karşı ise üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresi kullanılmıştır [41].

Sonuç olarak, bebek biberonlarından, gıda taşıma ve saklama kaplarına, konserve kutularından, ambalaj materyallerine kadar birçok alanda çok yoğun olarak kullanılan BFA'nın toksik etkiler, Swiss albino farelerde gözler önüne serilmeye, bu etkilere karşı ise yeşil kahvenin koruyucu rolü test edilmeye çalışılmıştır. Sonuçta BFA'nın belli bir doz eşliğinden sonra toksisiteye sebep olduğu, yeşil kahvenin ise bu toksisiteyi azaltmada etkili bir antioksidan ürün olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle günlük yaşantımızda sıkça kullandığımız ürünlerin yapısında yer alan BFA'nın kullanımından vazgeçilmesi, fakat sanayi sektöründe üretim aşamasında mutlaka gerekli bir ürün ise de toksik etki göstermeyen doz aralığının tercih edilmesi gerekmektedir.

### **Teşekkür**

Bu çalışma Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından SAĞ-BAP-A-200515-31 nolu proje kapsamında desteklenmiştir. Bu projeye maddi destek sağlayan Giresun Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederiz.

### **KAYNAKLAR**

1. Vandenberg L.N., Maffini M.V., Sonnenschein C., Rubin B.S., Soto A.M. Bisphenol-A And The Great Divide: A Review Of Controversies In The Field Of Endocrine Disruption *Endocrine Reviews* 2009; 30(1): 75-95.
2. Staples C.A., Dome P.B., Klecka G.M., Oblock S.T., Harris L.R. A Review of the Environmental Fate, Effects, And Exposures Oof Bisphenol A *Chemosphere* 1998; 36(10): 2149-2173.
3. Cousins I.T., Staples C.A., Klečka G.M., Mackay D. A Multimedia Assessment Of The Environmental Fate Of Bisphenol A *Human and Ecological Risk Assessment* 2002; 8(5): 1107-1135.
4. Maragou N.C., Lampi E.N., Thomaidis N.S., Koupparis M.A. Determination Of Bisphenol A in Milk by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry *Journal of Chromatography A* 2006; 1129(2): 165-173.
5. Podlipna D., Cichna-Markl M. Determination of Bisphenol A in Canned Fish By Sol–Gel Immunoaffinity Chromatography, HPLC And Fluorescence Detection. *European Food Research and Technology* 2007; 224(5): 629-634.
6. Tsai W.T. Human Health Risk on Environmental Exposure to Bisphenol-A: A Review *Journal Of Environmental Science And Health Part C* 2006; 24(2): 225-55.

7. Garcia R.S., Losada P.P. Determination of Bisphenol A Diglycidyl Ether and Its Hydrolysis and Chlorohydroxy Derivatives by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry *Journal of Chromatography A* 2004; 1032(1): 37-43.
8. European Commission, Scientific Committee on Food. *Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A. SCF/CS/PM/3936 Final*. Brussels. 2002.
9. Matsumoto J., Yokota H., Yuasa A. Developmental Increases in Rat Hepatic Microsomal UDP-Glucuronosyltransferase Activities Toward Xenoestrogens and Decreases During Pregnancy *Environmental Health Perspectives* 2002; 110(2): 193-196.
10. Krishnan A.V., Stathis P., Permuth S.F., Tokes L., Feldman D. Bisphenol-A: An Estrogenic Substance is Released from Polycarbonate Flasks During Autoclaving *Endocrinology* 1993; 132(6): 2279-2286.
11. Prokop Z., Hanková L., Jeřábek K. Bisphenol A Synthesis–Modeling of Industrial Reactor and Catalyst Deactivation *Reactive and Functional Polymers* 2004; 60: 77-83.
12. Kang J.H., Kondo F., Katayama Y. Human Exposure to Bisphenol A *Toxicology* 2006; 226(2): 79-89.
13. Lopez-Cervantes J., Paseiro-Losada P. Determination of Bisphenol A in, and Its Migration from, PVC Stretch Film Used for Food Packaging *Food Additives & Contaminants* 2003; 20(6): 596-606.
14. Wetherill Y.B., Akingbemi B.T., Kanno J., McLachlan J.A., Nadal A., Sonnenschein C., Watson C.S., Zoeller R.T., Belcher S.M. In Vitro Molecular Mechanisms of Bisphenol A Action *Reproductive Toxicology* 2007; 24(2): 178-198.
15. Ben-Jonathan N., Hugo E.R., Brandebourg T.D. Effects of Bisphenol A on Adipokine Release from Human Adipose Tissue: Implications for the Metabolic Syndrome *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 304(1): 49-54.
16. Estlander T., Jolanki R., Henriks-Eckerman M.L., Kanerva L. Occupational Contact Allergy to Bisphenol A *Contact Dermatitis* 1999; 40(1): 52-53.
17. Sánchez G.M., Re L., Giuliani A., Nunez-Selles A.J., Davison G.P., Leon-Fernandez O.S. Protective Effects of *Mangifera indica* L. Extract, Mangiferin and Selected Antioxidants Against TPA-Induced Biomolecules Oxidation and Peritoneal Macrophage Activation in Mice *Pharmacological Research* 2000; 42(6): 565-573.
18. Akintonwa A., Essien A.R. Protective Effects of Garcinia Kola Seed Extract Against Paracetamol-Induced Hepatotoxicity in Rats *Journal of Ethnopharmacology* 1990; 29(2): 207-211.
19. Tseng T.H., Kao E.S., Chu C.Y., Chou F.P., Wu H.W.L., Wang C.J. Protective Effects of Dried Flower Extracts of *Hibiscus Sabdariffa* L. Against Oxidative Stress in Rat Primary Hepatocytes *Food and Chemical Toxicology* 1997; 35(12): 1159-1164.
20. Gönder M., Şanlıer N. Kahve Tüketimi ve Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkisi *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology* 2014; 9(2): 67-72.
21. Bonita J.S., Mandarano M., Shuta D., Vinson J. Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacological Research* 2007; 55(3): 187-198.
22. Karnam S.S., Ghosh R.C., Mondal S., Mondal M. Evaluation of subacute bisphenol–A toxicity on male reproductive system. *Veterinary World* 2015; 8(6): 738-744.

23. Othman A.I., Edrees G.M., El-Missiry M.A., Ali D.A., Aboel-Nour M., Dabdoub, B.R. Melatonin controlled apoptosis and protected the testes and sperm quality against bisphenol A-induced oxidative toxicity. *Toxicology and Industrial Health* 2014; 1-13
24. Shimoda H., Seki E., Aitani, M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC complementary and alternative medicine*, 2006; 6(9): 1-9.
25. Te-Hsiu M.A., Zhou X., Loarco G.F., Arreola G.G., Lecona S.U. Mouse–erythrocyte micronucleus (MUS-EMN) assay on the clastogenicity of industrial wastewater *Rev. Int. Contam. Ambient* 1995; 11: 95-98.
26. Çavuşoğlu K., Yapar K., Yalçın E. Royal Jelly (Honey Bee) is a Potential Antioxidant Against Cadmium-Induced Genotoxicity and Oxidative Stress in Albino Mice *Journal of Medicinal Food* 2009; 12(6): 1286-1292.
27. Özkul Y., Donmez H., Erenmemisoglu A., Demirtas H., Imamoglu N. Induction of Micronuclei by Smokeless Tobacco on Buccal Mucosa Cells of Habitual Users *Mutagenesis* 1997; 12(4): 285-287.
28. Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. Human Micronucleus Project. HUMN Project: Detailed Description of the Scoring Criteria for the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Isolated Human Lymphocyte Cultures *Mutation Research* 2003; 534(1-2): 65–75
29. Savage J.R. Classification And Relationships of Induced Chromosomal Structural Changes. *Journal of Medical Genetics* 1976; 13(2): 103-122.
30. Miyawaki J., Sakayama K., Kato H., Yamamoto H., Masuno H. Perinatal and Postnatal Exposure to Bisphenol A Increases Adipose Tissue Mass and Serum Cholesterol Level in Mice. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2007; 14(5): 245-252.
31. Honma S., Suzuki A., Buchanan D.L., Katsu, Y., Watanabe H., Iguchi T. Low Dose Effect of in Utero Exposure to Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Female Mouse Reproduction *Reproductive Toxicology* 2002; 16(2): 117-122.
32. Kobayashi K., Miyagawa M., Wang R.S., Sekiguchi S., Suda M., Honma T. Effects of in Utero and Lactational Exposure to Bisphenol A on Somatic Growth and Anogenital Distance in F1 Rat Offspring. *Industrial Health* 2002; 40(4): 375-381.
33. Tan B.L., Kassim N.M., Mohd M.A. Assessment of Pubertal Development in Juvenile Male Rats After Sub-Acute Exposure to Bisphenol A and Nonylphenol. *Toxicology Letters* 2003; 143(3): 261-270.
34. Takahashi O., Oishi S. Testicular Toxicity of Dietarily or Parenterally Administered Bisphenol A in Rats and Mice *Food and Chemical Toxicology* 2003; 41(7): 1035-1044.
35. European Commission, Scientific Committee On Toxicity, Ecotoxicity and The Environment. *Opinion On The Results Of The Risk Assessment Of: Bisphenol A Human Health*. Brussels. 2002.
36. Naik P., Vijayalaxmi K.K. Cytogenetic Evaluation for Genotoxicity of Bisphenol-A in Bone Marrow Cells of Swiss Albino Mice *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2009; 676(1): 106-112.
37. Pfeiffer E., Rosenberg B., Deuschel S., Metzler M. Interference with Microtubules and Induction of Micronuclei In Vitro by Various Bisphenols. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 1997; 390(1): 21-31.

38. Pacchierotti F., Ranaldi R., Eichenlaub-Ritter U., Attia S., Adler I.D. Evaluation of Aneugenic Effects of Bisphenol A in Somatic and Germ Cells of the Mouse *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2008; 651(1): 64-70.
39. Cavin C., Mace K., Offord E.A., Schilter B. Protective Effects of Coffee Diterpenes Against Aflatoxin B 1-Induced Genotoxicity: Mechanisms in Rat and Human Cells *Food and Chemical Toxicology* 2001; 39(6): 549-556.
40. Yilmaz S., Atessahin A., Sahna E., Karahan I., Ozer S. Protective Effect of Lycopene on Adriamycin-Induced Cardiotoxicity and Nephrotoxicity *Toxicology* 2006; 218(2): 164-171.
41. Yousef M.I., Saad A.A., El-Shennawy L.K. Protective Effect of Grape Seed Proanthocyanidin Extract Against Oxidative Stress Induced by Cisplatin in Rats *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47(6): 1176-1183.