

Epigenetik Etkileri Olan Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler: Bisfenol A

Received : 11.10.2016
Revised : 08.12.2016
Accepted : 28.12.2016

Pınar Erkekoğlu^{o*}, Belma Koçer-Gümüsel*

Özet

Son yıllarda epigenetik mekanizmaların gen ifade değişikliklerine neden olduğu ve bu değişikliklerin de başta kanser olmak üzere birçok hastalığın ortaya çıkmasında rol oynadığı çok sayıda kapsamlı çalışma ile gösterilmiştir. İnsanların yaygın olarak maruz kaldığı bazı çevresel kirleticilerin epigenetik değişikliklere neden olarak bazı hastalıkların patogenezinde rol oynadıklarını gösteren veriler bulunmaktadır. Bisfenol A (BPA) en yaygın maruz kalınan çevresel kirleticilerden olup, başta plastik sanayi olmak üzere endüstride pek çok alanda kullanımı olan bir kimyasal maddedir. BPA'nın yaşamın farklı dönemlerinde farklı epigenetik etkilerinin bulunduğu ve bu etkilerin fertilitate ve kanser gelişimi gibi geniş bir yelpazede sonuçlarının olduğu bilinmektedir. Bu derleme kapsamında epigenetik mekanizmalar incelenecektir ve BPA'nın epigenetik etkilerinin değerlendirildiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların sonuçları sunulacaktır.

Anahtar kelimeler: bisfenol A, epigenetik, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, imprinting

Abstract

Epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals: Bisphenol A

In the last decade, several comprehensive studies showed that epigenetic mechanisms could alter gene expressions and this phenomenon could lead to numerous diseases, particularly to cancer. Data indicate that some environmental contaminants, to which humans are widely exposed to, can cause epigenetic alterations. These alterations can play roles in the pathogenesis of some diseases. Bisphenol A (BPA) is one of the most abundant environmental contaminants and it is a chemical widely used in several fields, specifically in plastic industry. It is known that BPA has epigenetic effects in different periods of life and these effects have wide range of outcomes, like affecting fertility and cancer promotion. In this review, we will mainly focus on epigenetic mechanisms and the results of *in vitro* and *in vivo* studies, in which the epigenetic effects of BPA were evaluated, will be presented.

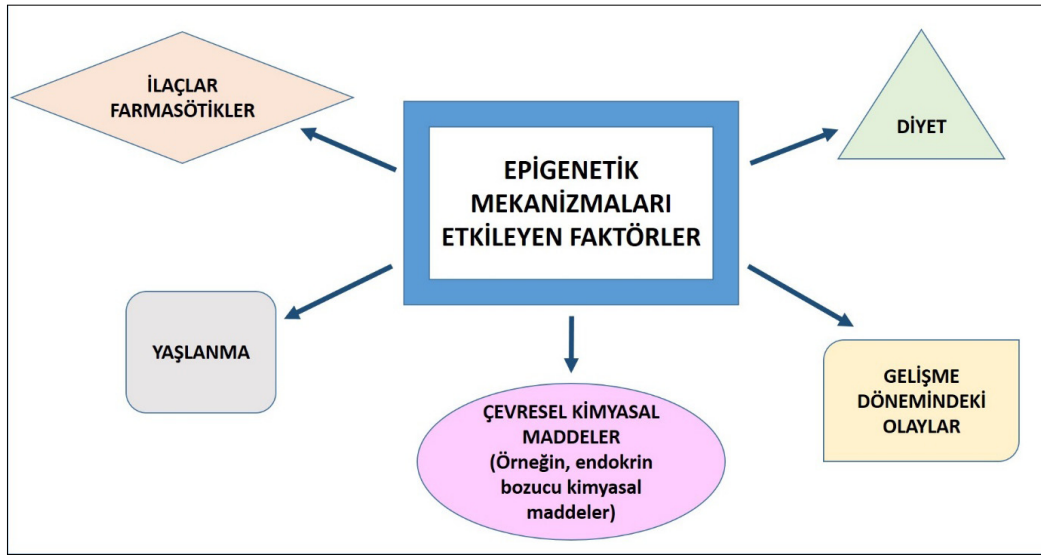
Keywords: bisphenol A, epigenetics, DNA methylation, histone modification, imprinting

* Hacettepe University Faculty of Pharmacy, Toxicology, Ankara, Turkey

^o Yazışma Yapılacak Yazarlar: E-posta: erkekp@yahoo.com, belmagumusel@yahoo.com

1. Giriş

Epigenetik “DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmadan gen ifadesindeki değişiklikler oluşmasını inceleyen bilim dalı” olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik mekanizmalar, hücre farklılaşmaları sırasında ortaya çıkan gen ifadesindeki değişikliklerde önemli rol oynamaktadır. Çevresel etkenler ve henüz tanımlanmamış bazı faktörlerin de katkısıyla “epigenotip” adı verilen bir profil oluşur. Genetik ve epigenetik mekanizmaların birlikte çalışması sonucu gen ifadesinde kalıcı değişiklikler meydana gelir. Genotipin genetik ve epigenetik üzerindeki yansıması ise fenotipi oluşturur. Bazı çevresel kirlenmeler epigenetik mekanizmaları harekete geçirerek genomda kalıcı değişikliklere neden olabilir [1]. Epigenetik mekanizmaları etkileyen faktörler Şekil 1’de gösterilmiştir.

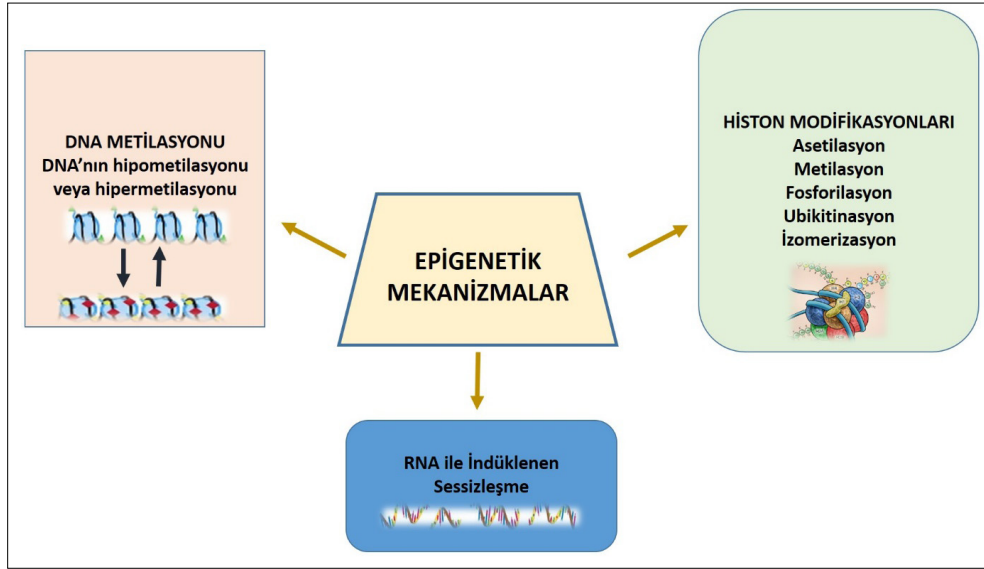


Şekil 1. Epigenetik Mekanizmaları Etkileyen Faktörler

Bu derleme kapsamında epigenetik mekanizmalardan bahsedilecek ve yaygın kullanılan bir plastizer olan bisfenol A (BPA)’nın neden olduğu epigenetik değişiklikler hücre kültürü, hayvan ve insan çalışmaları değerlendirilerek aktarılacaktır. Derlemede kullanılan kaynaklar, Pubmed ve Medline taramaları ile bulunmuştur. Kullanılan anahtar kelimeler, “epigenetics”, “methylation”, “DNA methylation”, “histone modification” ve “imprinting”dir. Bu kelimelerin “bisphenol A” anahtar kelimesi ile birlikte taramaları ile ilgili makalelere ulaşılmıştır. Bu makalelerden İngilizce olanlar seçilmiş ve öncelikle hücre kültürü, hayvan ve insan çalışmaları kategorize edilmiştir. Takiben, çalışmanın metodolojisi ve elde edilen verilerin doğru bir şekilde yorumlanması kriterleri değerlendirilmiş ve her iki kriterde de uyan yayınların sonuçları bu derlemeye dahil edilmiştir.

2. Epigenetik Değişiklikler

Epigenetik değişiklikler birçok farklı mekanizma ile gerçekleşebilir. Bu mekanizmalar arasında en önemlisi metilasyondur. Diğer taraftan, histon modifikasyonları, imprinting, RNA ile indüklenen sessizleşme gibi farklı mekanizmalar ile de epigenetik değişiklikler ortaya çıkabilir [1]. Şekil 2’de epigenetik mekanizmalar özetlenmiştir.



Şekil 2. Epigenetik Mekanizmalar

a. DNA Metilasyonu

Üzerinde en fazla çalışma yapılan epigenetik değişiklik DNA metilasyonudur. C-fosfat-G (CpG) adacıkları sitozin ve guaninin genomik bölgelerde tekrarlanan şekillerde bulunduğu DNA bölgelerinde oluşur. CpG adacıkları, genellikle genlerin promotör bölgelerinde bulunan 0,5-3 kb (genellikle 200 baz çiftinden uzun) uzunluğundaki CpG dinükleotidlerine zengin bölgelerdir. Başta çöp genler (housekeeping genler) olmak üzere insan DNA'sında bulunan genlerin hemen hemen %60-70'inde CpG dinükleotidleri vardır [2]. CpG dinükleotidleri promotör bölgelerin yanı sıra 3'-bölgelerde ve gen yapısında (ekzonik CpG) da bulunabilir. Promotör bölgelerdeki CpG dinükleotidleri gibi genin yapısında bulunan CpG dinükleotidlerinin metilasyonunun da transkripsiyonel aktiviteyi etkilediği bulunmuştur. 5-metilsitozin genellikle CpG dinükleotidlerinde görülmekte birlikte, CpA ve nadir olarak CpT dinükleotidlerinde de görülebilir. Ancak, CpA ve CpT dinükleotidleri somatik hücrelerde görülmez; embriyonik kök hücrelerde görülür [3,4].

DNA metilasyonu, genellikle genetik suskunluğa sebep olur. Ancak, bazı durumlarda gen metilasyonunun geni aktifleştirdiği bilinmektedir. İnsan genomunda genler arasında bulunan tekrar dizilerinde metilasyon gerçekleşebilir. DNA'nın metilasyonu, "DNA metiltransferaz (DNMT)" enzimleri tarafından "metil bağlanma proteinleri" (MBD1, MBD2, MBD3 vb.) yardımıyla katalizlenir. DNA metilasyonunu düzenleyen DNMT ve MBD genlerindeki mutasyonların, meme, mide ve akut myeloid lösemi gibi kanserlerin oluşumunda etkin olduğu bilinmektedir. Anormal DNA metilasyonu "hipermetilasyon" veya "hipometilasyon" şeklinde gerçekleşebilir [5-7]. Bunlardan global hipometilasyon, kanserle ilk ilişkilendirilen metilasyon türüdür. Özellikle tekrarlayan bölgelerde ve bazen de CpG dinükleotidlerinde görülen genomik global hipometilasyon normalde suskun olan genleri aktifleştirmek ve kromozomal kararsızlığa sebep olmak yoluyla tümör gelişimine sebep olabilir. Ayrıca, tümör gelişimi boyunca hipometilasyon derecesi artmaktadır [8-11]. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, spesifik genlerin ve/veya global hipometilasyonun meme, boyun, over, kolorektal, prostat, mesane ve özofagal kanserlerde ve miyeloid lösemide rol oynadığı bulunmuştur [12-18].

b. Histon modifikasyonları

Histon modifikasyonları, kromatin ile ilişkili proteinler ile de etkileşerek, genin transkripsiyon aşamasının düzenlenmesini sağlayan faktörlerdir. Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, S-nitrosilasyon, ubiquitinasyon ve sumolasyon kovalan histon modifikasyonları olarak değerlendirilen mekanizmalardır [19].

c. RNA ile indüklenen sessizleşme

RNA'ların, histon modifikasyonlarının ve DNA metilasyonunun başlaması için itici güç oluşturduğu, böylece heterokromatin bölgenin oluşumuna katkıda bulunarak bu bölgelerin sessizleştirilmesini sağladığı düşünülmektedir [20,21]. Son yıllarda, kodlanmayan RNA (non-coding RNA) adı verilen bazı küçük RNA moleküllerinin epigenetik süreçte rol aldıkları gösterilmiştir. Bu RNA'lara örnek olarak post-transkripsiyonel ve post-translasyonel sessizleştirmelerde görevli olan miRNA (micro RNA), siRNA (small-interfering RNA) ve X kromozom inaktivasyonundan sorumlu olan XIST RNA verilebilir [22-25].

Epigenetik değişikliklerin hücrel olaylarla ilişkisi

Önemli bir mekanizma: İmprinting

İmprinting, “monoallelik gen ifadesi” olarak tanımlanabilir ve bir genin parental kökenine bağlı olarak yalnızca bir kromozomda ifade bulmasıdır [26]. Beckwith-Wiedeman Sendromu, Prader-Willi Sendromu, Angelman Sendromu, Silver-Russell Sendromu ve Albright herediter osteodistrofisi gibi bazı hastalıkların yanı sıra, kanser gelişiminde de imprinting bozukluklarının rolü olduğu bilinmektedir [26,27]. Örneğin, kromatin 15'in q11-13 bölgesindeki delesyonlar Prader Willi Sendromu'na veya Angelman Sendromu'na neden olabilir [26-30]. Hangi sendromun olacağı anormal genin anneden mi, yoksa babadan mı geldiğine bağlıdır. Prader Willi sendromu kromozom delesyonu olmayan fakat her iki 15. kromozomu anneden gelen (uniparental disomy) bireylerde de teşhis edilmiştir. Bu da Prader Willi Sendromu'nun baba kaynaklı 15q11-13'ün yokluğu nedeniyle olduğunu düşündürmektedir [27,31]. Bu nedenle insanın normal gelişimi için 15q11-13 bölgesindeki genin her iki ebeveyninden de kalıtsal olarak aktarılması gereklidir [27,31].

İmprint genler, kromozomlar üzerinde kümeler halinde yerleşir ve birlikte kontrol edilir [26]. İmprinting kontrolü sağlayan bölgelere “imprinting merkezleri (IC)” adı verilir. İmprinting merkezleri, ayırt edici genomik işaretin tanımlanması ve gelişim boyunca bunun sürdürülmesinden sorumludur. Bu bölgeler delesyon haritaları ile tanımlanmıştır. Burada temel prensip, imprinting programını aksatan en küçük delesyonun yakalanmasıdır. Yapılan çalışmalar, farklı kümelerin imprinting merkezlerinin farklı yapıda olduklarını ve işleyiş mekanizmalarının birbirinden değişik olduğunu göstermektedir. İmprinting sürecinde rol oynadığı gösterilen farklı mekanizmalar, imprinting olayının protein sentezini kontrol eden basit mekanizmalardan evrimleştiğini düşündürmektedir. Ancak, IC'lerin nasıl ve hangi proteinler tarafından tanındığı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [32,33].

İmprinting çok basamaklı bir süreç olarak tanımlanmaktadır [34]:

1. Kromozom, parental orijinine göre işaretlenir. Bunun, iki alelin birbirinden fiziksel olarak farklı bölümlerde bulunduğu bir dönemde (gametogenez ya da zigotta çekirdek birleşmesi öncesinde) kazanılan bir özellik olduğu önerilmektedir.
2. Parental orijine özgü işaret hücre bölünmelerinde ve farklılaşma sürecinde korunur ve sürdürülür.
3. Bu işaret transkripsiyonu gerçekleştiren hücresel birimler tarafından tanınır ve böylece monoalelik ifade sağlanır.
4. Parental olarak gelen imprint genler germ hücrelerinde tamamen silinerek yeniden uygun şekilde düzenlenir.

3. Bisfenol A

Bisfenol A dünya çapında en yaygın üretilen kimyasal maddelerden biridir. Sadece 2009 yılında dünyada BPA üretimi 2,2 milyon tonu geçmiştir. 2011 yılında ise yaklaşık 11 milyon pound (yaklaşık 5 milyon ton) üretildiği bildirilmiştir [35-37].

Polikarbonatlar işlenmesi, kalıplanması ve şekillendirilmesi oldukça kolay olan ve geniş kullanım alanına sahip bileşiklerdir. BPA endüstride yaygın olarak kullanılan bir bisfenol türevidir ve üretilen BPA'nın yaklaşık %70-%95'i polikarbonat plastiklerin üretimi için kullanılmaktadır. BPA'nın polimer, epoksi reçine, fungusit, boya, polisülfon ve kauçuk imalatında ara bileşik olarak da kullanımı mevcuttur. Ayrıca, plastik dental dolgularında reçine olarak yaygın kullanımı vardır. Ambalaj endüstrisinde de kullanıldığı bilinmektedir. BPA, konservelerin iç kısımlarının ve bilgisayar ve müzik CD'lerinin dış tabaka kaplanmasında kullanılır. Diğer taraftan, su botaları, su bidonları, su şişeleri, oda kokuları, parfüm, cilt bakım ürünleri ve kozmesötikler gibi ürünlerin bileşimine de girmektedir. BPA'nın üretiminde kullanıldığı polikarbonat plastikler ve epoksi reçineler, genel olarak gıda saklama poşetleri, su, kola, meyve suyu ve bira kutularının iç yüzeyini kaplayan plastik film yapımında ve bebek biberonu gibi ürünlerde bulunur. Yüksek sıcaklığa dayanıklı polikarbonat plastikler yaygın olarak otomotiv sektöründe de kullanılmaktadır [35-40].

BPA'nın çok geniş kullanım alanının olması genel popülasyonun günlük hayatta BPA ile temas etme riskini arttırmaktadır [39,40]. Polikarbonat bebek biberonlarının kaynatılması ile 3.20–7.06 ppb, sterilizasyonu ile 0–46.05 ppb ve epoksi film kaplı konserve kutusundan 80 ppb BPA'nın açığa çıkabildiği belirtilmektedir [38-41]. Diş dolgu maddesi yapımında da polimerik BPA bis-glisididimetaşiralat ve BPA dimetilakrilat kullanılmaktadır. 50 mg diş dolgu maddenin uygulanmasının 1 saat sonrasında 0.05–1 ppm BPA'nın salındığı belirtilmektedir [38,42].

BPA'nın sistemik toksisitesi için advers etki gözlenmeyen doz düzeyi (NOAEL) 75 ppm (5 mg/kg/gün), üreme ve postnatal etkiler için için NOAEL değeri 750 ppm (50 mg/kg/gün) olarak bildirilmiştir [43].

4. Bisfenol A'nın epigenetik etkileri

BPA'nın da plastizer olarak kullanılan ftalatlar gibi epigenetik etkilerinin olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar 3 grupta toplanabilir:

a. Hücre kültürü çalışmaları

İnsan primer meme epitel hücrelerinin düşük doz (4 nM) BPA'ya maruziyeti ile otofajide görev alan bir gen olan lizozomal-assosiyе membran proteini 3'ün (*LAMP3*) CpG adacıklarında metilasyonu arttırdığı ve *LAMP3* geninin ifadesinin baskıladığı belirtilmiştir [44,45]. İnsan meme kanseri MCF7 hücrelerinde BPA'nın (2.5×10^{-4} , 2.5×10^{-5} , 2.5×10^{-6} , 2.5×10^{-7} veya 2.5×10^{-8} M) doz-bağımlı olarak kromatin kondensasyonunu ve epigenetik modülasyondan sorumlu bir gen olan histon metiltransferaz Enhancer of Zeste Homolog 2'nin (*EZH2*) ifadesini arttırdığı bildirilmiştir [46]. Yapılan bir diğer çalışmada, MCF7 meme kanseri hücrelerinde ve overoktemize sıçalarda *EZH2* geninin transkripsiyonunun estradiol uygulaması ile arttığı belirlenmiştir. *EZH2* ifadesinin BPA (5 µg/mL) ve dietilstilbesterol (DES) gibi östrojenik endokrin bozuculara maruziyetle de artabileceği gösterilmiştir. Sonuçta, bu çalışma ile *EZH2*'nin estradiol tarafından in vitro olarak transkripsiyonel olarak regüle edilebileceği ve ifadesinin östrojenik endokrin bozucular tarafından bozulabileceği belirtilmiştir [47].

İnsan plasental hücre kültürlerinin (3A, TCL-1 ve HTR-8) BPA'ya (0.25, 2,5 ve 25 ng/µl) maruziyeti, mikro RNA'ların (miRNA) ifadelerini etkilenmektedir ve spesifik olarak hücre yaşlanması ve inflamasyonunda rolü olduğu düşünülen, sistemik lupus eritematosusta azaldığı ve romatoid artritte arttığı bilinen miR-146a ifadesinin BPA ile indüklendiği belirtilmiştir. Bu da hücrelerde daha yavaş bir proliferasyon hızına neden olmuş ve hücrelerin DNA hasarı oluşturan bir ajan olan bleomisine daha hassas olmasına yol açmıştır [48]. Fare Sertoli hücre hattı TM4'ün 24 saat BPA'ya [inhibitör konsantrasyon 20 (IC20): 20 µg/mL] maruziyeti sonucu 37 miRNA'nın ifadelerinde artış veya azalışa neden olduğu (çoğu miRNA'nın azaldığı) belirtilmiştir [49].

Yapılan bir çalışmada, BPA (200 µM, 250 µM) ve ftalat [di (2-etilhekzil) ftalat (DEHP), 250 µM, 500 µM, 750 µM, 1 mM, 5 mM dozlarda] maruziyetinin domuzlarda oosit olgunlaşması üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonunda, *in vitro* olarak 250 µM BPA'ya maruz bırakılan domuz oositlerinde olgunlaşmanın azaldığı belirlenmiş; ancak DEHP'in böyle bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bunun nedeninin BPA'nın oosit olgunlaşması esnasında hücre siklusunun ilerlemesini geciktirmesi olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, BPA uygulamasının oositlerde anormal hücre iskeleti oluşmasına neden olduğu, bozuk aktin dağılımı, iç iplikçığı morfolojisi ve anormal kromozom dizilimine yol açtığı gözlenmiştir. Bu değişiklikler p-MAPK sinyal yolağındaki azalma ile de değerlendirilmiştir. Ayrıca, BPA uygulaması ile histon metilasyonu (H3K4me2) ve DNA metilasyonu (5 mC) düzeylerinin değiştiği belirlenmiştir. BPA'ya maruz kalan oositlerde erken apoptoz/otofaji görüldüğü belirlenmiştir ve bunun nedeni olarak ise BPA maruziyetinin oksidatif strese neden olması gösterilmiştir. Araştırmacılar sonuçta domuz oositlerinin BPA'ya *in vitro* maruziyetinin bu hücrelerin olgunlaşmasını azalttığını, hücre iskeleti dinamiklerini bozduğu, epigenetik modifikasyonlara neden olduğunu ve hücre ölümünü tetiklediğini belirtmişlerdir [50].

b. Hayvan çalışmaları

Hayvanlarda ve özellikle kemiricilerde BPA'nın epigenetik etkileri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak, bu konudaki çalışmaların özellikle son birkaç yılda ciddi anlamda artış gösterdiği belirlenmiştir.

Bisfenol A'ya İn Utero maruziyet ile gözlenen epigenetik değişiklikler

BPA'ya (5 µg/kg) *in utero* maruz kalan 6 haftalık farelerin memelerinde *EZH2* ifadesini artırdığı ve H3 trimetilasyonunda artışa neden olarak gen ifadesini belirgin şekilde etkilediği belirtilmiştir [46]. İn utero BPA maruziyeti sonrası 2 haftalık dişi yavrularda uterusda gelişimsel homeobox geni olan ve blastokist implantasyonu, fonksiyonel farklılaşma, infertilite ve endometrioziste rolü olduğu bildirilen *Hoxa10* geninin ifadesinin arttığı belirtilmiştir. Bunun nedeni, BPA'nın *Hoxa10* geninin başlatıcı ve intron bölgelerinde bulunan spesifik CpG bölgelerinin belirgin demetilasyonuna yol açmasıdır. Beyin dokusunda yapılan çalışmalarda ise, BPA'ya *in utero* maruziyetin fetal fare beyininde birçok lokusta CpG adacıklarının promotör bölgelerinde hipometilasyonuna veya hipermetilasyonuna neden olduğu belirtilmiştir. 13 lokusta gen-spesifik değişikliklerin olduğu, taşıyıcı proteinleri kodlayan 2 gende de DNA metilasyonunun etkilendiği ve gen ifade profillerinin değiştiği bildirilmiştir [51].

Bisfenol A maruziyeti ile gözlenen epigenetik değişikliklerin kemiricilerde kürk rengi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

Canlı sarı renkte kürkü olan farelerde (viable yellow mice) BPA'ya (50 mg BPA/kg, diyet ile) *in utero* maruziyet sonucu yenidoğan hayvanların kürklerinin rengi canlı sarıdan sarıya dönüşmüştür. Bunun nedeninin BPA'nın *Agouti* geninde IAP retrotransposabl diziliminde CpG metilasyonunun azalması olduğu belirtilmiştir. Diğer taraftan, maternal diyetsel metil grubu suplementasyonu (folik asit veya genistein) ile bu hayvanların kürk rengindeki değişimin engellenebileceği bildirilmiştir [52].

Bisfenol A maruziyeti ile gözlenen epigenetik değişikliklerin kemiricilerde kuyruk metilasyon kalıpları üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

Yapılan bir çalışmada, BPA'ya (50 mg BPA/kg, diyet ile) erken maruziyet ile birlikte farklı diyet (Akdeniz ve Batı) uygulamaların izogenik farelerde (3 hafta-10 ay arası) kuyruk dokusunda metilasyon kalıplarını etkilediği belirlenmiştir. Metilasyon kalıpları tekrarlayan elemanların (LINE-1, IAP), iki imprint genin (*Igf2*, *H19*) ve bir imprint olmayan genin (*Esr1*) piro-dizilemesi yöntemiyle değerlendirilmiştir. Yaşla birlikte kuyruk dokusunda LINE-1, IAP ve *H19* metilasyonu belirgin bir şekilde azalmış, *Esr1* metilasyonu ise artmıştır. IAP geninin metilasyonunda Batı diyetiyle ($p=0.058$) ve Batı diyeti + BPA maruziyetiyle ($p=0.051$) marjinal negatif bir değişiklik gözlenmiş, *Igf2*'de ise yaşamın erken dönemlerinde Batı diyetiyle bağlantılı metilasyon değişiklikleri belirlenmiştir ($p=0.027$). Araştırmacılar DNA metilasyonunu yaşla birlikte değiştiği ve gelişim döneminde ise farklı diyetlerle beslenmenin yaş-bağımlı metilasyon kalıplarını etkilediği belirtilmiştir [53].

Bisfenol A maruziyeti ile gözlenen epigenetik değişikliklerin kemiricilerde spermatogenez ve fertilité üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

Neonatal ve transjenerasyonel BPA [50 mg/kg/gün, oral medyan letal dozun (LD50) %1'i] maruziyetinin Sprague Dawley sıçanların testisinde ERlerin başlatıcı bölgelerindeki hipermetilasyonu indüklediği belirtilmiştir [54]. Bu da yapılan bir başka çalışma (neonatal Holtzman

erkek sıçanlara 2.4 µg/gün BPA subkütan uygulaması, postnatal 1.-5. günler arasında) ile de gösterilen BPA'nın spermatogenez ve fertilité üzerindeki ters etkilerinin altında metilasyondaki değişikliklerin yattığına işaret etmektedir [55].

Bisfenol A maruziyeti ile gözlenen epigenetik değişikliklerin kemiricilerde glikoz intoleransı üzerine etkileri

BPA'nın erişkin kemiricilerde ve fetal maruziyet sonrası epigenetik modifikasyonlara yol açtığı ve glikoz intoleransına neden olduğu bilinmektedir. Ancak, BPA'nın ikinci jenerasyondaki epigenetik ve glikoz intoleransı üzerine etkilerine dair veri bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada Sprague-Dawley gebe sıçanlara (F0 jenerasyonu) 40 µg/kg/gün BPA gestasyon ve laktasyon boyunca uygulanmıştır. Takiben, doğan F1 jenerasyonundaki sıçanlar çiftleştirilmiş ve F2 jenerasyonu elde edilmiştir. F1 ve F2 jenerasyonlarına herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre, F2 jenerasyonundaki erkek yavrularda glikoz intoleransı ve β-hücre disfonksiyonu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, erkek yavrularda Igf2 ifadesinin azaldığı ve pankreas β-adacıklarında Igf'nin hipermetilasyonunun gözleendiği belirtilmiştir. Benzer etkiler dişi yavrularda da görülmüş; ancak etkilerin şiddetinin erkeklerde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca erişkin erkek F1 jenerasyonunda spermde Igf2'nin anormal ifadesi ve metilasyonu gözlenmiştir ve bu da germ hücrelerindeki epigenetik modifikasyonların kısmen de olsa F2 jenerasyonuna aktarılabilceğini göstermektedir. Araştırmacılar, sonuç olarak yaşamın erken dönemlerinde BPA maruziyetinin glikoz intoleransı ve β-hücre disfonksiyonuna neden olduğunu ve bunun da nesiller arası geçişinin mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, germ hücrelerindeki epigenetik değişikliklerin BPA'nın neden olduğu bu değişikliklerin nesiller arası aktarılmasında etkin olduğunu ifade etmişlerdir [56].

Bisfenol A maruziyeti ile gözlenen epigenetik değişikliklerin kemiricilerde prostat kanseri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi ve prostat kanserinde biyogösterge olarak kullanılması

Sıçanların BPA'ya neonatal maruziyetinin mesane ve prostat kanserlerinde ifadesinin arttığı bildirilen nükleozom bağlayıcı protein-1'i (Nsbp1) kodlayan genin ve pankreatik kanser biyogöstergesi olarak kullanılan hippokalsin-benzeri 1'i (Hpcal1) kodlayan genin başlatıcı bölgelerinin metilasyonunu değiştirdiği ve buna bağlı olarak da bu genlerin ifadelerini etkilediği bildirilmiştir [57,58]. BPA'ya (0.1 µg/kg vücut ağırlığı, 10 µg/kg vücut ağırlığı ve 25 mg/kg vücut ağırlığı subkütan, postnatal 1., 3., ve 5. günde, boyundan uygulama ile) neonatal maruziyetin Sprague-Dawley sıçanlarda 28. haftada doz-bağımlı prostat intra-epitelyal neoplazinin insidansında artışa neden olduğu bildirilmiştir ve prostat dokusunda belirgin metilasyon değişikleri belirlenmiştir. Gebe sıçanların BPA ve ftalatlara geçici olarak maruz kalmasının F3 jenerasyonu dahil, 3 kuşakta da farklı DNA metilasyon kalıplarının oluşmasına neden olduğu belirtilmiştir. Gelişimsel etkiler değerlendirildiğinde, BPA ve ftalatların oldukça belirgin etkilerinin olabileceği bildirilmiştir. Örneğin, sıçanlarda fosfodiesteraz tip 4 varyant 4 geninin (PDE4D4) regülatör CpG adacıklarında hipometilasyona neden olduğu ve sıçanlar erişkin yaşa geldiğinde prostatlarında gen ifadelerinin arttığı gösterilmiştir [57,58].

17β-estradiol-3-benzoat (EB) ve BPA'ya maruziyetin kemiricilerde prostat kanserine duyarlılığı arttırdığı belirtilmiştir. Genomik yapının ve CpG adacıklarının belirlenmesi için "Metile-CpG adacığı gerikazanım yöntemi"nin (MIRA) kullanıldığı bir araştırmada, postnatal 1., 3. ve 5. günlerde 2.500 µg/kg vücut ağırlığı EB veya 10 µg/kg vücut ağırlığı BPA uygulamalarına bağlı "metilom" değişiklikleri Sprague-Dawley sıçanlarda postnatal 90. günde dorsal prostat

dokuları incelenerek değerlendirilmiştir. Farklılaşmış metilasyon bölgeleri ile ilgili 111 gende EB bağımlı, 86 gende BPA bağımlı değişiklikler görülmüş olup, değişikliklerin görüldüğü ortak gen sayısı 20 olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, bisülfid dizilemesi ile metilasyon ile ilgili olduğu belirtilen 15 aday genin yedisinde (Pitx3, Wnt10b, Paqr4, Sox2, Chst14, Tpd52, Creb314) ifade değişikliklerinin görüldüğü de belirtilmiştir. Diğer taraftan, 5-aza-sitidine maruz bırakılan normal (NbE-1) ve kanser (AIT) sıçan prostat hücrelerinde bu yedi genden altısında (Paqr4 hariç) DNA-metilasyon bağımlı gen ifade değişiklikleri görülmüştür. Bu genlerin fonksiyonel olarak embriyonik kök hücre pluripotensiyle bağlantılı olduğu da belirtilmiştir. Diğer taraftan, elde edilen veri setinin Kanser Genom Atlası (TCGA)'nın kümeleme analizi ile değerlendirilmesi sonucu, bu yedi genin prostat kanseri hastalarında hastalığın tekrarlamadan kişinin kansersiz olarak hayatına devam edebilmesi ile ilgili olduğu da belirlenmiştir. Sonuçta, araştırmacılar sıçanlarda yaşamın erken dönemlerinde endokrin bozucu kimyasal maddelere maruziyetin gen-spesifik promotör metilasyon değişikliklerine neden olduğunu ve bu değişikliklerin de prostat kanserinin tekrarlamasında öngörülsele epigenetik biyogösterge olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir [59].

Bisfenol A maruziyeti ile gözlenen epigenetik değişikliklerin kemiricilerde karaciğer üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

Yapılan bir çalışmada, perinatal olarak BPA'ya maruz kalan (50 ng BPA/kg, 50 µg BPA/kg, or 50 mg BPA/kg içeren yemler ile) ve karaciğer tümörü olan ve olmayan farelerin erişkin dönemlerinde (10 aylık) epigenom-çapında DNA metilasyon profilleri incelenmiştir. Hepatik tümörü olan farelerin tümörü olmayan hayvanlara göre [12,822 problemleri (%1,8) vs. 8,656 (%67,5)] diferansiyel metilasyon kalıplarının farklı olduğu ve özellikle morfojen, gelişme ve epigenomik değişimle ilgili gen metilasyon kalıplarının belirgin bir fazlalık gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan, BPA'nın nöronal sinyalleşme yollarını hipermetilasyona yol açarak bozduğu ve karaciğerde enerji regülasyonu, metabolik fonksiyon ve ilgili metabolik yolları etkilediği belirtilmiştir. Ayrıca, BPA maruziyetinin insan ve farelerde hepatik intrasellüler Jak/STAT ve MAPK sinyal yolağını etkilediği bildirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, deney hayvanlarında yapılan epigenom-çapında analizlerin insan hastalıklarının temellerinin belirlenmesi için önemli olduğu belirtilmiştir [60].

Bisfenol A maruziyeti ile gözlenen epigenetik değişikliklerin kemiricilerde meme dokusu ve meme kanseri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

Meme gelişmesinde önemli rolü olan homeobox-içeren bir gen olan HOXB9'un meme ve diğer bazı tip kanserlerde anahtar bir rolü olduğu bilinmektedir. HOXB9 geninin ifadesinin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak estradiol ile regüle edildiği bilinmektedir. Çok yakın zamanda yapılan bir çalışmada BPA maruziyetinin overektomize sıçanların meme dokularında (25 µg/kg vücut ağırlığı BPA) ve insan meme kanseri hücreleri (MCF7) (0.1, 1, 10, 100 ve 1000 nM BPA) üzerine etkileri incelenmiştir. BPA maruziyeti ile hem meme dokusunda hem de MCF7 hücrelerinde HOXB9 geninin ifadesinin arttığı; ancak bu etkinin doz-bağımlı olmadığı, özellikle 1 ve 10 nM uygulamalarda MCF7 hücrelerindeki artışın daha belirgin olduğu; 0.1 ve 100 nM uygulamalar ile benzer bir artışın görüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca, HOXB9 geninin promotör bölgesindeki ERElerin BPA ile indüklendiği lusiferaz yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuçta, aynı estradiol gibi BPA maruziyetinin de meme hücrelerinde transkripsiyonunu ve kromatin modifikasyon faktörlerini artırarak hem *in vitro*, hem de *in vivo* olarak HOXB9 gen ifadesini arttırdığı belirtilmiştir [61].

Lamartiniere ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, meme kanserinin dimetilbenz[a] antrasen ile (DMBA) (doğumdan sonra 50. günde 30 mg/kg vücut ağırlığı) indüklendiği hayvan modelinde (F433 sıçan), prenatal (konsepsiyon sonrası 2. günden 20. güne dek 25 and 250 µg/kg, oral) ve postnatal oral olarak düşük doz BPA (doğum sonrası ikinci gönden yirminci güne dek 0, 25 ve 250 µg/kg vücut ağırlığı) maruziyetinin laktasyondaki yavrularda tümör latent süresini doz-bağımlı olarak kısalttığı ve tümör sayısını yine doz-bağımlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. DMBA uygulamasını takiben BPA verilmesi sonucu oluşan karsinojenik cevapta, meme bezinde hücre proliferasyonunun artması, apoptozun azalması ve steroid reseptör ko-aktivatörleri (SRClar) 1-3 ve erbB3'nin ifadelerinin artışı ve de Akt sinyalleşmesinin artışının etkili olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, BPA'ya prenatal maruziyet sonrası sıçanlarda 100 günden itibaren tümör sayısı ve sıklığının arttığı; ancak bu artışın doza bağlı olmadan gerçekleştiği bildirilmiştir. Proteomik veriler, BPA maruziyetinin protein metabolizmasını, sinyal iletimini, gelişimsel işlevleri, hücre döngüsünü ve proliferasyonunu regüle eden birçok genin ifadesini değiştirdiğini göstermiştir. Özellikle ER α , SRC1-3, Bcl-2, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), fosfo-IGF-1R, fosfo-c-Raf, fosfo-ERKler 1/2, fosfo-ErbB2 ve fosfo-Akt'deki artışın hücre proliferasyonunu artırabileceği bildirilmiştir. Sonuçta, araştırmacılar, prenatal ve erken postnatal BPA maruziyetinin kimyasal maddelerle indüklenen meme kanserine yatkınlığı artırabileceğini belirtmişlerdir [62].

Bir antisens transkript olan uzun kodlamayan RNA HOTAIR'in genlerin sessizleştirilmesinde ve meme kanserinde anahtar bir role sahip olduğu bilinmektedir. RNA HOTAIR'in estradiol ile transkripsiyonel olarak regüle edildiği bildirilmiştir. Bhan ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada HOTAIR ekspresyonunun BPA ve DES'den etkilenip etkilenmediği araştırılmıştır. Bunun için MCF7 hücreleri ve sıçanların meme dokuları kullanılmıştır. Sprague-Dawley sıçanlara BPA (25 µg/kg), estradiol (5 µg), veya DES (5 µg/kg) uygulaması dekapitasyondan 24 ve 4 saat önce iki kez uygulanmıştır ve meme dokuları toplanmıştır. MCF7 hücrelerine uygulama 0.1 nM estradiol, 100 nM BPA ve 10 nM DES olacak şekilde ayrı ayrı veya kombinasyon şeklinde 4 saat boyunca yapılmıştır. Sonuçta, BPA ve DES'in hem in vitro, hem de in vivo olarak HOTAIR ifadesini arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, lusiferaz testi HOTAIR promotör ERElerin BPA ve DES ile arttığı görülmüştür. BPA ve DES varlığında ERler ve MLL1 ve MLL3 gibi ER koregülatörlerinin HOTAIR promotör ERElerine bağlanmasını indüklendiği ve bunun da histon metilasyon ve asetilasyonundaki değişiklikler nedeniyle komatin yapısını etkilediği ve gen aktivasyonuna yol açtığı belirtilmiştir. ER'lerin "knockdown"u BPA ve DES ile indüklenen HOTAIR ifadesini azaltmıştır. Araştırmacılar, sonuçta BPA ve DES'in HOTAIR promotörleri üzerinden epigenetik programlamayı değiştirdiklerini belirtmişlerdir [63].

Dhimolea ve ark. (2014) yaptıkları bir çalışmada, BPA'nın meme dokusunda neden olduğu gen ekspresyon değişikliklerini, morfogenetik olayları ve epigenetik etkilerini incelemek amacıyla, Wistar-Furth sıçanlara subkütan olarak osmotik pompalarla taşıyıcı veya BPA'nın duktal karsinomaları indüklediği gösterilmiş bir dozu (250 mg/kg) 9. gestasyonel günden ilk postnatal güne dek uygulamışlardır. Bu dişiler postnatal 4., 21. ve ilk östrosun görüldüğü 50. günde dekapite edilmiş ve takiben meme dokularından genomik DNA (gDNA) izole edilmiştir. gDNA takiben 5-metilsitozin antikorumlarıyla immuno-presipitasyona tabi tutulmuştur. gDNA'daki metilasyon düzeyinin tayini ve kantifikasyonu Nimblegen CHIP array ile gerçekleştirilmiştir. Deney sonunda, 58207 segment analiz edilmiş ve bunlardan 7412 adet segmentte farklı metilasyon kalıplarının görüldüğü belirlenmiştir. Bu değişikliklerin çoğu postnatal 21. günde belirlenmiştir.

Yapılan transkripsiyonel analiz ise, transkripsiyonel değişikliklerin postnatal 50. günde ortaya çıktığını göstermiştir. BPA maruziyetinin, postnatal 4. günde α -laktalbumin geninin transkripsiyonel başlama bölgesinde H3K4 trimetilasyonunun pro-aktivasyonunu önemli ölçüde arttırdığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, BPA maruziyetinin postnatal olarak ve erişkinlikte meme bezi epigenomu değiştirdiğini ve gen ekspresyon kalıplarını etkilediğini bildirmişler ve bu olayların erişkinlikte pre-neoplastik ve neoplastik olaylara neden olabileceğini ifade etmişlerdir [64].

Overoktemize sıçalarda EZH2 geninin transkripsiyonunun estradiol uygulaması ile arttığı belirlenmiştir. EZH2'nin promotör bölgesinin birçok işlevsel östrojen cevap elemanı (EREler) içerdiği, östrojen reseptörleri (ERler) ve bunların yardımcı düzenleyici moleküllerinin [örneğin, miks lineaj lösemi (MLL) histon metilazlar (MLL2 ve MLL3), histon asetil transferaz CBP/P300] estradiol varlığında EZH2'nin promotör bölgesine bağlanarak estradiol (sıçanlara uygulamada 5 μ g, dekapitasyondan 24 ve 4 saat önce; MCF7 hücrelerine uygulamada 5 μ g/mL) ile indüklenen EZH2 ifadesini düzenlediği bildirilmiştir. EZH2 ifadesinin BPA ve dietilstilbestrol (DES) gibi östrojenik endokrin bozuculara maruziyetle de in vivo artabileceği gösterilmiştir. Estradiole benzer şekilde BPA (sıçanlara uygulamada 25 μ g/kg vücut ağırlığı, dekapitasyondan 24 ve 4 saat önce) ve DES'in (sıçanlara uygulamada 5 μ g/kg, dekapitasyondan 24 ve 4 saat önce), EZH2 ifadesini indüklemesi ERler, MLLler ve histon asetil transferaz CBP/P300 tarafından kontrol edilmektedir. Sonuçta, araştırmacılar EZH2'nin estradiol tarafından in vivo olarak transkripsiyonel olarak regüle edilebileceğini ve ifadesinin BPA ve DES tarafından bozulabileceğini belirtmişlerdir [47].

Bisfenol A maruziyeti ile gözlenen epigenetik değişikliklerin kemiricilerde uterus kanseri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

Eker ve Sprague Dawley sıçanlarda yapılan bir çalışmada, bir fitoöstrojen olan gensitein (GEN, 50 mg/kg vücut ağırlığı) ve BPA'nın (postnatal 12. günde subkütan olarak 50mg/kg vücut ağırlığı, 50 μ g/kg, vücut ağırlığı veya 50ng/kg vücut ağırlığı) gelişimsel programlama kalıpları ve uterusu tümörözenezin (leiomyomalar) başlaması üzerine etkileri DES (1mg/kg vücut ağırlığı) ile karşılaştırılarak incelenmiştir. GEN ve BPA'nın gelişen uterusu ER sinyalleşmesini indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca, sadece GEN'in EZH2'ye PI3K/AKT non-genomik ER sinyalleşmesini indüklediği görülmüştür. Sonuçta, pre-genomik sinyalleşmenin EZH2'yi fosforile ettiği ve baskıladığı ve kromatinde H3K27 represif işaretini azalttığı belirtilmiştir. Bu olaylara ek olarak, GEN'in erişkinlikte miyometriyumdaki östrojen cevap genlerinde hormona karşı aşırı cevap verme eğilimi yarattığı ve östrojen cevap genlerinin BPA'ya maruz kalan uterusu baskılandığı bildirilmiştir. Daha da önemlisi, EZH2'nin bu bağlanma kalıbının azaldığı, H3K27 metilasyonunun ksenoöstrojenlerin bu etkileri ile korele bir şekilde arttığı belirlenmiştir. GEN'in neden olduğu gelişimsel yeniden programlamanın tümör insidansını, sayısını ve uterusu leiomyomaları arttırdığı; buna karşın BPA maruziyetinin bu tip etkilerinin olmadığı görülmüştür. Elde edilen bu veriler çevresel östrojenlere maruziyetin gelişen uterusu non-genomik etkilerinin olabileceğini göstermiştir. Araştırmacılar, sonuçta bu maddelerin etkilerinin gelişimsel yeniden programlamada ve uterus tümörözenezde epigenetik regülatör bir molekül olan EZH2'ye bağlanmaları ve kromatinde H3K27 metil işaretini azaltmaları ile orantılı olduğunu ifade etmişlerdir [65].

c. İnsan çalışmaları (insan dokuları/fetal dokuları ile çalışmalar)

Bisfenol A'ya Yaşamın erken dönemlerinde maruziyet ile gözlenen epigenetik değişiklikler

Gebeliği farklı nedenlerle istenerek sonlandırılan annelerden izinle alınan fetal karaciğer örneklerinde yapılan çalışmalarda, DNA metilasyonuna BPA'nın etkisi "epigenom çapında metilasyon analizi" yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Fetal karaciğer örnekleri düşük (<0.83 ng/g), orta (3.5-5.79 ng/g), ve yüksek (35.44-96.76 ng/g) olarak gruplandırılmış; BPA içeren fetal karaciğer örneklerinde farklı genomik bölgelerde metilasyon kalıplarının değiştiği gözlenmiştir. Genelde BPA'ya maruziyet CpG adacıklarının metilasyonu ile pozitif korele, CpG adacıklarına komşu bölgeler ve tekrarlayan bölgelerin metilasyonu ile negatif korele olarak bulunmuştur. SNORD imprint clusterdaki (15q11q13) DNA metilasyonunun maruz kalınan BPA düzeyleri ile hem lineer, hem de non-monotonik bir ilişki gösterdiği belirlenmiştir. İntegre metilasyon ve RNA-dizileme gen ifadesi analizi yöntemi kullanılarak düşük BPA maruziyetinin transkripsiyonun diferansiyel regülasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, BPA maruziyeti arttıkça ligand-bağlayıcı proteinlerin RNA ifadelerinin de değiştirdiği de rapor edilmiştir. Sonuçta, araştırmacılar insan fetal karaciğer dokusunda DNA metilasyonunun BPA maruziyeti ile kompleks lineer ve non-monotonik, aynı zamanda da dizi-bağımlı bir etkileşim gösterdiğini belirlemişlerdir [66].

Bisfenol A'ya gelişimsel maruziyet ile hem insan hem de farelerde farklı bölgelerde DNA metilasyonunun etkilendiği bilinmektedir. Ancak yakın zamanda yapılan bir çalışmada, BPA maruziyetinin tekrarlayan elemanlar ve transpozonlar üzerindeki etkileri yeni jenerasyon veri dizileme RepeatMaster analizi ile incelenmiştir. Yem (0, 50, or 50,000 ng/g) ile gestasyon ve laktasyon esnasında BPA'ya maruz bırakılan farelerde ve yukarıda bahsedildiği şekilde düşük (<0.83 ng/g), orta (3.5- 5.79 ng/g), ve yüksek (35.44-96.76 ng/g) şekilde gruplandırılan BPA içeren fetal karaciğer örneklerinde transpozon metilasyon değişiklikleri değerlendirilmiştir. Orta düzey maruziyet ile düşük ve yüksek derecede BPA içeren gruplarla karşılaştığında hipometilasyon görüldüğü belirlenmiştir. İnsan örneklerinde BPA'dan etkilenen ve belirgin diferansiyel DNA metilasyonu gösteren 1251 bireysel transpozon lokusu olduğu görülmüştür. Farelerde ise, BPA'dan etkilenen sadece 19 lokus belirlenmiştir. Ayrıca, BPA maruziyeti ile farelerde tekrarlayan elemanlarda belirgin diferansiyel DNA metilasyon değişiklikleri olmadığı görülmüştür [67].

Bisfenol A'ya uzun süreli maruziyetin sonucu oluşan toksisitenin altında yatan mekanizmalar halen değerlendirilmektedir. Bu mekanizmalar gelişim sırasında epigenetik programlamanın bozulmasını da içermektedir [68]. BPA'nın epigenetik etkileri Tablo 1'de özetlenmiştir.

5. Sonuç ve tartışma

Epigenetik bilimi son yıllarda yeni birçok tekniğin de geliştirilmesiyle araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. Birçok hastalıkta epigenetik değişikliklerin görülmesi ve bu değişikliklerin belirlenerek literatüre girmesi ile bu alanda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Son birkaç yıldır fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların yol açabileceği epigenetik değişiklikler üzerine de çok sayıda çalışma yapılmakta ve bu çalışmalar hızla yayınlanmaktadır.

Çevresel kimyasal maddelerin farklı hücrelerde oluşturabilecekleri epigenetik değişimlerin altında yatan mekanizmaların değerlendirilmesi gerekmektedir. Özellikle endokrin bozucularla ortaya çıkabilecek bu tip değişikliklerin belirlenmesi, bu maddelerin toksisite mekanizmalarının değerlendirilmesinde oldukça önemlidir. Epigenetik değişiklikler sonucu ortaya çıkabilecek gen ifadesindeki değişimler incelenmeli ve olası biyogöstergelerin geliştirilmesine yönelik veriler elde edilmelidir.

Tablo 1. BPA'nın epigenetik etkileri

<i>Etkilenen genetik eleman (DNA/Gen/RNA/Transpozon)</i>	<i>Organizma</i>	<i>Sonuç</i>
LAMP3 [44,45]	İnsan primer meme epitel hücreleri	LAMP3 CpG adacıklarında metilasyonun artması ve LAMP3 geninin ifadesinin baskılanması
EZH2 [46]	MCF7 hücreleri	EZH2 ifadesinde artış
EZH2 [46]	Fare	EZH2 ifadesinde artış
H3 trimetilasyonu [46]		H3 trimetilasyonunda artış
miRNA [47]	İnsan plasental hücre kültürü	miR-146a ifadesinin BPA ile indüklenmesi
DNA metilasyonu [49]	Domuz oositi	Bozuk aktin dağılımı, iç iplikçığı morfolojisi ve kromozom dizilimi
Histon metilasyonu		
Hoxa10 [50]	Fare	Hoxa10 geninin başlatıcı ve intron bölgelerinde bulunan spesifik CpG bölgelerinde belirgin demetilasyon
Agouti [51]	Fare	Agouti geninde IAP retrotransposabl diziliminde CpG metilasyonunun azalması
LINE-1, IAP, H19, Esr1 genleri [52]	Fare	LINE-1, IAP ve H19 metilasyonu belirgin bir şekilde azalmış, Esr1 metilasyonu ise artış
Östrojen reseptörleri [53]	Sıçan	Testiste östrojen reseptörlerin başlatıcı bölgelerinde hipermetilasyonu indüklenmesi
Igf2 [55]	Sıçan	Igf2 hipermetilasyonu
PDE4D4 [56,57]	Sıçan	PDE4D4 regülatör CpG adacıklarında hipometilasyona
Pitx3, Wnt10b, Paqr4, Sox2, Chst14, Tpd52, Creb3l4 genleri [58]	Sıçan	Pitx3, Wnt10b, Paqr4, Sox2, Chst14, Tpd52, Creb3l4 genlerinde ifade değişiklikleri
HOXB9 geni [60]	Sıçanların meme dokusu İnsan meme kanseri hücreleri	HOXB9 geninin ifadesinde artış HOXB9 geninin promotör bölgesindeki ERElerde artış
CpG adacıklarının metilasyonu [61]	Fötal karaciğer örnekleri	CpG adacıklarının metilasyonu ile pozitif korelasyon, CpG adacık kıyı, raf ve tekrarlayan bölgelerin metilasyonu ile negatif korelasyon
SNORD imprint clusterdaki (15q11q13) DNA metilasyonu [61]	Fötal karaciğer örnekleri	BPA ile hem lineer, hem de non-monotonik bir ilişki
1251 bireysel transpozon lokusu [62]	İnsan	Belirgin diferansiyel DNA metilasyonu
19 bireysel transpozon lokusu [62]	Fare	Belirgin diferansiyel DNA metilasyonu

Bisfenol A çevrede çok yaygın bulunan bir plastizerdir. Özellikle polikarbonat plastiklerin üretimi ve ambalaj endüstrisinde yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. BPA'nın farklı epigenetik etkileri sınırlı sayıda hücre kültürü, hayvan ve insan çalışması ile incelenmiştir. Bu kimyasal maddeyle indüklenen epigenetik değişikliklerinin hayat boyu kalıcı olabileceği belirlenen çalışmalar bulunmaktadır [69,70]. Ayrıca, BPA'nın nöral ve immün bozukluklara yol açabileceği; infertilite, kanser ve diyabet gibi kompleks hastalıkların ileri yaşlarda ortaya çıkmasına neden olabileceği bildirilmiştir [71-77].

BPA'nın epigenetik etkilerinin in vivo olarak incelendiği özellikle meme, uterus ve prostat kanseri ile ilgili çalışmalar literatürde daha çok yer bulmaktadır. BPA'nın gerek meme hücre kültürlerinde, gerekse kemirici meme dokusunda histon modifikasyonları dahil epigenetik de-

ğişikliklere neden olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, gestasyonel veya postnatal erken dönemde BPA maruziyetinin epigenetik değişikliklere neden olarak meme kanseri riskini artırabileceği ve kimyasal maddelerle indüklenen meme karsinogenезinde oluşan tümörlerin sayısını arttırabileceği belirtilmiştir [62-64].

Gelecek yapılacak çalışmalarla, BPA'nın epigenetik etkilerinin maruziyet kesilirse ne kadar süre devam edebileceği veya BPA temasının kesilmesiyle etkilerinin geri dönüşlü olup olmayacağı belirlenmesi gerekmektedir. Diğer taraftan, BPA ile birlikte diğer endokrin bozuculara (özellikle ftalatlara) maruziyetin DNA metilasyonunda ne tip değişiklikler oluşturabileceğinin ve trans-jenerasyonel etkilerin olup olmayacağı hem dişi, hem de erkeklerde daha detaylı incelenmesi gerekmektedir. Böylece endokrin bozuculara maruziyet sonucu ortaya çıkabilecek olası sağlık sorunlarını ve hastalıkları önlemek için daha iyi stratejiler geliştirilebilmesi sağlanabilecektir. Ayrıca, endokrin bozuculara maruziyet sonrası ortaya çıkabilecek toksisitenin önlenmesi için yeni stratejilerin de belirlenmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Jiang Y, Bressler J, Beaudet LA: Epigenetics and human disease. *Annual Reviews of Genetics* 2004, 5:479-510.
2. Chatterjee R, Vinson C: CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012, 1819(7):763-770.
3. Deaton AM, Bird A: CpG islands and the regulation of transcription. *Genes and Development* 2011, 25(10):1010-1022.
4. Kulis M, Queirós AC, Beekman R, Martín-Subero JI: Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013, 1829(11):1161-1174.
5. Meng H, Cao Y, Qin J, Song X, Zhang Q, Shi Y, Cao L: DNA methylation, its mediators and genome integrity. *International Journal of Biological Sciences* 2015, 11(5):604-617.
6. Erdmann A, Halby L, Fahy J, Arimondo PB: Targeting DNA methylation with small molecules: what's next? *Journal of Medicinal Chemistry* 2015, 58(6):2569-2583.
7. Du J, Johnson LM, Jacobsen SE, Patel DJ: DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2015, 16(9):519-532.
8. Dunn BK. Hypomethylation: one side of a larger picture. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003, 983:28-42.
9. Wilson AS, Power BE, Molloy PL: DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007, 1775(1):138-162.
10. Watanabe Y, Maekawa M: Methylation of DNA in cancer. *Advances in Clinical Chemistry* 2010, 52:145-167.
11. Zelic R, Fiano V, Grasso C, Zugna D, Pettersson A, Gillio-Tos A, Merletti F, Richiardi L: Global DNA hypomethylation in prostate cancer development and progression: a systematic review. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2015, 18(1):1-12.
12. Heichman KA, Warren JD: DNA methylation biomarkers and their utility for solid cancer diagnostics. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2012, 50(10):1707-1721.
13. Gokul G, Khosla S. DNA methylation and cancer. *Subcell Biochem*. 2013, 61:597-625.
14. Brennan K, Flanagan JM: Is there a link between genome-wide hypomethylation in blood and cancer risk? *Cancer Prevention Research (Phila)*. 2012, 5(12):1345-1357.

15. Baba Y, Watanabe M, Baba H: Review of the alterations in DNA methylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery Today* 2013, 43(12):1355-1364.
16. Akhavan-Niaki H, Samadani AA: DNA methylation and cancer development: molecular mechanism. *Cell Biochem Biophys.* 2013, 67(2):501-513.
17. Woloszynska-Read A, Zhang W, Yu J, Link PA, Mhawech-Fauceglia P, Collamat G, Akers SN, Ostler KR, Godley LA, Odunsi K, Karpf AR: Coordinated cancer germline antigen promoter and global DNA hypomethylation in ovarian cancer: association with the BORIS/CTCF expression ratio and advanced stage. *Clinical Cancer Research* 2011, 17(8):2170-2180.
18. Lam K, Pan K, Linnekamp JF, Medema JP, Kandimalla R: DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: A systematic review. *Biochimica et Biophysica Acta* 2016, 1866(1):106-120.
19. Segre CV, Chiocca S: Regulating the regulators: The Post-Translational Code of Class I HDAC1 and HDAC2. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 2011:690848.
20. Moazed D, Bühler M, Buker SM, Colmenares SU, Gerace EL, Gerber SA, Hong EJ, Motamedi MR, Verdel A, Villén J, Gygi SP: Studies on the mechanism of RNAi-dependent heterochromatin assembly. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 2006, 71:461-471.
21. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK: RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003, 67(4):657-685.
22. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones AP: Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004, 429:457-463.
23. Ghildiyal M, Zamore PD: Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics* 2009, 10(2):94-108.
24. Pratt AJ, MacRae IJ: The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *Journal of Biological Chemistry* 2009, 284(27):17897-17901.
25. Kim YJ, Maizel A, Chen X: Traffic into silence: endomembranes and post-transcriptional RNA silencing. *EMBO Journal* 2014, 33(9):968-980.
26. Bajrami E, Spiroski M: Genomic Imprinting. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 2016, 4(1):181-184.
27. Nicholls RD, Knepper JL: Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Human Genetics* 2001;2:153-175.
28. Jacob KJ, Robinson WP, Lefebvre L: Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: opposite developmental imbalances in imprinted regulators of placental function and embryonic growth. *Clinical Genetics* 2013, 84(4):326-334.
29. Marczak-Hałupka A, Kalina MA, Tańska A, Chrzanowska KH: Silver-Russell Syndrome - Part I: Clinical Characteristics and Genetic Background. *Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism* 2015, 20(3):101-106.
30. Levine MA: An update on the clinical and molecular characteristics of pseudohypoparathyroidism. *Curr Opinions in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 2012, 19(6):443-451.
31. Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM: Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas.* 2011, 69(1):41-49.
32. Pfeifer K: Mechanisms of Genomic Imprinting *American Journal of Human Genetics*, 2000, 67:777-877
33. Sleutels F, Barlow DP, Lyle R: The uniqueness of the imprinting mechanism. *Current Opinions in Genetics and Development* 2000,10:229-233.

34. Fundele RH, Surani MA, Allen ND. Consequences of genomic imprinting for fetal development. In: Reik W, Surani A (eds), *Genomic imprinting*, IRL/Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1997: 98–112.
35. Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A: Endocrine disrupters in the environment IUPAC Technical Report, *Pure and Applied Chemistry* 2003, 75(5):631-681.
36. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR: A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 1998, 36(10):2149-2173.
37. Vom Saal FS, Nagel SC, Coe BL, Angle BM, Taylor JA. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2012, 354(1-2):74-84.
38. Johnson S, Saxena P, Sahu R: Leaching of Bisphenol A from Baby Bottles. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 2015, 85(1):131-135.
39. Olea N, Pulgar R, Pérez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C: Estrogenicity of resin-based composites and sealants in dentistry. *Environmental Health Perspectives* 1996, 104(3):298-305.
40. Vandenberg LN, Hunt PA, Myers JP, Vom Saal FS: Human exposures to bisphenol A: mismatches between data and assumptions. *Reviews in Environmental Health* 2013, 28(1):37-58.
41. Fenichel P, Chevalier N, Brucker-Davis F: Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor. *Annals of Endocrinology (Paris)* 2013, 74(3):211-220.
42. Batra T: Bisphenol-A in canned food products: is it really required? *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 2011, 62(4):381-384.
43. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stropp GD, Waechter JM: Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences* 2002, 68(1):121-146.
44. Weng YI, Hsu PY, Liyanarachchi S, Liu J, Deatherage DE, Huang YW, Zuo T, Rodriguez B, Lin CH, Cheng AL, Huang TH: Epigenetic influences of low-dose bisphenol A in primary human breast epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010, 248(2):111-121.
45. Nagelkerke A, Sieuwerts AM, Bussink J, Sweep FC, Look MP, Foekens JA, Martens JW, Span PN: LAMP3 is involved in tamoxifen resistance in breast cancer cells through the modulation of autophagy. *Endocrine-Related Cancer*. 2014, 21(1):101-112.
46. Doherty LF, Bromer JG, Zhou Y, Aldad TS, Taylor HS: In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Hormones and Cancer* 2010, 1(3):146-155.
47. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Bobzean SA, Perrotti LI, Mandal SS. Histone methyltransferase EZH2 is transcriptionally induced by estradiol as well as estrogenic endocrine disruptors bisphenol-A and diethylstilbestrol. *Journal of Molecular Biology* 2014, 426(20):3426-3441.
48. Avissar-Whiting M, Veiga KR, Uhl KM, Maccani MA, Gagne LA, Moen EL, Marsit CJ: Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. *Reproductive Toxicology* 2010, 29(4):401-406.
49. Cho H, Kim S, Park H.-W, Oh M-J, Yu S, Lee S, Park C, Han J, Oh J-H, Hwang S, Yoon S-J: A relationship between miRNA and gene expression in the mouse sertoli cell line after exposure to bisphenol A. *BioChip Journal* 2010, 4(1):75–81.
50. Wang T, Han J, Duan X, Xiong B, Cui XS, Kim NH, Liu HL, Sun SC: The toxic effects and possible mechanisms of Bisphenol A on oocyte maturation of porcine in vitro. *Oncotarget* 2016, 7(22):32554-32565.

51. Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, Fushiki S: Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008, 376(3):563–567.
52. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL: Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 2007, 104(32):13056–13061.
53. Kochmanski J, Marchlewicz EH, Savidge M, Montrose L, Faulk C, Dolinoy DC: Longitudinal effects of developmental bisphenol A and variable diet exposures on epigenetic drift in mice. *Reproductive Toxicology* 2016, pii: S0890-6238(16)30308-2.
54. Manikkam M, Guerrero-Bosagna C, Tracey R, Haque MM, Skinner MK: Transgenerational actions of environmental compounds on reproductive disease and identification of epigenetic biomarkers of ancestral exposures. *PLoS One*. 2012, 7:e31901.
55. Doshi T, Mehta SS, Dighe V, Balasiner N, Vanage G: Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A. *Toxicology*. 2011;289(2-3):74–82.
56. Mao Z, Xia W, Chang H, Huo W, Li Y, Xu S: Paternal BPA exposure in early life alters Igf2 epigenetic status in sperm and induces pancreatic impairment in rat offspring. *Toxicology Letters* 2015 238(3):30-38.
57. Ho SM, Tang WY: Belmonte de Frausto J, Prins GS: Developmental exposure to estradiol and bisphenol a increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research* 2006, 66(11):5624–5632.
58. Prins GS, Tang WY, Belmonte J, Ho SM: Developmental exposure to bisphenol a increases prostate cancer susceptibility in adult rats: Epigenetic mode of action is implicated. *Fertility and Sterility* 2008, 89:e41.
59. Cheong A, Zhang X, Cheung YY, Tang WY, Chen J, Ye SH, Medvedovic M, Leung YK, Prins GS, Ho SM: DNA methylome changes by estradiol benzoate and bisphenol A links early-life environmental exposures to prostate cancer risk. *Epigenetics* 2016. DOI: 10.1080/15592294.2016.1208891.
60. Weinhouse C, Sartor MA, Faulk C, Anderson OS, Sant KE, Harris C, Dolinoy DC: Epigenome-wide DNA methylation analysis implicates neuronal and inflammatory signaling pathways in adult murine hepatic tumorigenesis following perinatal exposure to bisphenol A. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2016, 57(6):435-446.
61. Deb P, Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Bobzean SA, Pandita TK, Perrotti LI, Mandal SS: Endocrine disrupting chemical, bisphenol-A, induces breast cancer associated gene HOXB9 expression in vitro and in vivo. *Gene* 2016, 590(2):234-243.
62. Lamartiniere CA, Jenkins S, Betancourt AM, Wang J, Russo J: Exposure to the Endocrine Disruptor Bisphenol A Alters Susceptibility for Mammary Cancer. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 2011, 5(2):45-52.
63. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Bobzean SA, Perrotti LI, Mandal SS: Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOTAIR in vitro and in vivo. *Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology* 2014, 141:160-170.
64. Dhimolea E, Wadia PR, Murray TJ, Settles ML, Treitman JD, Sonnenschein C, Shioda T, Soto AM: Prenatal exposure to BPA alters the epigenome of the rat mammary gland and increases the propensity to neoplastic development. *PLoS One* 2014, 9(7):e99800.

65. Greathouse KL, Bredfeldt T, Everitt JI, Lin K, Berry T, Kannan K, Mittelstadt ML, Ho SM, Walker CL: Environmental estrogens differentially engage the histone methyltransferase EZH2 to increase risk of uterine tumorigenesis. *Molecular Cancer Research* 2012, 10(4):546-557.
66. Faulk C, Kim JH, Jones TR, McEachin RC, Nahar MS, Dolinoy DC, Sartor MA: Bisphenol A-associated alterations in genome-wide DNA methylation and gene expression patterns reveal sequence-dependent and non-monotonic effects in human fetal liver. *Environmental Epigenetics* 2015, 1(1). pii: dvv006.
67. Faulk C, Kim JH, Anderson OS, Nahar MS, Jones TR, Sartor MA, Dolinoy DC: Detection of differential DNA methylation in repetitive DNA of mice and humans perinatally exposed to bisphenol A. *Epigenetics*. 2016, 11(7):489-500.
68. Kundakovic M, Champagne FA: Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain Behavior and Immunity* 2011, 25(6):1084–1093.
69. Jones BA, Shimell JJ, Watson NV. Pre- and postnatal bisphenol A treatment results in persistent deficits in the sexual behavior of male rats, but not female rats, in adulthood. *Hormones and Behavior* 2011, 59(2):246-251.
70. Prins GS, Tang WY, Belmonte J, Ho SM. Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology* 2008, 102(2):134-138.
71. Yin N, Yao X, Qin Z, Wang YL, Faiola F: Assessment of Bisphenol A (BPA) neurotoxicity in vitro with mouse embryonic stem cells. *Journal of Environmental Sciences (China)* 2015, 36:181-187.
72. Li J, Fu KZ, Vemula S, Le XC, Li XF. Studying developmental neurotoxic effects of bisphenol A (BPA) using embryonic stem cells. *Journal of Environmental Sciences (China)* 2015, 1;36:173-177.
73. Hessel EV, Ezendam J, van Broekhuizen FA, Hakkert B, DeWitt J, Granum B, Guzylack L, Lawrence BP, Penninks A, Rooney AA, Piersma AH, van Loveren H. Assessment of recent developmental immunotoxicity studies with bisphenol A in the context of the 2015 EFSA TDI. *Reproductive Toxicology* 2016, 65:448-456.
74. Robinson L, Miller R. The Impact of Bisphenol A and Phthalates on Allergy, Asthma, and Immune Function: a Review of Latest Findings. *Current Environmental Health Reports* 2015, 2(4):379-387.
75. Ziv-Gal A, Flaws JA. Evidence for bisphenol A-induced female infertility: a review (2007-2016). *Fertility and Sterility* 2016, 106(4):827-856.
76. Seachrist DD, Bonk KW, Ho SM, Prins GS, Soto AM, Keri RA. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reproductive Toxicology* 2016, 59:167-182.
77. Provisiero DP, Pivonello C, Muscogiuri G, Negri M, de Angelis C, Simeoli C, Pivonello R, Colao A. Influence of Bisphenol A on Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2016, 13(10). pii: E989.