



Araştırma

2022; 31 (3): 369-377

**DİBUTİL FTALATIN İNSAN AKCİĞER HÜCRE HATTINA OLASI TOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ  
VE ASKORBİK ASİT VE N-ASETİLSİSTEİNİN OLASI KORUYUCU ETKİLERİ  
ASSESSMENT OF TOXIC EFFECTS OF DIBUTYL PHTHALATE ON HUMAN LUNG CELL LINE AND  
POSSIBLE PROTECTIVE EFFECTS OF ASCORBIC ACID AND N-ACETYLCYSTEINE**

**Gamze KARAMAN<sup>1</sup>, Aylin BALCI ÖZYURT<sup>1,2</sup>, Erhan TAN<sup>3</sup>, Anıl YİRÜN<sup>1,4</sup>, Ünzile SUR<sup>1,4</sup>,  
Belma KOÇER GÜMÜŞEL<sup>6</sup>, Pınar ERKEKOĞLU<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup>Bahçeşehir Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul

<sup>3</sup>Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Klinik Eczacılık Anabilim Dalı, Ankara

<sup>4</sup>Çukurova Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>5</sup>Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>6</sup>Lokman Hekim Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara

**ÖZ**

Endokrin bozucu kimyasallar (EBK'ler), hormonların üretimini, salınımını, biyotransformasyonunu ve/veya atılımını etkileyen sentetik veya doğal kimyasal maddelerdir. Dibutilftalat (DBP) endüstride birçok alanda yaygın olarak kullanımı olan bir ftalat türevidir. Literatürde DBP'nin testiküler ve hepatik toksisitesine dair veriler olmakla birlikte, akciğer toksisitesi üzerinde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca, DBP'nin akciğer toksisite mekanizmaları bilinmemektedir. Bu çalışmada, DBP'nin insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre kültürü (A549 hücreleri) üzerinde olası sitotoksik ve oksidatif stres oluşturan etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, A549 hücrelerinde DBP'nin inhibitör konsantrasyon 30 (IC<sub>30</sub>) dozu belirlenmiş, IC<sub>30</sub> dozunun neden olduğu intraselüler reaktif oksijen türleri (ROS)'u artırıcı etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca, DBP'nin yol açtığı olası lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu incelenmiş, glutatyon (GSH) ve total antioksidan kapasitede (TAOC) düzeylerinde yol açabileceği olası değişiklikler belirlenmiştir. Çalışmada DBP'nin olası toksik etkilerine karşı askorbik asit (Asc) ve N-asetil sisteinin (NAC) olası koruyucu etkileri incelenmiştir. Hem NAC, hem de Asc'nin DBP uygulamasıyla beraber ROS düzeylerini düşürdüğü, protein oksidasyonunu azalttığı, total GSH düzeylerini yükselttiği ve azalan oksidatif strese bağlı olarak her iki antioksidanın da TAOC düzeylerini düşürdüğü belirlenmiştir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda, DBP'nin toksik etki mekanizmasının altında yatan nedenlerden birinin oksidatif stres olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, Asc ve NAC'ın DBP'nin neden olduğu oksidatif strese karşı koruyucu oldukları saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Askorbik asit, Dibutilftalat (DBP), İnsan akciğer hücreleri (A549 hücreleri), N-asetilsistein, Oksidatif stres.

**ABSTRACT**

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are chemicals that affect production, release, transformation or excretion of hormones. Dibutylphthalate (DBP) is a phthalate derivative, which is used in many fields in industry. Although there is data on testicular and hepatic toxicity of DBP in the literature, there are few studies on lung toxicity. In addition, the pulmonary toxicity mechanisms of DBP is not known. In this study, we aimed to evaluate the possible cytotoxic and oxidative stress-generating effects of DBP in human non-small cell lung cancer cell line (A549 cells). In addition, the pulmonary toxicity mechanisms of DBP is not known. In this context, inhibitory concentration 30 (IC<sub>30</sub>) was determined in A549 cells and intracellular reactive oxygen species (ROS) generating effect was evaluated. Also, possible lipid peroxidation and protein oxidation caused by DBP were investigated, possible alterations in glutathione (GSH), and total antioxidant capacity (TAOC) levels were identified. In the study, the protective effects of ascorbic acid (Asc) and N-acetylcysteine (NAC) against the possible toxic effects of DBP were determined. Both NAC and Asc along with DBP application reduced ROS and TAOC levels, decreased protein oxidation, and increased total GSH levels due to decreased oxidative stress. According to our data, one of the underlying toxicity mechanisms of DBP is oxidative stress. In addition, Asc and NAC were determined to be protective against oxidative stress caused by DBP.

**Keywords:** Ascorbic acid, Dibutylphthalate (DBP), Human lung cancer cells (A549 cells), N-acetylcysteine, Oxidative stress

**Corresponding Author:** Prof. Dr. Pınar ERKEKOĞLU, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye, Ankara, erkekp@yahoo.com, ORCID: 0000-0003-4713-7672

Uzm. Ecz. Gamze KARAMAN, ecz\_gmz@hotmail.com, 0000-0003-4706-3095

Dr. Ecz. Aylin BALCIOZYURT, aylinbalci87@gmail.com, 0000-0002-0060-271X

Uzm. Ecz. Erhan TAN, eczerhantan@gmail.com, 0000-0001-6224-712X

Uzm. Ecz. Anıl YİRÜN, anil-yirun@hotmail.com, 0000-0002-4050-8832

Dr. Ecz. Ünzile SUR, unzilesur@gmail.com, 0000-0002-4493-3684

Prof. Dr. Belma KOÇER GÜMÜŞEL, belmagumusel@yahoo.com, 0000-0003-4311-2291

\*10th International Congress of the Turkish Society of Toxicology, 16-19 October 2019, Antalya, Turkey kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Makale Geliş Tarihi : 23.03.2021

Makale Kabul Tarihi: 12.05.2022

## GİRİŞ

Endokrin bozucu kimyasallar (EBK'ler), hormonların üretimini, salınımını, biyotransformasyonunu veya atılımını etkileyen sentetik veya doğal kimyasal maddelerdir (1). Günlük hayatta sentetik EBK'lere pek çok kaynaktan yüksek oranda yaşamın farklı dönemlerinde maruziyet söz konusudur ve etkileri kalıcı olabilir (2).

Ftalatlar, plastik malzemelerin esneklik ve yumuşaklığını arttırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Plastik materyalden kolayca uzaklaşabildikleri için bu maddelere oral, inhalasyon ve dermal yollar başta olmak üzere ciddi düzeyde ve çoğu zaman da karışım halinde maruziyet söz konusudur (3). Ftalatların anti-androjenik, östrojenik döngüyü bozucu ve immünolojik yanıtı tetikleyici etkilerinin olduğu bilinmektedir (4-8). Dibutil ftalat (DBP) tekstil endüstrisi, farmasötikler, mürekkepler, yapıştırıcılar, aerosoller (süspansiyon edici ajan, aerosol valflerinde lubrikan), duş perdeleri, otomotiv endüstrisi (arabaların iç plastik aksamaları), yüzey kaplamalar, kablo tüpleri, oyuncaklar, parlaticılar, laklar, kozmetikler ve kişisel bakım ürünlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla, DBP üreten işyerlerinde çalışan işçilerin, yüksek miktarda kozmetik kullanan bireylerin ve manikürçüler gibi kozmetiklere yoğun maruz kalan meslek gruplarının bu ftalata başta inhalasyonla olmak üzere yüksek miktarlarda maruz kaldıkları bilinmektedir (9,10). Bu ftalat türevine oral ve inhalasyonla kronik maruziyetin olası sonuçları üzerinde ilgili literatürde çok az bilgi bulunmaktadır. İnhalasyonla kronik maruziyet ile kemiricilerde vücut ağırlığı, akciğer ve beyin ağırlığında artışlar görülmüştür. Ayrıca, kemiricilerde subkronik maruziyetin (13 hafta, 0,1 mg/kg vücut ağırlığı) vücut ağırlığında düşüşe, minimal anemiye ve hepatotoksositeye neden olabileceği belirlenmiştir. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, DBP'nin referans dozu (RfD)'nin 0.1 mg/kg vücut ağırlığı olduğu görülmüştür (11). Sıçanlarda DBP için anti-androjenik etki, gamet gelişimi ve meme dokusunun gelişimi açısından oral en düşük ters etki gözlenen düzey (LOAEL) 2 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, Avrupa Birliği'nin DBP risk değerlendirme raporunda ise sıçanlarda embriyotoksosite açısından oral LOAEL değeri 52 mg/kg/gün olarak verilmiştir (12).

İşyeri maruziyeti için DBP eşik limit değeri- zaman ağırlıklı ortalama (TLV-TWA, günde 7 saat, haftada 40-45 saat) 5 mg/m<sup>3</sup> olarak saptanmıştır (13). Avrupa Komisyonu Sağlık ve Çevre Riskleri Bilimsel Komitesi (SCHER) DBP'ye toplam maruziyetin düşürülme zorunluluğunu ifade etmiştir. Avrupa Birliği 2011/65/EU sayılı direktifinde ve takiben yayınlanan 2015/863 no.lu revizyon direktifinde DBP'ye maruziyetin işyerinde 1000 ppm'i geçmemesi gerektiğini ifade etmiştir (11, 12, 14). Avrupa Birliği Direktif, 76/768/EEC ile DBP'nin ojelerde kullanımı yasaklanmış olmasına rağmen, maddenin ucuz kozmetiklerde ve özellikle ojelerde hala kullanımı devam etmektedir. Avrupa Birliği'nde 1999'da DBP'nin oyuncaklarda kullanımı kısıtlanmıştır. DBP içeren kozmetik ürünlerinin Avrupa Birliği'ne girmesi 2004/93/EC no.lu direktif ile 1 Nisan 2005'de yasaklanmıştır (11, 12). Ülkemizde de DBP ile ilgili düzenlemeler yapılmıştır. 2 Nisan 2011'de Resmi Gazete 'de Sanayi ve Ticaret Bakanlığı tarafından yayınlanan "Bazı Tüketici Ürünlerinin Tehlikeli Kimyasal Madde İçeriğine Yönelik Piyasa

Gözetimi ve Denetimine İlişkin Tebliğin'de DBP'nin birçok üründe (giysi, ayakkabı, oyuncak, çocuk bakım ürünleri, kırtasiye vb.) kütle bazında %0.1 ile sınırlandırılmıştır (15).

DBP'nin üreme sistemi ve karaciğer toksisitesine ait veriler olmakla birlikte, akciğer toksisitesi üzerinde yapılan çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca gelişen pulmoner toksisitenin mekanizmaları da bilinmemektedir. Ek olarak, askorbik asit (Asc) ve N-asetil sistein (NAC) gibi güçlü antioksidanların DBP'nin oluşturabileceği akciğer toksisitesi üzerindeki modifiye edici/koruyucu etkilerine dair literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamaktadır. Bu çalışma kapsamında, DBP'nin sitotoksik ve oksidatif stres oluşturucu etkilerinin insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri (A549 hücreleri) kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, DBP'nin toksik etkilerine karşı Asc ve NAC'ın olası koruyucu etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

## GEREÇ VE METOT

### Kullanılan Madde ve Kitler

DBP, Asc, NAC, 3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)-2.5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), dimetil sülfoksit (DMSO), reaktif oksijen türleri (ROS) kiti, proteaz inhibitör kokteylive kullanılan tüm diğer kimyasallar Sigma Aldrich (Mannheim, Almanya)'den satın alınmıştır. Hücre lizis tampon Thermo Fisher (Waltham, MA)'dan satın alınmıştır. A549 hücreleri American Type Cell Collection (ATCC)'den (Manassas, VA) satın alınmıştır. Malondiadehit (MDA), total glutatyon (GSH), karbonil ve total antioksidan kapasite (TAOC) kitleri Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)'den temin edilmiştir. Hücre kültürü için kullanılan tüm malzemeler [Dulbecco'nun Modifiye Eagle medyum (DMEM), fetal bovin serumu (FBS), penisilin-streptomisin ve L-glutamin] Biowest (Riverside, MO)'den alınmıştır.

### Dibutil ftalat, N-Asetilsistein ve Askorbik Asit Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

DBP (99%), %0.1 etanol içeren besiyerinde çözülmüş ve ara stok çözeltisi 100 mM konsantrasyonda hazırlanmıştır. Besiyeri ile ara stok çözeltisi seyreltilerek hücrelere uygulanan DBP (0.25-15 mM) çözeltileri hazırlanmıştır. NAC %0,1 etanol içeren besi yerinde çözülerek 500 mM konsantrasyonda ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ara stoktan 5 mM nihai konsantrasyonda NAC çözeltisi hazırlanmıştır. Asc %0.1 etanol içeren besiyerinde çözülmüş ve 10 mM konsantrasyonda ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ara stoktan 10 µM nihai konsantrasyonda Asc çözeltisi hazırlanmıştır.

### Hücre Hattı ve Deney Grupları

Çalışmada insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri epitel adheren hücre hattı (A549ATCC® CCL-185™) kullanılmıştır. Bu hücreler, alveolar tip 2 hücrelerine özgü metabolik ve makromoleküler süreçler için uygun bir model olarak kullanılmaktadır (16). Hücreler DMEM besiyeri içerisine %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin eklenerek flasklarda çoğaltılmıştır ve 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Besiyeri hücrelerin çoğalmasına bakılarak haftada 2-3 kere değiştirilmiştir. Deney grupları şu şekilde dozlanmıştır:

- Kontrol grubu:** Bu gruba sadece deneyler esnasından çözücü olarak kullanılan %0.1 etanol içeren besiyeri uygulanmıştır.
- DBP grubu:** Sitotoksisite deneylerinin sonucunda belirlenen inhibitör konsantrasyon 30 (inhibitör konsantrasyon 30 -IC<sub>30</sub>, 1,185 mM) DBP'nin 48 saat süreyle uygulandığı gruptur.
- NAC grubu:** Koruyucu doz olarak seçilen NAC'ın ön inkübasyon için 24 saat, sonrasında ise 48 saat 5 mM dozda uygulandığı gruptur.
- Askorbik asit grubu (Asc):** Koruyucu doz olarak seçilen Asc'nin ön inkübasyon için 24 saat, sonrasında ise 48 saat 10 µM dozda uygulandığı gruptur.
- DBP+NAC grubu:** Bu gruptaki hücelere 24 saat süreyle ön inkübasyon olarak 5 mM NAC uygulanmıştır. Takiben, hücelere 48 saat süreyle sitotoksisite deneyleri sonucu elde edilen IC<sub>30</sub> dozunda DBP (1,185 mM) ve NAC (5 mM) uygulanmıştır.
- DBP+Asc grubu:** Bu gruptaki hücelere 24 saat süreyle ön inkübasyon olarak 10 µM Asc uygulanmıştır. Takiben, hücelere 48 saat süreyle sitotoksisite deneyleri sonucu elde edilen IC<sub>30</sub> dozunda DBP (1,185 mM) ve Asc (10 µM) karışımı uygulanmıştır.

Inhibitör konsantrasyon 30 (IC<sub>30</sub>) dozlarının kullanılmasının nedeni bu dozların inhibitör konsantrasyon 50 (IC<sub>50</sub>) dozuna göre günlük hayat maruziyetini daha iyi yansıtması olduğu söylenebilir. Asc ve NAC dozları ise, diğer çalışmalarımızda da uygulanan ve bu hücre hattında da %100 hücre canlılığı sağlayan, prooksidan olmayan (Asc için) ve sitotoksisiteye yol açmayan konsantrasyonlar belirlenerek seçilmiştir (17-19).

#### **MTT Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi**

Deneyin esasısı sarı renkli MTT bileşiğinin mitokondriyal dehidrojenazlarla çözünmeyen mor renkli formazana dönüştürülmesi, oluşan formazan kristallerinin DMSO'da çözülmesi ve bu çözeltinin verdiği renk şiddetinin 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (20). Kontrol grubunda bulunan hücrelerin canlılığı (absorbanslarına göre) %100 olarak kabul edilmiş ve diğer gruplardaki hücrelerin canlılığı kontrole göre % canlılık olarak hesaplanmıştır. Takiben DBP uygulanan hücrelerin IC<sub>50</sub> ve IC<sub>30</sub> değerleri hesaplanmıştır.

#### **Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Belirlenmesi**

Canlı hücreler tarafından, floresan olmayan prob olan 5-ve 6-klorometil-2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (CM-H<sub>2</sub>DCFDA)'ın yeşil renkte floresans oluşturan 2',7'-diklorofloreskein (CM-DCF)'ne dönüştürülmesi ve oluşan floresansın λ<sub>eksitasyon</sub>= 640 nm ve λ<sub>emisyon</sub>= 675 nm'de ölçülmesi esasına dayanan ticari kit kullanılarak ölçüm yapılmıştır (21). Kontrol hücreleri tarafından üretilen ROS miktarı %100 kabul edilerek diğer hücrelerin ürettiği ROS miktarı kontrole göre % olarak hesaplanmıştır.

#### **Hücre Lizis İşlemi**

Flasktaki hücreler 4 ml D-PBS ile iki kez yıkanmıştır. Hücreler tripsin yardımıyla kaldırılmıştır. Hücre süspansiyonu falkon tübe alınmış ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış, hücre pelletleri 400 µl lizis tamponu (%1 proteaz inhibitör kokteyli içeren) içerisinde edilmiştir. (22).

#### **Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi**

Malondialdehit düzeylerinin kitin esasısı, asidik ortamda MDA'nın tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi ve oluşan pembe bileşiğin oluşturduğu renk şiddetinin kolorimetrik olarak 530 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır (23). Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir.

#### **Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi**

Ölçümde kullanılan kitin esasısı, glutasyon redüktaz (GR) enzimi tarafından okside glutasyon (GSSG)'nin indirgenmesi, oluşan indirgenmiş GSH'nin, 5.5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girerek GS-TNB bileşiği oluşturması ve GR enzimi etkisiyle GS-TNB'nin indirgenip GSH'ın tekrar serbest bırakılması ve TNB üretilmesine dayanmaktadır. Sonuçta meydana gelen sarı renkli TNB bileşiğinin absorbansının 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (24). Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir.

#### **Karbonil Grubu Düzeylerinin Belirlenmesi**

Ölçümde kullanılan kitin esasısı, karbonil gruplarının kantitatif analizi DNPH ile bu grupları türevlendirdikten sonra stabil hidrazonların oluşumuna dayanmaktadır. Takiben oluşan stabil hidrazonların absorbansın 370 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve sonuçlar nmol/mg protein olarak verilmiştir (25).

#### **Total Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi**

Total antioksidan kapasite ölçümü kitinin esasısı örnekteki antioksidanlar tarafından, maksimum 734 nm'de absorbans veren mavi-yeşil renkli ABTS kationunun absorbans şiddetinin azaltılması esasına dayanmaktadır. Örnekteki antioksidanların kapasitesi ABTS oksidasyonunu önlemektedir. Sonuçta örneklerdeki TAOC düzeyleri suda çözünür bir tokoferol analogu olan Trolox ile karşılaştırılmakta ve milimolar Trolox eşdeğeri olarak ölçülmektedir (26). Standartların Trolox konsantrasyonuna karşı 750 nm'de okunan absorbans değerleri kullanılarak konsantrasyon-absorbans grafiği çizilmiştir. Sonuçlar Trolox eşdeğeri olarak nmol/mg protein olarak verilmiştir.

#### **Protein Miktarının Belirlenmesi**

Protein miktar tayini deneyi BCA yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (27). Sonuçlar mg protein olarak elde edilmiştir.

#### **İstatistiksel Analiz**

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 17.0 (Chicago, IL) programı kullanılmıştır. Tüm gruplardan elde edilen sonuçların karşılaştırılması Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapılmıştır. Kruskal-Wallis analizinde gruplar arası farkların anlamlı bulunduğu durumlarda Dunn's post hoc çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiş, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

#### **BULGULAR**

##### **Sitotoksisite**

A549 hücrelerine DBP (0.25-15 mM) konsantrasyon aralığında uygulanmış ve hücreler 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı test maddesi kontrol

hücrelerine göre % canlılık olarak belirlenmiştir (Tablo I). Çalışma sonucunda IC<sub>50</sub> ve IC<sub>30</sub> değerleri hesaplanmıştır (Tablo II).

**Tablo I.** DBP uygulanan A549 hücrelerinde hücre canlılığı

Uygulanan DBP Dozu (mM)	Hücre Canlılığı (%)
0	100
0.25	87.80
0.5	84.13
1.25	62.50
2.5	45.76
10	44.76
15	38.80

Hücre canlılığının belirlenmesinde kontrol hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilerek, diğer gruplardaki hücrelerin canlılıkları kontrole göre % olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar üç farklı zamanda ve gün içi iki tekrarlar yapılan çalışmaların ortalama değeri olup; üç farklı günde yapılan değerlerden elde edilen ortalama hücre canlılığı verilmiştir.

Asc: Askorbik asit; DBP: dibutil ftalat; NAC: N-asetil sistein

**Tablo II.** A549 hücrelerinde DBP'nin IC<sub>30</sub> ve IC<sub>50</sub> değerleri.

DBP'nin IC değerleri (mM)	
IC <sub>30</sub>	1.186
IC <sub>50</sub>	2.139

Asc: Askorbik asit; DBP: dibutil ftalat; NAC: N-asetil sistein; IC<sub>30</sub>: hücrelerin %30'sini öldüren inhibitör kosantrasyon; IC<sub>50</sub>: hücrelerin %50'sini öldüren inhibitör kosantrasyon

### Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri

Çalışma gruplarında belirlenen hücre içi ROS düzeyleri kontrole kıyasla %ROS olarak hesaplanmıştır. Hücre içi ROS düzeyleri Şekil IA'da verilmiştir. Bütün gruplar kendi aralarında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Ancak, DBP uygulanan grupta kontrole kıyasla az da olsa (%4.5) bir artış olduğu görülmüştür. Bu artış koruyucu madde uygulaması ile engellenmiştir (Tablo III).

### Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri

Çalışma gruplarında bulunan MDA düzeyleri Şekil IB ve Tablo III'de verilmiştir. Kontrol grubuna göre DBP grubunda yaklaşık 10.4 kat artış gözlenmiştir ( $p=0.006$ ). DBP grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (DBP-Asc=0.007; DBP-NAC=0.008; DBP-DBP+Asc=0.032; DBP-DBP+NAC=0.012). Asc, NAC, DBP+Asc, DBP+NAC uygulanan gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ). Hücre hatlarına koruyucu madde uygulamasının DBP'nin lipit peroksidasyon üzerine etkisini azalttığı gözlenmiştir.

### Glutasyon Düzeyleri

Çalışma gruplarında total GSH düzeyleri Şekil IC ve Tablo III'de verilmiştir. DBP grubuna ait total GSH düzeylerinin kontrol grubuna oranla %88 oranında ve anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır ( $p=0.005$ ). DBP grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında GSH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (DBP-Asc=0.00002; DBP-NAC=0.002; DBP-DBP+Asc=0.020; DBP-DBP+NAC=0.022). Koruyucu madde uygulamasının DBP'nin GSH düzeylerinde neden olduğu azalmayı engellediği görülmüştür.

### Protein Oksidasyonu Düzeyleri

Çalışma gruplarında belirlenen karbonil düzeyleri Şekil ID ve Tablo III'de verilmiştir. DBP grubunda kontrol grubuna kıyasla 12,5 kat artış saptanmıştır ( $p=0.0001$ ). DBP+NAC ( $p=0.003$ ) ve DBP+Asc ( $p=0.004$ ) gruplarının protein karbonil düzeylerinin DBP grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır. Bu da NAC ve Asc uygulamasının DBP'nin neden olduğu protein oksidasyonuna karşı koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir.

### Total Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

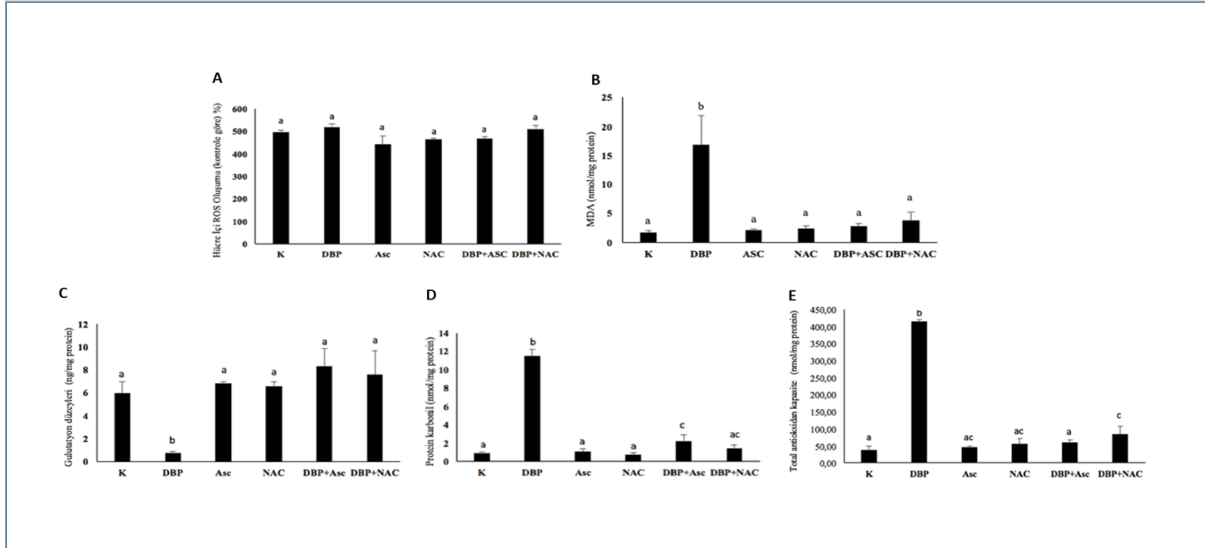
Çalışma gruplarına ait total antioksidan kapasite düzeyleri Şekil IE' ve Tablo III'de verilmiştir. DBP grubuna ait total antioksidan kapasite düzeyinde kontrol grubuna oranla yaklaşık 10.5 kat artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p=0.00002$ ). DBP+NAC ( $p=0.0004$ ) ve DBP+Asc ( $p=0.0004$ ) gruplarının TAOC düzeylerinin DBP grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır.

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Literatürde ftalatların ve DBP'nin erkek üreme sistemi üzerine istenmeyen etkilerinin incelendiği birçok çalışma bulunmakla birlikte (4), akciğer üzerine toksik etkilerinin incelendiği oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (28, 29). Ftalatların ev tozları ve iş yeri ortamının havasında da var olmaları nedeniyle pulmoner sistemde neden oldukları immünojenisite, astım ve ftalat maruziyeti arasındaki ilişkiyi inceleyen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar da bulunmaktadır (6, 7). Ancak, ftalatlara solunum yoluyla maruziyet sonrası gelişebilecek toksite hakkında yeterli mekanistik bir veri yoktur (30).

Yaygın olarak kullanılan ftalatların çoğunun alveolar makrofajların bakterileri yok etmesine engel olarak veya akciğerlerde mikroorganizmaların neden olduğu proenflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonunu düşürerek akciğerlerdeki savunma sistemini baskılayabileceğini ve enflamatuvar hücreler üzerinde adjuvan etkileri olabileceğini gösterilmiştir (31-34). Bilindiği üzere astım, hava yolunun aşırı duyarlılığı ile gelişen kronik enflamatuvar bir hastalıktır ve son yıllarda prevalansı dünya genelinde artış göstermektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, ftalat teması ile astım arasında olası bir ilişkiyi işaret etmektedir. Ftalat maruziyetinin hava yolu epitel hücrelerini doğrudan etkileyebileceği, özellikle kronik astımda hava yolunun yeniden şekillenmesine yol açarak hastalığın şiddetini arttırılabildiği de belirtilmiştir (7, 33, 34).

Hava yolunun tonusunun modülasyonunda insan bronşiyal düz kas hücreleri (BSMC)'nin önemli rolleri



**Şekil 1.** Çalışma gruplarında oksidatif stres parametreleri.

<sup>a, b, c</sup>Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ( $p < 0.05$ ).

A. Çalışma gruplarında hücre içi ROS oluşumu; B. Çalışma gruplarında MDA düzeyleri; C. Çalışma gruplarında total GSH düzeyleri;

D. Çalışma gruplarında karbonil gruplarının düzeyleri; E. Çalışma gruplarında total antioksidan kapasite düzeyleri;

Asc: Askorbik asit; DBP: dibutil ftalat; NAC: N-asetil sistein

**Tablo III.** Çalışma gruplarında oksidatif stres parametreleri.

	Hücre içi ROS üretimi (% kontrol göze)	MDA düzeyleri (nmol/mg protein)	Total GSH düzeyleri (ng/mg protein)	Karbonil grubu düzeyleri (nmol/mg protein)	TAOC düzeyleri (nmol/mg protein)
<b>Kontrol</b>	100±5.45 <sup>a</sup>	1.62±0.34 <sup>a</sup>	5.96±0.99 <sup>a</sup>	0.92±0.11 <sup>a</sup>	39.25±9.89 <sup>a</sup>
<b>DBP</b>	104.53±13.07 <sup>a</sup>	16.81±5.033 <sup>b</sup>	0.71±0.16 <sup>b</sup>	11.50±0.71 <sup>b</sup>	413.95±6.54 <sup>b</sup>
<b>Asc</b>	88.76±35.98 <sup>a</sup>	2.09±0.17 <sup>a</sup>	6.84±0.14 <sup>a</sup>	1.04±0.35 <sup>a</sup>	47.28±1.75 <sup>ac</sup>
<b>NAC</b>	93.06±7.48 <sup>a</sup>	2.33±0.58 <sup>a</sup>	6.58±0.37 <sup>a</sup>	0.70±0.25 <sup>a</sup>	55.71±15.75 <sup>ac</sup>
<b>DBP+Asc</b>	94.21±8.18 <sup>a</sup>	2.78±0.47 <sup>a</sup>	8.29±1.54 <sup>a</sup>	2.19±0.75 <sup>c</sup>	61.28±6.44 <sup>a</sup>
<b>DBP+NAC</b>	102.53±15.04 <sup>a</sup>	3.70±1.46 <sup>a</sup>	7.58±2.11 <sup>a</sup>	1.45±0.377 <sup>ac</sup>	84.14±24.31 <sup>c</sup>

Asc: Askorbik asit; DBP: dibutil ftalat; MDA: malondialdehit; GSH: glutatyon; NAC: N-asetil sistein; ROS: reaktif oksijen türleri; TAOC: total antioksidan kapasite

<sup>a, b, c</sup>Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ( $p < 0.05$ ).

**MDA düzeyleri** K-DBP  $p=0.006$ ; DBP-Asc=0.007; DBP-NAC=0.008; DBP-DBP+Asc=0.032; DBP-DBP+NAC=0.012

**Total GSH** K-DBP  $p=0.005$ ; DBP-Asc=0.00002; DBP-NAC=0.002; DBP-DBP+Asc=0.020; DBP-DBP+NAC=0.022

**Karbonil düzeyleri** K-DBP  $p=0.0001$ ; DBP+NAC  $p=0.003$ ; DBP+Asc  $p=0.004$

**TAOC düzeyleri** K-DBP  $p=0.00002$ ; DBP+NAC  $p=0.0004$ ; DBP+Asc  $p=0.0004$

olduğu bilinmektedir. Astım hastalarında BSMC'lerin sekresyonları ve proliferasyonu artış göstermektedir. Bu artış ile BSMC'lerin subepitelyal bölgeye göç ettikleri bilinmektedir. Bu olay astımın şiddetinin artmasına yol açmaktadır. Bronşiyal epitel hücrelerin işlevlerinin ve bütünlüğünün korunması solunum işlevlerinin doğru gerçekleşmesi için oldukça önemlidir ve bu hücrelerin yapı ve işlevlerinde görülen değişiklikler ve takiben enflamasyon gelişimi astıma yol açabilmektedir. Hava yollarında bulunan BSMC'ler dahil tüm epitel kökenli hücreler, çeşitli immünolojik mediyatörleri, sitokinleri ve kemokinleri salgılayabilmektedir. Ftalat maruziyetinin bu hücrelerin interlökin 8 (IL-8) üretiminde artışa, takiben proliferasyonlarına ve migrasyona

yol açabileceği ifade edilmiştir. Kuo ve ark. (2011) insan bronşiyal epitel hücre hatları (BEAS-2B ve HBE135-E6E7) kullanılarak gerçekleştirdikleri çalışmalarında, hücrelere 5  $\mu$ M DBP uygulanmış ve 6 saatlik sonunda hücrelerde IL-8 üretiminde artış ve hiperplazi geliştiğini gözlemlemiştir. Araştırmacıların bu istenmeyen etkileri önlemek için maruziyetten sonra 6-shogaol, 6-gingerol, 8-gingerol ve 10-gingerol gibi zencefilin aktif bileşiklerini 5  $\mu$ M dozda kültür ortamına eklemiştir. Bu bileşiklerden 6-shogaolün DBP'nin yol açtığı proliferasyon ve migrasyonu en güçlü şekilde inhibe eden bileşik olduğu saptanmıştır (35).

Sıçanlara DBP'nin inhalasyon ve oral alımla uygulanmasında oral toksisitenin daha yüksek olabileceği ifade edilmiştir (36). Diğer taraftan, sıçanlara oral DBP uygu-

lamasının akciğerlerde displazisi ve yapısal bozukluklar oluşturabileceği de gösterilmiştir (37, 38). Ayrıca DBP maruziyetinin akciğerlerde CYP450 ekspresyonlarını değiştirebildiğine dair de veriler elde edilmiştir (39, 40). Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, çalışmamızın verileri üç kısımda tartışılacaktır:

#### Sitotoksikite Bulguları

Farklı hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda ftalatların apoptoza yol açabildikleri bilinmektedir. Ftalat uygulamasının özellikle ekstrinsik kaspaz yolağını tetiklediği ve hücre siklusunu belirli aşamalarda durdurarak apoptotik hücre ölümüne yol açtıkları belirtilmiştir. Ancak, otofajik mekanizmaları da tetikleyebilecekleri ifade edilmektedir (41, 42). Bu çalışmada, A549 hücrelerine 48 saat DBP uygulanması sonrasında, IC50 ve ve IC30 değerleri mM düzeylerde belirlenmiştir. Diğer ftalat türevleriyle ve özellikle de ftalat metabolitleriyle karşılaştırıldığında mM düzeyler oldukça yüksek kalmaktadır. Daha önce *in vitro* çalışmalarda, di(2-etilhekzil) ftalat (DEHP)'in Leydig ve LNCaP hücrelerinde mM konsantrasyonlarda sitotoksik olduğu belirlenmiştir. Ancak, DEHP'in ana metaboliti MEHP'in  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda sitotoksik olduğu belirlenmiştir (41-44). DU145 (HTB-81) insan prostat adenokarsinoma hücreleriyle yapılan bir diğer *in vitro* çalışmada ise, DBP'nin IC50 değerleri sırasıyla 27.32 ppb ve 77.21 ppb bulunmuştur. DMP için IC50 değerleri iki hücre hattı için sırasıyla 2390.48 ppb ve 1301.78 ppb; dietil ftalat (DEP) için 1905.53ppb ve 477.13 ppb; diizobütil ftalat (DIBP) için 449.74 ppb ve 785.80 ppb; benzilbütül ftalat (BBP) için 93.15 ve 44.25 ppb ve DEHP için 22.82 ppb ve 78.69 ppb olarak belirlenmiştir. DU145 hücrelerinde DBP'nin DEHP'den daha az sitotoksik olduğu, ancak tüm diğer ftalatlardan daha fazla hücre ölümüne yol açabileceği ifade edilmiştir. PC3 hücrelerinde ise, en düşük dozda en yüksek sitotoksikiteye yol açan ftalat DBP olarak belirlenmiştir (45). Diğer taraftan DEHP ile A549 hücrelerinde yapılan yakın zamandaki bir çalışmada, DEHP'in 5,10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  dozlarda 24, 48 ve 72 saat uygulamasından sonra hücre canlılığı tüm konsantrasyon ve sürelerde artarken, en az artışın 100  $\mu\text{M}$  ve 72 saat uygulamada olduğu belirlenmiştir. Bu da DEHP'in A549 hücre proliferasyonunu belirli bir konsantrasyon ve uygulama süresine de arttırabildiğini göstermektedir (46). DEHP (1-100  $\mu\text{M}$ ) ve metaboliti MEHP (1-50  $\mu\text{M}$ ) ile alveolar epitel fenotip A549 hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş ve 24-72 saat arasındaki uygulamalarda, her iki ftalat türevinin de hücre proliferasyonunu arttırdığı belirlenmiştir (29). A549 hücrelerinde yapılan bir diğer çalışmada ise, DBP (5  $\mu\text{g/L}$ ) ve DEHP (5  $\mu\text{g/L}$ )'in tek başlarına sitotoksikite oluştururken, nanoplastiklerle birlikte uygulamalarının hücre canlılığını arttırdığı bildirilmiştir (47).

Başka bir çalışmada, DBP fare peritoneal makrofajları kültürlerine artan dozlarda (0, 1, 5, 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$ ) 24 saat süresinde uygulanmış ve 50 ve 100  $\mu\text{M}$  dozlarda sitotoksik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, DBP uygulamasının fare makrofajlarının antijen sunma kapasitelerini ve sitokin üretimlerini azalttığı ve genel olarak, immünojenisitetlerini düşürdüğü görülmüştür (48).

İnsan embriyo akciğer (L-132) epitel benzeri hücrelerinde DBP'nin hücre morfolojisi ve yapısı üzerine etkisi-

nin araştırıldığı çalışmada, DBP uygulaması (40  $\mu\text{g/ml}$ ) hücre büyümesinin suprese olduğu görülmüştür. Ayrıca, hücre çeperlerinde morfolojik değişimler izlenmiş, sitoplazmada birçok lipit damlacığının olduğu ve trigliseritin yüksek oranda biriktiği belirlenmiştir. Ancak, sitoplazmadaki kolesterol ve protein düzeyleri değişmemiştir (49). DBP'nin sitotoksik etkilerinin sıçan embriyonik eklem tomurcuk hücrelerinde değerlendirildiği bir çalışmada, nötral kırmızı alımı (NRU) yönteminde DBP'nin IC50 değeri 25,54  $\mu\text{g/ml}$  (91,75  $\mu\text{M}$ ) olarak belirlenirken, alsıyan mavi boyaması ile IC50 değeri 21,21  $\mu\text{g/ml}$  (76,20  $\mu\text{M}$ ) bulunmuştur. Araştırmacılar, DBP'nin sıçan embriyonik hücrelerinin bölünmesini engelleyerek gelişimsel toksisiteye yol açabileceğini ifade etmişler ve bu ftalat türevinin oluşturduğu sitotoksitenin temelinde oksidatif stresin yatayabileceğini belirtmişlerdir (50). A549 hücrelerinin metabolik kapasiteleri karaciğer hücreleri kadar yüksek değildir ve DBP'nin MBP'ye dönüşümünü çok etkin sağlayamayacakları düşünülmektedir. Bu nedenle, MBP'nin sitotoksikite araştırılması yapılmamıştır.

#### Hücre içi ROS düzeyleri

Çalışma gruplarında hücre içi ROS düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Sadece DBP uygulanan grupta kontrole kıyasla anlamlı olmayan bir yükseliş görülmüştür. Hem Asc, hem de NAC bu artışı önlemiştir. Zhang ve ark. (2019)'nın yaptığı bir çalışmada, fare spermatozoidlerinden elde edilen GC-2 hücre kültürlerinde, DBP'nin hücre içi ve mitokondriyel ROS düzeylerini yükseltebildiği belirlenmiştir. Ancak, DBP'nin yol açtığı özellikle mitokondriyel ROS artışını protein kinaz benzeri endoplazmik retikulum (ER) kinaz (PERK) proteinin antioksidan bir yolak olan nükleer faktör eritrosit ilişkili faktör 2/ antioksidan duyarlı eleman (Nrf2/ARE) yolağını aktive ederek azaltabildiği gösterilmiştir (51). Aynı yolağın A549 hücreleri için de geçerli olabileceği düşünülebilir. Zhang ve ark. (2016) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, DBP'nin GC-2 hücrelerinde neden olduğu hücre içi ROS artışı, ER stresive otofajinin melatonin uygulaması ile önlenilebileceği belirlenmiştir (42). Bu çalışmadan elde edilen veriler ile Zhang ve ark. (2016)'nın yaptıkları çalışmadan elde edilen sonuçlar paralel bulunmuştur. DBP maruziyeti ile A549 hücrelerinde görülen ROS artışının NAC ve Asc gibi antioksidanlar tarafından önlenilebileceği saptanmıştır.

Endokrin bozucu ajanlarının (BPA, BBP, DEHP, nonifenoller) ve DBP'nin insan plasental karsinom (JEG-3) hücre hattında sitotoksikite ve ROS üretimi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, DBP uygulamasının diğer endokrin bozuculara göre daha az sitotoksik olduğu (IC50=466±63  $\mu\text{M}$ ) görülmüştür. Ayrıca, diğer ftalatların ve DBP'nin hücre içi ROS artışına yol açmadığı belirlenmiştir. Ancak, DBP'nin P450 aromataz enziminin aktivitesini azalttığı görülmüştür. Bu enzimin östrojen biyosentezinde ve fetal androjenlerin östrojenlere aromatisasyonunda anahtar enzim olduğu bilinmektedir (52). DBP'nin farklı süre (3-48 saat) ve dozlarda (10-100 nM) fare nörokortikal nöronlarında uygulanmasıyla, bu ftalatın hücre içi ROS düzeylerini doz ve süre bağımlı olarak indüklediği görülmüştür. Ayrıca, DBP uygulamasının yine doz ve süre bağımlı

olarak laktat dehidrogenaz (LDH) ve kaspaz 3'ü aktive ettiği belirlenmiştir (53). Yapılan az sayıda *in vivo* araştırmada ise, DBP'nin oksidatif stresi indüklediği belirlenmiştir. Kunming (KM) farelere 28 gün boyunca oral DBP (50 mg/kg) uygulamasının böbrek ve karaciğerde ROS ve MDA düzeylerini anlamlı bir şekilde attırdığı görülmüştür (54).

### Oksidatif Stres Parametreleri

Literatürde DBP'nin yol açtığı olası oksidatif stres üzerinde az sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışma vardır. DBP'nin oksidatif strese yol açabileceği; ancak bunun doz ve süre bağımlı olduğu belirtilmektedir. DBP ile birlikte farklı antioksidanların uygulamasının DBP'nin yol açtığı oksidatif stresi azaltıp azaltmadığına dair kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu antioksidanların hangi yolları kullanarak azalttığı detaylı olarak incelenmemiştir (42, 52).

A549 hücrelerinde kontrol grubuna göre DBP grubunda MDA düzeylerinde önemli bir artış belirlenmiştir. Asc veya NAC uygulama ile DBP'nin yol açtığı lipid peroksidasyonun DBP grubuna göre azalttığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, total GSH düzeylerinin DBP grubunda azaldığı saptanmıştır. Asc veya NAC uygulaması ile DBP neden olduğu total GSH düzeyindeki baskılanmanın kontrol düzeyine yükseldiği belirlenmiştir. A549 hücrelerinde DBP grubunda kontrol grubuna göre protein oksidasyonu önemli ölçüde artmıştır. DBP ile birlikte hem Asc, hem de NAC uygulamaları ile protein oksidasyonu DBP grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Dolayısıyla, Asc ve NAC gibi antioksidanların DBP'nin yol açabileceği protein uygulamasının oksidasyonuna karşı koruyucu etkileri olduğunu söylenebilir. DBP grubuna ait TAOC düzeyleri kontrole göre istatistiksel anlamlı artış göstermiştir. DBP ile oluşan oksidatif stresin hücre içi farklı yolları [NF-E2-ilişkili faktör 2/antioksidan cevap elemanı Nrf/ARE yolağı gibi] etkileyerek TAOC düzeylerini arttırmış olabileceği söylenebilir. Ancak, bu konuda daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır. Diğer çalışma grupları kontrol ile ve kendi aralarında kıyaslandığında ise aralarında anlamlı bir fark belirlenmemiştir.

KM fareler kullanılarak Yan ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada DBP (oral, 5, 50 ve 125 mg/kg/gün) uygulamasının nörotoksosite ve anksiyeteye yol açtığı belirlenmiştir. DBP'nin beyinde oksidatif stresi tetikleyebildiği ve buna bağlı nörotoksosite yaratabileceği ifade edilmiştir. Bir antioksidan olan mangiferin (MAG, 50 mg/kg/gün)'nin DBP ile birlikte uygulandığı grupta, DBP grubuna göre anksiyete benzeri davranışlarda azalma sağladığı gözlenmiştir (55). Wang ve ark. (2019) tarafından bir çalışmada DBP (21 gün, oral, 50 g/kg) ve dalak hasarı oluşumu arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Ayrıca, diğer çalışma gruplarına DBP'nin yanı sıra, E vitamini (21 gün, oral, 50 mg/kg/gün) ve kurkumin (21 gün, oral, 2,5 mg/kg/gün) de koruyucu olarak verilmiştir. Takiben, dalak homojenatında ROS, GSH, TAOC, interlökin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), kaspaz 8 ve kaspaz 9 düzeyleri ölçülmüştür. DBP'nin dalakta histopatolojik değişiklikler oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca, DBP uygulamasının oksidatif stresle ilişkili apoptoz ve enflamasyona yol açtığı belirlenmiştir. DBP ile birlikte E vitamini veya

kurkumin uygulamasının DBP kaynaklı oksidatif stresi ve dolayısıyla dalak hasarını azaltabileceği ifade edilmiştir (56).

Sonuç olarak elde edilen veriler ışığında, DBP'nin A549 hücrelerinde oksidatif strese yol açabildiği belirlenmiştir. Ancak, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>30</sub> dozları dikkate alındığında DBP'nin mM dozlarda bu etkilerinin oluşabileceği ve bu nedenle A549 hücrelerindeki toksik etkilerinin ancak çok yüksek konsantrasyonlarda görülebileceği söylenebilir. IC<sub>30</sub> dozunda oksidatif stresin biyo göstergelerinde yaptığı değişiklikler de dikkate alındığında, Nrf/ARE yolağında yer alan proteinlerin düzeylerinin incelenmesi gerekli olabilir. DBP'nin primer toksisite mekanizmasının oksidatif stres olup olmadığının belirlenmesi için daha çok sayıda çalışma gerekmektedir. İlerideki çalışmalarımızda DBP ve monester metabolitinin de oksidatif stresle ilişkili enzimlerin özellikle de glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalazın da aktivite ve/veya düzeylerinin ölçülmesi planlanmaktadır. Ayrıca farklı lipid peroksidasyon biyo göstergelerinin de değerlendirilmesi ile gelecek planlarımız arasında yer almaktadır. Asc ve NAC'ın DBP'nin oluşturduğu oksidatif strese karşı koruyucu etkileri belirlenmiştir. Bu nedenle, farklı koruyucuların farklı doz aralıkları ve sürelerde kullanıldığı daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir. *In vitro* çalışmaların sonuçları değerlendirildikten sonra, *in vivo* çalışmaların da gerçekleştirilmesi DBP'nin toksik etkilerine daha geniş bir yelpazede bakılmasını sağlayacaktır. Diğer taraftan, DBP'nin toksisitesi altında yatan moleküler yolların değerlendirilebilmesi mekanistik verilere ihtiyaç duyulmaktadır. DBP'nin kullanımının sınırlandırılması ve özellikle işyeri maruziyetinin azaltılması için düzenleyici kuruluşların yapılan tüm *in vivo* ve *in vitro* çalışmaları izlemesi ve buna göre tedbirleri alması gerekmektedir.

### Çıkar Çatışması

Çalışmamızın herhangi bir kurum, kuruluş, kişi ile mali çıkar çatışması yoktur.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: TYL-2018-16986.

### KAYNAKLAR

1. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrin disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2015;40(1):241-258.
2. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*. 2009;30(4):293-342.
3. Braun JM. Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *National Review Endocrinology*. 2017;13(3):161-173.
4. Sifakis S, Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, et al. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environmental Toxicology*

- and Pharmacology. 2017;51:56-70.
5. Durmaz E, Erkekoğlu P, Asci A, et al. Urinary phthalate metabolite concentrations in girls with premature thelarche. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018;59:172-181.
  6. Ait BY, Shibata E, Saito I, et al. Exposure to house dust phthalates in relation to asthma and allergies in both children and adults. *Science of the Total Environment*. 2014;485:153-163.
  7. Li MC, Chen CH, Guo YL. Phthalate esters and childhood asthma: A systematic review and congener-specific meta-analysis. *Environmental Pollution*. 2017;229:655-660.
  8. Upson K, Sathyanarayana S, Roos AJ, et al. Phthalates and risk of endometriosis. *Environmental Research*. 2013;126:91-97.
  9. Australian Department of Public Health. Dibutyl phthalate. 2017 Erişim Linki: <https://www.nicnas.gov.au/chemicalinformation/factsheets/chemical-name/dibutyl-phthalate-dbp>. [Erişim Tarihi: 04.10.2019].
  10. Broe A, Ennis ZN, Pottgard A, et al. Population Exposure to Phthalate-containing Drugs. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2017;121(3):153-158.
  11. U.S. Environmental Protection Agency Chemical Assessment Summary National Center for Environmental Assessment, Dibutyl phthalate; CASRN 84-74-2. 1999. Erişim Linki: [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris\\_documents/documents/subst/0038\\_summary.pdf](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0038_summary.pdf). [Erişim Tarihi: 12.10.2019].
  12. European Chemicals Agency (ECHA), Review Of New Available Information for dibutyl phthalate (DBP) . 2010. Erişim Linki: [https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/dbp\\_echa\\_review\\_report\\_2010\\_6\\_en.pdf/64b1253c-9e03-48dd-8546-cb2bee3c3646](https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/dbp_echa_review_report_2010_6_en.pdf/64b1253c-9e03-48dd-8546-cb2bee3c3646). [Erişim Tarihi: 02.11.2019]
  13. Perez C, Soderholm SC. Some Chemicals Requiring Special Consideration when Deciding Whether to Sample the Particle, Vapor, or Both Phases of an Atmosphere. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*. 2011;6(10):859-864.
  14. European Commission, Commission Delegated Directive amending Annex II to Directive 2011/65/EU of the European Parliament and of the Council as regards the list of restricted substances. 2015 Erişim Linki: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/del/2015/863/oj#document1>. [Erişim tarihi 14.11.2019].
  15. Resmi Gazete, Sanayi ve Ticaret Bakanlığı. Bazı Tüketici Ürünlerinin Tehlikeli Kimyasal Madde İçeriğine Yönelik Piyasa Gözetimi ve Denetimine İlişkin Tebliğ . 2011. Erişim Linki: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-9.htm>. [Erişim tarihi: 16.12.2019]
  16. Martin A, Sarkar A. Overview on biological implications of metal oxide nanoparticle exposure to human alveolar A549 cell line. *Nanotoxicology*. 2017;11(6):713-724.
  17. Erkekoglu P, Baydar T. Evaluation of the protective effect of ascorbic acid on nitrite- and nitrosamine-induced cytotoxicity and genotoxicity in human hepatoma line. *Toxicol Mech Methods*. 2010;20(2):45-52.
  18. Chao MW, Erkekoglu P, Tseng CY, et al. Wogan GN. Protective effects of ascorbic acid against the genetic and epigenetic alterations induced by 3,5-dimethylaminophenol in AA8 cells. *J Appl Toxicol*. 2015;35(5):466-77.
  19. Lin PY, Chang YJ, Chen YC, et al. Anti-cancer effects of 3,5-dimethylaminophenol in A549 lung cancer cells. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205249.
  20. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blazquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*. 2018;120:159-167.
  21. Wojtala A, Bonora M, Malinska D, et al. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. *Methods Enzymology*. 2014;542:243-262.
  22. Ji H. Lysis of cells for immunoprecipitation. *Cold Spring Harb Protoc*; 2010;4:1-4.
  23. Jardine D, Antolovich M, Prenzler P, et al. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) Investigation of the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;50:1720-1724.
  24. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*. 2007;1:3159.
  25. Luo S, Wehr NB. Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Report*. 2009;14(4):159-166.
  26. Shahidi F, Zhong Y. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. 26th ed. Canada; Woodhead Publishing 2015.
  27. Noble JE, Bailey MJ. Quantitation of protein. *Methods Enzymology*. 2009;463:73-95.
  28. Jepsen KF, Abildtrup A, Larsen ST. Monophthalates promote IL-6 and IL-8 production in the human epithelial cell line A549. *Toxicology In Vitro*. 2004;18(3):265-269.
  29. Rafael-Vázquez L, García-Trejo S, Aztatzi-Aguilar OG, et al. Exposure to diethylhexyl phthalate (DEHP) and monoethylhexyl phthalate (MEHP) promotes the loss of alveolar epithelial phenotype of A549 cells. *Toxicology Letters*. 2018;294:135-144.
  30. Kwapniewski R, Kozaczka S, Silva MJ, et al. Occupational Exposure to Dibutyl Phthalate Among Manicurists. *Journal of occupational and environmental medicine*. 2008;50(6):705-711.
  31. Wang Y, Zhu H, Kannan K. A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. *Toxics*. 2019;7(2):21-49.
  32. Battle DM, Pena OM, Huff RD, et al. Dibutyl phthalate modulates phenotype of granulocytes in human blood in response to inflammatory stimuli. *Toxicology Letters*. 2018;296:23-30.
  33. Odebeatu CC, Taylor T, Fleming LE, et al.



- Phthalates and asthma in children and adults: US NHANES 2007-2012. *Environmental Science Pollution Research International*. 2019;26(27):28256-28269.
34. Kim YM, Kim J, Cheong HK, et al. Exposure to phthalates aggravates pulmonary function and airway inflammation in asthmatic children. *PLoS One*. 2018;18:351-362.
  35. Kuo PL, Hsu YL, Huang MS, et al. Ginger Suppresses Phthalate Ester-Induced Airway Remodeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59:3429-3438.
  36. Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile for Di-n-Butyl Phthalate. 2001. Erişim Linki: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp135.pdf>. [Erişim Tarihi: 16.10.2019].
  37. Liu ZH, Li EH, Xu DL, et al. Genetic research and structural dysplasia assessment of anorectal malformations in neonatal male rats induced by di (n-butyl) phthalate. *Environmental Toxicology*. 2016;31(3):261-268.
  38. Zhu YP, Li EH, Sun WL, et al. Maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) induces combined anorectal and urogenital malformations in male rat offspring. *Reproductive Toxicology*. 2016;61:169-176.
  39. Chen B, Hu X, Zhen X, et al. Effects of dibutyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate with their metabolites on CYP2C9\*1 and CYP2C19\*1 activities in vitro. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;160:195-201.
  40. Walseth F, Toftgard R, Nilsen OG. Phthalate esters I: Effects on cytochrome P-450 mediated metabolism in rat liver and lung, serum enzymatic activities and serum protein levels. *Archives of Toxicology*. 1982;50(1):1-10.
  41. Erkekoğlu P, Rachidi W, Yüzügüllü OG, et al. Induction of ROS, p53, p21 in DEHP- and MEHP-exposed LNCaP cells-protection by selenium compounds. *Food Chemical Toxicology*. 2011;49(7):1565-1571.
  42. Zhang G, Ling X, Liu K, et al. The p-eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway links endoplasmic reticulum stress to autophagy following the production of reactive oxygen species in mouse spermatocyte-derived cells exposed to dibutyl phthalate. *Free Radical Research*. 2016;50(7):698-707.
  43. Erkekoğlu P, Rachidi W, De Rosa V, et al. Protective effect of selenium supplementation on the genotoxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2 ethylhexyl)phthalate treatment in LNCaP cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;1549(4):559-566.
  44. Rosa V, Erkekoğlu P, Forestier A, et al. Low doses of selenium specifically stimulate the repair of oxidative DNA damage in LNCaP prostate cancer cells. *Free Radical Research*. 2012;46(2):105-116.
  45. Kismali G, Yurdakok DB, Kuzukiran O, et al. Phthalate induced toxicity in prostate cancer cell lines and effects of alpha lipoic acid. *Bratislavske Lekarske Listy*. 2017;118(8):460-466.
  46. Kim JH. Di(2-ethylhexyl) phthalate promotes lung cancer cell line A549 progression via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J Toxicol Sci*. 2019;44(4):237-244.
  47. Shi Q, Tang J, Wang L, et al. Combined cytotoxicity of polystyrene nanoplastics and phthalate esters on human lung epithelial A549 cells and its mechanism. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021;213:112041.
  48. Li L, Li HS, Song NN, et al. The immunotoxicity of dibutyl phthalate on the macrophages in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2013;35(2):272-281.
  49. Suzuki Y, Matsumoto M. Accumulation of triacylglycerol in tissue culture cells derived from human embryonic lung (L-132 cells) on administration of di-n-butyl phthalate. *The Japanese Journal of Experimental Medicine*. 1980;50(4):253-261.
  50. Kim SH, Kim SS, Kwon O, et al. Effects of dibutyl phthalate and monobutyl phthalate on cytotoxicity and differentiation in cultured rat embryonic limb bud cells; protection by antioxidants. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*. 2002;65:461-472.
  51. Zhang G, Yang W, Jiang F, et al. PERK regulates Nrf2/ARE antioxidant pathway against dibutyl phthalate-induced mitochondrial damage and apoptosis dependent of reactive oxygen species in mouse spermatocyte-derived cells. *Toxicology Letters*. 2019;308:24-33.
  52. Albaladejo EP, Fernandes D, Lacorte S, et al. Comparative toxicity, oxidative stress and endocrine disruption potential of plasticizers in JEG-3 human placental cells. *Toxicology in Vitro*. 2017;38:41-48.
  53. Wójtowicz AK, Szychowski KA, Wnuk A, et al. Dibutyl Phthalate (DBP)-Induced Apoptosis and Neurotoxicity are Mediated via the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) but not by Estrogen Receptor Alpha (ER $\alpha$ ), Estrogen Receptor Beta (ER $\beta$ ), or Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ) in Mouse Cortical Neurons. *Neurotoxicity Research*. 2017;31(1):77-89.
  54. Cheng L, Li J, Cheng J, et al. Dibutyl phthalate-induced activation of ROS and ERK1/2 causes hepatic and renal damage in Kunming mice. *Human and Experimental Toxicology*. 2019;38(8):938-950.
  55. Yan B, Guo J, Liu X, et al. Oxidative stress mediates dibutyl phthalate induced anxiety-like behavior in Kunming mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016;45:45-51.
  56. Wang X, Yan X, Yang Y, et al. Dibutyl phthalate-mediated oxidative stress induces splenic injury in mice and the attenuating effects of vitamin E and curcumin. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;136:110955.