

# Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelerin Epigenetik Etkileri: Ftalatlar

## Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: Phthalates: Review

Pınar ERKEKOĞLU,<sup>a</sup>  
Hüseyin KAHVECİOĞLU,<sup>a</sup>  
Belma KOÇER GÜMÜŞEL<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Farmasötik Toksikoloji AD,  
Hacettepe Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi, Ankara

Geliş Tarihi/Received: 03.04.2016  
Kabul Tarihi/Accepted: 20.09.2016

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Belma KOÇER GÜMÜŞEL  
Hacettepe Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi,  
Farmasötik Toksikoloji AD, Ankara,  
TÜRKİYE/TURKEY  
belmagumusel@yahoo.com

**ÖZET** DNA dizisinden bağımsız olarak gen ekspresyonunda meydana gelen kalıtsal değişiklikler “epigenetik değişiklikler” olarak adlandırılır. Peroksizom proliferasyonu önemli bir epigenetik mekanizmadır. Peroksizomların sayılarının artışı başta hipertrofiye, takiben hızlı mitoz ve hiperplaziye yol açar. Diğer taraftan, biyolojik sistemlerde metilasyon, genomun normal olarak düzenlenmesini sağlar. DNA metilasyonu, üzerinde en fazla çalışma yapılan epigenetik değişikliktir ve bu olay gen aktivasyonu, baskılanması ve kromatin şekillenmesinde rol oynar. Ftalatlar günümüzde oldukça yaygın kullanımı olan plastizerlerdir. Yüksek molekül ağırlıklı ftalatlar medikal ürünlerde, yapı materyalleri, kablo, film, kaplama, yer döşemeleri, cam/kapı profili, çanta, ayakkabı, kan torbası, baskılı kıyafetler, çocuk oyuncakları, bebek şampuanları, temizleme kremleri, eldiven, mürekkep ve yapıştırıcı yapımında kullanılır. Düşük molekül ağırlıklı ftalatların ise kozmetik ve parfümlerde renk ve koku sabitleyici olarak kullanıldıkları; insektisit ve farmasötik üretiminde de formülasyona eklendikleri bilinmektedir. Ftalatlar endokrin bozucu kimyasal maddeler arasında yer almaktadır ve kemirici karaciğerinde peroksizom proliferasyonuna neden olarak hepatokarsinogeneze yol açtıkları bildirilmiştir. Ancak, insanlarda benzer bir mekanizmanın etkin olduğuna dair kanıtlar sınırlıdır. Ftalatların peroksizom proliferasyonu dışında apoptozun baskılanması, reaktif oksijen türlerinin oluşması, hücreler arası haberleşmenin bozulması, başlatılmış hücrelerde klonal büyümenin artışı ve DNA metilasyonunun değişmesi gibi farklı epigenetik mekanizmalarla da etki gösterdikleri düşünülmektedir. Bu çalışmada, epigenetik mekanizmalar, ftalatların neden olduğu epigenetik değişiklikler ve bunun sonucunda ortaya çıkabilecek olası toksik etkilerine yer verilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz; DNA metilasyonu; reaktif oksijen türleri; dietilheksil ftalal; peroksizom çoğaltıcıları

**ABSTRACT** The changes in gene expression that are independent of alterations in DNA sequence, are called “epigenetic alterations”. Peroxisome proliferation is an epigenetic mechanism. The increase in peroxisome numbers can firstly cause hypertrophy of cells, later fast mitosis and hyperplasia. On the other hand, methylation in biological systems provides normal genome regulation. DNA methylation is the most widely studied epigenetic alteration and this phenomenon plays roles in gene activation, suppression and chromatin modelling. Phthalates are highly used plasticizers today. High molecular weight phthalates are used in medical devices, construction material, cable, film, coating, floorings, window/door profile bag, shoe, blood pack, printed attire, children’s toys, baby shampoos, cleansing creams, gloves, ink and glues. Low molecular weight phthalates are used in cosmetics and perfumes as colour and smell fixators, as well as they are added to insecticide and pharmaceutical formulations during production. Phthalates are endocrine disrupting chemicals and they are reported to cause peroxisome proliferation which may lead to hepatocarcinogenesis in rodent liver. However, there is limited evidence that the same mechanism is active in humans. Other than peroxisome proliferation, phthalates are suggested to cause suppression of apoptosis, production of reactive oxygen species, interruption of intercellular communication, clonal growth in initiated cells and alterations in DNA methylation. This review will focus on epigenetic mechanisms, the epigenetic alterations that phthalates may cause and the outcomes of these possible toxic effects.

**Key Words:** Apoptosis; DNA methylation; reactive oxygen species; diethylhexyl phthalate; peroxisome proliferators

doi: 10.5336/pharmsci.2016-51503

Copyright © 2016 by Türkiye Klinikleri

**Türkiye Klinikleri J Pharm Sci 2016;5(2):118-28**

**D**NA molekülü, nükleotid olarak adlandırılan küçük yapı taşlarının birleşmesiyle oluşmaktadır. DNA'nın yapısı ve nükleotidlerin dizilişi bir canlının tüm hücrelerinde aynı olmakla birlikte, hücreler arası farklılıklar gen ifadesindeki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. DNA dizisinden bağımsız olarak gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikler ise "epigenetik değişiklikler" olarak adlandırılmaktadır.<sup>1,2</sup>

Epigenetik mekanizmalar, çevresel etkenler ve henüz tanımlanmamış bazı faktörlerin de katkısıyla "epigenotip" adı verilen bir profil oluşturmaktadır. Genetik ve epigenetik mekanizmaların birlikte çalışması sonucu gen ekspresyonunda kalıcı değişiklikler meydana gelmektedir. Genotipin bu genetik ve epigenetik üzerindeki yansıması ise fenotipi oluşturmaktadır.<sup>1</sup>

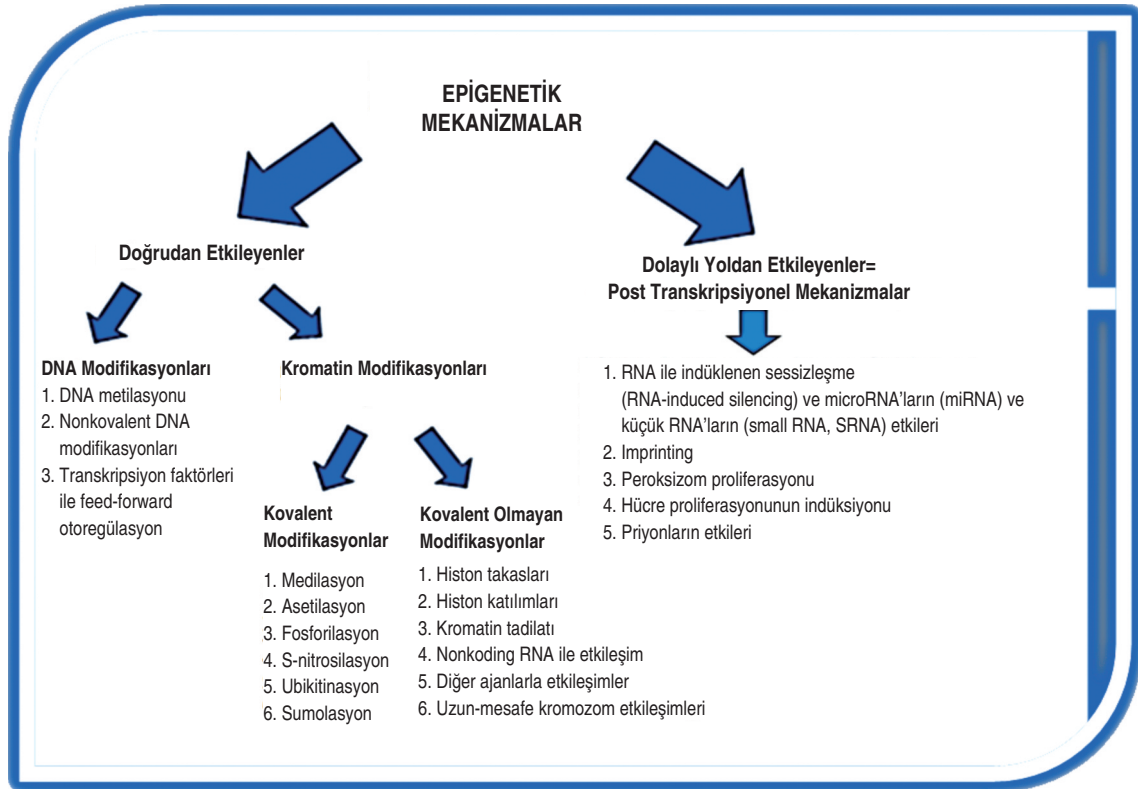
Epigenetik mekanizmaların işleyişinde ortaya çıkabilecek bir bozukluk genlerin ekspresyonlarında artış veya baskılanmaya neden olur ve epigenetik hastalıklara yol açabilir.<sup>2</sup> Bu hastalıklara; Angelman sendromu, otizm spektrum bozukluk-

ları, Beckwith-Wiedemann Sendromu, Fragile X sendromu, Prader-Willi sendromu, metabolik sendrom, Rett sendromu ve Russell-Silver sendromu örnek olarak verilebilir. Ayrıca, kalp hastalıkları, hipertansiyon, nörodejeneratif bozukluklar ve obezitenin ortaya çıkmasında da epigenetik kökenlerin olabileceği bildirilmektedir. Epigenetik mekanizmalar Şekil 1'de görülmektedir.

Bu çalışmada, ftalatların neden olduğu düşünülen önemli epigenetik mekanizmalar olan peroksizom proliferasyonu ve DNA metilasyonundan söz edilmiştir. Ayrıca, ftalatların neden olduğu diğer epigenetik değişiklikler ve bunların olası toksikolojik sonuçları değerlendirilmiştir.

### ÖNEMLİ BİR EPİGENETİK MEKANİZMA: PEROKSİZOM PROLİFERASYONU

Peroksizomlar; eritrositler hariç tüm memeli hücrelerinde bulunan ve birçok fonksiyonu olan tek zarla çevrili sitoplazmik organellerdir. Karaciğer hücrelerinde peroksizomlar hücre hacminin %2,4'ünü kaplamaktadır. Peroksizomlar, molekü-



ŞEKİL 1: Epigenetik mekanizmalar.

ler O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O kullanarak oksidatif reaksiyonları gerçekleştirir.<sup>3</sup>

Peroksizomal membranın sitozolik yüzünde yağ asitlerinin oksidasyonunda görevli enzim olan açıl-koenzim A sentetaz (açıl CoA sentetaz) bulunur. Aynı enzimin endoplazmik retikülüm membranında bulunduğu da bildirilmiştir.<sup>4</sup> Bu enzim prostetik grup olarak flavin adenin dinükleotid (FAD) içermektedir. Peroksizomlarda enzime bağlı redükte flavin adenin dinükleotid (FADH<sub>2</sub>)'in reoksidasyonu ve moleküler O<sub>2</sub> ile doğrudan etkileşmesi sonucunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşur. 1990 yılında peroksizom proliferatörleri tarafından indüklenen ve indüklenmeyen olmak üzere iki tip açıl CoA oksidaz varlığı saptanmıştır.<sup>5,6</sup>

Peroksizomların birçok ara metabolizmada önemli fonksiyonları vardır; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumu, yıkımı ve oksidatif metabolizmada rol aldıkları bilinmektedir.<sup>7</sup> Uzun zincirli yağ asitlerinin beta-oksidasyonu peroksizomlarda gerçekleşir. Karaciğerde safra asidi, beyin ve kalpte plazminojen sentezinde görevleri vardır. Amino asit, pürin ve glioksilat katabolizması ile ilaç ve ksenobiyotik metabolizmasında rol alır. Ayrıca, kolesterol sentezinde görevleri vardır. Peroksizom biyogenez bozuklukları çok geniş bir yelpazedeki otozomal resesif gelişimsel beyin hastalıklarını içerir ve kraniyofasiyal dismorfizm, karaciğer disfonksiyonu, progresif sensorinöral işitme kaybı ve retinopati gibi bozukluklarla kendini gösterir.<sup>8,9</sup>

İlk kez yaklaşık 50 yıl önce, klofibrat içeren yemle beslenen sıçanların karaciğer paraenkimal hücrelerinde peroksizom proliferasyonunun indüklendiği gösterilmiştir.<sup>10</sup> Daha sonraları birçok klofibrat-benzeri hipolipidemik ilacın ve ftalat esterlerinin primatlar dâhil birçok türün karaciğerinde peroksizom proliferasyonunu indüklediği saptanmıştır. Metil klofenapat, siprofibrat, nafenopin, gemfibrozil, bezafibrat ve fenofibrat gibi klofibratın yapısal analoglarının peroksizom proliferasyonunu takiben fare ve sıçanlarda hepatokarsinogeneze neden olduğu daha sonraki çalışmalar ile gösterilmiştir. Klofibrata yapısal olarak benzemeyen hipolipidemik ilaçların da potent peroksizom proliferatörleri olduğu bildirilmiştir. Takip eden yıllarda di (2-etilhekzil) ftalat [di (2-

ethylhexyl) phthalate (DEHP)] ve di (2-etilhekzil) adipat [di (2-ethylhexyl) adipate (DEHA)] gibi plastizerlerin de peroksizom proliferasyonuna neden olduğu belirlenmiştir.<sup>11</sup>

Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör (PPAR)'ler bazı genlerin ekspresyonunu regüle edici transkripsiyon faktörü olarak görev alan ve tiroid, steroid ve retinoik asit reseptörleri gibi nükleer reseptör ailesine mensup olan proteinlerdir. PPAR agonistleri, PPAR'nin ligand bağlayıcı bölgesine bağlandığında hücre içi sinyaller başlatılarak ilgili genlerin aktivitesi düzenlenir. PPAR'lerin hücre farklılaşması, gelişimi, karbonhidrat, lipit ve proteinlerin biyotransformasyonu, apoptoz, inflamasyon ve tümörogeneze esansiyel rolleri vardır. PPAR'ler kanser, diyabet, obezite gibi patolojik birçok süreçte pek çok genin ifadesini değiştirebilir.<sup>12</sup>

Bu reseptörler ilk kez fibratlarla ilgili araştırmalar sırasında belirlenmiştir. Fibratların kolesterol düşürücü etkilerinin artmış hepatik yağ asidi oksidasyonuna neden olduğu, bunun da hepatositlerdeki peroksizom dansitesini artırdığı belirlenmiştir. Takiben fibratların asıl hedefinin PPAR'ler olduğu gösterilmiştir. Ancak, ilerleyen yıllarda sadece PPAR-α'nın aktivasyonunun peroksizom proliferasyonuna neden olduğu, PPAR-α'ya amino asit dizilimi olarak yakın olan PPARδ veya PPAR-γ'nin aktivasyonunun peroksizom proliferasyonuna neden olmadığı bildirilmiştir.<sup>13</sup> PPARδ ve PPAR-γ'nin ise farklı fonksiyonlarının olduğu belirlenmiştir. PPARγ'nin ilk olarak farklılaşmış adipositlerde ifade edildiği belirlenmiştir. Son yıllarda ise adipogenezin ana düzenleyicisi olduğu anlaşılmış ve en yüksek oranda adipoz dokuda ifade edildiği görülmüştür. PPAR-γ'nin insülin sensitize edici bir ilaç olan tiyazolidinedio (TZD)'nin hedefi olduğu da belirlenmiştir. TZD, PPAR-γ'yi aktive ederek, adiposit farklılaşması için gerekli olan genlerin indüksiyonuna neden olur. Bu da artmış yağ depolanmasına ve adiponektin gibi insülin-duyarlaştırıcı hormonların salımına neden olur.<sup>14</sup>

Tüm PPAR'ler retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimerize olur ve DNA'da farklı noktalara bağlanarak hedef genlerin ifadesini etkiler. Bu DNA dizilimlerine peroksizom hormon cevap elemanları [peroxisome proliferator response elements

(PPRE)] adı verilir. Genel olarak bağlandıkları dizilim AGGTCANAGGTCA'dır. N burada herhangi bir nükleotidi temsil etmektedir. Genelde bu dizilim genin başlatıcı (promoter) bölgesinde bulunur ve PPAR liganda bağlandığında ilgili gene bağlı olarak genlerin transkripsiyonu artar veya azalır.<sup>15</sup>

## FTALATLAR

Ftalatlar, ftalik asidin monohidrik alkoller ile yaptığı diesterlerdir. 1900'lü yılların başında dietilftalat (DEP) ve dibütilftalat (DBP) üretilmeye başlanmıştır. 1920'li yılların sonunda polivinil klorür [polyvinyl chloride (PVC)] bulunmuştur. PVC normalde sert ve kırılğan bir materyal olduğu için PVC'nin esnetilmesi amacıyla plastik üretiminde ftalatlar kullanılmaya başlanmıştır.<sup>16,17</sup>

Bilinen tüm ftalatlar berrak ve oda sıcaklığında yağimsı sıvılardır. Tüm organik çözücülerde çözünür ve diğer PVC plastizerler ile karışabilir. Plastik ve reçinelere eklendiklerinde plastiğin işlenebilirliğini artırır; özelliklerini değiştirir ve orijinal materyalde olmayan yeni özellikler katabilir. Düşük molekül ağırlıklı ftalatlar suda çözünebilir. Işıklı parçalanma yarı ömürleri 0,2-dört gündür. Düşük sıcaklıklarda bu süre daha da uzar. Tüm ftalatlar düşük buhar basıncına sahiptir. Bu nedenle, yüzey sularında her zaman sabit miktarlarda bulunur.<sup>16,17</sup> Yüksek molekül ağırlıklı ftalatlar medikal ürünlerde, yapı materyalleri, kablo, film, kaplama, yer döşemeleri, cam/kapı profili, çanta, ayakkabı, kan torbası, baskılı kıyafetler, çocuk oyuncakları, bebek şampuanları, temizleme kremlerinde ve eldiven gibi esnek ve yalıtkan malzeme yapımında, mürekkep ve yapıştırıcı yapımında kullanılır. Düşük molekül ağırlıklı ftalatların ise kozmetik ve parfümlerde taşıyıcı, renk ve koku sabitleyici olarak kullanıldıkları; insektisit ve farmasötik üretiminde de formülasyona eklendikleri bilinmektedir.<sup>18,19</sup>

En yaygın kullanılan ve çevrede en çok bulunan ftalat olan DEHP'ye ait böbrek hasarı için belirlenen ters etki gözlenmeyen düzeyi (no observed adverse effect level, NOAEL) 29 mg/kg/gün; testis hasarı için 4,8 mg/kg/gün; fertiliteye etkiler için 20 mg/kg/gün ve gelişimsel etkiler için 4,8 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir.<sup>20</sup>

## FTALATLARIN EPİGENETİK ETKİLERİ

Ftalat türevlerinin kemiricilerde epigenetik etkili karsinojenler olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. DEHP, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı [International Agency for Research on Cancer (IARC)] tarafından "insanlarda muhtemel karsinojen (Grup IIB)" olarak sınıflandırılmıştır.<sup>21</sup> Ftalatların bu etkilerinin altında yatan olası mekanizmalar aşağıda sıralanmıştır:

**1. Peroksizom Proliferasyonu:** Ftalatların peroksizom proliferasyonuna neden oldukları uzun yıllardır bilinmektedir.<sup>22,23</sup> Ftalatlarla indüklenen hepatokarsinogeneze en hassas türler fare ve sıçanlardır. Ftalatların kemiricilerde aynı fibratlar gibi peroksizom proliferasyonunu ve hepatik katalaz [catalase activity (CAT)] aktivitesini artırarak karaciğer hipertrofisine ve hiperplazisine, takiben de hepatomegaliye ve hepatokarsinogeneze neden oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.<sup>17,22,23</sup> Farklı sürelerde DEHP'ye maruz kalan hayvanların karaciğerlerinde midzonal ve periportal yağ akümüasyonu, sentrilobüler bölgelerde glikojen depositlerinde azalma, safra kanallarında yapısal değişiklikler ve lipofuskin granüllerinde bir artış görülür.<sup>17,24,25</sup> PPAR- $\alpha$  aktivasyonunu takiben gözlenen olaylar zincirinin hepatokarsinogeneze için baskın bir etki şekli olduğu, ancak diğer farklı mekanizmaların da karsinogenezin gelişiminde etkin olabileceği belirtilmektedir. Peroksizom proliferasyonu dışında, mitokondri sayı ve hacminde ve lipit-yüklü lizozom sayısında artış da karsinogeneze giden olaylar zincirinin bir parçasıdır.<sup>26</sup>

Fare ve sıçanlarda hepatosit mitoz hızının artması DEHP başlangıç dozunu takip eden 24 saat içinde gerçekleşir ve aşamalı olarak bir hafta boyunca artış gözlenir.<sup>26</sup> Ancak, bu durum takip eden haftalarda aynı hızla sürmez.<sup>26-28</sup> Uzun süreli temasın sonucunda kemiricilerde hepatoselüler adenoma ve karsinomalar ortaya çıkar. Ulusal Toksikoloji Programı [National Toxicology Program (NTP)]'nin yaptığı iki yıllık çalışma sonucunda, B6C3F1 farelerde ve F344 sıçanlarda her iki cinsiyette de DEHP teması ile hepatoselüler karsinoma ve hepatik neoplastik nodül oluşma arasında

anamlı pozitif bir korelasyonun olduğu belirtilmiştir.<sup>29</sup> Ancak, DEHP uygulamasının kesilmesini takiben tümör insidansı, karaciğer ağırlığı ve peroksizom proliferasyonundaki azalma DEHP teması ile karaciğer karsinogenezi arasında geçici bir ilişki olduğunu göstermektedir.<sup>30</sup> Diğer taraftan, DNA'da hasar oluşturucu bir ajana teması takiben, DEHP'nin in vivo olarak tümör indüklemeye özelliğinin de olduğu belirlenmiştir.<sup>31,32</sup> PPAR- $\alpha$  bağımlı mekanizmalar ile insanlarda hepatokarsinogeneze oluşumuna ilişkin sınırlı sayıda veri olduğu ileri sürülmektedir.<sup>33</sup>

**2. Apoptozun Baskılanması:** Apoptozun baskılanması da ftalatların kemiricilerde neden olduğu karsinogenezin altında yatan önemli moleküler mekanizmalardan biridir.<sup>34</sup> Pek çok çalışmada fare ve sıçan karaciğerinde PPAR- $\alpha$  agonistlerinin in vivo olarak apoptozu baskıladıkları belirlenmiştir.<sup>35,36</sup> Ftalatlara temas sonrası normal olarak apoptozla uzaklaştırılan hücrelerin mitojenik stimülasyonla canlı kaldığı ve bölündüğü rapor edilmiştir. PPAR- $\alpha$  agonistleriyle yapılan bir çalışmada, yalnızca orta (50 haftalık) ve ileri yaşlarda (100 haftalık) olan hayvanların karaciğerlerinin bu etkiye hassas olduğu, genç hayvanların karaciğerlerinde bu etkinin görülmediği bildirilmiştir. DEHP ve diğer peroksizom proliferatörlerinin insanlarda ve diğer primatlarda benzer etkilerinin olduğuna dair çalışma yoktur.<sup>37</sup> İn vivo bir çalışmada, PPAR- $\alpha$  agonist prototipi Wy-16,643'ün farelerde apoptotik hepatositlerin sayısında %40-60 oranında bir artışa neden olduğu gösterilmiştir.<sup>38</sup> Kemirici hepatositlerinde, DEHP'nin ana metaboliti olan mono(2-etilhekzil) ftalat [mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP)] ve diğer peroksizom proliferatörlerinin spontan olarak hepatosit apoptozunu baskıladığı belirtilmiştir. Ayrıca, MEHP'nin transforme edici büyüme faktörü [transforming growth factor (TGF $\beta$ 1)] ve DNA'da hasar oluşturucu ajanlar olan etoposid, hidroksiüre ve anti-Fas antikolarıyla indüklenen karaciğer apoptozunu da baskıladığı gösterilmiştir.<sup>34,39-41</sup> Sıçan hepatositleri üzerinde yapılan canlılık deneylerinde, peroksizom proliferatörlerine maruz kalan hepatositlerin en az dört hafta canlı kaldığı; ancak kontrol hayvanlardan elde edilen hücrelerin ortalama sekiz gün canlı

kalabildiği; peroksizom proliferatörlerine maruz kalan kültürlerde apoptoz belirtilerinin (kondense ve fragmente DNA) daha az sıklıkla görüldüğü belirtilmiştir.<sup>42</sup> PPAR- $\alpha$ 'nın apoptozun inhibisyonu için gerekli olduğu düşünülmektedir ve PPAR- $\alpha$ -farelerin nafenopin gibi peroksizom proliferatörlerinin etkilerine yanıt vermediği, spontan ve TGF $\beta$ 1 ile indüklenen apoptozu açık olduğu belirtilmiştir.<sup>34,40</sup> PPAR- $\alpha$  aracılıklı apoptoz inhibisyonu bu reseptörün negatif efektör regülatör etkisine bağlıdır.<sup>42</sup>

### 3. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Oluşması:

Reaktif oksijen türleri [reaktive oxygen species (ROS)], hücreler arası sinyalleşme molekülleri olarak etki gösterir. Ancak, hücre içi fazla miktarda ROS oluşumu oksidatif strese yol açar. Bu durumda hücrel indirgeme potansiyeli bozulabilir, hücre hasara uğrayabilir ve/veya glutatyon (GSH) gibi hücrel indirgemeyi sağlayan öğeler baskılanabilir. Bu dengesizlik sonucu oluşan peroksitler ve serbest radikaller hücrel proteinlere, lipitlere ve DNA'ya hasar verir.<sup>43,44</sup> Oksidatif stresin büyüklüğü hücrel indirgeme mekanizmalarında ortaya çıkan değişimlerin boyutuna bağlıdır. Eğer hücre oluşan değişimlerin düzelmesini sağlayabiliyorsa ve normal hâline geri dönebiliyorsa, hücrede ya hiç hasar görülmez ya da küçük bir hasar ortaya çıkar. Ancak, hücrel onarım sağlanamıyorsa ve adenozin trifosfat [adenosine triphosphate (ATP)] deplesyonu da varsa hücre ölümü gerçekleşir. Hasar orta düzeyde ise hücre apoptozu gider; hasar büyükse nekroz, takiben de mutasyon ve karsinogeneze ortaya çıkabilir.<sup>45-47</sup> Ancak, oksidatif stresin patolojik durumların nedeni mi olduğu, yoksa patolojik durumların nedeni ile mi ortaya çıktığı tartışmalı bir konudur.<sup>48</sup>

Hücre içi ROS artışı ve takiben ortaya çıkabilecek olası değişiklikler hem doğrudan DNA yapısını bozarak genotoksisiteye hem de epigenetik bir mekanizma ile DNA'nın etkilenmesine yol açar.<sup>49-51</sup> Çeşitli çalışmalar, ftalatlar dâhil olmak üzere PPAR- $\alpha$  agonistlerinin neden olduğu tümörögenез ile ROS arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bunun nedeni, bu kimyasal maddeler ile karaciğer parankimal hücrelerinde indüklenen farklı protein ve hücre organellerinin (peroksizom, mitokondri, mikrozoim), özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve diğer ok-



sidanların neden olabileceği hasara açık olmalarıdır.<sup>52,53</sup> Oluşan DNA hasarı ve olası epigenetik etkiler, mutasyon ve kanserle sonuçlanabilir. Ancak, oluşabilecek değişikliklerin mekanizmalarını iyi değerlendirmek gerek.<sup>53,54</sup> Fare ve sıçan karaciğerlerinde ve izole hepatositlerde yapılan çalışmalarda peroksizom proliferatörlerinin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üreten enzimler ile DNA, lipid ve diğer molekülleri degrade eden enzimlerin aktivitelerini artırdıkları belirlenmiştir.<sup>55,56</sup> Reddy ve ark. peroksizom proliferatörlerinin oksidatif stresi indüklemelerine neden olan mekanizmanın peroksizomlarda bulunan “yağ asidi açıl-CoA oksidaz” enziminin indüklenmesi olduğunu bildirmiştir. Ancak, bu proteini ifade etmeyen farelerin kimyasal olarak indüklenen karaciğer kanserinden korunması beklenirken, spontan olarak karaciğer tümörü geliştirdikleri gözlenmiştir. Bunun nedeninin metabolize olmayan lipidlerle PPAR- $\alpha$ 'nın hiper-aktivasyonu olabileceği bildirilmiştir.<sup>57</sup> Son 30 yılda ise DEHP'nin hücre içi ROS düzeylerini artırdığına dair birçok veri elde edilmiştir.<sup>58-63</sup> Yaptığımız çalışmalarda, sıçanlara 10 gün süreyle DEHP uygulamasının karaciğer, böbrek ve testiste anlamlı düzeyde lipid peroksidasyon artışına neden olduğu belirlenmiştir. Testiste okside GSH düzeylerinde önemli artış ve total ve indirgenmiş GSH düzeylerinde gözlenen azalmalar nedeni ile, DEHP'nin önemli düzeyde oksidatif strese neden olduğu gözlenmiştir. DEHP uygulaması aynı zamanda testiste Cu,Zn-süperoksit dismutaz (Cu,Zn-SOD) ve GSH peroksidaz 4 (GPx4) aktivitelerini önemli ölçüde azaltmıştır. Diğer taraftan, özellikle testis ve karaciğerde CAT aktivitesinde ve CAT immünoreaktivitesinde gözlenen artışlar da bu ftalatın peroksizom proliferasyonu yapıcı etkisine bağlanabilir. Ayrıca, DEHP'in karaciğerde peroksizom sayısını artırdığı tarafımızdan ve diğer pek çok çalışma ile belirlenmiştir.<sup>64-66</sup> Özellikle DEHP gibi ftalatlara akut temasın PPAR- $\alpha$  aktivasyonuna neden olmadığı; PPAR- $\alpha$  aktivasyonunun sadece uzun süreli (örneğin; haftalar boyu) temas ile gerçekleşebileceği belirlenmiştir.<sup>67,68</sup> Fare ve sıçan karaciğerlerinde DEHP veya diğer peroksizom proliferatörlerine maruziyet sonrası, Kupffer hücrelerinin potansiyel bir oksidasyon kaynağı olabileceği de belirtilmektedir. Bütün

bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, peroksizom proliferatörlerine maruziyet sonucu artan ROS düzeyleri ile ortaya çıkabilecek olası epigenetik değişiklikler ve genotoksisitenin de bu bileşiklerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde dikkate alınması gereken önemli bir konu olduğu söylenebilir.<sup>17,69,70</sup>

#### 4. Hücreler Arası Haberleşmenin Bozulması:

Hücreler arası gap birleşme (gap junctional) iletişiminin, kanser gelişimi esnasında modüle olduğu ve çok basamaklı sıçan hepatokarsinogenezi esnasında progresif olarak azaldığı belirlenmiştir.<sup>71</sup> Hücre-hücre iletişiminin bozulması kimyasal karsinogenin “gelişme aşaması”nda önemli bir mekanizma olarak değerlendirilir. Tümör başlatıcı ajanlara maruziyet sonrasında hücreler arası iletişimin bozulması, bu kimyasal maddeye maruz kalan cins ve türün hassasiyetiyle de ilgilidir.<sup>71</sup> Örneğin, fare ve sıçanların karaciğerinde DEHP, diisononil ftalat [diisononyl phthalate (DINP)] ve diğer bazı peroksizom proliferatörlerinin gap birleşme iletişimini inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>72</sup> DEHP uygulaması kesildiğinde bile bu inhibisyonun devam ettiği görülmüştür.<sup>73</sup> Ayrıca, maddenin uygulama dozu ve sıklığının da hücreler arası iletişimin değişmesinde rolü vardır ve değişim, peroksizom proliferatörlerinin genotoksik olmayan karsinogenik etki potansiyellerinin değerlendirilmesinde iyi bir göstergedir.<sup>71,73,74</sup> MEHP'nin de fare ve sıçan hepatosit kültürlerinde gap birleşme iletişimini doz-bağımlı bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir.<sup>75,76</sup> MEHP maruziyeti kesildiğinde ise, bu hücrelerde iletişimin 24 saat içinde belirgin bir şekilde düzeldiği görülmüştür.<sup>76</sup> Ancak, MEHP'nin gap birleşme iletişimini hamster, maymun ve insan hepatosit kültürlerinde ve in vivo primat çalışmalarında inhibe etmediği belirlenmiştir.<sup>76,77</sup>

#### 5. Başlatılmış Hücrelerde Klonal Büyümenin

**Artışı:** Peroksizom proliferatörleri tarafından indüklenen oksidatif stres ve diğer endojen faktörler (replikasyon hataları, normal oksidatif metabolizma gibi), kemirici karaciğerinde hücre proliferasyonundaki artış, apoptozun baskılanması ve bunu izleyen olaylara neden olur.<sup>22,23</sup> Bu durumda kemirici hepatositlerinde ortaya çıkan genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu başlatılmış hücre-

lerde klonal artış görülür. Bu artış, DEHP ve diğer peroksizom proliferatörlerinin “tümör geliştiriciler” olarak sınıflandırılmasını beraberinde getirmiştir. Peroksizom proliferatörleri selektif olarak sıçan karaciğerinde hücre büyümesini ve takiben de bazofilik odakları ve adenomları indükler.<sup>78,79</sup> Ayrıca, peroksizom proliferatörlerine uzun süreli maruziyet ile başlatılmış hepatik hücrelerde karsinoma gelişimi gözlenir. Kanserin “başlama” evresi genelde spontan olarak ortaya çıkar ve geri dönüşüzdür. Yaşlı hayvanların spontan olarak ortaya çıkan başlatılmış hepatositleri akümüle etme olasılıkları genç hayvanlara göre yüksektir. Bu da daha önce bahsedildiği gibi, yaşlı hayvanların peroksizom proliferatörlerinin etkilerine daha hassas olmasını beraberinde getirir.<sup>80,81</sup> Nafenopin ve Wy-14,643’ün fare ve sıçan hepatositlerinde ve birçok hücre tipinde klonal ekspansiyona neden oldukları bildirilmiştir. Bu olayın nedenleri arasında, bu maddelerin mitoz ve apoptoz arasındaki dengeyi bozmaları ve takiben başlatılmış klonların hızlı artışının olabileceği belirtilmiştir. Ancak, hamster, kobay ve insan hepatositlerinin nafenopinin mitojenik etkisine duyarız oldukları bildirilmiştir. Hayvan ve insan hepatositleri için DEHP ve MEHP ile yapılmış olan benzer karşılaştırmalı çalışmalar bulunmamaktadır.<sup>81-83</sup>

**6. DNA Metilasyonunun Etkilenmesi:** Metilasyon, bir kimyasal bileşiğe, metil grubunun eklenmesidir. Biyolojik sistemlerde metilasyon, genomun normal olarak düzenlenmesini ve gelişmesini sağlayan kimyasal bir reaksiyondur ve epigenetik mekanizmalar arasında en çok üzerinde çalışılan konudur. Gen aktivasyonu, baskılanması ve kromatin şekillenmesi gibi epigenetik olaylarda, başka bir deyişle gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar. Metilasyon, organizmada “protein metilasyonu” ve “DNA metilasyonu” olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Üzerinde en fazla çalışma yapılan epigenetik değişiklik DNA’nın metilasyonudur.<sup>84</sup>

C-fosfat-G [C-phosphate-G (CpG)] adacıkları sitozin nükleotidinin guanin nükleotidi ile baz sekanısında lineer olarak bulunduğu DNA bölgelelerinde oluşur. CpG adacıkları, genellikle genlerin başlatıcı bölgelerinde bulunan 0,5-3 kb’lık (genel-

likle 200 baz çiftinden uzun) CpG dinükleotince zengin bölgelerdir. Başlatıcı bölgelerdeki CpG adacıkları gibi genin yapısında bulunan CpG adacıklarının metilasyonunun da transkripsiyonel aktiviteyi etkilediği ve genelde azalttığı bulunmuştur. Ancak, bazı durumlarda metilasyonun gen transkripsiyonunu da arttırdığı bildirilmiştir. DNA’nın metilasyonu, “DNA metiltransferaz (DNMT)” enzimleri tarafından ve “metil bağlanma proteinleri” yardımıyla (MBD1, MBD2, MBD3 vb.) katalizlenir. DNA metilasyonunu düzenleyen DNMT ve MBD genlerindeki mutasyonların, meme, mide ve akut miyeloid lösemi gibi kanserlerin oluşumunda etkin olduğu bilinmektedir. Anormal DNA metilasyonu, “hipermetilasyon”, “hipometilasyon” ve “imprinting kaybı (monoallel gen ekspresyon kaybı)” olmak üzere üç şekilde görülebilir. Bunlardan global hipometilasyon kanserle ilk ilişkilendirilen metilasyon türüdür. Genomik global hipometilasyon, normalde suskun olan genleri aktiveleştirir ve kromozomal kararsızlığa neden olarak tümör gelişimine yol açabilir.<sup>85-87</sup>

Ftalatlara maruziyetin DNA ve protein metilasyonlarında değişikliğe neden olabileceği son yıllarda üzerinde çalışılan bir konu hâline gelmiştir. Bilindiği gibi, onkogen aktivasyonu kanser gelişimde çok önemli mekanizmalardan biridir. [dibutil ftalat dibutyl phthalate (DBP)]’nin c-myc proto-onkogeninde hipometilasyona yol açarak c-myc’yi aktive ettiği bildirilmiştir.<sup>88</sup> Diğer taraftan, mayaya dayalı östrojen reseptör transkripsiyon yöntemi ile, DBP’nin metaboliti olan benz-butyl ftalat [benzyl butly phthalate (BBP)]’in insan meme kanser hücre kültürleri (MCF7) ve primer meme hücre kültürlerinde (MCF10A) östrojen reseptör alfa [estrogen receptor alfa (ER $\alpha$ )] geninin başlatıcı bölgesinde hipometilasyona neden olduğu ve insan ER $\alpha$  gen ekspresyonunu indüklediği belirlenmiştir. Aynı etkiyi DBP göstermemiştir. Ayrıca, düşük konsantrasyonlarda DBP ve BBP’nin, ER $\alpha$  geninin mRNA ifadesinin değişmesine ve genin başlangıç bölgesindeki CpG adacıklarının demetilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir.<sup>89</sup>

DEHP’nin germ hücrelerinin epigenetiğini de değiştirebildiği belirtilmektedir. Gebe sıçanlarının 0-40  $\mu$ g/kg DEHP’ye maruz bırakıldığı bir çalış-

mada, F1 jenerasyonunda DEHP temasının hem diş, hem de erkekte primordiyal germ hücrelerinde ve özellikle de oositlerde farklı metillenmiş bölgelerde [differentially methylated regions, (DMR)] *Igf2r* ve *Peg3* genlerinde metile CpG bölgelerinin oranını belirgin bir şekilde azalttığı bildirilmiştir. Bu durumun F2 jenerasyonuna da aktarıldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, hem anne, hem de yavruda DEHP temasının fetal fare germ hücrelerinde ve büyümekte olan oositlerde imprinted genlerin DNA metilasyonunu etkilediği belirtilmiştir.<sup>90</sup>

Fetal testis DEHP'in ana hedefidir. DEHP'ye maternal maruziyetin fare testisinde DNA metilasyonunu ve DNA metiltransferaz ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir. Bu da ftalat maruziyeti sonucu ortaya çıkan testiküler disgenez sendromunda insülin-benzeri hormon 3 (INSL3) ekspresyonu ve testosteron üretiminde bir azalma ile kendini göstermektedir.<sup>91</sup>

Ftalatların epigenetik etkileri Tablo 1'de görülmektedir.

## SONUÇ

Epigenetik mekanizmaların işleyişinde ortaya çıkabilecek bir bozukluk, genlerin ifadelerinde artış veya baskılanmaya neden olur. Ftalatların peroksi-

**TABLO 1:** Ftalatların epigenetik etkileri.

Kimyasallar	Epigenetik etki	Sonuç
DEHP	Peroksisom proliferasyonu	Hepatokarsinogenez
DEHP	Hücre içi ROS artışı	Oksidatif stres, genotoksisite
DEHP, MEHP	Apoptozun baskılanması	Artmış klonal büyüme
DEHP	Başlatılmış hücrelerde klonal büyümenin artışı	Hepatokarsinogenez
DEHP, DINP	Hücreler arası haberleşmenin bozulması	Hepatokarsinogenez
BBP, DBP	DNA hipometilasyonu veya hipermetilasyonu	Farklı gen ifadelerinde artış veya azalma

BBP: Benz butil ftalat; DBP: Dibutil ftalat; DEHP: di(2-etilhekzil)ftalat; DINP: Diizononil ftalat; MEHP: Mono(2-etilhekzil)ftalat; ROS: Reaktif oksijen türleri.

zom proliferasyonuna neden olduğu ve bu olayın epigenetik değişikliklerle sonuçlandığı bilinmektedir. Diğer taraftan, apoptozun süpresyonu, ROS oluşumunun tetiklenmesi, hücreler arası haberleşmenin bozulması ve DNA metilasyonunun değişmesi de ftalatların neden olduğu ve epigenetik sonuçları olan olaylardır. Tüm bu olayların ftalat toksisitesindeki rolü ancak son yıllarda anlaşılmaya başlanmıştır ve bu konuda daha ileri çalışmalara gereksinim vardır. Özellikle DNA, gen ve protein metilasyon kalıplarındaki değişimlerin incelenmesi ftalatların neden olduğu başta üreme sistemi toksisitesi olmak üzere, sistemik toksisitenin değerlendirilmesinde büyük bir aşama olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Jiang Y, Bressler J, Beaudet AL. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004;5:479-510.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429(6990):457-63.
- Dzhekova-Stojkova S, Bogdanska J, Stojkova Z. Peroxisome proliferators: their biological and toxicological effects. *Clin Chem Lab Med* 2001;39(6):468-74.
- van den Bosch H, Schutgens RB, Wanders RJ, Tager JM. Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem* 1992;61:157-97.
- Lazarow PB, De Duve C. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73(6):2043-6.
- Schepers L, Van Veldhoven PP, Casteels M, Eysen HJ, Mannaerts GP. Presence of three acyl-CoA oxidases in rat liver peroxisomes. An inducible fatty acyl-CoA oxidase, a noninducible fatty acyl-CoA oxidase, and a noninducible trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 1990;265(9):5242-6.
- Tanyalçın T, Kutay ZF. [The biogenesis and biochemistry of peroxisome]. *Biyokimya Dergisi* 1994;19(2):45-62.
- Steinberg S, Chen L, Wei L, Moser A, Moser H, Cutting G, et al. The PEX Gene Screen: molecular diagnosis of peroxisome biogenesis disorders in the Zellweger syndrome spectrum. *Mol Genet Metab* 2004;83(3):252-63.
- Steinberg SJ, Dodt G, Raymond GV, Braverman NE, Moser AB, Moser HW. Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763(12):1733-48.
- Giometti CS, Taylor J, Gemmel MA, Tollaksen SL, Lalwani ND, Reddy JK. A comparative study of the effects of clofibrate, ciprofibrate, WY-14,643, and di-(2-ethylhexyl)-phthalate on liver protein expression in mice. *Appl Theor Electrophor* 1991;2(4-5):101-7.
- Misra P, Viswakarma N, Reddy JK. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  signaling in hepatocarcinogenesis. *Subcell Biochem* 2013;69:77-99.
- Houseknecht KL, Cole BM, Steele PJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and its ligands: a review. *Domest Anim Endocrinol* 2002;22(1):1-23.
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58(4):726-41.



14. Brown JD, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation* 2007;115(4):518-33.
15. Corton JC, Lapinskas PJ, Gonzalez FJ. Central role of PPARalpha in the mechanism of action of hepatocarcinogenic peroxisome proliferators. *Mutat Res* 2000;448(2):139-51.
16. Benjamin S, Pradeep S, Josh MS, Kumar S, Masai E. A monograph on the remediation of hazardous phthalates. *J Hazard Mater* 2015;298:58-72.
17. Erkekoglu P, Kocer-Gumusel B. Genotoxicity of phthalates. *Toxicol Mech Methods* 2014;24(9):616-26.
18. Bajkin I, Bjelica A, Icin T, Dobrić V, Zavisic BK, Stojanoska MM. Effects of phthalic acid esters on fetal health. *Med Pregl* 2014;67(5-6):172-5.
19. Bergé A, Cladière M, Gasperi J, Coursimault A, Tassin B, Moilleron R. Meta-analysis of environmental contamination by phthalates. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013;20(11):8057-76.
20. Melnick RL, Brody C, DiGangi J, Huff J. The IARC evaluation of DEHP excludes key papers demonstrating carcinogenic effects. *Int J Occup Environ Health* 2003;9(4):400-2.
21. Kluwe WM, Hasemann JK, Huff JE. The carcinogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in perspective. *J Toxicol Environ Health* 1983;12(1):159-69.
22. Rusyn I, Peters JM, Cunningham ML. Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver. *Crit Rev Toxicol* 2006;36(5):459-79.
23. Rusyn I, Corton JC. Mechanistic considerations for human relevance of cancer hazard of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Mutat Res* 2012;750(2):141-58.
24. Mitchell FE, Price SC, Hinton RH, Grasso P, Bridges JW. Time and dose-response study of the effects on rats of the plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;81(3 Pt 1):371-92.
25. Ward JM, Peters JM, Perella CM, Gonzalez FJ. Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice. *Toxicol Pathol* 1998;26(2):240-6.
26. Smith-Oliver T, Butterworth BE. Correlation of the carcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) with induced hyperplasia rather than with genotoxic activity. *Mutat Res* 1987;188(1):21-8.
27. Marsman DS, Cattley RC, Conway JG, Popp JA. Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643) in rats. *Cancer Res* 1988;48(23):6739-44.
28. Ward JM, Hagiwara A, Anderson LM, Lindsey K, Diwan BA. The chronic hepatic or renal toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate, acetaminophen, sodium barbital, and phenobarbital in male B6C3F1 mice: autoradiographic, immunohistochemical, and biochemical evidence for levels of DNA synthesis not associated with carcinogenesis or tumor promotion. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988;96(3):494-506.
29. National Toxicology Program. Carcinogenesis Bioassay of Di(2-ethylhexyl)phthalate (CAS No. 117-81-7) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 1982;217:1-127.
30. David RM, Moore MR, Cifone MA, Finney DC, Guest D. Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di(2-ethylhexyl)phthalate and the effects of recovery. *Toxicol Sci* 1999;50(2):195-205.
31. Ward JM, Rice JM, Creasia D, Lynch P, Riggs C. Dissimilar patterns of promotion by di(2-ethylhexyl)phthalate and phenobarbital of hepatocellular neoplasia initiated by diethylnitrosamine in B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* 1983;4(8):1021-9.
32. Oesterle D, Deml E. Promoting activity of di(2-ethylhexyl)phthalate in rat liver foci bioassay. *J Cancer Res Clin Oncol* 1988;114(2):133-6.
33. Klaunig JE, Babich MA, Baetcke KP, Cook JC, Corton JC, David RM, et al. PPARalpha agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance. *Crit Rev Toxicol* 2003;33(6):655-780.
34. Hasmail SC, James NH, Macdonald N, Soames AR, Roberts RA. Species differences in response to diethylhexylphthalate: suppression of apoptosis, induction of DNA synthesis and peroxisome proliferator activated receptor alpha-mediated gene expression. *Arch Toxicol* 2000;74(2):85-91.
35. Bursch W, Lauer B, Timmermann-Trosiener I, Barthel G, Schuppler J, Schulte-Hermann R. Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis* 1984;5(4):453-8.
36. Gerbracht U, Bursch W, Kraus P, Putz B, Reinacher M, Timmermann-Trosiener I, et al. Effects of hypolipidemic drugs nafenopin and clofibrate on phenotypic expression and cell death (apoptosis) in altered foci of rat liver. *Carcinogenesis* 1990;11(4):617-24.
37. Youssef JA, Bouziane M, Badr MZ. Age-dependent effects of nongenotoxic hepatocarcinogens on liver apoptosis in vivo. *Mech Ageing Dev* 2003;124(3):333-40.
38. Bhattacharya N, Dufour JM, Vo MN, Okita J, Okita R, Kim KH. Differential effects of phthalates on the testis and the liver. *Biol Reprod* 2005;72(3):745-54.
39. Goll V, Alexandre E, Viollon-Abadie C, Nicod L, Jaeck D, Richert L. Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis, and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;160(1):21-32.
40. Hasmail SC, James NH, Macdonald N, West D, Chevalier S, Cosulich SC, et al. Suppression of apoptosis and induction of DNA synthesis in vitro by the phthalate plasticizers monoethylhexylphthalate (MEHP) and diisononylphthalate (DINP): a comparison of rat and human hepatocytes in vitro. *Arch Toxicol* 1999;73(8-9):451-6.
41. Gill JH, James NH, Roberts RA, Dive C. The non-genotoxic hepatocarcinogen nafenopin suppresses rodent hepatocyte apoptosis induced by TGFbeta1, DNA damage and Fas. *Carcinogenesis* 1998;19(2):299-304.
42. Roberts RA, Soames AR, Gill JH, James NH, Wheeldon EB. Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations. *Carcinogenesis* 1995;16(8):1693-8.
43. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985;311(1152):617-31.
44. Buettner GR, Schafer FQ. Free radicals, oxidants, and antioxidants. *Teratology* 2000;62(4):234.
45. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 1991;24(2):203-14.
46. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000;153(1-3):83-104.
47. Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32(2):157-70.
48. Bjelakovic G, Gluud C. Surviving antioxidant supplements. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(10):742-3.
49. D'Autrèaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(10):813-24.
50. Scott TL, Rangaswamy S, Wicker CA, Izumi T. Repair of oxidative DNA damage and cancer: recent progress in DNA base excision repair. *Antioxid Redox Signal* 2014;20(4):708-26.

51. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 2007;26(1):1-14.
52. Reddy JK, Rao MS. Oxidative DNA damage caused by persistent peroxisome proliferation: its role in hepatocarcinogenesis. *Mutat Res* 1989;214(1):63-8.
53. Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat Res* 2000;448(2):159-77.
54. Rusyn I, Rose ML, Bojes HK, Thurman RG. Novel role of oxidants in the molecular mechanism of action of peroxisome proliferators. *Antiox Redox Signal* 2000;2(3):607-21.
55. Nemali MR, Usuda N, Reddy MK, Oyasu K, Hashimoto T, Osumi T, et al. Comparison of constitutive and inducible levels of expression of peroxisomal beta-oxidation and catalase genes in liver and extrahepatic tissues of rat. *Cancer Res* 1988;48(18):5316-24.
56. Reddy JK, Goel SK, Nemali MR, Carrino JJ, Laffler TG, Reddy MK, et al. Transcription regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(6):1747-51.
57. Fan CY, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem* 1998;273(25):15639-45.
58. Erkekoğlu P, Rachidi W, De Rosa V, Giray B, Favier A, Hincal F. Protective effect of selenium supplementation on the genotoxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate treatment in LNCaP cells. *Free Radic Biol Med* 2010;49(4):559-66.
59. Erkekoğlu P, Rachidi W, Yüzügüllü OG, Giray B, Favier A, Öztürk M, et al. Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;248(1):52-62.
60. Erkekoğlu P, Rachidi W, Yüzügüllü OG, Giray B, Öztürk M, Favier A, et al. Induction of ROS, p53, p21 in DEHP- and MEHP-exposed LNCaP cells-protection by selenium compounds. *Food Chem Toxicol* 2011;49(7):1565-71.
61. Conway JG, Tomaszewski KE, Olson MJ, Cattley RC, Marsman DS, Popp JA. Relationship of oxidative damage to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and Wy-14,643. *Carcinogenesis* 1989;10(3):513-9.
62. Takagi A, Sai K, Umemura T, Hasegawa R, Kurokawa Y. Significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following short-term exposure to the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and di(2-ethylhexyl)adipate. *Jpn J Cancer Res* 1990;81(3):213-5.
63. Eagon PK, Teepe AG, Elm MS, Tadic SD, Epley MJ, Beiler BE, et al. Hepatic hyperplasia and cancer in rats: alterations in copper metabolism. *Carcinogenesis* 1999;20(6):1091-6.
64. Erkekoğlu P, Giray B, Rachidi W, Hinger-Favier I, Roussel AM, Favier A, et al. Effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on testicular oxidant/antioxidant status in selenium-deficient and selenium-supplemented rats. *Environ Toxicol* 2014;29(1):98-107.
65. Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian J Physiol Pharmacol* 2006;50(3):291-6.
66. Sohlenius AK, Lundgren B, DePierre JW. Perfluorooctanoic acid has persistent effects on peroxisome proliferation and related parameters in mouse liver. *J Biochem Toxicol* 1992;7(4):205-12.
67. Handler JA, Seed CB, Bradford BU, Thurman RG. Induction of peroxisomes by treatment with perfluorooctanoate does not increase rates of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in intact liver. *Toxicol Lett* 1992;60(1):61-8.
68. Rusyn I, Asakura S, Pachkowski B, Bradford BU, Denissenko MF, Peters JM, et al. Expression of base excision DNA repair genes is a sensitive biomarker for in vivo detection of chemical-induced chronic oxidative stress: identification of the molecular source of radicals responsible for DNA damage by peroxisome proliferators. *Cancer Res* 2004;64(3):1050-7.
69. Rusyn I, Kadiiska MB, Dikalova A, Kono H, Yin M, Tsuchiya K, et al. Phthalates rapidly increase production of reactive oxygen species in vivo: role of Kupffer cells. *Mol Pharmacol* 2001;59(4):744-50.
70. Rose ML, Rusyn I, Bojes HK, Belyea J, Cattley RC, Thurman RG. Role of Kupffer cells and oxidants in signaling peroxisome proliferator-induced hepatocyte proliferation. *Mutat Res* 2000;448(2):179-92.
71. Klaunig JE, Ruch RJ. Role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. *Lab Invest* 1990;62(2):135-46.
72. Smith JH, Isenberg JS, Pugh G Jr, Kamendulis LM, Ackley D, Lington AW, et al. Comparative in vivo hepatic effects of Di-isononyl phthalate (DINP) and related C7-C11 dialkyl phthalates on gap junctional intercellular communication (GJIC), peroxisomal beta-oxidation (PBOX), and DNA synthesis in rat and mouse liver. *Toxicol Sci* 2000;54(2):312-21.
73. Isenberg JS, Kamendulis LM, Ackley DC, Smith JH, Pugh G Jr, Lington AW, et al. Reversibility and persistence of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)- and phenobarbital-induced hepatocellular changes in rodents. *Toxicol Sci* 2001;64(2):192-9.
74. Isenberg JS, Kamendulis LM, Smith JH, Ackley DC, Pugh G Jr, Lington AW, et al. Effects of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on gap junctional intercellular communication (GJIC), DNA synthesis, and peroxisomal beta oxidation (PBOX) in rat, mouse, and hamster liver. *Toxicol Sci* 2000;56(1):73-85.
75. Klaunig JE, Ruch RJ, DeAngelo AB, Kaylor WH. Inhibition of mouse hepatocyte intercellular communication by phthalate monoesters. *Cancer Lett* 1988;43(1-2):65-71.
76. Kamendulis LM, Isenberg JS, Smith JH, Pugh G Jr, Lington AW, Klaunig JE. Comparative effects of phthalate monoesters on gap junctional intercellular communication and peroxisome proliferation in rodent and primate hepatocytes. *J Toxicol Environ Health A* 2002;65(8):569-88.
77. Pugh G Jr, Isenberg JS, Kamendulis LM, Ackley DC, Clare LJ, Brown R, et al. Effects of di-isononyl phthalate, di-2-ethylhexyl phthalate, and clofibrate in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 2000;56(1):181-8.
78. Oesterle D, Deml E. Promoting activity of di(2-ethylhexyl)phthalate in rat liver foci bioassay. *J Cancer Res Clin Oncol* 1988;114(2):133-6.
79. Grasl-Kraupp B, Huber W, Just W, Gibson G, Schulte-Hermann R. Enhancement of peroxisomal enzymes, cytochrome P-452 and DNA synthesis in putative preneoplastic foci of rat liver treated with the peroxisome proliferator nafenopin. *Carcinogenesis* 1993;14(5):1007-12.
80. James NH, Roberts RA. The peroxisome proliferator class of non-genotoxic hepatocarcinogens synergize with epidermal growth factor to promote clonal expansion of initiated rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 1994;15(12):2687-94.
81. James NH, Roberts RA. Species differences in the clonal expansion of hepatocytes in response to the coaction of epidermal growth factor and nafenopin, a rodent hepatocarcinogenic peroxisome proliferator. *Fundam Appl Toxicol* 1995;26(1):143-9.
82. Cattley RC, Marsman DS, Popp JA. Age-related susceptibility to the carcinogenic effect of the peroxisome proliferator Wy-14,643 in rat liver. *Carcinogenesis* 1991;12(3):469-73.
83. Ward JM, Diwan BA, Ohshima M, Hu H, Schuller HM, Rice JM. Tumor-initiating and promoting activities of di(2-ethylhexyl) phthalate in vivo and in vitro. *Environ Health Perspect* 1986;65:279-91.

84. Mann MRW, Bartolomei MS. Epigenetic reprogramming by maternal behaviour and pharmacological intervention nature versus nurture; let's the whole thing off. *Epigenetics* 2007;2(1):22-8.
85. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature* 2015;517(7534):321-6.
86. Li E, Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6(5):a019133.
87. Head JA. Patterns of DNA methylation in animals: an ecotoxicological perspective. *Integr Comp Biol* 2014;54(1):77-86.
88. Kostka G, Urbanek-Olejnik K, Wiadrowska B. Di-butyl phthalate-induced hypomethylation of the c-myc gene in rat liver. *Toxicol Ind Health* 2010;26(7):407-16.
89. Kang SC, Lee BM. DNA methylation of estrogen receptor alpha gene by phthalates. *J Toxicol Environ Health A* 2005;68(23-24):1995-2003.
90. Li L, Zhang T, Qin XS, Ge W, Ma HG, Sun LL, et al. Exposure to diethylhexyl phthalate (DEHP) results in a heritable modification of imprint genes DNA methylation in mouse oocytes. *Mol Biol Rep* 2014;41(3):1227-35.
91. Wu S, Zhu J, Li Y, Lin T, Gan L, Yuan X, et al. Dynamic effect of di-2-(ethylhexyl) phthalate on testicular toxicity: epigenetic changes and their impact on gene expression. *Int J Toxicol* 2010;29(2):193-200.