

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BİSFENOL S'NİN ERKEK RATLARDA TİROİD BEZİ ÜZERİNDEKİ
TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN : Müşerref BOSTANCI
DANIŞMAN : Doç. Dr. Burak KAPTANER
II. DANIŞMAN : Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN

VAN-2022

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BİSFENOL S'NİN ERKEK RATLARDA TİROİD BEZİ ÜZERİNDEKİ
TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Müşerref BOSTANCI

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2021-9359 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2022

KABUL VE ONAY SAYFASI

Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Burak KAPTANER danışmanlığında, Müşerref BOSTANCI tarafından sunulan “**Bisfenol S’nin Erkek Ratlarda Tiroid Bezi Üzerindeki Toksik Etkilerinin Araştırılması**” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili hükümleri gereğince 14/09/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mucip GENİŞEL

İmza:

Üye: Doç. Dr. İsmail YILDIZ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Burak KAPTANER

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Müşerref BOSTANCI



ÖZET

BİSFENOL S'NİN ERKEK RATLARDA TİROİD BEZİ ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

BOSTANCI, Müşerref
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Burak KAPTANER
II. Danışman: Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN
Eylül 2022, 67 sayfa

Bu çalışmada bir bisfenol analogu olan bisfenol S (BPS)'nin *Wistar albino* erkek ratların tiroid bezi üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda 28 adet rat, BPS'nin 0, 20, 100 ve 500 mg/kg vücut ağırlığı (v.a.) dozlarına 28 gün boyunca oral gavaj ile maruz bırakıldı. Yapılan histolojik incelemelere göre, BPS maruziyetinin tiroid dokusunda farklı histopatolojik değişimlere yol açtığı, gözlemlendi. Tiroid folikül hücrelerinde proliferasyon indeks ortalamasının, BPS'nin bütün dozlarında, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı artışlar gösterdiği belirlendi ($P < 0.05$). Tiroid folikül hücrelerinde apoptotik indeks ortalamasının ise, BPS'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı, tespit edildi ($P < 0.05$). Serum tiroid uyarıcı hormon ile serbest tiroksin düzeylerinin, BPS maruziyeti sonrasında anlamlı değişimler göstermediği ancak serum serbest triiyodotirozin seviyesinin bütün gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı düşüşler gösterdiği gözlemlendi ($P < 0.05$). BPS'nin tiroid dokusunda antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz) aktivitelerinde anlamlı artışlara ve redükte glutatyon düzeyinde ise anlamlı azalışlara neden olduğu belirlendi. Tiroid dokusunda malondialdehit düzeyinin ise BPS'nin 500 mg/kg ve konsantrasyonunda, kontrol grubuna kıyasla, anlamlı bir şekilde yükseldiği gözlemlendi. Elde edilen veriler, BPS'nin tiroid bezi üzerinde yapısal ve oksidatif hasarlar oluşturarak, toksik etkiler meydana getirdiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, Antioksidan göstergeler, Bisfenol S, Histopatoloji, Oksidatif stres, PCNA, Tiroid, Tiroid hormonları, TSH.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE TOXIC EFFECTS OF BISPHENOL S ON THE THYROID GLAND IN MALE RATS

BOSTANCI, Müşerref

M. Sc Thesis, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Burak KAPTANER

II. Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Abdulahad DOĞAN

September 2022, 67 pages

In the present study, it was aimed to investigate the toxic effects of bisphenol S (BPS), which is a bisphenol analogue, on the thyroid glands of male *Wistar albino* rats. Toward this aim, 28 rats were exposed to BPS at doses of 0, 20, 100, and 500 mg/kg of body weight (b.w.) via oral gavage for 28 days. According to the histological examinations, BPS led to several histopathological changes in the thyroid tissue. The average proliferation index among the thyroid follicular cells displayed statistically significant increases in all of the groups exposed to BPS when compared to the control group ($P < 0.05$). The average apoptotic index in the thyroid follicular cells was increased significantly in the groups exposed to BPS at concentrations of 100 and 500 mg/kg of b.w. ($P < 0.05$). The serum thyroid stimulating hormone and serum free thyroxine levels did not show significant changes after exposure to BPS; however, the serum free triiodothyronine levels displayed significant decreases in all of the groups treated with BPS when compared to the control group ($P < 0.05$). BPS was observed to cause significant increases in the antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase) and significant decreases in the reduced glutathione content. The malondialdehyde level in the thyroid tissue was elevated significantly with BPS at a dose of 500 mg/kg of b.w. when compared to the control group. The data obtained herein revealed that BPS creates toxic effects on the thyroid gland by causing structural and oxidative damages.

Keywords: Apoptosis, Antioxidant indicators, Bisphenol S, Histopathology, Oxidative stress, PCNA, Thyroid, Thyroid hormones, TSH.



ÖN SÖZ

Antropojenik aktiviteler sonucunda çevreye yayılan kirleticiler canlılar üzerinde geriye dönüşümsüz etkilere yol açabilmekle birlikte, canlı yaşamını, populasyonlarını ve neslini tehlike altına sokabilmektedirler. Sucul ve karasal organizmalar gibi insanlar da bu kimyasallara, atmosferdeki zararlı gazları soluyarak, kontamine içme sularını ve gıdaları tüketerek maruz kalabilmektedirler. Çevresel kirleticilere örnek olarak, tarımsal ve endüstriyel faaliyetlerden kaynaklanan pestisitler, herbisitler, poliaromatik hidrokarbonlar, poliklorlu bifeniller, ağır metaller, bisfenoller, fitalatlar ve mikroplastikler gibi farklı gruptaki kimyasallar verilebilir. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarda insanlarda belirlenen kanser, diyabet, kalp-damar hastalıkları gibi ciddi sağlık sorunları ile çevresel kirleticilere maruz kalma arasında ilişki olduğu belirlenmiştir.

Günlük hayatta kullanılan, oyuncaklar, biberon, plastik mutfak gereçleri, diş dolgu malzemeleri, inşaat malzemeleri, termal kâğıtlar ve yapıştırıcılar gibi birçok ürünün yapımında kullanılan bisfenol A (BPA), farklı çevresel kompartmanlarda varlığı tespit edilmiş olan ve canlılarda endokrin bozucu etkisi iyi bilinen bir kirleticidir. Bu nedenle bazı ülkeler, tüketici ürünlerinin üretiminde BPA'nın kullanımına yönelik sınırlamalar getirmişlerdir. Üreticiler ise yavaş yavaş, ürettikleri ürünlerden BPA'yı çıkartmaya başlamışlar ve BPA'ya göre çevre ve insan sağlığı açısından daha az zararlı olduklarını düşündükleri, BPA analoglarının kullanımını tercih etmeye başlamışlardır. Bununla birlikte, bisfenol AF (BPAF), bisfenol F (BPF), bisfenol S (BPS), bisfenol C (BPC) ve bisfenol B (BPB) gibi BPA analoglarının, BPA'ya benzer hatta ondan daha fazla toksik ve endokrin bozucu etkiler gösterebildikleri, son yıllarda yapılmaya başlanan deneysel çalışmalar ile ortaya çıkartılmıştır.

Canlıların erken gelişim evrelerinde büyümeyi ve gelişimi düzenleyen tiroid hormonları, ergin bireylerde enerji metabolizması, termoregülasyon ve kış uykusu gibi önemli fizyolojik olaylarda rol oynarlar. Canlı için oldukça önemli rolü olan tiroid hormonlarının sentezi ve salınımı, çevredeki kirleticilerden etkilenebilmektedir. Zararlı kimyasal bileşiklerin tiroid hormonları üzerindeki olumsuz etkisi, ya direkt olarak tiroid bezini etkilemeleri neticesinde ya da tiroid hormonlarının hipotalamus ve hipofiz ile gerçekleştirilen kontrol mekanizmalarını bozmaları sonucunda, ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda BPA'nın da tiroid bezi üzerinde toksik etkiler gösterdiği ve

bu bezin fonksiyonunu etkilediği, belirlenmiştir ancak BPA'nın yapısal analoglarının tiroid üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkilere ilişkin bilgi sınırlıdır. Bu çalışmada, bir BPA analogu olan BPS'nin *Wistar albino* ratların tiroid bezi üzerindeki olumsuz etkilerinin aydınlatılması ve literatüre katkı sunulması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması yapılırken, gösterdiği üstün sabırla her türlü destek ve yardımını benden esirgemeyen çok kıymetli tez Danışmanım Doç. Dr. Burak KAPTANER ve ikinci danışmanım olan Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN'a, laboratuvar çalışmalarım boyunca yanımda olan arkadaşlarım Emine DOĞAN, Fatoş YILDIZ, Handan AYKUT'a ve Arş. Gör. Fatih DÖNMEZ'e teşekkür ederim. Benden maddi ve manevi desteklerini eksiltmeksizin yanımda olan aileme de teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi için verdiği maddi destekten dolayı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje kodu: FYL-2021-9359) ayrıca teşekkür ederim. Bu alışma sırasında gösterdikleri yardımlardan dolayı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün akademik ve idari personeline ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu çalışanlarına da teşekkür ederim.

2022

Müşerref BOSTANCI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	5
2.1. Bisfenol A	5
2.2. BPA'nın Metabolizması	5
2.3. BPA'nın Analogları	6
2.4. Bir BPA Analogu Olarak BPS.....	7
2.5. Bisfenoller ve Tiroid Üzerindeki Etkileri	9
2.6. Apoptoz.....	19
2.7. Prolifere Olan Hücre Çekirdek Antijeni	20
2.8. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	20
2.9. Çalışmanın Amacı.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Deney Hayvanı	23
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	23
3.3. Deneysel Dizayn	24
3.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması	25
3.5. Histolojik Prosedürler	26
3.6. PCNA İmmun Boyaması	26
3.7. TUNEL Boyama	27
3.8. Apoptotik ve Prolifere Olan Hücrelerin Sayımı	28
3.9. Serum Hormon Seviyeleri	29
3.10. Antioksidan Savunma Sistemi Belirteçlerinin Tayini	29

	Sayfa
3.10.1. Doku homojenizasyonu.....	29
3.10.2. Total protein tayini	29
3.10.3. Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini.....	30
3.10.4. Katalaz aktivitesi tayini.....	32
3.10.5. Redükte glutatyon tayini	34
3.10.6. Glutatyon peroksidaz aktivitesi tayini.....	35
3.10.7. Glutatyon-S-transferaz aktivitesi tayini	36
3.10.8. Malondialdehit içeriği tayini	37
3.11. İstatistiksel Analizler	39
4. BULGULAR	41
4.1. Histopatolojik Değişimler.....	41
4.2. BPS'nin Hormon Seviyeleri Üzerindeki Etkisi	43
4.3. BPS'nin Tiroid Folikül Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi.....	43
4.4. BPS'nin Tiroid Folikül Hücre Apoptozu Üzerindeki Etkisi.....	44
4.5. BPS'nin Tiroid Bezinde Antioksidan Savunma Sistem Belirteçleri Üzerindeki Etkisi	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR.....	57
ÖZ GEÇMİŞ.....	68

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi	23
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kit ve kimyasalların listesi	24
Çizelge 3.3. SOD kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları.....	31
Çizelge 3.4. SOD aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları ..	32
Çizelge 3.5. CAT fosfat tamponu (pH:7.5)'nun hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar	33
Çizelge 3.6. CAT fosfat tamponunun hazırlanması için gerekli olan A ve B solüsyonlarının karıştırılma miktarları	33
Çizelge 3.7. CAT aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları...	33
Çizelge 3. 8. GPx kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları.....	36
Çizelge 3. 9. GPx aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları ..	36
Çizelge 3.10. GST aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenlerin miktar ve konsantrasyonları	37
Çizelge 3.11. MDA ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler, miktarları ve ölçüm prosedürü.....	38
Çizelge 4.1. Histopatolojik değişimler ve bunların gözlemlendiği birey sayıları	41
Çizelge 4.2. BPS'nin serum TSH, serum serbest T4 ve serum serbest T3 seviyeleri üzerindeki etkisi	43
Çizelge 4.3. BPS'nin tiroid folikül hücrelerinde proliferasyon indeks değerleri üzerindeki etkisi	44
Çizelge 4.4. BPS'nin tiroid folikül hücrelerinde apoptotik indeks değerleri üzerindeki etkisi	45
Çizelge 4.5. BPS'nin tiroid bezinde antioksidan savunma sistem belirteçleri üzerindeki etkisi	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tiroid hormonları (T3 ve T4)'na kimyasal yapı bakımından benzerlik gösteren BPA ve analogları.....	7
Şekil 2.2. Hipotalamus-hipofiz-tiroid aksının şeması	10
Şekil 3.1. Protein standart eğrisi	30
Şekil 3.2. GSH standart eğrisi	35
Şekil 3.3. 1,1,3,3-tetraetoksipropan standartlarından türetilen standart eğri.....	38
Şekil 4.1. BPS'ye maruz bırakılan ratların tiroid bezinde belirlenen histopatolojik değişimler (H&E).....	42
Şekil 4.2. İmmunohistokimya yöntemi ile işaretlenen PCNA pozitif tiroid folikül hücreleri	44
Şekil 4.3. TUNEL yöntemi ile işaretlenen apoptotik (TUNEL pozitif) tiroid folikül hücreleri	45



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
ΔA	Absorbans Değişimi
>	Büyüktür
<	Küçüktür
A	Absorbans
α	Alfa
β	Beta
Ca	Kalsiyum
cm	Santimetre
dk	Dakika
FeSO ₄	Demir Sülfat
g	Gram
g	Santrifüj Kuvveti
H ₂ O	Su
kg	Kilogram
KH ₂ PO ₄	Mono Potasyum Fosfat
L	Litre
M	Molar
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
mL	Mililitre
mmol	Milimol
mM	Milimolar
n	Deney Hayvan Sayısı

Simgeler	Açıklama
Na₂HPO₄	Sodyum Fosfat Dibazik
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
O₂	Oksijen
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
P	İstatistiksel Önem Derecesi
pH	Bir Çözeltinin Asitlik-Bazlık Derecesini Gösteren Ölçü
	Birim
pg	Pikogram
sn	Saniye
λ	Dalga Boyu
U	Ünite
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
v	Hacim

Kısaltmalar	Açıklama
AI	Apoptotik İndeks
ANOVA	Varyans Analizi
BPA	Bisfenol A
BPAF	Bisfenol AF
BPB	Bisfenol B
BPC	Bisfenol C
BPF	Bisfenol F

Kısaltmalar	Açıklama
BPM	Bisfenol M
BPS	Bisfenol S
BPZ	Bisfenol Z
BSA	Sığır Serum Albümin
CAT	Katalaz
CDNB	1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DDT	Dikloro Difenil Trikloroetan
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTNB	5,5'-Ditiyobis-2-Nitrobenzoik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Redükte Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
GST	Glutasyon-S-Transferaz
H&E	Hematoksilen Ve Eozin
HCl	Hidroklorik Asit
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HRP	Horse Radish Peroksidaz
INT	2-(-İyodofenil)-3-(4-Nitrofenol)-5-Feniltetrazolyum Klorür
MDA	Malondialdehit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
NADP⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Okside)
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Redükte)
NIS	Sodyum İyodür Taşıyıcı
PCNA	Prolifere Olan Hücre Çekirdek Antijeni
PBS	Fosfat Tuz Tamponu

Kısaltmalar	Açıklama
PI	Proliferasyon İndeks
ROS	Reaktif Oksijen Türü
SOD	Süperoksit Dizmutaz
T3	Triiyodotirozin
T4	Tiroksin
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBBPA	Tetrabromobisfenol A
TBG	Tiroksin Bağlayıcı Globülin
TBS	Tris Tuz Tamponu
TCBPA	Tetraklorobisfenol A
TdT	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
Tg	Tiroglobulin
TPO	İyodun Tiroid Peroksidaz
TR	Tiroid Hormon Reseptörü
TRα	Tiroid Hormon Reseptörü A
TRβ	Tiroid Hormon Reseptörü β
TRH	Tirotropin Salıverici Hormon
TSH	Tiroid Stimüle Edici Hormon
TTR	Transtiretin
Tris	Hidroksimetil Amino Metan
TUNEL	Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesinde Kullanılan Biyotin-Avidin-Peroksidaz Tekniği Boyaması
UGT	UDP-Glukuronosil-Transferaz
V.A.	Vücut Ağırlığı

1. GİRİŞ

Tiroid hormonları (tiroksin (T4) ve triiyodotirozin (T3)) bütün omurgalılarda büyüme, gelişme ve metabolizmanın önemli düzenleyicileridirler. Bu hormonlar, omurgalılardaki birçok anahtar gelişim süreci için gereklidirler. Tiroid hormonlarının fonksiyonel olarak yer aldığı gelişimsel süreçlere örnek olarak, lamprey, dip balıkları ve amfibilerdeki postembriyonik metamorfoz, salmonlarda smoltifikasyon, kuşlarda tüy dökme, yılanlarda gömlek değiştirme ve insanlar da dahil olmak üzere memelilerde perinatal gelişim boyunca nörolojik gelişim, verilebilir. Tiroid hormonları insanlarda, beyin, iç kulak, göz, böbrek, kemik, iskelet kası gibi farklı dokuların gelişimi, aynı zamanda enerji metabolizmasının düzgün bir şekilde düzenlenmesi için esansiyeldir. Sıcakkanlı canlılarda termoregülasyon, zebra balığında termal aklimasyon, insanlarda ruh hali, kuş ve sürüngenlerde çiftleşme ve besin arama davranışı, ayılarda kış uykusu, kardiyovasküler fonksiyon ve enerji tüketimi, tiroid hormonlarının canlının yaşamı boyunca kontrol ettiği temel fizyolojik olaylar arasında yer alır (Leemans ve ark., 2019; Thambirajah ve ark., 2022).

Tiroid hormonlarının sentezi hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı tarafından kontrol edilir. Hipotalamus, tirotropin salıverici hormon (TRH) üretir, bu da anteriör hipofizden tiroid stimüle edici hormon (TSH) üretimini uyarır. TSH kan dolaşımına salınır ve tiroid bezinde tiroid folikül hücrelerindeki reseptörlerine bağlanır. Tiroid hormonlarının sentezi için tiroid folikülü kolloidinde iyodun (dolaşımda iyodür iyonu formundadır) mevcudiyetine gereksinim duyulur. TSH, sodyum iyot taşıyıcısı aracılığı ile tiroid folikül hücrelerine iyot alınımını uyarır. İyot, tiroid bezinde T3 ve T4 üretimi için tirozin aminoasitine bağlanır. İyodun tiroid peroksidaz (TPO) tarafından oksidasyonu sonrasında, kolloiddeki tiroglobuline iyodun birleştirilmesini içeren ve T3 ile T4 öncülerinin üretimi için gerekli olan “iyodun organikleştirilmesi” meydana getirilir. Tiroid hormonlarının kandaki seviyelerinin düzenlenmesi, bu hormonların hipotalamus ve hipofiz üzerine yaptıkları negatif geri bildirim mekanizması ile gerçekleştirilir. Tiroid hormonları kanda, albumin, transtiretin (TTR) ve tiroksin bağlayıcı globülin (TBG) gibi serum taşıyıcı proteinler ile taşınır. Dolaşımda, total T4 ve T3'ün %0.001'inden daha azı serbest T4 ve T3 olarak bulunur ve bunlar hücrelere transmembran transport taşıyıcıları

vasıtasıyla giriş yaparlar. Monokarboksilat taşıyıcıları, bazı organik anyon taşıyıcı polipeptid ailesi üyeleri ve heterodimerik L-tip aminoasit taşıyıcılar gibi farklı taşıyıcılar, tiroid hormonlarını taşıyabilirler. Tiroid hormonlarının hücre içerisindeki elde edilebilirliği, spesifik deiyodinasyon süreçleri tarafından, dinamik olarak ve sıkı bir şekilde koordine edilerek, düzenlenir. Tip 1 ve tip 2 deiyodinazlar tiroid hormonlarını aktive ederlerken, tip 3 deiyodinaz T4 ve T3'ün inaktivasyonunu gerçekleştirir. Tiroid hormonları, hedef genlerin promotor bölgeleri üzerinde yer alan tiroid hormon yanıt elementleri aracılığıyla ya da gen ekspresyonunu direkt olarak module ederek, gen transkripsiyonunu negatif ve pozitif olarak düzenlerler. Tiroid hormon reseptörleri, tiroid hormon reseptörü α ve β genleri tarafından kodlanır ve her biri spesifik transkripsiyonel yanıtlar oluşturur. Tiroid fonksiyonunun klinik açıdan değerlendirilmesi için, TSH ölçümüne gereksinim duyulur. Yüksek TSH düzeyleri ile eşlik eden düşük tiroid hormon düzeyleri, hipotiroidiye işaret eder. Öte yandan, baskılanmış TSH seviyesi ile eşlik eden yüksek tiroid hormon düzeyleri, hipertiroidi durumunu gösterir. Klinik olarak belirti vermeyen ve tiroid hormonlarının referans aralığındaki değerler ile karakterize edilen hipotiroidizm ve hipertiroidizm ise, sırasıyla yüksek ve düşük TSH düzeyleri ile tanımlanır. TSH, tiroid fonksiyon testlerine ait ölçümlerin ve yorumlamaların her zaman anlaşılır olmadığı zamanlarda bile (özellikle de total T4 ve serbest T4 ile ilgili tutarsız sonuçlar söz konusu olduğunda), tiroidin durumu ile ilgili en hassas indikatör olarak düşünülür (Leemans ve ark., 2019). Farklı tipteki çevresel kimyasalların, hipotalamus-hipofiz-tiroid aksını etkileyerek tiroid bezi üzerinde toksik etki gösterdiği ve tiroid hormon seviyelerinde değişimlere yol açtıkları bildirilmiştir. Bu kimyasalların, tiroid hormonlarının etkisinde önemli rolleri olan reseptörler, enzimler ve taşıyıcılar ile etkileştikleri de rapor edilmiştir (Zoeller, 2010).

Birleşik Devletler Çevre Koruma Kurumu endokrin bozucu bir bileşiği, “vücutta homeostazis, üreme ve gelişimsel süreçten sorumlu kan kaynaklı doğal hormonların, sentezini, salgılanmasını, taşınımını, metabolizmasını, bağlanma etkisini ve eliminasyonunu bozan, eksojen bir ajan” olarak tanımlamaktadır. Tiroid, endokrin bozucu kimyasallara oldukça hassas bir endokrin bezdir. Tiroid bezinin fonksiyonları göz önünde tutulduğunda, endokrin bozucu bir kimyasalın bu bez üzerindeki negatif etkisi, nöronal ve fiziksel sağlık ile gelişim üzerinde önemli yansımalarla neden olabilmektedir. Farklı tipteki endokrin bozucu kimyasalların, hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı üzerinde

olumsuz etkiler meydana getirebildiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Bunlar arasında, poliklorlu bifeniller, dioksinler, polibromlu difenil eterler, perklorat, bisfenoller, fitalatlar ve ultraviyole filtreler, üzerinde en kapsamlı olarak durulan endokrin bozucu kimyasal gruplarını oluşturmaktadırlar (Boas ve ark., 2012; Calsolaro ve ark., 2017). Bu kimyasallar, tiroid bezinde yapısal değişimlere yol açarak, tiroid hormonlarını bağlayan proteinleri etkileyerek ve tiroid hormonlarının periferik metabolizması ile klirensi üzerinde olumsuz etkiler oluşturarak, tiroid fonksiyonunu etkileyebilmektedirler (Boas ve ark., 2012). Pestisitler ve biyositler olarak tanımlanan bitki koruma ürünleri de, tiroid hormon üretimi ve kontrolünü bozarak, tiroid hormonlarının taşıyıcı proteinlerdeki yerleşimini ve bu hormonların karaciğerdeki metabolizmasını etkileyerek, tiroid homeostazisi üzerinde endokrin bozucu etkiler meydana getirebilmektedirler. Bu ürünler arasında, organik klorlu pestisitler (örneğin; DDT (dikloro difenil trikloroetan), heksaklorobenzen, dikofol, metoksiklor, heksaklorosikloheksan, klordan, lindan, dieldrin, endosülfan), organik fosforlu pestisitler (örneğin; klorpirifos), karbamatlar, piretroidler, fenilpirazoller ve neonikotinoidler sayılabilir (Leemans ve ark., 2019).

Epoksi rezinlerin ve polikarbonat plastiklerin bir bileşeni olarak endüstriyel alanlarda kullanılan BPA, endokrin bozucu yönü iyi bilinen bir kimyasal bileşiktir. BPA tabanlı plastikler ve rezinler, gıdalar ile temas eden ambalaj, kap ve termal kâğıt gibi materyallerin üretiminde yer almaktadır. İnsanların BPA'ya maruziyeti temel olarak, gıdalar ve gıda temalı materyaller ile meydana gelmektedir. Yapılan araştırmalar, insanlarda BPA'ya maruz kalma ile gelişimsel sorunlar, üreme ile ilgili olumsuzluklar, kardiyovasküler problemler ve bağışıklık sistemi ile ilgili olumsuzluklar arasında ilişki olduğunu göstermiştir (Andújar ve ark., 2019). BPA'nın tiroid hormon reseptör antagonisti olduğu ve farklı mekanizmalar ile tiroid hormon homeostazisini bozduğu da çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir (Kim ve Park, 2019). BPA'nın sebep olduğu ciddi sağlık sorunlarından dolayı endüstriyel alandaki kullanımına dünya genelinde kısıtlama getirilmiş ve üreticiler, BPA'ya alternatif olacak yeni arayışlar içerisine girmişlerdir. Sonuç olarak üreticiler, ürettikleri ürünlerde BPF ve BPS gibi BPA türevlerini kullanmaya yönelmişlerdir (Sur ve ark., 2017).

Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda BPF ve BPS gibi BPA türevlerinin, canlılarda BPA'ya benzer olumsuz etkiler gösterdikleri ve bunların endüstriyel alanlarda kullanımlarının, insan ve çevre sağlığı açısından, risk oluşturabileceği ortaya

konulmuştur (İyigünderoğdu ve ark., 2020). BPA analoglarının tiroid fonksiyonu üzerindeki olumsuz etkilerine dair yapılan çalışmalar ve elde edilen bilgiler ise oldukça sınırlıdır. Bu nedenle bu çalışmada, bir BPA analogu olan BPS'nin tiroid bezi üzerindeki olumsuz etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, *Wistar albino* ırkı erkek ratlar, BPS'ye oral gavaj ile günlük olarak maruz bırakılmıştır. Daha sonra BPS'nin, tiroid histolojisi, tiroid fonksiyonu ile ilişkili hormonlar (TSH, serbest T4 ve serbest T3), tiroid folikül hücre apoptozu ile proliferasyonu ve tiroid dokusunda antioksidan savunma sistemi belirteçleri (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri ile redükte glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) içeriği) üzerindeki etkisi araştırılmıştır.



2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Bisfenol A

Gıda kapları, metalik konserve kutularının koruyucu iç yüzey kaplamaları, tıbbi gereçler, yangın söndürücüleri ve termal kâğıt gibi birçok tüketici ürününün yapımında yaygın olarak kullanılan Bisfenol A (BPA; 2,2-bis(4-hidroksifenil)propan), polikarbonat plastikler ile epoksi rezinlerin bir monomeridir. Yapısında iki adet benzen halkası ve iki adet 4,4'-OH grubu bulunur (Şekil 2.1) (Milczarek-Banach ve Miśkiewicz, 2020).

Dünya çapındaki yıllık üretiminin en az sekiz milyon ton olduğu bildirilen BPA'nın çevreye, fabrikaların atık suları aracılığıyla, atık depolama alanlarındaki BPA içeren ürünlerin imha edilmesi esnasında ve çöp yakma fırınları vasıtasıyla salındığı bildirilmiştir. Lipofilik olmasından dolayı insanda, yağ dokusu, beyin, karaciğer ve meme sütünde varlığı tespit edilen BPA'nın, placentaya ve amniyon sıvısına geçerek, fötüs ve bebeği etkileyebildiği bildirilmiştir (Gorini ve ark., 2020). Östrojenik aktivitesi ve endokrin bozucu yönü iyi bilinen BPA'nın, obezite, diyabet, kronik solunum hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, renal hastalıklar, davranış bozuklukları, meme kanseri, diş gelişim bozuklukları ve üreme bozuklukları gibi sağlık sorunları ile ilişkili olduğu, yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (İyigünoğlu ve ark., 2020). İnsanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile hayvanlar üzerinde yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneysel çalışmalarda, BPA'nın tiroid hormon homeostazisini de bozduğu ortaya konulmuştur (Kim ve Park., 2019; Gorini ve ark., 2020).

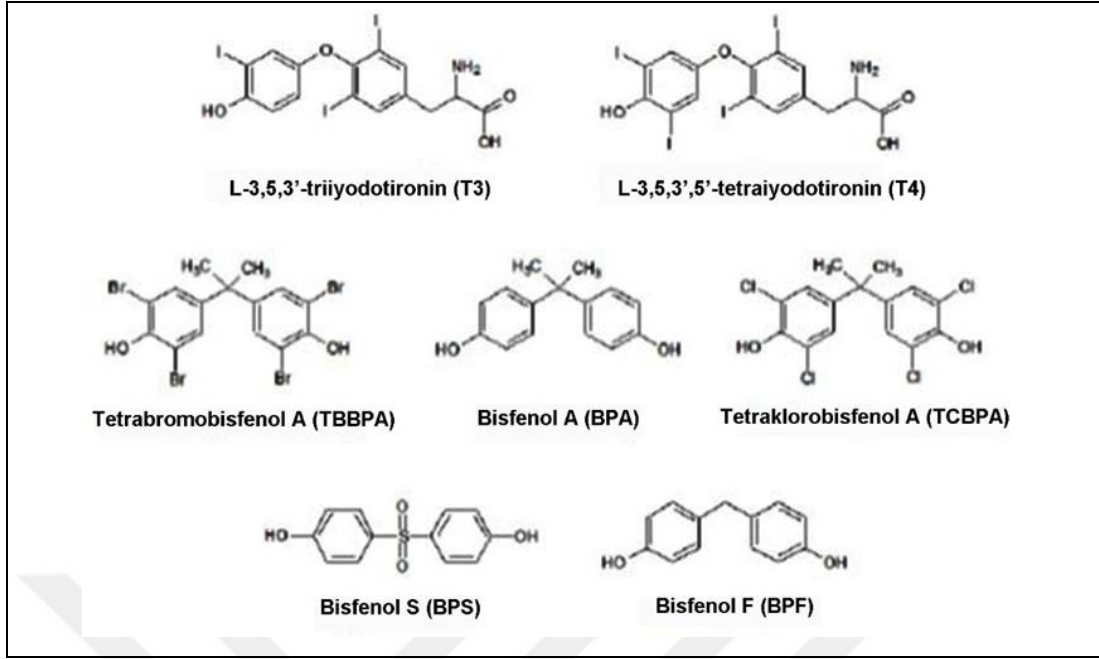
2.2. BPA'nın Metabolizması

BPA, ağız yolu ile alındıktan sonra, bağırsak ve karaciğerde ilk geçiş metabolizmasına maruz kalır. Daha sonra karaciğerde UDP-glukuronosil-transferaz (UGT) ile metabolize edilir. BPA'nın glukuronidasyonundan sonra, böbrek klirensi ile 24 saat içerisinde eliminasyonu gerçekleştirilir. Bununla birlikte, insanlar BPA'ya diğer yollar (örneğin, soluma ve dermal yol) ile de maruz kalırlar. Bu yollar ile maruziyet

endişe vericidir çünkü bu yollar ile maruziyet sonrasında, konjuge olmayan BPA formuna uzun bir süre maruz kalınması söz konusu olur (Milczarek-Banach ve Miśkiewicz, 2020).

2.3. BPA'nın Analogları

Endüstrinin birçok alanında kullanılan BPA'nın, endokrin bozucu ve sağlık üzerindeki diğer endişe verici etkileri, bu kimyasalın dünya genelinde kullanımının sınırlandırılmasına ve yasaklanmasına neden olmuştur (Sur ve ark., 2017). Avrupa Kimyasal Ajansı tarafından 2017 yılında, “çok yüksek endişe verici maddeler” listesine alınan BPA'nın, gıdalar ile temas eden materyallerdeki, kullanımına daha geniş sınırlamalar getirilmiştir. Gıda ambalaj şirketleri ise BPA'yı ürettikleri ürünlerden dereceli bir şekilde çıkartarak, BPA'nın yerine geçebilecek yeni arayışlar içerisine girmişlerdir (Andújar ve ark., 2019). BPA'nın yerine tercih edilen analoglar, BPA'ya kimyasal yapı bakımından benzer olan ve en az iki fenil halkası içeren ancak substituentleri açısından farklılık gösteren bileşiklerdir. Örneğin BPA analoglarında, fenil halkalarının 3,3' veya 3,5' pozisyonlarında metil, brom ve klor substituentleri yerleşim gösterebilir. BPA analogları, BPS, BPF, BPB, bisfenol Z (BPZ), BPC, bisfenol P (BPP), bisfenol M (BPM), bisfenol AP (BPAP), BPAF, bisfenol AD (BPAD), tetrabromobisfenol A (TBBPA), tetraklorobisfenol A (TCBPA), tetrametilbisfenol A (TMBPA) ve dimetilbisfenol A (DMBPA)'yı kapsar (İyigünoğdu ve ark., 2020; Milczarek-Banach ve Miśkiewicz, 2020). Gıda maddeleri, ev içi tozu, sedimentler, termal kağıtlar ve kişisel bakım ürünlerinde tespit edilen BPA analoglarının, insan biyolojik örneklerinde de, varlığı gösterilmiştir. Bu analogların BPA'ya benzer olarak, endokrin bozucu etkilere, sitotoksik etkilere, genotoksik etkilere, dioksin benzeri etkilere, üreme ile ilgili toksik etkilere ve nörotoksik etkilere sahip oldukları farklı deneysel çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, BPAF, BPF, BPS ve BPB gibi BPA analoglarının, BPA'nın sahip olduğu östrojenik ve antiandrojenik aktivitelere benzer hatta ondan daha fazla aktiviteye sahip oldukları, bildirilmiştir (Chen ve ark., 2016). BPA ve analogları, tiroid hormonlarına yüksek seviyede yapısal benzerlik gösterdiklerinden dolayı (Şekil 2.1), tiroid fonksiyonunu antagonistik olarak ya da başka mekanizmalar ile bozabilmektedirler (Kim ve Park., 2019; Gorini ve ark., 2020).



Şekil 2.1. Tiroid hormonları (T3 ve T4)'na kimyasal yapı bakımından benzerlik gösteren BPA ve analogları (TBBBA, TCBPA, BPS ve BPF) (Gorini ve ark., 2020).

2.4. Bir BPA Analogu Olarak BPS

Endüstriyel uygulamalarda BPA'nın yerine bir alternatif olarak kullanılan BPS, önemli bir BPA analogudur. Kimyasal ismi bis(4-hidroksifenil)sulfon olan BPS'nin moleküler ağırlığı, 250.27 g/mol'dür. BPS, ısıya dirençli, yüksek termal stabiliteye sahip ve güneş ışığına dayanıklı olan bir analogdur. Termal kâğıtlar ile plastiklerin üretiminde, epoksi reçinelerin yapımında ve hızlandırıcı ajan olarak temizlik ürünlerinin üretiminde kullanılan BPS, bagaj etiketleri, el ilanları, gazete, konserve kutusu ve daha sayılabilecek birçok endüstriyel üründe, BPA yerine geçebilecek bir alternatif olarak kullanılmaktadır. BPS'nin varlığı, yapılan saha çalışmalarında, konserve gıdalar, ev içi tozlar, musluk suyu, çamur ve atık su gibi farklı ortamlardan alınan örneklerde tespit edilmiştir. Bununla birlikte, BPS'nin insan doku ve idrar örneklerindeki, konsantrasyonunun BPA ile kıyaslanabilir düzeylerde olduğu bildirilmiştir (İyigünoğlu ve ark., 2020). BPS ile ilgili yapılmış olan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, BPS'nin BPA'ya benzer, akut ve kronik toksik etkilere, genotoksik etkilere ve östrojenik aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Sur ve ark., 2017). BPS ile ilgili yapılan bazı deneysel çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

BPS'nin 50, 150 ve 500 mg/kg konsantrasyonlarına, gavaj yolu ile maruz bırakılan Sprague Dawley ratlarda, esas atılım yolunun idrar olduğu belirlenmiştir. İdrar ile atılımın zamana bağlı olarak azaldığı, fekal atılımın ise arttığı gözlenmiştir. Safra kesesinin kannule edildiği ratlarda, tek bir gavaj dozu sonrasında %53'ünün safra içine salgılanmasının, BPS'nin büyük oranda enterohepatik dolaşıma girdiğini ortaya koymuştur. Ratlarda ve farelerde intravenöz BPS uygulaması sonucunda atılımın, gavaj uygulamasındakine benzer olduğu bildirilmiştir. Elde edilen veriler gavaj uygulamasından sonra dışkı ile atılan dozun, absorbe edilen doz olabileceğini göstermiştir. Glukuronid ve sülfat konjugatları gibi üriner metabolitlerin, ana bileşiğin ortalaması kadar olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, BPS'ye oral olarak maruziyet sonrasında iyi absorbe edildiği ve dokularda minimal düzeyde tutularak atıldığı belirlenmiştir (Waidyanatha ve ark., 2018).

BPS'ye subkutan enjeksiyon ile maruz bırakılan (0.5, 5 ve 50 mg/kg) dişi sıçanlarda, yüksek BPS konsantrasyonlarının, puberte başlangıcını ve östrus siklusunu geciktirdiği, belirlenmiştir. En yüksek BPS konsantrasyonunun vücut ağırlığını azalttığı gözlenmiştir. Yüksek BPS konsantrasyonlarının, gonadosomatik indeks değerlerini ve uterus ağırlığını düşürdüğü tespit edilmiştir. BPS maruziyeti sonrasında, plazma testosteron ve östradiol düzeylerinin yükseldiği, plazma progesteron, lüteinizan hormon ve folikül stimüle edici hormon düzeylerinin ise azaldığı belirlenmiştir. Atretik folikül artışı ile birlikte kistik foliküllerin miktarında doza bağımlı şekilde artışların olduğu ifade edilmiştir. Dolayısıyla, BPS'nin BPA'ya benzer olarak, yapısal ve endokrin değişimlere yol açtığı rapor edilmiştir (Ahsan ve ark., 2018).

Ullah ve ark., (2019), BPA ve analogları (BPB, BPF ve BPS)'na, gebeliğin 1. gününden 21. gününe kadar içme suyu ile 5, 25 ve 50 µg/L konsantrasyonlarda maruz bırakılan sıçanların, erkek yavru bireylerinde üreme dokularındaki biyokimyasal histolojik değişimleri incelemişlerdir. Araştırmacılar, BPA ve analoglarının erkek yavru bireylerin üreme dokularında antioksidan enzim düzeylerini etkilediğini, plazma testosteron/östrojen seviyelerinde değişimler meydana getirdiklerini ve testis/epididimis dokularında histolojik değişimlere yol açtığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak BPA ve analoglarının, erkek üreme sisteminin gelişimini olumsuz olarak etkilediği, bildirilmiştir.

BPS'nin 30, 60 ve 120 mg/kg konsantrasyonlarına, 30 gün boyunca gavaj yolu ile maruz bırakılan Sprague Dawley ırkı erkek ratlarda, eritrosit sayısının, lökosit sayısının,

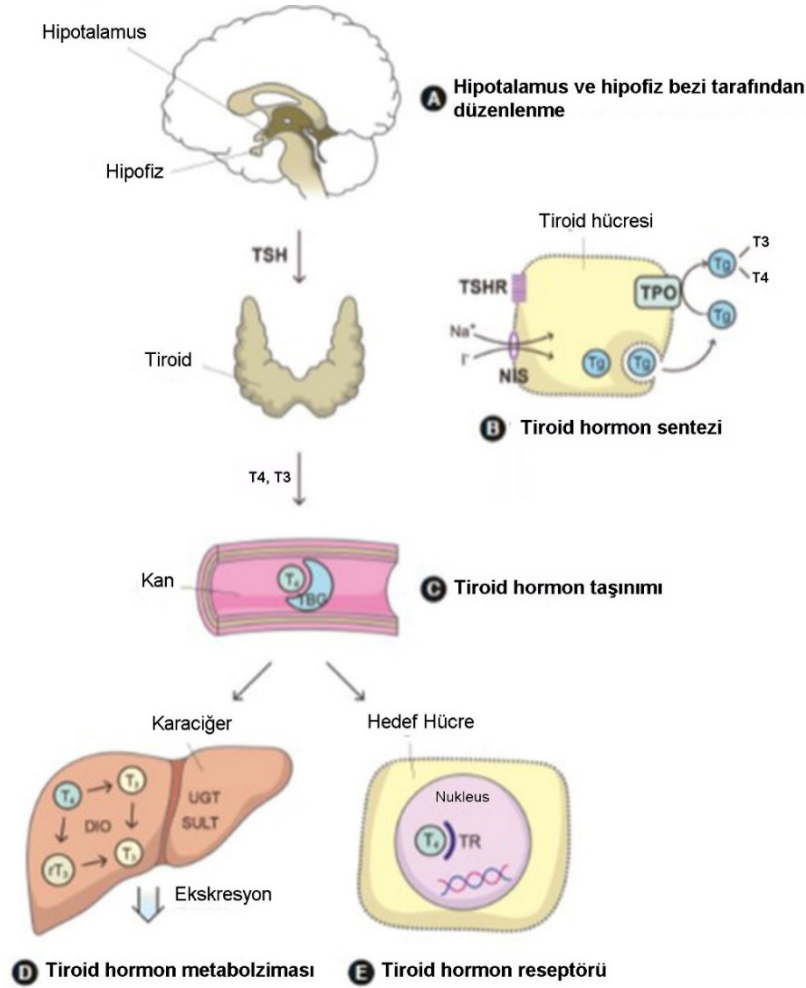
hemoglobin konsantrasyonunun ve pıhtılaşma zamanının doza bağımlı bir şekilde ve anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir. BPS'nin total serum glukoz ve protein seviyelerini artırdığı tespit edilmiştir. Öte yandan, BPS maruziyetinin, serum total kolesterol, trigliserit, gliserolsüz trigliserit, düşük yoğunluklu lipoprotein, çok düşük yoğunluklu lipoprotein düzeylerini artırırken yüksek yoğunluklu lipoprotein konsantrasyonunu azalttığı gözlenmiştir. BPS'nin serum aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ve alkalın fosfataz aktivitelerini anlamlı olarak artırdığı belirlenmiştir. Bunlardan başka, serum kalsiyum, bilirubin ve üre düzeylerinin BPS dozuna bağımlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, BPS'nin ratlarda kan fonksiyonlarını bozabileceği ve kardiyovasküler risklere yol açabileceği bildirilmiştir (Pal ve ark., 2017).

BPA, BPS ve diğer BPA analogları (BPF ve BPAF)'na 4, 12 ve 24 saat boyunca, 1 ile 250 g/mL konsantrasyon aralığında maruz bırakılan insan eritrositlerinde, sitosolik kalsiyum iyon konsantrasyonunun yükseldiği, fosfatidilserin translokasyonunu arttığı, kalpain ve kaspaz-3 aktivitelerinin uyarıldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, BPA ve analoglarının eriptotik potansiyele sahip oldukları ifade edilmiştir (Maćczak ve ark., 2016).

İnsan eritrositlerinin, BPA ve analogları (BPS, BPF ve BPAF)'na 1, 4 ve 2 saat boyunca maruz bırakıldığı (0.1-500 µg/mL) farklı bir çalışmada ise, hücrelerde reaktif oksijen türü (ROS) seviyesinde artış olduğu, lipid peroksidasyon düzeyinin yükseldiği, GSH seviyesinde düşüşün meydana geldiği ve antioksidan enzim aktivitelerinin değiştiği belirlenmiştir (Maćczak ve ark., 2017).

2.5. Bisfenoller ve Tiroid Üzerindeki Etkileri

Tiroid hormonları (T4 ve T3) büyüme, gelişim ve metabolizma için gerekli olan ve sinir gelişiminde önemli rol oynayan hormonlardır. Bu hormonlar, hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı ve tiroid hormonlarının etki mekanizmasını kontrol eden diğer faktörler aracılığı ile düzenlenir. Tiroid hormon sentezi sırasında iyot, sodyum iyodür simport taşıyıcı proteini ile tiroositlere giriş yapar ve TPO tarafından oksidize edilir. Daha sonra tiroglobulindeki tirozil rezidüleri ile birleşir. Sentezlenen tiroid hormonları TBG ve TTR gibi proteinlere bağlanır ve kanda dolaşır. Tiroid hormonları hedef organda tiroid hormon reseptörüne (TR) bağlanır ve tiroid hormon sinyal yollarını uyarır. Hormon,



Şekil 2.2. Hipotalamus-hipofiz-tiroid aksının şeması. Hipotalamus hipofiz bezinden tirotropin (TSH; tiroid uyarıcı hormon) salgılanmasını uyararak, tirotropin salıverici hormon (TRH) üretir. TSH hipofizden dolaşıma salgılanır ve tiroid hormonları (T4 ve T3)'nın üretilmesi için tiroid bezini uyarır (A). TSH, tiroid hormonlarının biyosentezinin ve salınımının bütün basamaklarında yer alır. TSH aynı zamanda farklı proteinlerin (solüt taşıyıcı ailesi 5A olarak bilinen sodyum iyodür simport taşıyıcı, pendrin, dual oksidaz tip 2, TPO, tiroglobulin ve deiyoninazlar (tip 1, tip 2 ve tip 3)) aktivitesini ve ekspresyonunu da uyarır (Oliveira ve ark., 2019). TSH tiroisitleri, TSH reseptörü (TSHR) aracılığı ile uyardığında, iyodun sodyum iyodür taşıyıcı (NIS) ile hücreye alınımı, tiroglobulin (Tg) üretimi ve TPO aracılığı ile oksidasyon gerçekleşir (B). Tiroid hormonları kanda, TBG ve TTR gibi bağlayıcı proteinler ile taşınır (C). Tiroid hormonları karaciğerde deiyodinaz (DIO), UGT ve sülfotransferaz (SULT) ile metabolize edilir daha sonra safrada elimine edilir (D). Tiroid hormonları hedef hücrelerde TR'lere bağlanır ve tiroid hormon uyarım yollarını aktive eder (E). Farklı kimyasallar farklı noktalarda (hipotalamus, hipofiz bezi, tiroid bezi, serum TSH ve tiroid hormonları gibi) olumsuz etkiler oluşturarak, tiroid hormon etkisini engelleyebilirler. Şekil, Kim ve Park (2019)'dan değiştirilerek alınmıştır.

karaciğerde inaktif forma metabolize edilir (Şekil 2.2). Endokrin bozucu kimyasallar, birkaç farklı noktada olumsuz etkiler (hipotalamus, hipofiz ve tiroid bezi ile ilişkili olumsuz etkiler ve serum TSH seviyesi ile tiroid hormon seviyeleri ilişkili olumsuz etkiler) oluşturarak, tiroid hormon düzenlenmesinde ve tiroid hormonlarının fonksiyonlarında değişimlere yol açarlar (Şekil 2.2) (Kim ve Park, 2019; Oliveira ve ark., 2019).

BPA'nın, tiroid hormonu (T3) tarafından uyarılan transkripsiyonel aktiviteyi doza bağımlı bir şekilde baskıladığı ve bu baskılayıcı etkisinin, T3'ün fizyolojik konsantrasyonlarında, meydana geldiği bildirilmiştir. BPA'nın TSH α promotörünün negatif düzenlenmesi durumunda ise zıt olarak, T3 tarafından baskılanan gen transkripsiyonunu aktive ettiği bildirilmiştir. BPA'nın, T3'ün tiroid reseptöründeki yerini değiştirdiği ve transkripsiyonel bir baskılayıcıyı çalıştırdığı, neticede gen baskılanmasına yol açtığı belirlenmiştir. Kısaca BPA'nın, T3'ün TR'ye bağlanmasını inhibe ederek ve promotor üzerindeki N-CoR'u aktive ederek, transkripsiyonel aktiviteyi baskıladığı ifade edilmiştir. Dolayısıyla, BPA'nın bir T3 antagonisti olarak rol oynadığı ve tiroid hormon reseptörü aracılığı ile oluşturulan transkripsiyonu inhibe ettiği, bildirilmiştir (Moriyama ve ark., 2002).

Gebelik ve laktasyon dönemlerinde, BPA'ya oral gavaj ile 1, 10 ve 50 mg/kg konsantrasyonlarda maruz bırakılan Sprague Dawley ratların yavrularında, serum T4 düzeyinin doğumdan sonraki 15. günde yükseldiği ancak TSH düzeyinin değişim göstermediği belirlenmiştir. BPA'nın dentat girusta, tiroid hormonuna duyarlı *rc3/nörogranin* gen ifadesini artırdığı, TR β üzerinde antagonist etki gösterdiği ve hipofiz bezinde tiroid hormonlarının negatif geri bildirim mekanizmasını bozduğu ifade edilmiştir (Zoeller ve ark., 2005).

BPA'nın 0.1 mg/L konsantrasyonuna maruz bırakılan gebe Sprague-Dawley ratlarda geçici hipotiroidi gözlenirken, bu ratların erkek yavrularında doğumdan sonraki 7. günde T4 seviyesinin kısa süreli bir yükselme gösterdiği ve doğumdan sonraki 21. günde, T4 seviyesinin düştüğü belirlenmiştir. BPA maruziyetinden sonra erkek yavruların hipokampusunda, steroid hormon reseptör koaktivatör-1 protein ve mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ekspresyon seviyelerinin yükseldiği ifade edilmiştir. Bununla birlikte, tiroid hormon reseptörleri, α ve β ile RC3/nörogranin ekspresyonlarının BPA maruziyetinden etkilenmediği bildirilmiştir. Sonuç olarak, BPA'nın çok düşük seviyelerine perinatal

dönemde maruz kalmanın, tiroid fonksiyonunu etkileyerek, beyin gelişimi için olumsuz etkiler meydana getirebildiği gösterilmiştir. Tiroid hormon reseptörlerinin BPA etkisinin direkt hedefi olmadığı ancak başka faktörlerin BPA'nın oluşturduğu olumsuz etkilerin ortaya çıkmasında rol oynayabileceği, belirtilmiştir (Xu ve ark., 2007).

BPA'nın 0, 2.5, 8, 25, 80, 260, 840, 2700, 100000 ve 300000 mg/kg/gün konsantrasyonlarına gebeliğin 6. gününden doğum anına kadar oral gavaj ile maruz bırakılan Sprague-Dawley ratların yavruları, doğumdan 15 gün sonrasına kadar aynı BPA dozlarına maruz bırakılmıştır. Erkek yavruların 300000 mg/kg/gün BPA konsantrasyonunda, serum T3 ve TSH düzeylerinin anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir (Delclos ve ark., 2014).

Puberte sürecinde (doğumda sonra 28. gün ile 56. günler arasında) BPA'ya, 1 ve 100 mg/L konsantrasyonlarda içme suyu ile maruz bırakılan farelerde, serbest T4 düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2016).

BPA'nın 5, 50 ve 500 µg/50 µL konsantrasyonlarına, doğumdan sonraki 1. günden 10. güne kadar subkutan olarak maruz bırakılan yavru ratlarda, doğumdan sonraki 13. günde TSH seviyesinde değişim meydana gelmediği ancak östrus dönemindeki erişkinlerde TSH düzeyinin yükseldiği gözlenmiştir. Serum T4 düzeyinin, BPA'nın 5 ve 500 µg/50 µL konsantrasyonlarında azaldığı ancak serum T3 düzeylerinde herhangi bir değişimin meydana gelmediği belirlenmiştir. Tirotropin salıverici hormon (TRH), TSHβ ve TRH reseptör ekspresyonunun BPA maruziyeti sonrasında anlamlı farklılıklar göstermediği ifade edilmiştir. BPA'nın 50 µg/50 µL dozunun, östrus dönemindeki erişkin ratlardan izole edilen primer hipofiz hücre kültüründe, TSH salınımını artırdığı gözlenmiştir. Hücrelerin BPA'ya 24 saatlik maruziyeti sonrasında, bazal TSH düzeyinin ve prolaktin salınımının arttığı ancak TRH'ye verilen yanıtın azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler, BPA'ya neonatal dönemde maruz kalmanın, östrus dönemindeki erişkin ratların hipotalamus-hipofiz-tiroid aksında değişimler meydana getirdiği ayrıca BPA'nın hipofiz bezinden izole edilen primer hücre kültüründe, TSH salınımını değiştirdiği belirlenmiştir (Fernandez ve ark., 2018).

BPA'ya (20 ve 40 µg/kg v.a./gün) doğumdan sonra 15. günden 30. güne kadar maruz bırakılan yavru erkek albino ratlarda, serum T3 ile T4 seviyelerinin azaldığı, TSH düzeyinin ise yükseldiği bildirilmiştir. Aynı zamanda, yavruların serebrum ve serebellumunda histopatolojik değişimlerin meydana geldiği belirlenmiştir. BPA'ya

maruziyet sonrasında, serebrum ile serebellumda oksidatif stres belirteçlerinin yükseldiği, antioksidan savunma belirteçlerinin ise düştüğü, gözlenmiştir. Sonuç olarak, BPA tarafından meydana getirilen hipotiroidi durumunun, yenidoğan tiroid-beyin aksında, serbest radikal oluşumu sonucunda bozulmalara yol açtığı ve serebrum ile serebellum gelişimini geciktirdiği bildirilmiştir (Ahmed ve ark., 2018).

Yapılan bazı deneysel çalışmalarda ise BPA'ya perinatal dönemde maruz kalma sonrasında tiroid hormon düzeylerinde anlamlı değişimlerin meydana gelmediği bildirilmiştir. Örneğin, BPA (0, 4 ve 40 mg/kg/v.a./gün)'ya gebeliğin 6. gününden, doğumdan 20 gün sonrasına kadar oral gavaj ile maruz bırakılan ratların, erkek ve dişi yavrularında T4 düzeylerinin değişmediği ve *in vivo*'da yapılan TSH uyarım testlerine normal yanıtın verildiği gözlenmiştir. Dolayısıyla uterus ve laktasyon sürecinde BPA'ya maruziyetin cinsiyete bağımlı olmaksızın plazma T4 düzeylerini değiştirmediği bildirilmiştir (Kobayashi ve ark., 2005). Ferguson ve ark., (2011) ise yaptıkları çalışmada, Sprague Dawley ratlarını, BPA'nın 0, 2.5, ve 25.0 mg/kg/gün konsantrasyonlarına gebeliğin 6. gününden 21. gününe kadar oral gavaj ile maruz bıraktıktan sonra, doğan yavruları doğumdan 21 gün sonrasına kadar aynı BPA dozlarına maruz bırakmışlardır. Maruziyet sonrasında, yavrularda cinsiyet ayrımı olmaksızın serum hormon seviyelerinin (T4 ve T3) değişmediği ifade edilmiştir.

BPA'ya 50, 100 ve 200 mg/kg v.a. konsantrasyonlarda maruz bırakılan erkek ratlarda (*Rattus norvegicus*), serum TSH ve T3 düzeylerinin değişmediği ancak serum T4 seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, BPA'nın tiroid dokusunda, vakuollü kolloid, parafoliküler hücrelerde kalınlaşma ve düzleşmiş tiroisit formasyonu gibi histopatolojik değişimlere yol açtığı gözlenmiştir (Alkalby, 2015).

BPA'nın 50 mg/kg/gün konsantrasyonuna 8 hafta boyunca oral gavaj ile maruz bırakılan erkek ratların tiroid bezinde, vakuollü folikül hücreler, kolloid lümenine doğru epitelial dökülme ve foliküller arası boşluklardaki kılcal damarlarda kongesyon gibi histopatolojik değişimler belirlenmiştir. BPA'nın kolloiddeki periyodik asit-Schiff boyanmasını ve folikül hücrelerindeki Bcl-2 immunreaksiyonunu azalttığı gösterilmiştir. BPA'nın serum T3 ile T4 seviyelerinde anlamlı azalışlara sebep olduğu, serum TSH düzeyini ise artırdığı ifade edilmiştir. BPA uygulaması sonrasında, 4 haftalık süre içerisinde iyileşme süreci incelenen rat grubunda ise, BPA tarafından oluşturulan

histolojik ve biyokimyasal değişimlerin kısmi olarak düzeldiği bildirilmiştir (Manal ve Ibrahim, 2019).

T4, tiroid bezi tarafından üretilen esas tiroid hormonudur. Bununla birlikte, tiroid reseptörünün T3'e olan afinitesi, T4'den daha fazladır. Tip 1 ve tip 2 iyodotironin deiyodinazlar, farklı dokularda preprohormon T4'ü, biyolojik olarak aktif olan T3'e dönüştürürler. Bir integral protein olan tip 1 deiyodinaz ratlarda baskın olarak, tiroid, böbrek ve karaciğerde eksprese edilir ve bu enzimin, T3 düzeylerinin devamlılığı ile ilişkili olduğu düşünülür. Öte yandan tip 2 deiyodinaz, endoplazmik retikulum içerisinde lokalize olur. Bu enzimin, hem plazma hem de hücre içi T3 düzeyinin devamlılığının sağlanması rol oynadığı düşünülür. Tip 2 deiyodinaz esas olarak kahverengi adipoz doku, hipotalamus ve hipofiz bezinde eksprese edilir. BPA'nın *in vitro*'da tip 1 ve tip 2 deiyodinaz aktivitelerini inhibe ettiği, *in vivo*'da ise hepatik tip 1 deiyodinaz aktivitesini azalttığı ancak kahverengi yağ dokusu tip 2 aktivitesini etkilemediği bildirilmiştir. Dolayısıyla, BPA'nın tiroid hormon metabolizmasını etkileyebildiği ve tiroid hormon uyarımını bozabildiği ifade edilmiştir (Da Silva ve ark., 2019).

Zebra balığında yapılan *in vitro* ve *in vivo* deneysel çalışmalarda, BPA'nın tiroid hormonlarının sentezi ile ilişkili genlerin ve tiroide özğü transkripsiyonel faktörlerin ekspresyonunda değişimlere neden olduğu ve hipofiz-tiroid aksını etkileyebildiği bildirilmiştir (Gentilcore ve ark., 2013).

BPF ile BPS'nin zebra balığında, T3 ve T4 seviyelerini arttırdığı, tiroid gelişimi (*hhex* ve *tg*), tiroid hormon transportu (*ttr*) ve metabolizması (*ugt1ab*) ile ilişkili genlerin transkripsiyonunda değişimler meydana getirdikleri ve yumurta açılımında gecikmeye sebep oldukları bildirilmiştir. Araştırıcılar, BPA analoglarının larval balıkta tiroid fonksiyonunu bozabildiğini ve bu analogların tiroid hormon bozucu potansiyellerinin, BPA'dan daha yüksek olabileceğini belirtmişlerdir (Lee ve ark., 2019).

Ergin zebra balığı, BPA ve BPS'ye maruz bırakıldığında, sodyum iyot simport taşıyıcısı, *Tg* ve *TPO* genlerinin, uygulama dozuna bağımlı olarak pozitif ve negatif düzenlenmeler gösterdikleri bildirilmiştir. Yapılan moleküler kenetlenme çalışmalarında ise, tiroid transkripsiyon faktörleri, *Pax 8* ve *TFF1* ile BPA ve BPS arasında, *in silico* etkileşimler olduğu gösterilmiştir. Elde edilen bulgularda, endüstriyel alanlarda BPA yerine güvenilir bir alternatif olarak düşünölen BPS'nin tiroid fonksiyonu üzerindeki bozucu etkisinin, BPA ile aynı olduğu belirtilmiştir (Berto-Júnior ve ark., 2018).

BPA'nın 20 ve 40 µg/kg v.a./gün dozlarına gebeliğin 1. gününden 20. gününe kadar maruz bırakılan gebe ratlarda ve bunların fötüslerinde, serum T4 ve T3 düzeylerinin düştüğü ve TSH düzeyinin yükseldiği gözlenmiştir. Fötüslere ait tiroid bezlerinde, fibroblast proliferasyonu, hiperplazi, luminal obliterasyon, ödem ve dejenerasyon gibi farklı histopatolojik değişimler meydana geldiği bildirilmiştir. Belirlenen bu olumsuzlukların, fötal serum büyüme hormonu, insülin büyüme faktörü-1 ve adiponektin seviyelerini baskıladığı, buna karşın; fötal serum leptin, insülin ve tümör nekroz faktör-α seviyelerini artırdığı ifade edilmiştir. Dolayısıyla BPA'nın plösental bariyeri aşabildiği ve endokrin sistem ile yağ metabolizmasını olumsuz etkileyerek fötal tiroid-adiponektin akısını bozduğu, bildirilmiştir (Ahmed, 2016).

BPA'ya oral gavaj ile 40 mg/kg v.a. konsantrasyonda maruz bırakılan dişi *Wistar albino* ratların tiroidinde hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşumunun arttığı, tiroid iyot alınınının ve TPO aktivitesinin ise azaldığı belirlenmiştir. Yapılan histolojik incelemelerde tiroid bezi içerisinde yassı epitel tabakasına sahip ve kalınlaşmış interfoliküler bağ dokusu ile çevrelenen çok sayıda hipoaktif folikülün varlığı tespit edilmiştir. Maruziyet sonrasında, serum T4 düzeyinde artışın olduğu, T3 düzeyinin değişmediği ve hipofiz TSH-β mRNA seviyesinin azaldığı bildirilmiştir. Tiroid hücreleri (PCCL3), BPA'nın 10⁻⁹ M konsantrasyonuna maruz bırakıldıklarında ise, *in vivo*'da gözlenen bulgulara paralel olarak, H₂O₂ düzeyinin yükseldiği, sodyum iyot taşıyıcı mRNA seviyelerinin azaldığı, *Duox2* mRNA seviyelerinin ise yükseldiği belirlenmiştir. Hücrelerin bir antioksidan olan N-asetilsistein ile muamele edilmesi sonrasında ise BPA'nın sodyum iyot taşıyıcısı üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkinin önlendiği ifade edilmiştir. Sonuç olarak, BPA'nın tiroisitlerde reaktif oksijen türlerini artırarak oksidatif hasara yol açtığı ve tiroid problemlerine zemin hazırlayabileceği belirtilmiştir (Da Silva ve ark., 2018).

Zhang ve ark. (2018), BPF ve BPS'nin, tiroid hormon uyarım yolları üzerindeki engelleyici etkilerini, yaptıkları bir dizi *in vitro* ve *in vivo* çalışma ile ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar yaptıkları floresan kompetitif bağlanma ölçüm deneyleri ile BPS ve BPF'nin, BPA'ya benzer olarak, tiroid hormon reseptörleri (TRα ve TRβ)'ne bağlanabildiklerini göstermişlerdir ancak her iki bisfenolün reseptörlere bağlanma potansiyelinin BPA'ya göre düşük olduğunu (BPA > BPF > BPS) ifade etmişlerdir. Araştırmacılar BPS ve BPF'nin tiroid hormon reseptörlerine bağlanma potansiyellerini,

yaptıkları moleküler kenetlenme çalışmalarında da belirlemişlerdir. Bu üç bisfenolün, T3'ün varlığında ve yokluğunda, agonistik etkileşimler gösterdikleri ifade etmişlerdir. BPA, BPF ve BPS'nin, tiroid hormon bağımlı GH3 hücre proliferasyonunu uyardıkları ancak BPA ile BPF'nin, T3 varlığında T3 uyarımını inhibe ettiklerini belirlemişlerdir. *Pelophylax nigromaculatus* iribaşlarında yaptıkları *in vivo* çalışmalarda ise, her bisfenol tipinin T3'e benzer olarak, tiroid hormon yanıt gen transkripsiyonunu uyardığını ifade etmişlerdir. Sonuç olarak, BPF ve BPS'nin BPA'ya benzer olarak, tiroid hormon uyarım yollarını engelleme potansiyeline sahip olduklarını, bunu da T3 yoksunluğunda tiroid hormon uyarımını aktive ederek, tiroid hormonlarının varlığında ve belirli koşullar altında ise agonistik ve antagonistik etkiler ile meydana getirerek gerçekleştirdikleri, rapor edilmiştir.

Rat hipofiz hücreleri (GH3) ve tiroid folikül hücreleri (FRTL-5) ile yapılan *in vitro* çalışmalarda BPA analoglarının, BPA'ya benzer olarak, GH3 hücrelerinde tiroid uyarıcı hormon, tiroid hormon reseptörleri (α ve β) ve deiyodiniz (tip 1 ve tip 2) genlerinde anlamlı azalışlara neden oldukları, bildirilmiştir. Hatta bazı analogların (BPF, BPM ve BPZ) BPA'dan daha güçlü potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir. FRTL-5 hücrelerinde ise, hormon sentezinden sorumlu olan genlerin (tiroid hormon reseptörü, *pax8*, *nkx2.1*, *NIS*, *Tg* ve *TPO*) transkripsiyon seviyelerinin BPA analoglarına (özellikle BPS) maruziyet sonrasında 1.5 kat daha fazla artış gösterdikleri bildirilmiştir. Araştırmacılar gen düzenlenmesi üzerine olan etkilerin hücre hattına göre farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. BPA analoglarının, tiroid düzenlenmesini ve tiroid hormon sentezini BPA'ya göre daha düşük konsantrasyonlarda etkileyerek, tiroid hormon homeostazisini bozabildikleri ifade edilmiştir (Lee ve ark., 2017).

FRTL-5 hücrelerinin kullanıldığı farklı bir çalışmada ise BPA'nın hücrelere iyot alınımasını azalttığı ve ratdan izole edilen tiroid mikrozomlarında TPO aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir. BPA'nın aynı zamanda tiroid hormon sentezinde rol oynayan genlerin (*Slc5a5*, *Tpo* ve *Tgo*) ve transkripsiyon faktör genlerinin (*Pax8*, *Foxe1* ve *Nkx2-1*), transkripsiyonel ekspresyon seviyelerinde değişimlere neden olduğu bildirilmiştir (Wu ve ark., 2016).

Halojenli fenolik bileşiklerin (3,3',5-triklorobisfenol A, 3,3',5,5'-TCBPA, 3,5-diklorobisfenol A, 3-klorobisfenol A), *Xenopus laevis*'ten saflaştırılan TTR ile etkileşebildikleri bildirilmiştir. Bu etkileşimin, tiroid hormon reseptörü β 'nın ligand

bağlanma bölgesi ile olan etkileşime kıyasla daha güçlü olduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte, 3,3',5-triklorobisfenol A ile 2,4,6-triyodobisfenol'ün, T3 antagonistleri oldukları belirlenmiştir. Dolayısıyla fenolik bileşiklerin, hücre içi T3 uyarım yolakını bozabilecekleri ifade edilmiştir (Kudo ve Yamauchi, 2005).

Marchesini ve ark. (2008), biyosensör tabanlı ölçüm yöntemine dayanan çalışmalarında, BPA'nın TTR'ye olan afinitesinin inaktif olduğunu ancak halojenli BPA türevleri olan TCBPA ile TBBPA'nın TTR'ye güçlü afinite gösterdiklerini bildirmişlerdir. Öte yandan, hem TCBPA'nın ile TBBPA'nın TBG'ye olan aktivitelerinin inaktif olduğunu belirtmişlerdir.

Cao ve ark. (2011), BPA'nın tiroid hormon taşıyıcı proteinlere (insan serum albumin, TTR ve TBG'ye) bağlanma afinitesinin T3'den daha düşük, T4'e göre ise çok daha düşük olduğunu, bildirmişlerdir. Araştırmacıların, insan plazmasında belirledikleri BPA seviyelerinin ise T4 transportunu engelleyecek yeterli düzeyde olmadığını, ifade etmişlerdir.

Bisfenol analoglarının, TBG ve TR α ile polar ve hidrofobik etkileşimler meydana getirebildikleri bildirilmiştir. Bunların yapısal bağlanma özelliklerindeki benzerliklerinin ise, tiroid hormon uyarımı ve taşınımındaki endokrin bozucu etkilerin kaynağı olabileceği ileri sürülmüştür (Beg ve Sheikh, 2020).

Rat hipofiz tümör GH3 hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen raportör gen ölçümüne dayalı *in vitro* bir çalışmada, BPA ve halojenli türevlerinin (TBBPA ve TCBPA), 1 μ M konsantrasyona kadar, zayıf agonistik etki gösterdikleri, 5 μ M üstündeki konsantrasyonlarda ise antagonistik etkiye sahip oldukları bildirilmiştir. Bu bisfenollerin ek olarak, tiroid hormon reseptörü aracılığı ile meydana getirilen etkileri bozabilecek potansiyele sahip oldukları ifade edilmiştir (Freitas ve ark., 2011). Farklı bir hücre hattı (CV1) kullanılarak gerçekleştirilen ve yine raportör gen ölçümüne dayalı başka bir çalışmada da BPA'nın 10^{-9} M gibi düşük bir konsantrasyonda bile, tiroid hormon reseptörünü inhibe ettiği bildirilmiştir (Sheng ve ark., 2012).

BPS ve analoglarının tiroid bezi üzerindeki endokrin bozucu etkisini, *in vivo*'da, *in vitro*'da ve moleküler dinamik simülasyon yöntemleri ile araştıran Lu ve ark. (2018), BPS, tetrabromobisfenol S, TBBPA ve BPA'nın TR β için antagonistik etki potansiyeline sahip olduklarını bildirmişlerdir. Aynı zamanda, BPS ve analoglarının zebra balığı

embriyolarında, *TR β* geninin mRNA ekspresyon seviyesini, anlamlı bir şekilde değiştirdiği, ifade edilmiştir.

BPF'ye, döllenmenin 2. saatinden itibaren başlayarak 144. saate kadar, 0.2, 2, 20 ve 200 mg/L konsantrasyonlarda maruz bırakılan zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında, tüm vücut T3 ile T4 içeriğinde değişimlerin meydana geldiği ve T3/T4 oranının arttığı gözlenmiştir. TSH içeriğinin ise BPF maruziyeti sonrasında konsantrasyona bağımlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir. Deiyodinaz (*dio2*) gen transkripsiyonunun BPF etkisi ile arttığı, böyle bir etkinin ise yükselen T3 içeriğini azaltmaya yönelik olabileceği ifade edilmiştir. Tiroid hormon düzenlenmesi ve sentezi ile ilişkili olan genlerin (*crh*, *nis* ve *tg*) transkripsiyonundaki artışların ise azalmış olan T4 içeriğini kompanse edici bir mekanizma olarak meydana gelebileceği, belirtilmiştir. Öte yandan, tiroid hormon transportu ile ilişkili proteini kodlayan genin (*ttr*) , BPF'ye maruziyet sonrasında transkripsiyonel olarak baskılandığı, bildirilmiştir. Sonuç olarak BPF'nin, zebra balığı embriyo/larvalarında, hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı ile ilgili genlerin transkripsiyonunu değiştirdiği ve tiroid sisteminde endokrin bozuluma sebep olduğu, tespit edilmiştir (Huang ve ark., 2016).

BPS'nin 1, 3, 10 ve 30 µg/L konsantrasyonlarına, döllenmenin 2. saatinden döllenmenin 168. saatine kadar, maruz bırakılan zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarında T4 ve T3 seviyelerinin, sırasıyla 10 ile 30 µg/L konsantrasyonlarda anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. TSH düzeyinin ise aynı BPS konsantrasyonlarında arttığı gözlenmiştir. Kortikotropin salıverici hormon (*crh9* ve *Tg*) genlerinin mRNA ekspresyonunun 10 ile 30 µg/L konsantrasyonlarda, doza bağlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir. Tiroid gelişimi (*pax8*) ve tiroid hormon sentezi (sodyum iyodür taşıyıcı ve *slc5a5*) ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun, BPS'nin 30 µg/L konsantrasyonunda arttığı, ifade edilmiştir. Öte yandan, BPS'nin tiroid hormon metabolizması ile ilgili genlerin (deiyodinazlar (1 ve 2) ve üridindifosfat glukoronosiltransferaz (*ugt1ab*)) ekspresyonlarında artışa neden olduğu ve bu artışların değişen tiroid hormon seviyeleri ile ilgili olabileceği belirtilmiştir. TTR gen transkriptinin BPS'nin 3 µg/L ve üstü konsantrasyonlarda azaldığı, TR α ve TR β ile deiyodinaz 3 (*dio39*) mRNA düzeylerinin ise değişmediği gözlenmiştir. Sonuç olarak, BPS'nin zebra balığı larvalarında tiroid hormon ve TSH düzeylerini değiştirdiği, hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı ile ilgili genlerin

ekspresyon profillerinde değişikliklere yol açtığı ve tiroid endokrin bozulumunu hızlandırdığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2017).

2.6. Apoptoz

Apoptoz, hücrenel bir intihar şeklidir çünkü ölüm hücrenin kendi içindeki aktif süreçlerin uyarılması sonucunda ortaya çıkar. Apoptoza giden hücrede, yapısal ve biyokimyasal olarak hızlı değişimler meydana gelir. Apoptoz morfolojik olarak marjınasyon, nüklear kromatinin kondensasyonu (piknoz), sitoplazmik büzüşme, nüklear fragmentasyon ve plazma mebranında bleb oluşumu ile karakterize edilir. Apoptotik hücre bir müddet sonra ‘apoptotik cisimler’ adı verilen kısımlara ayrılır. Bu kısımlar; organelleri, nukleus kısımlarını ve hücre artıklarını içeren paketlerdir. Apoptotik cisimler, kendilerine komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve apoptoza giden hücre fagosite edilir (Orrenius ve ark., 2011).

Apoptozun en karakteristik biyokimyasal özelliklerinden biri DNA’nın internükleozomal bölgelerden, Ca^{2+}/Mg^{2+} bağımlı endonükleaz aktivitesi sonucunda düzenli olarak kesilmesi ve neticede 180-200 baz çifti büyüklüğünde DNA fragmentlerinin oluşmasıdır (Schwartzman ve Cidlowski, 1993). Endonükleaz aktivitesi ile meydana gelen bu DNA kırıklarının 3’-OH uçları, terminal transferaz enzimi ile işaretlendikten sonra işaretili bölgelerin biyotin-avidin-peroksidaz tekniği ile boyanması (TUNEL boyama), apoptotik hücrelerin histolojik kesitlerde ve tek hücre seviyesinde incelenmesine olanak verir (Gavrieli ve ark., 1992). Apoptotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılan bu yöntem, hassas ve spesifik bir metoddur (Kylarová ve ark., 2002).

Kimyasal toksisitesinin farklı ölüm yolları ile ilişkisi bulunsa da, farklı tipteki çok sayıda kimyasal ajanın toksik etkisini, apoptozu uyarma yolu ile ortaya çıkardığı bildirilmiştir (Orrenius ve ark., 2011). Örneğin çevrede bir kirletici olarak geniş yayılım gösteren heksaklorobenzenin, dişi *Wistar albino* ratların tiroid folikül hücrelerinde, TUNEL-pozitif (apoptotik) hücrelerin miktarını artırdığı, belirlenmiştir (Chiappini ve ark., 2009). Toksik etkili kimyasallar dışında, guatr (Tamura ve ark., 1998), sepsis (Lin ve ark., 2016) ve iyonize radyasyon (Matsuu-Matsuyama ve ark., 2015) gibi faktörler de tiroid folikül hücre apoptozunu uyatabilmektedir.

2.7. Prolifere Olan Hücre Çekirdek Antijeni

Prolifere olan hücre çekirdek antijeni (PCNA), hücre siklusunun S safhası için esansiyel olan ve evrimsel açıdan yüksek derecede korunmuş bir moleküldür. Bu molekül, hücre siklusunun geç G1 ve S fazlarında sentezlenen bir polimeraz delta aksesuar proteinidir. PCNA, aktif olarak replike olan veya çoğalan hücreler için bir belirteç olup, bu hücrelerin parafin kesitlerde incelenmesine ilişkin bilgi sunar (Wolf ve Dittrich, 1992; Casasco ve ark.,1993). Östrojen ve tamoksifene maruz bırakılan ratların tiroid folikül hücrelerinde PCNA indeks değerlerinin yükseldiği dolayısıyla bunların tiroid üzerinde proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Araujo ve ark., 2006). Bromüre içme suyu ile maruz bırakılan ratlarda, PCNA-pozitif tiroid folikül hücre indeksinin yükseldiği ve bu durumun parenkimatik guatrı temsil eden bir değişiklik olabileceği ifade edilmiştir (Velický ve ark., 1997). Potasyum dikromat ile hipotiroidi oluşturulan erkek ratlarda ise, PCNA-pozitif tiroid folikül hücre sayısının arttığı ancak bu etkinin kurkumin tarafından azaltıldığı bildirilmiştir (Aboul-Fotouh ve ark., 2018).

Mikrozomal enzim uyarıcıları olan fenobarbital ve pregnenolon-16 α -karbonitril, T4'ün biyotransformasyonu ile eliminasyonunu artırarak ve serum TSH düzeyinde artışa yol açarak, tiroid folikül hücre proliferasyonunu artırır. Öte yandan, serum TSH düzeyinde artışa neden olmayan mikrozomal enzim uyarıcıları 3-metilkolantern ile Aroklor 1254 (PCB)'ün, folikül hücre proliferasyonunda artışa neden olmadıkları bildirilmiştir. Fenobarbital ve pregnenolon-16 α -karbonitril tarafından oluşturulan TSH düzeyindeki küçük artışların, tiroid folikül hücre proliferasyonunda anlamlı artışlara sebep oldukları halde total tiroid folikül hücre miktarında anlamlı artışlar meydana getirmediği ifade edilmiştir (Hood ve ark., 1999a).

2.8. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikaller, son yörüngesinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran atom veya molekül olarak tanımlanırlar. Bunlar, eşlenmemiş elektrona sahip olduklarından dolayı kararsız yapıdadırlar ve diğer maddeler ile reaksiyona girerek kararlı duruma geçme eğilimi gösterirler. Serbest radikaller oksijen ve nitrojen türevli olabilirler.

Reaktif oksijen türleri (ROS) için süperoksit, hidroksil, peroksil, lipid peroksil ve alkoksil radikalleri örnek olarak verilebilir. Reaktif nitrojen türlerini ise nitrik oksit ve nitrojen dioksit oluşturur. Serbest radikaller, endojen ve eksojen kaynaklar tarafından oluşturulur. En önemli endojen kaynak, mitokondride aerobik solunum sırasında elektron transport sistemi tarafından katalize edilen oksijenlerin, serbest radikalleri yan ürün olarak üretmesidir. Eksojen kaynaklar ise ultraviyole ışınlar, radyasyon ve çevrede bulunan kimyasal maddelerdir. Miktarlarının artması durumunda canlıda, lipidler, proteinler ve nükleik asitler üzerinde yapısal bozukluklara neden olarak, zararlı etkilere yol açabilirler (Karabulut ve Gülay, 2016a).

Antioksidan maddeler, hücrelerdeki protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanırlar (Çavdar ve ark., 1997). Antioksidanlar, endojen ve eksojen olmak üzere iki grup altında sınıflandırılırlar. Endojen antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları içerir. Enzimatik olan endojen antioksidanlar için SOD, CAT, GPx ve glutatyon redüktaz (GR) örnek olarak verilebilir. Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar ise glutatyon, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, koenzim Q10, selenyum, α -lipoik asit, seruloplazmin ve transferrin gibi maddelerden oluşur. Eksojen kaynaklı antioksidanlar; vitamin eksojen antioksidanlar (örneğin; α -Tokoferol (vitamin E), β -karoten (vitamin A), askorbik asit (vitamin C) ve folik asit (vitamin B9)) ve ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar (örneğin; ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, rekombinant SOD, Trolox-C (vitamin E analogu), GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein, enzimatik olmayan serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin), sitokinler (TNF ve IL-1) ve demir şelatörleri) olmak üzere iki grupta sınıflandırılır. İnsan ve diğer organizmaların vücudunda oksidanlar ile antioksidanlar denge halinde bulunur. Bu dengenin bozulması sonucunda artan oksidatif stres, kardiyovasküler hastalıklar, gastrointestinal hastalıklar, solunum ve boşaltım bozuklukları, kanser, diabet, yaşlanma, sperm fonksiyon bozukluğu ve infertilite gibi birçok rahatsızlığın ortaya çıkabilme ihtimalini artırır (Karabulut ve Gülay, 2016b).

2.9. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, bir BPA analoğu olan BPS'nin *Wistar albino* erkek ratların tiroid bezi üzerindeki toksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda;

1. BPS'nin, tiroid bezinde meydana getirdiği histopatolojik değişimler,
2. BPS'nin, serum TSH, serum serbest T4 ve T3 seviyeleri üzerindeki etkisi,
3. BPS'nin, tiroid folikül hücre proliferasyonu ile apoptozu üzerindeki etkileri ve
4. BPS'nin, tiroid bezinde antioksidan sistem göstergeleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanı

Çalışmada ağırlıkları 180-245 g olan 2-3 aylık, toplam 28 adet, *Wistar albino* ırkı erkek rat kullanıldı. Ratlar, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Ratlar, deney süresince, ortalama 25 °C sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık periyodu altında barındırıldı ve standart plastik kaplarda *ad libitum* (istenildiği kadar) olarak beslenmeleri sağlandı. Deneyler, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Deneyler sırasında meydana gelebilecek olumsuzlukların en aza indirilmesi için gerekli olan bütün önlemler alındı. Çalışma süresince, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen kurallara riayet edildi. Bu tez çalışması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (VAN YUHADYEK) tarafından onaylanmıştır (Karar no: 2022/05-19).

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan cihazlar ve kimyasallar sırasıyla, Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihaz	Marka	Model
Rotari mikrotom	Microm GmbH	H315
Mikroskop	Leica	DMI 6100B
Mikroplaka okuyucu	DAS	A3
Spektrofotometre	Shimadzu	UV/VIS 1201
Spektrofotometre	A&E LAB	UV/VIS AE-S90-ID
Ultrasonik homojenizatör	Bandelin Electronic GmbH &Co KG	Bandelin Sonopuls, HD 2070
pH metre	Sartorius	PB-11
Manyetik karıştırıcı	Heidolph	MR 3001
Vorteks	Heidolph	Reax Top QO4
Hassas terazi	Sartorius	ED 224S
Sterilizatör	Sanyo	MOV-212S
Buzdolabı	Beko	BK 9330 NF
Derin dondurucu	Beko	BK 7971 DF
Su banyosu	-	-

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kit ve kimyasalların listesi

Kimyasal/Sarf	Marka	Katalog numarası
Bisfenol S (BPS; Bis-(4-hidroksifenil)-sulfon (sinonim: 4,4'-Sulfonildifenol), $C_{12}H_{10}O_4S$, saflık: %99.7,)	Acros Organics, New Jersey, ABD	146915000
TUNEL Kiti (TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit)	Calbiochem, Merck	QIA33
İmmunohistokimya kiti (Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detetion Kit-Micropolymer)	Abcam	ab236466
PCNA primer antikoru (PC10)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	13-3900
Glutasyon peroksidaz kiti	Randox-Ransel	RS505
Süperoksit dismutaz kiti	Randox-Ransod	SD125
GSH (Redükte Glutasyon)	Sigma-Aldrich	G4251
CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen)	Fluka	24440
DTNB (5,5'-ditiyobis-2nitrobenzoik asit)	Sigma	D8130
Etanol (% 99.9)	Merck	1.00983
Fosfat tuz tamponu (PBS)	Sigma	P4417
Sığır serum albumin	Fluka	05471
Coomasie Brilliant G	Applichem	A3480
1,1,3,3-Tetraetoksipropan	Aldrich	T9889
2-Tiyobarbiturik asit	Merck	1.08180
Trikloroasedik asit	Merck	1.00810
H_2O_2	Merck	1.08597
KH_2PO_4	Merck	1.04873
Na_2HPO_4	Sigma-Aldrich	71640
NaH_2PO_4	Fluka	71496
NaCl	Merck	1.06404
Sodyum sitrat tribazik dihidrat	Sigma	S4641

3.3. Deneysel Dizayn

Her grupta yedi (7) adet rat olacak şekilde, toplam dört (4) deney grubu oluşturuldu. Ratlar gruplara rastgele olarak dağıtıldı. Deneyisel uygulamalar, toplam 28 gün süre ile gerçekleştirildi. Test kimyasalı olan bisfenol S (BPS; Bis-(4-hidroksifenil)-sulfon (sinonim: 4,4'-Sulfonildifenol), $C_{12}H_{10}O_4S$, saflık: %99.7, kod: 146915000, Acros

Organics, New Jersey, ABD)'nin, etanol-zeytinyağı karışımı (1:4 v/v) içerisinde tamamen çözünmesi sağlandı (Pal ve ark., 2017; Da Silva ve ark., 2018). Hayvanlara oral gavaj ile günlük olarak uygulanan BPS konsantrasyonları, Higashihara ve ark. (2007), Pal ve ark. (2017) ve Da Silva ve ark. (2018)'nin bisfenoller ile yapmış oldukları çalışmalara göre belirlendi. Toplam yirmi sekiz gün süren çalışmadaki deney grupları aşağıda belirtilmiştir:

Grup I: Kontrol grubu hayvanlarını ($n = 7$) içeren ve sadece test kimyasalının çözündüğü etanol-zeytinyağı karışımı (1:4 v/v)'nin hayvanlara günlük olarak oral gavaj yolu ile verildiği gruptur. Gruptaki hayvanların deney süresince standart yem ve su ile *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı.

Grup II: Her hayvanın vücut ağırlığına göre BPS'nin 20 mg/kg v.a. konsantrasyonuna, oral gavaj yolu ile günlük olarak maruz bırakıldığı gruptur. Gruptaki hayvanların ($n = 7$) deney süresince standart yem ve su ile *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı.

Grup III: Her hayvanın vücut ağırlığına göre BPS'nin 100 mg/kg v.a. konsantrasyonuna, oral gavaj yolu ile günlük olarak maruz bırakıldığı gruptur. Gruptaki hayvanların ($n = 7$) deney süresince standart yem ve su ile *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı.

Grup IV: Her hayvanın vücut ağırlığına göre BPS'nin 500 mg/kg v.a. konsantrasyonuna, oral gavaj yolu ile günlük olarak maruz bırakıldığı gruptur. Gruptaki hayvanların ($n = 7$) deney süresince standart yem ve su ile *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı.

3.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Deney süresinin tamamlanmasından hemen sonra ratlar, ketamin/ksilazin karışımı ile anestezi edildi. Hayvanların kalbinden enjektör ile alınan kan örnekleri, biyokimyasal analizler için biyokimya tüplerine alındı. Daha sonra, her hayvanın tiroid bezinin bir lobu histolojik incelemeler için, diğer lobu ise antioksidan indikatörlerin ölçümü için dikkatlice çıkartıldı.

3.5. Histolojik Prosedürler

Hayvanlardan çıkartılan tiroid dokuları, % 10'luk nötral tamponlu formaldehit fiksatif ile 24 saat tespit edildi. Tespit edilen dokular, fosfat tuz tamponu (PBS; 0.01 M, pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra dereceli etanol (% 70, % 80, % 96 ve absolü) serilerinden geçirilerek, dehidrate edildi. Dokular daha sonra ksilende şeffaflaştırılarak parafine gömüldü. Parafin bloklardan Rotary mikrotom ile alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler, adeziv kaplı lamlara aktarıldı. Kesitler rutin histolojik incelemeler için, Hematoksilen ve Eozin (H&E) ile boyandı. BPS uygulanan hayvanların tiroid dokusunda meydana gelen histopatolojik değişimler, Hadie ve ark. (2012), Abd El-Twab ve Abdul-Hamid (2016), ve Brändli-Baiocco ve ark. (2018)'e göre belirlendi. Daha sonra kesitlerden, kamera ataşmanlı mikroskop (Çizelge 3.1) kullanılarak, uygun büyütmede, fotoğraflar çekildi.

3.6. PCNA İmmun Boyaması

Tiroid bezinden alınan kesitlerde (5 µm) proliferen olan hücrelerin işaretlenmesi için immunohistokimya yöntemi tercih edildi. Bu yöntem, spesifik bir "PCNA primer antikoru" ve avidin-biyotin mikropolimer işaretleme sistemine göre çalışan ticari bir "immunohistokimya kiti" kullanılarak gerçekleştirildi (Çizelge 3.2). İmmun boyama kit protokollerine uyularak yapıldı. Kesitler, deparafinize ve rehidrate edildikten sonra, immunohistokimya kiti içinde bulunan H₂O₂ solüsyonu ile oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Bu şekilde dokudaki endojen peroksidaz aktivitesinin inaktif hale getirilmesi sağlandı. Kesitler TBS ile yıkandıktan sonra, bu kez kit içerisinde mevcut olan protein bloke edici solüsyon damlatıldı ve dokudaki proteinlerin bloke edilmesi gerçekleştirildi. Daha sonra kesitler, içerisinde % 1 oranında sığır serum albümin (BSA) bulunan TBS ile 1:400 oranında sulandırılmış olan PCNA primer antikoru (Çizelge 3.2) ile oda sıcaklığında 2 saat, inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon, kesitlerin kurumaması için, nemli oda içerisinde gerçekleştirildi. Kesitler, TBS ile birkaç defa yıkandıktan sonra kitin komplement solüsyonu ile inkübe edildi. TBS ile tekrar yıkanan kesitlere bu kez, HRP-konjugatı uygulandı. HRP-konjugat ile inkübe edilen kesitler, TBS ile birkaç kez yıkandıktan sonra DAB kromojen solüsyonu ile muamele edildi ve proliferen olan (PCNA pozitif) hücrelerin kahverengiye boyanması gerçekleşene kadar bu hücrelerin

boyanmaları (1-3 dk) sağlandı. Zemin boyaması Mayer'in hematoksilen boyası ile yapıldı. Lamlar dereceli etanolden (%95, %100) ve ksilenden geçirilerek Entellan ile kapatıldı. Negatif kontrol kesitlerinde, primer antikor yerine TBS kondu. Preparatlar mikroskop ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.7. TUNEL Boyama

Tiroid dokusundan alınan 5 µm kalınlığındaki histolojik kesitlerde apoptotik hücrelerin (parçalı DNA'ya sahip olan hücreler) işaretlenmesi için TUNEL yöntemi kullanıldı. TUNEL boyaması, ticari bir kit (Çizelge 3.2) kullanılarak ve bu kitin protokollerine uyularak gerçekleştirildi. Dokulardan alınan kesitler (5 µm) silan kaplı adheziv lamlara aktarıldıktan sonra, deparafinize ve rehidrate edildi. Kesitler daha sonra tris tuz tapmonu (TBS; 20 mM Tris 140 mM NaCl, pH: 7.6) ile yıkandı ve proteinaz K (10 mM Tris içinde 2 mg/mL, pH: 8.0) ile oda sıcaklığında 20 dakika (dk) inkübe edilerek dokunun permeabilizasyonu sağlandı. TBS ile yıkanan kesitler, metanol ile hazırlanan %3'lük H₂O₂ ile oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilerek dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi inaktif hale getirildi. TBS ile yıkamadan sonra kesitler, TdT tamponu ile oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Kesitler daha sonra TBS ile yıkanmaksızın, biyotin ile işaretlenmiş deoksinükleotid ve enzim (TdT) karışımı (3 µL enzim + 57 µL TdT işaretleme karışımı) ile 37 °C'de ve nemli ortamda 90 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, doku kesitleri durdurma (stop) tamponu (0.5 M EDTA, pH:8) ile muamele edilerek reaksiyon durduruldu. TBS ile yıkamanın ardından kesitler, bloke edici tampon ile 10 dk. inkübe edildi. Kesitlerden bloke edici tampon, TBS ile uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine sulandırılmış konjugat karışımı (%4'lük BSA ile 1:50 oranında sulandırılan streptavidin peroksidaz konjugatı) damlatıldı ve kesitler oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Kesitler TBS ile yıkandıktan sonra, 3,3'-diaminobenzidin (DAB) solüsyonu ile muamele edilerek, kahverengi renk oluşumu gözleninceye kadar beklendi. Daha sonra lamlar distile su ile yıkandı ve sonrasında %0.3'lük metil yeşili ile zemin boyaması yapıldı. Son olarak kesitler, etanol ve ksilol serilerinden geçirildi ve Kanada balsamı ile kapatıldı. Boyama, pozitif ve negatif kontrol boyamaları ile test edildi. Pozitif kontrol boyamasında kesitler, proteinaz K uygulamasından sonra, DNaz I (TBS ile hazırlanan 1mM MgSO₄ içinde) ile inkübe edildi

(oda sıcaklığında 20 dk). Negatif kontrol boyamasında ise, işaretleme karışımına TdT enziminin yerine bidistile su konuldu. Diğer basamaklar her iki kontrol kesitinde yukarıda tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. Preparatlar, mikroskop (Leica DMI 6000B model) ile incelenerek görüntüleri alındı.

3.8. Apoptotik ve Prolifere Olan Hücrelerin Sayımı

Her bireye ait TUNEL ve immunohistokimya yöntemleri ile boyanmış tiroid kesitlerinden, birbirinden farklı en az 10 farklı sahada ve 400× büyütmede, mikroskop ile bağlantılı bir kamera (Leica DFC490, Leica Microsystems) kullanılarak, fotoğraflar çekildi. Her iki boyama için çekilen fotoğraflar <https://imagej.nih.gov/ij/download.html> internet adresinden indirilebilen, ImageJ 1.46 yazılımına aktarıldı. Çekilen fotoğraflarda daha sonra, yazılımın “hücre sayıcı” eklentisi kullanılarak, hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayımları aşağıda kısaca özetlenmiştir:

Bir bireye ait tiroid kesitinin en az 10 farklı sahasında yer alan tiroid foliküllerindeki TUNEL/PCNA-pozitif ve TUNEL/PCNA-negatif hücrelerin sayımı yapıldı. Daha sonra sayımın yapıldığı her saha için apoptotik indeks (AI) ve proliferasyon indeks (PI) değerleri, aşağıda verilen eşitliklere (sırasıyla 3.8.1 ve 3.8.2) göre, hesaplandı. AI ve PI değerlerinin belirlenmesi için, bir bireye ait toplamda en az 600 folikül hücresi sayıldı.

$$AI = [Alanda sayılan TUNEL pozitif hücre sayısı \div Toplam hücre sayısı (negatif + pozitif)] \times 100 \quad (3.8.1)$$

$$PI = [Alanda sayılan PCNA pozitif hücre sayısı \div Toplam hücre sayısı (negatif + pozitif)] \times 100 \quad (3.8.2)$$

Her bireye ait en az 10 farklı sahadan elde edilen AI ve PI değerlerinin ortalamaları alınarak, bireyler için AI ve PI değerleri elde edildi. Bu değerler daha sonra, istatistiksel analizler için kullanıldı (Matsuu-Matsuyama ve ark., 2015; Iglesias-Osma ve ark., 2019). Sonuçlar, “%” olarak ifade edildi.

3.9. Serum Hormon Seviyeleri

Serum TSH, serbest T4 ve T3 seviyeleri, kemolüninesent mikropartikül immün ölçüm yöntemine göre çalışan kitler kullanılarak, Architect i4000 SR otoanalizör cihazı (Abbot Diagnostics Inc., Illinois, ABD)'nda belirlendi. Sonuçlar, TSH için $\mu\text{LU/mL}$, serbest T4 için ng/mL ve serbest T3 için pg/mL olarak ifade edildi.

3.10. Antioksidan Savunma Sistemi Belirteçlerinin Tayini

3.10.1. Doku homojenizasyonu

Derin dondurucuda saklanan tiroid dokuları, homojenizasyon öncesinde çıkartılarak erimeleri sağlandı. Daha sonra, dokular PBS (pH: 7.4) ile ultrasonik parçalayıcı kullanılarak, 2.5 dk. boyunca, homojenize edildi. Homojenatlar, $15000 \times g$ 'de 20 dk boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak, tüplere aktarıldı. Yapılan bu işlemlerin hepsi, $+4^\circ\text{C}$ veya buz üzerinde gerçekleştirildi. Elde edilen süpernatantlar, antioksidan savunma sistemi belirteçlerinin analizleri ve total protein tayini için -20°C 'de saklandı.

3.10.2. Total protein tayini

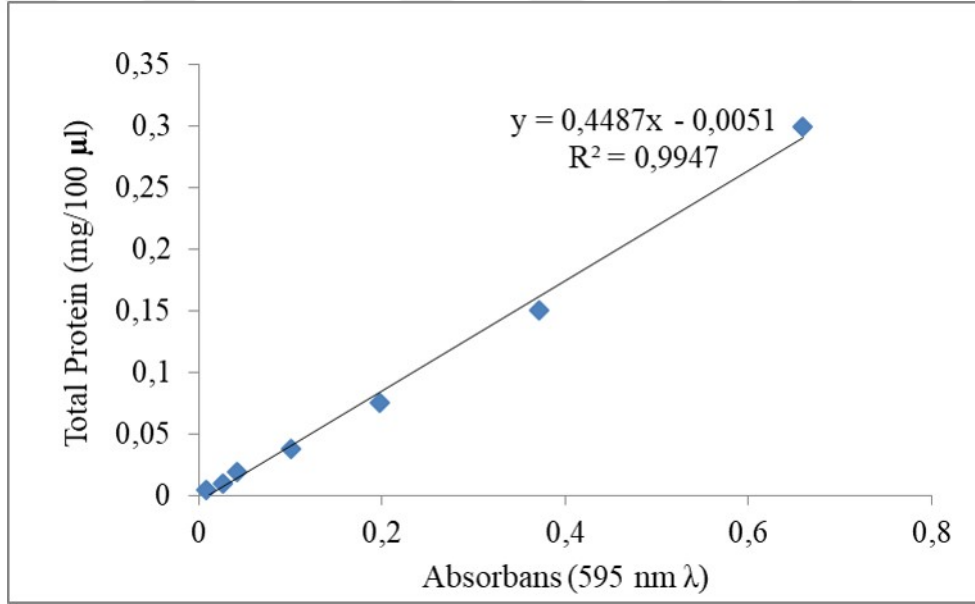
Antioksidan savunma sistemi parametrelerinin mg protein cinsinden ifade edilebilmesi için, her örneğe ait süpernatantta, total protein tayini yapıldı. Total protein konsantrasyonu, Bradford, (1976) metoduna göre, BSA'nın standart olarak kullanılması ile belirlendi. Bradford metodu, proteine bağlanan Coomasie Blue G boya reaktifinin, 595 nm dalga boyundaki maksimum absorpsiyonunun, spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır.

Ayırıcılar:

1. Konsantre Bradford solüsyonu ($5\times$): 100 mg Coomasie Blue G, 50 mL absöü etanol ve 100 mL ortofosforik asit ($\%85$) içerisinde çözölür. Solüsyon distile su ile 200 mL'ye tamamlanır ve filtre edilir.

2. Bradford solüsyonu (1×): Yukarıda hazırlanan solüsyonun, distile su ile 1:5 oranında sulandırılması ile hazırlanır.

Yöntem: Standartlar hazırlanmadan önce 10 mg/mL stok BSA hazırlandı. Stoktan seri sulandırmalar yapılarak 0.05 ile 1.20 mg/30 µL aralığında 7 adet standart oluşturuldu. Örnek, kör ve standartlar Bradford solüsyonu ile muamele edildikten sonra, 20 dk boyunca karanlık ortamda inkübe edildi. Spektrofotometre köre karşı sıfırlandıktan sonra, örnek ve standartların absorbansı, 595 nm dalga boyunda ölçüldü. Standartlara karşılık gelen absorbens değerlerine dayalı olarak standart eğri (Şekil 3.1) oluşturuldu. Örneklerdeki total protein konsantrasyonu eğriye ait fonksiyon kullanılarak belirlendi. Sonuçlar mg/mL protein olarak ifade edildi.

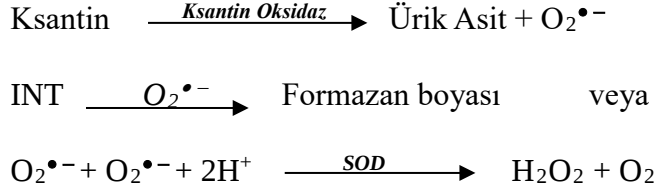


Şekil 3.1. Protein standart eğrisi

3.10.3. Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini

Prensip: SOD, oksidatif enerji basamağında üretilen, toksik süperoksit radikalının ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijen (O_2) dismutasyonunu hızlandırır. Ölçüm yönteminde, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikali, INT ile reaksiyona girer ve kırmızı formazan boya formu meydana getirir. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesinin 505 nm'de spektrofotometrik olarak

ölçülmesi ile belirlenir. Ölçümde bir ünite SOD, INT'nin indirgenmesinin %50'lik inhibisyonunu gerçekleştirir (Suttle ve McMurray, 1983).



Yöntem: SOD aktivite ölçümü Ransod kit (Randox Lab., İngiltere) kullanılarak ve kit protokollerine uyularak gerçekleştirildi. Kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. SOD kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları

Kit İçeriği	İçerik bileşeni	Solüsyonların başlangıç konsantrasyonları
Substrat karışımı	Ksantin	0.05 mmol/L
	INT	0.025 mmol/L
Tampon	CAPS	40 mmol/L, pH 10.2
	EDTA	0.94 mmol/L
Ksantin oksidaz		80 U/L
Standart		4.6 U/mL

Kör (S1) olarak, 0.01 mol fosfat tamponu (pH: 7.0) kullanıldı. Kalibrasyon stok solüsyonu 10 mL distile su içerisinde hazırlandı (4.6 U/mL). Standartlar (S2–S6), kitte belirtildiği şekilde, 0.01 mol fosfat tamponu ile kalibrasyon stok solüsyonundan seyreltilerek oluşturuldu. Ölçüm yapılırken, süpernatantın 25 µL'si küvet içerisine pipetlendikten sonra üzerine 850 µL substrat karışımı eklendi. Küvet iyice çalkalandıktan sonra, bu karışımın üzerine 125 µL ksantin oksidaz ilave edildi (ölçüm sırasında küvet içine pipetlenen bileşenler Çizelge 3.4'te belirtilmiştir). Küvetteki karışımın başlangıç absorbansı (A_1), 505 nm'de 37 °C'de, 30 sn sonra ölçüldü ve kaydedildi. Ölçüme 3 dk boyunca devam edildi ve son absorbans değeri (A_2), 3. dk'nın sonunda kaydedildi. Kör ve standartların absorbans değerlerinin ölçümleri de yukarıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 5 ölçüm yapıldı.

Hesaplama: Standart ve örneklere ait dk başına düşen absorbans değeri ($\Delta A = (A_2 - A_1)/3$) hesaplandıktan sonra bütün standartlar ve örnekler için % inhibisyon

değerleri aşağıdaki formüllerden yararlanılarak hesaplandı (S1 için reaksiyon inhibisyonu gerçekleştirilmediği için % inhibisyon değeri 100'dür).

$$100 - \frac{(\Delta A_{\text{standart} / dk} \times 100)}{(\Delta A_{\text{kör} / dk})} = \% \text{Inhibisyon} \quad 100 - \frac{(\Delta A_{\text{örnek} / dk} \times 100)}{(\Delta A_{\text{kör} / dk})} = \% \text{Inhibisyon}$$

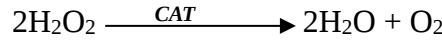
Standartların U/mL cinsinden bilinen konsantrasyonlarına karşılık gelen % inhibisyon değerleri kullanılarak bir standart eğri oluşturuldu. Örneklerdeki SOD aktivitesi, bu eğriden elde edilen denkleme göre U/mL olarak belirlendi. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Çizelge 3. 4. SOD aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları

Küvete pipetlenen bileşenler	S1 (µL)	S2-S6 (µL)	Örnek (µL)
Örnek	25	-----	-----
Standart	-----	25	-----
Örnek sulandırıcı	-----	-----	25
Substrat karışımı	850	850	850
Ksantin oksidaz	125	125	125

3.10.4. Katalaz aktivitesi tayini

Prensip: CAT, H₂O₂'nin suya ve oksijene ayrışmasını katalizler:



Süpernatantlarda CAT aktivitesi 240 nm dalga boyunda H₂O₂'nin tüketilme esasına dayanan spektrofotometrik metoda göre belirlendi (Aebi, 1974). H₂O₂, ışığı 240 nm dalga boyunda absorbe eder. Bu yöntemle göre CAT tarafından H₂O₂'in dekompoze olma oranı, spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda tespit edilir.

Kullanılacak solüsyonların hazırlanışı:

a. CAT fosfat tamponun hazırlanışı: Çizelge 3.5.'te belirtilmiş olan A (KH₂PO₄) ve B (Na₂HPO₄) solüsyonları, 50 mM konsantrasyon için, verilen miktarlarda tartılarak hazırlanır. Hazırlanan A ve B solüsyonları daha sonra Çizelge 3.6'da belirtilen miktarlarda karıştırılır. Bu şekilde CAT fosfat tamponu hazırlanmış olur (pH: 7.5).

b. H₂O₂ solüsyonu: Absorbansı 0.500 nm'ye ayarlanmış olan H₂O₂'li fosfat tamponudur. Yaklaşık 300 mL fosfat tamponu (pH 7.5, 50 mM) renkli bir cam şişeye aktarılır. Spektrofotometre 240 nm'de fosfat tamponuna göre sıfırlandıktan sonra renkli

şışedeki tampona 10-20 µL miktarında H₂O₂ ilave edilir ve absorbands 0.500 nm oluncaya kadar bu işleme devam edilir. H₂O₂ ilavesi yapılırken şişe ara ara karıştırılır.

Çizelge 3.5. CAT fosfat tamponu (pH:7.5)'nün hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar

Kimyasal	Molekül Ağırlığı	50 mM için	Son Hacim (distile su)	Solüsyon Adı
KH ₂ PO ₄	136.09 g/mol	6.805 g	1000 mL	A
Na ₂ HPO ₄ (susuz)	141.96 g/mol	7.098 g	1000 mL	B

Çizelge 3.6. CAT fosfat tamponunun hazırlanması için gerekli olan A ve B solüsyonlarının karıştırılma miktarları

50 mM Fosfat tamponu (1 L) (pH 7.5)	A Solüsyonu (mL)	B Solüsyonu (mL)
	160	840

Deneyin yapılışı: Örnek ve tampon kuvartz küvet içerisine Çizelge 3.7'de belirtilen miktarlarda bırakıldıktan sonra küvetin ağzı bekletilmeden kapatılır ve küvet hızlıca alt-üst edilerek absorbandsı okunur. Absorbans azalması, her 15 sn'de bir defa olmak üzere 5 dk süre ile kaydedilir (aktivite hızlı ilerliyorsa 10 sn'de bir kayıt yapılır ve lineer azalma tespit edilirse okuma sonlandırılabilir). Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbands azalmasının en yüksek (A₁) ve en düşük (A₂) değerleri esas alınır.

Çizelge 3.7. CAT aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları

Tampon	Kör (mL)	Örnek (mL)
Fosfat Tamponu	2.99	-
H ₂ O ₂ solüsyonu	0.01	-
H ₂ O ₂ 'li fosfat tamponu	-	2.99
Süpernatant	-	0.01

Hesaplama: $\Delta A = \epsilon \times c \times L$, [A: absorbands/dk, ϵ : ekstinksiyon katsayısı, c: konsantrasyon, L: ışık yolu (1 cm)]

H₂O₂'nin 240 nm'deki milimolar ekstinksiyon katsayısı: 0.0436 mM⁻¹cm⁻¹
(0.0436 mM= 0.0436 mmol/L= 0.0000436 mmol/mL= 0.436 µmol/mL=43.6 nmol/mL)

$$\text{CAT aktivitesi (nmol/dk/mL)} = \frac{\Delta A}{43.6} \times \text{Küvet içi sulandırma} \left(\frac{V_t}{V_o} \right) \times \text{SO}$$

ΔA : Absorbansın 240 nm dalga boyunda dk başına değişimi

Vt: Toplam hacim

Vö: Örnek hacmi

SO: Süpernatant sulandırma oranı

Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 5 ölçüm yapıldı. Sonuçlar, tüketilen H_2O_2 (μmol)/dk/g protein olarak ifade edildi.

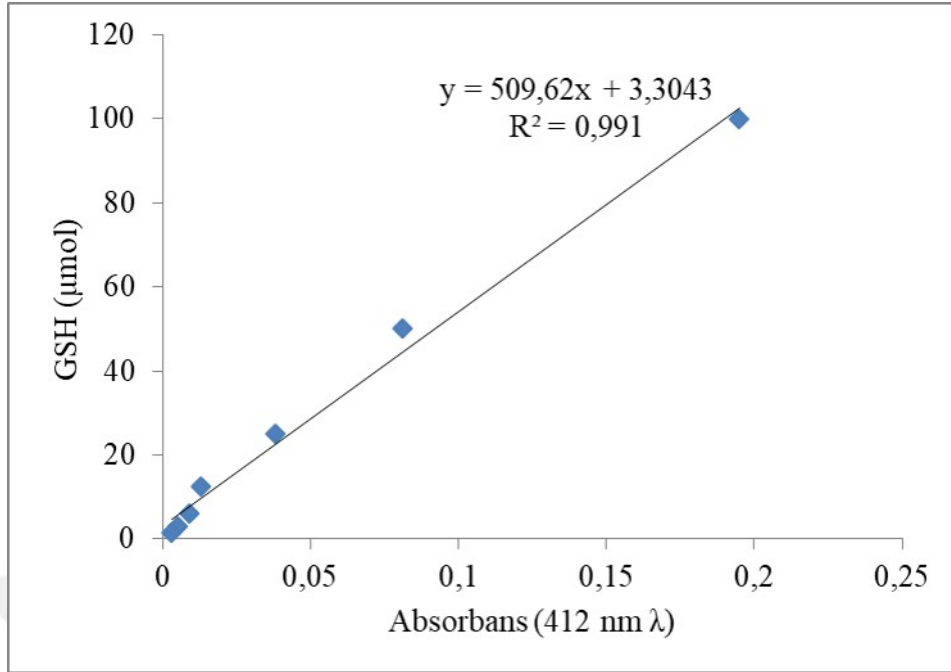
3.10.5. Redükte glutatyon tayini

Prensip: GSH içeriği, fosfat tamponu kullanılarak süpernatanttaki sülfidril gruplarının, 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı rengin absorbansının 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümüne, dayanmaktadır (Beutler, 1984).

Ayırıcılar:

1. Fosfat tamponu: 0.3 M NaH_2PO_4 distile su ile hazırlandı (pH: 6.8).
2. DTNB (Ellman Ayırıcı): 40 mg DTNB'nin, % 1'lik 100 mL sodyum sitrat çözeltisi içerisinde çözünmesi ile hazırlandı.

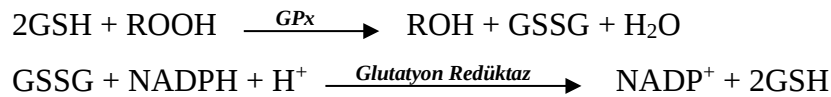
Yöntem: Tüplerin içerisine 200 μL süpernatantlardan alındıktan sonra üzerine 1 mL fosfat tamponu eklendi. Vortekslenen tüpler, sıcak su banyosunda 60 °C'de 10 dk bekletildi. Tüpler oda sıcaklığına getirildikten sonra her tüpe 200 μL DTNB ayırıcı eklenerek Shimadzu UV/VIS-1201 spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda, köre karşı okuma yapıldı. Standartlar için 100 μM GSH stok çözeltisi fosfat tamponu içerisinde taze olarak hazırlandı. Daha sonra stok çözeltisi seyreltilerek 6.25 μM ile 400 μM konsantrasyon aralığında 7 adet standart hazırlandı. GSH standartlarına karşılık gelen absorbans değerlerinden oluşturulan standart eğri (Şekil 3.2)'ye göre örneklerdeki GSH konsantrasyonu hesaplandı. Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 5 ölçüm yapıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol} / \text{mg}$ protein olarak ifade edildi.



Şekil 3.2. GSH standart eğrisi

3.10.6. Glutasyon peroksidaz aktivitesi tayini

Prensip: GPx, GSH'ın kümen hidroperoksit (ROOH) ile oksidasyonunu katalizler. Oluşan oksidize glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz varlığında NADPH kullanılarak, NADP^+ 'ye ve GSH'a dönüştürülür. Absorbanstaki düşüş 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (Paglia ve Valentine, 1967).



Yöntem: GPx aktivitesi, Ransel kit (Randox Lab., İngiltere) kullanılarak ve kit protokollerine uyularak gerçekleştirildi. Kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları Çizelge 3.8'de, ölçüm sırasında küvet içine pipetlenen bileşenler ise Çizelge 3.9'da gösterilmiştir. Küvet içerisine süpernatanttan 20 μL bırakıldı ve üzerine 1000 μL reajan eklendi. Daha sonra bu karışıma 40 μL kümen hidroperoksit eklendi. Küvet iyice çalkalandıktan sonra, örneğin ve körün başlangıç absorbanısı, 340 nm dalga boyunda 37 °C'de, 1 dk sonra spektrofotometrik olarak ölçüldü. Absorbans okuması 1 dk ve 2 dk sonra tekrar edildi.

Hesaplama: GPx aktivitesi, kitte önerilen formülden ($U/L = 8412 \times \Delta A_{340}/dk$) yararlanılarak hesaplandı. Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 5 ölçüm yapıldı. Sonuçlar, U/g protein hücre olarak ifade edildi.

Çizelge 3.8. GPx kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları

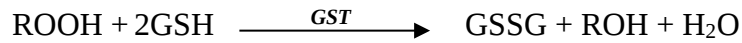
Kit İçeriği	İçerik bileşeni	Solüsyonların başlangıç konsantrasyonları
Reajan	GSH	4 mmol/L
	GR	≥ 0.05 U/L
	NADPH	0.34 mmol/L
Tampon	Fosfat Tamponu	0.05 mol/L, pH: 7.2
	EDTA	4.3 mmol/L
Kümen hidroperoksit		0.18 mmol/L

Çizelge 3.9. GPx aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları

Küvete pipetlenen bileşenler	Örnek (µL)	Kör (µL)
Örnek	20	----
Distile su	----	20
Reajan	1000	1000
Kümen hidroperoksit	40	40

3.10.7. Glutatyon-S-transferaz aktivitesi tayini

Prensip: GST, elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunu GSH'ın -SH grubu ile tepkimesini katalizleyerek sağlar. Enzim aktivitesi tayini, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'nin GSH ile konjugasyonu sırasında meydana gelen absorbans artışının, 340 nm dalga boyunda ve 25 °C'de, ölçülmesine dayanır (Habig ve ark., 1974).



Yöntem: Çizelge 3.10'da çözeltiler sırasıyla belirtilen miktarlarda küvete eklendikten sonra, küvet iyice çalkalandı. Daha sonra absorbanstaki artış 340 nm'de, 3 dk boyunca her 30 sn'de bir kaydedildi.

Çizelge 3.10. GST aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenlerin miktar ve konsantrasyonları

Küvete pipetlenen bileşen	Kör (mL)	Örnek (mL)	Son Konstrasyon (mM)
PBS (0.11 M)	2.7	2.7	100 mM
Distile su	0.1	-	-
CDNB (30 mM)	0.1	0.1	1 mM
GSH (30 mM)	0.1	0.1	1 mM
Süpernatant	-	0.1	-

Her örneğin absorbansındaki dk başına değişim (ΔA) belirlendikten sonra aşağıda verilen formüle göre, GST'nin molar ekstinksiyon katsayısı (9.6 mmol/L/cm) ve küvetteki sulandırma oranı hesaba katılarak, enzimin mL'deki aktivitesi belirlendi. Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 5 ölçüm yapıldı. Sonuçlar, nmol CDNB-glutasyon konjugatı/dk/mg protein olarak ifade edildi.

Hesaplama:

$$\text{GST aktivitesi (mmol/dk/L)} = \frac{\Delta A}{9.6} \times \frac{V_t}{V_o} \times \text{SO}$$

ΔA : Absorbansın 340 nm'de, dk başına değişimi

V_t : Toplam hacim

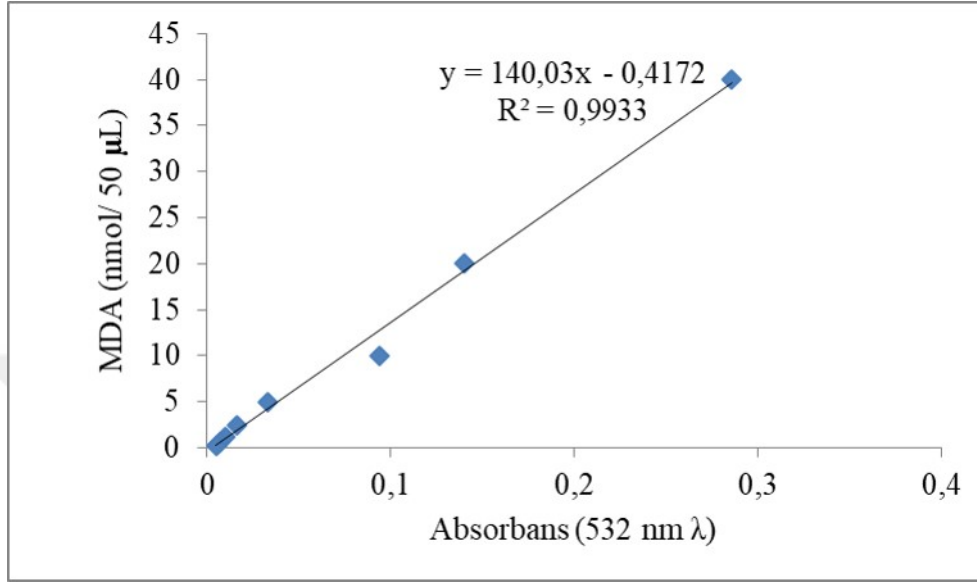
V_o : Örnek hacmi

SO: Süpernatant sulandırma oranı

3.10.8. Malondialdehit içeriği tayini

Yöntem: Yağ asitlerinin, serbest radikallerle reaksiyonu sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile pembe renkli forma girmesi prensibine dayanır (Buege ve Aust, 1978). MDA içeriği, Buege ve Aust (1978)'a göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kısaca; 0.1 mL of 150 mM Tris-HCl tamponu (pH: 7.1), 0.1 mL süpernatant üzerine eklendi. Daha sonra bu karışıma, 0.1 mL 1.5 mM askorbik asit ve 0.1 mL 1 mM FeSO₄ ilave edildi. Bu karışımın total hacmi, distile su ile 1 mL'ye tamamlandı. Bu bileşenlerin olduğu tüpler vortekslendikten sonra, 37 °C'de 15 dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra tüplere 1 mL trikloroasedik asit (%10) ve 2 mL TBA (%0.375) eklendi. Tüpler vortekslendikten sonra kaynar suda 15 dk'lığına inkübasyona bırakıldı. Tüpler oda sıcaklığına getirildikten sonra, 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Son olarak, elde edilen süpernatantlar kullanılarak, 532 nm dalga

boyunda, spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirildi (Çizelge 3.11). Örneklerdeki MDA konsantrasyonu, eksternal 1,1,3,3-tetraetoksipropan standartlarından türetilen standart eğri kullanılarak hesaplandı (Şekil 3.3). Sonuçlar, nmol/mg protein olarak sunuldu.



Şekil 3. 3. 1,1,3,3-tetraetoksipropan standartlarından türetilen standart eğri.

Çizelge 3.11. MDA ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler, miktarları ve ölçüm prosedürü

Ayırıştırıcılar	Numune (mL)	Standart (mL)	Kör (mL)
Numune	0.1	---	---
Kör	---	---	0.1
Standart	---	0.1	---
Tris-HCl tamponu (150 mM)	0.1	0.1	0.1
Askorbik asit çözeltisi (1.5 mM)	0.1	0.1	0.1
FeSO ₄ .7H ₂ O (1 mM)	0.1	0.1	0.1
Distile Su	0.6	0.6	0.6
Tüplere şekildeki gibi pipetleme yapıldıktan sonra tüpler karıştırıldı. Pipetlemeden sonra tüpler 37 °C'de 15 dk inkübe edildi.			
TCA (%10)	1	1	1
TBA Çözeltisi (%0,375)	2	2	2
Tüplere şekildeki gibi pipetleme yapıldıktan sonra tüpler vortekslendi. Tüpler vortekslendikten sonra kaynayan su banyosunda (95 °C) 15 dk bekletildi.			
Tüpler 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak, 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma yapıldı. Sonuçlar standart grafikten (Şekil 3.3) değerlendirilir.			

3.11. İstatistiksel Analizler

Çalışmadan elde edilen veriler, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 20.0 istatistik paket programı (IBM SPSS Statistics)'nda, varyans analizi (ANOVA) ile analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi için *post-hoc Duncan* çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Analizler sonucunda elde edilen veriler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel önem derecesi $P < 0.05$ olarak kabul edildi.





4. BULGULAR

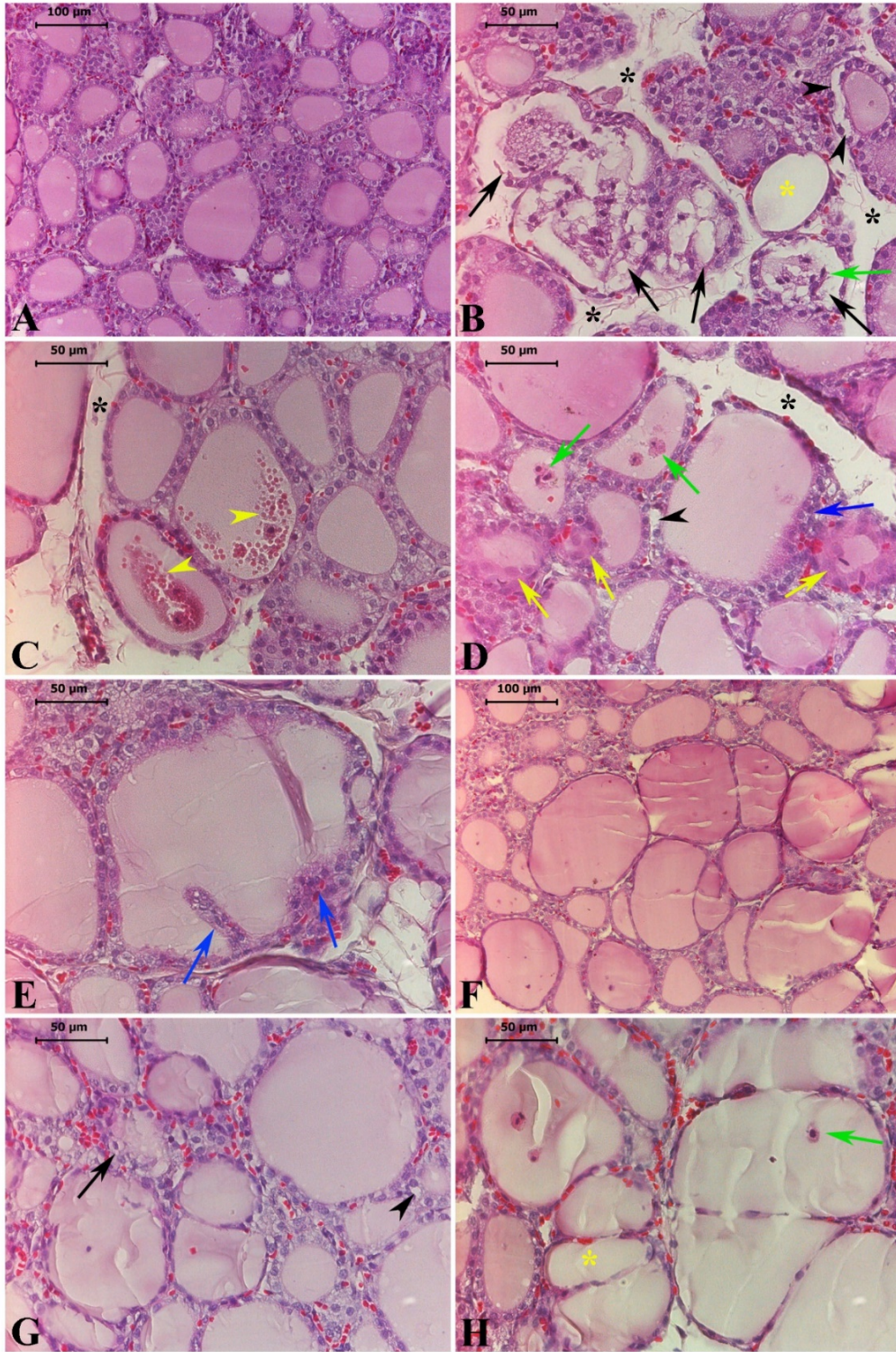
4.1. Histopatolojik Değişimler

Tiroid histolojisinin kontrol grubuna ait bireylerde normal yapılanma gösterdiği gözlemlendi. Bu gruba ait bireylerde tiroid foliküllerinin farklı büyüklüklerde olduğu, foliküllerin genellikle yuvarlak çekirdeğe sahip kübik epitel hücreleri ile çevrelendiği belirlendi. Geniş foliküllerin bezin dış bölgelerinde lokalize oldukları ve bu foliküllerde, folikül epitel hücrelerinin yassılaştığı gözlemlendi. Asidofilik boyanan kolloidin, folikül lümenlerinde homojen dağılım gösterdiği belirlendi (Şekil 4.1A).

BPS'ye maruz bırakılan hayvanların tiroid bezlerinde farklı tipte histopatolojik değişimlerin meydana geldiği gözlemlendi. BPS etkisi sonucunda meydana gelen histopatolojik değişimler; disorganize ve hasarlı foliküller (Şekil 4.1B, G), foliküller arasındaki interstisyel boşlukta artış (Şekil 4.1B, C, D), folikül hücrelerinde genişleme ve camsı sitoplazma ile karakterize edilen hidropik dejenerasyon (Şekil 4.1B, D, G), kolloid miktarının azaldığı veya hiç bulunmadığı foliküller (Şekil 4.1B, H), folikül hücrelerinin folikül lümenine doğru ayrılması ile karakterize edilen deskuamasyon (Şekil 4.1B, D, H), kolloidde eritrosit varlığı (Şekil 4.1C), folikül lümen çapında azalma ve folikül hücresi boyutunda artış ile karakterize edilen folikül hücre hipertrofisi (Şekil 4.1D), folikül epitelinin içe katlanması ve tabakalanması ile karakterize edilen fokal hiperplazisi (Şekil 4.1D, E), folikül hücrelerinin ve bunların çekirdeklerinin yassılaştığı genişlemiş foliküller (Şekil 4.1F, H), olarak belirlendi. Histopatolojik değişimler ve bu değişimlerin gruplarda gözlemlendiği birey sayıları Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Histopatolojik değişimler ve bunların gözlemlendiği birey sayıları

Histopatolojik değişim	Gruplar			
	Kontrol	BPS (20 mg/kg)	BPS (100 mg/kg)	BPS (500 mg/kg)
Hidropik dejenerasyon	0/7	2/7	2/7	2/7
Genişlemiş folikül	0/7	2/7	4/7	4/7
Folikül hücre hipertrofisi	0/7	0/7	1/7	1/7
Folikül hücre hiperplazisi (fokal)	0/7	1/7	1/7	1/7
Deskuamasyon	0/7	4/7	3/7	4/7
İnterstisyel boşlukta artış	0/7	2/7	1/7	1/7
Folikül lümeninde eritrositler	0/7	1/7	2/7	1/7
Hasarlı / disorganize foliküller	0/7	2/7	1/7	1/7
Kolloidde azalma	0/7	1/7	2/7	1/7



Şekil 4.1. BPS'ye maruz bırakılan ratların tiroid bezinde belirlenen histopatolojik değişimler (H&E). A: Kontrol grubu; B, C: BPS'nin 20 mg/kg dozu; D, E, F: BPS'nin 100 mg/kg dozu; G, H: BPS'nin 500 mg/kg dozu; siyah oklar: disorganize ve hasarlı foliküller; siyah asteriksler: interstisyel boşlukta artış; siyah okbaşıları: hidropik dejenerasyon; sarı asteriksler: kolloidde azalma; yeşil oklar: deskuamasyon; sarı ok başları: kolloidde eritrositler; sarı oklar: hipertrofi; mavi oklar: hiperplazi

4.2. BPS'nin Hormon Seviyeleri Üzerindeki Etkisi

BPS'nin, serum TSH, serbest T4 ve serbest T3 seviyeleri üzerindeki etkisi Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Buna göre BPS'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, serum TSH ve serum serbest T4 seviyelerinin, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı değişimler göstermediği belirlendi. Serum serbest T3 seviyelerinin ise BPS'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarının uygulandığı gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı düşüşler gösterdiği gözlemlendi ($p < 0.05$).

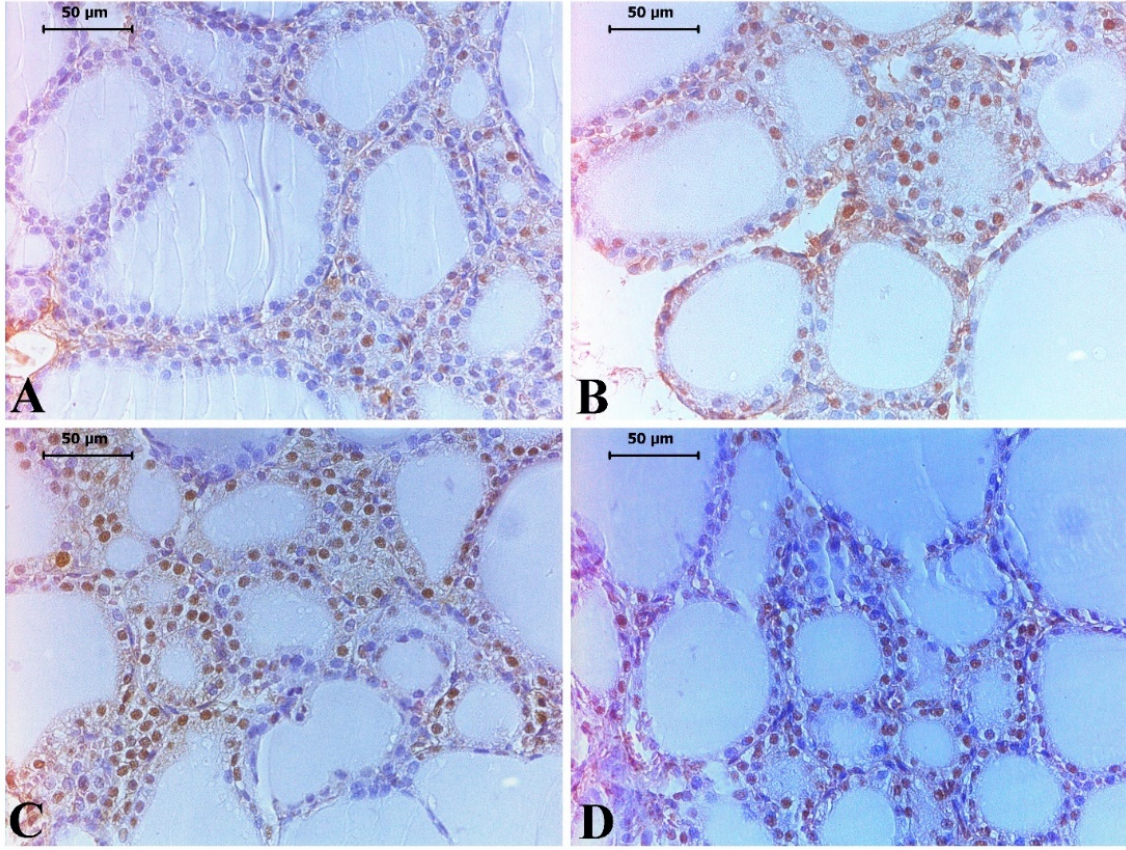
Çizelge 4.2. BPS'nin serum TSH, serum serbest T4 ve serum serbest T3 seviyeleri üzerindeki etkisi

Hormon	Kontrol	BPS (20 mg/kg)	BPS (100 mg/kg)	BPS (500 mg/kg)
TSH (μ LU/mL)	0.00021 $\pm$ 0.00019 ^a	0.00021 $\pm$ 0.00014 ^a	0.00010 $\pm$ 0.00004 ^a	0.00031 $\pm$ 0.00022 ^a
Serbest T₄ (ng/mL)	1.02 $\pm$ 0.07 ^a	1.02 $\pm$ 0.06 ^a	0.95 $\pm$ 0.08 ^a	1.01 $\pm$ 0.09 ^a
Serbest T₃ (pg/mL)	2.38 $\pm$ 0.06 ^a	2.19 $\pm$ 0.16 ^b	2.19 $\pm$ 0.19 ^b	1.78 $\pm$ 0.08 ^c

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur ($n = 7$). Değerler üzerindeki farklı üst simgeler, Duncan *post hoc* çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$).

4.3. BPS'nin Tiroid Folikül Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi

BPS'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan bireylerin tiroid bezlerinde, proliferasyon alan (PCNA-pozitif) folikül hücrelerinin varlığında kontrol grubuna göre, belirgin artışların olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2). Folikül hücresi proliferasyon indeksi ortalamalarının, BPS'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı artışlar olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Çizelge 4.3).



Şekil 4.2. İmmunohistokimya yöntemi ile işaretlenen PCNA pozitif tiroid folikül hücreleri. A: Kontrol grubu; B: BPS'nin 20 mg/kg dozu; C: BPS'nin 100 mg/kg dozu; D: BPS'nin 500 mg/kg dozu

Çizelge 4.3. BPS'nin tiroid folikül hücrelerinde proliferasyon indeks değerleri üzerindeki etkisi

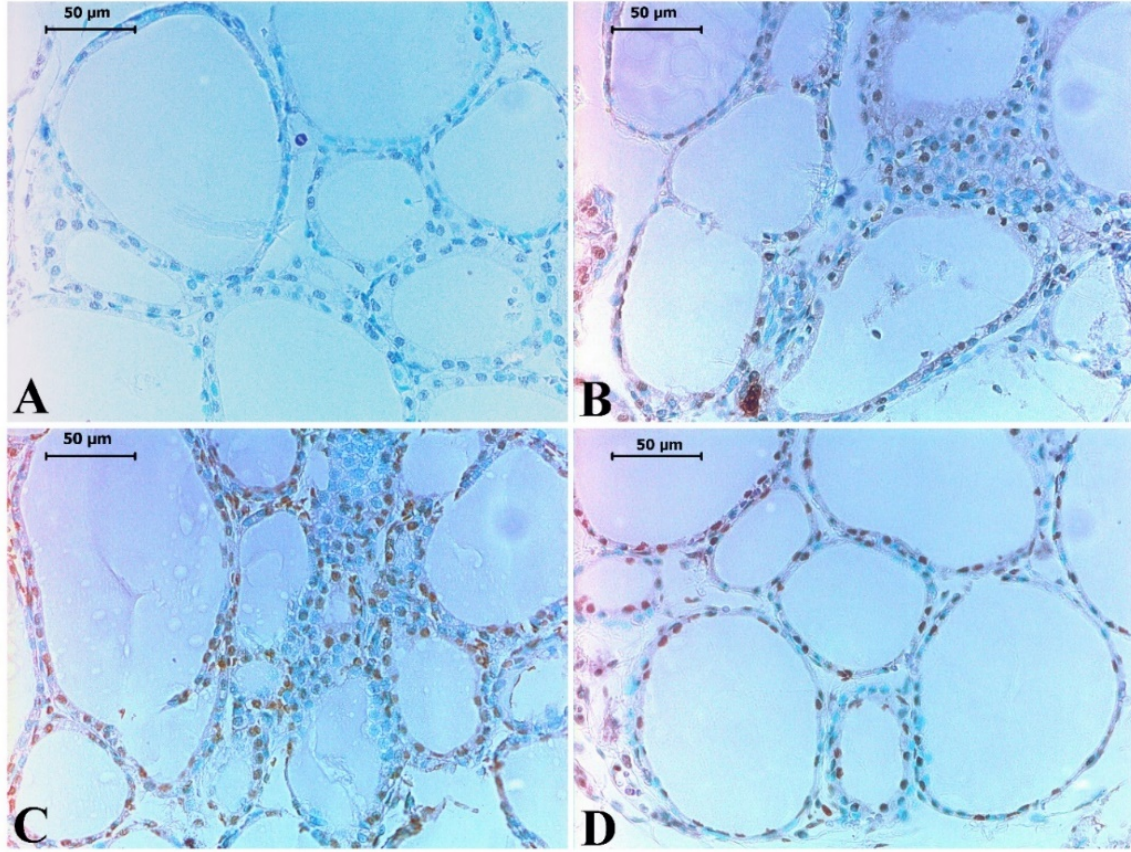
Grup	Kontrol	BPS (20 mg/kg)	BPS (100 mg/kg)	BPS (500 mg/kg)
Proliferasyon indeksi (%)	13.05 ± 1.47 ^c	22.75 ± 9.78 ^b	31.23 ± 5.81 ^a	15.25 ± 9.26 ^{bc}

Değerler, ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (n = 7). Değerler üzerindeki farklı üst simgeler, Duncan *post hoc* çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir (p < 0.05).

4.4. BPS'nin Tiroid Folikül Hücre Apoptozu Üzerindeki Etkisi

Kontrol grubuna ait bireylerin tiroid bezlerinde apoptotik (TUNEL-pozitif) folikül hücrelerin, seyrek oldukları belirlendi ancak BPS'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan bireylerin tiroid bezlerinde, apoptotik (TUNEL-pozitif) folikül hücrelerin varlığında gözle görülür artışların olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3). Apoptotik folikül hücre indeks ortalamalarının, BPS'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan

gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, artışlar gösterdiği ve bu artışların BPS'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Çizelge 4.4).



Şekil 4.3. TUNEL yöntemi ile işaretlenen apoptotik (TUNEL pozitif) tiroid folikül hücreleri. A: Kontrol grubu; B: BPS'nin 20 mg/kg dozu; C: BPS'nin 100 mg/kg dozu; D: BPS'nin 500 mg/kg dozu

Çizelge 4.4. BPS'nin tiroid folikül hücrelerinde apoptotik indeks değerleri üzerindeki etkisi

Grup	Kontrol	BPS (20 mg/kg)	BPS (100 mg/kg)	BPS (500 mg/kg)
Apoptotik indeks (%)	6.88 ± 2.32^b	10.72 ± 4.31^b	13.90 ± 3.22^{ab}	18.36 ± 10.92^a

Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur ($n = 7$). Değerler üzerindeki farklı üst simgeler, Duncan *post hoc* çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$).

4.5. BPS'nin Tiroid Bezinde Antioksidan Savunma Sistem Belirteçleri Üzerindeki Etkisi

BPS'nin, tiroid bezi antioksidan savunma sistem indikatörleri üzerinde oluşturduğu etkiler, Çizelge 4.5.'da gösterilmiştir. SOD ve CAT aktivitelerinin BPS'nin 20 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği gözlemlendi ($p < 0.05$). GPx ve GST aktivitelerinin BPS'nin 500 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttıkları belirlendi ($p < 0.05$). Redükte GSH içeriğinin BPS'nin 20 ve 100 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($p < 0.05$) ancak BPS'nin 500 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta değişmediği gözlemlendi. MDA düzeyinin BPS'nin 500 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği ($p < 0.05$) ancak diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı değişimler göstermediği belirlendi.

Çizelge 4.5. BPS'nin tiroid bezinde antioksidan savunma sistem belirteçleri üzerindeki etkisi

Belirteç	Kontrol	BPS (20 mg/kg)	BPS (100 mg/kg)	BPS (500 mg/kg)
SOD (U/mg protein)	0.79 ± 0.10 ^c	1.59 ± 0.47 ^b	0.84 ± 0.63 ^c	2.16 ± 0.56 ^a
CAT (µmol/dk/g protein)	1.94 ± 0.54 ^b	4.89 ± 0.46 ^a	1.81 ± 1.25 ^b	4.68 ± 1.49 ^a
GPx (U/g protein)	76.00 ± 12.36 ^b	131.36 ± 48.81 ^b	108.04 ± 42.23 ^b	257.38 ± 75.33 ^a
GST (nmol/dk/mg protein)	31.82 ± 4.87 ^b	53.51 ± 26.80 ^b	42.79 ± 16.17 ^b	85.63 ± 31.07 ^a
GSH (µmol/mg protein)	94.89 ± 33.20 ^a	85.39 ± 24.85 ^{ab}	54.31 ± 17.55 ^b	115.04 ± 48.18 ^a
MDA (nmol/mg protein)	78.70 ± 11.26 ^b	121.39 ± 41.03 ^b	96.59 ± 24.60 ^b	207.61 ± 74.18 ^a

Değerler, ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur ($n = 7$). Değerler üzerindeki farklı üst simgeler, Duncan *post hoc* çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

BPA'nın endüstriyel uygulamalardaki kullanımı, endokrin bozucu ve toksik etkilerinden dolayı, birçok ülkede yasaklanmıştır. BPS, günlük hayatta kullanılan termal kağıt ve plastikler gibi birçok ürünün üretiminde, BPA'nın yerine alternatif olarak kullanılan, bir bisfenol türevidir. BPS, insan vücut sıvılarından ev içi tozlara, atık sulardan sedimentlere, konserve gıdalardan musluk suyuna kadar çok farklı ortamlarda tespit edilmiştir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, BPS'nin akut toksisite, genotoksisite ve östrojenik aktivite açısından BPA'ya benzer etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Chen ve ark., 2002; Grignard ve ark., 2012; Molina-Molina ve ark., 2013; Vinas ve Watson, 2013a, 2013b; Teng ve ark., 2013; Rajasarkka ve ark., 2014; Rosenmai ve ark., 2014; Eladak ve ark., 2015; Sur ve ark., 2017; İyigündoğdu ve ark., 2020). Bazı *in vitro* çalışmalarda ise, BPS'nin anti-androjenik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Kitamura ve ark., 2005; Molina-Molina ve ark., 2013; Eladak ve ark., 2015). BPS'nin sitotoksik, mutajenik, apoptozu uyarıcı ve DNA hasarı oluşturuvcu etkileri de *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (Fic ve ark., 2013; Lee ve ark., 2013; Vinas ve Watson, 2013a, 2013b; Mathew ve ark., 2014; Peyre ve ark., 2014; Salvesen ve Walsh, 2014; Eladak ve ark., 2015; Feng ve ark., 2016). Ratlar ile yapılan deneysel çalışmalarda ise BPS'nin hepatotoksik olduğu (Zhang ve ark., 2018) ve erkek üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu belirlenmiştir (Ullah ve ark., 2016; Ullah ve ark., 2018). Bununla birlikte, BPS'nin ratların tiroid bezi üzerinde nasıl bir etki gösterdiğine dair literatürde herhangi çalışma ile karşılaşılammıştır. Bu nedenle bu çalışmada, BPS'nin *Wistar albino* erkek ratların tiroid bezinde meydana getirdiği yapısal, fonksiyonel ve biyokimyasal değişimlerin araştırılması ve literatürdeki boşluğun doldurulması amaçlanmıştır.

BPS'ye maruz bırakılan ratlarda yapılan histolojik incelemeler sonucunda, BPS'nin tiroid bezinde, belirgin ve farklı tipte histopatolojik değişimler meydana getirdiği, gözlemlendi. Maruziyet sonrasında, bezdeki bazı foliküllerin hasar gördüğü ve hasarlı foliküllerde folikül epitel hücrelerinin lümene doğru döküldüğü gözlemlendi. Bezde ayrıca, foliküller arasındaki interstisyel boşlukta artış, folikül hücrelerinde hidropik dejenerasyon, bazı foliküllerde kolloid miktarında azalma veya kolloidin bulunmaması, kolloidde eritrosit ve lökositlerin varlığı, folikül hücre hipertrofisi, fokal hiperplazi ve

genişlemiş foliküller gibi histopatolojik değişimler belirlendi. Literatürde, BPS'nin rat tiroid bezi üzerinde oluşturduğu yapısal değişimleri ele alan herhangi bir deneysel çalışma bulunmamaktadır ancak bu çalışmadaki gözlemler ile uyumlu olarak BPA'nın, ratların tiroid dokusunda histolojik değişimler meydana getirdiği, farklı deneysel çalışmalar ile ortaya konmuştur (Alkalby, 2015; Ahmed, 2016; Da Silva ve ark., 2018; Manal ve Ibrahim, 2019). Alkalby (2015), BPA'ya maruz bırakılan ratların tiroid bezinde, vakuollü kolloid, tiroositlerde yassılaşma ve mikrofolikül sayısında artış gibi histopatolojik değişimler gözlemlemiştir. BPA'ya maruz bırakılan gebe ratların fötüslerinin tiroid bezinde, fibroblast proliferasyonu, hiperplazi, luminal obliterasyon, ödem ve dejenerasyon gibi histopatolojik değişimlerin, meydana geldiği bildirilmiştir (Ahmed, 2016). Farklı bir çalışmada ise BPA'nın, rat tiroid dokusunda, yassı epitel hücreleri ile döşeli ve etraflarında bağ dokusunun artış gösterdiği hipoaktif foliküllerin sayısında artışa neden olduğu ifade edilmiştir (Da Silva ve ark., 2018). Manal ve Ibrahim (2019) ise BPA maruziyetinin, ratların tiroid bezinde, çekirdeği koyu boyanan vakuollü folikül hücrelerinde artışa, kolloidde vakuolizasyona, interfoliküler boşlukta genişlemiş ve kongesyon gösteren kapillerlere, mikrofolikül sayısında artışa ve folikül epitel hücrelerinin kolloid lümenine doğru dökülmesine yol açtığını bildirmişlerdir. Endokrin bozucu karaktere sahip olan farklı sınıftaki kimyasalların, örneğin ağır metallerin (Wade ve ark., 2002; Salah ve ark., 2022), bir plastikleştirici olan dietilheksil fitalatın (Ye ve ark., 2017), bir karbamat pestisit olan karbofuranın (Hadie ve ark., 2012), 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin ile dioksin benzeri bileşiklerin (Yoshizawa ve ark., 2010), zirai bir pestisit olan p,p'-DDT'nin (Tebourbi ve ark., 2010), poliklorlu bifeniller (Kılıç ve ark., 2005) ve organotin bir bileşik olan tributiltinin (Badr El Dine ve ark., 2017) ratların tiroid bezinde, bu çalışmadakine benzer yapısal değişimlere yol açtıkları belirlenmiştir.

Bu çalışmada BPS'nin, serum serbest T4 ve TSH düzeylerinde anlamlı değişimlere yol açmadığı ancak serum serbest T3 düzeyinde anlamlı azalışlara neden olduğu belirlendi. Literatürde BPS'nin ratlarda tiroid fonksiyonu ile ilişkili hormon seviyeleri üzerindeki etkilerine dair yapılmış olan herhangi bir deneysel çalışma ile karşılaşılmamıştır. Bununla birlikte BPA'nın, ratlarda serum TSH ile tiroid hormonları üzerinde değişiklik meydana getirdiği farklı deneysel çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Alkalby (2015), BPA'nın erişkin erkek ratlarda (*Rattus norvegicus*) serum TSH ile T3

düzeyleri üzerinde herhangi bir değişime yol açmadığını ancak serum T4 düzeyini anlamlı bir şekilde azalttığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada ise BPA'ya maruz bırakılan *Wistar albino* erkek ratlarda serum T4 ile T3 seviyelerinin anlamlı azalışlar gösterdiği, serum TSH düzeyinin ise arttığı ifade edilmiştir (Manal ve Ibrahim, 2019). BPA maruziyetinin *Wistar albino* dişi ratlarda ise serum T4 seviyesinde artışa neden olduğu, T3 düzeyini değiştirmediği ve hipofiz bezindeki β -TSH mRNA ekspresyon düzeyinde azalmaya yol açtığı ifade edilmiştir (Da Silva ve ark., 2018). Ahmed (2016), BPA'nın *Wistar albino* gebe ratlarda ve bunlarında fötüslerinde ise serum TSH düzeyini, serum T4 ve T3 düzeylerindeki düşüşler ile ilişkili olarak, artırdığını rapor etmiştir. Öte yandan, erişkin zebra balığında yapılan deneysel çalışmalar, BPS'nin de BPA'ya benzer olarak, plazma tiroid hormon düzeylerinde değişimler meydana getirdiğini göstermiştir. BPS'nin zebra balığının F0 jenerasyonu dişi bireylerinde plazma T4 düzeyini azalttığı, bununla birlikte hem F0 dişi hem de F0 erkek bireylerde plazma T3 düzeyini artırdığı gözlenmiştir. Ek olarak, F1 jenerasyonu yumurtalarda yapılan analizlerde, tiroid hormon içeriğinin, F0 dişilerdeki değişimlere benzer olduğu, dolayısıyla BPS'nin maternal transfer yolu ile endokrin bozuluma yol açabildiği bildirilmiştir (Wei ve ark., 2018). BPS'nin zebra balığı larvasında, hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı ile ilişkili anahtar genleri etkilediği ve tiroid hormon metabolizmasında rol oynayan bazı genlerin (deiyodinaz-I, deiyodinaz-II ve glukoronoziltransferaz ugt1ab) mRNA ekspresyonlarında değişimlere neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmada BPS maruziyeti sonrasında larvalarda, serum T4 ile T3 düzeylerinin arttığı, TSH düzeyinin ise azaldığı ifade edilmiştir (Zhang ve ark., 2017). Çalışmamızdan ve yukarıda belirtilen deneysel çalışmalardan elde edilen bulgular göstermektedir ki, BPS'nin de BPA gibi tiroid bezi üzerinde endokrin bozuluma yol açma potansiyeli mevcuttur. Çalışmamızda BPS maruziyeti sonrasında, serum TSH düzeyinde anlamlı bir değişim meydana gelmediği belirlendi. Benzer olarak, dietil heksilfitalata maruz bırakılan ratlarda serum T4 ile T3 düzeylerinde anlamlı azalışlar olmasına rağmen serum TSH düzeyinin değişmediği, bu durumun da, hipotalamus-hipofiz-tiroid aksının negatif geri bildirim mekanizmasında meydana gelen bir bozulma sonucunda ortaya çıkmış olabileceği, ifade edilmiştir (Ye ve ark., 2017). Serum T4 seviyesinde azalma olmasına rağmen, TSH düzeyinde değişimin meydana gelmediği bir durum, heksaklorobenzen maruz bırakılan ratlarda da gözlenmiştir (Chiappini ve ark., 2009). Çalışmamızda ayrıca, serum T4 düzeyinin değişmemesine karşılık, T3 düzeyinin azaldığı

gözlemlendi. Yapılan bir *in vitro* çalışmada, BPA'nın T3 tarafından uyarılan transkripsiyonel aktiviteyi baskıladığı, dolayısıyla T3 üzerinde antagonistik etki yarattığı ve farklı nuklear hormon reseptör tipleri ile bunların kofaktörlerinin fonksiyonlarını bozabildiği bildirilmiştir (Moriyama ve ark., 2002). *Pelophylax nigromaculatus* iribaşları ile yapılan *in vivo* bir çalışmada ise, BPS'nin de BPA'ya benzer şekilde, tiroid hormon sinyal yolakını engelleyebildiği; örneğin T3 yokluğunda tiroid hormonlarının sinyal uyarımını aktive ettiği, ancak tiroid hormonlarının varlığında, agonistik ve antagonistik etkiler meydana getirdiği belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2018). Öte yandan, yapılan başka bir çalışmada BPA'nın *in vitro*'da deiyodinaz-I ile deiyodinaz-II'yi inhibe ettiği, *in vivo*'da ise sadece hepatik deiyodinaz-I aktivitesini azalttığı gözlenmiştir. Ek olarak, ratlarda gözlenen hepatik deiyodinaz-I aktivitesindeki azalma ile birlikte serum T4 düzeyinin arttığı, T3 düzeyinin değişmediği ve T3/T4 oranının azaldığı ifade edilmiştir (Da Silva ve ark., 2019). Dolayısıyla, çalışmamızda serum T3 düzeyinde belirlenen azalışlar, BPS'nin BPA'ya benzer olarak deiyodinaz-I üzerindeki muhtemel inhibe edici etkisinden dolayı meydana gelmiş olabilir ancak net bir ifade için daha ayrıntılı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, gerek BPA'nın, gerekse bizim çalışmamız da dahil BPS'nin kullanıldığı farklı çalışmalarda, her iki bisfenolün serum TSH, T4 ve T3 düzeyleri üzerinde farklı etkiler ortaya çıkardıkları, yukarıda sözü edilen çalışmalardan, anlaşılmaktadır. Bu durum, kullanılan deney hayvanının ırkı ve cinsiyeti ile test kimyasalının konsantrasyonu, uygulama şekli ve uygulama süresinden kaynaklanabilir.

Çalışmamızda bütün BPS dozlarının, tiroid folikül hücre proliferasyon indeksi üzerinde, anlamlı artışlara neden olduğu belirlendi. Antitiroid ilaçlar (propiltiourasil (PTU), metimazol) ve fenobarbital, ratlarda T4'ün biyotransformasyonunu ve eliminasyonunu artırarak, TSH düzeyinin yükselmesine neden olurlar. Bu mikrozomal enzim uyarıcılarının etkisi ile artan serum TSH düzeyi, sırasıyla tiroid bez fonksiyonunu ve tiroidin büyümesini uyarırlar. Sonuç olarak, tiroid bezinde neoplaziler ortaya çıkar (Hood ve ark. 1999a ve 1999b). Serum TSH düzeyinde artışa sebep olan mikrozomal enzim uyarıcılarının (fenobarbital ve pregnenolon-16 α -karbonitril) tiroid folikül hücre proliferasyonunu artırdıkları fakat serum TSH düzeyinde artışa sebep olmayan mikrozomal enzim uyarıcılarının (3-metilkolantren ve Aroklor 1254 (PCB)) tiroid folikül hücre proliferasyonunu artırmadıkları belirlenmiştir. Ek olarak, fenobarbital ve pregnenolon-16 α -karbonitril etkisi ile meydana gelen TSH düzeyindeki küçük artışların

tiroid folikül hücre proliferasyonunda büyük artışlar meydana getirebildikleri gözlenmiştir. Bununla birlikte, folikül hücre proliferasyonundaki bu dramatik artışların, tiroid folikül hücrelerinin totalinde anlamlı bir yükselmeye (hiperplazi) neden olmadığı ifade edilmiştir (Hood ve ark., 1999b, Klaassen ve Hood, 2001). Ratların mikrozomal enzim uyarıcılarına maruziyeti sonrasında, tiroid folikül hücrelerinin totalinde meydana gelen proliferasyonun, sınırlı olmasının nedeninin ise folikül hücrelerindeki apoptozun artışından kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Kolaja ve ark., 1999; Klaassen ve Hood, 2001). Çalışmamızda BPS'nin serum TSH düzeyinde anlamlı değişimlere yol açmadığı ve TSH düzeyinde artışa neden olmayan mikrozomal enzim uyarıcılarının aksine, tiroid folikül hücre proliferasyon indeksini artırdığı belirlendi. Östrojen reseptörlerinin tiroid dokusundaki varlığı, geçmişte yapılan immunohistokimya ve reseptöre bağlanma ölçüm çalışmaları ile ortaya konulmuştur (Clark ve ark., 1985; Chaudhuri ve ark., 1986; Giani ve ark., 1993; Inoue ve ark., 1993; Yane ve ark., 1994). *In vivo* ve *in vitro*'da yapılan bazı deneysel çalışmalarda ise östrojenik ve östrojen uyarımı yapan ilaçların, tiroidin büyümesinde etkili oldukları ve tiroid folikül hücrelerinin proliferasyonunu tetikleyebildikleri belirlenmiştir (Manole ve ark., 2001; Banu ve Aruldas, 2002; Banu ve ark., 2001; 2002a, 2002b; Araujo ve ark., 2006). Östrojen ve tamoksifen uygulamasının, ovariyektomi yapılmış ratlar ile ovariumu çıkartılmamış östrus dönemindeki ratlarda, TSH düzeyinde düşüşler olmasına rağmen, tiroid folikül hücre proliferasyonunu anlamlı olarak artırdıkları belirlenmiştir (Araujo ve ark., 2006). Dolayısıyla BPS'nin TSH düzeyinde bir artışa sebep olmaksızın, tiroid folikül hücre proliferasyonunu artırıcı etkisi, bu kimyasalın östrojenik potansiyeli ile ilişkili olarak meydana gelmiş olabilir ancak BPS'nin bu etkisinin altında yatan nedenlerin net olarak belirlenebilmesi için daha detaylı çalışmaların yapılması gerekir.

BPS'nin tiroid folikül hücrelerinde apoptotik indeksi, doz artışı ile birlikte, artırdığı gözlemlendi. Düşük iyot diyeti ile birlikte östrojenik propiltiourasile maruz bırakılan ratlarda, guatr formasyonu sırasında, tirosit apoptozunun arttığı bildirilmiştir. Guatrlı ratlara yüksek iyot içerikli besin verilerek meydana getirilen guatr involüsyonunun erken safhasında ise, apoptotik folikül hücre miktarının yine yükseldiği ifade edilmiştir. Guatr formasyonu sırasında, PCNA-pozitif hücre/TUNEL-pozitif hücre oranının ise anlamlı bir şekilde arttığı ancak özellikle de guatr involüsyonunun geç safhasında azalmaların olduğu gözlenmiştir. Elde edilen veriler, guatr formasyonu ile

involüsyonu sırasında meydana gelen hücre kaybı için temel faktörün, tiroisit apoptozu olduğunu ve Fas/FasL sisteminin apoptoz uyarımında önemli role sahip olduğunu ortaya koymuştur. Öte yandan, apoptoz ile hücre proliferasyonu arasındaki ince dengenin, tiroid kitlesinin kontrolünü sağlamada önemli bir rol oynayabileceği ifade edilmiştir (Tamura ve ark., 1998). Kolaja ve ark. (1999), mikrozomal enzim (UDP-GT) uyarıcılarının, TSH düzeyinde meydana getirdikleri artışın muhtemel bir sonucu olarak, tiroid bezinde transforme edici büyüme faktörü- β_1 (TGF- β_1) ekspresyonu ile apoptozu uyardığını, bu etkinin ise tiroid hipertrofisi ve hiperplazisini kompanse etmek için ortaya çıkabileceğini bildirmişlerdir. Farklı bir çalışmada ise bir mikrozomal enzim uyarıcı olan heksaklorobenzen maruz bırakılan ratlarda, TSH düzeyinde bir artış olmaksızın, tiroid folikül hücrelerinde TGF- β_1 gen ekspresyonunun ve apoptozun arttığı belirlenmiştir. Böyle bir etkinin ise tiroid hormon homeostazisindeki bozucu etkilerden ziyade, heksaklorobenzenin bez üzerindeki direkt etkileri sonucunda meydana gelebileceği speküle edilmiştir (Chiappini ve ark., 2009). Yukarıda söz edilen çalışmalara benzer olarak, çalışmamızda BPS maruziyeti sonucunda tiroid foliküllerinde belirlenen apoptotik hücre sayısındaki artış, bezde hücre sel dengenin korunması ile BPS'nin tiroid folikül hücreleri üzerindeki direkt etkisi sonucunda meydana gelmiş olabilir. Öte yandan, tiroid bezinde meydana gelen apoptoz ve fonksiyon bozuklukları ile oksidatif stres arasında bağlantı olabileceği bildirilmiştir (Kochman ve ark., 2021; Li ve ark., 2021). Dolayısıyla, BPS maruziyeti sonrasında tiroid folikül hücrelerinde gözlenen apoptotik folikül hücre artışı, BPS'nin bezde meydana getirdiği oksidatif stres sonucunda da meydana gelmiş olabilir.

Geçmişte yapılmış olan farklı çalışmalar, BPA ve yapısal analoglarının neden olduğu toksisite ile reaktif oksijen türlerindeki artış arasında yakın bir ilişki olduğu ifade edilmiştir ve bisfenollere maruz kalmanın bir sonucu olarak dokularda oksidatif stresin uyarıldığı bildirilmiştir (Meli ve ark., 2020; Steffensen ve ark., 2020). BPS'nin oksidatif stresi uyarıcı etkisi, kırmızı kan hücreleri (Maćczak ve ark., 2017), RWPE-1 hücreleri (Köse ve ark., 2020), fare karaciğer ve böbrek hücreleri (Zhang ve ark., 2016) ve balık hepatositleri (Kaptaner ve ark., 2021) gibi farklı hücre tiplerinin kullanıldığı *in vitro* çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Fare ve ratların kullanıldığı *in vivo*'da yapılan deneysel çalışmalar da ise, BPS'nin karaciğer (Zhang ve ark., 2018) ve testis (Ullah ve ark., 2016; Ullah ve ark., 2018) dokularında oksidatif stresi arttırdığı bildirilmiştir. Öte yandan

literatürde BPS'nin, tiroid dokusunda antioksidan sistem göstergeleri üzerindeki etkisine dair yapılmış olan herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bununla birlikte, BPA'nın rat tiroid hücre hattında (PCCL3 hücreleri) ve tiroid dokusunda H_2O_2 oluşumunu indükleyerek oksidatif stresi uyardığı bildirilmiştir (Da Silva ve ark., 2018). Çalışmamızdan elde edilen veriler, BPS'nin tiroid dokusunda antioksidan sistem enzimlerini (SOD, CAT, GPx ve GST) indüklediğini, GSH düzeyini düşürdüğünü ve MDA seviyesinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, BPS'nin tiroid bezindeki toksik etkisini, antioksidan dengeyi bozucu potansiyeli ile meydana getirdiğini ortaya koymaktadır. Aerobik organizmalarda üretilen primer ROS, süperoksit radikalidir. SOD, süperoksit anyon radikalının, daha az toksik etkiye sahip olan H_2O_2 ile suya dismutasyonunu gerçekleştirir ve bu enzim, antioksidan savunmanın ilk basamağını oluşturur (Abd El-Twab ve Abdul-Hamid, 2016; Salah ve ark., 2022). Bu çalışmada, BPS'nin tiroid SOD aktivitesinde, anlamlı artışlara yol açtığı belirlendi. Benzer olarak, BPA'nın fare karaciğerinde SOD aktivitesini yükselttiği bildirilmiştir (Kabuto ve ark., 2003). BPA ve yapısal analogu olan BPF'ye, *in vitro*'da maruz bırakılan balık hepatositlerinde ise, bu çalışmada elde edilen bulgular ile uyumlu olarak, SOD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Kaya ve Kaptaner, 2016; Aykut ve Kaptaner, 2021). Dolayısıyla, SOD aktivitesinde gözlenen artışlar, süperoksit anyon radikal düzeyindeki yükselmeler sonucunda meydana gelmiş olabilir (Kabuto ve ark., 2003). SOD aktivitesi sonucunda meydana getirilen H_2O_2 daha sonra CAT tarafından, moleküler oksijen ve suya indirgenir. Bu mekanizma doyduğunda ise, antioksidan enzim savunmasının ikinci basamağında yer alan GPx aktive olur (Piper ve ark., 1995; Yu ve ark., 2007). Bu çalışmada, CAT aktivitesinde gözlenen artışlar ile uyumlu olarak, BPS'ye *in vitro*'da maruz bırakılan fare karaciğer ve böbrek hücrelerinde, CAT aktivitesinin yükseldiği gözlenmiştir. Araştırmacılar, BPS'nin bu enzimin substrat kanalı üzerinde bulunan Gly 117 rezidüsü ile etkileşerek yapısında değişikliğe yol açtığını ve aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir (Zhang ve ark., 2016). Yine daha önce yapılmış olan başka bir *in vitro* çalışmada, BPS'nin gökkuşağı alabalığından izole edilen hepatositlerde, CAT aktivitesini uyardığı bildirilmiştir (Kaptaner ve ark., 2021). Selenyum içeren GPx, yüksek derecede sitotoksik olan lipid peroksitlerin ve diğer organik hidroperoksitlerin indirgenmesini, GSH'ı kofatör olarak kullanarak, meydana getirir (Łukaszewicz-Hussain, 2003). Bu çalışmada tiroid dokusunda gözlenen GPx aktivitesindeki artış, H_2O_2 ve diğer

hidroperoksitlerin seviyesindeki yükselmenin sonucunda, enzimin nötralize edici ve membran hasarını önleyici rolüne bağlı olarak meydana gelmiş olabilir (Sabry ve ark., 2022). Benzer olarak, BPA'ya maruz bırakılan farelerin böbrek dokusunda GPx aktivitesinin arttığı, bildirilmiştir (Kabuto ve ark., 2014). Ayrıca, bu çalışmadaki bulgulara paralel olarak GPx aktivitesinin, BPS ve BPF'ye *in vitro*'da maruz bırakılan balık hepatositlerinde arttığı belirlenmiştir (Kaya ve Kaptaner, 2016; Aykut ve Kaptaner, 2021; Kaptaner ve ark., 2021). Bir faz-II enzimi olan GST, elektrofilik merkezlere sahip olan zenobiyotiklere GSH'ı konjuge ederek bunların detoksifiye edilmesini gerçekleştirir (Li, 2009). Çalışmamızda, BPS'nin tiroid bezinde GST aktivitesini uyardığı gözlemlendi. GST aktivitesinin, BPA'ya maruz bırakılan tavuk embriyolarının karaciğer dokusunda, diğer antioksidan enzimler (SOD, CAT ve GPx) ile birlikte artış gösterdiği belirlenmiştir (Sravani ve ark., 2015). BPA uygulanan ratların kalp dokusunda da GST aktivitesinin yükseldiği bildirilmiştir (Aboul Ezz ve ark., 2015). Yapılan *in vitro* bir çalışmada, BPS maruziyetinin hepatositlerde GST aktivitesini uyardığı gözlemlenmiştir (Kaptaner ve ark., 2021). GSH, zenobiyotiklere direkt olarak bağlanarak, onların detoksifiye ve metabolize edilmelerini gerçekleştiren bir tripeptiddir. GSH'ın seviyesindeki artış ve azalışlar oksidatif stresin bir göstergesidir (Meister ve Anderson, 1983). Çalışmamızda tiroid GSH düzeyinde azalmaların olduğu belirlendi. BPS maruziyeti sonucunda artan ROS'ların detoksifiye edilmesi için GSH'ın aşırı bir şekilde tüketilmesi, böyle bir etkiye sebep olabilir (Salah ve ark., 2022). Öte yandan, GSH'ı kofaktör olarak kullanan GPx ve GST'nin aktivitesindeki yükselmeler de, GSH havuzunda azalmalara neden olabilir (Aboul Ezz ve ark., 2015). Bu çalışmadakine benzer olarak düşük GSH seviyeleri, BPA'ya maruz bırakılan ratların karaciğer (Korkmaz ve ark., 2010; Abdel-Wahab, 2014), beyin (Aydoğan ve ark., 2008), testis (Kabuto ve ark., 2003) ve pankreas (Özaydın ve ark., 2018) gibi farklı dokularında da gösterilmiştir. Diğer taraftan, BPA'nın rat karaciğerinde, GSH sentezinde rol oynayan glutatyon redüktaz aktivitesini anlamlı bir şekilde düşürdüğü rapor edilmiştir (Bindhumol ve ark., 2003). Dolayısıyla BPS, BPA'ya benzer bir etki ile GSH sentezinde bozulmaya neden olarak, bu molekülün seviyesinde azalmalara yol açmış olabilir. Serbest radikaller ve ROS'lar gibi oksidan moleküller, biyolojik membranlardaki doymamış yağ asitleri gibi karbon-karbon çift bağ içeren lipidlere saldırabilirler. Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında, glikolipid, fosfolipid ve kolesterolü içeren hedef lipid tiplerinde, bir karbondan hidrojenin

uzaklaştırılması ve yerine oksijenin eklenmesini kapsayan bir dizi değişiklik meydana gelir. Sonuç olarak lipid peroksil radikalleri ve hidroperoksiller membran fonksiyonunda bozulmaya sebep olurlar ve hücrelerin apoptoza gitmesine yol açarlar (Yin ve ark., 2011). Lipid peroksidasyonunun major endojen ürünü olan MDA, oldukça mutajeniktir ve hücrelerde serbest radikal atağından sonra meydana gelen lipid prooksidasyonunun faydalı bir indikatördür (Ayala ve ark., 2014). Bu çalışmada, tiroid dokusu MDA düzeyinin, BPS'nin 500 mg/kg/gün konsantrasyonunda anlamlı olarak yükseldiği gözlemlendi. Benzer olarak, BPS'ye maruz bırakılan farelerin karaciğerinde MDA düzeyinin anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2018). BPS'nin rat spermi ve testis dokusu üzerindeki etkilerini, *in vitro* ve *in vivo*'da araştıran Ullah ve ark, (2018) ise, BPS'nin spermde ve testis dokusunda lipid peroksidasyon düzeyini anlamlı olarak artırdığını ifade etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen veriler, daha önce Da Silva ve ark. (2018) tarafından BPA'nın tiroid bezi üzerindeki oksidatif hasara yol açıcı potansiyeline dair bulguları ile uyumlu olarak, BPS'nin de tiroid dokusunda oksidatif hasara yol açabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, sağlık üzerindeki olumsuz etkileri BPA'dan daha az olduğu düşünülen ve endüstriyel uygulamalarda BPA yerine bir alternatif olarak kullanılan BPS'nin, tiroid bezinde yapısal, fonksiyonel ve antioksidan savunma ile ilgili değişimlere yol açabildiği, gösterilmiştir. BPS'nin tiroid dokusunda yapısal olarak, histopatolojik değişimler oluşturduğu ve tiroid folikül hücre proliferasyonu ile apoptozunu uyardığı gözlenmiştir. BPS'nin serum T3 düzeyinde anlamlı azalmalara sebep olduğu, dolayısıyla bezin endokrin fonksiyonunu bozabileceği belirlenmiştir. Öte yandan BPS'nin tiroid bezinde antioksidan dengeyi bozabildiği ve dokuda oksidatif stres uyardığı tespit edilmiştir. Elde edilen veriler BPS'nin, BPA'ya benzer olarak, tiroid üzerinde toksik etkiler gösterebildiğini ve BPS maruziyetinin tiroid hastalıklarını uyurabileceğini, ortaya koymaktadır. BPS'nin tiroid bezinde oluşturduğu bu olumsuz etkilerinin altında yatan sebeplerin aydınlatılması için daha detaylı ve uzun süreli çalışmaların yapılması gerekmektedir. BPS'nin, BPA'nın yerine güvenilir bir alternatif olarak kullanımına, dikkatle yaklaşılması gereklidir ve BPS'nin insan ile çevre sağlığı üzerinde oluşturabileceği zararlı etkilerin önüne geçmek için gerekli önlemlerin alınması elzemdir.

KAYNAKLAR

- Abd El-Twab, S. M., Abdul-Hamid, M., 2016. Curcumin mitigates lithium-induced thyroid dysfunction by modulating antioxidant status, apoptosis and inflammatory cytokines. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, **76**: 7-19.
- Abdel-Wahab, W. M., 2014. Thymoquinone attenuates toxicity and oxidative stress induced by bisphenol A in liver of male rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **17** (11): 1152-1160.
- Aboul Ezz, H. S., Kqhadrawy, Y. A., Mourad, I. M., 2015. The effect of bisphenol A on some oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity in the heart of male albino rats. *Cytotechnology*, **67** (1): 145-155.
- Aboul-Fotouh, G. I., El-Nour, A., El-Din, R. K., Farag, E., Boughdady, W. A. E. A. A. 2018. Histological study on the possible protective effect of curcumin on potassium dichromate induced hypothyroidism in adult male albino rats. *Egyptian Journal of Histology*, **41** (2): 220-235.
- Aebi, H., 1974. Catalase. In: Methods of Enzymatic Analysis. *Bergmeyer HU (Ed.), Academic Press, New York*, **2**: 673-684.
- Ahmed, R. G., 2016. Maternal bisphenol A alters fetal endocrine system: Thyroid adipokine dysfunction. *Food and Chemical Toxicology*, **95**: 168-174.
- Ahmed, R. G., Walaa, G. H., Asmaa, F. S., 2018. Suppressive effects of neonatal bisphenol A on the neuroendocrine system. *Toxicology and Industrial Health*, **34** (6): 397-407.
- Ahsan, N., Ullah, H., Ullah, W., Jahan, S., 2018. Comparative effects of Bisphenol S and Bisphenol A on the development of female reproductive system in rats; a neonatal exposure study. *Chemosphere*, **197**: 336-343.
- Alkalby, J. M., 2015. Effect of bisphenol a on thyroid, liver and testicular functions in adult male rats. *Basrah Journal of Veterinary Research*, **14** (1): 187-206.
- Andújar, N., Gálvez-Ontiveros, Y., Zafra-Gómez, A., Rodrigo, L., Álvarez-Cubero, M. J., Aguilera, M., Monteagudo, C., Rivas, A., 2019. Bisphenol A analogues in food and their hormonal and obesogenic effects: a review. *Nutrients*, **11** (9): 2136.
- Araujo, L. F. B. D., Soares Jr, J. M., Simões, R. S., Caliό, P. L., Oliveira-Filho, R. M., Simões, M. D. J., Haidar, M.A., Baracat, E. C., 2006. Effect of conjugated equine estrogens and tamoxifen administration on thyroid gland histomorphology of the rat. *Clinics*, **61**: 321-326.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2014**: 360438.
- Aydoğan, M., Korkmaz, A., Barlas, N., Kolankaya, D., 2008. The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats. *Toxicology*, **249** (1): 35-39.
- Aykut, H., Kaptaner, B., 2021. *In vitro* effects of bisphenol F on antioxidant system indicators in the isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Biology Reports*, **48** (3): 2591-2599.
- Badr El Dine, F. M., Nabil, I. M., Dwedar, F. I., 2017. The effect of tributyltin on thyroid follicular cells of adult male albino rats and the possible protective role of green tea: a toxicological, histological and biochemical study. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, **7** (1): 1-13.

- Banu, S. K., Arosh, J. A., Govindarajulu, P., Aruldas, M. M., 2001. Testosterone and estradiol differentially regulate thyroid growth in *Wistar* rats from immature to adult age. ***Endocrine Research***, **27** (4): 447-463.
- Banu, K. S., Aruldas, M. M., 2002. Sex steroids regulate TSH-induced thyroid growth during sexual maturation in *Wistar* rats. ***Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes***, **110** (01): 37-42.
- Banu, S. K., Govindarajulu, P., Aruldas, M. M., 2002a. Developmental profiles of TSH, sex steroids, and their receptors in the thyroid and their relevance to thyroid growth in immature rats. ***Steroids***, **67** (2): 137-144.
- Banu, S. K., Govindarajulu, P., Aruldas, M. M., 2002b. Testosterone and estradiol differentially regulate TSH-induced thyrocyte proliferation in immature and adult rats. ***Steroids***, **67** (7): 573-579.
- Beg, M. A., Sheikh, I. A., 2020. Endocrine disruption: Molecular interactions of environmental bisphenol contaminants with thyroid hormone receptor and thyroxine-binding globulin. ***Toxicology and Industrial Health***, **36** (5): 322-335.
- Berto-Júnior, C., Santos-Silva, A. P., Ferreira, A. C. F., Graceli, J. B., Carvalho, D. P., Soares, P., Romeiro, N. C., Miranda-Alves, L., 2018. Unraveling molecular targets of bisphenol A and S in the thyroid gland. ***Environmental Science and Pollution Research***, **25** (27): 26916-26926.
- Beutler, E., 1984. Red cell metabolism. In E. Beutler (eds), Grune & Startton; ***A Manual of Biochemical Methods***. 3rd, ed.: 105–106.
- Bindhumol, V., Chitra, K. C., Mathur, P. P., 2003. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. ***Toxicology***, **188** (2-3): 117-124.
- Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., Main, K. M., 2012. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. ***Molecular and Cellular Endocrinology***, **355** (2): 240-248.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Analytical Biochemistry***, **72** (1-2): 248-254.
- Brändli-Baiocco, A., Balme, E., Bruder, M., Chandra, S., Hellmann, J., Hoenerhoff, M. J., Kambara T., Landes, C., Lenz, B., Mense, M., Rittinghausen, S., Satoh, H., Schorsch, F., Seeliger, F., Tanaka, T., Tsuchitani, M., Wojcinski, Z., Rosol, T. J., 2018. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse endocrine system. ***Journal of Toxicologic Pathology***, **31**: 1-95.
- Buege, J. A., Aust, S. D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. ***Methods in Enzymology***, **52**: 302-310.
- Calsolaro, V., Pasqualetti, G., Niccolai, F., Caraccio, N., Monzani, F., 2017. Thyroid disrupting chemicals. ***International Journal of Molecular Sciences***, **18** (12): 2583.
- Cao, J., Guo, L. H., Wan, B., Wei, Y., 2011. *In vitro* fluorescence displacement investigation of thyroxine transport disruption by bisphenol A. ***Journal of Environmental Sciences***, **23** (2): 315-321.
- Casasco, A., Giordano, M., Danova, M., Casasco, M., Cornaglia, A. I., Calligaro, A., 1993. PC10 Monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissues: a combined immunocytochemical and flow cytometric study. ***Histochemistry***, **99** (3): 191-199.
- Chaudhuri P. K., Patel N., Sandberg, L., Prinz R. A., 1986. Distribution and characterization of steroid hormone receptors in human thyroid tissue. ***World Journal of Surgery***, **10** (5):737-743.

- Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y., Widelka, M., 2016. Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity- a review. *Environmental Science and Technology*, **50** (11): 5438-5453.
- Chen, M.Y., Ike, M., Fujita, M., 2002. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol A and other bisphenols. *Environmental Toxicology*, **17**: 80-86.
- Chiappini, F., Alvarez, L., Lux-Lantos, V., Randi, A. S., Kleiman de Pisarev, D. L., 2009. Hexachlorobenzene triggers apoptosis in rat thyroid follicular cells. *Toxicological Sciences*, **108** (2): 301-310.
- Clark O. H., Gerend, P.L., Davis, M., Goretzki, P. E., Hoffman, Jr. P.G., 1985. Estrogen and thyroid-stimulating hormone (TSH) receptors in neoplastic and nonneoplastic human thyroid tissue. *Journal of Surgical Research*, **38**: 89-96.
- Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., 1997. Reactive oxygen particles and antioxidant defence. *Office Journal of the Turkish Nephrology Association*, **3** (4): 92-95.
- Da Silva, M. M., Gonçalves, C. F. L., Miranda-Alves, L., Fortunato, R. S., Carvalho, D. P., Ferreira, A. C. F., 2019. Inhibition of type 1 iodothyronine deiodinase by bisphenol A. *Hormone and Metabolic Research*, **51** (10): 671-677.
- Da Silva, M. M., Xavier, L. L. F., Gonçalves, C. F. L., Santos-Silva, A. P., Paiva-Melo, F. D., De Freitas, M. L., Fortunato, R.S., Miranda-Alves, L., Ferreira, A. C. F., 2018. Bisphenol A increases hydrogen peroxide generation by thyrocytes both in vivo and in vitro. *Endocrine Connections*, **7** (11): 1196-1207.
- Delclos, K. B., Camacho, L., Lewis, S. M., Vanlandingham, M. M., Latendresse, J. R., Olson, G. R., Davis, K. J., Patton, R. E., Da Costa, G. G., Woodling, K. A., Bryant, S. M., Chidambaram, M., Trbojevich, R., Juliar, B. E., Felton, R. P., Thorn, B. T., 2014. Toxicity evaluation of bisphenol A administered by gavage to Sprague Dawley rats from gestation day 6 through postnatal day 90. *Toxicological Sciences*, **139** (1): 174-197.
- Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guirquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, M. D., Benachi, A., Livera, G., Fabre, V. R., Habert, R., 2015. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and Sterility*, **103** (1): 11-21.
- Feng, Y., Jiao, Z., Shi, J., Li, M., Guo, Q., Shao, B., 2016. Effects of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells. *Chemosphere*, **147**: 9-19.
- Ferguson, S. A., Law Jr, C. D., Abshire, J. S., 2011. Developmental treatment with bisphenol A or ethinyl estradiol causes few alterations on early preweaning measures. *Toxicological Sciences*, **124** (1): 149-160.
- Fernandez, M. O., Bourguignon, N. S., Arocena, P., Rosa, M., Libertun, C., Lux-Lantos, V., 2018. Neonatal exposure to bisphenol A alters the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in female rats. *Toxicology Letters*, **285**: 81-86.
- Fic, A., Zegura, B., Dolenc, S. M., Filipic, M., Masic, P. L., 2013. Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, **64**: 3-14.
- Freitas, J., Cano, P., Craig-Veit, C., Goodson, M. L., Furlow, J. D., Murk, A. J., 2011. Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable *in vitro* reporter gene assay. *Toxicology in Vitro*, **25** (1): 257-266.

- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, **119**: 493-501.
- Gentilcore, D., Porreca, I., Rizzo, F., Ganbaatar, E., Carchia, E., Mallardo, M., Felice, M. D., Ambrosino, C., 2013. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. *Toxicology*, **304**: 21-31.
- Giani, C., Campani, D., De Negri, F., Martini, L., Fabbri, R., Bonacci, R., 1993. Interference of thyroperoxidase on immuno-cytochemical determination of steroid receptors in thyroid tissue. *Journal of Endocrinological Investigation*, **16**: 37-43.
- Gorini, F., Bustaffa, E., Coi, A., Iervasi, G., Bianchi, F., 2020. Bisphenols as environmental triggers of thyroid dysfunction: Clues and evidence. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **17** (8): 2654.
- Grignard, E., Lapenna, S., Bremer, S., 2012. Weak estrogenic transcriptional activities of bisphenol A and bisphenol S. *Toxicology in Vitro*, **26**: 727-731.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, **249** (22): 7130-7139.
- Hadie, S. N. H., Mansor, O., Shariff, S. E. T., 2012. The effect of carbofuran on thyroid gland of male rats. *International Medical Journal*, **19** (1): 16-20.
- Higashihara, N., Shiraishi, K., Miyata, K., Oshima, Y., Minobe, Y., Yamasaki, K., 2007. Subacute oral toxicity study of bisphenol F based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline no. 407". *Archives of Toxicology*, **81** (12): 825-832.
- Hood, A., Hashmi, R., Klaassen, C. D., 1999a. Effects of microsomal enzyme inducers on thyroid-follicular cell proliferation, hyperplasia, and hypertrophy. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **160** (2): 163-170.
- Hood, A., Liu, Y. P., Gattone, V. H., Klaassen, C. D., 1999b. Sensitivity of thyroid gland growth to thyroid stimulating hormone (TSH) in rats treated with antithyroid drugs. *Toxicological sciences*, **49** (2): 263-271.
- Huang, G. M., Tian, X. F., Fang, X. D., Ji, F. J., 2016. Waterborne exposure to bisphenol F causes thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae. *Chemosphere*, **147**: 188-194.
- Iglesias-Osma, M. C., Blanco, E. J., Carretero-Hernandez, M., Catalano-Iniesta, L., Sanchez-Robledo, V., Garcia-Barrado, M. J., Vicente-Garcia, T., Burks, D. J., Carretero, J., 2019. The influence of the lack of insulin receptor substrate 2 (IRS2) on the thyroid gland. *Scientific Reports*, **9** (1): 1-10.
- Inoue, H., Oshimo, K., Miki, H., Kawano, M., Monden, Y., 1993. Immunohistochemical study of estrogen receptors and the responsiveness to estrogen in papillary thyroid carcinoma. *Journal of Cancer*, **72**: 1364-1368.
- İyigündoğdu, İ., Üstündağ, A., Duydu, Y., 2020. Toxicological evaluation of bisphenol A and its analogues. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, **17** (4): 457-462.
- Jiang, W., Cao, L., Wang, F., Ge, H., Wu, P. C., Li, X. W., Chen, G. H., 2016. Accelerated reduction of serum thyroxine and hippocampal histone acetylation links to exacerbation of spatial memory impairment in aged CD-1 mice pubertally exposed to bisphenol-A. *Age*, **38** (5): 405-418.
- Kabuto, H., Amakawa, M., Shishibori, T., 2004. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes

- underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sciences*, **74** (24): 2931-2940.
- Kabuto, H., Hasuike, S., Minagawa, N., Shishibori, T., 2003. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environmental Research*, **93** (1): 31-35.
- Kaptaner, B., Yılmaz, C., Aykut, H., Doğan, E., Fidan, C., Bostancı, M., Yıldız, F., 2021. Bisphenol S leads to cytotoxicity-induced antioxidant responses and oxidative stress in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Molecular Biology Reports*, **48** (12): 7657-7666.
- Karabulut, H., Gülay, M. Ş., 2016a. Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **4** (1): 50-59
- Karabulut, H., Gülay, M. Ş., 2016b. Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, **1** (1): 65-76.
- Kaya, Ö., Kaptaner, B., 2016. Antioxidant defense system parameters in isolated fish hepatocytes exposed to bisphenol A-Effect of vitamin C. *Acta Biologica Hungarica*, **67** (3): 225-235.
- Kılıç, N., Sandal, S., Çolakoğlu, N., Kutlu, S., Seyran, A., Yılmaz, B., 2005 . Endocrine disruptive effects of polychlorinated biphenyls on the thyroid gland in female rats. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **206** (4): 327-332.
- Kim, M. J., Park, Y. J., 2019. Bisphenols and thyroid hormone. *Endocrinology and Metabolism*, **34** (4): 340-348.
- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., Ohta, S., 2005. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences*, **84** (2): 249-259.
- Klaassen, C. D., Hood, A. M., 2001. Effects of microsomal enzyme inducers on thyroid follicular cell proliferation and thyroid hormone metabolism. *Toxicologic Pathology*, **29** (1): 34-40.
- Kobayashi, K., Miyagawa, M., Wang, R. S., Suda, M., Sekiguchi, S., Honma, T., 2005. Effects of in utero and lactational exposure to bisphenol A on thyroid status in F1 rat offspring. *Industrial Health*, **43** (4): 685-690.
- Kochman, J., Jakubczyk, K., Bargiel, P., Janda-Milczarek, K., 2021. The influence of oxidative stress on thyroid diseases. *Antioxidants*, **10** (9): 1442.
- Kolaja, K. L., Hood, A. M., Klaassen, C. D., 1999. The UDP-glucuronyltransferase inducers, phenobarbital and pregnenolone-16 α -carbonitrile, enhance thyroid-follicular cell apoptosis: association with TGF- β 1 expression. *Toxicology letters*, **106** (2-3): 143-150.
- Korkmaz, A., Ahbab, M. A., Kolankaya, D., Barlas, N., 2010. Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food and Chemical Toxicology*, **48** (10): 2865-2871.
- Köse, Ö., Rachidi, W., Beal, D., Erkekoğlu, P., Fayyad-Kazan, H., Koçer-Gümüşel, B., 2020. The effects of different bisphenol derivatives on oxidative stress, DNA damage and DNA repair in RWPE-1 cells: A comparative study. *Journal of Applied Toxicology*, **40** (5): 643-654.
- Kudo, Y., Yamauchi, K., 2005. *In vitro* and *in vivo* analysis of the thyroid disrupting activities of phenolic and phenol compounds in *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences*, **84** (1): 29-37.

- Kylarová, D., Procházková, J., Madarová, J., Bartoš, J., Lichnovsky, V., 2002. Comparison of the TUNEL, Lamin B and Annexin V Methods for the Detection of Apoptosis by Flow Cytometry. *Acta Histochemica*, **104**: 367–370.
- Lee, S., Kim, C., Shin, H., Kho, Y., Choi, K., 2019. Comparison of thyroid hormone disruption potentials by bisphenols A, S, F, and Z in embryo-larval zebrafish. *Chemosphere*, **221**: 115-123.
- Lee, S., Kim, C., Youn, H., Choi, K., 2017. Thyroid hormone disrupting potentials of bisphenol A and its analogues-in vitro comparison study employing rat pituitary (GH3) and thyroid follicular (FRTL-5) cells. *Toxicology in Vitro*, **40**: 297-304.
- Lee, S., Liu, X., Takeda, S., Choi, K., 2013. Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: a comparison study employing chicken DT40 cells. *Chemosphere*, **93**: 434-440.
- Leemans, M., Couderq, S., Demeneix, B., Fini, J. B., 2019. Pesticides with potential thyroid hormone-disrupting effects: a review of recent data. *Frontiers in Endocrinology*, **10**: 743.
- Li, X., 2009. Glutathione and Glutathione-S-Transferase in Detoxification Mechanisms. *General, Applied and Systems Toxicology*.
- Li, Y., Zhang, W., Liu, M., Zhang, Q., Lin, Z., Jia, M., Liu, D., Lin, L., 2021. Imbalance of Autophagy and Apoptosis Induced by Oxidative Stress May Be Involved in Thyroid Damage Caused by Sleep Deprivation in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Lin, X., Shi, S., Shi, S., 2016. Sepsis leads to thyroid impairment and dysfunction in rat model. *Tissue and Cell*, **48** (5): 511-515.
- Lu, L., Zhan, T., Ma, M., Xu, C., Wang, J., Zhang, C., Liu, W., Zhuang, S., 2018. Thyroid disruption by bisphenol S analogues via thyroid hormone receptor β : *in vitro*, *in vivo*, and molecular dynamics simulation study. *Environmental Science and Technology*, **52** (11): 6617-6625.
- Łukaszewicz-Hussain, A., 2003. The role of glutathione and glutathione-related enzymes in antioxidative process. *Medycyna Pracy*, **54** (5): 473-479.
- Maćczak, A., Cyrkler, M., Bukowska, B., Michałowicz, J., 2016. Eryptosis-inducing activity of bisphenol A and its analogs in human red blood cells (*in vitro* study). *Journal of Hazardous Materials*, **307**: 328-335.
- Maćczak, A., Cyrkler, M., Bukowska, B., Michałowicz, J., 2017. Bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce different oxidative stress and damage in human red blood cells (*in vitro* study). *Toxicology in Vitro*, **41**: 143-149.
- Manal, M. M., Ibrahim, H. I., 2019. Hazards of Bisphenol A on the Thyroid Gland of Adult Male Albino Rats and Possibility of Recovery after its Withdrawal. *The Medical Journal of Cairo University*, **87**: 2945-2953.
- Manole, D., Schildknecht, B., Gosnell, B., Adams, E., Derwahl, M., 2001. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86** (3): 1072-1077.
- Marchesini, G. R., Meimaridou, A., Haasnoot, W., Meulenberg, E., Albertus, F., Mizuguchi, M., Takeuchi, M., Irth, H., Murk, A. J., 2008. Biosensor discovery of thyroxine transport disrupting chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **232** (1): 150-160.
- Mathew, M., Sreedhanya, S., Manoj, P., Aravindakumar, C. T., Aravind, U. K., 2014. Exploring the interaction of bisphenol-S with serum albumins: a better or worse

- alternative for bisphenol A?. *The Journal of Physical Chemistry A*, **118**: 3832-3843.
- Matsuu-Matsuyama, M., Shichijo, K., Okaichi, K., Kurashige, T., Kondo, H., Miura, S., Nakashima, M., 2015. Effect of age on the sensitivity of the rat thyroid gland to ionizing radiation. *Journal of Radiation Research*, **56** (3): 493-501.
- Meister, A., Anderson, M. E., 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, **52** (1): 711-760.
- Meli, R., Monnolo, A., Annunziata, C., Pirozzi, C., Ferrante, M. C., 2020. Oxidative stress and BPA toxicity: an antioxidant approach for male and female reproductive dysfunction. *Antioxidants*, **9** (5): 405.
- Milczarek-Banach, J., Miśkiewicz, P., 2020. The role of bisphenol A and its analogues as endocrine disruptors influencing the thyroid gland: a short review. *Journal of Medical Science*, **89** (3): 199-204.
- Molina-Molina, J. M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J. M., Real, M., Fernández, M. F., Balaguer, P., Olea, N., 2013. *In vitro* study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **272** (1): 127-136.
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N. Hataya, Y. Shimatsu, A. Kuzuya, H., Nakao, K., 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87** (11): 5185-5190.
- Oliveira, K. J., Chiamolera, M. I., Giannocco, G., Pazos-Moura, C. C., Ortega-Carvalho, T. M., 2019. Thyroid function disruptors: from nature to chemicals. *Journal of Molecular Endocrinology*, **62** (1): 1-19.
- Orrenius, S., Nicotera, P., Zhivotovsky, B., 2011. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological Sciences*, **119** (1): 3-19.
- Özaydın, T., Öznurlu, Y., Sur, E., Çelik, I., Uluişik, D., Dayan, M. O., 2018. Effects of bisphenol A on antioxidant system and lipid profile in rats. *Biotechnic and Histochemistry*, **93** (4): 231-238.
- Paglia, D. E., Valentine, W. N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **70** (1): 158-169.
- Pal, S., Sarkar, K., Nath, P. P., Mondal, M., Khatun, A., Paul, G., 2017. Bisphenol S impairs blood functions and induces cardiovascular risks in rats. *Toxicology Reports*, **4**: 560-565.
- Peyre, L., Rouimi, P., de Sousa, G., Helies-Toussaint, C., Carre, B., Barcellini, S., Chagnon, M. C., Rahmani, R., 2014. Comparative study of bisphenol A and its analogue bisphenol S on human hepatic cells: a focus on their potential involvement in nonalcoholic fatty liver disease. *Food and Chemical Toxicology*, **70**: 9-18.
- Piper, G. M., Jordan, M., Dondlinger, L. A., Adans, M. B., Roza, A. M., 1995. Peroxidative stress in diabetic blood vessels. Reversal by pancreatic islet transplantation. *Diabetes*, **44**: 884-889.
- Rajasarkka, J., Koponen, J., Airaksinen, R., Kiviranta, H., Virta, M., 2014. Monitoring bisphenol A and estrogenic chemicals in thermal paper with yeast-based bioreporter assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **406**: 5695-5702.
- Rosenmai, A. K., Dybdahl, M., Pedersen, M., van Vugt-Lussenburg, B. M. A., Wedebye, E. B., Taxvig, C., Vinggaard, A. M., 2014. Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives?. *Toxicological Sciences*, **139**: 35-47.

- Sabry, R., Nguyen, M., Younes, S., Favetta, L. A., 2022. BPA and its analogs increase oxidative stress levels in *in vitro* cultured granulosa cells by altering anti-oxidant enzymes expression. ***Molecular and Cellular Endocrinology***, **545**: 111574.
- Salah, I., Adjroud, O., Elwej, A., 2022. Protective effects of selenium and zinc against nickel chloride-induced hormonal changes and oxidative damage in thyroid of pregnant rats. ***Biological Trace Element Research***, **200** (5): 2183-2194.
- Salvesen, G.S., Walsh, C.M., 2014. Functions of caspase 8: the identified and the mysterious. ***Seminars in Immunology Journal***, **26**: 246-252.
- Schwartzman, R. A., Cidlowski, J. A., 1993. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. ***Endocrine Reviews***, **14**: 133-151.
- Sheng, Z. G., Tang, Y., Liu, Y. X., Yuan, Y., Zhao, B. Q., Chao, X. J., Zhu, B. Z., 2012. Low concentrations of bisphenol A suppress thyroid hormone receptor transcription through a nongenomic mechanism. ***Toxicology and Applied Pharmacology***, **259** (1): 133-142.
- Sravani, J., Padmaja, K., Eswara Prasad, P., Punya Kumari, B., 2015. Effect of bisphenol A on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of chick embryos. ***International Journal of Meat Science***, **6**: 1-5.
- Steffensen, I. L., Dirven, H., Couderq, S., David, A., D'Cruz, S. C., Fernández, M. F., Hofer, T., 2020. Bisphenols and oxidative stress biomarkers associations found in human studies, evaluation of methods used, and strengths and weaknesses of the biomarkers. ***International Journal of Environmental Research and Public Health***, **17** (10): 3609.
- Sur, U., Oral, D., Erkekoğlu, P., Koçer-Gümüşel, B., 2017. Bisfenol türevleri daha güvenli mi?.-Bisfenol F ve bisfenol S'in toksik etkileri. ***FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences***, **42** (3): 225-237.
- Suttle, N. F., McMurray, C. H., 1983. Use of erythrocyte copper: zinc superoxide dismutase activity and hair or fleece copper concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. ***Research in Veterinary Science***, **35** (1): 47-52.
- Tamura, M., Kimura, H., Koji, T., Tominaga, T., Ashizawa, K., Kiriya, T., Yokoyama, N., Yoshimura, T., Eguchi, K., Nakane, P. K., Nagataki, S., 1998. Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model of goiter. A possible involvement of Fas system. ***Endocrinology***, **139** (8): 3646-3653.
- Tebourbi, O., Hallègue, D., Yacoubi, M. T., Sakly, M., Rhouma, K. B., 2010. Subacute toxicity of p, p'-DDT on rat thyroid: Hormonal and histopathological changes. ***Environmental Toxicology and Pharmacology***, **29** (3): 271-279.
- Teng, C., Goodwin, B., Shockley, K., Xia, M., Huang, R., Norris, J., 2013. Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. ***Chemico-Biological Interactions***, **203**: 556-564.
- Thambirajah, A. A., Wade, M. G., Verreault, J., Buisine, N., Alves, V. A., Langlois, V. S., Helbing, C. C., 2022. Disruption by stealth-Interference of endocrine disrupting chemicals on hormonal crosstalk with thyroid axis function in humans and other animals. ***Environmental Research***, **203**: 111906.
- Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Shaheen, G., Rehman, H. Siddiqui M.F., Butt, M. A., 2018. Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative *in vitro* and *in vivo* studies on the sperms and testicular tissues of rats. ***Chemosphere***, **209**: 508-516.
- Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Razak, S., Rauf, N., Khan, M.J., Mahboob, S.Z., 2019. Prenatal BPA and its analogs BPB, BPF, and BPS exposure and

- reproductive axis function in the male off spring of Sprague Dawley rats. *Human and Experimental Toxicology*, **38** (12): 1344-1365.
- Ullah, H., Jahan, S., Ain, Q. U., Shaheen, G., Ahsan, N., 2016. Effect of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: A histological and biochemical study. *Chemosphere*, **152**: 383-391.
- Velický, J., Titlbach, M., Lojda, Z., Jelinek, F., Vobecký, M., Raška, I., 1997. Expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the rat thyroid gland after exposure to bromide. *Acta histochemica*, **99** (4): 391-399.
- Vinas, R., Watson, C.S., 2013a. Bisphenol S disrupts estradiol-induced nongenomic signaling in a rat pituitary cell line: effects on cell functions. *Environmental Health Perspectives*, **121**: 352-358.
- Vinas, R., Watson, C.S., 2013b. Mixtures of xenoestrogens disrupt estradiol-induced nongenomic signaling and downstream functions in pituitary cells. *Environmental Health Perspectives*, **121**: 1-11.
- Wade, M. G., Parent, S., Finnson, K. W., Foster, W., Younglai, E., McMahon, A., Cry, D.G. Hughes, C., 2002. Thyroid toxicity due to subchronic exposure to a complex mixture of 16 organochlorines, lead, and cadmium. *Toxicological Sciences*, **67** (2): 207-218.
- Waidyanatha, S., Black, S. R., Snyder, R. W., Yueh, Y. L., Sutherland, V., Patel, P. R., Watson, S. L., Fennell, T. R., 2018. Disposition and metabolism of the bisphenol analogue, bisphenol S, in Harlan Sprague Dawley rats and B6C3F1/N mice and *in vitro* in hepatocytes from rats, mice, and humans. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **351**: 32-45.
- Wei, P., Zhao, F., Zhang, X., Liu, W., Jiang, G., Wang, H., Ru, S., 2018. Transgenerational thyroid endocrine disruption induced by bisphenol S affects the early development of zebrafish offspring. *Environmental Pollution*, **243**: 800-808.
- Wolf, H. K., Dittrich, K. L., 1992. Detection of proliferating cell nuclear antigen in diagnostic histopathology. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **40**: 1269-1273.
- Wu, Y., Beland, F. A., Fang, J. L., 2016. Effect of triclosan, triclocarban, 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether, and bisphenol A on the iodide uptake, thyroid peroxidase activity, and expression of genes involved in thyroid hormone synthesis. *Toxicology in Vitro*, **32**: 310-319.
- Xu, X., Liu, Y., Sadamatsu, M. E., Tsutsumi, S., Akaike, M., Ushijima, H., Kato, N., 2007. Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptors and its responsive gene. *Neuroscience Research*, **58** (2): 149-155.
- Yane K., Kitahori Y., Konishi N., Okaichi, K., Ohnishi, T., Miyahara, H., Matsunaga, T., Lin, J. C., Hiasa, Y., 1994. Expression of the estrogen receptor in human thyroid neoplasms. *Cancer Letters*, **84**: 59-66.
- Ye, H., Ha, M., Yang, M., Yue, P., Xie, Z., Liu, C., 2017. Di2-ethylhexyl phthalate disrupts thyroid hormone homeostasis through activating the Ras/Akt/TRHr pathway and inducing hepatic enzymes. *Scientific Reports*, **7** (1): 1-12.
- Yin H., Xu L., Porter N.A., 2011. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, **111** (10): 5944-5972.
- Yoshizawa, K., Walker, N. J., Nyska, A., Kissling, G. E., Jokinen, M. P., Brix, A. E., Sells, D.M., Wyde, M.E., 2010. Thyroid follicular lesions induced by oral treatment

- for 2 years with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and dioxin-like compounds in female Harlan Sprague-Dawley rats. *Toxicologic Pathology*, **38** (7): 1037-1050.
- Yu, H., Ge, Y., Wang, Y., Lin, C. T., Li, J., Liu, X., Zang, T., Xu, J., Liu, J., Luo, G., Shen, J., 2007. A fused selenium-containing protein with both GPx and SOD activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **358** (3): 873-878.
- Zhang, D. H., Zhou, E. X., Yang, Z. L., 2017. Waterborne exposure to BPS causes thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae. *PLoS One*, **12** (5): e0176927.
- Zhang R, Liu R, Zong W., 2016. Bisphenol S interacts with catalase and induces oxidative stress in mouse liver and renal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64** (34): 6630-6640
- Zhang, Y. F., Ren, X. M., Li, Y. Y., Yao, X. F., Li, C. H., Qin, Z. F., Guo, L. H., 2018. Bisphenol A alternatives bisphenol S and bisphenol F interfere with thyroid hormone signaling pathway *in vitro* and *in vivo*. *Environmental Pollution*, **237**: 1072-1079.
- Zoeller, R. T., Bansal, R., Parris, C., 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist *in vitro*, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology*, **146** (2): 607-612.
- Zoeller, T. R., 2010. Environmental chemicals targeting thyroid. *Hormones*, **9** (1): 28-40.

ÖZ GEÇMİŞ

Müşerref BOSTANCI, ilköğrenimine İstiklal İlköğretim Okulu'nda başladı ve Özel İlkem Güneş Koleji'nde tamamladı. Lise öğrenimini Özel Final Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2015 yılında girdiği Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden, 2019 yılında mezun oldu. 2019 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.



T. C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 07/09/2022

Tez Başlığı / Konusu:

Bisfenol S'nin Erkek Ratlarda Tiroid Bezi Üzerindeki Toksik Etkilerinin Araştırılması

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 57 sayfalık kısmına ilişkin, 07/09/2022 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %10 (yüzde on)'dur.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Materyal ve yöntem hariç,
- Kaynaklar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

07/09/2022
Müşerref BOSTANCI

Adı Soyadı: Müşerref BOSTANCI

Öğrenci No: 19910001244

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı:

Statüsü: ☒ Y. Lisans

☐ Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

Doç. Dr. Burak KAPTANER