

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

**BİSFENOL F'NİN ERKEK RATLARDA PANKREAS ÜZERİNDEKİ TOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Emine DOĞAN
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 F'NİN ERKEK RATLARDA PANKREAS ÜZERİNDEKİ TOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Emine DOĞAN

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından FYL-2021-9360 No'lu proje olarak desteklenmiştir

VAN-2022

KABUL VE ONAY SAYFASI

Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Burak KAPTANER danışmanlığında, Emine DOĞAN tarafından sunulan “**Bisfenol F’nin Erkek Ratlarda Pankreas Üzerindeki Toksik Etkilerinin Araştırılması**” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili hükümleri gereğince 13/04/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. İsmail YILDIZ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Mucip GENİŞEL

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.

Emine DOĞAN

ÖZET

BİSFENOL F'NİN ERKEK RATLARDA PANKREAS ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOĞAN, Emine

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Burak KAPTANER

II. Danışman: Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN

Nisan 2022, 51 sayfa

Bisfenol F (BPF), epoksi rezinlerin ve polikarbonat plastiklerin üretiminde kullanılan bir bisfenol A (BPA) analogudur. Son yıllarda yapılan çalışmalar BPF'nin de BPA'ya benzer endokrin bozucu etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, BPF'nin pankreas üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda *Wistar albino* erkek ratlar, BPF'nin 0, 20, 100 ve 500 mg/kg vücut ağırlığı (v.a.) konsantrasyonlarına, 28 gün boyunca oral gavaj ile maruz bırakıldı. BPF maruziyeti sonrasında, pankreatik Langerhans adacıklarında, vakuolar dejenerasyon gösteren hücrelerin varlığı tespit edildi. Histomorfolojik ölçümler, BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. konsantrasyonlarına maruz bırakılan gruplarda, adacık çap ve alan ortalamalarının düştüğünü gösterdi. Ek olarak, adacıklarda immunohistokimyasal olarak boyanan insülin pozitif β hücre yüzdesinin, BPF uygulanan bütün gruplarda, anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. Serum açlık glukoz, total kan HbA1c ve serum C-peptid ile insülin seviyelerinin, BPF maruziyeti sonrasında anlamlı değişimler göstermedikleri gözlemlendi. BPF'nin pankreas malondialdehit düzeyi hariç, antioksidan sistem belirteçlerinde (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz aktiviteleri ve redükte glutatyon içeriği) değişimlere yol açtığı belirlendi. Elde edilen sonuçlar BPF'nin endüstriyel alanlarda BPA yerine güvenilir bir alternatif olarak kullanımına ilişkin, daha fazla dikkat edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan belirteçler, Bisfenol F, β hücresi, Histopatoloji, Pankreas.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF TOXIC EFFECTS OF BISPHENOL F ON MALE RAT PANCREAS

DOĞAN, Emine

Master Thesis, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Burak KAPTANER

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

April 2022, 51 pages

Bisphenol F (BPF) is a bisphenol A (BPA) analogue that used in the production of epoxy resin and polycarbonate plastics. Studies in recent years have shown that BPF also possesses endocrine disrupting effects similar to BPA. In this study, it was aimed to investigate the toxic effects of BPF on rat pancreas. Toward this aim, male *Wistar albino* rats were exposed to BPF at concentrations of 0, 20, 100, and 500 mg/kg of body weight (b.w.) via oral gavage for 28 days. After BPF exposure, the presence of cells displaying vacuolar degeneration in the pancreatic Langerhans islets was determined. Histomorphometric measurements demonstrated that averages of the islet diameter and area decreased in the groups exposed to BPF concentrations of 100 and 500 mg/kg of b.w.. In addition, the percentage of immunohistochemically-stained insulin-positive β cells in the islets was determined to have diminished significantly at all of the groups exposed to BPF. The levels of serum fasting glucose, total blood HbA1c, serum C-peptide or insulin did not display significant changes after BPF exposure. BPF was determined to cause significant changes in the antioxidant defense indicators (superoxide dismutase-, catalase-, glutathione peroxidase-, glutathione-S-transferase-activities, and reduced glutathione content) of the pancreas, except for the malondialdehyde level. The results obtained herein showed that more attention should be given regarding the usage of BPF instead of BPA as a safe alternative in industrial areas.

Keywords: Antioxidant indicators, Bisphenol F, β cell, Histopathology, Pancreas.



ÖN SÖZ

Dünyada artan endüstrileşmenin bir sonucu olarak, çevresel kirleticilerin sucul ve karasal habitatlardaki miktarları, gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle, kirleticilerin canlılar üzerindeki olumsuz etkilerinin bilimsel olarak aydınlatılması, gün geçtikçe daha çok önem kazanmaktadır. Tarımsal uygulamalar, endüstriyel üretim ve sanayiden kaynaklanan herbisitler, pestisitler, poliaromatik hidrokarbonlar, poliklorlu bifeniller, ağır metaller, plastik üretiminde kullanılan bisfenoller ve daha birçok kimyasal grubunun insanda ve diğer canlılarda toksik ve endokrin bozucu etkiler meydana getirdiği özellikle son yarım asırlık zaman dilimi içerisinde yapılan bilimsel çalışmalar ile ortaya konulmuştur.

Epoksi rezinlerin ve polikarbonat plastiklerin bir bileşeni olan ve günlük hayatta kullanılan, biberon, plastik mutfak gereçleri, dental malzemeler, inşaat malzemeleri, termal kağıtlar ve yapıştırıcılar gibi bir çok üründe yer alan bisfenol A (BPA)'nın kanser, tiroid hastalıkları, diyabet, obezite ve üreme bozuklukları gibi sağlık sorunları ile ilişkisi olduğu, yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile belirlenmiştir. Sucul ve karasal ortamlarda varlığı tespit edilen BPA'nın toksik ve endokrin bozucu etkileri, deneysel çalışmalar ile ispatlanmıştır. Bu nedenlerden dolayı, endüstriyel alanda BPA yerine insan ve çevre sağlığı açısından daha az zararlı oldukları düşünülen, BPA analoglarının kullanımına geçilmeye başlanmıştır. Bunlar arasında yer alan bisfenol F (BPF), en yaygın olarak kullanılan BPA analogudur. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar, BPF'nin de BPA'ya benzer olumsuz etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, BPF'nin canlılar üzerindeki etkilerinin araştırılarak öğrenilmesi ve elde edilen sonuçlar göz önünde tutularak, gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, yukarıda söz edilen durumlar göz önünde tutularak, BPF'nin pankreas üzerindeki toksik etkilerinin araştırılması 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 Fatoş YILDIZ, Handan AYKUT ve Müşerref BOSTANCI'ya 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-2021-9360), teşekkür ederim. Bu çalışma 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, ayrıca teşekkür ederim.

2022

Emine DOĞAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
2.1. Bisfenol A ve Yapısal Analogları.....	3
2.2. Bisfenol A – Diyabet İlişkisi	5
2.3. Bisfenol A’nın Pankreas β Hücreleri Üzerindeki Etkileri	6
2.4. Bisfenol F	9
2.5. BPF’nin <i>In Vivo</i> Deneylerde Belirlenen Olumsuz Etkileri	9
2.6. BPF’nin <i>In Vitro</i> Deneylerde Belirlenen Olumsuz Etkileri	11
2.7. Tez Çalışmasının Amacı	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Deney Hayvanı	15
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	15
3.3. Deneysel Dizayn.....	16
3.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması.....	17
3.5. Histolojik Prosedürler.....	17
3.6. Pankreas Langerhans Adacıklarında β Hücrelerinin İmmunohistokimyasal Olarak Boyanması	18
3.7. Adacık Morfometrisi ve β Hücre Sayımı	19
3.8. Biyokimyasal Analizler	20
3.9. Antioksidan Savunma Sistemi Belirteçlerinin Tayini	20
3.9.1. Doku homojenizasyonu	20
3.9.2. Total protein tayini.....	21

	Sayfa
3.9.3. Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini	22
3.9.4. Katalaz aktivitesi tayini	24
3.9.5. Redükte glutatyon tayini	26
3.9.6. Glutatyon peroksidaz aktivitesi tayini	27
3.9.7. Glutatyon-S-transferaz aktivitesi tayini.....	28
3.9.8. Malondialdehit içeriği tayini	29
3.10. İstatistiksel Analizler.....	30
4. BULGULAR	31
4.1. Histopatolojik Değişimler	31
4.2. Adacık Morfometrisi	32
4.3. Pankreatik β Hücrelerinin İmmunohistokimyasal Boyanması ve β İndeks Değerleri	32
4.4. BPF'nin Glukoz, HbA1c, C-peptid ve İnsülin Seviyeleri Üzerindeki Etkisi	34
4.5. BPF'nin Pankreas Antioksidan Savunma Sistem Belirteçleri Üzerindeki Etkisi.....	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	37
KAYNAKLAR.....	45
ÖZ GEÇMİŞ.....	51

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. BPA ve bazı BPA analoglarının kimyasal yapıları, isimleri, kısaltmaları ve belirlendikleri yerler	4
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi	15
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kit ve kimyasalların listesi	16
Çizelge 3.3. SOD kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları.....	23
Çizelge 3.4. SOD aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları	24
Çizelge 3.5. CAT fosfat tamponu (pH: 7.5)'nin hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar.....	24
Çizelge 3.6. CAT fosfat tamponunun hazırlanması için gerekli olan A ve B solüsyonlarının karıştırılma miktarları	25
Çizelge 3.7. CAT aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları	25
Çizelge 3.8. GPx kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları	27
Çizelge 3.9. GPx aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları	28
Çizelge 3.10. GST aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenlerin miktar ve konsantrasyonları	28
Çizelge 3.11. MDA ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler, miktarları ve ölçüm prosedürü	30
Çizelge 4.1. Farklı gruplara ait adacık çap ve alan ortalamaları	32
Çizelge 4.2. Kontrol grubuna ve BPF uygulanan gruplara ait β hücre indeks değerleri.....	33
Çizelge 4.3. Kontrol grubuna ve BPF uygulanan gruplara ait serum açlık glukoz, total kan HbA1c, serum C-peptid ve insülin seviyeleri.....	34
Çizelge 4.4. BPF'ye ratların pankreas bezinde antioksidan savunma sistemi belirteçlerindeki değişimler	35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Protein standart eğrisi	22
Şekil 3.2. GSH standart eğrisi	26
Şekil 3.3. 1,1,3,3-tetraetoksipropan standartlarından türetilen standart eğri	29
Şekil 4.1. Farklı grupların H&E ile boyanmış olan pankreas kesitleri.....	31
Şekil 4.2. Farklı grupların Langerhans adacıklarında, immunohistokimya yöntemi ile boyanmış olan β hücreleri	33





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
A	Absorbans
α	Alfa
β	Beta
cm	Santimetre
dk	Dakika
dl	Desilitre
g	Gram
<i>g</i>	Santrifüj kuvveti
kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
mM	Milimolar
n	Deney hayvan sayısı
nM	Nanomolar
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
rpm	Dakikadaki devir sayısı
P	İstatistiksel önem derecesi

Simgeler**Açıklama**

pH	Bir çözeltinin asitlik-bazlık derecesini gösteren ölçü birim
pg	Pikogram
sn	Saniye
U	Ünite
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
v	Hacim

Kısaltmalar**Açıklama**

ANOVA	Varyans analizi
BPA	Bisfenol A
BPAF	Bisfenol AF
BPB	Bisfenol B
BPF	Bisfenol F
BPS	Bisfenol S
BSA	Sığır serum albümin
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DTNB	5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ER	Östrojen reseptörü
E2	17β-Östradiol
GPx	Glutasyon peroksidaz

Kısaltmalar	Açıklama
GR	Glutasyon redüktaz
GS	Glutasyon sentetaz
GSH	Redükte glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
CAT	Katalaz
HbA1c	Glikozillenmiş hemoglobin
H & E	Hematoksilen ve Eozin
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HRP	Horse radish peroksidaz
INT	2-(-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür
MDA	Malondialdehit
NaCl	Sodyum klorür
NADP ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte)
PBS	Fosfat tuz tamponu
POD	Peroksidaz
ROS	Reaktif oksijen türü
SOD	Süperoksit dizmutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBS	Tris Tuz Tamponu
TCA	Triklor asetik asit
Tris	Hidroksimetil amino metan
v.a.	Vücut ağırlığı



1. GİRİŞ

Endokrin bozucu kimyasallar, endokrin sistemin normal fonksiyonunu değiştiren bileşiklerdir. Bu bileşiklerin insanlardaki biyobirikimi, olumsuz sağlık problemlerine sebebiyet verebilmektedir. Endüstriyel olarak üretilen ve endokrin bozucu yönü iyi bilinen Bisfenol A (BPA), epoksi rezinlerin ve polikarbonat plastiklerin bir bileşeni olarak, yaygın bir şekilde, kullanılmaktadır. BPA tabanlı plastikler ve rezinler, gıdalar ile temas eden ambalaj, kap ve termal kâğıt gibi materyallerin içinde yer almaktadır. İnsanların BPA'ya maruziyeti temel olarak, gıdalar ve gıda temalı materyaller ile meydana gelmektedir. BPA ayrıca, metal konserve kutularının epoksi kaplamalarında, mutfak gereçlerinde, tıbbi aletlerde ve dış kompozitleri/yapıştırıcılarında bulunmaktadır. BPA'nın insanlarda, gelişimsel, üreme, kardiyovasküler ve bağışıklık sistemi ile ilgili metabolik olumsuz etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır. Avrupa Kimyasal Ajansı BPA'yı 2017 yılında, çok yüksek endişe verici maddeler listesine almıştır. BPA ile ilgili yapılan son düzenlemelerde, bu kimyasalın gıdalar ile temas eden materyallerdeki kullanımına, daha geniş sınırlamalar getirilmiştir. Gıda ambalaj şirketleri ise BPA'yı ürettikleri ürünlerden dereceli bir şekilde çıkartmak adına, BPA'nın yerine geçebilecek, yeni arayışlar içerisine girmişlerdir (Andújar ve ark., 2019).

BPA'nın dünya genelinde kullanımının kısıtlanması, BPA'ya alternatif olarak, bisfenol F (BPF) ve bisfenol S (BPS) gibi BPA analoglarının kullanımına neden olmuştur ancak son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar BPA analoglarının, BPA'ya benzer olumsuz etkilere sahip olduklarını ve kullanımlarının, insan ve çevre sağlığı açısından, risk oluşturabileceğini ortaya koymuştur (İyigündoğdu ve ark., 2020). Bisfenol AF (BPAF), BPF ve BPS gibi BPA analoglarının, abiyotik çevrelerde ve bazı bölgelerdeki insanların idrar örneklerinde, BPA'ya benzer veya BPA'dan daha yüksek seviyelerde, tespit edildiği rapor edilmiştir. Birçok BPA analogunun, endokrin bozucu etkiler, sitotoksik etkiler, genotoksik etkiler, dioksin benzeri etkiler, üreme ile ilgili toksik etkiler ve nörotoksik etkiler meydana getirdiği çok sayıda laboratuvar çalışmasında ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, BPAF, BPF, BPS ve Bisfenol B (BPB) gibi BPA analoglarının, BPA'nın sahip olduğu östrojenik ve antiandrojenik

aktivitelere benzer veya onunkinden daha fazla aktiviteye sahip oldukları, belirlenmiştir (Chen ve ark., 2016).

Tip II diyabet, insülin direnci ve insülin eksikliği ile belirti gösteren metabolik bir hastalıktır. Erişkin bireylerde küresel tip II diyabet prevalansının 415 milyon civarında olduğu ancak Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun tahminlerine göre bu sayının 2040'ta 642 milyona ulaşacağı bildirilmiştir. Yapılan meta-analiz çalışmalarına göre insanlarda BPA maruziyeti ile tip II diyabet riski arasında pozitif bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Hwang ve ark., 2018). Erişkinlerde yapılan saha çalışmalarında ise, BPA'ya yüksek konsantrasyonlarda maruziyet ile artan glikolize hemoglobin (HbA1c) ve insulin seviyeleri, insulin direnci, prediyabet riski ve tip II diyabet gelişme riski arasında korelasyon olduğu ifade edilmiştir (Mustieles ve ark., 2020). Yapılan deneysel çalışmalarda ise endokrin pankreasın BPA'ya karşı hassas bir doku olduğu ve BPA'nın, 17 β -östradiol (E2)'ün meydana getirdiği etkileri aynı şekilde taklit ederek, aşırı insulin uyarımına sebep olduğu ve insulin direncini tetiklediği, gösterilmiştir. Dolayısıyla elde edilen bilimsel veriler, BPA'nın tip II diyabet gelişimini tetikleyebileceğini ortaya koymuştur.

Bir BPA analoğu olan BPF, birçok endüstriyel uygulama alanında BPA'nın yerine kullanılan bir kimyasal bileşiktir. BPF'nin de BPA gibi organizmalar üzerinde toksik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. *In vivo* çalışmalar, BPF'nin östrojenik, androjenik ve tiroidojenik etkilerinin olduğunu ve fizyolojik/biyokimyasal değişimlere yol açabildiğini göstermiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda ise, BPF'nin sitotoksik etkiler gösterdiği, oksidatif stresi uyardığı, kromozomal aberasyonlara sebep olduğu, DNA hasarına yol açtığı ve genotoksisiteye sebep olduğu rapor edilmiştir (İyigünoğlu ve ark., 2020). Öte yandan BPF'nin pankreas üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğuna ilişkin oldukça az bilgi mevcuttur.

Bu çalışmada, BPF'nin pankreas üzerindeki etkileri araştırılarak, literatürdeki eksikliğin doldurulması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, *Wistar albino* ırkı erkek ratlar, BPF'ye oral gavaj ile günlük olarak, maruz bırakılmış, daha sonra BPF'nin, pankreatik Langerhans adacık histolojisi, adacık β hücre içeriği, pankreas antioksidan sistem belirteçleri ve kandaki bazı biyokimyasal değerler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Bisfenol A ve Yapısal Analogları

Yapıları genellikle difenolmetan üzerine kurulmuş olan bisfenoller, iki adet hidroksifenil grubu içeren kimyasal bileşiklerdir. Bisfenoller, karbon ve diğer kimyasal yapıların oluşturduğu bir köprü ile birbirine bağlanmış iki fenolik halka içerirler. Çok sayıda analogu olan bisfenoller, içlerindeki reaktan atom/bileşen grubuna göre adlandırılırlar (Çizelge 2.1). Örneğin, BPA'da reaktan grup aseton iken, BPF'de formaldehit, BPS'de kükürt trioksittir (Sur ve ark., 2017). Epoksi reçineler, polikarbonatlar, diş dolguları, yemek saklama kapları, bebek biberonları ve su bidonlarının üretiminde yaygın olarak kullanılan BPA'nın endokrin bozucu yönü ve obezite, diyabet, kronik solunum hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, renal hastalıklar, davranış bozuklukları, meme kanseri, diş gelişimi bozuklukları ve üreme bozuklukları gibi çok sayıda sağlık problemi ile olan ilişkisi, geçmişte yapılan bir çok çalışmada ortaya konulmuştur (İyigündoğdu ve ark., 2020). Bu nedenle, bilim insanlarında, yasa düzenleyicilerinde ve toplumda BPA kullanımına ilişkin endişe artmış ve bu endişe endüstriyi BPA yerine, bisfenol AF, BPAF, BPB, BPF, BPS gibi alternatif kimyasalların aranması için harekete geçirmiştir (İyigündoğdu ve ark., 2020; Knížatová ve ark., 2020). BPA analoglarının kullanımı yaygın olsa bile, toksik etkileri hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Bununla birlikte, BPA için bildirilen anti-östrojenik ve anti-androjenik etkiler, BPA analogları için de gösterilmiştir (Knížatová ve ark., 2020).

BPA'ya yapısal ve fonksiyonel olarak benzerliklerinden dolayı, "BPA analogları veya türevleri" olarak isimlendirilen bu kimyasallar, gıda maddeleri, ev içi tozu, göl ve nehir sedimentleri, kişisel bakım ürünleri ve termal kağıtlarda tespit edilmişlerdir. Daha da önemlisi bu analogların varlığı insan biyolojik örneklerinde, gösterilmiştir. BPA'nın bazı klorlu ve bromlu türevleri, alev geciktirici olarak kullanılmaktadır (Pelch ve ark., 2017). BPA ve bazı BPA analoglarının kimyasal yapıları, isimleri, kısaltmaları ve belirlendikleri yerler Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. BPA ve bazı BPA analoglarının kimyasal yapıları, isimler, kısaltmaları ve belirlendikleri yerler (Chen ve ark., 2016; Pelch ve ark., 2017)

Kimyasal yapı	Kimyasal isim	Kısaltma ve CASRN	Belirlendiği yer
	2,2-bis(4-hidroksifenil)propan	BPA (80-05-7)	İnsan serumu, idrar, plesental doku, göbek kordonu kanı, insan serumu, memeden alınan süt, ev içi toz, sedimentler, tatlı su, deniz suyu, atık su, silaj
	4,4'-Metilendifenol (sinonim: 4,4'-Dihidroksidifenilmetan)	4,4-BPF (620-92-8)	Kan, gıda, alındı (makbuz), idrar, toz, kişisel bakım ürünleri
	4,4'-Sulfonildifenol	BPS (80-09-1)	Kan, gıda, alındı (makbuz), idrar
	4,4'-(1-Fenil-1,1-etanediol)difenol	BPAP (1571-75-1)	Gıda, toz, alındı (makbuz), sediment
	4,4'-(1,1,1,3,3,3-Heksafloro-2,2-propanediol)difenol	BPAF (1478-61-1)	Gıda, toz, alındı (makbuz), atık su arıtma silajı
	2,2-Bis(4-hidroksifenil)bütan	BPB (77-40-7)	Gıda, toz, sediment, kan, idrar
	4,4'-(1,4-Fenilendi-2,2-propanediol)difenol	BPP (2167-51-3)	Gıda, toz
	4,4'-(1,1-Siklohekza)diphenol	BPZ (843-55-0)	Gıda, toz, kişisel bakım ürünleri
	4,4'-ethylidenbisfenol	BPE (2081-08-5)	Atık su arıtma silajı
	2,2-Bis(4-hidroksi-3-metilfenil)propan	BPC (79-97-0)	Alındı (makbuz)
	2,2'-dihidroksidifenil metan	2,2-BPF (2467-02-9)	Rezinler
	4,4'-(2,2-Propandiol)bis(2,6-dimetilfenol)	TMBPA (5613-46-7)	Polikarbonat rezinler
	Fosforik asit, (1-metiletiliden)di-4,1-fenilen tetrafenil ester	BDP (5945-33-5)	Alev geciktiriciler
	4-[(4-İzopropoksifenil)sulfonyl]fenol	D-8 (95235-30-6)	Kan, alındı (makbuz)

CASRN: Kimyasal özetler hizmet kayıt numarası

2.2. Bisfenol A – Diyabet İlişkisi

Pankreas, glukoz homeostazisinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu işlevini iki temel hormonun (insülin ve glukagon) sentezi ve salınımı ile gerçekleştirir. Pankreasın Langerhans adacıklarındaki β hücreleri insülin sentezleyip salgımlarken, α hücreleri glukagon sentezleyip salgımlarlar. Pankreasın fonksiyonunda meydana gelen bozulmalar, insülin ve glukagon üretiminde düzensizliğe neden olabilir. Bu da obezite ve metabolik sendrom ile ilişkili olan insülin direnci ve tip II diyabete neden olur. Son yıllarda yapılan çalışmalar ortaya koymuştur ki BPA, glukoz metabolizmasını değiştirerek, karaciğer fonksiyonları üzerinde olumsuzluklara yol açarak ve pankreastan insülin üretimini değiştirerek, endokrin bozucu etkiler ortaya çıkarmaktadır. BPA'nın kas dokusunda glukoz kullanımını değiştirdiği ve yağ dokusunun endokrin fonksiyonuna engel oluşturduğu rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalar, BPA'nın merkezi sinir sistemini etkileyerek glukoz metabolizmasının nöroendokrin düzenlenmesini olumsuz etkilediğini ve neticede glukoz intoleransı ve insülin direnci gibi glukoz metabolizması rahatsızlıklarını uyardığını, ortaya koymuştur. Dolayısıyla BPA, obezite ve metabolik sendromun ortaya çıkmasında, önemli bir risk faktörü olarak görünmektedir (Menale ve ark., 2016).

İnsanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalar ile *in vitro*, *eks-vivo* ve *in-vivo* modeller üzerinde yapılan prelinik çalışmalar, çoğunlukla düşük dozlardaki BPA'nın tip II diyabet (DM) gelişim riskini arttırabileceğini göstermiştir. Bunu da; direkt olarak pankreatik hücrelerini etkileyerek, insülin ve glukagon salgılanmasını bozarak, β hücre gelişimi inhibisyonunu ve apoptozunu tetikleyerek, kas, karaciğer ve yağ hücre fonksiyonunu etkileyerek ve insülin direnci durumunu harekete geçirerek gerçekleştirdiği ifade edilmiştir (Provvissiero ve ark., 2016).

Doğum öncesi ve doğum sonrası BPA'ya maruziyetin, glukoz metabolizması ile ilgili olan genlerin (Pdx1, Jack, Igf2, Srebf1 ve Srebf2) ekspresyonunu düzensizleştirdiği rapor edilmiştir. BPA'nın, normal glukoz ve lipid homeostazisini olumsuz etkileyen epigenetik bozuklukları uyardığı ve tip II diyabete neden olabileceği belirtilmiştir (Rahmani ve ark., 2018).

Epidemiyolojik veriler, insan idrarında tespit edilen BPA miktarı ile değişen açlık kan şekeri ve HbA1c seviyeleri arasında pozitif bir ilişki olduğunu ortaya

koymuştur. Dolayısıyla, BPA'ya maruziyet ile diyabet arasında ilişkinin olduğu ifade edilmiştir (Mirmira ve Evans-Molina., 2014).

2.3. Bisfenol A'nın Pankreas β Hücreleri Üzerindeki Etkileri

Pankreatik β hücrelerinde östrojen reseptör α ve β 'nin varlığını belirleyen Alonso-Magdalena ve ark. (2008), erkek farelerden izole edilen Langerhans adacıklarını, BPA'nın düşük dozlarına *in vitro* ortamda maruz bıraktıklarında, β hücrelerindeki insülin içeriğinin, östrojen reseptör α (ER α)'nin aktivasyonunun sonucunda arttığını, göstermişlerdir.

Erişkin farelerin, E2 ve BPA'ya tek doz enjeksiyon (10 μ g/kg) ile maruz bırakılmaları sonrasında, glisemide hızlı bir düşüşün meydana geldiği ve bunun artan plazma insülin düzeyi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. E2 ve BPA'ya daha uzun süreli maruziyetin ise pankreatik β hücre insülin içeriğini, ER'ye bağımlı bir tarzda, artırdığı ifade edilmiştir. Bu etkinin muameleden 2 gün sonra bile gözlenebildiği ve 10 μ g/kg/gün gibi düşük dozlarda bile ortaya çıktığı, belirlenmiştir. E2 ve BPA uygulamasından 4 gün sonra farelerde hiperinsülinemi geliştiği ve glukoz/insulin tolerans testlerinde değişimlerin meydana geldiği gözlenmiştir. Dolayısıyla, endojen ve çevresel östrojenlerin anormal düzeylerine maruz kalmanın, tip II diyabet, hipertansiyon ve dislipidemi gelişim riskini artırabileceği ifade edilmiştir (Alonso-Magdalena ve ark., 2006).

ER α 'nın E2 ve çevresel östrojen BPA tarafından aktive edilmesi, ERK1/2'nin fosforilasyonunu kapsayan klasik olmayan östrojen aktıveli yolak vasıtasıyla, insülin biyosentezini uyarır. ER α 'nın E2'nin fizyolojik konsantrasyonları tarafından aktivasyonu, endokrin pankreasın gebeliğe adaptasyonunda önemli bir rol oynayabilir. Diğer taraftan ER α , artan E2 seviyesi veya BPA gibi çevresel bir östrojen tarafından aşırı bir şekilde uyarılması, yüksek insülin uyarım sinyali üretir. Bu durum, β hücre tükenmişliğine yol açabileceği gibi kasta ve karaciğerde insülin direncini tetikleyebilir. Dolayısıyla, tip II diyabet gelişimini meydana getirebilir (Nadal ve ark., 2009).

β hücrelerinin E2 ve BPA'ya nM konsantrasyonlarda maruz bırakılması (1-10 nM), potasyum kanallarını hızlıca inhibe eder ve ER β 'ya bağımlı bir mekanizmayla glukoz ile uyarılan insülin salınımını artırır (Soriano ve ark., 2009, 2012).

Ropero ve ark. (2008), BPA'nın *in vitro*'da, farenden izole edilen Langerhans adacıklarının insülin salgılayan β hücreleri ve glukagon salgılayan α hücreleri üzerinde, hızlı genomik olmayan etkiler gösterdiğini bildirmişlerdir. BPA'nın 10 $\mu\text{g/kg}$ konsantrasyonuna tek doz enjeksiyon ile maruz bırakılan farelerde plazma insülin seviyesinin hızlıca arttığı ve bu artışla eş zamanlı olarak gliseminin azaldığı ifade edilmiştir. Fareler BPA'nın 100 $\mu\text{g/kg/gün}$ konsantrasyonuna 4 gün boyunca maruz bırakıldıklarında ise, yemek sonrası hiperinsülinemi ve insülin direnci ile birlikte, β hücresi insülin içeriğinin arttığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla BPA'nın, erkek farelerde pankreatik β hücre fonksiyonunu bozduğu ve insülin direncine yol açtığı belirtilmiştir. Aynı zamanda BPA'ya maruziyet sonrasında meydana gelen kan glukoz dengesindeki değişimin, tip II diyabet gelişim riskini artırabileceğini ifade etmişlerdir.

BPA'nın 20 ve 200 mg/kg v.a./gün konsantrasyonlarına 30 gün boyunca oral gavaj ile maruz bırakılan *Wistar albino* ırkı ratların gastrocnemius kasında, BPA'nın glukoz oksidasyonu ve insülin sinyal molekülleri üzerindeki etkilerini araştıran Indumathi ve ark. (2013), BPA'nın kasta glukoz oksidasyonunu düşürmesine rağmen, açlık kan glukoz düzeyini değiştirmediğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, bu durumun hiperinsülinemi ve düşük serum testosteron seviyeleri ile sonuçlandığını ifade etmişlerdir. Kasta (hem plazma membranı hem de sitosolik fraksiyonda), insülin reseptörü (IR), protein kinaz B (Akt) ve glukoz transporter 4 (GLUT-4) mRNA seviyelerinde anlamlı değişimlerin meydana gelmediğini ancak IR, Akt ve GLUT-4 protein seviyelerinde azalmanın olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak, BPA'nın insülin sinyal moleküllerini olumsuz etkileyerek iskelet kasında glukoz alımını ve oksidasyonunu azalttığı göstermişlerdir.

BPA'nın 5, 50, ve 500 $\mu\text{g/kg}$ v.a./gün konsantrasyonlarına oral gavaj ile 8 hafta boyunca maruz bırakılan ratlarda, plazma glutatyon içeriğinin, SOD aktivitesinin, glutatyon peroksidaz aktivitesinin ve katalaz aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Öte yandan, BPA'nın plazma tiyobarbitürat reaktif madde düzeyini ve nitrik oksit düzeyini artırdığı belirlenmiştir. Plazma total kolesterol, trigliserit, düşük dansiteli lipoprotein, yüksek dansiteli lipoprotein, insülin ve glukoz düzeylerinin, BPA maruziyeti sonrasında değişmediği bildirilmiştir. BPA'nın en yüksek konsantrasyonunda, Langerhans adacıklarında, insülin pozitif β hücre yüzdesini anlamlı bir şekilde artırdığı

gözlenmiştir. BPA maruziyetinin oksidatif strese neden olduğu ve pankreatik β hücre fonksiyonunu bozduğu ifade edilmiştir (Özaydın ve ark., 2018).

Kalsiyum iyonu uyarımı, β hücrelerinden insulin sentezinin ve salgılanmasının gerçekleştirilmesine katkı sunar. BPA'nın plazma insulin seviyelerini ve insulin transkripsiyon faktörlerini yükselttiği ancak insulin artışı ile oransal olarak plazma glukoz dengesini sağlayamadığı veya artan glukoz düzeyini düşürmediği rapor edilmiştir. BPA'nın streptozotosine karşı, pankreatik β hücre canlılığını artırdığı, bununla birlikte BPA tarafından artırılan insülin seviyesine rağmen serum glukoz dengesinin düzenlenmediği gözlemlenmiştir. BPA'nın, özellikle streptozotosin ile tip I diyabet oluşturulmuş modelde, β hücresi kalsiyum homeostazisinde bozulmaya ve endoplazmik retikulum stresinde artışa neden olarak, insülin direncine yol açtığı bildirilmiştir (Ahn ve ark., 2018).

BPA'nın çeşitli konsantrasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakılan insan adipoz dokusunda, proenflamatuar genlerin (*IL6*, *IL1B*, *TNFA*) ve adipokinlerin (*ADIPOQ*, *FABP4*) ekspresyonlarında azalmaların meydana geldiği ve adipositlerde glukoz alımının insulin sinyalinden bağımsız olarak düştüğü bildirilmiştir. BPA maruziyeti ile ilişkili olan bu mekanizmaların, insulin direnci gelişimine neden olabileceği ifade edilmiştir (Ahmed ve ark., 2020).

BPA'nın 100 $\mu\text{g/kg/gün}$ konsantrasyonuna dört hafta boyunca subkutan olarak maruz bırakılan farelerde, hipergliseminin uyarıldığı ve homeostatik model değerlendirme β hücre indeksinin azaldığı belirlenmiştir. Bu olumsuz etkilere ek olarak, serum insulin, adiponektin, testosteron, total antioksidan kapasite ve malondialdehit düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte BPA uygulanan bireylere oral gavaj ile verilen soya ekstresinin (150 mg/kg), BPA'nın oluşturduğu olumsuz etkileri azalttığı bildirilmiştir (Veissi ve ark., 2018).

BPA'nın 100 mg/kg/gün dozuna 14 gün boyunca maruz bırakılan ratların pankreasının endokrin bölümünde, histopatolojik değişikliklerin meydana geldiği ve pankreatik β hücrelerindeki $\text{ER}\alpha$ immünoreaktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, BPA'ya maruz bırakılan ratlara uygulanan koenzim Q10 (10 mg/kg/gün)'nun, BPA'nın oluşturduğu olumsuz etkiler üzerinde, koruyucu etki göstermediği bildirilmiştir (Yıldız ve ark., 2020).

2.4. Bisfenol F

Bisfenol ailesine ait olan BPF'nin, kimyasal ismi bis(4-hidroksifenil) metan'dır. Yapısal olarak, metilen vasıtasıyla bağlanan iki fenol halkasına sahiptir. BPF'nin kullanımı ve birçok ülkedeki üretimi, BPA epoksi rezinlerine kıyasla düşük vizkositesinden ve solventlere karşı daha dayanıklı olmasından dolayı, artmaktadır. BPF, epoksi rezinlerin ve polikarbonatların üretiminde kullanılmaktadır. Bu nedenden dolayı da endüstriyel sektörün birçok uygulama alanında BPF ile karşılaşmakta ve BPF dereceli olarak BPA'nın yerini almaktadır. Gıda paketlenmesi, boru kaplamaları, diş dolguları, endüstriyel döşemeler, derz, elektrik vernikleri, kaplamalar, vernikler, plastikler ve adezivler, BPF'nin kullanıldığı uygulamaları içerir. BPF'nin varlığı, kişisel bakım ürünleri, meşrubat ve enerji içecekleri, konserve gıdalar, hazır yemekler, gıdalar ile temaslı geri dönüşüm kağıtları, evlerde günlük olarak kullanılan atık kağıt veya kağıt ürünleri, ticari süt ve külotlu çorap gibi birçok tüketici ürününde, tespit edilmiştir. BPF'nin gıda maddelerinde (et ve et ürünleri, balık ve deniz mahsülleri, sebzeler vs.) baskın bulunan bir bisfenol tipi olduğu ve gıda maddelerindeki varlığının, total bisfenoller içerisinde % 17'ye karşılık geldiği ifade edilmiştir (Usman ve ark., 2019).

2.5. BPF'nin *In Vivo* Deneylerde Belirlenen Olumsuz Etkileri

BPF'nin 20, 100 ve 500 mg/kg/v.a. konsantrasyonlarına, oral gavaj ile 28 gün boyunca, maruz bırakılan ratların organ ağırlıklarında artışların meydana geldiği bildirilmiştir. Erkek bireylerde, serum triiyodotirozin (T3) ve tetraiyyodotirozin (T4) düzeylerinin yükseldiği, dişilerde ise T4 düzeyinin yükseldiği ancak T3 düzeyinin azaldığı gözlenmiştir. Erkek bireylerde spermatolojik açıdan anormal bir bulgu gözlenmemiştir. Dişi bireylerde eritrosit sayısının, hematokrit değerlerinin ve hemoglobin konsantrasyonunun azaldığı ancak erkek bireylerin kan değerlerinde herhangi bir değişimin olmadığı belirlenmiştir. Erkek bireylerde, serum total kolesterol ve kan üre azot değerlerinin düştüğü, dişilerde ise serum kolesterol, glukoz ve albumin düzeylerinde azalmaların olduğu tespit edilmiştir. Histolojik olarak incelenen, prostat, seminal vezikül, ovarium, testis, uterus, meme bezi, beyin, tiroid, adrenal bez, karaciğer, dalak, böbrek, mide, bağırsak, timus, paratiroid ve hipofiz dokularında, herhangi bir değişimin olmadığı, sadece mezenterik lenf nodlarının subkapsüler sinüsünde

dilatasyonun meydana geldiği bildirilmiştir. Karaciğerde histopatolojik bir değişim gözlenmemesine rağmen, BPF'nin en temel toksik etkisinin, klinik biyokimyasal bulgular ve karaciğer ağırlığına dayanılarak, karaciğer ile ilgili olduğu belirtilmiştir (Higashihara ve ark., 2007).

BPA ve analogları (BPB, BPF ve BPS)'na, gebeliğin 1. gününden 21. gününe kadar içme suyu ile 5, 25 ve 50 mg/L konsantrasyonlarda maruz bırakılan sıçanların erkek yavru bireylerinin üreme dokularında, antioksidan enzim düzeylerinde değişimlerin meydana geldiği, plazma folikül uyarıcı hormon, lüteinizan hormon, testosteron düzeylerinin azaldığı tam tersine östrojen seviyesinin yükseldiği ve testis/epididimis dokularında histolojik değişimlerin meydana geldiği bildirilmiştir (Ullah ve ark., 2019a).

BPF'ye *in vitro*'da iki saat boyunca maruz bırakılan rat testis dokularında, katalaz (CAT), süperoksit dizmutaz (SOD) ve peroksidaz (POD) aktivitelerinde ve testiküler testosteron düzeyinde anlamlı değişimler gözlenmemesine rağmen, reaktif oksijen türleri (ROS) ile lipid peroksidasyon seviyelerinde artışların olduğu belirlenmiştir. BPF'ye 28 gün boyunca maruz bırakılan erkek ratlarda ise, BPF'nin doza bağımlı bir şekilde etki gösterdiği, yüksek doz BPF konsantrasyonunda (100 mg/kg v.a./gün) testis protein düzeyinin, CAT, SOD ve POD aktivitelerinin azaldığı ve ROS ile lipid peroksidasyon seviyesinin yükseldiği rapor edilmiştir. Sonuç olarak, BPF'nin epididimisteki sperm sayısında düşüş meydana getirdiği, erkek üreme hormonları üzerine antagonistik etkiler gösterdiği, testis histolojisinde değişimlere sebep olduğu ve testiste oksidatif stresi uyardığı belirlenmiştir (Ullah ve ark., 2019b).

BPA ve analogları (BPF, BPS ve BPZ)'nın, zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarında, tiroid gelişimi ve tiroid hormon taşınımı/metabolizması ile ilişkili genlerde transkripsiyonel değişimlere ve tiroid hormonlarının sentezinde bozulmalara neden olarak, tiroid bezinin fonksiyonunu olumsuz etkiledikleri bildirilmiştir (Lee ve ark., 2019).

BPF'nin 1 mg/L konsantrasyonuna 21 gün boyunca maruz bırakılan zebra balığı (*Danio rerio*)'nda, testis ve ovaryum histolojisinde değişimler, cinsiyet hormonlarının seviyelerinde değişimler, erkek bireylerde karaciğer vitellogenin gen ekspresyonunda artış ve hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninde yer alan genlerin ekspresyonlarında değişimler, meydana geldiği bildirilmiştir (Yang ve ark., 2017).

BPF'ye 0.1, 1, 10, 100 ve 1000 mg/L maruz bırakılan sazan balığı (*Cyprinus carpio*)'nda hepatosomatik indeks değerinin yükseldiği, karaciğerde total antioksidan kapasitenin azaldığı, CAT aktivitesinin düştüğü ve malondialdehit seviyesinde artışların olduğu belirlenmiştir. BPF maruziyetinin, karaciğerde nitrik oksit seviyesini ve nitrik oksit sentaz aktivitesini artırdığı, kompleman bileşen 3 ile immunoglobulin M içeriğinin yanı sıra enflamatuar sitokin genlerinin ekspresyonunu uyardığı gözlenmiştir. Ek olarak, NF-kB p65 gen ekspresyonu seviyeleri ile yüksek ROS içeriği ve NF-kB yolağı ile ilişkili genler arasında korelasyon olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak BPF'nin etki şeklinin, NF-kB sinyal yolağı ile ilişkili olabileceği ve immun sistemi etkileme kapasitesinin, BPA ile kıyaslanabilir düzeyde olabileceği, ifade edilmiştir (Qiu ve ark.,2018).

2.6. BPF'nin *İn Vitro* Deneylerde Belirlenen Olumsuz Etkileri

BPF'nin hücrelerde kromozomal aberasyonlara, sitotoksik ve genotoksik etkilere, DNA hasarına, hücresel fonksiyon bozukluğuna, adiponektin sentez ve salgılamasında azalmaya neden olduğu, *in vitro* çalışmalarda belirlenmiştir (İyigündoğdu ve ark., 2020). Yapılan *in vitro* çalışmalar, BPF'nin ER'ye bağlanarak endokin bozucu etkiler gösterebildiğini ancak östrojenik etkisinin BPA ve BPA'nın diğer analoglarına kıyasla daha zayıf olduğunu göstermiştir (Sur ve ark., 2017).

Bir *in vitro* çalışmada ise BPA ve analoglarının, östrojen reseptörleri ile etkili bir şekilde etkileşebildikleri belirtilerek, BPA ve BPF'nin potent insan ER antagonistleri oldukları (BPA > BPF) bildirilmiştir. Çalışmada, BPA türevlerinin çoklu çekirdek reseptörlerini bozabilecekleri ve endokrin sistemi bozucu etkiler gösterebilecekleri ifade edilmiştir (Molina-Molina ve ark., 2013).

BPF ve BPS'ye kısa süreli maruz bırakılan fare pankreatik β hücrelerinde, glukoz ile uyarılan insülin salgılamasının arttığı gözlenmiştir. Bu durumun, kısa süreli uygulamalarda, potasyum kanallarının inhibe edilmesi sonucunda meydana geldiği ifade edilirken, uzun süreli maruziyette voltaj-kapılı kalsiyum, sodyum ve potasyum kanallarının düzenlenmesi ile ilgili olabileceği, bildirilmiştir. Bu bisfenollerin ER β agonistleri oldukları ve ekstrasülnöler olarak harekete geçirilen bir yolağı aktive ettikleri belirlenmiştir (Marroqui ve ark., 2021).

BPA ve analogları (BPF, BPS ve BPAF)'na maruz bırakılan insan eritrositlerinde, sitosolik kalsiyum iyon konsantrasyonunun yükseldiği, fosfatidilserin translokasyonun arttığı, kalpain ve kaspaz-3 aktivitelerinin indüklendiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, BPA ve analoglarının eritrositlerde apoptozu uyarıcı potansiyele sahip oldukları bildirilmiştir (Maćczak ve ark., 2016).

İnsan eritrositleri, BPA ve analogları (BPS, BPF ve BPAF)'na maruz bırakıldıklarında, ROS seviyesinde artışın, lipid peroksidasyon düzeyinde yükselmenin, GSH seviyesinde düşüşün meydana geldiği ve antioksidan enzim aktivitelerinde değişimlerin gözlemlendiği, bildirilmiştir (Maćczak ve ark., 2017).

BPA ve analogları (BPS, BPF ve BPAF)'nın insan hepatosellüler karsinom (HepG2) hücrelerinde canlılığı azalttıkları, DNA çift iplikciği kırıklarına sebep oldukları, *CYP1A1* ve *UGT1A1* gen ekspresyonlarını artırdıkları belirlenmiştir. BPF ve BPAF'nin, BPA'nın yerine kullanılabilecek güvenilir alternatifler olarak düşünülmemeleri gerektiği, ifade edilmiştir (Hercog ve ark.,2019).

BPAF ve BPF'ye maruz bırakılan insan meme kanseri hücreleri (MCF-7)'nde, canlılığın 0.01–1 μM konsantrasyon aralığında arttığı ancak, 25 ve 50 μM konsantrasyonlarda azaldığı belirlenmiştir. BPAF ve BPF'nin, 0.01–10 μM konsantrasyon aralığında DNA hasarını, ROS düzeyini ve hücre içi Ca^{2+} seviyelerini önemli ölçüde artırdığı gözlenmiştir. Bu etkilerin ise, ROS süpürücüsü N-asetilsistein tarafından azaltıldığı tespit edilmiştir (Lei ve ark., 2017).

BPA ve analoglarının fare spermatosit GC-2 hücre hattında, apoptozu indüklediği ve hücrel hasara neden olduğu bildirilmiştir. Maruziyet sonrasında hücrelerde steroid reseptörü ve steroidogenezis ile ilişkili gen ifadelerinin değiştiği ve DNA metilasyonunun yükseldiği gözlenmiştir. BPF ve BPS'nin BPA'nın alternatifi olarak kullanılmasının, erkek üreme sağlığı açısından, güvenilir olmadığı ifade edilmiştir (Sidorkiewicz ve ark.,2018).

BPA'nın insan adrenokortikal karsinom (H295R) hücrelerinde hormon üretimini baskıladığı, BPF'nin ise E2 ve testosteron düzeylerini yükselttiği gözlenmiştir (Feng ve ark., 2016).

Köse ve ark. (2020), RWPE-1 hücrelerini BPA ve analogları (BPF ve BPS)'na 24 saat süre ile maruz bıraktıkları çalışmalarında, sitotoksik etki derecesinin sırasıyla; BPA>BPF>BPS olduğunu bildirmişlerdir. Hücrelerde maruziyet sonrasında antioksidan

savunma sistemi indikatörlerinin (SOD, GPx, GR aktiviteleri ve GSH düzeyi) değişimler gösterdiğini, aynı zamanda DNA onarım proteinleri (OGG1, Ape-1 ve MyH) ve p53 protein seviyelerinde azalmaların olduğunu, bildirmişlerdir.

BPF'nin 7 farklı konsantrasyonuna (0, 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250 ve 500 μ M), 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhyncus mykiss*) hepatositlerinde sitotoksitenin, doz artışı ile birlikte yükseldiği ve BPF'nin hepatitlerde antioksidan dengeyi bozarak, hücrel hasara yol açtığı bildirilmiştir (Aykut ve Kaptaner, 2021).

2.7. Tez Çalışmasının Amacı

Bu çalışmada BPF'nin erkek ratlarda pankreas üzerindeki toksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda;

1. BPF'nin, pankreasta meydana getirdiği histopatolojik değişimler incelenmiştir.
2. BPF'nin, pankreatik Langerhans adacık çapı ve alanı üzerindeki etkisi araştırılmıştır.
3. BPF'nin, Langerhans adacıklarında, insulin sentezleyen β hücrelerinin yüzdesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.
4. BPF'nin, glukoz homeostazisinde belirteç olarak kullanılan, açlık kan glukoz düzeyi, total kan HbA1c ve serum C-peptid ile insulin düzeyleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.
5. BPF'nin, pankreas antioksidan sistem belirteçleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanı

Çalışmada ağırlıkları 160-290 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 gereken 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: 2022/03-20).

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
BPF, 4,4'-Dihidroksidifenilmetan, $C_{13}H_{12}O_2$, saflık: %98)	Alfa Aesar	AAA1141706
İmmunohistokimya kiti” (Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detetion Kit-Micropolymer)	Abcam	ab236466
İnsülin primer antikor	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	MA5-12037
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. Deneyisel 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 F (BPF, 4,4'-dihidroksidifenilmetan, $C_{13}H_{12}O_2$, saflık: %98, Alfa Aesar, Kandel, Almanya)'nin, etanol-zeytinyağı karışımı (1:4 v/v) içerisinde tamamen çözünmesi sağlandı (Pal ve ark., 2017; Silva ve ark., 2018). Hayvanlara oral gavaj ile günlük olarak uygulanan BPF

konsantrasyonları, Higashihara ve ark. (2007)'na 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)'nın 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 BPF'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 BPF'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 BPF'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 aktarılırken, total kan HbA1c ölçümü için EDTA'lı tüplere alındı. Daha sonra, her hayvanın pankreasının bir bölümü histolojik incelemeler için, diğer bir bölümü ise antioksidan indikatörlerin ölçümü için dikkatlice çıkartıldı.

3.5. Histolojik Prosedürler

Hayvanlardan çıkartılan pankreas dokuları, % 10'luk nötral tamponlu formaldehit fiksatiyi 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, H & E ile boyandı. H & E ile boyanan kesitler, kamera ataçmanlı mikroskop ile incelendikten sonra, uygun büyütmede fotoğrafları çekildi.

3.6. Pankreas Langerhans Adacıklarında β Hücrelerinin İmmunohistokimyasal Olarak Boyanması

Langerhans adacıklarında insülin-pozitif β hücrelerinin işaretlenmesi için immunohistokimya yöntemi tercih edildi. Bu yöntem uygulanırken, spesifik “insülin monoklonal primer antikoru” ve avidin-biyotin mikropolimer işaretleme sistemine göre çalışan ticari bir “immunohistokimya kiti” kullanıldı. İmmun boyama esnasında kitin protokollerine riayet edildi. Adeziv kaplı lamlara aktarılan pankreas kesitleri, deparafinize ve rehidrate edildikten sonra, tris tuz tamponu (TBS: 20 mM Tris 140 mM NaCl, pH: 7.6) ile bir kaç kez yıkandı. Kesitler, yukarıda belirtilen immunohistokimya kiti içinde sağlanmış olan H_2O_2 ile inkübe edilerek dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi inaktif hale getirildi. TBS ile yıkamadan sonra kesitlere bu kez kitte mevcut olan protein bloke edici solüsyon damlatılarak, protein blokasyonu sağlandı. Daha sonra kesitler, içerisinde % 1 oranında BSA bulunan TBS ile 1:40 oranında sulandırılmış olan, insülin primer antikoru ile bir gece boyunca +4 °C’de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon, kesitlerin kurumaması için, nemli oda kullanılarak 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 yıkandıktan sonra DAB kromojen solüsyonu ile muamele edildi ve β hücrelerinde kahverengi renk oluşumu gözleninceye kadar (1-3 dk) bu solüsyonda bekletildi. 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. Adacık Morfometrisi ve β Hücre Sayımı

Deney gruplarındaki bireylerden ($n = 7$) alınan ve H&E ile boyanmış olan pankreas kesitlerinde, Langerhans adacığı çap ve alan ölçümleri gerçekleştirildi. Bunun için, deney gruplarındaki her bireye ait olan pankreas kesitinin birbirinden farklı en az 10 farklı sahasında yer alan Langerhans adacıklarından, mikroskop ile bağlantılı bir kamera (Leica DFC490, Leica Microsystems) kullanılarak, $200\times$ veya $400\times$ büyütmede, fotoğraflar çekildi. Adacık çap ve alan ölçümleri <https://imagej.nih.gov/ij/download.html> internet adresinden indirilebilen, ImageJ 1.46 yazılımından yararlanılarak gerçekleştirildi. Çekilen fotoğraflar yazılıma aktarıldıktan sonra, yazılımın “analiz” eklentisi kullanılarak adacık çap ve alan ölçümleri yapıldı. Adacık çap ve alan ölçümleri, yazılımın kullanıcı rehberi (ImageJ User Guide, version revised edition IJ 1.46r)’ndeki tariflere uyularak ve yazılımın analiz eklentisi kullanılarak, gerçekleştirildi. Adacık çap ölçümünde belirlenen kriterler ise, Dra ve ark. (2019) ve Hanalp ve ark. (2021)’ndan bazı modifikasyonlar yapılarak belirlendi. Kısaca; bir bireye ait olan pankreas kesitindeki en az 10 farklı Langerhans adacığının çekilen resimler üzerinde en ve boy uzunlukları, yazılımın “analiz” eklentisi kullanılarak, ölçüldü. Daha sonra her adacık için belirlenen en ve boy uzunluklarının ortalaması alındı. Bu şekilde, bireyin her adacığı için “ortalama çap uzunluğu” belirlendi. Bireyin her adacığı için elde edilen “ortalama çap uzunluğu” değerlerinin ortalaması alınarak, o birey için “ortalama Langerhans adacık çapı” belirlendi. Gruplardaki her hayvan için belirlenen “ortalama Langerhans adacığı çap değerleri” istatistiksel analizler için kullanıldı. Alan ölçümü için, çap ölçümüne benzer olarak, her bireyin en az 10 farklı Langerhans adacığından çekilmiş olan fotoğraflar, ImageJ 1.46 yazılımına aktarıldı. Kısaca; bir bireye ait pankreas kesitindeki en az 10 farklı Langerhans adacığının alanı ölçüldü. En az 10 farklı Langerhans adacığından elde edilen alan ölçüm sonuçlarının ortalaması alınarak, bireye ait olan “ortalama adacık alanı” belirlendi. Her hayvan için “ortalama Langerhans adacığı alan değeri” belirlendikten sonra elde edilen veriler, istatistiksel analizler için kullanıldı.

Langerhans adacıklarında immunohistokimya yöntemi ile boyanan β hücrelerinin sayımı, Hanalp ve ark. (2021)’nın belirttiği şekilde gerçekleştirildi. Her bireyin immunohistokimya ile boyanmış olan pankreas kesitinin, birbirinden farklı en az

10 farklı sahasında yer alan Langerhans adacıklarından, mikroskop ile bağlantılı bir kamera kullanılarak, 200× veya 400× büyütmede, fotoğraflar çekildi. Çekilen fotoğraflar, ImageJ 1.46 yazılımına aktarıldı. Daha sonra bu yazılımın hücre sayıcı eklentisi kullanılarak, insulin-pozitif ve negatif hücrelerin sayımı yapıldı. Sayımın yapıldığı her adacık için β indeks değeri, aşağıda verilen eşitliğe göre, hesaplandı:

β hücre indeksi = [Adacıkta sayılan insülin pozitif hücre sayısı ÷ Toplam hücre sayısı (negatif + pozitif)] $\times 100$ (3.6.1)

Bir birey için en az 10 farklı adacıktan elde edilen indeks değerlerinin ortalamaları alındıktan sonra, bireye ait “ortalama β hücre indeksi” değeri belirlendi. Her birey için hesaplanan, “ortalama β hücre indeksi” verileri, istatistiksel analizler için kullanıldı.

3.8. Biyokimyasal Analizler

Serum glukoz ve total kanda HbA1c düzeyleri, Cobas 6000 otoanalizör cihazı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ve bu cihaza spesifik olarak kullanılan glukoz ölçüm kiti (Glucose HK Gen.3, Cobas Integra / Cobas c systems, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ve HbA1c ölçüm kiti (Tina-quant HbA1c Gen.3, Cobas Integra / Cobas c systems, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılarak belirlendi. Sonuçlar, mg/dL olarak ifade edildi. Serum C-peptid ve insülin seviyeleri ise rat C-peptid ve rat insülin ELISA kitleri (Hangzhou Eastbiopharm Co., Ltd., Hangzhou, Çin) kullanılarak ve bu kitlerin protokollerine uyularak belirlendi. Ölçümler mikropłaka okuyucu ile yapıldı. Sonuçlar; C-peptid düzeyi için pg/mL olarak, insulin düzeyi için mIU/L olarak verildi.

3.9. Antioksidan Savunma Sistemi Belirteçlerinin Tayini

3.9.1. Doku homojenizasyonu

Derin dondurucuda saklanan pankreas dokuları, homojenizasyon öncesinde çıkartılarak erimeleri sağlandı. Daha sonra, dokular PBS (pH: 7.4) ile ultrasonik parçalayıcı kullanılarak, 5 dk. boyunca, homojenize edildi. Homojenatlar, $15000 \times g$ 'de

25 dk boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak, tüplere aktarıldı. Yapılan bu işlemlerin hepsi, +4 °C veya buz üzerinde gerçekleştirildi. Elde edilen süpernatantlar, antioksidan savunma sistemi belirteçlerinin analizleri ve total protein tayini için -20 °C’de saklandı.

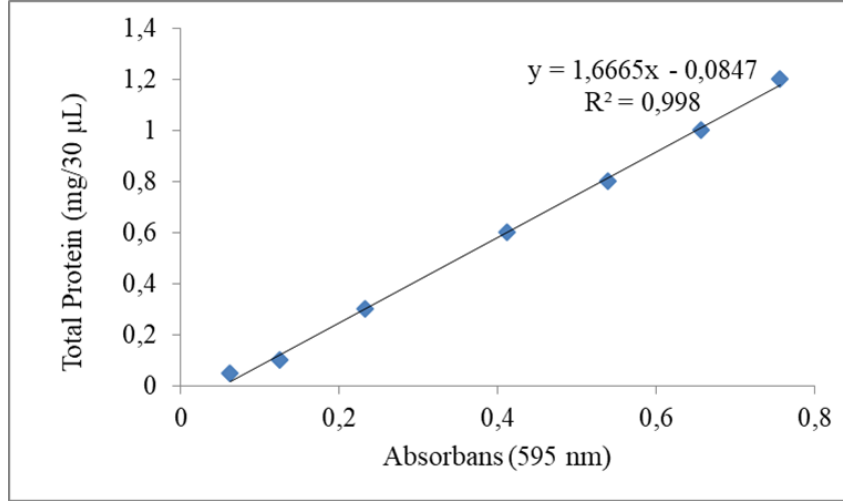
3.9.2. Total protein tayini

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, sığır serum albümin (BSA)’in 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×): 100 mg Coomasie Blue G, 50 mL absölit 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 hazırlana solüsyonun, distile su ile 1:5 oranında sulandırılması ile hazırlanır.

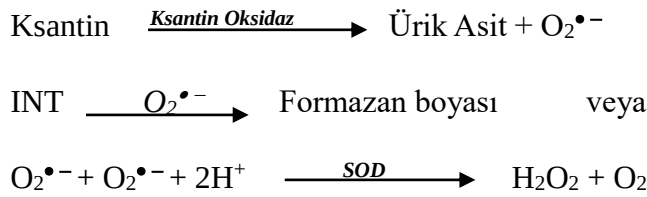
Yöntem: Standartlar hazırlanmadan önce 10 mg/mL stok BSA hazırlandı. Stoktan seri sulandırmalar yapılarak 0.05 ile 1.20 mg/30 µL aralığında 7 adet standart oluşturuldu. Örnek, kör ve standartlar Bradford solüsyonu ile muamele edildikten sonra, 20 dk boyunca karanlık ortamda inkübe edildi. Spektrofotometre köre karşı sıfırlandıktan sonra, örnek ve standartların absorbansı, 595 nm dalga boyunda ölçölldü. Standartlara karşılık gelen absorbans değeerlerine 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.

3.9.3 Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini

Prensip: SOD, oksidatif enerji basamağında üretilen, toksik süperoksit radikalinin ($O_2^{\bullet-}$), 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 içeriği	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 absobansı (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 dakika 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).

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

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

3.9.4. Katalaz aktivitesi tayini

Prensip: Katalaz (CAT), hidrojen peroksitin suya ve oksijene ayrışmasını katalizler:



Süpernatantlarda CAT aktivitesi 240 nm dalga boyunda H_2O_2 'nin tüketilme esasına dayanan spektrofotometrik metoda göre belirlendi (Aebi, 1974). H_2O_2 , ışığı 240 nm dalga boyunda absorbe eder. Bu yöntemle göre CAT tarafından H_2O_2 '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 (KH_2PO_4) ve B (Na_2HPO_4) 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. H_2O_2 solüsyonu: Absorbansı 0.500 nm'ye ayarlanmış olan H_2O_2 '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 şişedeki tampona 10-20 µL miktarında H_2O_2 ilave edilir ve absorbans 0.500 nm oluncaya kadar bu işleme devam edilir. H_2O_2 ilavesi yapılırken şişe ara ara karıştırılır.

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

Kimyasal	Molekül Ağırlığı	50 mM için	Son Hacim (distile su)	Solüsyon Adı
KH_2PO_4	136.09 g/mol	6.805 g	1000 mL	A
Na_2HPO_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 absorbansı okunur. Absorbans azalması, her 15 sn’de bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile kaydedilir (aktivite hızlı ilerliyorsa 10 sn’de bir kayıt yapılır ve lineer azalma tespit edilirse okuma sonlandırılabilir). Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının en yüksek (A_1) ve en düşük (A_2) 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: absorbans/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 μ mol/mL=43.6 nmol/mL)

$$\text{CAT aktivitesi (nmol/dk/mL)} = \frac{\Delta A}{43.6} \times \text{Küvet içi sulandırma} \left(\frac{V_t}{V_0} \right) \times \text{SO}$$

ΔA : Absorbansın 240 nm dalga boyunda dk başına değişimi

V_t : Toplam hacim

V_0 : Örnek hacmi

SO: Süpernatant sulandırma oranı

Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 5 ölçüm yapıldı. Sonuçlar, tüketilen H₂O₂ (μ mol) / 5×10^5 hücre olarak ifade edildi.

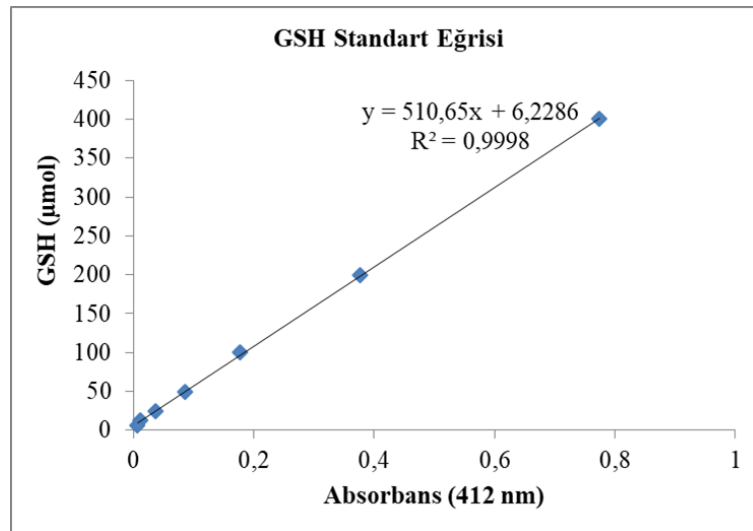
3.9.5. Redükte glutatyon tayini

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.

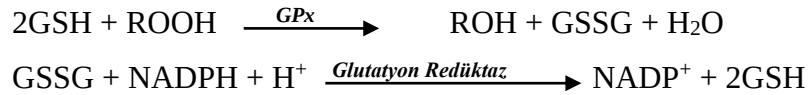
Yöntem: Tüplerin içerisine 200 μL süpernatantlardan alındıktan sonra üzerine 1 mL fosfat tamponu eklendi. Vortekslenen tüpler, sıcak su banyosunda 60 $^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika bekletildi. Tüpler oda sıcaklığına getirildikten sonra her tüpe 200 μL DTNB ayırıcı eklenerek Shimadzu UV/VIS-1201 spektrofotometrede 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 $\mu\text{mol/dk/g}$ protein olarak ifade edildi.



Şekil 3.2: GSH standart eğrisi.

3.9.6. 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: Glutasyon peroksidaz 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 absorbansı, 340 nm dalga boyunda 37 °C'de, 1 dk sonra spektrofotometrik olarak ölçüldü. Absorbans okuması 1 dk ve 2 dakika sonra tekrar edildi.

Hesaplama: GPx aktivitesi, kittede 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

3.9.7. Glutasyon-S-transferaz aktivitesi tayini

Prensip: GST, elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunu GSH'ın –SH grubu ile tepkimesini katalizleyerek sağlar. Enzimin aktivitesi tayini, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'nin GSH ile konjugasyonu sırasında meydana gelen absorbanstaki artışın, 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 absorbanstaki 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

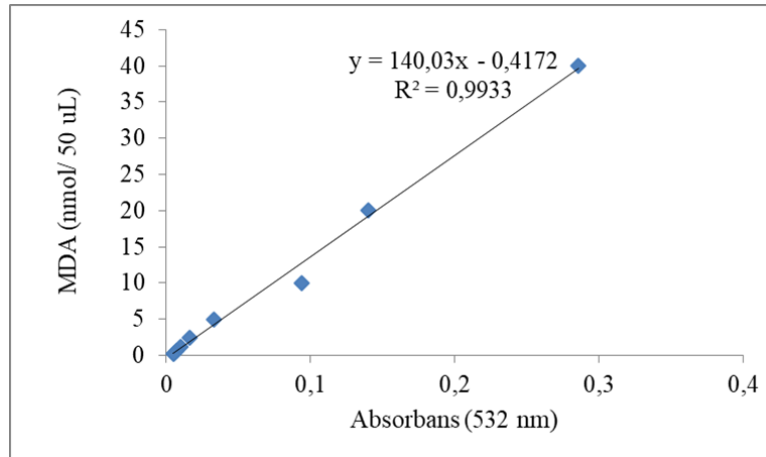
Vt: Toplam hacim

Vö: Örnek hacmi

SO: Süpernatant sulandırma oranı

3.9.8. Malondialdehit içeriği tayini

Yöntem: Yağ asitlerinin, serbest radikallerle reaksiyonu sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden MDA, tiyobarbitürik asit 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 trikloroasetik asit (%10) ve 2 mL tiyobarbitürik asit (%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

Ayraçlar	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 dakika 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 dakika bekletildi.			
Tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak, 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma yapıldı. Sonuçlar standart grafikten (Şekil 3.3) değerlendirilir.			

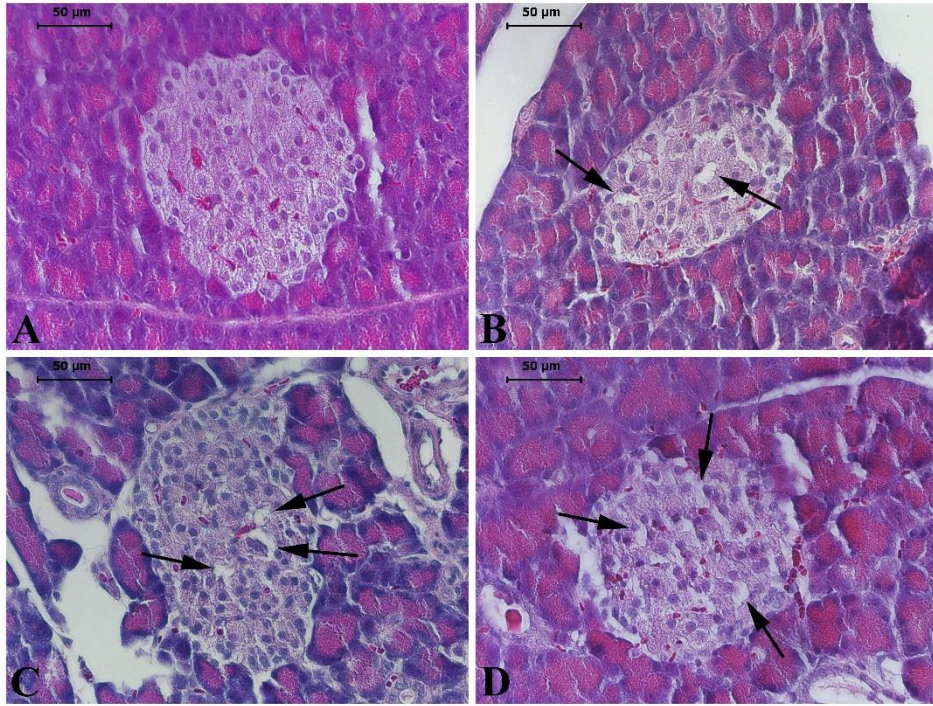
3.10. İstatistiksel Analizler

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

Kontrol grubuna ait bireylerin pankreas kesitlerinde yapılan histolojik incelemeler sonucunda, Langerhans adacıklarının ve adacık hücrelerinin normal görünümde oldukları gözlemlendi (Şekil 4.1A). BPF'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda ise hafif histopatolojik değişimlerin meydana geldiği belirlendi. Bu gruplarda, pankreasın bazı Langerhans adacıklarının küçüldükleri (atrofi) ve bu adacıkların bazı hücrelerinde vakuolar dejenerasyona sahip adacık hücrelerinin olduğu, gözlemlendi (Şekil 4.1B, C, D).



Şekil 4.1. Farklı grupların H&E ile boyanmış olan pankreas kesitleri. A: Kontrol grubuna ait bir bireyin normal görünümüne sahip olan Langerhans adacığı. B: BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan bir bireyin atrofiye olmuş ve hücrelerinde vakuolar dejenerasyon (oklar) meydana gelen Langerhans adacığı. C: BPF'nin 100 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan bir bireyin Langerhans adacığında hasarlı veya dejeneratif hücreler (oklar). D: BPF'nin 500 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan bir bireyin adacık hücrelerinde vakuolar dejenerasyon (oklar).

4.2. Adacık Morfometrisi

Langerhans adacıklarında yapılan morfometrik ölçümler (adacık çapı ve adacık alanı)'e ait değerler, Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Adacık çap ortalamasının BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi ($p > 0.05$). Öte yandan adacık çap ortalamasının BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$). Adacık alan ortalamasının ise BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği ($p > 0.05$) ancak BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, azaldığı belirlendi ($p < 0.05$).

Çizelge 4.1. Farklı gruplara ait adacık çap ve alan ortalamaları

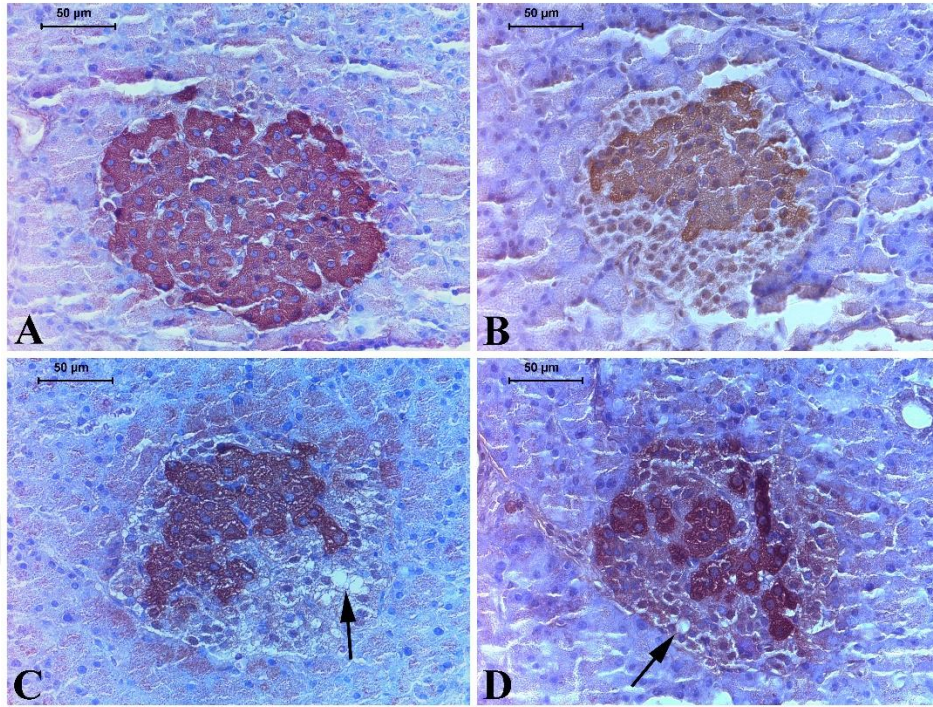
Grup	Adacık çapı (μm)	Adacık alanı (mm^2)
Kontrol	155.53 ± 5.94^a	21.41 ± 1.41^a
BPF (20 mg/kg v.a.)	157.59 ± 35.82^a	23.09 ± 9.14^a
BPF (100 mg/kg v.a.)	137.59 ± 23.78^{ab}	18.73 ± 7.53^{ab}
BPF (500 mg/kg v.a.)	124.61 ± 16.69^b	13.73 ± 2.60^b

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

4.3. Pankreatik β Hücrelerinin İmmunohistokimyasal Boyanması ve β İndeks

Değerleri

İmmunohistokimyasal olarak işaretlenen β hücrelerinin, kontrol grubuna ait bireylerin Langerhans adacıklarında, çoğunlukla merkezi alanda lokalize oldukları ve güçlü immun boyanma gösterdikleri gözlemlendi (Şekil 4.2A). BPF'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplardaki bireylerin adacıklarının bazılarında insülin-pozitif β hücrelerinde azalmaların olduğu, belirlendi. Özellikle adacık hücrelerinde vakuolizasyonun gözlemlendiği alanlarda immun boyanmanın çok az olduğu veya hiç olmadığı tespit edildi (Şekil 4.2B, C, D).



Şekil 4.2. Farklı grupların Langerhans adacıklarında, immunohistokimya yöntemi ile boyanmış olan, β hücreleri. A: Kontrol grubuna ait bir bireyin güçlü sitoplazmik immün boyanma (kahverengi) gösteren ve çoğunlukla adacık merkezinde lokalize olan β hücreleri. B: BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan bir bireyin Langerhans adacığında azalmış olan β hücreleri. C: BPF'nin 100 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan bir bireyin Langerhans adacığında azalmış olan β hücreleri. Adacıkta vakuolar dejenerasyon (ok) olduğu alanlarda immün boyanmanın gerçekleşmediği görülmektedir. D: BPF'nin 500 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan bir bireyin Langerhans adacığının merkezinde azalmış olan β hücreleri ve bir adacık hücresinde vakuolar dejenerasyon (ok).

Kontrol grubuna ve BPF uygulanan gruplara ait β hücre indeks değerleri, Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Yukarıda sözü edilen gözlemler ile uyumlu olarak, β hücre indeks değerlerinin, BPF'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, azaldıkları belirlendi.

Çizelge 4.2. Kontrol grubuna ve BPF uygulanan gruplara ait β hücre indeks değerleri

	Kontrol	BPF (20 mg/kg v.a.)	BPF (100 mg/kg v.a.)	BPF (500 mg/kg v.a.)
β hücre indeksi (%)	75.67 $\pm$ 4.17 ^a	70.64 $\pm$ 4.60 ^{ab}	66.91 $\pm$ 5.69 ^{bc}	62.55 $\pm$ 6.80 ^c

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

4.4. BPF'nin Glukoz, HbA1c, C-peptid ve İnsülin Seviyeleri Üzerindeki Etkisi

Kontrol grubuna ve BPF uygulanan gruplara ait serum açlık glukoz, total kan HbA1c ve serum C-peptid ile insülin seviyeleri, Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Serum açlık glukoz, total kan HbA1c ve serum C-peptid ile insülin seviyelerinin, BPF uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermedikleri gözlemlendi ($p > 0.05$).

Çizelge 4.3. Kontrol grubuna ve BPF uygulanan gruplara ait serum açlık glukoz, total kan HbA1c, serum C-peptid ve insülin seviyeleri

Grup	Glukoz (mg/dL)	HbA1c (mg/dL)	C-peptid (pg/mL)	İnsülin (mIU/L)
Kontrol	198.20 $\pm$ 37.86 ^a	3.41 $\pm$ 0.35 ^a	2228.43 $\pm$ 691.58 ^a	1.55 $\pm$ 0.32 ^a
BPF (20 mg/kg v.a.)	198.66 $\pm$ 65.34 ^a	3.45 $\pm$ 0.24 ^a	2324.97 $\pm$ 592.09 ^a	1.49 $\pm$ 0.72 ^a
BPF (100 mg/kg v.a.)	193.57 $\pm$ 54.27 ^a	3.68 $\pm$ 0.20 ^a	2166.55 $\pm$ 595.80 ^a	0.98 $\pm$ 0.18 ^a
BPF (500 mg/kg v.a.)	164.77 $\pm$ 20.66 ^a	3.41 $\pm$ 0.33 ^a	2782.91 $\pm$ 708.17 ^a	1.50 $\pm$ 0.32 ^a

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur ($n = 7$). Aynı sütun içerisinde yer alan değerler üzerindeki harf (a), Duncan *post hoc* çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığını ifade etmektedir ($p > 0.05$).

4.5. BPF'nin Pankreas Antioksidan Savunma Sistem Belirteçleri Üzerindeki Etkisi

BPF'nin, pankreasta antioksidan savunma sistem belirteçleri üzerinde oluşturduğu etkiler, Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. SOD aktivitesinin, BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği ($p < 0.05$) ancak BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta değişmediği ($p > 0.05$) gözlemlendi. CAT aktivitesinin, BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($p < 0.05$) ancak BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta değişmediği ($p > 0.05$) belirlendi. GPx aktivitesinin BPF uygulanan bütün gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel

olarak anlamlı bir şekilde düştüğü tespit edildi ($p < 0.05$). GST aktivitesinin, BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği ($p < 0.05$) ancak BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta değişmediği ($p > 0.05$) belirlendi. GSH içeriğinin, BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($p < 0.05$) ancak BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta değişmediği ($p > 0.05$) gözlemlendi. MDA düzeyinin, BPF'ye maruz bırakılan grupların herhangi birisinde kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi ($p > 0.05$).

Çizelge 4.4. BPF'ye maruz bırakılan ratların pankreas bezinde antioksidan savunma sistemi belirteçlerindeki değişimler

Belirteç	Kontrol	BPF (20 mg/kg v.a.)	BPF (100 mg/kg v.a.)	BPF (500 mg/kg v.a.)
SOD (U / mg protein)	0.17 ± 0.018 ^c	0.15 ± 0.019 ^c	0.35 ± 0.049 ^b	0.39 ± 0.028 ^a
CAT (μmol/dk/g protein)	0.15 ± 0.022 ^a	0.17 ± 0.024 ^a	0.14 ± 0.035 ^{ab}	0.11 ± 0.030 ^b
GPx (U / g protein)	12.87 ± 2.36 ^a	12.16 ± 1.44 ^{ab}	8.83 ± 0.48 ^c	9.93 ± 3.23 ^{bc}
GST (nmol/dk/mg protein)	2.08 ± 0.31 ^a	2.03 ± 0.50 ^a	2.21 ± 0.25 ^{ab}	2.52 ± 0.09 ^b
GSH (μmol/mg protein)	29.23 ± 1.45 ^a	27.62 ± 2.16 ^a	23.77 ± 1.41 ^b	22.69 ± 3.93 ^b
MDA (nmol/mg protein)	2.02 ± 0.25 ^a	2.35 ± 0.72 ^a	1.73 ± 0.12 ^a	1.95 ± 0.44 ^a

Değerler, ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (n = 7). Aynı sütun içerisinde yer alan değerler üzerindeki farklı harfler, Duncan *post hoc* çoklu karşılaştırma testine göre gruplar arasında, istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$).



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

BPF'nin farklı konsantrasyonlarına (20, 100 ve 500 mg/kg v.a.) maruz bırakılan ratların pankreas dokularında hafif histopatolojik değişimlerin meydana geldiği belirlendi (Şekil 4.1). BPF uygulanan grupta, bazı adacıkların küçüldüğü ve adacık hücrelerinde vakuolar dejenerasyonların meydana geldiği gözlemlendi. Diğer taraftan, BPF'nin bu çalışmada seçilen konsantrasyonların aynısına, 14 gün boyunca maruz bırakılan ratların pankreas, karaciğer, böbrek ve diğer dokularında herhangi bir histopatolojik değişimin meydana gelmediği bildirilmiştir (Higashihara ve ark., 2007). Bu çalışmada adacıklarda belirlenen histopatolojik değişimlerin sebebi, uygulama süresinin daha uzun olmasından kaynaklanabilir. Çalışmamızdaki gözlemler ile uyumlu olarak, BPA'nın 100 mg/kg/gün dozuna 14 gün boyunca maruz bırakılan ratların pankreas Langerhans adacıklarında, vakuolar dejenerasyon gösteren hücrelerin varlığı tespit edilmiştir (Yıldız ve ark., 2020). Benzer şekilde, BPA'ya 50 mg/kg v.a. konsantrasyonda günlük olarak maruz bırakılan ratların Langerhans adacık hücrelerinde, vakuolizasyon meydana geldiği, rapor edilmiştir (Mohamed ve Bastwrous, 2021). Buna karşılık, BPA'nın düşük konsantrasyonları (5, 50, ve 500 µg/kg/gün)'na oral olarak 8 hafta süre ile maruz bırakılan erkek ratların Langerhans adacıklarında ise herhangi bir histopatolojik değişimin meydana gelmediği belirlenmiştir (Özaydın ve ark., 2018). Dolayısıyla çalışmalarda bildirilen farklı histolojik gözlemler, seçilen bisfenolün konsantrasyonundan ve uygulama süresinden kaynaklanmış olabilir.

Adacık çap ve alan ortalamalarının, çalışmada belirlenen histopatolojik gözlemler ile uyumlu olarak, BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarında anlamlı düşüşler gösterdiği belirlendi (Çizelge 4.1). Benzer şekilde, BPA'nın 100 mg/kg konsantrasyonuna intraperitoneal enjeksiyon ile maruz bırakılan dişi farelerin Langerhans adacıklarının boyutunda ve hücre miktarında azalmaların meydana geldiği ve BPA'nın, streptozotosinin adacıklarda oluşturduğu lezyonların şiddetini artırdığı ifade edilmiştir (Arroyo-Salgado ve ark., 2018).

Bu çalışmada, insülin pozitif β hücre indeks değerlerinin, BPF'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan grupta, kontrol grubuna kıyasla, düştüğü belirlendi (Çizelge 4.2). BPA'nın düşük dozuna (50 µg/kg/gün) 35 hafta maruz

bırakılan erkek ratlarda, β hücre kitlesinin yükseldiği belirlenmiştir (Ding ve ark., 2014). BPA'nın düşük konsantrasyonları (5, 50, ve 500 $\mu\text{g/kg/gün}$)'na maruz bırakılan erkek ratlarda, adacık alanında anlamlı değişimlerin meydana gelmemesine karşılık, en yüksek BPA konsantrasyonunda insülin immunreaktif β hücre yüzdesinin, anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Özaydın ve ark., 2018). BPA'nın düşük dozlarına (10 ve 100 $\mu\text{g/kg/gün}$) maruz bırakılan gebe farelerin erkek yavrularında, doğum gününde ve doğumdan 20 ile 30 gün sonra, Langerhans adacığı β hücre kitlesinde artışın meydana geldiği ve apoptozun azaldığı, gösterilmiştir ancak doğumdan 120 gün sonra yavrulardan alınan pankreas örneklerinde, Langerhans adacığı β hücre kitlesinin kontroller ile eşit düzeyde veya kontrollerden anlamlı derecede daha düşük seviyede olduğu bildirilmiştir (García-Arévalo ve ark., 2016). BPA'ya 10 ve 100 $\mu\text{g/kg/gün}$ dozlarda uzun süre maruz bırakılan gebe farelerin, Langerhans adacıklarında β hücre kitlesinin doğumdan 7 ay sonra azaldığı, β hücre proliferasyonunun düştüğü ve β hücre apoptozunun yükseldiği bildirilmiştir (Alonso-Magdalena ve ark., 2006). Bir başka çalışmada, BPA'ya diyet ile 25 mg/kg konsantrasyonda maruz bırakılan gebe farelerin fötüslerinde, immunohistokimyasal olarak işaretlenen insülin ifadesinin değişmediği ancak glukagon ifadesinin arttığı belirlenmiştir (Whitehead ve ark., 2016). BPA'nın yüksek dozlarına (1 ve 100 mg/l) içme suyu ile uzun süre (7 – 12 hafta) maruz bırakılan obez olmayan farelerde insülit gelişiminin BPA tarafından hızlandırıldığı bildirilmiş, aynı zamanda BPA'nın, insülit gelişimden önce, adacıklardaki β hücre apoptozunu uyardığı belirlenmiştir (Bodin ve ark., 2013). Yıldız ve ark. (2020) ise, yüksek doz (100 mg/kg/gün) BPA'nın erişkin erkek ratlarda, adacık çapı, adacık alanı ve β hücre alanı üzerinde anlamlı farklılıklar meydana getirmediğini bildirmişlerdir. Yapılan bir *in vitro* çalışmada, rat insülinoma hücre (INS-1)'lerinin BPA'ya düşük konsantrasyonda ve kısa süreli olarak maruziyet sonrasında, hücre canlılığında anlamlı değişimlerin meydana gelmediği ancak BPA'nın doz artışı ile birlikte apoptozu uyarak hücre canlılığını azalttığı, aynı zamanda glukoz ile uyarılan insülin salınımını düşürdüğü ifade edilmiştir (Lin ve ark., 2013). Benzer şekilde BPA'ya, *in vitro*'da uzun süreliğine (72 saat) maruz bırakılan rat pankreatik β -hücreleri (INS-1E)'nde, hücre canlılığının ve insülin sekresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Weldingh ve ark., 2017). BPA'ya *in vitro*'da maruz bırakılan murin pankreatik adacıklarında, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulduğu, reaktif oksijen türlerinde artışın meydana geldiği ve apoptozun arttığı

bildirilmiştir. Ek olarak BPA'nın, *in vivo*'da, adacıkların hasara karşı verdiği yanıtı zayıflattığı ifade edilmiştir (Carchia ve ark., 2015). BPF'nin pankreatik β hücresi üzerindeki etkisine yönelik geçmişte yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır ve bu çalışmada ilk kez, BPF'nin pankreatik β hücre yüzdesi üzerinde anlamlı azalışlara neden olduğu gözlenmiştir. BPA ile yapılmış olan ve yukarıda sözü edilen çalışmalar göz önünde tutulursa BPA'nın, uygulama süresine, uygulama konsantrasyonuna ve deneysel dizayna bağlı olarak, β hücreleri üzerinde, artışlara ve azalışlara sebep olabilmektedir yahut herhangi bir değişime neden olmamaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmada BPF'nin β hücreleri üzerindeki azaltıcı etkisi uygulanan konsantrasyonların yüksek olmasına bağlı olarak meydana gelen toksik etkilerden kaynaklanabilir.

Bu çalışmada serum açlık glukoz, total kan HbA1c ve serum C-peptid ve insülin seviyelerinde, anlamlı değişimler gözlenmedi (Çizelge 4.3). Düşük doz BPA'nın fareden izole edilen Langerhans adacıklarında, ER α aracılığı ile insülin içeriğini artırdığı belirlenmiştir (Alonso-Magdalena ve ark., 2008). E2 ve BPA'ya maruziyetin erişkin farelerde pankreatik β hücre insülin içeriğini, ER'ye bağımlı bir tarzda, artırdığı gözlenmiştir (Alonso-Magdalena ve ark., 2006). BPA'ya maruz bırakılan farelerde yemek sonrası hiperinsülinemi ve insulin direnci ile birlikte, β hücresi insülin içeriğinin arttığı, bildirilmiştir (Ropero ve ark., 2008). BPA'nın E2'yi taklit ederek veya E2'nin sahip olduğu aynı potansiyel ile insülin uyarım sinyali ürettiği, β hücre tükenmişliğine sebebiyet verdiği ve sonuçta insülin direncine yol açabileceği ifade edilmiştir (Nadal ve ark., 2009). Pankreatik β hücrelerinin E2 ve BPA'ya nanomolar konsantrasyonlarda (1-10 nM) maruz bırakılması sonucunda, potasyum kanallarının inhibe olduğu ve ER β 'ya bağımlı bir mekanizma vasıtasıyla glukoz ile uyarılan insülin salınımının artırdığı, gözlenmiştir (Soriano ve ark., 2009; 2012). Öte yandan bu çalışmadaki bulgulara benzer olarak, BPA'nın düşük dozlarına maruz bırakılan ratlarda, pankreatik β hücre miktarındaki artışa rağmen, plazma glukoz ve insülin seviyelerinin değişmediği rapor edilmiştir (Özaydın ve ark., 2018). BPA'nın 20 mg/kg v.a konsantrasyonuna 28 gün boyunca maruz bırakılan erkek ratlarda, plazma insulin düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Agustine ve ark., 2019). Başka bir çalışmada ise, BPA'nın 20 ve 200 mg/kg v.a./gün dozlarına maruz bırakılan erkek ratlarda plazma insülin düzeyinin arttığı ancak açlık kan glukoz düzeyinin değişmediği bildirilmiştir (Indumathi ve ark., 2013). Pankreatik β hücrelerinin BPF'ye kısa süreli maruziyeti sonrasında, potasyum iyon kanallarının

inhibe olduğu ve insülin salınımının arttığı bildirilmiştir. Hücrelerin BPF'ye uzun süreli maruziyetinde ise mekanizmaların daha kompleks olduğu ve artan insülin salınımının voltaj-kapılı kalsiyum, sodyum ve potasyum kanallarının düzenlenmesi ile ilgili olabileceği, ifade edilmiştir (Marroqui ve ark., 2021). Bu çalışmada, BPF'ye maruziyet sonrasında pankreatik β hücre yüzdesinde bir azalma olmasına rağmen, plazma insülin düzeyinde anlamlı değişimlerin meydana gelmediği gözlemlendi. Bu durum BPF'nin BPA'ya benzer şekilde, β hücre insülin salınımını artırmış olmasından kaynaklanabilir. Bununla birlikte, BPF'nin plazma insülin seviyesi ve glukoz homeostazisi üzerindeki etkilerinin aydınlatılması için daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Pankreas SOD aktivitesinin BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. konsantrasyonlarında anlamlı artışlar gösterdiği gözlemlendi (Çizelge 4.4). SOD, süperoksit anyon radikallerinin, hidrojen peroksit ve suya dönüştürülmesinde rol oynar ve antioksidan savunmanın ilk basamağını oluşturur. SOD aktivitesindeki artışlar, süperoksit anyon radikallerinin seviyesindeki artışlardan dolayı meydana gelmiş olabilir. Benzer olarak, BPA'ya maruz bırakılan fare karaciğerinde SOD aktivitesinin yükseldiği bildirilmiştir (Kabuto ve ark., 2003). Yapılan bazı *in vitro* çalışmalarda, bu çalışmada olduğu gibi BPA ve BPF'ye maruz bırakılan hepatositlerde SOD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Kaya ve Kaptaner, 2016; Aykut ve Kaptaner, 2021). CAT aktivitesinin BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. konsantrasyonlarında anlamlı azalışlar gösterdiği belirlendi (Çizelge 4.4). CAT, SOD aktivitesi sonucunda meydana gelen ve bir hidroksil radikal öncüsü olan hidrojen peroksitin, indirgenmesini gerçekleştirir. Bu çalışmaya benzer olarak, Maćczak ve ark. (2017), BPF'ye *in vitro*'da maruz bırakılan insan eritrositlerinde CAT aktivitesinde düşüşler olduğunu belirlemişlerdir. Ullah ve ark. (2019b) ise, BPF'ye içme suyu ile maruz bırakılan ratların testis dokusunda CAT aktivitesinin azaldığını ifade etmişlerdir. CAT aktivitesinde meydana gelen azalmalar, BPA'ya maruz bırakılan ratların kan plazmasında da gözlemlenmiştir (Özaydın ve ark., 2018). Antioksidan enzimler, oksidan moleküllerin aşırı artışından dolayı inhibe olabilir veya enzimin kendi substratı, bir oksidan olarak davranabilir. Dolayısıyla düşük CAT aktivitesi, süperoksit radikallerinin üretimi sonucunda hızlanan SOD aktivitesi sonucunda meydana gelen hidrojen peroksitin aşırı bir şekilde artmasından, kaynaklanabilir (Pigeolet ve ark., 1990; Modesto ve Martinez, 2010; Aboul Ezz ve ark., 2015). Bu çalışmadaki bulgular ile uyumlu olarak Kabuto ve ark. (2003), BPA'ya

maruz bırakılan ratların karaciğerinde, SOD aktivitesindeki artışlar ile birlikte, CAT aktivitesinin düştüğünü rapor etmişlerdir.

GSH, antioksidan savunmanın ikinci basamağında yer alan ve yapısında sistein, g-glutamin ve glisin içeren bir tripeptittir. Bu molekül zenobiyotiklere direkt olarak bağlanarak, onların detoksifiye ve metabolize edilmelerini gerçekleştirir. GSH'ın seviyesindeki artış ve azalışlar oksidatif stresin bir göstergesidir (Meister ve Anderson, 1983). Bu çalışmada pankreas GSH düzeyinin, BPF maruziyetinden sonra azaldığı ve bu azalmaların BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Çizelge 4.4). Bu bulgulara paralel olarak, *in vitro*'da yapılan çalışmalar, BPF'ye maruz bırakılan hücrelerde GSH seviyesinin anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir (Maćczak ve ark. 2017; Aykut ve Kaptaner, 2021). GSH seviyesindeki azalma, BPA'ya maruz bırakılan ratların farklı dokularında da belirlenmiştir (Kabuto ve ark., 2003; Aydoğan ve ark., 2008; Korkmaz ve ark., 2010; Özaydın ve ark., 2018). GSH, zenobiyotiklerin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması sırasında GST tarafından kullanılan, bir konjugasyon molekülüdür. Dolayısıyla artan GST aktivitesi, GSH havuzunda düşüşe neden olabilir (Minghong ve ark., 2011). BPA'nın rat karaciğerinde, glutatyon redüktaz aktivitesini anlamlı bir şekilde düşürdüğü rapor edilmiştir (Bindhumol ve ark., 2003). Bu çalışmada glutatyon redüktaz aktivitesi ölçülmemiş olsa da, BPF'nin BPA'ya benzer olarak GSH sentezinde rol oynayan bu enzimin aktivitesini düşürmesi neticesinde, GSH seviyesi azalmış olabilir. Kısaca, GSH seviyesindeki azalmalar, detoksifikasyon işlevine bağlı olarak aşırı kullanımının ve sentezindeki bozulmanın bir sonucu olarak, meydana gelmiş olabilir.

Bu çalışmada GPx aktivitesinin, BPF uygulanan bütün gruplarda anlamlı azalışlar gösterdiği gözlemlendi (Çizelge 4.4). Benzer olarak, BPF'ye maruz bırakılan insan eritrositlerinde, GPx aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir (Maćczak ve ark. 2017). Ayrıca, BPA'ya (50 mg/kg/gün) intraperitoneal olarak 5 gün boyunca maruz bırakılan ratların böbrek dokusunda, GPx aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (Kabuto ve ark., 2003). Özaydın ve ark, (2018), BPA'ya 5, 50, ve 500 µg/kg v.a./gün konsantrasyonlarına 8 hafta süre ile maruz bıraktıkları ratların kan plazmasında, GPx seviyelerinde anlamlı düşüşlerin meydana geldiğini, bildirmişlerdir. Süpürücü bir antioksidan enzim olan GPx, GSH'ı kofatör olarak kullanır ve organik peroksitler ile lipid peroksitlerin indirgenmesini gerçekleştirir. Bununla birlikte GPx aktivitesi, GSH düzeyi ile yakından

ilişkilidir ve GSH düzeyindeki azalmalar, enzimin aktivitesinin azalmasına neden olabilir (Łukaszewicz-Hussain, 2003). Dolayısıyla, GSH'ın GPx tarafından kullanılabilirliğinin BPF maruziyeti sonucunda azalması, enzimin aktivitesinde düşüşlerin meydana gelmesine yol açmış olabilir. Bu çalışma ile uyumlu olarak BPA'ya maruz bırakılan ratların karaciğerinde de, GSH düzeyindeki azalmalar ile birlikte GPx aktivitesinin de düştüğü, rapor edilmiştir (Abdel-Wahab ve ark., 2014; Hassan ve ark., 2012).

GST, reaktif oksijen türlerine ve zenobiyotiklere karşı hücrel korunmada kritik rol oynayan, bir faz-II detoksifiye edici enzimdir. Bu enzim endojen ve eksojen elektrofilik maddelere, GSH'ın konjuge edilmesini gerçekleştirir (Li, 2009). Çalışmamızda, GST aktivitesinin, BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlendi (Çizelge 4.4). BPF'nin ratlarda GST aktivitesi üzerindeki etkisine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır ancak bu çalışmaya benzer olarak, BPA'nın 25 mg/kg konsantrasyonuna 6 hafta boyunca maruz bırakılan ratların kalp dokusunda GST aktivitesinde artış meydana geldiği bildirilmiştir (Aboul Ezz ve ark., 2015). Yükselen GST aktivitesi, BPF'nin metabolize edilmesi sonucunda meydana gelen serbest radikal artışından kaynaklanabilir (Minghong ve ark., 2011; Kaya ve Kaptaner, 2016; Aykut ve Kaptaner, 2021).

MDA, lipid peroksidasyonunun temel ürünüdür ve oksidatif hasarın önemli bir göstergesidir (Ayala ve ark., 2014). Yapılan *in vitro* çalışmalarda, BPF'nin hücrelerde MDA içeriğini artırdığı belirlenmiştir (Maćczak ve ark. 2017; Aykut ve Kaptaner 2021). BPF'ye maruz bırakılan ratların testis dokusunda ise lipid peroksidasyon düzeyinin arttığı bildirilmiştir. BPA'ya maruz bırakılan ratların, farklı dokularında da lipid peroksidasyon seviyesinin yükseldiği gözlenmiştir (Bindhumol ve ark., 2003; Aydoğan ve ark., 2008; Korkmaz ve ark., 2010; Abdel-Wahab ve ark., 2014; Hassan ve ark., 2012). Ancak bu çalışmada, pankreas MDA içeriğinde anlamlı değişimlerin meydana gelmediği belirlendi (Çizelge 4.4). Benzer olarak Kabuto ve ark. (2003), BPA'nın 25 ve 50 mg/kg konsantrasyonlarına intraperitoneal olarak maruz bırakılan farelerin karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularında, reaktif oksijen türlerinde anlamlı artışlar gözlenmesine rağmen, MDA düzeylerinin değişmediğini bildirmişlerdir. Pankreas

MDA düzeylerinin BPF'ye maruziyet sonrasında değişimler göstermemesi, uygulama süresinin kısa olmasından kaynaklanabilir.

Sonuç olarak BPF'nin rat pankreatik Langerhans adacıklarında hafif histolojik değişimlere sebep olmasına rağmen, adacık çap ortalamaları ile alan ortalamalarında ve β hücre yüzdesinde anlamlı azalmalara yol açtığı belirlendi. Aynı zamanda BPF'nin pankreasta antioksidan savunma sistemi belirteçlerinde değişimlere yol açtığı gözlemlendi. Bu da BPF'nin pankreas antioksidan dengesini bozabildiğini ve dokuda oksidatif stresi tetikleyebileceğini göstermektedir. Öte yandan, glukoz homeostazisinde önemli belirteçler olan, açlık kan glukoz, total HbA1c, C-peptid ve insülin düzeylerinin, BPF maruziyeti sonrasında anlamlı değişimler göstermediği belirlendi. Böyle bir etkinin altında yatan sebeplerin aydınlatılması için daha detaylı ve uzun süreli çalışmaların yapılması gerekmektedir. Elde edilen sonuçlar BPF'nin, BPA'nın yerine güvenilir bir alternatif olarak, kullanımına dikkatle yaklaşılması gerektiğini göstermektedir.



KAYNAKLAR

- 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., Khadrawy, 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.
- Aebi, H., 1974. Catalase. In: Methods of Enzymatic Analysis. *Bergmeyer HU (Ed.), Academic Press, New York*, **2**: 673-684.
- Agustine, F. N., Prasetyarini, S., Hamzah, Z., 2019. Pengaruh BPA (Bisphenol A) terhadap Kadar Insulin dalam Serum Darah Tikus Wistar Jantan. *Stomatognathic-Jurnal Kedokteran Gigi*, **16** (1): 28-32.
- Ahmed, F., Sarsenbayeva, A., Katsogiannos, P., Aguer, C., Pereira, M. J., 2020. The effects of bisphenol A and bisphenol S on adipokine expression and glucose metabolism in human adipose tissue. *Toxicology*, **445**: 152600.
- Ahn, C., Kang, H. S., Lee, J. H., Hong, E. J., Jung, E. M., Yoo, Y. M., Jeung, E. B., 2018. Bisphenol A and octylphenol exacerbate type 1 diabetes mellitus by disrupting calcium homeostasis in mouse pancreas. *Toxicology Letters*, **295**: 162-172.
- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal, A., 2006. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic β -cell function *in vivo* and induces insulin resistance. *Environmental Health Perspectives*, **114** (1): 106-112.
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A. B., Carrera, M. P., Cederroth, C. R., Baquie, M., Gauthier, B. R., Nef, S., Stefani, E., Nadal, A., 2008. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER α . *PloS One*, **3** (4): e2069.
- 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.
- Arroyo-Salgado, B., Garcia-Espiñeira, M., Olivero-Verbel, J., 2018. Effects of bisphenol A on streptozotocin treated female mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, **56** (6): 419-429.
- 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.
- 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.
- Bodin, J., Bølling, A. K., Samuelsen, M., Becher, R., Løvik, M., Nygaard, U. C., 2013. Long-term bisphenol A exposure accelerates insulinitis development in diabetes-

- prone NOD mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **35** (3): 349-358.
- 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.
- Buege, J. A., Aust, S. D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, **52**: 302-310.
- Carchia, E., Porreca, I., Almeida, P. J., D'angelo, F., Cuomo, D., Ceccarelli, M., Felice, M. De., Mallardo M., Ambrosino, C., 2015. Evaluation of low doses BPA-induced perturbation of glycemia by toxicogenomics points to a primary role of pancreatic islets and to the mechanism of toxicity. *Cell Death and Disease*, **6** (10): e1959.
- 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.
- Ding, S., Fan, Y., Zhao, N., Yang, H., Ye, X., He, D., Jin, X., Liu, J., Tian, C., Li, H., Xu, S., Ying, C., 2014. High-fat diet aggravates glucose homeostasis disorder caused by chronic exposure to bisphenol A. *Journal of Endocrinology*, **221**: 167–179.
- Dra, L. A., Sellami, S., Rais, H., Aziz, F., Aghraz, A., Bekkouche, K., Markouk, M., Larhsini, M., 2019. Antidiabetic potential of *Caralluma europaea* against alloxan-induced diabetes in mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **26** (6): 1171-1178.
- 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.
- García-Arévalo, M., Alonso-Magdalena, P., Servitja, J. M., Boronat-Belda, T., Merino, B., Villar-Pazos, S., Medina-Gómez, G., Novials, A., Quesada, I., Nadal, A., 2016. Maternal exposure to bisphenol-A during pregnancy increases pancreatic β -cell growth during early life in male mice offspring. *Endocrinology*, **157** (11): 4158-4171.
- 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.
- Hanalp, H. C., Kaptaner, B., Doğan, A., 2021. Protective effects of Lyophilized Ethanolic Extract of *Achillea arabica* Kotschy. on the Islet β Cells of Streptozotocin-Induced diabetic rats. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, **24** (4): 689-700.
- Hassan, Z. K., Elobeid, M. A., Virk, P., Omer, S. A., ElAmin, M., Daghestani, M. H., AlOlayan, E. M., 2012. Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2012**: 194829.
- Hercog, K., Maisanaba, S., Filipič, M., Sollner-Dolenc, M., Kač, L., Žegura, B., 2019. Genotoxic activity of bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF and their mixtures in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Science of the Total Environment*, **687**: 267-276.
- 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.
- Hwang, S., Lim, J. E., Choi, Y., Jee, S. H., 2018. Bisphenol A exposure and type 2 diabetes mellitus risk: a meta-analysis. *BMC Endocrine Disorders*, **18** (1): 81.
- Indumathi, D., Jayashree, S., Selvaraj, J., Sathish, S., Mayilvanan, C., Akilavalli, N., Balasubramanian, K., 2013. Effect of bisphenol-A on insulin signal transduction and glucose oxidation in skeletal muscle of adult male albino rat. *Human and Experimental Toxicology*, **32** (9): 960-971.
- İyigündoğdu, İ., Üstündağ, A., Duydu, Y., 2020. Toxicological evaluation of bisphenol A and its analogues. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, **17** (4): 457-462.
- 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.
- 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.
- Knizatova, N., Tokárová, K., Greifová, H., Jambor, T., Massányi, P., Lukáč, N., 2020. Bisphenol A Analogues: A Brief Review of their Occurrence in Food, Biological Samples and Endocrine Effects. *Archives of Ecotoxicology*, **2**: 89-94.
- 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.
- Kose, O., Rachidi, W., Beal, D., Erkekoglu, P., Fayyad-Kazan, H., Kocer - Gumusel, 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.
- 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.
- Lei, B., Sun, S., Xu, J., Feng, C., Yu, Y., Xu, G., Wu, M., Peng, W., 2017. Low concentration BPAF- and BPF- induced cell biological effects are mediated by ROS in MCF-7 breast cancer cells. *Environmental Science and Pollution Research*, **25** (4): 3200-3208.
- Li, X., 2009. Glutathione and Glutathione-S-Transferase in Detoxification Mechanisms. *General, Applied and Systems Toxicology*.
- Lin, Y., Sun, X., Qiu, L., Wei, J., Huang, Q., Fang, C., Ye, T., Kang, M., Shen, H., Dong, S., 2013. Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death and Disease*, **4** (1): e460-e460.
- 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.
- Marroqui, L., Martinez-Pinna, J., Castellano-Muñoz, M., Dos Santos, R. S., Medina-Gali, R. M., Soriano, S., Quesada, I., Gustafsson, J.A., Encinar, J.A., Nadal, A., 2021. Bisphenol-S and Bisphenol-F alter mouse pancreatic β -cell ion channel expression and activity and insulin release through an estrogen receptor ER β mediated pathway. *Chemosphere*, **265**: 129051.
- Meister, A., Anderson, M. E., 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, **52** (1), 711-760.
- Menale, C., Mita, D. G., Diano, N., Diano, S., 2016. Adverse effects of bisphenol A exposure on glucose metabolism regulation. *The Open Biotechnology Journal*, **10** (1): 122-130.
- Minghong, W., Hai, X., Ming, Y., Gang, X., 2011. Effects of chronic bisphenol A exposure on hepatic antioxidant parameters in medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicological and Environmental Chemistry*, **93**(2): 270-278.
- Mirmira, P., Evans-Molina, C., 2014. Bisphenol A, obesity, and type 2 diabetes mellitus: genuine concern or unnecessary preoccupation?. *Translational Research*, **164** (1): 13-21.
- Modesto, K. A., Martinez, C. B. R., 2010. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, **78**: 294-299.
- Mohamed, H. Z., Bastwrous, A. E., 2021. A Histological study on the effects of bisphenol an administration on the liver, spleen and pancreas of adult male albino rats and the possible protective role of lycopene. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, D. Histology and Histochemistry*, **13** (1): 43-61.
- 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): 127-36.
- Mustieles, V., D'Cruz, S. C., Couderq, S., Rodríguez-Carrillo, A., Fini, J. B., Hofer, T., Steffensen, I. L., Dirven, H., Baroukig, R., Olea, N., Fernández, M.F., David, A., 2020. Bisphenol A and its analogues: a comprehensive review to identify and prioritize effect biomarkers for human biomonitoring. *Environment International*, **144**: 105811.
- Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Quesada, I., Roperio, A. B., 2009. The pancreatic β -cell as a target of estrogens and xenoestrogens: implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **304** (1-2): 63-68.
- 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.

- Pelch, K. E., Wignall, J. A., Goldstone, A. E., Ross, P. K., Blain, R. B., Shapiro, A. J., 2017. **NTP research report on biological activity of bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives**. RR4. North Carolina, 2473-4756, USA. 33.
- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Remacle, J., 1990. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. **Mechanisms of Ageing and Development**, **51** (3): 283-297.
- Provvisiero, D. P., Pivonello, C., Muscogiuri, G., Negri, M., De Angelis, C., Simeoli, C., Pivonello, R., Colao, A., 2016. Influence of bisphenol A on type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, **13** (10): 989.
- Rahmani, S., Khalili, N. P., Khan, F., Hassani, S., Ghafour-Boroujerdi, E., Abdollahi, M., 2018. Bisphenol A: What lies beneath its induced diabetes and the epigenetic modulation?. **Life Sciences**, **214**: 136-144.
- Ropero, A. B., Alonso-Magdalena, P., Garcia-Garcia, E., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal, A., 2008. Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. **International Journal of Andrology**, **31** (2): 194-200.
- Qiu, W., Zhan, H., Tian, Y., Zhang, T., He, X., Luo, S., Xu, H., Zheng, C., 2018. The *in vivo* action of chronic bisphenol F showing potential immune disturbance in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). **Chemosphere**, **205**: 506-513.
- Sidorkiewicz, I., Czerniecki, J., Jarzabek, K., Krętowska, M.Z., Wołczyński, S., 2018. Cellular, transcriptomic and methylome effects of individual and combined exposure to BPA, BPF, BPS on mouse spermatocyte GC-2 cell line. **Toxicology and Applied Pharmacology**, **359**: 1-11.
- Silva, M. M. D., 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.
- Soriano, S., Alonso-Magdalena, P., Garcia-Arevalo, M., Novials, A., Muhammed, S.J., Salehi, A., Gustafsson, J.A., Quesada, I., Nadal, A., 2012. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta. **PloS One**, **7**: e31109.
- Soriano, S., Ropero, A. B., Alonso-Magdalena, P., Ripoll, C., Quesada, I., Gassner, B., Kuhn, M., Gustafsson, J. A., Nadal, A., (2009). Rapid regulation of KATP channel activity by 17 β -estradiol in pancreatic β -cells involves the estrogen receptor β and the atrial natriuretic peptide receptor. **Molecular Endocrinology**, **23** (12): 1973-1982.
- 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.
- Ullah, A., Pirzada, M., Afsar, T., Razak, S., Almajwal, A., Jahan, S., 2019a. Effect of bisphenol F, an analog of bisphenol A, on the reproductive functions of male rats. **Environmental Health and Preventive Medicine**, **24** (1): 1-11.

- Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Razak, S., Rauf, N., Khan, MJ., Mahboob, SZ., 2019b. 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.
- Usman, A., Ikhlas, S., Ahmad, M., 2019. Occurrence, toxicity and endocrine disrupting potential of Bisphenol-B and Bisphenol-F: A mini-review. ***Toxicology Letters***, **312**: 222-227.
- Veissi, M., Jafarirad, S., Ahangarpour, A., Mohaghegh, S. M., Malehi, A. S., 2018. Co-exposure to endocrine disruptors: effect of bisphenol A and soy extract on glucose homeostasis and related metabolic disorders in male mice. ***Endocrine Regulations***, **52** (2): 76-84.
- Welding, N. M., Jørgensen-Kaur, L., Becher, R., Holme, J. A., Bodin, J., Nygaard, U. C., Bølling, A. K., 2017. Bisphenol A is more potent than phthalate metabolites in reducing pancreatic β -cell function. ***BioMed Research International***, **2017**: 1-11.
- Whitehead, R., Guan, H., Arany, E., Cernea, M., Yang, K., 2016. Prenatal exposure to bisphenol A alters mouse fetal pancreatic morphology and islet composition. ***Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation***, **25** (3): 171-179.
- Yang, Q., Yang, X., Liu, J., Ren, W., Chen, Y., Shen, S., 2017. Effects of BPF on steroid hormone homeostasis and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of zebrafish. ***Environmental Science and Pollution Research***, **24** (26): 21311-21322.
- Yıldız, M., Güleş, Ö., Sandıkçı, M., Kum, Ş., 2020. Sıçanlarda Bisfenol A'nın Neden Olduğu Pankreatik Değişimler Üzerine Koenzim Q10'un Etkileri. ***Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi***, **17** (3): 335-341.

ÖZ GEÇMİŞ

Emine DOĞAN, İlköğrenimini Çatak Merkez Hürriyet İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Lise öğrenimini Çatak Çok Programlı Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2015 yılında girdiği Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim 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.



	VAN YÜHADYEK VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ	
VAN YUZUNCUYILUNIVERSITY (TURKEY) ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE	

Araştırmanın Adı	Bisfenol F'nin erkek ratlarda pankreas üzerindeki toksik etkilerinin araştırılması	
Research Title	Investigation of toxic effects of bisphenol F on pancreas in male rats	
Araştırmacı(lar) Investigator(s)	Yürütücü / Chief investigator :	Doç. Dr. (Assoc. Prof. Dr.) Burak KAPTANER
	Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s):	Emine DOĞAN (MSc Candidate) Doç. Dr. (Assoc. Prof. Dr.)Abdulahad DOĞAN
Araştırmanın Başlama Tarihi / Research Starting Date: 25.01.2021		
Araştırmanın Bitiş Tarihi / Research Completion Date: 25.07.2022		
Proje Süresi / Total Time of Project: 18 ay (months)		
Proje No / Project Number: FYL-2021-9360		
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa)/ Funding institution(s) (if available): Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi The Scientific Research Coordination Unit of Van Yuzuncu Yil University		
Destek Şekli ve Miktarı / Type and amount of funding: 33.984,50 TL		
Karar: Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 31/03/2022 tarih ve 2022/03-20 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Decision: Final report of the research project detailed above was approved by Van Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 31/03/2022 (decision number 2022/03-20).		
	BAŞKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE/Member Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	ÜYE/Member Prof. Dr. Sıddık KESKİN	ÜYE/Member Prof. Dr. Nalan ÖZDAL
ÜYE Prof. Dr. Atilla DURMUŞ	ÜYE/Member Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ	ÜYE/Member Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN
ÜYE/Member Doç. Dr. Canser Yılmaz DEMİR	ÜYE/Member Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN	ÜYE/Member Dr. Öğr. Üyesi Dicle ALTINDAL
ÜYE/Member Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ÖNALAN	ÜYE/Member Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET	ÜYE/Member Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU

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

Tarih: 18/04/2022

Tez Başlığı / Konusu:

Bisfenol F'nin Erkek Ratlarda Pankreas Üzerindeki Toksik Etkilerinin Araştırılması

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 51 sayfalık kısmına ilişkin, 18/04/2020 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinalite raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 (yüzde dört)'tür.

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 Orijinalite 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.

18/04/2022
Emine DOĞAN

Adı Soyadı: Emine DOĞAN

Öğrenci No: 19910001229

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı:

Statüsü: ☒ Y. Lisans

☐ Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

Doç. Dr. Burak KAPTANER