



**BİSFENOL A'YA MARUZ KALAN ERKEK
RATLARIN KARACİĞERİNDE APOPİTOTİK
ÖZELLİKLERİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE
MOLEKÜLER,OKSİDATİF STRESİN
BİYOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ VE
BİR ANTIOKSİDAN OLARAK D₃ VİTAMİNİNİN
ETKİSİ**

**2022
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA**

Abdulaziz Hasan Ahmed Mohsen SAIF

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Feyza BAŞAK**

**BİSFENOL A'YA MARUZ KALAN ERKEK RATLARIN KARACİĞERİNDE
APOPTOTİK ÖZELLİKLERİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE
MOLEKÜLER, OKSİDATİF STRESİN BİYOKİMYASAL OLARAK
BELİRLENMESİ VE BİR ANTİOKSİDAN OLARAK D₃ VİTAMİNİNİN
ETKİSİ**

Abdulaziz Hasan Ahmed Mohsen SAIF

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Feyza BAŞAK**

**T.C.
Karabük Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**KARABÜK
Aralık 2022**

Abdulaziz Hasan Ahmed Mohsen SAIF tarafından hazırlanan “BİSFENOL A (BPA)’YA MARUZ KALAN ERKEK RATLARIN KARACİĞERİNDE APOPİTOTİK ÖZELLİKLERİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE MOLEKÜLER, OKSİDATİF STRESİN BİYOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ VE BİR ANTİOKSİDAN OLARAK D₃ VİTAMİNİNİN ETKİSİ” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Feyza BAŞAK

Tez Danışmanı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 28/12/2022

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. M. Ramazan ŞEKEROĞLU (SAÜ)

Üye : Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN (KBÜ)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Feyza BAŞAK (KBÜ)

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Müslüm KUZU

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Abdulaziz Hasan Ahmed Mohsen SAIF

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**BİSFENOL A'YA MARUZ KALAN ERKEK RATLARIN KARACİĞERİNDE
APOPTOTİK ÖZELLİKLERİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE
MOLEKÜLER, OKSİDATİF STRESİN BİYOKİMYASAL OLARAK
BELİRLENMESİ VE BİR ANTİOKSİDAN OLARAK D₃ VİTAMİNİNİN
ETKİSİ**

Abdulaziz Hasan Ahmed Mohsen SAIF

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Feyza BAŞAK

Aralık 2022, 80 sayfa

Bisfenol A isimli kimyasal [BPA, 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan], sanayide özellikle epoksi reçine yapımında ve polimer olmayan diğer plastiklerde katkı maddesi olarak sıklıkla kullanılan, yalancı östrojenik etkisi nedeniyle de hormonal sistemi olumsuz etkileyen bir maddedir. Endokrin sistemin hem gelişiminde hem de işleyişinde öngörülemez değişikliklere yol açar. BPA aslen metabolizmaya girişini bulaşık yiyeceklerin yenilmesi ve içme suyunun içilmesi ile yapmaktadır. Bunun yanında BPA ile kirlenmiş hava ve şehir suyu, kişisel bakım ürünleri ve medikal ürünlerden bazıları BPA'nın vücuda alınımının önemli bir kısmına zemin hazırlarken, üretim aşamalarında çalışan kişiler için önemli alım yolları inhalasyon ve deri ile temastır.

D vitamini steroid yapıda bir prohormondur, D₂ ve D₃ olmak üzere iki şekilde bulunur. D₂ bitkisel kaynaklı besinlerden sağlanırken, D₃ vitamininin çoğu, güneşten alınan ultraviyole-B (UVB) ışınları sayesinde sentezlenirken, çok az bir kısmı diyetle alınır. D vitamini eksikliği dünya genelinde yaygın bir problemdir. D vitamini hem bağışıklığı güçlendirici hem de oksidatif hasardan koruyucu etkileri ile bilinen önemli bir hormondur.

Apopitoz, bir hücrenin kendisinden ya da yaşadığı mikroçevreden kaynaklı olarak artık yaşamaya devam etmemek üzere başlattığı programlı bir reaksiyonlar dizisidir. Bu reaksiyonlar eğer hücrenin kendisi ile ilişkili değilse en önemli sebeplerinden birisi mikroçevrede oksidatif hasar etkenlerinin olması ve hücre içi antioksidan sistemlerin yetersiz kalmasıdır.

Bu amaçla en az 150 g ağırlığındaki 50 erkek rat, her birinde 10 adet erkek rat bulunan beş rastgele gruba ayrıldı: Kontrol grubu, Zeytinyağı grubu, BPA grubu, D₃ vitamini grubu, BPA ve D₃ vitamini grubu. 30 gün süreyle BPA uygulanan gruplara 25 mg/kg/gün dozunda BPA, zeytinyağı bulunan gruplara 0,5 mL zeytinyağı ve D vitamini bulunan gruplara ise 400 IU/gün dozunda D₃ vitamini 0,5 mL zeytinyağı içinde çözdürülerek uygulandı.

Çalışma sonucunda alınan karaciğer örneklerinde BPA kullanılan gruplarda TUNEL metodu kullanılarak hepatositlerde apopitozun ciddi oranda arttığı, karaciğer dokularında MDA düzeyinin arttığı, SOD ve CAT düzeylerinin azaldığı, TAS değerinin düştüğü, TOS, OSİ, TNF- α ve IL-6 değerlerinin yükseldiği, serumda ise AST, ALP ve ALT değerlerinde artışa neden olduğu tespit edildi. D₃ vitamini uygulanan BPA+D₃ grubu BPA grubu ile karşılaştırıldığında, apopitotik hücre sayısının, MDA, TOS, OSİ, TNF- α , IL-6, AST, ALP, ALT düzeylerinin azalttığı, SOD, CAT, TAS değerlerinin yükseldiği tespit edildi. BPA grubunda görülen histopatolojik değişikliklerin D₃ vitamini uygulanmasıyla ortadan kalktığı saptandı.

D vitamininin günlük diyete eklenmesinin BPA kaynaklı hasarları büyük lde ortadan kaldıracağını düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler : Bisfenol A, Rat, D vitamini, Oksidatif stres, Hepatotoksisite

Bilim Kodu : 1090

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MOLECULAR DETERMINATION OF APOPTOTIC PROPERTIES IN THE LIVER OF MALE RATS EXPOSED TO BISPHENOL A BIOCHEMICAL DETERMINATION OF OXIDATIVE STRESS AND EFFECT OF VITAMIN D₃ AS AN ANTIOXIDANT

Abdulaziz Hasan Ahmed Mohsen SAIF

Karabük University

Institute of Graduate Programs

Department of Medical Biochemistry

Thesis Advisor

Dr. Öğr. Üyesi Feyza BAŞAK

December 2022, 80 pages

The chemical called Bisphenol A [BPA, 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane] is a substance that is frequently used as an additive in the industry, especially in the production of epoxy resins and other non-polymer plastics, and is a substance that adversely affects the hormonal system due to its pseudo-estrogenic effect. It leads to unpredictable changes in both the development and functioning of the endocrine system. BPA actually enters the metabolism by eating contaminated food and drinking drinking water. In addition, while some of the air and city water contaminated with BPA, personal care products and medical products pave the way for a significant part of the intake of BPA into the body, inhalation and dermal contact are important intake routes for people working in production processes.

Vitamin D is a prohormone in steroid structure; it exists in two forms as D₂ and D₃. While D₂ is obtained from plant-derived foods, most of the vitamin D₃ is synthesized by ultraviolet-B (UVB) rays from the sun, while a very small amount is obtained from the diet. Vitamin D deficiency is a common problem worldwide. Vitamin D is an important hormone known for its immune-enhancing and oxidative damage-protective effects.

Apoptosis is a series of programmed reactions initiated by a cell to no longer continue to live, either from itself or from the microenvironment in which it lives. If these reactions are not related to the cell itself, one of the most important reasons is the presence of oxidative damage factors in the microenvironment and insufficient intracellular antioxidant systems.

In this study, it was tried to determine the level of oxidative stress caused by BPA, a substance that is detoxified in the liver after it enters the body orally, and whether the oxidative stress level it causes causes apoptosis in the cells of the liver. An attempt was made to determine whether there were changes in the liver for inflammation.

For this purpose, 50 male rats weighing at least 150 g were divided into five random groups with 10 male rats in each and grouped as followed. (Control group, Vehicle (Olive Oil) group, BPA group, vitamin D₃ group, BPA and vitamin D₃ group) The study was continued for 30 days, 25mg/kg/day BPA was applied to the BPA-treated groups, 0.5mL olive oil and D₃ was administered to the olive-oil groups. Vitamin D₃ was dissolved in 0.5 mL olive oil and administered at a dose of 400 IU/day to the groups with vitamin D.

As a result of the study, in the groups in which BPA was used, in the groups in which BPA was used, apoptosis increased significantly in hepatocytes, MDA levels increased, SOD and CAT levels decreased, TAS values decreased, TOS, OSI, TNF- α and IL-6 values increased, and AST in serum. It was determined that it caused an increase in ALP and ALT values. When the BPA+D₃ group treated with vitamin D₃ was compared with the BPA group, it was determined that the number of apoptotic cells, MDA, TOS, OSI, TNF- α , IL-6, AST, ALP, ALT levels decreased, and SOD,

CAT, TAS values increased. It was determined that the histopathological changes seen in the BPA group disappeared with the administration of vitamin D₃. We think that adding vitamin D to the daily diet will largely eliminate the damage caused by BPA.

Key Word : Bisfenol A, Rat, D vitamini, Oksidatif stres, Hepatotoksisite

Science Code : 1090

TEŞEKKÜR

Bu tez alıŐmasının planlanmasında, araŐtırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalıŐmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Feyza BAŞAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Biyokimyasal analizlerin yapılması sırasında sunduğu laboratuvar imkânları için Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN'a, biyokimyasal laboratuvar işlerinin yürütülmesinde her daim yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ'e ve Histoloji Laboratuvarı'nda yapılan işlemlerde destek veren AraŐ. Gör. Tansu KUŐAT'a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Yüksek lisans tez çalıŐmalarım esnasında maddi destek sağlayan Karabük Üniversitesi Bilimsel AraŐtırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: KBÜBAP-21-YL-065) teşekkür ederim.

Sevgili aileme maddi ve manevi hiçbir yardımı esirgemedен yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	x
İÇİNDEKİLER.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.....	4
KARACİĞER.....	4
2.1. KARACİĞER'İN ANATOMİSİ.....	5
2.2. KARACİĞER HİSTOLOJİSİ.....	6
2.2.1. Karaciğer Hücreleri.....	6
2.2.1.1. Hepatositler.....	6
2.2.1.2. Biliyer Epitel Hücreleri.....	6
2.2.1.3. Peribilier Bez Hücreleri.....	6
2.2.1.4. Kanallı Hücreler.....	7
2.2.1.5. Endotel Hücreleri.....	7
2.2.1.6. Kupffer Hücreleri.....	7
2.2.1.7. Hepatik Yıldız Hücreleri.....	8
2.2.1.8. Pit Hücreleri.....	8
2.3. KARACİĞERİN BİYOKİMYASI.....	8
2.3.1. Karaciğerin Metabolizmadaki Görevleri.....	8
2.3.2. Karaciğerin Detoksifikasyonu.....	9
2.3.3. Karaciğerin İmmünolojik Fonksiyonu.....	10
2.3.3.1. Karaciğerin Doğuştan Bağışıklığı.....	10

2.3.3.2. Uyarlanabilir Bağışıklık.....	11
BÖLÜM 3	12
BİSFENOL A	12
3.1. BİSFENOL A'NİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ	12
3.2. BPA'NİN ÜRETİMİ VE KULLANIMI.....	12
3.3. BPA'NİN VÜCUT SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ	13
3.3.1. Bpa'nın Üreme Sistemi Üzerine Etkileri	13
3.3.1.1. Doğurganlık	13
3.3.1.2. Erkek Cinsel İşlevi.....	13
3.3.1.3. Seks Hormonu Konsantrasyonları	14
3.3.1.4. Polikistik Over Sendromu.....	14
3.3.1.5. Meme Kanseri.....	14
3.4. BPA'NİN METABOLİK HASTALIK ÜZERİNE ETKİLERİ.....	15
3.4.1. Tip 2 Diyabet	15
3.4.2. Kardiyovasküler Hastalık	15
3.4.3. Karaciğer Hastalıkları	15
3.4.4. Obezite	16
3.4.5. Tiroid Fonksiyonu Üzerine Etkileri.....	16
3.4.6. Bağışıklık Fonksiyonu Üzerine Etkileri	16
3.4.7. Oksidatif Stres ve İnflamasyon.....	17
BÖLÜM 4	18
D VİTAMİNİ	18
4.1. D VİTAMİNİ VE KARACİĞER İLİŞKİSİ.....	20
BÖLÜM 5	21
APOPİTOZ	21
5.1. PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜM YOLLARI.....	22
5.1.1. İntrinsik Apopitoz.....	22
5.1.2. Ekstrinsik Apopitoz	23
5.1.3. Kaspazlar	25
5.1.4. Granzim	26

5.2. PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜNÜ BELİRLEMEK İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER	26
5.2.1. Apoptozu Belirlemek İçin Kullanılan Morfolojik Yöntemler	27
5.2.2. Apoptoz Tespitinde Kullanılan İmmünohistokimyasal Yöntemler	29
5.2.3. Apoptozu belirlemek için kullanılan biyokimyasal yöntemler	31
5.2.4. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan İmmunolojik Yöntemler	31
5.2.5. Apoptozu Belirlemek İçin Kullanılan Moleküler Biyoloji Yöntemleri.	32
BÖLÜM 6	33
OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	33
6.1. OKSİDATİF STRES	33
6.2. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	34
6.2.1. Enzimatik Antioksidanlar	35
6.2.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar	36
BÖLÜM 7	38
GEREÇ VE YÖNTEM	38
7.1. GEREÇLER	38
7.1.1. Deney Hayvanları	38
7.1.2. Kimyasal Malzemeler	38
7.1.3. Laboratuvar Cihazlar	38
7.2. YÖNTEMLER	39
7.2.1. BPA'nın Hazırlanması ve Uygulanması.....	39
7.2.2. Ratların Bakımı.....	39
7.2.3. Ratların Deney Protokolü	39
7.2.4. Biyokimyasal Analizler	41
7.2.4.1. Numunelerin Hazırlanması	41
7.2.4.2. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analizi.....	41
7.2.4.3. Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Ölçümü.....	43
7.2.4.5. Histopatolojik Analiz	44
7.2.4.6. İmmünohistokimyasal Analiz	45
7.2.4.7. İstatistiksel Analiz.....	45

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 8	46
BULGULAR.....	46
8.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR	47
8.3.1. Karaciğer Dokusu MDA ve GSH Düzeyleri	47
8.3.2. Karaciğer Dokusu SOD ve CAT Aktivite Düzeyleri	47
8.3.3. Karaciğer Dokusu TAS, TOS ve OSİ Düzeyleri	47
8.4.1. Karaciğer Dokusu TNF- α ve İL-6 Düzeyleri	48
8.5. SERUM BİYOKİMYA PARAMETRELERİ.....	48
8.5.1. Serum AST, ALT ve ALP Düzeyleri	48
8.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	49
8.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	53
BÖLÜM 9	57
TARTIŞMA VE SONUÇ	57
9.1. TARTIŞMA.....	57
9.2. SONUÇ	62
KAYNAKLAR	63
EK AÇIKLAMALAR ETİK KURUL İZİNİ.....	78
ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Bisfenol A'nın kimyasal formülü	12
Şekil 4.1. Kolekalsiferol (D ₃ Vitamini) kimyasal yapısı	18
Şekil 5.1. İntrensik ve ekstrinsik apopitotik yollar	23
Şekil 5.2. İntrensik apopitotik yolak. BCL-2 ailesi proteinleri etki mekanizması. ..	23
Şekil 5.3. Ekstrinsik apopitoz yolağında TNF- α ve TNFR-1 reseptör.	24
Şekil 5.4. Ekstrinsik apopitoz yolağında Fas/FasL.	24
Şekil 5.5. Apopitozun özeti.....	26
Şekil 5.6. Apoptotik hücreler (oklar) (HxE boyama)	27
Şekil 5.7. Hoechst boyama (N, Normal hücreler, A, Apopitotik hücreler)	28
Şekil 5.8. Karaciğer dokusunda apopitotik hücreler (X)	30
Şekil 6.1. Başlıca ROS' lar ve detoksifikasyon yolları.....	33
Şekil 6.2. Enzimatik antioksidanlar ve gerçekleştirdiği reaksiyonlar.....	35
Şekil 7.1. Karın boşluğunun açılması.	40
Şekil 7.2. Karaciğer dokularının alınması.....	40
Şekil 8.1. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu Bar 200 $\mu\text{m} \times 10\text{x}$	49
Şekil 8.2. D ₃ grubuna ait karaciğer dokusu Bar 200 $\mu\text{m} \times 10\text{x}$	50
Şekil 8.3. Zeytinyağı grubuna ait karaciğer dokusu Bar 200 $\mu\text{m} \times 10\text{x}$	50
Şekil 8.4. BPA uygulanan grupta hepatositlerde, oklar: granüler vakuoler dejenerasyon Bar 100 $\mu\text{m} \times 40\text{x}$	51
Şekil 8.5. BPA uygulanan grupta hepatositlerde, yıldız: inflamatuvar hücre infiltrasyonu Bar 100 $\mu\text{m} \times 40\text{x}$	51
Şekil 8.6. BPA uygulanan grupta oklar: sinuzoidlerde konjesyon ve dilatasyonBar 100 $\mu\text{m} \times 40\text{x}$	52
Şekil 8.7. BPA uygulanan grupta oklar: lenfosit infiltrasyonu Bar 100 $\mu\text{m} \times 40\text{x}$... 52	
Şekil 8.8. BPA ve D ₃ uygulanan grupta karaciğerin görüntüsü Bar 200 μm , $\times 10\text{x}$ 53	
Şekil 8.9. Kontrol grubundan alınan karaciğer örneklerine yapılan TUNEL boyamasında apoptotik hücre görülmemiştir. Bar 100 $\mu\text{m} \times 20\text{x}$	54
Şekil 8.10. Zeytinyağı kullanılan gruptan alınan karaciğer örneklerine yapılan TUNEL boyamasında apoptotik hücre görülmemiştir. Bar 100 $\mu\text{m} \times 20\text{x}$	54

Şekil 8.11. D ₃ vitaminin kullanıldığı gruptan alınan karaciğer örneklerine yapılan TUNEL boyamasında apoptotik hücre görülmemiştir. Bar 100 µm× 20x.....	55
Şekil 8.12. BPA grubundan alınan karaciğer örneklerine yapılan TUNEL boyaması oklar: apoptotik hücreler ok başları: apoptoz göstermeyen hücreler. Bar 100 µm× 20x	55
Şekil 8.13. BPA ve D ₃ vitamininin birlikte kullanıldığı gruptan alınan karaciğer örneklerine yapılan TUNEL boyaması oklar: apoptotik hücreler ok başları: apoptoz göstermeyen hücreler. Bar 100 µm× 20x.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 7.1. Hematoksilen eosin boyama protokolü.....	44
Çizelge 8.1. Karaciğer biyokimya değerlerine ilişkin çizelge	46
Çizelge 8.2. Serum biyokimya değerlerine ilişkin çizelge.....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

CPR	: sitokrom P450 redüktaz
H ₂ O ₂	: hidrojen peroksit
H ₃ PO ₄	: fosforik asit
HOCl	: hipokloröz asit
Na ₂ EDTA	: disodyum etilendiamin tetraasetik asit
Na ₂ HPO ₄	: disodyumdihidrojen fosfat
NO•	: nitrik oksit radikali
O ₂ ⁻	: süperoksit radikali
O ₂	: oksijen
OH•	: hidroksil radikali
ONOO ⁻	: peroksinitrit radikali

KISALTMALAR

AA-NAT	: Arilalkilamin-N-asetiltransferaz
ADA	: Amerikan diyabet derneği
AFA	: Arilamin formamidaz
AFMK	: N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin
AGE	: İleri glikasyon son ürünleri
APG	: Açlık plazma glukozu
ASMT	: Asetilserotonin-O-metiltransferaz
BPA	: Bisfenol A
BSA	: Bovine serum albumin
BUN	: Kan üre azotu
CAT	: Katalaz
CVO	: Sirkumventriküler organ

DAG	: Diaçilgliserol
DHAP	: Dihidroksiaseton fosfat
DIP	: Gebelikte diyabet
DTNB	: Dithiobis-2 nitrobenzoik asit
EASD	: Avrupa Diyabet Çalışma Birliği
eNOS	: İndüklenmiş nitrik oksit sentaz
FIGO	: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
GAPDH	: Gliseraldehit-3-Dehidrojenaz
GDM	: Gestasyonel diyabetes mellitus
GFAT	: Glutamin fruktoz-6-fosfat amidotransferaz
GFR	: Glomerüler filtrasyon hızı
GLUT	: Kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcısı
GP _x	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
HbA1c	: Glukozillenmiş hemoglobin A1c
HIP	: Gebelikte hiperglisemi
IDDM	: İnsüline bağımlı diyabetes mellitus
IDF	: Uluslararası Diyabet Çalışma Birliği
IMCC	: İntermediolateral hücre kolonu
i.p	: İntroperitonal
MDA	: Malondialdehit
MRGC	: Melanopsin içeren retinal ganglion hücreler
NBT	: Nitro blue tetrazolium
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa B
NIDDM	: İnsüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus
NO	: Nitrik oksit
NTF	: Nötral tamponlanmış formalin
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi
OSI	: Oksidatif Stres İndeksi
PARP	: PoliADP riboz polimeraz
PKC	: Protein kinaz C

PVN	: Paraventriküler nükleus
RAAS	: Renin-anjiotensin-aldosteron sistemi
RAGE	: AGE reseptörü
RHT	: Retinohipotalamik yol
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SCG	: Sempatik servikal ganglion
SCN	: Süprakiazmatik nucleus
SDRH	: Son dönem renal hastalık
SF	: Serum fizyolojik
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAS	: Total antioksidan seviye
TBA	: Tiyobarbitrik asit
TGF- β 1	: Dönüştürücü büyüme faktörü- β 1
TOS	: Total oksidan seviye
UDP-GLcNAc	: Üridin difosfat N-asetilglukozamin
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bisfenol A isimli kimyasal [BPA, 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan], sanayide özellikle epoksi reçine yapımında ve polimer olmayan diğer plastiklerde katkı maddesi olarak sıklıkla kullanılan, yalancı östrojenik etkisi nedeniyle de hormonal sistemi olumsuz etkileyen bir maddedir. Endokrin sistemin hem gelişiminde hem de işleyişinde öngörülemez değişikliklere yol açar [1]. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Çevre Koruma Ajansı (U. S. EPA) BPA'nın da içinde bulunduğu bu tip maddeleri; hedef reseptör ya da dokudaki hormonların etkisini durduran, taklit eden, ya da direkt olarak endokrin sistem hormonlarının üretimini stimüle veya inhibe eden kimyasallar olarak tanımlamıştır [2]. Yapılan çoğu çalışmada östrojenik özellik gösterdiği için BPA da bu grupta tanımlanmıştır [1]. BPA ilk olarak 1891'de Dianin tarafından bildirilmiştir [3]. Yaklaşık olarak bir asırdır sentetik estradiol özelliği ile ticari sahada kullanım alanı bulmuştur [4]. Hem üretim hem de kullanım bakımından dünyada oldukça üst sıralarda kendine yer bulan BPA [5], 2000'li yılların başında 2,8 milyon ton olan üretimini yaklaşık 10 yıl gibi kısa bir sürede iki katından fazla artırmıştır [6]. Üretiminde en fazla büyüme Hindistan'da %19 ile gözlemlenmektedir [4]. BPA aslen metabolizmaya girişini bulaşık yiyeceklerin yenilmesi ve içme suyunun içilmesi ile yapmaktadır. Bunun yanında BPA ile kirlenmiş hava ve şehir suyu, kişisel bakım ürünleri ve medikal ürünlerden bazıları BPA'nın vücuda alınmasının önemli bir kısmına zemin hazırlarken, üretim aşamalarında çalışan kişiler için önemli alım yolları inhalasyon ve dermal temastır [7]. Vücuda ağız yoluyla alınmasında, gıdaların plastik poşetlerde ısıtılması (özellikle mikrodalga fırın kullanımında yaygın) veya pişirmeden önce paketlenmesi gibi uygulamalar sebep olarak kabul edilebilir. Yine epoksi reçineden yapılmış gıda ambalajları, su şişeleri ya da plastik biberonların kullanımı ile de ağız yoluyla oldukça yüksek miktarda BPA vücuda alınmış olunur [7]. Ayrıca, diş ile ilgili ürünler (diş macunları ve kompozit dolgular) yine BPA'nın ağız yoluyla alınmasında önemli bir sebep olarak sıralanabilir [6]. U. S. EPA tarafından BPA için gözlenebilen

hiçbir yan etki göstermeyen doz (NOAEL) ve en düşük gözlenen etki seviyesi (LOAEL) değerleri sırası ile 5 ve 50 mg/kg/vücut ağırlığı olarak tanımlanmıştır [8]. Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA) 50 µg/kg vücut ağırlığı/gün tolere edilebilir bir günlük alım değeri (TDI) belirlenmiştir [9]. İnsanlar için kabul edilebilir günlük alım dozu, kemirgenlerde yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Kemirgen yavrularının gelişme döneminde BPA'ya karşı hassasiyetlerinin önemli ölçüde arttığı bilgisinin ortaya çıkmasının ardından güvenli doz ile ilgili bilgilerden de endişe duyulmasının [10] ardından, aynı kurum 2015 yılında BPA'nın TDI değerini 4 µg/kg/gün seviyesine düşürdüğünü bildirmiştir [2]. Bulaş ya da vücuda alım yolu ne olursa olsun BPA temelde karaciğer glukuronidasyon yolunda metabolize olur. Biyolojik yarılanma ömrü yaklaşık 6 saattir ve bir günün sonunda idrarla neredeyse tamamı atılır. Ancak metabolizasyon hızı yüksek olduğu halde, BPA oldukça uzun bir süre dokularda birikebilir [11]. BPA; kan serumu, plazma, amniyon sıvısı, plasenta dokusu ve göbek kordon kanı, anne sütü, semen ve foliküler sıvıda olmak üzere vücudun birçok farklı dokusunda ve farklı vücut sıvılarında tespit edilmiştir [12]. ABD nüfusunun neredeyse tamamının idrar örneklerinde BPA bulunur, yetişkinlerde idrar ortalama BPA düzeyinin 2,5 ng/ml olduğu ve kanda serbest BPA konsantrasyonunun 1 ng/ml olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, maternal plazmada 0,3–18,9, fetal plazmada 0,2–9,2 ve anne sütünde 0,28–0,97 ng/ml düzeylerinde BPA saptanmıştır [13]. Belirlenen güvenli doz altındaki düzeylerde bile gelişimsel maruziyetin sayısız olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir.

D vitamini steroid yapıda bir prohormondur, D₂ ve D₃ olmak üzere iki şekilde bulunur [14]. D₂ bitkisel kaynaklı besinlerden sağlanırken [14]. D₃ vitamininin çoğu, güneşten alınan ultraviyole-B (UVB) ışınları sayesinde sentezlenirken, çok az bir kısmı diyetle alınır [14, 16]. D vitamini eksikliği dünya genelinde yaygın bir problemdir [15]. Referans değerleri konusunda görüş birliği yoktur ancak kan dolaşımındaki 25 hidroksi vitamin D (25-OH-D) düzeyinin 30 ng/mL'den yüksek olması normal, 21-29 ng/mL arasında bulunması D vitamini yetersizliği, 20 ng/mL'den düşük olması ise D vitamini eksikliği olarak tanımlanır [17-19]. D vitamini hem bağışıklığı güçlendirici hem de oksidatif hasardan koruyucu etkileri ile bilinen önemli bir hormondur. [20-22].

Sahip olunan bu bilgilerin ışığında yiyeceklerle alınan BPA'nın oksidatif etkisinin, karaciğerde apoptoza yol açıp açmadığı immunohistokimyasal olarak belirlenmiş, D vitamininin antioksidan etkisinin, apoptotik faaliyeti nasıl etkilediği gösterildi. Aynı zamanda dokuda SOD, MDA, GSH, TAS, TOS, CAT, OSI, IL-6, TNF- α değerleri belirlenerek antioksidan etkinin düzeyi ve inflamasyonla olan ilişkisi biyokimyasal olarak da ortaya konuldu.

BÖLÜM 2

KARACİĞER

Fetal gelişimin başlangıcında (gebeliğin üçüncü haftasının sonu), ön bağırsağın kaudalinden ventral yönde hepatik divertikül gelişir. Endoderm kökenli olan bu divertikül daha sonra perikardiyal ve peritoneal boşluklar arasında yer alan ve splanknik bir mesoderm kitlesi olan transvers septuma (septum transversum) doğru uzanır [23,24]. Septum transversum bu bölgedeki ventral mezogastriumu oluşturur. Halihazırda var olan transvers septumun mezenkimal elementleri, hepatik divertikülün hepatik endodermal hücrelerinden (hepatoblastlar olarak da bilinir) oluşan karaciğer parankimi tarafından yatırılır ve karaciğer tomurcuklarını oluşturur [25]. Fetal gelişim sırasında, hepatositik kordlar, venöz-sinüzoidal pleksus ve karaciğer makrofajları olarak bilinen Kupffer hücreleri de dahil olmak üzere hematopoietik öncü hücrelerden oluşan karaciğer tomurcukları, hematopoietik bir organ olarak işlev görür. Karaciğerin gelişimi sırasında kanın çoğunu V.umbilicalis sağlar. Kalan daha az miktarda kan, portal ven ve hepatik arter tarafından sağlanır. Fetal gelişim sırasında plasenta, besinlerin emilmesi ve safra içeren atık ürünlerin atılması dahil olmak üzere yetişkin karaciğeri tarafından gerçekleştirilen başlıca işlevleri yerine getirir; fetal karaciğer tarafından safra salgısı doğumdan önce ihmal edilebilir düzeydedir. Bununla birlikte fetal karaciğer, alfa-fetoprotein ve diğer plazma proteinlerini üretir, safra asitlerini sentezler ve yağ, glikojen, demir ve bakır depolar. Karaciğer divertikülünün ön kısmından karaciğer ve karaciğerin içindeki safra kanalları, arka kısımdan ise vesika fella ve karaciğer dışı safra kanalları oluşur [24, 26-27].

İntrahepatik safra kanallarının nihai oluşumu, gelişim sırasında geç ortaya çıkar ve doğumdan sonra yaşamın ilk yılında tamamlanır. Küçük intrahepatik safra kanallarının gelişimi, bir portal ven dalını çevreleyen portal mezenkim ile yakın temas halinde olan periportal hepatoblastlar tarafından bir araya getirilen küçük düz epitel hücrelerinin tek katmanlı bir kılıfı olan duktal plaka oluştuğunda başlar [24]. Takip eden haftalarda,

duktal plakaların belirli kısımları ikinci bir hücre katmanıyla çoğaltılır, çift katmanlı kanal plakaları haline gelir ve daha sonra yeni oluşturulan portal bölgenin mezenşimine entegre edilecek silindirik yapılar oluşturmak için genişler. Portal boşluğa entegre edildiklerinde, olgunlaşmamış tübüller, bağ dokusu tarafından sarılmış safra kanallarına dönüşür ve portal yollar büyüdükçe yavaş yavaş portal yollarda normal konumlarına yerleşirler [24, 28-29].

2.1. KARACİĞER'İN ANATOMİSİ

Karaciğer, V. hepatica medius ve V. kava inferior ile vesica fella fossası arasındaki bir düzlemle sağ ve sol loblara ayrılır. Alt yüzeyden bakıldığında, safra kesesi fossası çevresinde kuadrat lob ve kısmen vena kavayı çevreleyen kaudat lob vardır. Karaciğerde afferent iki kan kaynağı vardır: hepatik arter ve portal ven. Sinüzoidler kanı hepatik arterlerden ve portal venlerden terminal hepatik venüllere ve ardından hepatik ven yoluyla inferior vena cava'ya taşır. Fonksiyonel olarak karaciğer, Couinaud sınıflandırması veya Couinaud şeması olarak bilinen kan akışına göre sekiz bölüme ayrılır. Segment I, esas olarak, doğrudan inferior vena kavaya akan kaudat lobu temsil eder. Segment II ila VIII sol lobdan yukarıda başlayan bir ön düzlemde saat yönünde numaralandırılır. Bu bölümler hepatik venlerin üç ana dalıyla sınırlıdır: sol, orta ve sağ hepatik damarlar. Her bölüm hepatik venlerin dallarına ve ardından inferior vena kavaya akar. Genel olarak, I ila IV. segmentler fonksiyonel sol lobu temsil ederken, V ila VIII segmentler fonksiyonel sağ lob olarak kabul edilir. Couinaud şemasına göre karaciğerin bölünmesi, kalan segmentlere zarar vermektan kaçınmak için tek bir segmentin veya iki veya daha fazla bitişik segmentin blok halinde cerrahi olarak çıkarılmasına izin verir [30].

2.2. KARACİĞER HİSTOLOJİSİ

2.2.1. Karaciğer Hücreleri

2.2.1.1. Hepatositler

Endodermden köken alan hepatositler, karaciğerdeki birincil hücre popülasyonudur ve karaciğer hacminin yüzde 75 ila 80'ini oluşturur [31]. Enine kesitte altıgen veya çok yüzlüdürler ve merkezi olarak yerleştirilmiş yuvarlak bir çekirdek içeren eozinofilik bir sitoplazmaya sahiptirler; hepatositler bazen iki çekirdekli olabilir. Yetişkin karaciğerinde hepatositler birbirleriyle anastomoz yapan plakalar halindedir ve bu plakalar birbirinden oksijenli kanın portal yollardan hepatic venüllere aktığı sinuzoidlerle ayrılır. Safra, sadece hepatositler tarafından üretilir ve hepatositik plaklarda iki veya üç bitişik hepatosit arasında oluk benzeri yapılar olan safra kanaliküllerine salgılanır [32].

2.2.1.2. Biliyer Epitel Hücreleri

Septal veya daha büyük intrahepatik safra kanallarının astar epitel hücreleri (kanal duvarları) uzun prizmatik ila kübik, interlobüler safra kanallarınıninki ise tipik olarak kübik şekildedir. Bu hücreler bir Periyodik Asit-Schiff (PAS) pozitif bazal membran tabakası ile çevrelenmiştir ve ayrıca safra kanallarının boyutuna bağlı olarak değişken miktarda bağ dokusu ile çevrelenmiştir. İnterlobüler safra kanalı ve hepatic arter tipik olarak birbirine bitişiktir, çapları birbirine yakındır ve aralarında yaklaşık olarak kendi çapları kadar bir mesafe bulunur. Safra kanalları, Hering kanallarından safra kanalına bağlanır. Kesitte, safra kanalının konfigürasyonu bir inci zinciri olarak görünür.

2.2.1.3. Peribilier Bez Hücreleri

Peribilier bezler, karaciğerdeki safra kanallarının küçük aksesuar bezleridir. Hiler safra kanalları, sistik kanal alanlarında yoğun olarak bulunan özel kanallar [28,33,34] aracılığıyla intrahepatik ve ekstrahepatik büyük safra kanallarının lümenleri ile iletişim kurarlar [34,35]. Peribilier bezler, intrahepatik ve ekstrahepatik büyük safra

kanallarını çevreleyen küçük asinuslar oluşturan glandüler ve dallı tubuloalveolar yapılardan oluşur. Glandüler hücreler küboidaldir ve şeffaftır, doğası gereği seromüsinözdür, laktoferrin ve lizozim salgırlar [36].

2.2.1.4. Kanallı Hücreler

Safra kanalları “kolanjiyoller” olarak da bilinir. Hering'in safra kanalları ve kanalları terimleri bazen birbirinin yerine kullanılır, ancak bunlar iki farklı fizyolojik ve histolojik yapıyı temsil eder. Hering kanalları, safra ağacı ile hepatosit kanalikülleri arasındaki fizyolojik bağlantıdır [37].

2.2.1.5. Endotel Hücreleri

Hücreleri, diğer organlardaki arterleri, damarları ve kılcal damarları kaplayan endotelial hücreler ile aynı özellikleri ve immünofenotipi paylaşır. Tek katlı yassı endotel hücreleri, bir bazal membranın üzerine eklenir ve bu damarların vasküler boşluklarını kaplar. CD31, CD34 ve faktör VIII ile ilişkili antijene (von Willebrand faktörü) karşı antikorlara karşı immünoreaktifler. Bunun aksine, sinüzoidal boşlukları kaplayan endotel hücrelerinde bir taban zarı yoktur. Normal karaciğerde, sinüzoidal boşluklar fenestredir ve CD31 veya CD34'e immünohistokimyasal olarak reaktif olmayan endotelial hücreler tarafından kaplanır. Fenestrasyon, plazmanın sinüzoidal boşluklar ve Disse'nin subendotelial boşluğunun altındaki hepatositler arasında taşınmasına izin verir. Hepatositlerde neoplastik değişiklik olduğunda, fenestrasyon azalır ve sinüzoidal endotel hücreleri, sinüzoidlerin kapilerizasyonu olarak bilinen bir fenomen olan CD31 veya CD34'e reaktif hale gelir [38-39].

2.2.1.6. Kupffer Hücreleri

Kupffer hücreleri, sinüzoidal boşlukların duvarlarını kaplayan mononükleer fagosit sisteminin özel makrofajlarıdır. Normalde belirgin değildirler, ancak karaciğer hasarından kaynaklanan fagositoz kalıntılarını yuttuklarında ve fark edilir hale geldiklerinde genişler ve belirgin hale gelirler [40].

2.2.1.7. Hepatik Yıldız Hücreleri

Hepatosit sitoplazmik membran ile sinüzoidal boşluk arasındaki, fenestrelili sinüzoidal endotelial hücrelerin altındaki bölme, hepatik yıldız hücrelerin bulunduğu Disse alanıdır. Bu hücreler için daha önce Ito hücreleri, yağ depolayan hücreler, perisinüzoidal hücre lipositleri ve parasinüzoidal hücreler gibi bir takım eş anlamlı kullanılmıştır, ancak bu hücreyi inceleyen araştırmacıların fikir birliğiyle tercih edilen isimlendirme hepatik yıldız hücresidir [41]. Normal karaciğerin subendotelial boşluklarında, bu hücreler sitoplazmalarında A vitamini (retinoid) damlacıklarını depolar [42].

2.2.1.8. Pit Hücreleri

Disse alanında bulunan bir başka hücre türü de pit hücreleridir. Pit hücreleri, doğal öldürücü hücre özelliklerine sahip, büyük granüller içeren karaciğere özgü lenfoid hücrelerdir [43]. Pit hücreleri ışık mikroskobu altında kolayca tanımlanamaz, ancak elektron mikroskobu ile çok sayıda cisimle ilişkili yoğun granüller ve çubuk çekirdekli veziküller içeren hücreler olarak karakterize edilmiştir [44].

2.3. KARACİĞERİN BİYOKİMYASI

Karaciğerini safra salgısı, bilirubin metabolizması, vasküler ve hematolojik fonksiyonlar, besin metabolizması, metabolik detoksifikasyon, minerallerin ve vitaminlerin depolanması şeklinde gruplandırılmış çok sayıda işlevi vardır.

2.3.1. Karaciğerin Metabolizmadaki Görevleri

- Safra Salgısı
- Bilirubin Metabolizması
- Vasküler ve Hematolojik Fonksiyonlar
- Önemli kan rezervuarı
- Besinlerin Metabolizması
- Yağ - yağ asidi oksidasyonu, kolesterol / lipoprotein sentezi ve ketoasit üretimi

- Protein - Amino asit üretimi, proteinlerin dönüşümü
- Karbonhidrat - galaktozu / fruktozu glikoza, glukoneogeneze dönüştürür
- Metabolik Detoksifikasyon
- Toksinler
- Hormonlar
- İlaçlar *
- Mineral ve Vitaminlerin Saklanması
- Demir, Bakır, Vitaminler (A, D*, E, K, B12), Glikojen
- Endokrin fonksiyonları
- D vitamini aktivasyonu
- Tiroksinin (T4) T3'e dönüşümü
- Anjiyotensinojen salgılanması
- Hormonların metabolizasyonu
- İmmünolojik / Koruyucu Fonksiyonlar
- Portal kanı bakterilerden filtreler
- Antijen sunumunda önemli
- Kupffer hücreleri yoluyla fagositoz
- Toksinlerin ve İlaçların İnaktivasyonunu
- Hemoliz ürünlerini ortadan kaldırır
- Faz I (oksidasyon, indirgeme ve hidroliz)
- Faz II (konjugasyon / sitokrom P450 sistemi) [45,46].

2.3.2. Karaciğerin Detoksifikasyonu

Karaciğer, eksojen ve endojen kimyasalları (örneğin ilaçlar), yabancı molekülleri ve hormonları daha az toksik veya biyolojik olarak daha az aktif hale getirmek için değiştirir. Metabolik detoksifikasyon adı verilen bu süreç, potansiyel olarak toksik maddelerin bağırsaktan veya renal tübüllerden yeniden emilimini azaltarak atılımını kolaylaştırır. Bu şekilde alkol, barbitüratlar, amfetaminler, steroidler ve hormonlar (östrojenler, aldosteron, antidiüretik hormon ve testosteron dahil) metabolize edilir veya detoksifiye edilerek bunların aşırı birikimi ve yan etkileri önlenir. Metabolik detoksifikasyon genellikle koruyucu olmakla birlikte, bazı sürelerde metabolik

detoksifikasyon ürünleri toksinlere dönüşür. Örneğin alkol metabolizması olanlar asetaldehit ve hidrojen dir. Uzun süre aşırı alkol alımı, bu son ürünlerin hepatositlere zarar vermesine neden olur. Asetaldehit, hücresel mitokondriye zarar verir ve fazla hidrojen, yağ birikimini teşvik eder. Alkol, karaciğerin işlev görme yeteneğini bu şekilde bozar. Yetişkin karaciğeri, çeşitli ekzojen ve endojen bileşiklerin detoksifiye edilmesinden ve metabolize edilmesinden sorumlu olan ana organdır, bu da onları daha hidrofilik hale getirir, bu da genellikle potenslerini ve düzeylerini etkiler [47]. Faaliyetlerden sorumlu enzimler öncelikle hepatositlerde üretilir ve temel olarak iki gruba ayrılır: Faz I ve Faz II. Faz I enzimleri ağırlıklı olarak, genel işlevi hidroksil grupları gibi polar grupları lipofilik moleküllere ekleyerek onları daha hidrofilik hale getiren P-450 gen ailesindedir [48]. Faz II enzimlerinin esas fonksiyonu, faz I'ler tarafından eklenen polar gruba suda çözünür bir kısmı kovalent bir şekilde bağlamaktır. Bu tür moleküller çoğunlukla glukuronik asit veya glutatyon gibi şekerler veya peptitlerdir. Bu genellikle bileşiği daha az reaktif hale getirir. Faz II enzimlerinin örnekleri, glutatyon-S-transferaz ve UDP-glukuronosil transferazdır. Faz II reaksiyonu bazı nedenlerden dolayı bozulursa veya faz I reaksiyonu indüklenirse, bu organizmayı faz I reaksiyonundan aşırı reaktif molekül bırakarak zararlı olabilir. Bu, ilaca bağlı hepatotoksiste durumunda, ana bileşiğin reaktif metabolitleri oluştuğunda meydana gelebilir ve bu daha sonra hücresel fonksiyonları olumsuz etkiler [49].

2.3.3. Karaciğerin İmmünolojik Fonksiyonu

Karaciğer, fetal gelişimin belirli aşamalarında ana hematopoetik organdır ve doğumdan sonra bile hematopoetik bir organ olmaya devam eder. Yerleşik hematopoietik kök hücrelerden tüm lökosit soylarını üretebilir [50,51]. Karaciğerin portal yolu, hematopoietik kök hücrelerin yanı sıra birçok farklı hematopoietik hücre içerir [52].

2.3.3.1. Karaciğerin Doğuştan Bağışıklığı

Diğer organlara kıyasla karaciğer, özellikle doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücreleri açısından zengindir. Karaciğerin ana hücre tiplerinden olan NK- T hücreleri kesin olarak doğuştan gelen bağışıklığın bir parçası değildir, ancak işlevsel olarak

uyarlanabilir ve doğuştan gelen arasında bir yerdedir. Karaciğer lenfositlerinin yaklaşık % 30'u NK hücreleridir ve bu, NK hücrelerinin karaciğer bağışıklığına büyük katkısını gösterir. Bu, periferik kan lenfositlerinde bir araya gelen iki hücre tipinin katkıda bulunduğu yaklaşık % 15 ile karşılaştırılabilir [53].

2.3.3.2. Uyarlanabilir Bağışıklık

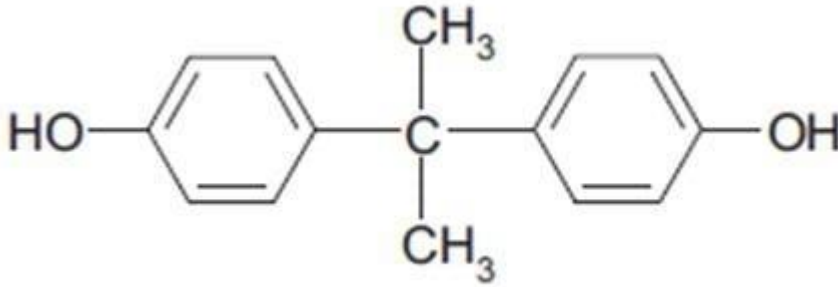
Adaptif immünite, humoral immünite ve hücre aracılı immünite olarak sınıflandırılabilir ve sırasıyla B ve T lenfositleri aracılık eder. T hücreleri, B hücrelerinin plazma hücrelerini salgılayan antikora farklılaşmasını teşvik eder. T hücreleri, enfekte olmuş hücreleri öldürür ve TNF α , IFN γ ve IL -6 gibi sitokinleri salgılar. Kupffer hücrelerinden türetilen TNF α , daha sonra sitotoksik bir yanıt ortaya çıkaran T hücrelerinin aktivasyonunun uyarılmasında önemli bir rol oynar [54]. Alkollü hepatit dahil olmak üzere hepatitte yüksek düzeyde aktive olan CD8 + T hücrelerinin intrahepatik birikimi patogenez sürecinin bir parçasıdır [55].

BÖLÜM 3

BİSFENOL A

3.1. BİSFENOL A'NIN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Bisfenol A (BPA) (4,4-izopropilidendifenol; 2,2-bis(4-hidroksifenil)-propan), molekül ağırlığı 228,29 g/cm³ olan kimyasal bir bileşiktir. BPA, erime noktası 156°C ve kaynama noktası 220°C (5 hPa basınçta) olan beyaz, kristalli katı bir maddedir. Logaritmik biçimde ifade edilen BPA'nın su-oktanol katsayısı 3.32'dir (log P = 3.32), bu da onun yağlarda iyi çözünürlüğünü ve suda düşük çözünürlüğünü gösterir (25°C'de yaklaşık 200 mg/dm³). BPA, doğrudan aromatik halkaya bağlı hidroksil kalıntısına sahip bir fenol grubuna aittir. BPA'daki hidroksil gruplarının varlığı, onun iyi reaktivitesini belirler. Diğer fenollere benzer şekilde BPA, eterlere, esterlere ve tuzlara dönüştürülebilir. Ayrıca BPA, nitrasyon, sülfonasyon veya alkilasyon gibi elektrofilik sübstitüsyona uğrar [56, 57].



Şekil 3.1. Bisfenol A'nın kimyasal formülü [58].

3.2. BPA'NIN ÜRETİMİ VE KULLANIMI

BPA ilkin 1891 yılında Rus bir kimyager olan Alexander P. Dianin tarafından iki fenol molekülü ve bir aseton molekülünün hidrojen klorür veya iyon değiştirici reçine gibi bir katalizör varlığında kondenzasyon reaksiyonu ile sentezlendi. 1930'da sentetik

östrojen araştırmaları sırasında BPA kapsamlı bir şekilde analiz edildi [59]. BPA dñnyada en çok üretilen ve kullanılan kimyasallardan biridir. 2003 yılında BPA'nın yıllık üretimi bazı literatür verilerine göre 3.8 milyon ton olmakla beraber ortalama 2,7 milyon tondan fazladır ve üretimi artmaya devam etmektedir [56]. BPA esas olarak (%95) epoksi reçineler ve polikarbonatlar dahil sentetik polimerlerin üretiminde kullanılmaktadır [57]. BPA'dan yapılan sentetik polimerlerin iyi mekanik özellikleri, düşük nem adsorpsiyonu ve termal stabilitesi nedeniyle, su boruları, gıda kapları, şişeler, oyuncaklar, biberon emzikleri, tıbbi ekipman, diş ürünleri, elektronik cihazlar dahil olmak üzere çeşitli ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır [60]. Ayrıca BPA, poliakrilatlar, polyester ve teneke kaplamalar için verniklerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır ki bu malzemeler bozunmadan sonra çevre ve gıdada bu bileşiğin önemli kaynakları olabilecek niteliktedir [61].

3.3. BPA'NIN VÜCUT SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

3.3.1. Bpa'nın Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

3.3.1.1. Doğurganlık

Çevresel kimyasalların insan üremesini bozabileceği öne sürülmüştür [62] ve BPA'nın doğurganlığın birçok safhasını etkilediği gösterilmiştir [63]. Çeşitli prospektif kohort çalışmaları, infertilite tedavisi (yani in vitro fertilizasyon, IVF) gören bireyleri incelemiş ve BPA'yı yumurtalık tepkisi, döllenme başarısı, embriyo kalitesi ve implantasyon başarısızlığı gibi çeşitli üreme son noktaları ile ilişkilendirmiştir.

3.3.1.2. Erkek Cinsel İşlevi

Li ve diğerleri tarafından yapılan iki kohort çalışmasında [64,65] işçilerde kendi bildirdikleri erkek cinsel işlevlerini incelenmiştir. Çalışmada, Çin'de bulunan BPA ve epoksi reçine imalat şirketlerinde çalışan erkekler ve BPA'ya maruz kalmayan erkekler incelendi. BPA maruziyeti, fabrikanın geçmiş kayıtları incelenerek, nokta hava örnekleme yapılarak ve kişisel hava takibi yapılarak belirlendi. Katılımcılara genel bir sağlık anketi yapıldı, ancak çalışmanın hedefinin BPA'nın etkileri olduğu

söylenmedi. Maruz kalan işçilerin kendi bildirdikleri cinsel işlev (erektile işlev, orgazm işlevi, cinsel istek ve cinsel yaşamdan genel memnuniyet) kontrollere göre önemli ölçüde daha düşüktü. Azalmış cinsel işlev, doza ve süreye bağımlı bir şekilde BPA maruziyetiyle ilişkilidi [65].

3.3.1.3. Seks Hormonu Konsantrasyonları

Birçok çalışma, yetişkinlerde ve yenidoğanlarda BPA maruziyeti ile ilgili olarak, endojen seks hormonu konsantrasyonlarında (yani östrojenler, androjenler ve gonadotropinler) ve ayrıca seks hormonu bağlayıcı globulinde (SHBG) değişiklikler bulmuştur. Hanaoka et al. [66] Bisfenol A diglisidil etere (BADGE) maruz kalan işçilerde ve yaş ve sigara içimi açısından eşleştirilmiş kontrollerde BPA düzeylerini ölçtüler. Epoksi reçine püskürterek BADGE'ye maruz kalan işçiler, kontrollerden önemli ölçüde daha yüksek toplam idrar BPA konsantrasyonlarına ve önemli ölçüde daha düşük folikül uyarıcı hormona (FSH) sahipti. Organik çözücülerin diğer ürünler metabolitleri işçilerde mevcuttu ancak hormon konsantrasyonları ile anlamlı bir korelasyon göstermedi [66].

3.3.1.4. Polikistik Over Sendromu

Birçok çalışma, yetişkin kadınlarda BPA'yı polikistik over sendromu (PKOS) ile ilişkilendirmiştir, ancak bu çalışmaların yorumlanması zor olabilir, çünkü yüksek androjenler hem PKOS'un bir belirtisidir hem de artmış BPA düzeyleri ile ilişkilidir. Birbirleriyle olan yakın ilişkileri nedeniyle her iki faktörün birbirinden bağımsız değerlendirilmesi zordur[67].

3.3.1.5. Meme Kanseri

BPA ve kanser arasındaki ilişkilere ilişkin bir çalışmada, Yang ve ark. [68] meme kanseri olan ve olmayan kadınlardan alınan kanda bulunan toplam serum BPA'sını analiz etti. Kanser hastalarında BPA yüksekliği vardı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi [68]. Başka bir çalışmada, örneklem boyutları çok küçük olmasına rağmen, anketle ölçüldüğü üzere yetişkinlerin mesleki olarak BPA'ya maruz kalması ile meme

kanseri teşhisi arasında bir ilişki bulunmadı [69, 70]. Bu çalışmalara dayanarak, BPA ile meme kanseri arasında bir bağlantı belirlenmemektedir. Biyolojik olarak daha alakalı çalışma tasarımı, meme kanserinin gelişmesi büyük olasılıkla yıllar aldığından ve hatta rahimde yerleşebileceğinden, BPA'yı uterusu ölçen boylamsal çalışmalar olabilir [71].

3.4. BPA'NIN METABOLİK HASTALIK ÜZERİNE ETKİLERİ

3.4.1. Tip 2 Diyabet

Tip-2 diyabet, birçok insan çalışmasında BPA ile ilişkilendirilmiştir. İnsanlarda BPA ve diyabet arasındaki bağlantıyı inceleyen ilk çalışmada, Lang ve ark. [72], Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi'ne (NHANES) (2003–2004 yılları) cevap veren Amerikalı bireylerin kesitsel popülasyonundan elde edilen verileri inceledi. 18-74 yaş arası yetişkinlere, diyabet gibi belirli hastalıklara tıbbi olarak teşhis edilip edilmediği soruldu. Kan şekerini içeren kan analizleri de yapıldı. Yazarlar, daha yüksek toplam idrar BPA'sının, Tip-2 diyabet tanısının artmasıyla önemli ölçüde ilişkili olduğunu bildirmiştir [72].

3.4.2. Kardiyovasküler Hastalık

Hipertansiyon ve kolesterol seviyeleri kardiyovasküler bozukluklar ve hipertansiyon, yetişkin BPA maruziyeti ile ilişkilendirilen diğer yetişkin başlangıçlı hastalıklardır [72-75].

3.4.3. Karaciğer Hastalıkları

Toplam üriner BPA konsantrasyonu daha yüksek olan erişkinlerde karaciğer fonksiyonunun değiştiğini bulmuşlardır. [72,73], NHANES 2003–2004 verilerini incelemiş, daha yüksek idrar BPA'sının karaciğer enzimleri alkalik fosfataz, gama-glutamilttransferaz ve laktat dehidrojenazdaki yükselmelerle önemli ölçüde ilişkili olduğunu bulmuştur. NHANES 2005–2006 çalışması ise bu üç enzim ve üriner BPA ile daha zayıf ilişkiler buldu, çünkü toplam idrar BPA ile karaciğer enzimleri arasında

anlamli iliflkiler gstermedi [73]. Ancak, bu çalışmadan elde edilen veriler bir araya getirildiğinde, yine de önemli yükselmeler vardı. Yüksek idrar BPA ile birlikte alkalın fosfataz ve laktadehidrojenaz düzeylerinde önemli ölçüde yükselmeler belirlenmiştir [73].

3.4.4. Obezite

Vücut kitle indeksi (BMI) ve obezite, insan sağlığı ve BPA ile ilgili en çok çalışılan konulardan ikisidir. Bizim ele aldığımız çalışmada [76] PKOS'lu olmayan kadınlarda artan BPA ile VKİ artışının ilişkili olduğunu bulunmuştur. Obez kontrollerin obez olmayan kontrollere göre daha yüksek serum BPA konsantrasyonlarına sahip olduğu belirtilmiştir [76]. Ancak daha önceki çalışmalarda BMI ve serum BPA arasında bir ilişki belirlenememiştir [77].

3.4.5. Tiroid Fonksiyonu Üzerine Etkileri

Tiroid hormon konsantrasyonları ile ölçülen tiroid fonksiyonu, insanlarda BPA tarafından bozulabilir. Tiroid uyarıcı hormon (TSH), beyin sinyaline yanıt olarak hipofiz bezinden salınır ve tiroksin (T4) ve triiodotironin (T3) üretmek için tiroid bezine etki eder. T3 ayrıca periferik organlarda T4'ün deiyodinasyonundan üretilir. Tiroid hormonlarının üretimi, beyne yapılan negatif geri besleme ile düzenlenir [78].

3.4.6. Bağışıklık Fonksiyonu Üzerine Etkileri

Yetişkinler ve çocuklar (6 yaş ve üzeri) üzerinde yapılan güçlü bir kesitsel çalışmada [79], bağışıklık fonksiyonunun genel ölçümlerinin de BPA maruziyeti ile olumlu bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Clayton ve diğerleri NHANES 2003–2006 verilerini incelemiş ve üriner BPA'nın antikor titreleri tocytomegalovirus (CMV) ile önemli ölçüde korele olduğunu bulmuşlardır. Artan CMV antikor titreleri, bağışıklık sisteminin baskılandığını gösterir ve insanlarda bağışıklık fonksiyon bozukluğunun erken bir belirteci olabilir. Yetişkinlerde (18 ve üstü), daha yüksek BPA, artan CMV antikor titresi ile ilişkiliyken, çocuklarda ve ergenlerde (18 yaş altı) daha yüksek BPA,

azalmış CMV antikor titresi ile ilişkilidir. Yazarlar, bu farklılığın BPA'ya maruz kalma süresinden kaynaklanabileceğini ve BPA'ya maruz kalmanın zamanla bağışıklık fonksiyonunu olumsuz etkileyebileceğini öne sürmüştür [79].

3.4.7. Oksidatif Stres ve İnflamasyon

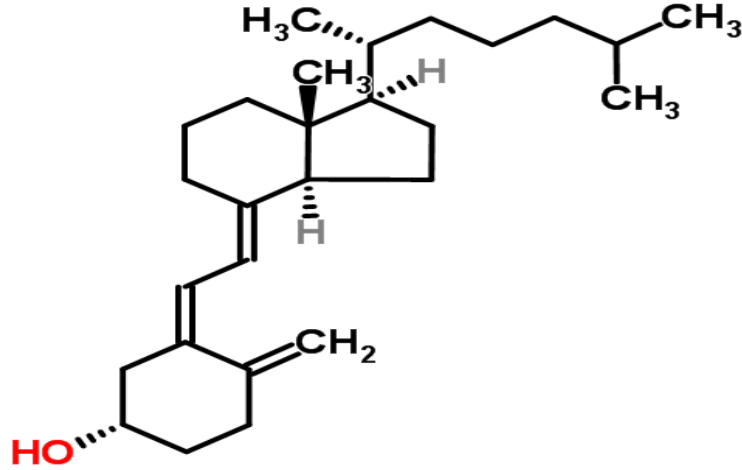
BPA maruziyeti ile ilişkili olarak PKOS (Poli Kistik Ovarian Sendrom)'u olan ve olmayan kadınlarda kronik enflamasyonun son noktalarını izlendiği bir çalışmada[80], inflamasyonun bir göstergesi olan artmış dalak boyutuna sahip deneklerde toplam serum BPA'sı daha yüksek bulunmuştur. Daha yüksek BPA konsantrasyonlarına sahip PKOS kadınlarında ayrıca artan hepatik steatoz, daha yüksek C-reaktif protein (CRP) ve interlökin (IL)-6 (trend) ve genişlemiş dalak gibi kronik inflamasyon belirteçlerinde artış saptanmıştır. Araştırmacılar, yukarıda bahsedildiği gibi semptomlar gösteren PKOS'lu kadınlarda, daha yüksek BPA maruziyeti ve daha ciddi olumsuz sağlık sonuçları (yani insülin direnci ve kronik inflamasyon belirtileri) olan "farklı bir PKOS kadın alt grubu" tanımlamışlardır [80].

Hong ve arkadaşları [81] büyük bir Koreli yetişkin popülasyonunu inceledikleri çalışmada total üriner BPA ile reaktif oksijen türleri malondialdehit (MDA) ve 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) arasında pozitif bir ilişki ($p < 0.01$) olduğu saptamışlardır.

BÖLÜM 4

D VİTAMİNİ

Epidermiste fotoindüklenen D vitamininin steroid yapıda bir hormon olduğu bilinmektedir ve bu vitamin kalsiyum-fosfor dengesinin düzenlenmesinde ve kemiklerdeki minerallerin çökmesinde aktif rol oynar [82]. D vitamini terimi iki bileşen içerir: Kimyasal yapı olarak ondan farklı olan Vitamin D₂ ve Vitamin D₃'tür. D₂ vitamini, ergokalsiferol, maya tarafından üretilir ve genellikle gıdalara eklenir. D₃ Vitamini (kolekalsiferol) güneş ışığının etkisiyle deride üretilir ve besinler içeren besinler yoluyla vücuda alınır. Bu vitaminin her iki şekli de beslenme açısından zenginleştirilmiş gıdalarda ve takviyelerde bulunur. D₃ vitamininin tercih edilen form olması gerektiğine dair kanıtlar vardır çünkü D₂ vitamininden daha stabil ve etkili olabilir [83].



Şekil 4.1. Kolekalsiferol (D₃ Vitamini) kimyasal yapısı [84].

Vitamin D'nin metabolizmadaki önemli rolleri şunlardır;

- Bağımsızlık fonksiyonunun güçlendirilmesini destekler,
- anti-inflamatuar özellikler gösterir,
- Kalsiyumun ince bağırsaktan emilimini uyarır,
- Kemik oluşumu, kemiğin mineral dengesi, büyümesi ve hasarlı kısımların tamiri için gerekli olan yeterli kalsiyum ve fosfat düzeylerinin kanda bulunmasını sağlar [85].

Normal D vitamini seviyesinin düşük olması karmaşık patolojilere zemin hazırlayabilir. D vitamini eksikliği; artmış kemik oluşum ve yıkım hızı, osteoporoz ve osteomalazi gibi fizyolojik, klinik ve patolojik sonuçlara ve kalça veya diğer kemiklerin kırılma olasılığının artmasına neden olur [86, 87]. Şiddetli D vitamini eksikliği yetişkin iskeletinin demineralizasyonuna yol açarak raşitizm ve osteomalaziye yol açar [88]. Dent ve Harris tarafından yapılan bir çalışmada, insanlarda kalıtsal raşitizmlerin doğurganlığın azalmasına neden olabileceği gösterilmiştir [89]. D vitamini fazlalığının klinik belirtileri şunlardır: İştahsızlık, kilo kaybı, yorgunluk, oryantasyon bozukluğu denilen kafa karışıklığı, kusma ve kabızlık gibi psikolojik rahatsızlıklar [90]. Serum D vitamini düzeyleri (25-OHD3) <25 nmol/L D vitamini eksikliği, 50 nmol/L D vitamini yeterli değeri ve ≥75 nmol/L D vitamini yüksek değeri olarak tanımlanır [91]. D vitamini biyolojik işlevlerinin bir kısmını D vitamini reseptörleri aracılığıyla yerine getirir [92]. D vitamini metabolizması için anahtar enzim olan D vitamini reseptörü (VDR), insan dokularında ve hücrelerinde yaygın olarak bulunur [93]. Kalsiyum düzenleyici dokularda, bağırsaklarda, iskelet sisteminde, karaciğerde, paratiroid bezlerinde ve ovaryumlar, uterus, plasenta, testisler ve hipofiz bezi gibi üreme organlarında VDR bildirilmiştir [92]. Bu bağlamda Blomberg Jensen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada erkek üreme sisteminin testis dokularının Leydig hücrelerinde D vitamini reseptörlerini ve D vitamini metabolizma enzimlerini önemli ölçüde gözlemlemişlerdir. Bu bilgi, D vitamininin erkek üreme sisteminde hormon üretimini artırıp artıramayacağı sorusunu gündeme getirmektedir [94]. D vitamini, kemik, kalsiyum ve fosfat homeostazı üzerindeki klasik etkisinin yanı sıra erkek üreme sistemini de etkileyen çok yönlü bir sinyal molekülüdür [93,94]. D vitamini metabolik enzimleri ve D vitamini reseptörleri erkek üreme sistemini döşeyen

epitel hücreleri, sperm, Leydig hücreleri, germ hücreleri ve Sertoli hücrelerinde bulunur [94-96].

Testosteron, Leydig hücreleri tarafından üretilir ve birincil ve ikincil erkek üreme özelliklerinden sorumludur. Testisteki testosteron konsantrasyonu, kan serumundakinden 100 kat daha yüksektir ve testosteron sentezi, plasentadaki insan koryonik gonadotropini tarafından fetal yaşamın erken dönemlerinde, hipofiz bezinden luteinize edici hormon (LH) salınana kadar kontrol edilir [97]. LH, Leydig hücrelerinde hücre içi kalsiyum iyonlarını (Ca^{+2}) ve siklik AMP üretimini artırarak steroidogenezi uyarır [97,98] ve $1\alpha,25$ -dihidroksivitamin D_3 etkisini kalsiyuma bağımlı LH yanıtını değiştirerek gösterebilir. $1\alpha,25$ -hidroksivitamin D_3 , insan sperminde hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda VDR aracılı bir artışa yol açar [99].

4.1. D VİTAMİNİ VE KARACİĞER İLİŞKİSİ

D vitamini ve karaciğer homeostazı: D vitamini, karaciğer düzeyinde de deneysel olarak kanıtlanmış olan sistemik ve dokuya özgü anti-inflamatuar özellikler gösterir [100]. MAFLD sıçan modellerinde, aktif D vitamini ile tedavi, p53-p21 sinyal yolunu ve ilişkili hücre yaşlanmasını inhibe ederek karaciğer iltihabını ve oksidatif stresi azaltmıştır [100]. D vitamini ayrıca, toll benzeri reseptörleri azaltan veya sirtuini baskılayan antioksidan molekül nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2'nin (NFE2L2) nükleer translokasyonunu teşvik ederek yüksek yağlı diyetle indüklenen yağlı karaciğere karşı koruma sağlamıştır [101,102,103]. Yakın tarihli bir araştırmada D vitamini, hepatosit nükleer faktör 4α 'nın (HNF4 α) VDR aracılı aktivasyonu yoluyla kemirgen modellerinde hepatik insülin direncini iyileştirmiş ve karaciğer yağlanmasını iyileştirmiştir [104]. Öte yandan, D vitamini eksikliğinin karaciğer inflamasyonunu şiddetlendirdiği tespit edilmiştir [102]. İnsanlarda hepatik VDR ekspresyonu, karaciğer histolojisinde steatoz şiddeti ve lobüler inflamasyon ile ters korelasyon gösterilmiştir [105]. Ek olarak, deneysel çalışmalarda D vitamini ligandları tarafından hepatik makrofajlarda VDR'lerin aktivasyonu karaciğer inflamasyonunu, steatozu ve insülin direncini iyileştirmiştir [106].

BÖLÜM 5

APOPİTOZ

Canlı hücre ölümü iki ayrı mekanizma ile gerçekleşir. Bu mekanizmalar apopitoz ve nekrozdur. Nekroz ya da travmatik hücre ölümü, aşırı sıcaklık değişimleri, hipoksi, toksinler gibi ekstraselüler kaynaklı fiziksel ya da kimyasal etkiler sonucu gelişen hücre ölümüdür [107]. Apopitoz ise programlanmış hücre ölümü veya hücre intiharı olarak tanımlanmıştır [108,109]. Apopitoz, organizmanın güvenli bir şekilde yok edilmesini sağlayan yaşlı, işlevsiz, aşırı üretilmiş, düzensiz veya genetik olarak hasar görmüş hücrelerin genetik olarak programlanmış ölümüdür [107]. Apopitoz kelimesi ilk olarak 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından hücre ölümünün görüntüsü morfolojik farklılık gösterdiği için kullanılmıştır [110].

Yunanca'da "apo" ayrı, "ptosis" ise düşmek anlamına gelir. Apopitoz için ilk biyokimyasal kanıt, 1983 yılında Duke ve arkadaşlarının jel elektroforezi ile apopitozda aktive olan eksonükleazların DNA kırılmalarına neden olduğunu göstermesiyle elde edilmiştir [107]. Apopitozun nedenleri arasında antitümör ilaçlar, yüksek düzeyde glukokortikoidler, radyasyon, büyüme hormonu eksikliği, insan immün yetmezlik virüsü (HIV), yaşlanan hücreler, kanser hücreleri, sitotoksik T lenfositler, ölüm reseptörleri ailesine ait bir zar proteini olan Fas ve tümör nekroz faktörü reseptörü aktive edici reseptör 1 (TNFR-1) ve hafif oksidatif stres [108,109]. Apopitoz, morfolojik halesi ile mikroskop altında kolayca tanımlanabilir [111]. Hücre küçülür ve zarı bozulmaz. Ancak zarda kabarcık oluşumu gibi morfolojik değişiklikler gözlenir. Kromatin, nükleer zarın etrafında yoğunlaşır ve toplanır [112]. Organellerde parçalanma yoktur. Apopitotik sürecin sonunda, hücre organelleri morfolojik olarak küçük zarla kapsüllenmiş apoptotik cisimlere dönüşür [109]. Apopitoz, enerjiye bağımlı fizyolojik bir olaydır [111]. DNA bozunması (deoksiribonükleik asit) glikoliz öncesi dönemde meydana gelir ve internükleozom alanlarında 180 kilobaz çiftinin (kb) katları halinde monomerlere ve oligonükleozomlara bölünür. Apopitozda bireysel

hücre ölümü gerçekleşir ve inflamasyon görülmez [113]. Apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik olarak ortaya çıkabilir [109].

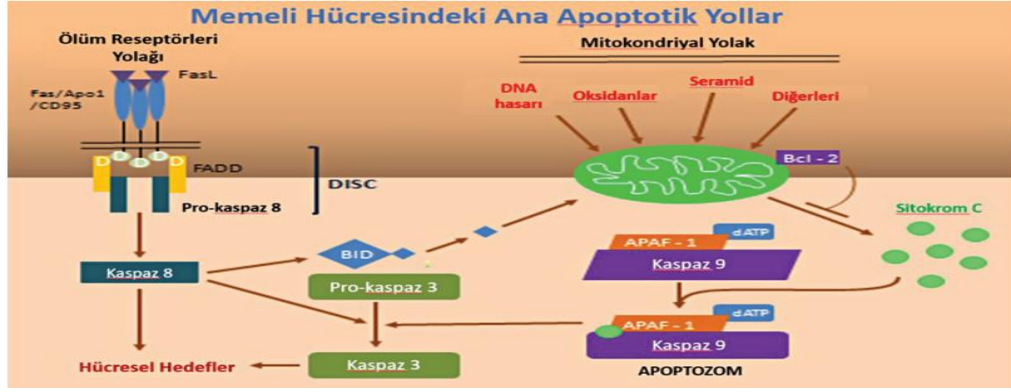
Fizyolojik apoptoz, insan vücudunun gelişimi ve embriyogenezinde önemli bir rol oynar. Embriyogenezde meydana gelen apoptoza bir örnek, embriyonun el ve ayak parmakları arasındaki dokuların apoptozudur [107]. Adet döngüsünde endometriyal dökülme de apoptoz ile gerçekleşir. Yara iyileşmesi sırasında enflamatuar hücrelerin (özellikle lökositlerin) ölümü için de apoptoz gereklidir [112]. Radyasyon ve sitostatik ilaçların yutulmasından sonra DNA hasarı, katlanmamış proteinlerin birikmesi ve apoptozun mitokondriyal yolunu aktive eden viral enfeksiyonlar sırasında da görülebilir [109].

5.1. PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜM YOLLARI

Fizyolojik ve patolojik apoptozda beş farklı yol kullanılır. Metabolik stres ve hipoksi tarafından indüklenen intrinsik (intrinsik) yol ve ölüm ligandları olarak bilinen Fas-L veya tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi ekzojen uyarıların indüklediği ekstrinsik yol en iyi bilinenidir (Şekil 4.1.). Bunların dışındaki yollar; Doğrudan kaspaz aktivasyonuna sahip Granzyme-B yolu, DNA parçalanmasını başlatan Granzyme-A yolu ve DNA hasarı üzerine tümör proteini 53 (p53) tarafından aktive edilen kaspaz 2'ye bağlı yol'dur[114].

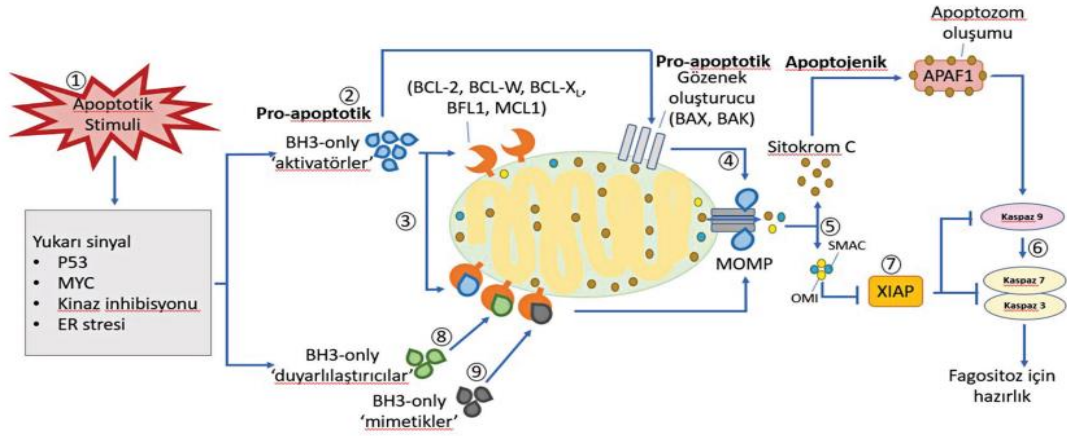
5.1.1. İntrensik Apoptoz

Endojen apoptoz, mitokondriyal hasar, endoplazmik retikulum stresi, iyonlaştırıcı radyasyondan kaynaklanan genotoksik hasar, onkogenlerin neden olduğu hücre ölümü, mutajenik aşırı uyarılma veya büyüme faktörü gibi spesifik uyarıların yokluğunda aktive olur [115].



Şekil 5.1. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar [109].

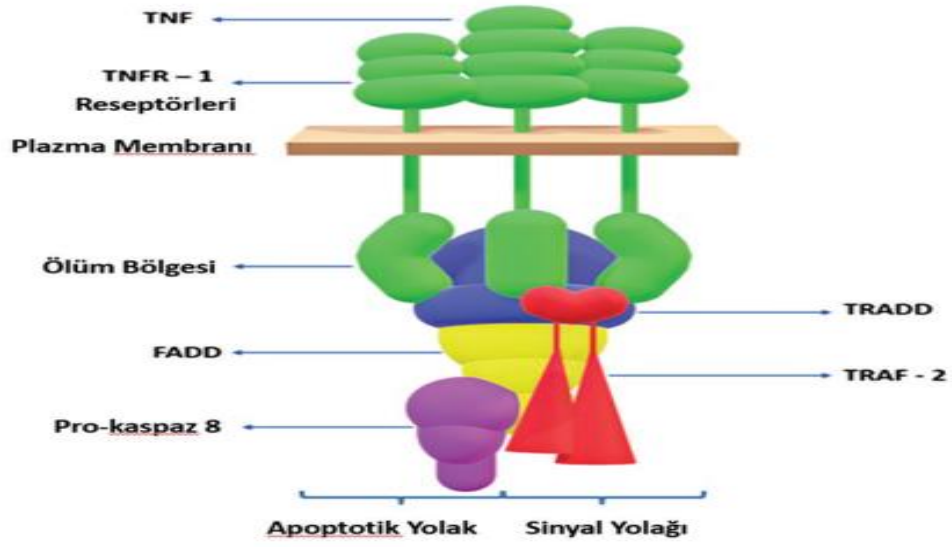
(BID: BH3 etkileşim alan ölüm agonisti; APAF1: Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 DISC: Ölüme neden olan sinyal kompleksi



Şekil 5.2. İntrinsik apoptotik yolak. BCL-2 ailesi proteinleri etki mekanizması. [109].

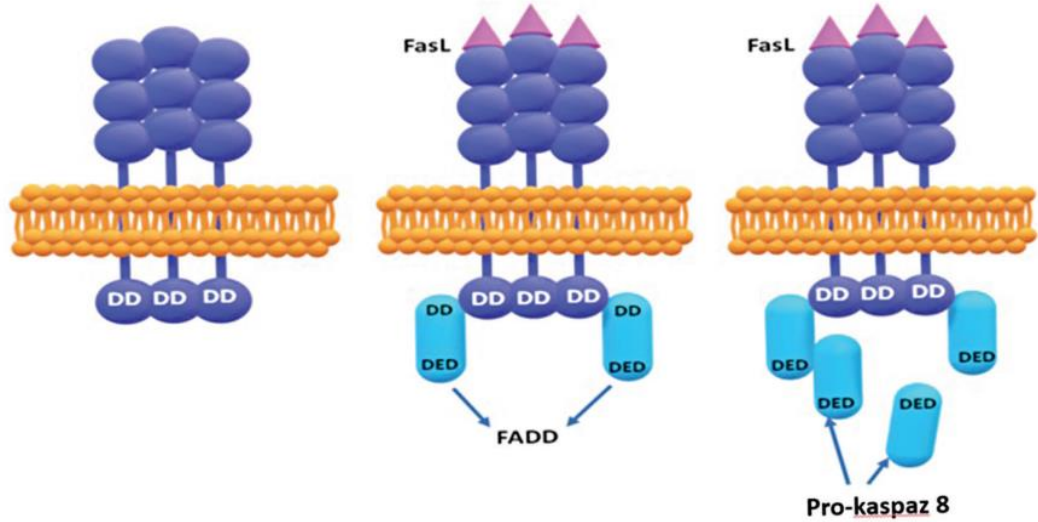
5.1.2. Ekstrinsik Apoptoz

Ekstrinsik apoptotik yol, doğal öldürücü (NK) hücrelerin, aktive edilmiş T lenfositlerin ve makrofajların target hücre zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla başlatılır. Tümör nekroz faktörü (TNF) ve yağ asidi sentez reseptörü (FasR) düzenlenmiş proteinlerdir. Procaspase-8, kompleman ölüm aktivatörleri, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve yağ asidi sentez bağlayıcısının (FasL) bağlanmasıyla kaspaz-8'e dönüştürülür. Bu şekilde kaspaz kaskad aktivasyonu başlatılır [116].



Şekil 5.3. Ekstrinsik apopitoz yolağında TNF- α ve TNFR-1 reseptör.

FADD: Ölüm etki alanına sahip Fas ile ilişkili protein TRADD: TNF reseptörü ile ilişkili öldürücü bölge TRAF-2: tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 2 [109].



Şekil 5.4. Ekstrinsik apopitoz yolağında Fas/FasL. [109].

DD: Ölüm bölgesi; DED: Ölüm efektör alanı.

Ölüm ligandları arasında TNF ile ilişkili apopitozis indükleyici ligand (TRAIL), APO-3/APO-2 ligandı, FasL ve TNF- α bulunur. FasL/FasR ve TNF-a/TNFR1, bu sinyal yolundaki en popüler reseptör-ligand çiftleridir. TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve FAS ile ilişkili ölüm alanı (FADD), adaptör proteinleri olarak ölüm reseptörlerine alınır. Procaspase 8 ve 10, ölüme neden olan sinyal kompleksini (DISC) oluşturmak için adaptör proteinlerine bağlanır. Bu karmaşık yapı, kaspaz 8 ve kaspaz 10'u aktive eder. Yönetici kaspazlar, 3, 6 ve 7 kaspazları, aktif kaspazlar 8-10 tarafından aktive edilir. Kaspaz 3,6 ve 7'nin aktivasyonu ile hücre ölümüne yol açan hücre iskeleti ve proteinlerin yıkımı başlar [117]. Kaspaz-10'un aksine kaspaz-8, BH3 ölümle etkileşime giren alan (BID) agonistini bölerek mitokondriden sitokrom C'nin salınmasına ve içsel yolu aktive etmesine neden olur [116].

5.1.3. Kaspazlar

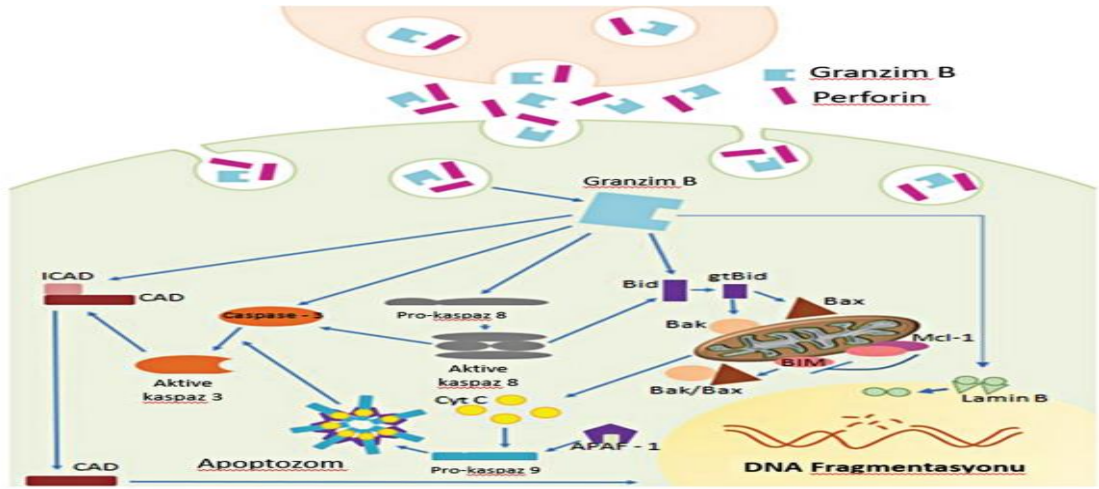
Kaspazlar (CASPASE: Sistein Aspartat Spesifik ProteASE), apopitozda önemli rol oynayan sistein protein grubu enzimlerdir. Kaspazlar iki gruba ayrılır. grup I kaspazlar; İlk kaspazlar (kaspazları başlatan) (kaspazlar 2, 8, 9 ve 10) bir sinyale yanıt olarak ilk olarak aktive edilirken, ikinci kaspaz seti; Apopitozun yıkım aşamasını yürüten yönetici kaspazlar (cellat kaspazlar) (kaspazlar 3, 6 ve 7) [118].

İlk Kaspaz, pro-N-terminal alanlarını içerir ve kendi kendini etkinleştirir. Yürütülen kaspazlar, aktif başlatıcı kaspazlar 8, 9, 10 tarafından aktive edilir. Kaspaz-2 aynı anda başlatan ve yürüten bir kaspazdır. Ayrı ayrı, kaspaz-2, kaspaz-13 portu ile substrat özelliklerini paylaştığı için bir kaspaz portu olarak sınıflandırılabilir [119].

Yürütülen kaspazlar (kaspazlar 3, 6 ve 7) aktive edildiğinde; DNA parçalanması, nükleoproteinlerin yıkımı, endonükleazların aktivasyonu, fagositik hücrelerin ligand ekspresyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu meydana gelir [108]. Uygulanan kaspazların aktivasyonu doğrudan performans/granzim yolu ile başlatılabilir [119]. Uygulanan kaspazlar arasında kaspaz-6, kaspaz-3 ve kaspaz-7'den daha az önemli bir rol oynar [120, 121].

5.1.4. Granzim

Granzyme, yabancı hücrelerin lenfositler (NK hücreleri), yani bir hücrel aracı tarafından öldürülmesinde rol oynayan bir serin esteraz enzimidir. İnsan vücudunda 5 granzim vardır: A, B, H, K ve M. En güçlü proapoptotik protein Granzyme B'dir. Granzim, hücre zarında perforinin oluşturduğu gözeneklerden girer. BID daha sonra granzim tarafından aktif bir zar hedefli ölüm ligandına (tBID) dönüştürülür. tBID, BAK/BAX oligomerizasyonunu (BCL-2 anti-letal/BCL-2 X-bağlı protein) ve sitokrom C'nin mitokondriden sitozole geçişini kolaylaştırarak apoptozu başlatır [122]. Kaspaz-3 ve kaspaz-7, Granzyme B tarafından doğrudan aktive edilir ve bu da cellat yolunun aktivasyonuna yol açarak apoptozu başlatır (123). Granzyme-B mitokondriye girerken, Nikotinamid Adenin Dinükleotidi (NADH) ayrıştır ve mitokondriyal solunum zinciri [Elektron Taşıma Zinciri (ETZ)] bozulur. Granzyme-B'nin reaktif oksijen radikalleri üretmek apoptozda etkili olduğu gösterilmiştir [124].



Şekil 5.5. Apoptozun özeti [109].

5.2. PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜNÜ BELİRLEMEK İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER

Apoptozu tespit etmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972'de apoptoz terimi ilk kez kullanıldığında, karar hücrenin morfolojik görünümüne göre verildi. Ancak günümüzde apoptoz, moleküler düzeyde apoptozla özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların tanımlanmasıyla da tespit edilebilmektedir.

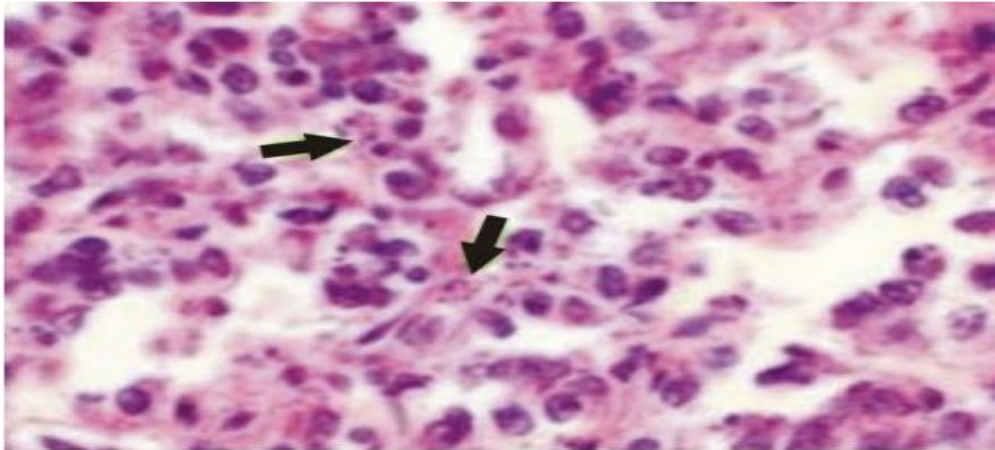
Apoptoz, ilk olarak 1980'lerin sonunda, DNA kırılmalarını tespit etme yöntemleriyle morfolojik verilere dayanarak tanımlandı. Apoptoz, apoptoz, 1990'ların ortalarında apoptotik hücrelerde kaspazların aktivasyonunun saptanması ve kaspaz aktivasyon süreçlerini belirlemeye yönelik yöntemlerle keşfedilmiştir. Fosfatidilserin iletimini belirlemeye yönelik yöntemlerle 1990'lı yılların sonunda tespit edilirken; Apoptotik epitel hücrelerinde kaspaz aktivitesi ile parçalanmış bir protein olan kaspaz-18, 2000'li yılların başında, parçalandıktan sonra doğal halini saptayan antikörler kullanılarak daha spesifik bir şekilde saptanmaya başlanmıştır [125,126, 127].

5.2.1. Apoptozu Belirlemek İçin Kullanılan Morfolojik Yöntemler

I. Işık mikroskobu kullanımı ;

- Hematoksilen-eozin boyama

Apoptozda, hücre çekirdeğinde bulunan kromatin, çekirdeğin çevresinde yoğunlaşır ve toplanır. Hematoksilin bu kromatini boyadığı için, HxE ile boyanan ve incelenen örneklerle yapılan hücre kültürü çalışmalarında, kromatin yoğunlaşması ve nükleer zarın çevresinde agregasyon şeklindeki değişiklikler, hücre büzülmesi veya sitoplazmanın büzülmesi, çekirdeğin büzülmesi veya parçalanması gözlemlendi. ışık mikroskobu altında [128].



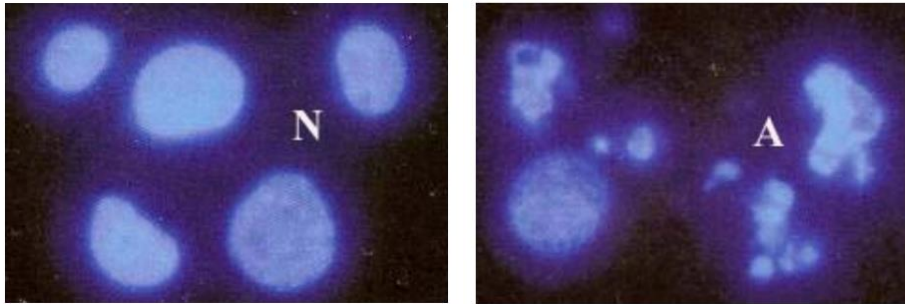
Şekil 5.6. Apoptotik hücreler (oklar) (HxE boyama) [128].

- Giemsa Boyama

Giemsa boyamasında apoptotik hücreler, çekirdeklerin morfolojisine göre tanımlanır. Hematoksilen boyama ile sitoplazmik sınırlar daha iyi ayırt edilebilse de pek bir avantajı yoktur [128,129].

II. Floresan mikroskobu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı;

Floresan mikroskopi, Hoechst boyası, 4,6-diamidin-2'-fenilindol (DAPI), akridin oranji, etidyum bromür, propidyum iyodür ve floresein izotiyosiyanat (FITC) gibi floresan malzemeleri kullanan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar çekirdekteki DNA'ya bağlanarak onu görünür kılar. Hücre kültürü çalışmalarında canlı hücrelerin canlı hücrelerden ayrılmasını sağlar. Tüm canlı veya ölü hücreleri boyayabilen bir boya (Hoechst boyası gibi) ve yalnızca ölü hücreleri birlikte boyayabilen başka bir boya (Propidium iodide gibi) canlı ve ölü hücreleri birbirinden ayırmak için kullanılır. Bu yöntem sayesinde hücrelerin ölü ya da diri olduğu anlaşılırken, ölü hücrelerin apoptoz ya da nekroz sonucu öldüğü ayrımı çekirdeğin morfolojisine bakılarak yapılır. Nükleer kırılma veya kromatin yoğunlaşması olan hücrelerin apoptotik hücreler olduğu ileri sürülmektedir [128, 129].



Şekil 5.7. Hoechst boyama (N, Normal hücreler, A, Apoptotik hücreler) [128].

III. Elektron mikroskobu

Morfolojik değişikliklerin en gerçekçi şekilde takip edildiği bir yöntemdir. Kromatin kırılması ve yoğunlaşması, sitoplazmada büzülme, hücre zarı bütünlüğünün veya nükleer zarın bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi hücre içi detayların yanı sıra mitokondrinin durumu da incelenebilir [129].

IV. Faz kontrast mikroskobu

Bu mikroskop sadece hücre kültürü ortamında bir hücre veya hücre grubunu incelemek için kullanılmaktadır [129]. Faz mikroskobu ile substrattan ayrılan ve ortamda yüzmeye başlayan ölü hücreler gözlemlenebilir, ancak faz mikrobölünmesine uğrayan hücreler de gözlemlenebilir, bu da apoptotik hücrelerin erken evre görüntüleriyle karıştırılabilir ve farklılaşma çok zordur. Apoptotik hücreler üzerinde gelişen blebler, faz kaydırmalı mikroskopi kullanılarak gözlemlenebilir [128].

5.2.2. Apoptoz Tespitinde Kullanılan İmmünohistokimyasal Yöntemler

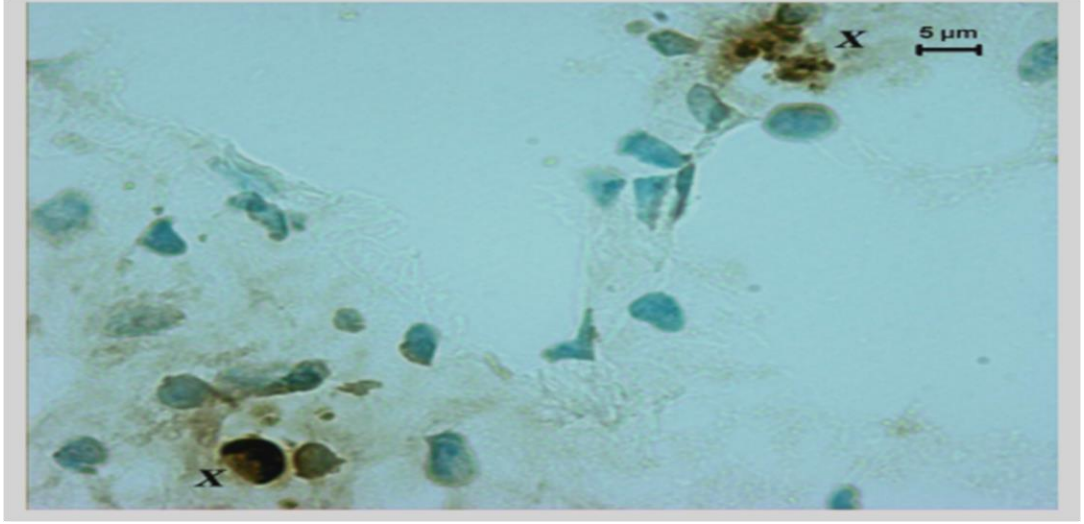
I. Anneksin V Yöntemi

Normal hücrelerde bulunan fosfatidilserin (PS), hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunan bir zar lipididir. Bir hücre apoptoz geçirdiğinde, içindeki PS molekülleri hücre zarının dışına doğru hareket eder. Bu, apoptozun erken döneminde gerçekleşir. Annexin V, fosfatidilserin'e bağlanabilen bir proteindir. Hücre zarı dışına taşınan PS'ye bağlanabilen Annexin V, apoptotik hücreyi görünür kılmak için FITC gibi bir floresan madde ile işaretlenebilir [130,131,132].

II. TUNEL Yöntemi

Bu yöntem, DNA kırıklarının yerinde tespit edilmesini sağlar [133,134]. TUNEL (nidoksiüridin trifosfat (dUTP) uç etiketleme yöntemi) ile kültür solüsyonunda, plakalarda veya plakalarda üreyen hücrelerde, frozen kesitlerde ve parafin bloklarda apoptoz varlığı saptanabilir [129]. DNA polimeraz veya bir Klenow fragmanı

kullanılarak, apoptotik fragmentasyonun bir sonucu olarak DNA uçları ayırt edilebilir. Ancak deoksinükleotidil transferaz (TdT) ile etiketlemenin daha duyarlı bir yöntem olduğu saptanmıştır [128].



Şekil 5.8. Karaciğer dokusunda apoptotik hücreler (X) [128].

III. M30 Yöntemi

Sitokeratin 18 (CK18), glandüler epitel hücrelerinde bulunan bir tip 1 mezenkimal filamentöz proteindir. Ağırlıklı olarak karaciğer, meme, akciğer, prostat ve kolon kanserlerinde eksprese edilirken, nöronlarda ve lenfositlerde bulunmaz [135]. M30 yönteminde apoptotik hücreler, kaspazların etkisiyle parçalanmış sitokeratin 18'de oluşan yeni bir antijenik bölgenin immünohistokimyasal olarak boyanması prensibine göre tanımlanır. Sadece sitokeratin 18 eksprese eden dokularda kullanılabilir. Bu dokular epitel kökenli dokulardır [136].

IV. Kaspaz-3 Yöntemi

Bu yöntem ile apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama yöntemi ile belirlenebilmektedir. Bu nedenle incelenen dokuda apoptozu indükleyen ajanın kaspaz-3'ü parçalayıp parçalamadığı veya doku kaspaz-3'ü ifade

edip etmediği bilinmelidir. Bu bilinirse programlanmış hücreler bu şekilde saptanabilir [137, 128].

5.2.3. Apoptozu belirlemek için kullanılan biyokimyasal yöntemler

I. Agaroz Jel Elektroforezi

Apoptozda, DNA 180 baz çifti ve bunların katlarına karşılık gelen noktalarda kırıldığı için bir merdiven modeli oluşur [129].

Agaroz, orta ve büyük boyutlu DNA moleküllerini elektroforez ile ayırmak için kullanılan en yaygın destek ortamıdır. Ayrıştırılacak partiküllerin boyutuna bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda (%0,3-2 arasında) agaroz kullanılır. Nükleik asitlerin en iyi ayrılması, büyük DNA fragmanları için düşük konsantrasyonlarda ve küçük DNA fragmanları için yüksek konsantrasyonlarda agaroz kullanılarak elde edilir. Bir flüoresan boya iki DNA dizisi arasına girdiğinde ve 300 veya 360 nm dalga boyundaki ışığı emdiğinde, DNA jelde görünür hale gelir, bu bir flüoresan etkisini gösterir. Genellikle bir floresan boya olan etidyum bromür ile kullanılır ve DNA fragmanları UV ışığı altında görselleştirilir [138,139,128]. Agaroz jel elektroforez yöntemi güvenilir sonuçlar veren bir analiz yöntemidir [140].

5.2.4. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan İmmunolojik Yöntemler

I. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

ELISA testi, apoptozu belirlemek için kullanılan serodiagnostik yöntemlerden biridir. Spesifik, hızlı ve duyarlı bir testtir (128). ELISA kullanarak, kan plazmasında ve kültürlenmiş hücre popülasyonlarında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. ELISA yöntemi kullanılarak apoptozun bir belirteci olan M30 antijeninin düzeylerini ölçmek de mümkündür [137].

ELISA testinde, ELISA plakalarındaki sitoplazmik nükleozomları tespit etmek ve yakalamak için iki nükleer epitopa özgü bir çift monoklonal antikor kullanılır. ELISA

testi, agaroz jel elektroforezi kullanılarak apoptotik DNA merdiveninin belirlenmesinden daha hassastır ve çok sayıda örneğin test edilmesi açısından daha uygun bir analiz yöntemidir [141].

5.2.5. Apoptozu Belirlemek İçin Kullanılan Moleküler Biyoloji Yöntemleri

I. DNA Microarrays (DNA Mikrodizileri)

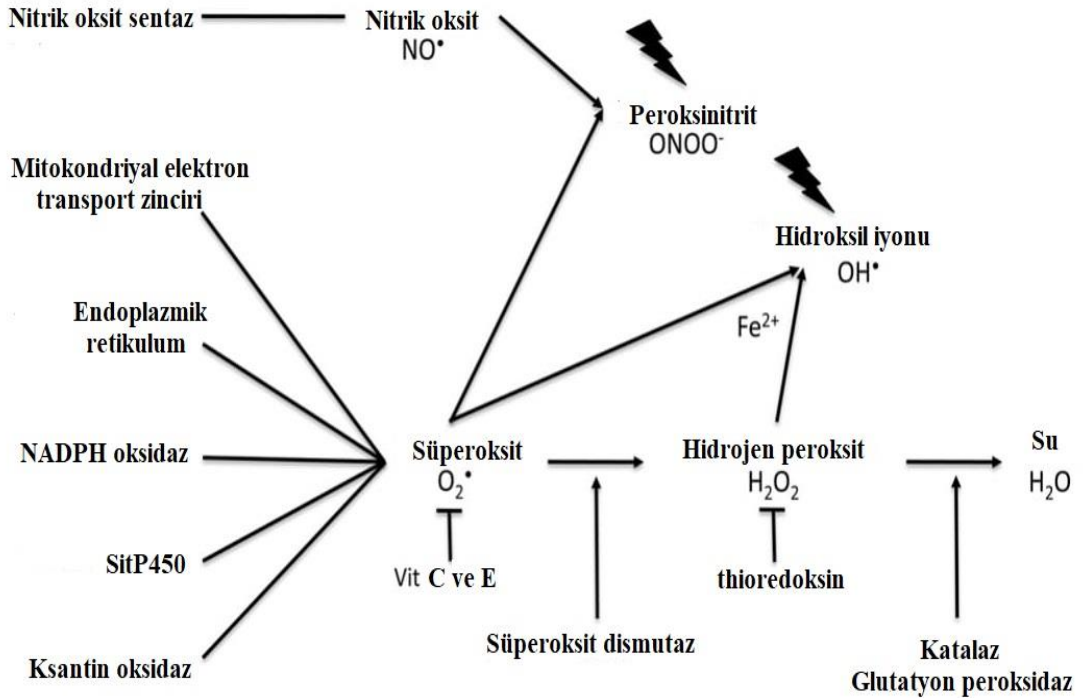
DNA mikroarray teknolojisi göreceli olarak yeni ancak oldukça pahalı bir yöntemdir. Bu teknik ile binlerce genin ifade düzeylerinin (mRNA'lar) aynı anda ve kısa sürede tespit edilmesi mümkündür. Bu sayede apoptoza özgü hücre yüzeyi ölüm reseptörlerinin ekspresyonu ile ilişkili kapsamlı bilgiler elde etmek mümkün olacaktır [129].

BÖLÜM 6

OKSİDATİF STRES VE ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

6.1. OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres, biyolojik sistem içinde yer alan oksidan ve antioksidan maddelerin arasında bulunan dengenin oksidan maddeler galip gelecek şekilde bozulması sonucu meydana gelen bir durumdur. Dengesizlik, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretiminin veya antioksidan sistemin işleyişindeki bir hatanın bir sonucu olarak ortaya çıkar [142]. Öte yandan serbest radikaller, bir ya da daha çok eşlenmemiş (serbest) elektron içeren moleküller veya atomlar olarak tanımlanır ve bahsi geçen elektronlar son derece reaktiftir. Birçok element serbest radikallerin oluşumuna neden olabileceği de metabolizmada en fazla hasara neden olan elementler oksijen ve nitrojen ihtiva eden elementlerdir [143].



Şekil 6.1. Başlıca ROS' lar ve detoksifikasyon yolları [143].

Oksijen molekülünün metabolizmadaki rolü kritiktir, çünkü hücresel işleyişin devam ettirilmesi için gereklidir. Oksijen, gen transkripsiyonu ve hücre içinde gerçekleşen diğer önemli fonksiyonlarda elzemken, serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri haline geldiğinde biyomoleküllere hasar verici bir potansiyeli bulunmaktadır. Oksijenin bu hasar verici etkisi, düşük değerlik metabolik durumunun sonucudur ki bu durum reaktif oksijen türlerinin oluşumundan sorumludur. ROS arasında en önemlisi, damar düz kas hücrelerinin gevşemesi ve çoğalması, lökosit adezyonu, anjiyogenez, trombosit agregasyonu, tromboz, damar tonusu ve kan dolaşımının düzenlenmesi işlevlerini yerine getiren nitrik oksittir [144, 145]. Oksidatif stres, AIDS, yaşlanma, artrit, astım, otoimmün hastalıklar, kanser, kardiyovasküler disfonksiyon, katarakt, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi çeşitli patolojik durumlara yol açan bir dizi hücresel işlevi bozar [146-147].

İlaça bağlı oksidatif stres, karaciğer, böbrek, kulak ve kardiyovasküler ve sinir sistemleri dahil olmak üzere çok sayıda doku ve organ sisteminde bir toksisite mekanizması olarak gösterilmiştir. Kanser terapileri, non-steroidal antiinflatuar ilaçlar (NSAID), antiretroviral ajanlar, antipsikotikler ve analjezikler dahil olmak üzere oksidatif stresin katkıda bulunabileceği olumsuz olaylarla ilişkili iyi karakterize edilmiş ilaçlar. Mekanik olarak farklı tedavilerin, önemli bir katkı maddesi olarak oksidatif stres ile çeşitli toksisitelere neden olma potansiyelini göstermeye hizmet eder. İlaça bağlı oksidatif stres mekanizmalarının karakterize edilme derecesi değişir. Bir ilacın metabolizması, doksorubisin için tartışıldığı gibi, doğrudan ROS oluşturmak için moleküler oksijeni indirgeyebilen reaktif bir ara ürün oluşturabilir. Klorpromazin, derideki fotoaktivasyonun, bu bileşikle ilişkili iyi bilinen bir yan etki olan deri fototoksitesine (güneş yanığı benzeri reaksiyon ve hiperpigmentasyon) yol açabileceği düşünüldüğünden ilginç bir örnektir [148].

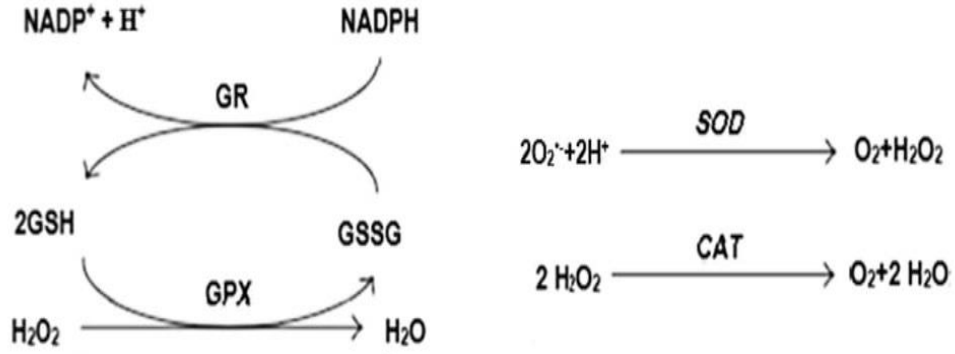
6.2. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Vücutta reaktif oksijen çeşitlerinin teşkil olmasına mani olmak, bu maddelerin vereceği hasarları önlemek ve detoksifikasyon sağlamak için çalışan savunma sistemleri “antioksidan savunma sistemleri” veya “antioksidanlar” adını alırlar. Antioksidanlar, aşırı reaktif oksijen türlerini detoksifiye eden ve vücuttaki mikro-

oksidan/antioksidan dengesinin korunmasına yardımcı olurlar. Antioksidan savunma sistemlerinin iki çeşidi bulunmaktadır: enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar [144].

6.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar, zehir atılımı işlemi sırasında moleküllerin son yörüngesine yerleşmiş elektronları stabilize etmek için elektronları aktararak farklı değerlere dayanma yeteneği veren bir mineral merkezine sahiptir. Aşırı ROS'u nötralize ederek hücre elemanlarının hasar görmesini önlerler. Endojen antioksidan enzimler, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazı (GPx) içerir. [149, 150].



Şekil 6.2. Enzimatik antioksidanlar ve gerçekleştirdiği reaksiyonlar [149].

Antioksidan reaksiyonlar için süperoksit anyonunun süperoksit dismutaz (SOD) tarafından H₂O₂'ye ayrılması temel adımdır. SOD, SOD 1, SOD 2 ve SOD 3 olarak bilinen üç tür yapıda bulunur. SOD 1, bakır ve çinko (Zn) içerir, sitozolde bulunur ve içerdiği mineraller mineral kofaktörler olarak bilinir. SOD 2, manganez (Mn) içeren mitokondriyal izoformdur. SOD 3 ise ekstraselüler formu kodlar, yapısı bakır ve çinko içeren SOD 1'e benzer çünkü her ikisinde de kofaktörler ortaktır. [149,150].

Glutatyon (GSH) enzim ailesinde, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR) bulunur. GPx, H₂O₂ türevlerini parçalamak için H⁺ donörü olarak GSH'ın indirgenmiş şekliyle çalışır. GSH'ın ortadan kalkması ya da ortamdaki miktarının azalması, DNA hasarı ve H₂O₂ miktarında artış ile sonuçlanır. Hidrojen peroksit'in su ve O₂'ye indirgenmesi sırasında GPx tarafından kullanılan

GSH oksitlenmiş glutatyona (GSSG) çevrilir. Glutasyon redüktazın ters reaksiyona katılmasıyla ve NADPH'den oksitlenmiş glutatyona bir donör proton transfer edilerek GSH tekrar elde edilmiş olur [149, 151, 152].

Glutasyon peroksidazın organizmada beş izoformu bulunmaktadır: GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 ve GPx5. GPx1, dokularda genel olarak görülen hücresel izoformdur, GPx2 ise mide-bağırsak izoformu olarak kodlanır; GPx3 kan plazması ve epididimal hücrelerde bulunur. GPx4, spesifik olarak organizmada yer alan biyolojik membranların yapısına katılan fosfolipid hidroperoksin detoksifikasyonundan sorumludur. Yine epididimal hücrelerde yer alan bir diğer izoform GPx5'tir. Glutasyon, sitozolde sistein, glutamat ve glisin tarafından oluşturulur. Hücreye ait glutasyon düzeyleri, de-novo oluşumu ile düzenlenir. GSH, hücrelerin bazı endojen ve yabancı biyolojik olarak tehlikeli bileşiklerle konjugasyonlardan korunmasında ve hücrelerin oksidanlara karşı azaltılmış bir durumda tutulmasında rol oynar [151-153].

Katalaz, H₂O₂den H₂O ve O₂ oluşturmak üzere peroksidaz aktivitesi yoluyla metanol, etanol, formik asit veya fenollerden proton alarak çalışan bir enzimdir [154, 155].

6.2.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar

C ve E vitamini, GSH, beta-karoten ve flavonoidler gibi antioksidanlar bu gruptadır [156, 157]. C vitamini, suda çözünme özelliği sayesinde gerek intraselüler gerekse ekstraselüler matrise difüze olmayı kolaylaştırır. Okside E vitamininin yenilenmesinde rol alır. Bir diğer önemli özelliği pro-oksidan aktiviteye sahip olmasıdır. Fe⁺³'yü Fe⁺²'ya dönüştürüp ardından H₂O₂ ile reaksiyona girerek OH• oluşturabilen belki de tek bileşiktir [158-159]. Vitamin E (α -tokoferol), zincirli radikal peroksidleri hızla uzaklaştırarak zincir yayılımına engel olur. E vitamini bu işlem sırasında tokoferol haline geri dönmek için tokoferil adı verilen serbest bir radikal haline gelir ve bu şekilde zarın iç yüzeyine doğru hareket eder. [160,161,162]. β -karoten, belirli dokuların hücre zarlarında yüksek konsantrasyonlarda biriken A vitamininin su öncüsüdür. Beta-karotenin antioksidan aktivitesi, lipid oksidasyonu sürecinde oluşan O₂•- ve serbest radikallerin uzaklaştırılmasıyla ilgilidir [163-164]. GSH normalde sitozolde mitokondride bulunarak hücrenin okside olmasının engellenmesinde önemli

bir rol oynar. Çekirdekdeki GSH ise sülfhidril proteinlerinin redoks durumunu korur [165]. Flavonoidlerin kimyasal yapısı, radikallerin uzaklaştırılması söz konusu olduğunda idealdir hatta antioksidan özelliği hem C hem de E vitaminlerinden kat kat daha fazladır. Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi, nelerin bileşimden oluştuğuna göre değişir ve beş faktör tarafından belirlenir: H⁺ ve elektron donörü olarak etkileşim, oluşan flavanol köklerinin ne kadar stabil olduğu, geçiş metallerini şelatlama yeteneği, çözünürlük ve membranlarla etkileşimleri ve son olarak diğer antioksidanlara kıyasla etkinliği. Flavonoidlerin oksidasyon potansiyeli düştükçe, serbest radikal süpürücü aktiviteleri o kadar yüksek olur [161].

BÖLÜM 7

GEREÇ VE YÖNTEM

7.1. GEREÇLER

7.1.1. Deney Hayvanları

Deneyde kullanılmak üzere minimum 150 gr. ağırlığındaki Wistar albino cinsi erkek ratlar Saki Yenilli Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Çalışmanın yapılabilmesi için Saki Yenilli Deney Hayvanları Üretim ve Uygulama Laboratuvarı Tic. Lmt. Şirketi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan etik kurul izni (No: 2021/03-04-13) esas tutulmuş ve yapılan işlemlerin tümü ilgili izin belgesinin alınabilmesi için hazırlanan etik kurul protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

7.1.2. Kimyasal Malzemeler

Tez çalışması sırasında kullanılan kimyasallar; disodyumhidrojen fosfat (Na_2HPO_4), tiyobarbutirik asit (TBA), fosforik asit, n-butanol, 5,5' dithiobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB), hidrojen peroksit (H_2O_2), disodium etilendiamin tetraasetik asit (Na_2EDTA), potasyum sodyum tartarat, bakır (II) sülfat, sodyum hidroksit, ksantin oksidaz, bakır (II) klorür, bovine serum albumin (BSA), krosin, ksantin, sodyum karbonat, Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS), TGF- β kiti kullanıldı.

7.1.3. Laboratuvar Cihazlar

Çalışmada kullanılan aletler; manyetik karıştırıcı (Termal N11150M), otomatik pipetler (Brand), hassas terazi (RADWAG AS 220.R2), vorteks (Velp Scientifica), soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1200R), mikrosantrifüj (Nüve NF 048),

spektrofotometre (Thermo Fisher Multiskan Go 1510), UV/VIS Spektrofotometre (PG Instruments), pH metre (Adwa 1000), homejenizatör (Hangzhou Bioprep-24), sallayıcı su banyosu (Nüve ST 30), mikropilaka yıkayıcı (Thermo Fisher Wellwash 888).

7.2. YÖNTEMLER

7.2.1. BPA'nın Hazırlanması ve Uygulanması

25mg/kg/ Bisfenol A 0.5 ml zeytinyağı içinde çözdürülerek günlük olarak hazırlandı. Ratlara BPA uygulaması intragastric olarak yapılmıştır.

7.2.2. Ratların Bakımı

Ratların kafes temizliği ilgili personel tarafından her gün yapılmış, içme suları da bu işlem yapılırken tazelenmiştir. Ratlar, deney süresince 21°C, %55-60 oranında nem ve 12 saat karanlık/aydınlık döngüsüne tabi tutulmuş ve standard yem ile ad libitum olarak beslenmişlerdir. Ratların tutulduğu kafesler özel olarak üzerlerinde "BPA free-BPA'dan arı" ifadesi olanlardan seçilmiştir.

7.2.3. Ratların Deney Protokolü

Araştırmada Saki Yenilli Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı'nda üretilmekte olan en az 150 gr ağırlığındaki ergin Wistar albino erkek ratlardan 50 tane deney ve kontrol grubu olmak üzere rastgele seçildi, deney grupları oluşturuldu.

Grup 1- Kontrol grubu, (denek sayısı 10), herhangi bir işlem yapılmayan grup.

Grup 2- Zeytinyağı grubu, (denek sayısı 10), deneklere gavaj yoluyla intragastrik olarak 0.5 ml zeytinyağı 30 gün boyunca her gün verildi.

Grup 3- BPA grubu, (denek sayısı 10), deneklere gavaj yoluyla intragastrik olarak 25mg/kg/ Bisfenol A 0.5 ml zeytinyağı içinde çözdürülerek 30 gün boyunca her gün verildi.

Grup 4- D₃ vitamini grubu: Bu grupta bulunacak denek sayısı 10 olarak tasarlanmıştır. Bu gruptaki deneklere gavaj yoluyla intragastrik olarak 400IU/gün D₃ 0.5 ml zeytinyağı içinde çözdürülerek vitamini 30 gün boyunca her gün verildi. [12,166].

Grup 5- BPA ve D₃ vitamini grubu (denek sayısı 10), deneklere gavaj yoluyla intragastrik olarak 30 gün boyunca her gün 400IU/gün D₃ vitamini ve 25mg/kg/ BPA 0.5 ml zeytinyağı içinde çözdürülerek Bisfenol A verildi.

Bu uygulamalardan sonra, deneyin 30. gününün sonunda denekler, ketamin-ksilazin anestezisi altındayken karın boşlukları açıldı (Şekil 13). Karın boşluğunun açılmasının ardından öncelikle V. abdominalisten serumdan bakılacak biyokimyasal parametreler gözetilerek kan alındı (Şekil 14). Karaciğer dokularının alınmasının, ardından denekler dekapite edildiler. Alınan örneklerin bir bölümü %10' luk tamponlanmış (pH 7.4) formalin solüsyonunda oda sıcaklığında, bir bölümü ise -80°C'de saklandı.



Şekil 7.1. Karın boşluğunun açılması.



Şekil 7.2. Karaciğer dokularının alınması

7.2.4. Biyokimyasal Analizler

7.2.4.1. Numunelerin Hazırlanması

Karaciğer dokuları -80°C'de tutuldukları soğutucudan alınarak malondialdehit (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) analizleri yapılarak, toplam antioksidan seviyesi (TAS), toplam oksidan seviyesi (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI) düzeylerini belirlemek amacıyla ivedilikle tartıldı. Fosfat tampon (pH:7.5) eklenerek %10'luk doku homojenatları elde edildi ve bunlar 12.000 rpm'de 1-2 dakika süreyle otomatik homojenizatör (Hangzhou Bioprep-24) kullanılarak homojenize edildiler. Bu homojenatlarda karaciğer MDA seviyelerinin tespit edilmesinin ardından aynı homojenatlar +4 °C'de 5000 rpm'de 30 dakika santrifüje edilerek süpernatant elde edildi. Elde edilen süpernatantlar, GSH, SOD, CAT, TAS, TOS, OSI ve protein seviyelerini belirlemek için kullanıldı.

Biyokimyasal incelemeler yapılncaya kadar karaciğerden alınan 250-300 mg ağırlığındaki dokular -80°C'de muhafaza edildi. Biyokimyasal analizler için dokular homojenize edildi, SOD, MDA, TAS, TOS, GTX değerleri kit vasıtasıyla çalışıldı.

7.2.4.2. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analizi

Karaciğer Dokusu Malondialdehit (MDA) Analizi

Karaciğer homojenatındaki MDA analizi Ohkawa vd. [167] tarif ettiği yönteme bağlı kalınarak yapıldı. Karaciğerden elde edilen homojenatlar, %1'lik fosforik asit (H₃P0₄) ve %0.6'lık tiyobarbitürik asit ile karıştırıldı. Ardından 45 dakika süresince kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra karışım, n-bütanol ile ekstrakte edildi, santrifüj işlemiyle n-bütanol fazında ayrılan pembe renk deney gruplarına göre mikropilaka kuyucuklarına yerleştirilerek ELISA okuyucuda 535 nm dalga boyunda ölçüldü, MDA seviyesinin tespitinde kullanıldı. Kör olarak n-bütanol ve standart olarak tetrametoksipropan kullanıldı. Sonuçlar nanomol/g yaş doku olarak sunulmuştur.

Karaciğer Dokusu Redükte-Glutatyon (GSH) Analizi

Karaciğer süpernatantındaki redükte glutatyon (GSH) analizinde Ellman'ın [168] yöntemi kullanıldı. Karaciğer süpernatantları deproteinize edildi. 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona sokularak inkubasyona bırakıldı. Oluşan renkli ürün deney gruplarına göre mikropalakalara yerleştirilerek ELISA okuyucuda 410 nm dalga boyunda ölçüldü ve GSH seviyesini hesaplamak için kullanıldı. Kör olarak distile su ve standard olarak 5mM/L'lik stok GSH çözeltisinden hazırlanan farklı dilüsyonlar kullanıldı. Sonuçlar nanomol/g yaş doku olarak elde edildi.

Karaciğer Dokusu Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Analizi

Karaciğer süpernatantındaki SOD aktiviteleri, Sun vd. [169] açıkladığı yöntem ile belirlendi. Deney ortamında oluşan süperoksit radikalleri, ortamdaki NBT'yi (nitro blue tetrazolium) indirgeyerek mavi renkli formazan oluşmasına neden olur. Doku SOD aktiviteleri oluşan formazanın 560 nm'de ELISA okuyucuda ölçülmesi ile belirlendi. Sonuçlar U/g protein olarak elde edildi.

Karaciğer Dokusu Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Analizi

Karaciğer süpernatantındaki CAT aktivitelerinin hesaplanmasında Aebi vd. [170] uyguladığı yöntem esas alındı. Süpernatant ile H₂O₂ içeren fosfat tamponu (pH: 7.5 mM) karıştırıldı. Süpernatandaki CAT aktivitesi sayesinde H₂O₂, H₂O ve O₂' e parçalandı. Ortamdaki hidrojen peroksitlerin yıkımlanması da 240 nm'de absorban azalmasına neden oldu. CAT aktivitesini hesaplamak için absorbanstaki azalma 1 dakika boyunca gözlemlendi. Sonuçlar K/g protein olarak elde edildi.

Karaciğer Dokusu Protein Analizi

Karaciğer süpernatantlarında SOD ve CAT enzim aktivitelerinin hesaplanması için protein düzeyleri Lowry vd [171] yöntemi esas alınarak tespit edildi. Oluşan mavi renk 540 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda ölçülerek protein içeriğinin hesaplanmasında kullanıldı. Sonuçlar mg/ml olarak elde edildi.

Karaciğer Dokusu Total Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi

Karaciğer süpernatantında TOS düzeylerinin ölçülmesinde Erel'in metodu kullanıldı [172]. Total Oksidan Seviyeleri, kitte (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Türkiye) belirlenen adımlar uygulanarak tespit edildi. Oluşan renkli bileşikler 660 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile ölçüldü. Standart olarak 20 µmol/L'lik H₂O₂ solusyonu kullanıldı. Sonuçlar µmol H₂O₂ equiv/L olarak elde edildi.

Karaciğer Dokusu Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi

Karaciğer süpernatantında TAS düzeylerinin ölçümünde Erel'in metodu [173] kullanıldı. Total Antioksidan seviyeleri, kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) prosedürleri uygulanarak belirlendi. Mikroplakalara konan süpernatant üzerine reaktif 1 eklendi, 660 nm'de birinci okuma yapıldı. Reaktif 2'nin eklenmesinin ardından ikinci okuma yapıldı. Birinci ve ikinci değer arasındaki farklar belirlenerek karaciğer TAS düzeylerinin hesaplanmasında kullanıldı. Kalibratör olarak Trolox kullanıldı. Sonuçlar mmol Trolox Equiv/L olarak belirlendi.

Karaciğer Dokusu Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Ölçümü

Karaciğer süpernatantında OSI ölçümünde Erel'in metodu [173] kullanıldı. OSI (Arbitrary Unit) = TOS (µmol H₂O₂ eqv/l)/[(TAS (mmol Trolox eqv/l)x10)]. Sonuçlar Arbitrary Unit (AU) olarak belirlendi.

7.2.4.3. Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Ölçümü

Karaciğer AST, ALT ve ALP düzeylerini belirlemek için analiz kitleri (Abbott, Abbott Park, Illinois, ABD) ve otoanalizör (Architect C8000) kullanılarak enzimatik kolorimetrik yöntemle ölçüm yapıldı. Sonuçlar mg/dl olarak belirlendi.

7.2.4.5. Histopatolojik Analiz

Deneklerden anestezi altında alınan karaciğer dokuları %10'luk tamponlanmış (pH 7.4) formalin solüsyonuna konularak bu solüsyonda oda sıcaklığında 48 saat tespit amacıyla cam kaplarda bekletildi. Tespit edilen dokular akan su altında bir gece yıkandıktan sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafin içerisine gömülerek, kesit almak üzere blok haline getirildi. Bloklardan mikrotom ile alınacak 5 µm kesitler lam üzerine alınarak kuruması beklendi, ardından önce kesitler deparafinize edildi sonra da rutin Hematoksilen Eosin boyaması yapıldı.

Çizelge 7.1. Hematoksilen eosin boyama protokolü

Ksilen	5 dakika
Absolu etil alkol	2 dakika
% 96 lık etil alkol	2 dakika
%80 lik etil alkol	2 dakika
% 70 lik alkol	2 dakika
Distile suda yıkama	3 dakika
Hematoksilen (109253, Papanicolaou's solution 1a Harris' hematoxylin solution, MERCK)	2 dakika
Akarsuda yıkama	5-7 dakika
Amonyaklı su	Doku mor renk alana kadar
Akarsuda yıkama	Hızlıca daldırılıp çıkarılır
Distile Suda Yıkama	5 dakika
Eosin (05-10003/L, Bio-optica, ITA)	1- 2 dakika
% 70 lik alkol	2 dakika
%80 lik etil alkol	2 dakika
% 96 lık etil alkol	2 dakika
Absolu etil alkol	2 dakika
Ksilen	5 dakika
Boyanmış preparatlar entellan kullanılarak kapatılır.	

7.2.4.6. İmmünohistokimyasal Analiz

Adhesivli lam üzerine alınan 5 µm kalınlığındaki lamlara öncelikle 5'er dakika süreyle deparafinizasyon işlemi ardından da yine 5'er dakika süreyle dehidrasyon işlemi uygulandı. Ardından PBS ile yıkanan kesitler 30 dakika süreyle Proteinaz- K solüsyonunda tutuldular. Tekrar PBS ile yıkanan kesitler %3'lük H₂O₂ içeren metanolde 5 dakika bekletilmesinin ardından tekrar 3 kez PBS ile yıkandı. 1 saat süreyle TUNEL mixture uygulanmasının ardından, TdT(+) label solüsyon enzim solüsyonu damlatılan kesitler, PBS ile yıkandılar. Converter POD solüsyonunda da 30 dakika tutulup tekrar PBS ile yıkandıktan sonra DAB kromojen ile boyandı, PBS ile yıkandı ve son olarak Mayer'in Hematoksileni ile arka plan boyamaları yapıldıktan sonra lamel ile kapatıldılar.

7.2.4.7. İstatistiksel Analiz

SPSS (SPSS for Windows version 25.0) programı kullanılarak veriler uygun metodlarla analiz edilecektir.

BÖLÜM 8

BULGULAR

Çizelge 8.1. Karaciğer biyokimya değerlerine ilişkin çizelge

	N	Kontrol	Zeytinyağı	BPA	D3	D3+BPA
GSH	30	962,35±102,45 ^b	1056,15±102,45 ^b	378,40±102,45 ^a	1234,13±102,45 ^b	605,41±102,45 ^b
MDA	30	571,89±48,54 ^a	522,03±48,52 ^a	1063,46±48,52 ^c	532,95±48,52 ^a	775,77±48,52 ^b
CAT	30	68,97±3,25 ^d	54,75±3,25 ^c	19,50±3,25 ^a	70,16±3,25 ^d	38,86±3,25 ^b
SOD	30	24,35±3,33 ^{a,b}	24,26±3,33 ^{a,b}	10,70±3,33 ^a	36,78±3,33 ^b	24,24±3,33 ^{a,b}
TAS	30	1,303±0,153 ^{a,b}	1,812±0,153 ^{b,c}	0,915±0,153 ^a	2,12±0,153 ^c	1,22±0,153 ^{a,b}
TOS	30	47,25±5,58 ^{a,b}	40,05±5,58 ^{a,b}	86,98±5,58 ^c	35,91±5,58 ^a	59,96±5,58 ^b
OSI	30	3667,32±954,25 ^a	2374,672±954,25 ^a	10164,80±954,25 ^b	1760,32±954,25 ^a	5600,00±954,25 ^a
TNFa	30	54,49±6,40 ^a	55,55±6,40 ^a	102,00±6,40 ^b	52,95±6,40 ^a	69,37±6,40 ^a
IL-6	30	3,13±1,59 ^a	2,50±1,59 ^a	14,00±1,59 ^b	2,12±1,59 ^a	4,09±1,59 ^a

En küçük kareler ortalaması ve standart hataları verilmiştir. Aynı satırda aynı harfleri taşıyan ortalamalar arasında fark yoktur ($p>0,05$), farklı harf taşıyan ortalamalar arasında ise farklılık vardır ($p<0,05$).

Çizelge 8.2. Serum biyokimya değerlerine ilişkin çizelge

	N	Kontrol	Zeytinyağı	BPA	D3	D3+BPA
AST	30	112,63±10,21 ^{a,b}	103,50±10,21 ^a	198,11±10,21 ^c	108,10±10,21 ^a	154,01±10,21 ^b
ALT	30	74,03±11,37 ^a	68,11±11,37 ^a	135,56±11,37 ^b	62,23±11,37 ^a	93,65±11,37 ^{a,b}
ALP	30	247,00±49,63 ^a	25,83±49,63 ^a	971,33±49,63 ^c	261,16±49,63 ^a	674,16±49,63 ^b
Ure	30	40,15±0,95 ^a	40,78±0,95 ^a	52,26±0,95 ^c	37,43±0,95 ^a	47,55±0,95 ^b

En küçük kareler ortalaması ve standart hataları verilmiştir Aynı satırda aynı harfleri taşıyan ortalamalar arasında fark yoktur ($p>0,05$), farklı harf taşıyan ortalamalar arasında ise farklılık vardır ($p<0,05$).

8.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR

8.3.1. Karaciğer Dokusu MDA ve GSH Düzeyleri

Ratlara BPA uygulanması kontrol grubuna göre MDA seviyelerinde ciddi bir artışa ($p < 0.001$), GSH seviyelerinde ise dramatik düşüşle ($p < 0.05$) sonuçlanmıştır. Diğer yandan BPA uygulanmış ratlar D vitamini ile etkilendiğinde (BPA+D₃), işlenmeyen BPA grubuna göre MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı düşüşler gözlemlenirken ($p < 0.05$), GSH seviyelerinde ise ciddi gelişmeler ($p < 0.001$) olduğu tespit edilmiştir.

8.3.2. Karaciğer Dokusu SOD ve CAT Aktivite Düzeyleri

Ratlara BPA uygulaması kontrol grubuna göre doku antioksidan enzim aktivitelerinde bozulmaya neden olarak SOD ($p < 0.05$) ve CAT ($p < 0.001$) aktivitelerinde ciddi düşümlere neden olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan BPA uygulanan ratların D vitamini ile etkilenmesi (BPA+D₃), işlenmeyen BPA grubuna kıyasla hem SOD hem de CAT ($p < 0.01$) enzim aktivitelerinde ciddi reaksiyonlar gözlenmesine neden olmuştur.

8.3.3. Karaciğer Dokusu TAS, TOS ve OSİ Düzeyleri

Karaciğer dokusuna ait TAS, TOS ve OSİ düzeyleri Çizelge sunulmuştur. Deney hayvanlarına BPA uygulanması kontrol grubuna kıyasla karaciğer dokusu TAS düzeylerinde ciddi düşümlere ($p < 0.001$) neden olurken, doku TOS ve OSİ değerlerinde ise ciddi artışlar ($p < 0.001$) gözlenmesi ile neticelenmiştir. Ancak BPA verilen ratların D vitamini ile Etkilenmesi işlenmeyen gruba kıyasla karaciğer dokusuna ait oksidan/antioksidan dengesini antioksidanlar lehine düzelterek TAS düzeylerinde artışlara neden olurken TOS ve OSİ değerlerinde ise ciddi düşümlere ($p < 0.05$) neden olmuştur.

8.4. İNFLAMASYON BELİRTEÇLERİNİN DÜZEYİ

BPA uygulanmış ratlarda karaciğer dokusu üzerinde oluşturduğu inflamasyonu ve D vitamininin anti-inflamatuar etkisini ortaya koymak için doku inflamasyon belirteçlerinden TNF- α ve İL-6 düzeyleri çalışılmıştır.

8.4.1. Karaciğer Dokusu TNF- α ve İL-6 Düzeyleri

Deney hayvanlarına BPA uygulanması karaciğer dokusu üzerinde inflamasyona sebep olmuş ve kontrol grubuna kıyasla TNF- α ve İL-6 düzeylerinde ciddi artışlara ($p < 0.001$) neden olmuştur. Diğer yandan BPA uygulanmış hayvanların D vitamini ile Etkilenmesi (BPA+D₃), işlenmeyen BPA grubuna kıyasla inflamasyonun baskılanmasına neden olarak TNF- α ve İL-6 düzeylerinde ciddi reaksiyonlara ($p < 0.05$) neden olmuştur.

8.5. SERUM BİYOKİMYA PARAMETRELERİ

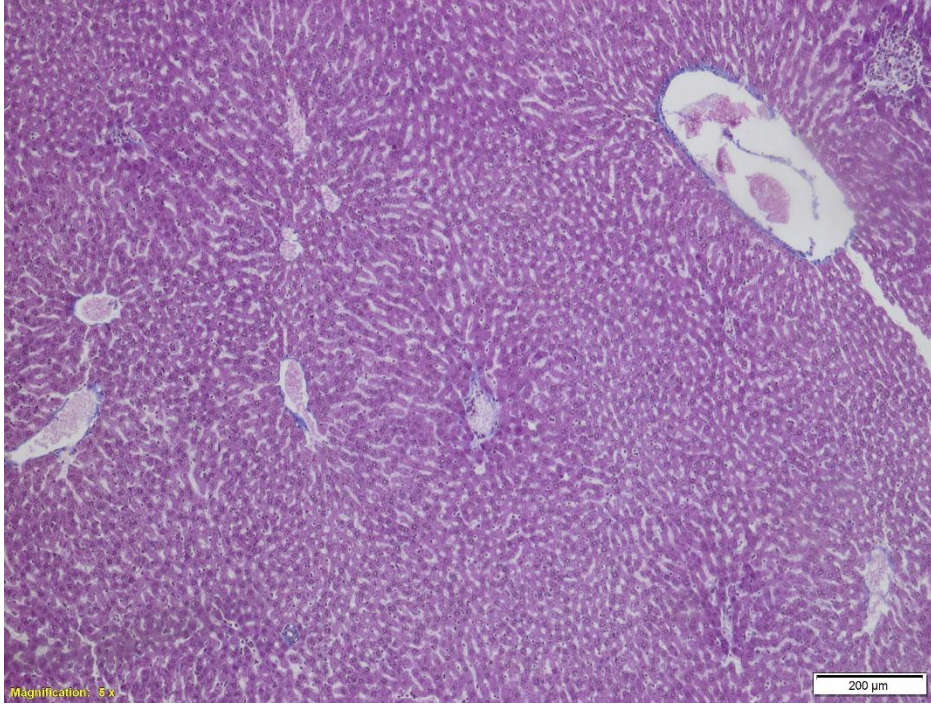
Deney hayvanlarından alınan kan örneklerinden elde edilen serum örneklerinde karaciğer fonksiyon testleri olan AST, ALT ve ALP düzeyleri ile serum üre düzeyleri ölçülmüştür.

8.5.1. Serum AST, ALT ve ALP Düzeyleri

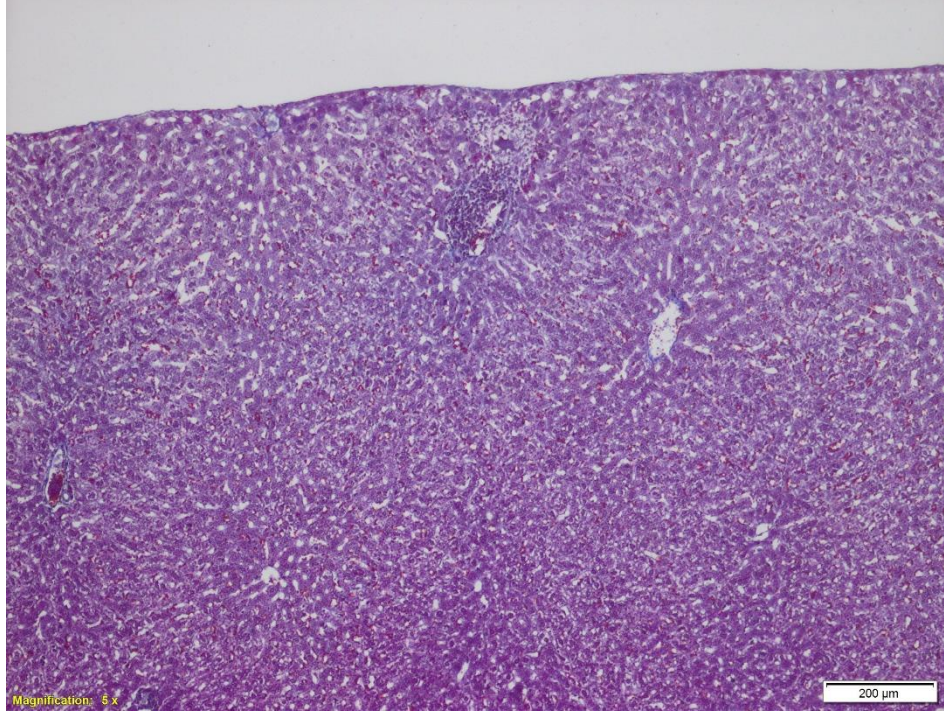
Ratlara BPA uygulaması kontrol grubuna göre karaciğerde hasara sebep olarak serum AST ve ALP düzeyleri ($p < 0.001$) ile serum ALT ($p < 0.05$) düzeylerinde ciddi yükselişlere neden olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan BPA uygulanan ratların D vitamini ile Etkilenmesi (BPA+D vit), işlenmeyen BPA grubuna kıyasla ise serum parametrelerinde ciddi gelişmeler gözlenmiş ve işlenmeyen gruba göre (BPA) serum AST ve ALP düzeylerinde ($p < 0.001$) ciddi düşüşler olurken, serum ALT düzeylerinde ise anlamlı olmayan bir düzelme olduğu tespit edilmiştir.

8.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

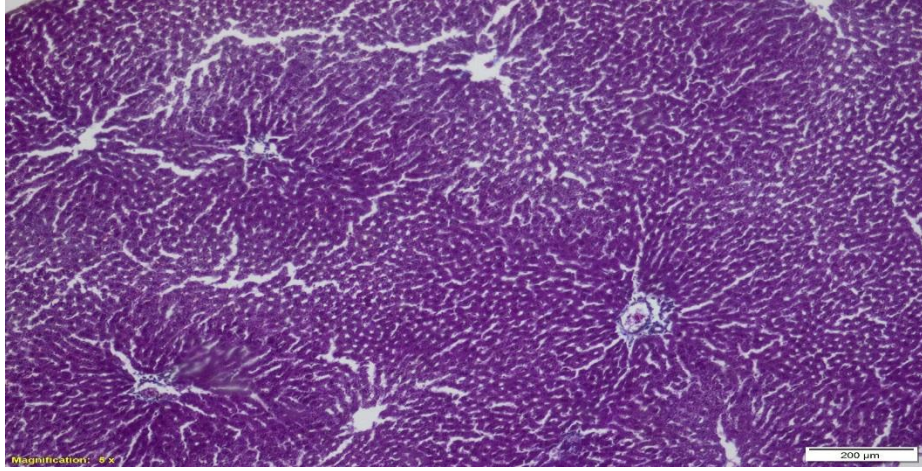
Kontrol grubuna ait karaciğerlerin histolojik incelemesinde, bu dokuların normal histolojik görünümde oldukları, normal portal alan, V. Centralis, normal sinusoidal genişlik gösterdiği tespit edildi (Şekil15). Benzer şekilde D₃ vitamini ve zeytinyağı gruplarının rutin histolojik incelemesi, normal histolojik görüntü alınması ile sonuçlanmıştır (Şekil16). Ancak BPA uygulanan grupta karaciğer dokusunda granüler vakuoler dejenerasyon (Şekil 17), portal inflamasyon (Şekil 18), sinuzoidelerde konjesyon (Şekil 19) ve lenfositik infiltrasyon (Şekil 20). gözlenmiştir. Ek olarak perisinuzoidal alanda lenfositik hücreler (Şekil 21). görülmüştür. BPA ve D₃ vitaminin beraber uygulandığı grupta ise bu görüntülere rastlanmamış, sadece daha ödemli olan karaciğer dokusu, normal karaciğer dokusuna oldukça benzer bir şekilde gözlemlenmiştir (Şekil 22).



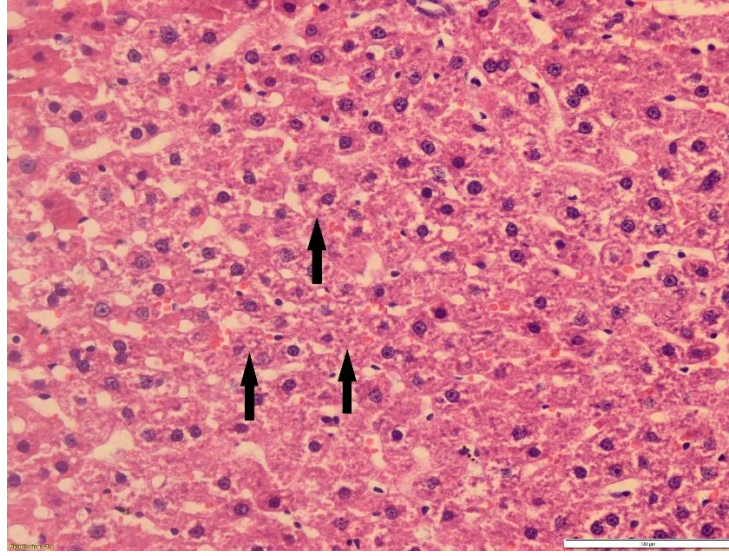
Şekil 8.1. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu Bar 200 µm× 10x



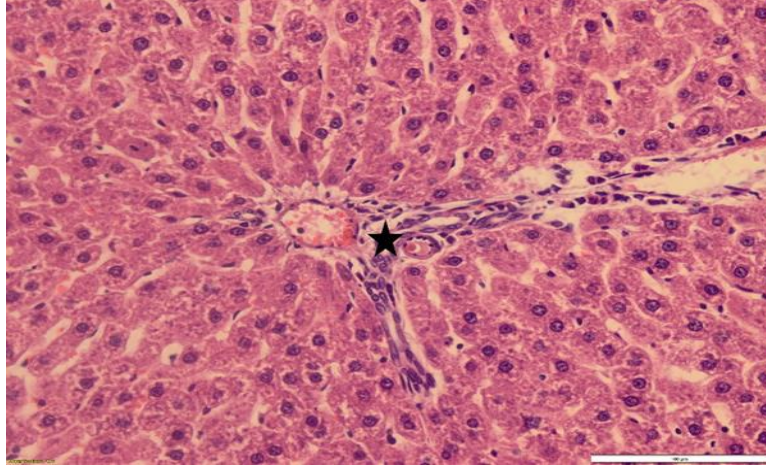
Şekil 8.2. .D₃ grubuna ait karaciğer dokusu Bar 200 μm× 10x



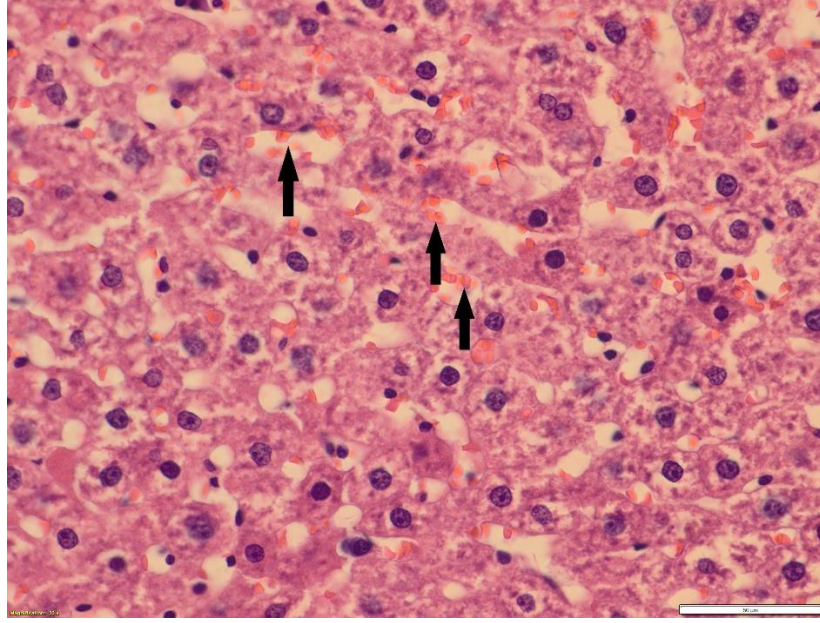
Şekil 8.3. .Zeytinyağı grubuna ait karaciğer dokusu Bar 200 μm× 10x



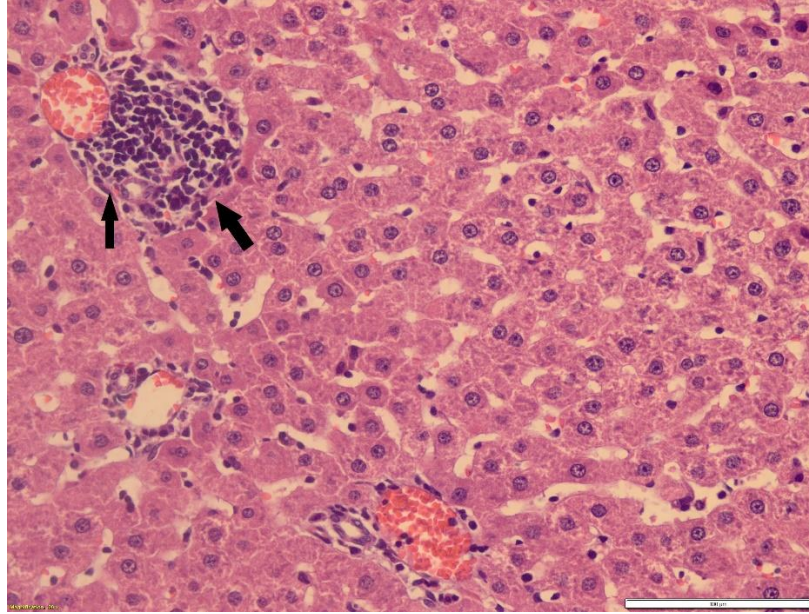
Şekil 8.4. BPA uygulanan grupta hepatositlerde, oklar: granüler vakuoler dejenerasyon
Bar 100 μm \times 40x



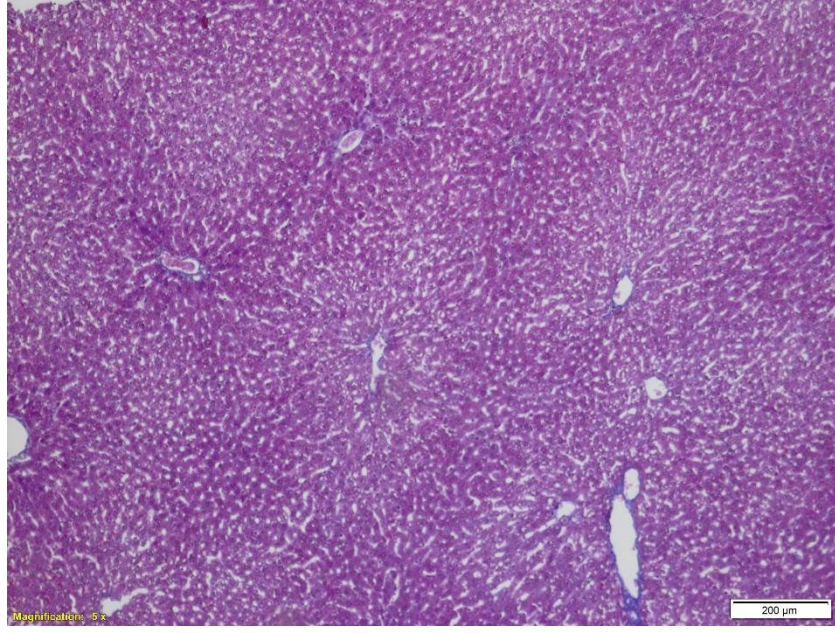
Şekil 8.5. BPA uygulanan grupta hepatositlerde, yıldız: inflamatuvar hücre infiltrasyonu Bar 100 μm \times 40x



Şekil 8.6. BPA uygulanan grupta oklar: sinuzoidlerde konjesyon ve dilatasyon Bar 100 μm \times 40x



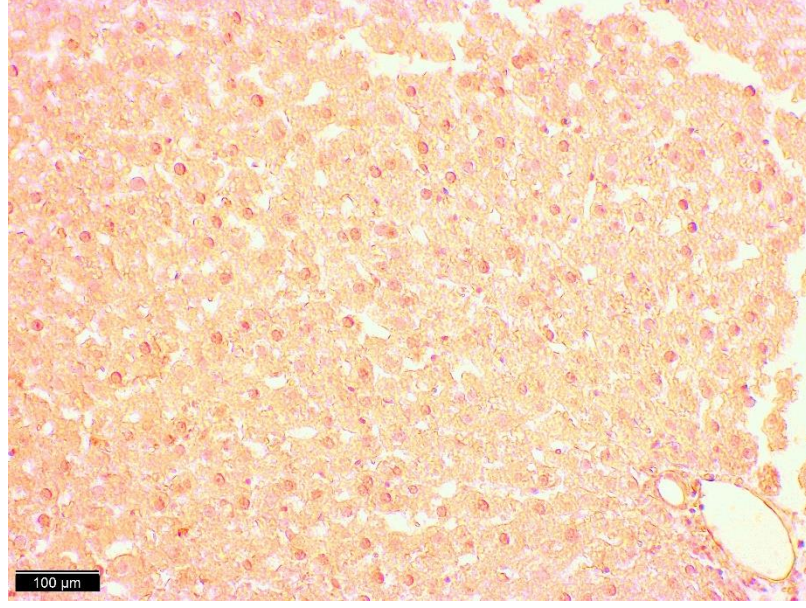
Şekil 8.7. BPA uygulanan grupta oklar: lenfosit infiltrasyonu Bar 100 μm \times 40x



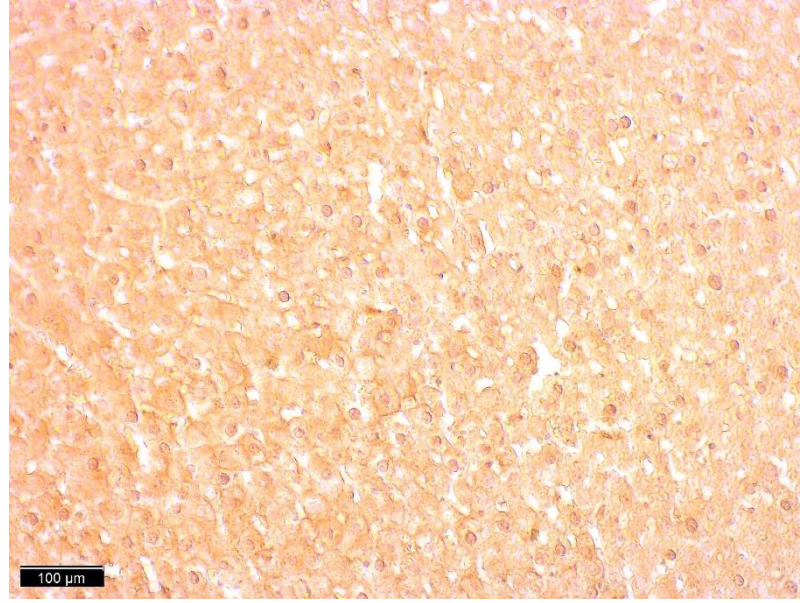
Şekil 8.8. BPA ve D₃ uygulanan grupta karaciğerin görüntüsü Bar 200 μm, ×10x

8.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

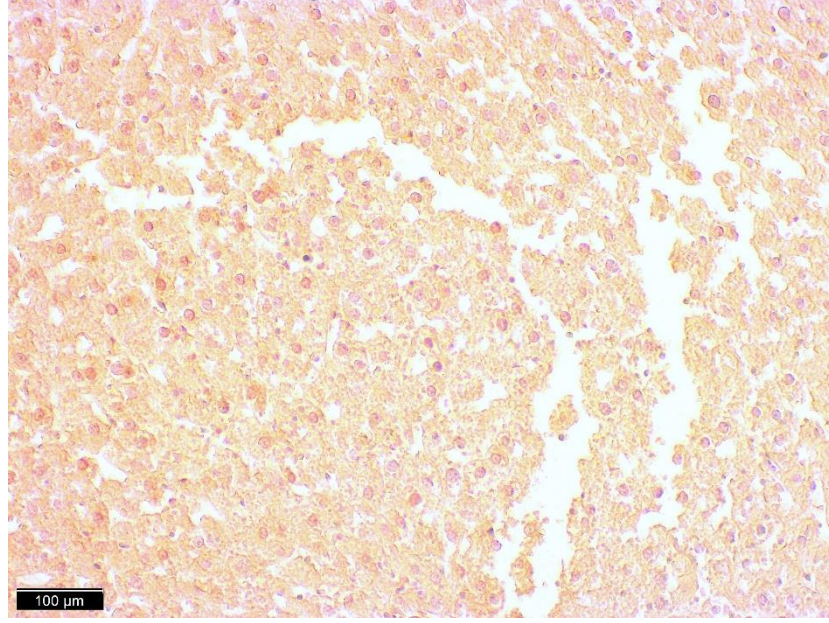
TUNEL metodu, intrinsik ya da mitokondriyal yolak ile oluşan apoptozun tespit edilmesinde kullanılır. Bu yolakta radyasyon, hipoksi, toksinler ve ilaçlar kaynaklı olarak DNA hasarı oluşan hücrelerde, DNA uçlarının terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ile işaretlenmesi sayesinde DNA hasarının tespit edilmesi mümkün olur. Bu çalışmaya konu olan gruplar arasında, kontrol, zeytinyağı ve D₃ gruplarında apoptotik hücrelerden TUNEL metodu kullanılarak tespit edilebilen olmamıştır (Şekil23), (Şekil24), (Şekil25). Ancak BPA uygulanan grupta TUNEL(+) hücelere yoğun bir şekilde görüldü (Şekil26). BPA ile birlikte D₃ vitaminin beraber kullanıldığı grupta ise apoptoza giden hücre yoğunluğunun azaldığı görüldü (Şekil27).



Şekil 8.9. Kontrol grubundan alınan karaciğer örneklerine yapılan TUNEL boyamasında apoptotik hücre görülmemiştir. Bar 100 µm× 20x



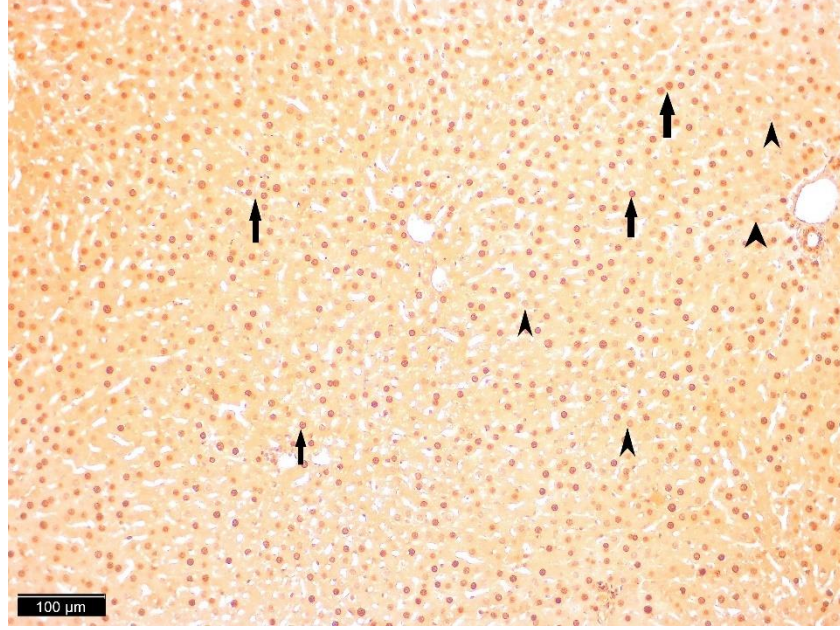
Şekil 8.10. Zeytinyağı kullanılan gruptan alınan karaciğer örneklerine yapılan TUNEL boyamasında apoptotik hücre görülmemiştir. Bar 100 µm× 20x



Şekil 8.11. D₃ vitaminin kullanıldığı gruptan alınan karaciğer örneklerine yapılan TUNEL boyamasında apoptotik hücre görülmemiştir. Bar 100 µm× 20x



Şekil 8.12. BPA grubundan alınan karaciğer örneklerine yapılan TUNEL boyaması oklar: apoptotik hücreler ok başları: apoptoz göstermeyen hücreler. Bar 100 µm× 20x



Şekil 8.13. BPA ve D₃ vitamininin birlikte kullanıldığı gruptan alınan karaciğer örneklerine yapılan TUNEL boyaması oklar: apoptotik hücreler ok başları: apoptoz göstermeyen hücreler. Bar 100 μm× 20x

BÖLÜM 9

TARTIŞMA VE SONUÇ

9.1. TARTIŞMA

Bisfenol A, ev ürünleri, kozmetik ve medikal ürünlerden (kontamine ekipman ve cihazlar) veya endüstriyel kullanım sırasında inhalasyon ve dermal temas ile vücuda alınabilmektedir. Bu kimyasal madde, hızlı metabolize olmasına rağmen, oldukça uzun bir süre dokularda birikmesi [11] nedeniyle insan sağlığını on yıllardır tehdit etmektedir.

Günlük yaşamda maruz kalınan bu tür toksik ve kimyasal maddeler, vücutta başta endokrin sistem olmak üzere, kalp, karaciğer ve birçok organda kronik rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Bilindiği gibi karaciğer toksik ve kimyasal maddelerin metabolizmasında ve detoksifikasyon sürecinde yer alan başlıca organdır. Bu yüzen karaciğer oksidatif stres ve apoptoza daha çok maruz kalmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; BPA'nın karaciğerde oluşturduğu hasara karşı vitamin D₃'ün koruyucu etkisini gözlemlemektir. Bu amaçla hem karaciğer dokusunda, hem de kan serumunda çeşitli biyokimyasal parametreler değerlendirilmiş, ek olarak BPA kaynaklı olarak karaciğerde apoptoz ile kendini gösteren süreç, immunohistokimya metodu ile ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda biyokimyasal olarak değerlendirilen parametrelerden biri olan MDA, son ürün olarak lipid peroksidasyonunda üretilir, lipid yıkım ürünlerinden biridir ve üç karbonlu dialdehit yapısı gösterir. MDA lipidlerde yanlış bağlanmalara neden olur, karsinogenik ve mutajenik özellikleri ile de ön plandadır. Lipidlerde meydana gelen oksidasyonu bu parametre gözetilerek ortaya konabilir. Ölçülen MDA değerindeki artış, oksidatif stresin de bir belirteci olarak uzun zamandır kullanılmaktadır [174].

Glutatyon ya da GSH, hücrelerin içinde bulunur ve hücreyi reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerinden korur. Bu özellikleri sebebiyle, oksidatif hasara maruz kalan doku ve organlarda bulunan hücrelerde GSH seviyelerinde ciddi düşüşler gözlenmektedir. Bir diğer önemli antioksidan savunma sistemi Süperoksit dismutaz (SOD)'dır. SOD bir süperoksit radikalini O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer bir süperoksit radikalini ise daha az reaktif bir molekül olan hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenmesini katalize eder. Oksidatif hasara maruz kalan hücrelerde SOD miktarında düşüşler tespit edilir. Katalaz (CAT) enzimi temel olarak peroksizomlarda bulunan bir enzimdir. H_2O_2 'in zararsız hale getirilmesi işlemi CAT enziminin yapısıdır. [175].

Ratlara 10mg/kg dozunda BPA'nın gavaj yoluyla ve 30 gün süreyle uygulandığı bir çalışmada [176]. karaciğer dokusuna ait MDA, SOD ve GSH düzeyleri değerlendirilmiş, bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçlara paralellik gösterir şekilde, MDA değerlerinin yükseldiği, SOD ve CAT enzim değerlerinin ise düştüğü gösterilmiştir.

BPA'nın bizim çalışmamızla benzer şekilde 25mg/kg dozunda ve 60 gün süreyle ancak hipodermik bir enjektöre bağlı beslenme tüpü vasıtasıyla oral yoldan uygulandığı bir başka çalışmada [177] yine BPA uygulamasına bağlı olarak MDA düzeyinde artış, SOD ve CAT düzeylerinde ise azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler BPA'nın karaciğer üzerinde oksidatif hasara sebep olduğunu gösterir nitelikte ve bizim çalışmamızla uyum içindedir.

Bir başka çalışmada [178] 50mg/kg dozunda BPA 28 gün süre ile oral yolla uygulanmış ve antioksidan parametreler değerlendirilmiştir. Alınan sonuçlar yine BPA'nın karaciğer hasarına neden olduğunu ortaya çıkartmış, MDA düzeyinde artışa neden olmuşken, SOD, CAT ve GSH düzeylerinde ciddi düşüşlerle sonuçlanmıştır.

D_3 vitamini, antioksidan özelliği sayesinde karaciğerde meydana gelen metabolik ya da toksik hasarları ortadan kaldırma potansiyeli nedeniyle özellikle son yıllarda oldukça fazla sayıda çalışmaya konu olmuştur. Genellikle çalışmaların çoğu, bu vitaminin eksikliğinde bozulan sistemler üzerinde durmakla beraber, yaşanan pandemide bağışıklık destekleyici özelliklerinin ön plana çıkartılmasıyla diyeteye eklenmesinin sağladığı faydalara yoğunlaşmıştır.

3000IU/ kg / gün D₃ vitamini dozunun 5 gün süreyle uygulanarak akut parasetamol toksikasyonu kaynaklı karaciğer hasarına karşı tedavi edici etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada [179] akut parasetamol toksisitesinin değerlendirildiği gruba göre MDA düzeyinin azaldığı, SOD, CAT ve GSH düzeylerinde ise D₃ vitamini uygulamasıyla arttığı tespit edilmiş ve D₃ vitamininin antioksidan özelliği vurgulanmıştır. Elde edilen veriler bizim çalışmamızda elde ettiğimiz verileri destekler niteliktedir.

Orta ve yüksek miktarda (5 ve10 µg/kg dozları) D vitamini takviyesinin karaciğer üzerinde etkilerinin histolojik ve biyokimyasal metotlarla araştırıldığı bir başka çalışmada [180] 2 hafta boyunca 3 kez D₃ vitamini uygulaması yapılmış 5 µg/kg dozunda kullanılan grupta, karaciğer dokusundan elde edilen MDA değerlerinde azalma, SOD, CAT ve GSH değerlerinde artma tespit edilmiş ancak doz yükseltildiğinde bu değerlerin karaciğer aleyhinde olacak şekilde tam tersi şekilde sonuçlandığı bildirilmiştir. Araştırmacılar tarafından orta miktar olarak nitelendirilen doz için elde edilen bulgular, bizim çalışmamızda D₃ vitaminin verildiği grup ile benzerlik göstermektedir.

Dünya Sağlık Örgütü tarafından, yetişkin bireylerde kandaki D vitamini seviyesine bakılmaksızın 400-800 IU/ gün D vitamini önerilir. Şimdiye kadar D vitaminin uzun aralıklar ile yüksek dozda alınmasının yeterli olacağı yönündeki görüşler, son dönemde yapılan araştırmalar zeminine dayandırılarak günlük ve orta miktarda alım yapılmasının metabolizma açısından faydalarının altını çizmektedir. Biz de bu nedenle, tavsiye edilen dozun minimumunu baz alarak yaptığımız çalışmada D₃ vitamininin hepatotoksisite üzerine koruyucu etkisini ve oksidatif stresi azaltıcı etkisini ortaya koymuş bulunmaktayız.

Bisfenol A, yaygın olarak kullanılan endüstriyel bir malzeme olmasına karşın, her gün ancak düşük dozlarda alınmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada BPA'nın dozu yüksek tutulmamıştır. Buna karşın belirlenen doz için BPA'nın hepatotoksik bir ajan olduğu ve karaciğer üzerinde oksidatif hasara neden olduğu tespit edilmiştir.

TAS ve TOS değerleri dokudaki tüm antioksidan ve oksidanların toplam miktarını ifade eder. Total antioksidanların total oksidanlara oranı ise OSİ adı ile karşımıza

çıkar. OSİ doku üzerindeki genel oksidatif stres durumunu ifade eden bir belirteçtir. Oksidatif stres sebebiyle dokularda TAS seviyesinin düştüğü, TOS ve OSİ düzeylerinde ise artış olduğu bilinmektedir. Literatürde direct olarak TAS, TOS ve OSİ düzeylerinin ölçüldüğü bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak BPA kullanılan grupta TOS değerinin yükseldiği, D vitamini kullanımıyla da bu değer düşerek TAS değerinin yükseldiği tespit edilmiştir.

Enflamasyon bir dokunun her çeşit etkene veya doku hasarına verdiği bir seri vital yanıtıdır. Enflamatuvar yanıtlar, hormonal ve hücrel immünite aracılığında [Interlökin-1 β (IL-1 β), Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) ve IL-6] indirekt olarak ortaya çıkabilmektedir [181]. TNF-alfa ve IL_6 enflamatuvar yanıtı artıran pro-enflamatuvar sitokinlerdir [182]. Bir diğer deyişle bu pro-enflamatuvar sitokinlerin artışı, enflamasyonun habercisidir.

Araştırmacıların 25mg/kg dozundaki BPA'yı 60 gün süre ile kullanmalarının ardından TUNEL metodu kullanarak karaciğerdeki apoptotik hücreleri tespit ettiği bir çalışmada [177] BPA grubunda kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayısında oldukça belirgin bir artış vardır. Bu anlamda bahsedilen çalışma ile bulgularımız, aynı dozda BPA'yı 30 gün süre ile kullanmamıza karşın benzerlik içindedir.

100 μ g/kg/gün dozunda uygulanan BPA'nın 2,4,6 ve 8 hafta süreyle uygulandığı ratların karaciğerinde apoptoz gösteren hücrelerin TUNEL metodu ile gösterildiği bir çalışmada [183] süre uzadıkça BPA kullanılan grupta apoptoza giden hücre sayısının arttığı belirtilmiş ve bu sonuç bizim kullandığımız doz ve 30 gün için benzerlik göstermiştir. Aynı çalışmada karaciğer dokusuna ait genel histolojik görüntünün elde edilmesi amacıyla yapılan boyamalarda bizim sonuçlarımıza benzer şekilde BPA uygulanan grupta lenfosit infiltrasyonları, genel yapıda bozulmalar, hiperemik alanlar tespit edilmiştir.

Karaciğer hasarına sebep olan d-galactosamine maddesinin kullanımının ardından ratlara 5 gün süreyle intramusküler yolla D₃ vitamininin uygulanmasının ardından yapılan TUNEL ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi işlemi, tek başına D₃ vitamini kullanılan grupta intramusküler yol ile verilmesine karşın karaciğerdeki apoptotik

hücre sayısının karaciğer hasarı olan gruptan daha az olarak tespit edilmesiyle sonuçlanmıştır [184] Ancak bahsi geçen literatürde hem veriliş yolu hem de süresi bizim kullandığımız metottan farklıdır. Bu bağlamda D₃ vitamininin oral ve intramüsküler olarak verilmesinin apopitoza giden hücrelerin sayısını antioksidan aktivitesi ile azaltıp azaltmadığını ya da hangi yolla verilirse etkinliğinin daha iyi olacağını tespit edilmesi literatüre katkı sağlayabilir.

Karaciğer fonksiyon testleri; karaciğerin ne durumda olduğunu anlamak amacıyla değerlendirilen bir grup biyokimya testidir. Aslı, karaciğerde üretilen metabolitlerin kan serumunda ne miktarda bulduklarının tespit edilmesi olan bu testler normalden farklı sonuçlandıklarında karaciğerde bir sorunun göstergesi olurlar. Karaciğer fonksiyon testi başlığı altında AST, ALT ve ALP düzeylerinin ölçümü yapılır. Alanin Transaminaz (ALT) bir enzimdir ve protein üretimi sırasında kullanılır. Karaciğer hücrelerinin parçalanması ile kana karışır. Aspartat Aminotransferaz (AST) hepatositlerin içinde bulunan bir enzimdir. Karaciğer hücrelerinin parçalanması sonucunda kandaki miktarı yükselir. Alkalin Fosfataz (ALP) enzimi safra kanalları yakınındaki karaciğer hücrelerinde bulunur. Çalışmamızda deneklerin kan serumunda bakılan bu değerler BPA kullanılan grupta anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

30 gün süreyle gavaj yoluyla BPA uygulanan ratlardan alınan kan serum örneklerinde ALT ve ALP değerlerinin ölçüldüğü çalışmada bizim bulgularımıza paralel olarak bu değerler BPA uygulanan grupta yüksek bulunmuştur [176].

Akut parasetamol toksisitesinin karaciğer üzerinde yaptığı etkiye karşı olarak D₃ vitamininin oldukça yüksek dozlarının gavaj yoluyla verilerek profilaktik ve terapötik etkilerinin değerlendirildiği çalışmada [179] D₃ vitamininin profilaktik olarak kullanıldığı zaman karaciğer fonksiyon testleri üzerine daha olumlu etki yaptığı gösterilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada D₃ vitamininin sadece terapötik etkisi değerlendirilmiştir, başka çalışmalarda profilaktik etkisinin de değerlendirilmesinin literatüre katkı sağlayacağı açıktır. Ancak bahsi geçen çalışmada kullanılan dozun çok yüksek olmasının (1200mg/kg) karaciğer fonksiyon testlerini profilaktik olarak kullanıldığında daha iyi sonuçlar verse de yine de oldukça olumsuz etkilediği görülmüştür. Yine üre düzeyi için benzer bir sonuca ulaşılmıştır, bizim yaptığımız

çalışmada ise BPA uygulaması ile beraber yapılan D₃vitamini uygulamasının serum üre düzeyini düşürdüğü görülmüştür.

250mg/kg dozunda uygulanan BPA'nın [185] serum AST, ALP ve ve ALT değerlerini yükselttiği bildirilmiştir, bizim sonuçlarımızla uyum içindedir.

4 hafta süre ile farklı dozlarda (0/0,1/1/10/50 mg/kg) BPA uygulaması yapılan bir diğer çalışmada [178] ALT ve ALP değerlerinin kullanılan BPA miktarı arttıkça trajik bir şekilde arttığı belirtilmiştir. Bu da yine çalışmamızın sonuçları ile uyum içindedir.

9.2. SONUÇ

Sonuç olarak yaptığımız çalışma ile BPA'nın, düşük/orta dozlarda alınıyor olsa bile karaciğerde oksidatif hasara neden olduğunu ve bu hasarların istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde D₃ vitamini kullanılarak azaltılabileceğini ortaya koymuş olduk. Bu sonuca biyokimyasal, histolojik ve immunohistokimyasal verilerin ışığında ulaşılmıştır. Optimum doz ve uygulama yolu, uygulama sıklığı için başka çalışmaların yapılması, bilim dünyasında bir açığı kapatacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ayazgök B, Tüylü Küçükkinç T., “Düşük Doz Bisfenol A’nın Büyük Etkileri”, *FABAD J Pharm Sci*, 42:139–50 (2017).
2. EFSA 2015, “ <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol> Accessed”, 16.03(2021).
3. Huang YQ, Wong CK, Zheng JS, Bouwman H, Barra R, Wahlström B, et al., “Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts”, *Environ Int*, 42:91–9 (2012).
4. Jalal N, Surendranath AR, Pathak JL, Yu S, Chung CY., “Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic”, *Toxicol Rep*, 5:76–84 (2018).
5. Michałowicz J. Bisphenol A – Sources., “toxicity and biotransformation”, *Environ Toxicol Pharmacol*, 37:738–58 (2014).
6. Rochester JR., “Bisphenol A and human health”, *A review of the literature. Reprod Toxicol*, 42:132–55 (2013).
7. Manfo FP, Jubendradass R, Nantia EA, Moundipa PF, Mathur PP., “Adverse Effects of Bisphenol A on Male Reproductive Function”, *Rev Environ Contam Toxicol*, 228:57–82 (2014).
8. Rahman MS, Kwon WS, Karmakar PC, Yoon SJ, Ryu BY, Pang MG., “Gestational Exposure to Bisphenol A Affects the Function and Proteome Profile of F1 Spermatozoa in Adult Mice”, *Environ Health Perspect*, 125:238–45 (2017).
9. Bolt HM, Stewart JD., “Highlight report: the Bisphenol A controversy”, *Arch Toxicol*, 85:1491–2 (2011).
10. Rubin BS., “Bisphenol A. an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects”, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127:27–34 (2011).
11. Sözlü S, Akdevelioğlu Y., “Bisfenol A (BFA) ve insan üreme sağlığı”, *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 11:86–9 (2018).
12. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV., “Human exposure to bisphenol A (BPA) ”, *Reprod Toxicol*, 24:139–77 (2007).
13. Nanjappa MK, Simon L, Akingbemi BT., “The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cells”, *Biol Reprod*, 86:135, 1–12 (2012).

14. Gil A, Plaza-Diaz J, Mesa MD., “Vitamin D: Classic and Novel Actions. Ann NutrMetab”, Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29346788>, 72(2):87–95(2018).
15. Feng R, Li Y, Li G, Li Z, Zhang Y, Li Q, et al., “Lower serum 25 (OH) D concentrations in type 1 diabetes: A meta-analysis”, *Diabetes Res Clin Pract [Internet]*. 2015 Jun;108(3):e71-5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres>, 108(3):71-5 (2014).
16. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JBJ, Pols HAP, Van Leeuwen JPTM., “Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms”, *Gene [Internet]*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/153158181>, 338(2):143–56 (2004).
17. Holick MF., “Vitamin D deficiency”, *N Engl J Med*, 19;357(3):266–81 (2007).
18. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R., “Estimates of optimal vitamin D status”, *Osteoporos Int [Internet]* Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15776217>, 7:713-6 (2005).
19. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, et al., “Hypovitaminosis D in medical inpatients”, *N Engl J Med* Available from; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504937>, 338(12):777–83(1998).
20. Deluca HF, Cantorna MT., “Vitamin D: its role and uses in immunology”, *FASEBJ* Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726533>, 14:2579-85 (2001).
21. Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, Zhang L, et al., “Calcitriol protects renovascular function in hypertension by downregulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress”, *Eur Heart J* Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22267242>, 33(23):2980–90(2012).
22. Berridge MJ., “Vitamin D cell signalling in health and disease”, *Biochem Biophys Res Commun*, 24;460(1):53–71.(2015).
23. Tremblay KD, Zaret KS., “Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues”, *Dev Biol*, 280:87-99 (2005).
24. Strazzabosco M, Fabris L., “Development of the bile ducts: essentials for the clinical hepatologist”, *J Hepatol*, 56:1159-1170 (2012).
25. Houssaint E., “Differentiation of the mouse hepatic primordium”, *I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. Cell Differ*, 9:269-279 (1980).

26. Tan J, Hytiroglou P, Wieczorek R, et al., “Immunohistochemical evidence for hepatic progenitor cells in liver diseases”, *Liver*, 22:365-373 (2002).
27. Lemaigre FP., “Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies”, *Gastroenterology*, 137:62-79 (2009).
28. Nakanuma Y, Hosono M, Sanzen T, Sasaki M., “Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply”, *Microsc Res Tech*, 38:552-570 (1997).
29. Fabris L, Cadamuro M, Libbrecht L, et al., “Epithelial expression of angiogenic growth factors modulate arterial vasculogenesis in human liver development”, *Hepatology*, 47:719-728 (2008).
30. Majno P, Mentha G, Toso C, Morel P, Peitgen HO, Fasel JH., “Anatomy of the liver: an outline with three levels of complexity—a further step towards tailored territorial liver resections”, *J Hepatol*, 60:654-662 (2014)., “10. Zhou Z, Xu MJ, Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity”, *Cell Mol Immunol*, 13:301-315 (2016).
31. Zhou Z, Xu MJ, Gao B., “Hepatocytes: a key cell type for innate immunity”, *Cell Mol Immunol*, 13:301-315 (2016).
32. Suriawinata A, Thung S., “Liver. In: Mills SE, ed. Histology for pathologists, 4th ed”, *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*, 733-758 (2012).
33. Terada T, Nakanuma Y, Ohta G., “Glandular elements around the intrahepatic bile ducts in man; their morphology and distribution in normal livers”, *Liver*, 7:1-8 (1987).
34. Igarashi S, Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y., “Participation of peribiliary glands in biliary tract pathophysiology”, *World J Hepatol*, 5:425-432 (2013).
35. Lim JH, Zen Y, Jang KT, Kim YK, Nakanuma Y., “Cyst-forming intraductal papillary neoplasm of the bile ducts: description of imaging and pathologic aspects”, *AJR Am J Roentgenol*, 197:1111-1120(2011).
36. Nakanuma Y, Zen Y, Portman B., “Diseases of the bile ducts. In: MacSween RN, Burt AD, Portman B, Ferrell LE, eds”, *MacSween’s pathology of the liver. Edinburg: Churchill Livingstone/Elsevier*, 491-562 (2012).
37. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, et al., “Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers”, *Hepatology*, 39:1739-1745 (2004).
38. Ruck P, Xiao JC, Kaiserling E., “Immunoreactivity of sinusoids in hepatocellular carcinoma. An immunohistochemical study using lectin UEA1 and antibodies

- against endothelial markers, including CD34”, *Arch Pathol Lab Med*, 119: 173-178 (1995).
39. Bedossa P, Hytioglou P, Yeh M., “Vascular Disorders. In: Burt A, Ferrell LD, Hubscher S, eds”, *MacSween’s pathology of the liver, 7th ed: Philadelphia: Elsvier*, 636-672 (2018).
 40. Pietrangelo A., “The ferroportin disease”, *Blood Cells Mol Dis*, 32:131-138 (2004).
 41. Friedman SL., “Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver”, *Physiol Rev*, 88:125-172 (2008).
 42. Wake K., “Sternzellen” in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A”, *Am J Anat*, 132:429-462 (1971).
 43. Wisse E, Luo D, Vermijlen D, Kanellopoulou C, De Zanger R, Braet F., “On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells”, *Semin Liver Di*, 17:265-286 (1997).
 44. Nakatani K, Kaneda K, Seki S, Nakajima Y., “Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function”, *Med Electron Microsc*, 37:29-36 (2004).
 45. Guyton AC, Hall JE., “Textbook of Medical Physiology”, *11th Edition, Saunder Philadelphia, Pennsylvania*, 1116 pp (2006).
 46. Moore KL, Dalley AF., “Clinically Oriented Anatomy”, *5 th Edition Lippincott Williams and Wilkins*, 1209 pp (2006).
 47. Butura A., “Drug and Alcohol Induced Hepatotoxicity”, *Ph. D Thesis Department of Physiology and Pharmacology Karolinska Institutet, Stockholom, Sweden*, 55 pp (2008).
 48. Park BK, Pirmohamed M, Kitteringham NR., “The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity”, *Pharmacology and Therapeutics*, 68(3): 385 – 424 (1995).
 49. Liu ZX, Govindarajan S, Kaplowitz N., “Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity”, *Gastroenterology*, 127: 1760 – 1774 (2004).
 50. Abo T, Watanabe H, Iiai T, Kimura M, Ohtsuka K, Sato K, Ogawa M, Hirahara H, Hashimoto S, Sekikawa H., “Extrathymic pathways of T-cell differentiation in the liver and other organs”, *International Reviews of Immunology*, 11(1): 61 – 102 (1994).
 51. Taniguchi H, Toyoshima T, Fukao K, Nakauchi H., “Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver”, *Nature Medicine*, 2(2): 198 – 203 (1996).

52. Grisham JW., “Cell type in rat liver cultures: their identification and isolation”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 53(2): 23 – 33 (1983).
53. Mechal WZ, Azzaroli F, Crispe IN., “Immunology of the healthy liver”, *Gastroenterology*, 120: 250 – 260 (2001).
54. Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, Van Rooijen N, Tiegs, G., “Importance of kupffer cells for T-cells dependent liver injury in mice”, *American Journal of Pathology*, 157(5): 1671 – 1683 (2000).
55. Bowen DG, Warren A, Davis T., “Cytokine dependent hepatitis due to intrahepatic murine CD8 T cell activation by bone marrow derived cells”, *Gastroenterology*, 123(4): 1252 – 1264 (2002).
56. Vandenberg, L., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W., “Human exposure to bisphenol A (BPA) ”, *Reprod. Toxicol*, 24, 139–177 (2007).
57. Flint, S., Markle, T., Thomson, S., Wallace, E., “Bisphenol A exposure effects and policy; a wildlife perspective”, *J. Environ. Manag*, 104, 19–34 (2012).
58. Michałowicz, J., “Bisphenol A—sources, toxicity and biotransformation. *Environmental toxicology and pharmacology*”, 37(2), 738–758(2014).
59. Rubin, B.S., “Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects”, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, 127, 27–34 (2011).
60. Huang, Y., Wong, C., Zheng, J., Bouwman, H., Barra, R., Wahlstrom, B., Neretin, L., Hong, M., “Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human impacts”, *Environ. Int*, 42, 91–99 (2012).
61. Vandenberg, L., Chahoud, I., Heindel, J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F., Schoenfelder, G., “Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A”, *Cien. Saude Colect*, 17, 407–434 (2012).
62. Mantovani A., “Risk assessment of endocrine disruptors: the role of toxicological studies”, *Ann N Y Acad Sci*, 1076:239–52 (2006).
63. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, et al., “In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action”, *Reprod Toxicol*, 24:178–98 (2007).
64. Li DK, Zhou Z, Miao M, He Y, Qing D, Wu T, et al., “Relationship between urine bisphenol-A level and declining male sexual function”, *J Androl*, 31:500–6 (2010).
65. Li DK, Zhou Z, Qing D, He Y, Wu T, Miao M, et al., “Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction”, *Hum Reprod*, 25:519–27 (2010).

66. Hanaoka T, Kawamura N, Hara K, Tsugane S., “Urinary bisphenol A and plasmahormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidylether and mixed organic solvents”, *Occup Environ Med*, 59:625–8 (2002).
67. Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezaki Y, Takai Y, Taketani Y., “Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction”, *Endocr J*, 51:165–9 (2004).
68. Yang M, Ryu JH, Jeon R, Kang D, Yoo KY., “Effects of bisphenol A on breast cancer and its risk factors”, *Arch Toxicol*, 83:281–5 (2009).
69. Philippat C, Mortamais M, Chevrier C, Petit C, Calafat AM, Ye X, et al., “Exposure to phthalates and phenols during pregnancy and offspring size at birth”, *Environ Health Perspect*, 120:464–70 (2012).
70. Aschengrau A, Coogan PF, Quinn M, Cashins LJ., “Occupational exposure to estrogenic chemicals and the occurrence of breast cancer: an exploratory analysis”, *Am J Ind Med*, 34:6–14 (1998).
71. Anway MD, Leathers C, Skinner MK., “Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease”, *Endocrinology*, 147:5515–23 (2006).
72. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, et al., “Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults”, *JAMA*, 300:1303–10 (2008).
73. Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS., “Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES2003/06”, *PLoS One*, 5:e8673 (2010).
74. Shankar A, Teppala S., “Urinary bisphenol A and hypertension in a multiethnic sample of US adults”, *J Environ Public Health*, 481641. (2012).
75. Shankar A, Teppala S, Sabanayagam C., “Bisphenol A and peripheral arterial disease: results from the NHANES”, *Environ Health Perspect*, 120:1297–300 (2012).
76. Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezaki Y, Takai Y, Taketani Y., “Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction”, *Endocr J*, 51:165–9 (2004).
77. Takeuchi T, Tsutsumi O., “Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels”, *Biochem Biophys Res Commun*, 291:76–8 (2002).
78. Dietrich JW, Landgrafe G, Fotiadou EH., “TSH and thyrotropic agonists: key factors in thyroid homeostasis”, *J Thyroid Res*, 2012:351864 (2012).

79. Clayton EM, Todd M, Dowd JB, Aiello AE., “The impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the U.S. population NHANES 2003-2006”, *Environ Health Perspect*, 119:390–6 (2011).
80. Tarantino G, Valentino R, Di Somma C, D’Esposito V, Passaretti F, Pizza G, et al., “Bisphenol A in polycystic ovary syndrome and its association with liver-spleen axis”, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 78:447–53 (2012).
81. Hong YC, Park EY, Park MS, Ko JA, Oh SY, Kim H, et al., “Community level exposure to chemicals and oxidative stress in adult population”, *Toxicol Lett*, 184:139–44 (2009).
82. Yılmaz M, Yılmaz N., “D Vitamininin beyindeki rolü ve ilişkili nörolojik hastalıklar”, *Journal of Clinical and Experimental Investigations JCEI*, 4: 411-415 (2013).
83. Houghton LA, Vieth R., “The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement”, *American Journal of Clinical Nutrition*, 84: 694-697 (2006).
84. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444353.html>
85. <http://kanser.gov.tr/Dosya/Bilgi-Dokumanlari/raporlar/VitaminDRapor.docx.pdf>
86. Boucher BJ., “Inadequate vitamin D status: does it contribute to the disorders comprising syndrome X”, *Br J Nutr*, 79: 315-327 (1998).
87. Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, et al., “Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case control study”, *Lancet*, 355: 618-621 (2000).
88. Pehlivan İ, Hatun Ş, Aydoğan M, Babaoğlu K, Türker G, Gökalp AS., “Maternal serum vitamin D levels in the third trimester of pregnancy”, *Turk J Med Sci*, 322: 237-241 (2002).
89. Dent CE, Harris H., “Hereditary forms of rickets and osteomalacia”, *Journal of Bone & Joint Surgery, British*, 38: 204-226 (1956).
90. Blank S, Scanlon KS, Sinks TH, Lett S, Falk H., “An outbreak of hypervitaminosis D associated with the overfortification of milk from a home-delivery dairy”, *Am J Public Health*, 85: 656-659 (1995).
91. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R., “Estimates of optimal vitamin D status”, *Osteoporosis International*, 16: 713-716 (2005).
92. Özbey İ, Ziypak T, Adanur Ş., “Vitamin D ve üreme sistemi”, *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci*, 8: 134-7 (2012).

93. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al., “Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice”, *Endocr. Rev.*, 29: 726 – 776 (2008).
94. Blomberg Jensen M, Nielsen JE, Jorgensen A, et al., “Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract”, *Hum Reprod.*, 25: 1303–1311 (2010).
95. Merke J, Kreusser W, Bier B, Ritz E., “Demonstration and characterisation of a testicular receptor for 1,25-dihydroxycholecalciferol in the rat”, *Eur. J. Biochem.*, 130: 303–308 (1983).
96. Aquila S., “Human sperm anatomy: ultrastructural localization of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D receptor and its possible role in the human male gamete”, *J. Anat.*, 213: 555–564 (2008).
97. Huhtaniemi I, Toppari J., “Endocrine paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis”, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 377: 33–54 (1995).
98. Costa RR, Reis RI, Aguiar JF, Varanda WA., “Luteinizing hormone (LH) acts through PKA and PKC to modulate T-type calcium currents and intracellular calcium transients in mice Leydig cells”, *Cell Calcium*, 49: 191–199 (2011).
99. Blomberg JM., “Characterization of the testicular, epididymal and endocrine phenotypes in the Leuven Vdr-deficient mouse model: targeting estrogen signalling”, *Mol. Cell Endocrinol.*, 377: 93–102 (2013).
100. Ma, M.; Long, Q.; Chen, F.; Zhang, T.; Wang, W., “Active vitamin D impedes the progression of non-alcoholic fatty liver disease by inhibiting cell senescence in a rat model”, *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, 44, 513–523 (2020).
101. Zhu, C.G.; Liu, Y.X.; Wang, H.; Wang, B.P.; Qu, H.Q.; Wang, B.L.; Zhu, M., “Active form of vitamin D ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by alleviating oxidative stress in a high-fat diet rat model”, *Endocr J.*, 64, 663–673 (2017).
102. Roth, C.L.; Elfers, C.T.; Figlewicz, D.P.; Melhorn, S.J.; Morton, G.J.; Hoofnagle, A.; Yeh, M.M.; Nelson, J.E.; Kowdley, V.K., “Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation”, *Hepatology*, 55, 1103–1111 (2012).
103. Wu, T.; Liu, Y.H.; Fu, Y.C.; Liu, X.M.; Zhou, X.H., “Direct evidence of sirtuin downregulation in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients”, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 44, 410–418 (2014).
104. Zhang, H.; Shen, Z.; Lin, Y.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Liu, P.; Zeng, H.; Yu, M.; Chen, X.; Ning, L.; et al., “Vitamin D receptor targets hepatocyte nuclear factor 4 α and mediates protective effects of vitamin D in nonalcoholic fatty liver disease”, *J. Biol. Chem.*, 295, 3891–3905 (2020).

105. Barchetta, I.; Carotti, S.; Labbadia, G.; Vespasiani-Gentilucci, U.; Muda, A.O.; Angelico, F.; Silecchia, G.; Leonetti, F.; Fraioli, A.; Picardi, A.; et al., “Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: Relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus”, *Hepatology*, 56, 2180–2187 (2012).
106. Dong, B.; Zhou, Y.; Wang, W.; Scott, J.; Kim, K.H.; Sun, Z.; Guo, Q.; Lu, Y.; Gonzales, N.M.; Wu, H.; et al., “Vitamin D Receptor Activation in Liver Macrophages Ameliorates Hepatic Inflammation, Steatosis, and Insulin Resistance in Mice”, *Hepatology*, 71, 1559–1574 (2020).
107. Öztürk, F., “Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi”, 9(2), 143-148 (2002).
108. D'arcy, M., “Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy”, *Cell Biology International*, 43, 582-592 (2019).
109. Celepli, S., Bigat, İ. ve Celepli, P., “Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi”, *Güncel Gastroenteroloji*, 24(3), 103-111(2020).
110. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R., “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics”, *Br J Cancer*, 26(4), 239-257 (1972).
111. Adamkov, M., “Logical complexity of Bcl-2 family proteins function in the intrinsic apoptosis”, *Department of Histology and Embryology*, 147(1-2), 98-104 (2019).
112. Elmore, S., “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death”, *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516 (2007).
113. Fink, S.L. ve Cookson, B.T., “Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells”, *Infection and Immunity*, 73, 1907-1916 (2005).
114. Grilo, A.L. ve Mantalaris, A., “Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective”, *Biotechnology advances*, 37, 459-75 (2019).
115. Singh, R., Letai, A. ve Sarosiek, K., “ Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins”, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20, 175-93(2019).
116. Choo, Z., Loh, A.H.P. ve Chen, Z.X., “ Destined to die: Apoptosis and pediatric cancers”, *Cancers*, 11(11), 1623 (2019).
117. Pfeffer, C.M. ve Singh, A.T., “Apoptosis: a target for anticancer therapy”, *Int J Mol Sci*, 19(2), 448 (2018).

118. Boice, A. ve Bouchier-Hayes, L., “ Targeting apoptotic caspases in cancer”, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1867(6), 118688 (2020).
119. Voskoboinik, I., Whisstock, J.C. ve Trapani, J.A., “ Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology”, *Nat Rev Immunol*, 15, 388- 400 (2015).
120. Graham, R.K., Ehrnhoefer, D.E. ve Hayden, M.R., “ Caspase-6 and neurodegeneration”, *Trends Neurosci*, 34, 646-56 (2011).
121. Peña-Blanco, A. ve García-Sáez, A.J., “ Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis”, *FEBS J*, 285, 416-431(2018).
122. Barman, J., Kumar, R., Saha, G.vd., “ Apoptosis: mediator molecules, interplay with other cell death processes and therapeutic potentials”, *Curr Pharm Biotechnol*, 19, 644-663 (2018).
123. Kim-Campbell, N., Gomez, H. ve Bayir, H., “ Cell death pathways: Apoptosis and regulated necrosis”, *Critical Care Nephrology*, 113-121, e112 (2019).
124. Adrain, C., Murphy, B.M. ve Martin, S.J., “ Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B”, *J Biol Chem*, 280, 4663-4673 (2005).
125. Kano, M., Takemura, G., Misao, J. vd., “ Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy not apoptosis but DNA repair”, *Circulation*, 99, 2757-2764 (1999).
126. Watanabe, I., Toyoda, M., Okuda, J. vd., “ Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different in situ methods; antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) methods”, *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 188-193. (1999).
127. Vairetti, M., Ferrigno, A., Bertone, R. vd., “ Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740, 367-374. (2005).
128. Güleş, Ö. ve Eren, Ü., “ Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler”, *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 73-78 (2008).
129. Erdem, E., “ Etanolün Sıçan Testis Dokusunda Meydana Getirdiği Apoptotik Değişiklikler Üzerine Elettaria Cardamomum 'Un Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi”, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Elazığ (2013).

130. Kopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A. vd., “Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis”, *Blood.*, 84, 1415–1420 (1994).
131. Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A. vd., “Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flipflop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase”, *J. Biol. Chem.*, 272, 26159–26165 (1997).
132. Gatti, R., Belletti, S., Orlandini, G. vd., “Comparison of Annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy”, *J. Histochem. Cytochem.*, 46, 895–900 (1998).
133. Gavrieli, Y., Sherman, Y. ve Ben-Sasson, S.A., “Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation”, *J. Cell Biol.*, 119, 493-501 (1992).
134. Kressel, M. ve Groscurth, P., “Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA”, *Cell Tissue Res.*, 278, 549–56 (1994).
135. Caulin, C., Salvesen, G.S. ve Oshima, R.G., “Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis”, *The Journal of Cell Biology*, 138(6), 1379-1394 (1997).
136. Leers, M.P., Kolgen, W., Bjorklund, V. vd., “Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis”, *J. Pathol.*, 187, 567–572 (1999).
137. Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H. ve Vermes, I., “Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays”, *Apoptosis*, 3: 115 (1998).
138. Carson, D.A. ve Rbiero, J.M., “Apoptosis and disease”, *The Lancet*, 341: 1251-1254 (1993).
139. Bortner, C.D., Oldenburg, N.B. ve Cidlowski, J.A., “The role of DNA fragmentation in apoptosis”, *Trends Cell Biol.*, 5, 21–6 (1995).
140. Sereno, D., Holzmuller, P., Mangot, I. vd., “Antimonial-mediated dna fragmentation in leishmania infantum amastigotes”, *Antimicrob Agents Chemother*, 45(7), 2064–2069 (2001).
141. Salgame, P., Varadhachary, A.S., Primiano, L.L. vd., “An ELISA for detection of apoptosis”, *Nucleic Acids Research*, 25(3), 680–681 (1997).
142. Emerit, J., Edeas, M., and Bricaire, F., “Neurodegenerative diseases and oxidative stress”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58 (1): 39-46 (2004).

143. Cadenas, E., and Davies, K. J., "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging", *Free Radical Biology and Medicine*, 29 (3-4): 222-230 (2000).
144. Zheng, M., and Storz, G., "Redox sensing by prokaryotic transcription factors", *Biochemical Pharmacology*, 59 (1): 1-6 (2000).
145. Halliwell, B., "Biochemistry of oxidative stress", *Biochemical Society Transactions*, 35 (5): 1147-1150 (2007).
146. Gupta, V. K., and Sharma, S. K., "Plants as natural antioxidants", *Indian Journal of Natural Product Radiance*, 5 (4):326-334 (2006).
147. Jose, N., and Janardhanan, K. K., "Antioxidant and antitumour activity of *Pleurotus florida*", *Current Science*, 79 (7): 941-943 (2000).
148. D. E. Moore, "Drug-induced cutaneous photosensitivity: incidence, mechanism, prevention and management," *Drug Safety*, vol. 25, no. 5, pp. 345–372, 2002.
149. Marrocco, I., Altieri, F., and Peluso, I., "Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-33 (2017).
150. Fujii, J., Iuchi, Y., and Okada, F., "Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3 (1): 1-10. (2005).
151. Droge, W., "Free radicals in the physiological control of cell function", *Physiological Reviews*, 82 (1): 47-95 (2002).
152. Ruder, E. H., Hartman, T. J., & Goldman, M. B., "Impact of oxidative stress on female fertility", *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 21 (3): 219 (2009).
153. Perkins, A. V., "Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia", *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 46 (2): 77-83 (2006).
154. Matés, J. M., and Sánchez-Jiménez, F., "Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes", *Frontiers Bioscience*, 4 (4): 339-345 (1999).
155. Usui, S., Komeima, K., Lee, S. Y., Jo, Y. J., Ueno, S., Rogers, B. S. and Campochiaro, P. A., "Increased expression of catalase and superoxide dismutase 2 reduces cone cell death in retinitis pigmentosa", *Molecular Therapy*, 17 (5): 778-786 (2009).
156. Mello, L. D., and Kubota, L. T., "Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation", *Talanta*, 72 (2): 335-348 (2007).

157. Sharma, R. K., and Agarwal, “A. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases”, *Reproductive Medicine and Biology*, 3 (4): 177-199 (2004).
158. Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., and Mazur, M., “Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer”, *Chemico-Biological Interactions*, 160 (1): 1-40 (2006).
159. Tang, V. J., Konigsfeld, K. M., Aguilera, J. A., and Milligan, J. R., “DNA binding hydroxyl radical probes”, *Radiation Physics and Chemistry*, 81 (1): 46-51 (2012).
160. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (1): 44-84 (2007).
161. Comhair, S. A., and Erzurum, S. C., “Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases”, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283 (3): 246-255 (2002).
162. Barreiros, A. L., David, J. M., and David, J. P., “Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo”, *Química nova*, 29: 113-123 (2006).
163. Niki, E., “Antioxidants in relation to lipid peroxidation”, *Chemistry and Physics of Lipids*, 44 (2-4): 227-253 (1987).
164. Limón-Pacheco, J., and Gonsebatt, M. E., “The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674 (1-2): 137-147 (2009).
165. Ellerby, L. M., Cabelli, D. E., Graden, J. A., and Valentine, J. S., “Copper– zinc superoxide dismutase: why not pH-dependent?”, *Journal of The American Chemical Society*, 118 (28): 6556-6561 (1996).
166. What are endocrine disruptors Agency., U. S. E. P., “Retrieved from: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrinedisruption>”, Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K., “Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction”, *Analytical Biochemistry*, 95 (2): 351-358 (1979).
167. Ellman, G. L., “Tissue sulfhydryl groups”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82 (1): 70-77 (1959).
168. Sun, Y. I., Oberley, L. W., and Li, Y., “A simple method for clinical assay of superoxide dismutase”, *Clinical Chemistry*, 34 (3): 497-500 (1988).

169. Burnie, J. P., Coke, A., and Matthews, R. C., "Restriction endonuclease analysis of *Aspergillus fumigatus* DNA", *Journal of Clinical Pathology*, 45 (4): 324-327. (1992)
170. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275 (1951).
171. Erel, O., "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status", *Clinical Biochemistry*, 38 (12): 1103-1111 (2005).
172. Erel, O., "A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation", *Clinical Biochemistry*, 37 (4): 277-285 (2004).
173. Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J., "Free radicals and antioxidant systems in health and diseases", *J Hosp Med*, 43:334-44 (1990).
174. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA., "Detection of catalase in rat heart mitochondria", *J Biol Chem*, 266:22028–22034 (1991).
175. Haidy G. Abdel-Rahman, Heba M. A. Abdelrazek, Dalia W. Zeidan, Rasha M. Mohamed, Aaser M. Abdelazim., "Lycopene: Hepatoprotective and Antioxidant Effects toward Bisphenol A-Induced Toxicity in Female Wistar Rats", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, Article ID 5167524, 8 pages (2018).
176. Akçay NC, Ömeroğlu S, Dizakar SÖA, Kavutçu M, Türkoğlu İ, Eşmekaya MA, Peker TV., "The effects of melatonin on possible damage that will occur on adipocytokines and liver tissue by coadministration of fructose and bisphenol A (BPA)", *Environ Sci Pollut Res Int*, May;27(14):16231-16245 (2020).
177. Hassan ZK, Elobeid MA, Virk P, Omer SA, ElAmin M, Daghestani MH, AlOlayan EM., "Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model", *Oxid Med Cell Longev*, 2012:194829 (2012).
178. El-Boshy M, BaSalamah MA, Ahmad J, Idris S, Mahbub A, Abdelghany AH, Almainani RA, Almassoum H, Ghaith MM, Elzubier M, Refaat B., "Vitamin D protects against oxidative stress, inflammation and hepatorenal damage induced by acute paracetamol toxicity in rat", *Free Radic Biol Med*, 141:310-321 (2019).
179. Cakici C, Yigitbasi T, Ayla S, Karimkhani H, Bayramoglu F, Yigit P, Kilic E, Emekli N., "Dose-dependent effects of vitamin 1,25(OH)2D3 on oxidative stress and apoptosis", *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 27;29(3):271-279 (2018).
180. Lee H., "Procalcitonin as a biomarker of infectious diseases", *Korean J Intern Med*, 28:285-91 (2013).

181. Ruan H, Lodish HF., "Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor", *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14(5):447-55 (2003).
182. Shi R, Liu Z, Liu T., "The antagonistic effect of bisphenol A and nonylphenol on liver and kidney injury in rats", *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 43(5):527-535 (2021).
183. Colakoglu, N., Kuloglu, T., Ozan, E., Kocaman, N., Dabak, D. O., & Parlak, G., "Protective effects of vitamin D3 against d-galactosamine-induced liver injury in rats", *Tissue and Cell*, 48(4), 356–360 (2016).
184. Mahdavinia M, Alizadeh S, Raesi Vanani A, Dehghani MA, Shirani M, Alipour M, Shahmohammadi HA, Rafiei Asl S., "Effects of quercetin on bisphenol A-induced mitochondrial toxicity in rat liver", *Iran J Basic Med Sci*, 22:499-505 (2019).

EK AÇIKLAMALAR

ETİK KURUL İZİNİ

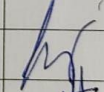
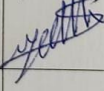
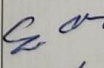
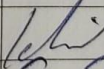
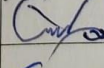
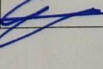
SAKİ YENİLLİ DENEY HAYVANLARI ÜRETİM VE UYGULAMA
LABORATUVARI TİC. LMT. ŞTİ.
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 17/06/2021
TOPLANTI NO : 03
DOSYA NO : 04
KARAR NO : 13

Yürütücülüğünü Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji Bölümünden Dr. Öğretim Üyesi Feyza BAŞAK ın yaptığı ve Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD dan Biyolog Abdulaziz Hasan Ahmet Mohsen SAIF ın ve Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi ABD dan Prof. Dr. Emine Ümran ÖRSÇELİK in katıldığı

Bisfenol A (BPA)'ya maruz kalan erkek ratların karaciğerinde apoptotik özelliklerin immunohisto kimyasal ve moleküler,oksidatifstetin biyokimyasal olarak belirlenmesi ve bir antioksidan olarak D3vitamininin etkisi adlı çalışmanın Saki Yenilli Deney Hayvanları Üretim Ve Uygulama Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

HAYVAN TÜRÜ : Wistar Albino Rat
HAYVAN SAYISI : 50 Adet
GEÇERLİLİK SÜRESİ : 17/06/2021 – 17/06/2022

ETİK KURUL ÜYELERİ			
ADI SOYADI	ÜNVANI	GÖREVI	İMZASI
MUSTAFA GÜRGEN	VET.HEKİM	ETİK KURUL BAŞKANI	
SAKİ YENİLLİ	PROTEZ-ORTEZ TEKNİKERİ	BAŞKAN VEK.	
HÜSEYİN HAYRİ KERTMEN	BEYİN CERRAHI	İN VİVO ÇALIŞACAK ÜYE	
ERCAN ŞAHİN	BIYOLOG	SİVİL TOPLUM KURULUŞUNA KAYITLI ÜYE	
SELİM KOCA	TEKNİKER	SEKRETER	
EMRAH SATILMIŞ	EDİTÖR	SİVİL ÜYE	
BORA GÜRER	BEYİN CERRAHI	İN VİVO ÇALIŞACAK ÜYE	

ÖZGEÇMİŞ

Abdulaziz Hasan Ahmed Mohsen SAIF, ilk ve orta öğrenimini aynı ülkede tamamladı. Al Hudaydah Abu Musa al-Ash'ari Lisesi'nden mezun oldu. 2018 yılında Aksaray Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2020 yılında Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans programına başladı. Evli ve bir erkek çocuk babasıdır.