



**T.C
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİSFENOL A'YA MARUZ KALAN ERKEK RAT İLEUMUNDA
APOPİTOTİK ÖZELLİKLERİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL
OLARAK BELİRLENMESİ VE BİR ANTİOKSİDAN OLARAK
D3 VİTAMİNİNİN ETKİSİ**

DYT. TUĞBA NUR DENİZ

VETERİNER ANATOMİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine Ümran ÖRSÇELİK**

KIRIKKALE-2022



**T.C
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİSFENOL A'YA MARUZ KALAN ERKEK RAT İLEUMUNDA
APOPTOTİK ÖZELLİKLERİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL
OLARAK BELİRLENMESİ VE BİR ANTIOKSİDAN OLARAK
D3 VİTAMİNİNİN ETKİSİ**

DYT. TUĞBA NUR DENİZ

VETERİNER ANATOMİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine Ümran ÖRSÇELİK**

KIRIKKALE-2022

Tuğba Nur DENİZ tarafından hazırlanan “BİSFENOL A’YA MARUZ KALAN ERKEK RAT İLEUMUNDA APOPİTOTİK ÖZELLİKLERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ VE BİR ANTIOKSİDAN OLARAK D3 VİTAMİNİNİN ETKİSİ” adlı tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: PROF. DR. EMİNE ÜMRAN ÖRSÇELİK

Anatomi Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

İmza.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

İkinci Danışman : DR. ÖĞR. Ü. FEYZA BAŞAK

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Karabük Üniversitesi

İmza.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Başkan : PROF. DR. EMİNE ÜMRAN ÖRSÇELİK

Anatomi Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

İmza.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye : PROF. DR. DİNÇER YILDIZ

Anatomi Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

İmza.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye : PROF. DR. SEVİNÇ ATEŞ

Anatomi Anabilim Dalı, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi

İmza.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

PROF. DR. MEHMET AKİF KARSLI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tuğba Nur DENİZ

22.09.2022

ÖZET

Bisfenol A (BPA; 4,4'-dihidroksi-2,2-difenilpropan; CAS 80-05-7) dünya çapında üretilen en yüksek hacimli kimyasallardan biridir. Tüketim malları ve emtialarında yaygın kullanımı nedeniyle BPA, çevremizde hemen her yerde ve insanlarda pek çok dokuda bulunur. İn vitro deneylerde ve laboratuvar hayvan çalışmalarında serum, idrar, plasenta, göbek kordonu kanı ve anne sütünde BPA'nın yaygın olarak bulunduğu ve BPA'nın üreme ve gelişme, sinir, kardiyovasküler, metabolik ve bağışıklık sistemleri üzerindeki olumsuz etkileri bildirilmiştir.

D vitamini organizmanın normal işlevlerini yürütmesi için ve sağlık için önemlidir. D vitamininin organizmadaki etkinliği, bağırsak bariyerinin bütünlüğü ve bağışıklık seviyesi ile de ilgilidir. Her ne kadar D vitamini pek çok kaynaktan elde edilebilse de yalnızca birkaç besin maddesinde organizmanın ihtiyacını karşılayacak D₂ vitamini (ergokalsiferol) ve D₃ vitamini (kolekalsiferol) yeterli miktarda bulunur. D vitamininin yeterli alınmaması bağırsakta geçirgenliği arttırdığı için dolaylı olarak immun cevaplar oluşmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda yetersiz vitamin D alınması bağırsağın mikrobiyal kompozisyonunu değiştirdiği için otoimmün yanıtlara da yol açmaktadır.

Bu çalışmada ergin Wistar albino erkek ratlardan 50 tane deney ve kontrol grubu olmak üzere rastgele seçilmiştir. Grup 1: kontrol grubu, grup 2: vehicle (zeytinyağı) grubu, grup 3: BPA grubu, grup 4: D₃ vitamini grubu, grup 5: BPA + D₃ vitamini grubu olmak üzere 5 grup oluşturulmuştur. BPA uygulanan gruplarda deneklere 30 gün boyunca gavaj yoluyla intragastrik olarak 25mg/kg/ BPA uygulaması yapılmıştır. 30 günün sonunda denekler ketamin xylazine ile anestezi edilmiştir. Deneklerden kan ve ileum doku örnekleri gerekli prosedürlere uygun olarak alınmıştır. Alınan kan örneklerinde kan yağlarına bakılmıştır. İleum doku örneklerinde ise oksidatif stres belirteçlerine bakılmıştır.

Histopatolojik bulgular sonucunda BPA uygulanan grupta villus derinliğinin azaldığı ve doku bütünlüğünün bozulduğu gözlenmiştir. D vitamini ve BPA'nın birlikte uygulandığı grupta villus derinliğinin kontrol, zeytinyağı ve D₃ vitamini uygulanan gruplara yakın uzunlukta olduğu ve Peyer plaklarının yapısının daha iyi korunduğu belirlenmiştir. İmmunohistokimyasal bulgular sonucunda BPA uygulanan grubun Peyer plaklarında yoğunlaşan tutulumun tüm lenfoid dokuya yayıldığı ve villuslarda da tutulumun olduğu gözlenmiştir. BPA ve D₃ vitaminin beraber uygulandığı grupta ise villus tutulumu bulunmakla beraber Peyer plaklarındaki tutulumun miktarının önemli derecede azaldığı gözlenmiştir. Biyokimyasal bulgular sonucunda BPA'nın kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak (p<0.01) inflamasyonu artırıcı etkisinin olduğu, BPA ile birlikte verilen D₃ vitaminin (BPA+D₃) inflamasyonun baskılanmasında ciddi bir (p<0.01) etkisinin olduğu gözlenmiştir.

BPA'nın ileum da bulunan Peyer plakları ve villuslarda apoptoza yol açtığı ve D₃ vitamininin bu hasarı önlemede etkili olduğu histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, Bisfenol-A, D vitamini, İleum, Rat

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA; 4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane; CAS 80-05-7) is one of the highest volume chemicals produced worldwide. Due to its widespread use in consumer goods and commodities, BPA is found almost everywhere in our environment and in many tissues in humans. In vitro experiments and laboratory animal studies show BPA is commonly found in serum, urine, placenta, umbilical cord blood and breast milk and adverse effects of BPA on reproduction and development, nervous, cardiovascular, metabolic and immune systems have been reported.

Vitamin D is important for the normal functions of the organism and for health. The effectiveness of vitamin D in the organism is partially related to the integrity of the intestinal barrier and the level of immunity. Although vitamin D can be obtained from many sources, only a few nutrients contain sufficient amounts of vitamin D₂ (ergocalciferol) and vitamin D₃ (cholecalciferol) to meet the organism's needs to a significant extent. Inadequate intake of vitamin D increases intestinal permeability and indirectly causes immune responses. In addition, insufficient vitamin D intake also leads to autoimmune responses as it changes the microbial composition of the gut.

In this study, 50 adult Wistar albino male rats were randomly selected as experimental and control groups. 5 groups were formed as group 1: control group, group 2: vehicle (olive oil) group, group 3: BPA group, group 4: vitamin D₃ group, group 5: BPA + vitamin D₃ group. 25mg/kg/BPA was administered intragastrically via gavage for 30 days. After 30 days, subjects were anesthetized with ketamine and xylazine combination. Blood and ileum tissue samples were taken from the subjects. Blood lipids in the blood samples, and oxidative stress markers were examined in ileum tissue samples taken.

The result of the histopathological examinations showed that the villus depth decreased and the tissue integrity was impaired in the BPA applied group. In the group in which vitamin D₃ and BPA were applied together, it was determined that the depth of villus was closer to the groups in which control, olive oil and vitamin D₃ were applied, and the structure of Peyer's patches was better preserved. As a result of the immunohistochemical findings, it was observed that the involvement concentrated in the Peyer's patches of the BPA-administered group spread to the entire lymphoid tissue and there was also involvement in the villi. In the group in which BPA and vitamin D₃ were administered together, there was villus involvement, but it was observed that the amount of involvement in Peyer's patches was significantly reduced. As a result of the biochemical findings, it was observed that BPA had a significant ($p < 0.01$) inflammation-increasing effect compared to the control group, and vitamin D₃ (BPA+D₃) given together with BPA had a serious ($p < 0.01$) effect on the suppression of inflammation.

It has been histopathologically, immunohistochemically and biochemically observed that BPA causes apoptosis in Peyer's patches and villi in the ileum, and that vitamin D₃ is effective in preventing this damage.

Keywords: Apoptosis, Bisphenol-A, Vitamin D, Ileum, Rat

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tez konumun seçimi, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Emine Ümran ÖRSÇELİK' e, araştırma sırasında, tezimin yürütülmesinde ve değerlendirme aşamasında ilgi, öneri ve yardımlarımdan ötürü ikinci danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Feyza BAŞAK'a, eğitim sürecinde desteğini ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Dinçer YILDIZ'a çok teşekkür ederim.

Bütün eğitim hayatım boyunca sabırla destek veren annem Adile ŞAHİN'e, kardeşlerim Beyza Nur DENİZ ve Mustafa Talha DANA'ya yardım ve destekleri için çok teşekkür ederim.

Tuğba Nur DENİZ
Kırıkkale, Ekim 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
SEMBOLLER.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. İleum	2
1.1.1. İleum Embriyolojisi.....	2
1.1.2. İleum Histolojisi.....	3
1.1.3. İleum Fizyolojisi	4
1.2. Bisfenol A (BPA).....	4
1.2.1. BPA Maruziyeti	5
1.2.2. BPA Maruziyeti İle İlgili Sağlık Riskleri	7
1.2.3. BPA ve Bağırsak	9
1.3. Apoptoz.....	11
1.3.1. Apoptoz Yolakları.....	12
1.3.1.1. İntrensik Apoptoz.....	13
1.3.1.2. Ekstrinsik Apoptoz	14
1.3.1.3. Kaspazlar	15
1.3.1.4. Granzim.....	16
1.3.2. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	17
1.3.2.1. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Morfolojik Yöntemler	17
1.3.2.2. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan İmmunohistokimyasal Yöntemler	19

1.3.2.3. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Biyokimyasal Yöntemler	21
1.3.2.4. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan İmmunolojik Yöntemler	22
1.3.2.5. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Biyoloji Yöntemleri.....	23
1.4. Oksidatif Stres	23
1.5. D Vitamini.....	26
1.5.1. D Vitamini Diyet Kaynakları.....	26
1.5.2. D Vitamini Sentezi, Metabolizması ve İşlevi	27
1.5.3. D Vitamini ve Bağırsak	29
1.5.4. D Vitamini ve BPA	31
2. GEREÇ ve YÖNTEMLER	33
2.1. Gereçler	33
2.1.1. Kimyasal Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler.....	33
2.2. Yöntemler.....	34
2.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	34
2.2.2. Ratlardan Numune Alınması.....	34
2.2.3. Numunelerin Hazırlanması	36
2.2.4. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analizi.....	36
2.2.4.1. Doku Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Ölçümü	36
2.2.4.2. Doku Redükte-Glutatyon (GSH) Seviyesinin Ölçümü.....	36
2.2.4.3. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Ölçümü	37
2.2.4.4. Doku Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü	37
2.2.4.5. Doku Total Oksidan Seviyesinin (TOS) Ölçümü.....	37
2.2.4.6. Doku Total Antioksidan Seviyesinin (TAS) Ölçümü.....	37
2.2.4.7. Doku Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Ölçümü	38
2.2.4.8. Doku TNF- α Seviyesinin Ölçümü.....	38
2.2.4.9. Doku IL-6 Seviyesinin Ölçümü	38
2.2.4.10. Serum Biyokimyasal Ölçümler (Kan yağları)	38
3. BULGULAR.....	39
3.1. Histopatolojik Bulgular	39
3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	40

3.3. Biyokimyasal Bulgular.....	41
3.3.1. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Düzeyleri	45
3.3.1.1. İleum Dokusu MDA ve GSH Düzeyleri.....	46
3.3.1.2. İleum Dokusu SOD ve CAT Aktivite Düzeyleri	47
3.3.1.3. İleum Dokusu TAS, TOS ve OSI Düzeyleri.....	48
3.3.2. İnflamasyon Belirteçlerinin Düzeyi	48
3.3.2.1. İleum Dokusu TNF- α ve IL-6 Düzeyleri.....	48
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ	69



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Embriyonal bağırsak bölümlerinden oluşan yapılar	2
3.1. Serum biyokimya sonuçları	42
3.2. Serum biyokimya Anova test sonuçları.	43
3.3. Varyansların homojenlik testleri (Serum biyokimya).....	43
3.4. Güven Aralıkları (Serum biyokimya)	45
3.5. İleum biyokimya sonuçları (1).	45
3.6. İleum biyokimya sonuçları (2).	47
3.7. İleum biyokimya Anova test sonuçları	49
3.8. Varyansların homojenlik testleri (İleum biyokimya).....	50
3.9. Güven Aralıkları (İleum biyokimya) (1).....	51
3.10. Güven Aralıkları (İleum biyokimya) (2).....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bağırsağın enine kesiti.....	3
1.2. Bisfenol A'nın (BPA) kimyasal yapısı	5
1.3. BPA maruziyet sebepleri ve etkilediği sistemler	8
1.4. Diyetle BPA alımının kolon bariyerine etkisi.....	10
1.5. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar	13
1.6. İntrinsik apoptotik yolak. BCL-2 ailesi proteinleri etki mekanizması	13
1.7. Ekstrinsik apoptoz yolağında TNF- α ve TNFR-1 reseptör.....	14
1.8. Ekstrinsik apoptoz yolağında Fas/FasL.....	14
1.9. Apoptoz özet	16
1.10. Apoptotik hücreler (oklar) (HxE boyama).....	18
1.11. Hoechst boyama (N, Normal hücreler, A, Apoptotik hücreler)	19
1.12. Karaciğer dokusunda apoptotik hücreler (X).....	20
1.13. D vitamini metabolizması ve fonksiyonunun özet diyagramı (Laird vd., 2010) 'dan uyarlanmıştır.....	29
1.14. Genetik, bağırsak bütünlüğü, mikrobiyom ve D vitamini eksikliği arasındaki etkileşimlerin modeli (Yamamoto ve Jorgensen 2019a) 'dan uyarlanmıştır.....	31
2.1. Karın boşluğunun açılması	35
2.2. Aorta abdominalis'in bulunması.....	35
2.3. İleumun'un bulunması ve alınması	35
3.1. İleumdan alınan kesitlere uygulanan Masson's trichrome boyama sonuçları (Büyütme: 4X)	40
3.2. İleumdan alınan kesitlere uygulanan TUNEL kiti boyama sonuçları	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	: Mikrogram
APAF1	: Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1
APO-2	: Apoptozun TNF ile ilişkili indükleyicisi
APO-3	: Apoptozun TNF ile ilişkili zayıf indükleyicisi
ATP	: Adenozin trifosfat
BAK	: BCL-2 antagositi öldürücü 1 (BCL-2 antagonist killer 1)
BAX	: BCL-2 ilişkili X proteini (BCL-2 associated X apoptosis regulator)
BCL-2	: β-hücreli lenfoma 2 (β-cell lymphoma-2)
BH3	: Etkileşim alanı ölüm agonisti (Interacting-domain death agonist)
BID	: BH3 etkileşim alan ölüm agonisti
BPA	: Bisfenol A
BPS	: Bisfenol-S
C	: Celsius
Ca	: Kalsiyum
CAS	: Chemical Abstracts Servise
CAT	: Katalaz
CK18	: Sitokeratin 18
CYP27B1	: 1α-hidroksilaz
CYP2R1	: 25-hidroksilaz
DAPI	: 4,6-diamidine-2'-phenylindole
DBP	: Vitamini bağlayıcı protein
DD	: Ölüm bölgesi
DED	: Ölüm efektör alanı
DISC	: Ölüme neden olan sinyal kompleksi
dl	: Desilitre
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DTNB	: 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asit
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
ER	: Endokrin reseptörü
ETZ	: Elektron taşıma zinciri
FADD	: Ölüm etki alanına sahip Fas ile ilişkili protein
Fas	: Yağ asidi sentazı
Fas-L	: Yağ asidi sentaz ligandı (Fatty acid synthetase Ligand)
FasR	: Yağ asidi sentaz reseptörü
FGF-23	: Fibroblast büyüme faktörü
FITC	: Floresein izotiyosiyanat (Fluorescein isothiocyanate)
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon (Follicle-stimulating hormone)
GALT	: Gut İlişkili Lenfoid Doku (Gut-Associated Lymphoid Tissue)
GIS	: Gastrointestinal Sistem
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
GSH	: Glutasyon
GSH- Px	: Glutasyon peroksidaz
HE	: Hematoksilin-eozin
IBD	: İnflamatuar bağırsak hastalığı

IL-17	: İnterlökin 17
IL-6	: İnterlökin-6
JAM-A	: Birleşme adezyon molekülü
JNK	: c-JUN N-terminal kinaz
kb	: Kilobaz
kg	: Kilogram
LH	: Luteinleştirici Hormon
MAPK	: Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MDA	: Molondialdehit
mg	: Miligram
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
nµ	: Nanomikron
Na	: Sodyum
NADH	: Adenin dinükleotidi
NK	: Natural killer (Doğal öldürücü)
nm	: Nanometre
NOAEL	: Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz (No Observed Adverse Effect Level)
OSİ	: Doku oksidatif stres indeksi
p53	: Tümör protein 53
PCOS	: Polikistik over sendromu
pH	: Potansiyel Hidrojen (Power of Hydrogen)
POS	: Point of sale – satış terminali
PS	: Fosfatidilserin
PTH	: Paratiroid hormonu
RANK	: Nükleer Faktör Reseptör Aktivatörü
RANKL	: Nükleer Faktör κ B Ligandı için Reseptör Aktivatörü
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
RXR	: Retinoik asit x reseptörü
SOD	: Superoksit dismutaz
TAS	: Toplam antioksidan durumu
tBID	: Membran hedefli ölüm ligandı
TDI	: Tolere edilebilir günlük alım
TdT	: Terminal deoksinükleotidil transferaz
Th17	: T yardımcı hücresi 17
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNFR-1	: Tümör nekroz faktör reseptörü-1
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
TOS	: Toplam oksidan durumu
TRADD	: Tümör nekroz faktör reseptörü ile ilişkili death domain
TRAF-2	: Tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 2
TRAIL	: Tümör nekroz faktör ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
TRPV6	: Transient reseptör potansiyel vanilloid kanalı
TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP uç işaretleme yöntemi
UV	: Ultra viyole
VDR	: D vitamini reseptörü
VDRE	: D vitaminine duyarlı element

SEMBOLLER

α	: alfa
β	: beta
γ	: gama
δ	: delta
μ	: mikron
$^{\circ}$: derece
%	: yüzde



1. GİRİŞ

Gastrointestinal sistem (GİS), anatomik ve işlevsel olarak farklı bölgelerden oluşur. Bunlar ağız boşluğu, yutak (aynı zamanda solunum yolunun bir parçasıdır), yemek borusu, mide, ince bağırsak (duodenum, jejunum ve ileum) ve kalın bağırsak (çekum, kolon ve rektum) olarak sıralanır. Dişler, dil, tükürük bezleri, karaciğer, safra kesesi ve pankreas ile birlikte sindirim sisteminin işlevi, besin bileşenlerini küçük moleküllere parçalamak ve daha sonra vücuda kan ile dağıtımını için bunları absorbe etmektir (Wilson, 2008).

İnce bağırsak, sindirim ve emilim işlevi görürken, patojenlere ve toksik maddelere karşı koruma sağlamaktadır (Feng, Chen, Zhang vd., 2019). İnce bağırsakların jejunum ve ileum bölümleri karın boşluğunun ventral kısmında az çok sabit bir konumda yer almaktadır. Bağırsak, damarları ve sinirleri de içinde barındıran mesenterium tarafından taşınır. Jejunum ile ileum arasındaki sınır net değildir (Özer, 2007).

Bağırsak, oksidatif strese bağırsak mukozasında tahribata neden olabilen toksik maddeler de dahil olmak üzere çeşitli lümen streslerine maruz kalabilmektedir (Taniguchi, Wu, Grivennikov vd., 2015). Hücre içinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesi, bağırsak epitel hücre yenilenme bozukluğu, bariyer bozuklukları ve gastrointestinal kanser, inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), enterokolit ve bağırsak dengesinde bozukluklar gibi çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır (Rezaie, Parker ve Abdollahi, 2007; Bhattacharyya, Chattopadhyay, Mitra vd., 2014). Bu nedenle, bağırsak sağlığını korumada bağırsak epitel bütünlüğünü ve hücrel redoks homeostazını korumak önemlidir (Okumura ve Takeda, 2017).

Bağırsak epitel bütünlüğü, bağırsak fonksiyonunu tam gerçekleştirmek için bağırsak boşluğu ile vücudun iç kısmı arasında temel bir bariyer görevi görmektedir (Odenwald ve Turner, 2017). Bağırsak epiteli, vücuda giren eksojen toksik maddelere karşı sınır çizgisidir (Qu, Zhao, Chen vd., 2018). Bisfenol-A'nın (BPA) bağırsak epitel hücrelerinde işlev bozukluğuna neden olduğu bilinmesine rağmen

(Zhao, Qu, Wang vd., 2019), bu işlev bozukluğunun ne şekilde gerçekleştiğine dair mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır (Jiao, Xu, Qiu vd., 2020).

1.1. İleum

İnce bağırsağın en kısa parçası ileum'dur. Son bölümü kısmen cecum'un içine girmiştir. Cecum'a açılan deliğini çevreleyen sirküler kas tabakası mevcuttur. İleum'un cecum'a açıldığı deliğin (ostium ileocecale) dış yanında ostium cecocolicum (cecum ile colon arasında) bulunur. Bağırsak boşluğuna doğru sarkık bu iki delik, uzunlamasına geniş yapraklarla birbirinden ayrılmıştır (Dursun, 2001).

1.1.1. İleum Embriyolojisi

Fötal hayatta vücudun kıvrımlanması ile birlikte şiplahnik mezoderm tarafından sarılı ve endodermle döşeli olan boşluk, bağırsağı oluşturmak üzere embriyonun ventraline yerleşir. Bu tubuler yapı ön bağırsak, son bağırsak ve vitellus sapı ile vitellus kesesine bağlanan ve vitellus kesesiyle ilişkisini geçici olarak sürdüren orta bağırsaktan oluşur (Ünal, 2007).

Sindirim kanalının oluşmaya başlaması, diskus embriyonalisin kranial, kaudal ve lateral kısımlarının şekillenmesi ve primitif vitellüs kesesinin dorsal kısmının embriyoya dahil olması ile başlar (McGeady ve Quinn, 2011). Endoderm tabakasından oluşan vitellüs kesesi ve allantois embriyonun dışında kalır. Ön bağırsak embriyonun ön kısmından, son bağırsak embriyonun arka kısmından şekillenir. Orta kısmından şekillenen orta bağırsağın vitellüs kesesi ile bağlantısı ise vitellin kanal veya vitellüs kesesi sapı ile sağlanır (Ünal, 2007).

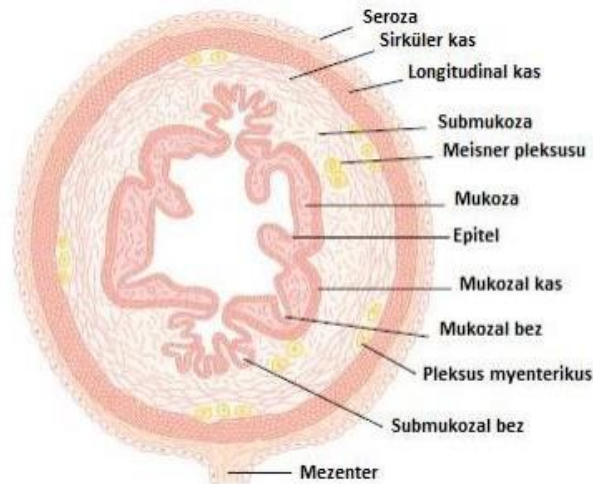
Tablo 1.1. Embriyonal bağırsak bölümlerinden oluşan yapılar (Özer, 2007).

BÖLGE	YAPILAR	OLUŞANLAR
Ön Bağırsak	Özofagus Mide Kranial Duodenum Pankreas	Karaciğer
Orta Bağırsak	Kaudal Duodenum Jejunum İleum Sekum Kolon	
Son Bağırsak	Kolon Kloaka İdrar Kesesi Allontoik Sap	Rektum Urahus

1.1.2. İleum Histolojisi

Sindirim kanalı histolojik olarak 3 katmandan oluşur; en içteki *tunika mukoza* katmanı, endoderm kökenli epitel ve mezoderm kökenli bağ dokudan oluşur. Epitel organın paranzimini oluşturur. Orta tabaka *tunika muskularis*'tir ve şiplahnik mezodermden köken almaktadır (Ünal, 2007). *Tunika muskularis* dışta dairesel, içte uzunlamasına seyreden iki kat düz kas ile karakterizedir. Kas liflerinin oryantasyonu peristaltik hareketi kolaylaştırır. Kas tabakası arasında sıklıkla *plexus myentericus* denilen sinir ağı bulunur (Eurell, 2003). En dıştaki tabaka, peritonun visseral yaprağından oluşan, mezodermal *tunika seroza*'dır (Ünal, 2007).

İnce bağırsağın mukozasında, lümeneye doğru uzanan ve organın genel emici yüzey alanını büyük ölçüde artıran villuslar bulunur. Villusun yüzey epiteli, çok sayıda kadeh hücresi içeren basit kolumnar epitelidir. Bağırsak mukozasında yer alan besin maddelerini absorbe eden hücreler, apikal yüzeyde geniş mikrovilluslara sahiptir. Goblet hücreleri emici hücreler arasında dağılır ve mukus üretir. Bağırsak bezleri villusun tabanından alttaki lamina propriaya uzanır. Bezlerde bulunan farklılaşmamış epitel hücreleri, her 24-48 saatte bir glandüler ve yüzey epitelini yenilemek için bölünür ve göç eder (Eurell, 2003). İnce bağırsak bölgeleri evcil türlerde kabaca anatomik olarak tanımlanmış olmasına rağmen, duodenum, ileum ve jejunum arasındaki histolojik farklılıklar net değildir.



Şekil 1.1. Bağırsağın enine kesiti (Atasever, 2015).

Bağırsak duvarının katmanlarında birbirinden farklı özellikte hücreler bulunmaktadır. Asidofilik granüler hücreler (paneth hücreleri) geniş getiren hayvanlarda ve atlarda bağırsak bezlerinin tabanındaki epitelde bulunur. Bu hücreler peptidaz ve lizozim üretirler ve fagositik özellikleri olabileceği bildirilmiştir. Enteroendokrin hücreler ayrıca bağırsak bezlerinin epitelinde de bulunur. Lamina propria'nın altında düz kaslardan oluşmuş *lamina muskularis* bulunur. *Tunica submukoza* areolar bağ dokusundan oluşmuştur. Submukoza bezleri (Brunner bezleri) köpek ve geniş getiren hayvanlarda mukus, domuz ve ata seröz ve kedide karışık serömüközdür (Eurell, 2003).

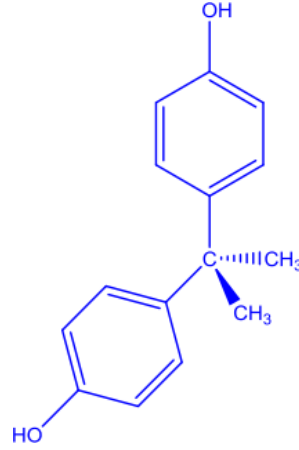
Bağırsağın uzunluğu boyunca submukozada agrege lenf nodülleri (GALT 'gut-associated lymphoid tissue') bulunur (Eurell, 2003). Lenfatik nodüllerin oluşturduğu kümeler peyer plakları olarak adlandırılır ve ince bağırsağın *lamina propria* ve submukozasında, en yoğun olarak ileum'da bulunur (Bacha, Bacha, 2006; Frappier, 2006). Nodüllerin üzerini örten epitelde lenfoid dokuya antijen sunan özelleşmiş M hücreleri bulunur (Eurell, 2003).

1.1.3. İleum Fizyolojisi

Emilebilir düzeydeki elektrolitler, su ve gıdaların sürekli olarak dolaşım sistemine (kana) aktarımı sindirim kanalı ile sağlanır. Sindirim ve sinir sistemi kontrolü ile gıdaların sindirim kanalında hareketi ve parçalanması, sindirim salgılarının salgılanması ve besinlerin sindirimi, sindirilen ürünlerin, su ve çeşitli elektrolitlerin emilimi, emilen maddelerin uzaklaştırılması için gastrointestinal organlarda kanın dolaşımı ve tüm bu işlevlerin lokal, sinirsel ve hormonal mekanizmaların işleyişleri sağlanmış olur (Guyton ve Hall, 2007).

1.2. Bisfenol A (BPA)

Bisfenol A (BPA; 4,4'-dihidroksi-2,2-difenilpropan; CAS 80-05-7) ilk olarak 1890'larda sentetik bir östrojen olarak geliştirilmiştir, ancak 1930'larda BPA'nın dişi sıçanların üreme sisteminde östrojenik etkiler yaptığı bildirilmiştir (Acconica vd., 2015). BPA küresel çapta üretilen en yüksek hacimli kimyasallardan biridir (Vandenberg vd., 2007). BPA'nın üretim hacminin 2006 yılında 3,8 milyon ton iken 2011 yılında tahmini olarak 5.5 milyon ton olduğu bilinmektedir (Geens, Goeyens, ve Covaci, 2011; Rochester, 2013).



Şekil 1.2. Bisfenol A'nın (BPA) kimyasal yapısı (Yurteri, 2018).

Tüketim malları ve emtialarında yaygın kullanımı nedeniyle BPA, çevrede hemen hemen her yerde ve insanlarda pek çok dokuda bulunur (Crain vd., 2007; Becker vd., 2009). BPA'nın yaşadığımız çevrede birçok yerde bulunduğu (ör. yüzey ve atık suları, çökeltiler ve biota) tespit edilmiştir (Belfroid, Velzen, Horst vd., 2002; Arditsoglou ve Voutsas, 2010; Navarro-Ortega ve Barcelo, 2011).

BPA, polikarbonat plastiklerin, metal kutuları kaplamak için kullanılan epoksi reçinelerin üretiminde; oyuncaklar, su boruları, içme kapları, gözlük camları, spor güvenlik ekipmanları, diş monomerleri, tıbbi ekipman ve borular ve tüketici elektroniği dahil olmak üzere birçok plastik tüketici ürünüde kullanılmaktadır (American Chemistry Council, 2021).

1.2.1. BPA Maruziyeti

Yapılan çalışmalarda insanda, serum, idrar, plasental doku, göbek kordonu kanı ve anne sütünde BPA'nın yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir ve bu maruziyetin küresel düzeyde olduğu ortaya koyulmuştur (Vandenberg vd., 2007; Rochester, 2013).

BPA'ya yaygın şekilde maruz kalınması ve buna bağlı sağlık etkileri konusundaki endişe, Kuzey Amerika ve Avrupa Birliği'nde BPA'nın üretimi ve kullanımına ilişkin düzenlemeler yapılması ihtiyacını doğurmuştur. Kanada Hükümeti 2010 yılında, BPA içeren polikarbonat biberonların ithalatını ve satışını yasaklamıştır (Chen, Kannan, tan vd., 2016).

BPA'nın günlük hayatta yaygın olarak kullanılması nedeniyle; ağız, solunum ve deri gibi çeşitli yollarla BPA'ya maruziyet söz konusu olmaktadır (Rochester, 2013; Konieczna, Rutkowska ve Rachon, 2015). BPA'ya maruz kalmanın ana kaynakları arasında gıda ambalajı ve tozu, diş malzemeleri, sağlık ekipmanları, yazar kasa ve pos cihazlarında kullanılan termal kâğıtlar, çocuklar ile bebekler için oyuncaklar ve eşyalar bulunur. Gıda ürünleri BPA maruziyetinin başlıca kaynağıdır (Geens, Goeyens, Kannan vd., 2012; Konieczna vd., 2015). Daha düşük pH ve daha yüksek yağ içeriğine sahip yiyecekler daha yüksek BPA konsantrasyonları içermektedirler (Munguia-Lopez, Peralta, Gonzalez-Leon vd., 2002).

BPA, gıda muhafazası için teneke kutu imalatında ve kavanoz kapaklarının iç kaplamasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Teneke kutularda, gıdanın metal ile doğrudan temasını önlemek, kutunun termal kararlılığını ve mekanik dayanıklılığını sağlamak için kullanılan kaplamalar en çok epoksi reçinelerden yapılmaktadır. Her yıl üretilen BPA'nın % 9'u teneke kutulardaki astar malzemesinin üretimi için kullanılmaktadır (Cao, Corriveau, ve Popovic, 2010; Konieczna vd., 2015). Sterilizasyon veya yiyecek hazırlama sırasında tenekelerin ısıtılması, BPA'nın teneke kutu duvarının epoksi kaplamasından kutu içeriğine sızmasına neden olmaktadır ve bu nedenle BPA'ya diyetle maruz kalma potansiyelini artırmaktadır (Cooper, Kendig ve Belcher, 2011). Bu nedenle BPA'ya diyetle maruz kalmada en önemli kaynak konserve gıdalardır. Bunun yanında hayvanlar BPA ile bulaşık, BPA bulunan kirli bölgelerde yetiştirildiğinde veya bu gibi sulardan içtiğinde hayvansal ürünler olan et, süt ve yumurta gibi taze yiyeceklerde de BPA bulunabilmektedir (Van Landuyt, Nawrot, Geebelen vd., 2011). Ayrıca karton kutularda depolanan gıda ürünlerinde de BPA varlığı tespit edilmiştir (Oldring, Castle, Mahony vd., 2014).

BPA'ya laminant yer döşemesinden, epoksi reçineleri içeren yapıştırıcılardan, boyalardan ve ev elektronik ekipmanlarının tozlarından maruz kalınabilmektedir (Hanaoka, Kawamura, Hara vd., 2002). BPA, 56 toz örneğinin % 95'inde tespit edilmiştir, konsantrasyonlar örnek başına 0,8 mg ila 10 mg arasında değişmektedir (Ma ve Sassoon, 2006; Geens, Roosens, Neels, H vd., 2009). Çok sayıda mobilya ve elektronik cihaz bulunan ofisler ve laboratuarlardan gelen toz örneklerinde de daha yüksek değerler tespit edilmiştir (Calafat, Ye, Wong vd., 2008). Toplam BPA maruziyetinin % 5'inden daha azının tozlar aracılığıyla olduğu tahmin edilmektedir (Geens vd., 2012).

Diş malzemeleri, kontakt lensler, probalar, inhalerler, intravenöz kanüller, kateterler, neonatal inkübatörler veya hemodiyaliz aparatları gibi polikarbonat veya polisülfon plastikleştiriciler içeren bazı tıbbi cihazlardan BPA salınabilmektedir (Haishima, Hayashi, Yagami vd., 2001; Calafat, Weuve, Ye vd., 2009; Geens vd., 2012).

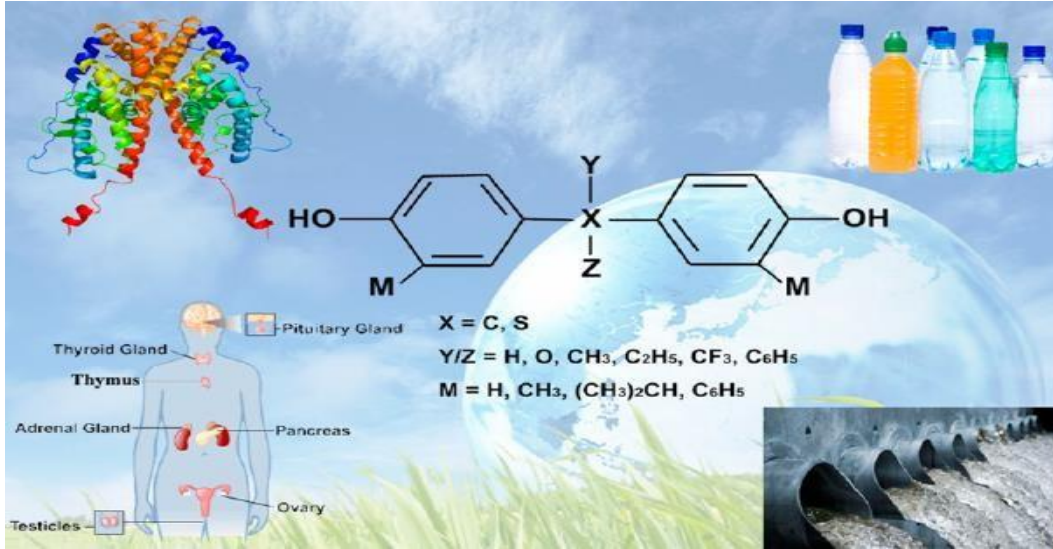
BPA ayrıca yazar kasa ve POS (Point of sale – satış terminali) cihazı olarak da bilinen ödeme kartı terminallerinde termal baskı için kâğıt üretiminde de kullanılmaktadır. Bu şekilde BPA'ya maruz kalma, yıkanmamış ellerin doğrudan ağız ile teması yoluyla ve ayrıca transdermal olarak da meydana gelmektedir (Geens vd., 2012). Üç yaşın üzerindeki kişilerde BPA'ya maruz kalmanın diyetten sonra gelen en yaygın nedeninin bu termal kağıtlar ile temas neticesinde transdermal yolla olduğu bildirilmiştir (EFSA 2015).

BPA'ya uzun süreli maruziyet, gün içinde birkaç saat ağıza konulabilen oyuncak bebekler, diş kaşiyıcıları gibi bebekler ve küçük çocuklara yönelik ürünlerle temastan da kaynaklanabilmektedir (Koniczna vd., 2015).

1.2.2. BPA Maruziyeti İle İlgili Sağlık Riskleri

BPA'nın çevresel bulunuşunu, insan maruziyetini ve toksisitesini araştıran çok sayıda çalışma vardır (Chen vd., 2016). *In vitro* deneylerde ve laboratuvar hayvan çalışmalarında BPA'nın üreme ve gelişme, sinir ağları, kardiyovasküler, metabolik ve bağışıklık sistemleri üzerindeki olumsuz etkileri ortaya konulmuştur (Crain vd., 2007; Richter vd., 2007).

Fenolik yapısı nedeniyle BPA östrojen reseptörleri ile etkileşime girmektedir. Endokrin reseptörüne (ER) bağlı sinyal yolları aracılığıyla agonist veya antagonist olarak hareket etmektedir (Ma ve Sassoon, 2006). Bu nedenle, BPA'nın kadın ve erkeklerde infertilite, erken ergenlik, meme ve prostat kanseri gibi hormona bağlı tümörler, polikistik over sendromu (PCOS) ve çeşitli metabolik bozukluklar dahil olmak üzere birçok endokrin bozukluğun patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir (Diamanti-Kandarakis, Bourguignon, Giudice vd., 2009).



Şekil 1.3. BPA maruziyet sebepleri ve etkilediği sistemler (Chen vd., 2016).

İdrarda BPA konsantrasyonunun artmasının, ejakülatta sperm sayısının azalması, sperm motilitesi ve canlılığında azalma ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Li, Zhou, Miao vd., 2011; Skakkebaek, Toppari, Söder vd., 2011). BPA'nın dişilerde ve erkeklerde fertilité üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır. BPA bu etkisinin hipotalamustaki östrojenik aktivitesi nedeniyle GnRH (gonadotropin salgılatıcı hormon) uyarımı üreticinin işlevini bozarak FSH ve LH'nin yeterli salgılanmasını bozmasından kaynaklandığı öne sürülmüştür (Eagleson, Gingrich, Pastor vd., 2000).

Hayvan deneylerinden elde edilen veriler, BPA maruziyetinin erken ergenliğin nedeni olabileceğini göstermektedir. Prenatal dönemde günde 2 mg/kg BPA'ya maruz bırakılan sıçanların yavru generasyonunun, kontrol grubuna göre ergenliğe girişinin daha erken olduğu gözlenmiştir (Honma, Suzuki, Buchanan vd., 2002). BPA'ya maruz kalma sonucu erken ergenliğe girme, BPA'nın zayıf östrojenik aktivitesinin, pozitif geribildirim mekanizması yoluyla GnRH salgısının uyarımını aktive ederek hipofiz LH ve FSH sekresyonunda artışa neden olmasından kaynaklanmaktadır (Paulose, Speroni, Sonnenschein vd., 2015).

Obezite, ardında yatan nedenlerden birinin BPA olduğu gösterilen metabolik bir bozukluktur. Farelerde yapılan çalışmalar, BPA gibi endokrin bozucu kimyasallara doğum öncesi maruz bırakılma ile farelerde obezite görülme sıklığı, glukoz tolerans ve lipid metabolizmasının bozulması arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Newbold, Jefferson, W. ve Padilla-Banks, 2009). Günde 10 mg / kg BPA'ya maruz kalan farelerde, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek plazma trigliserid

konsantrasyonları ve dört aylık yaşta vücut ağırlığında hızla artış görülmüştür (Rutkowska ve Rachon, 2014). Legeay ve Faure (2017), BPA'nın adipogenez, lipid ve glikoz metabolizmalarında düzensizlik ve selülit oluşumuna neden olarak obezite patofizyolojisinde rolü olduğunu göstermiştir.

1.2.3. BPA ve Bağırsak

Bağırsak, besinlerin sindirimi ve emilimi için önemli organ sisteminin bir bölümüdür (Feng vd., 2019). İnce bağırsak, sindirim ve emilim işlevi görürken, patojenlere ve toksik maddelere karşı koruma sağlamaktadır. Bağırsak epitel bütünlüğü, bağırsağın fonksiyonunu tam anlamıyla yerine getirebilmesi için bağırsak lümeni ile vücudun iç kısmı arasında temel bir bariyer görevi gördüğü için önemlidir. (Odenwald ve Turner, 2017). Bağırsak epitel bütünlüğü sürekli hücre yenilenmesiyle korunurken, düzensiz hücre yenilenmesi bağırsak mukozal bariyer fonksiyonuna zarar verebilmektedir (Barker, 2013).

Bağırsak mukozası, bağırsak lümeninde bulunan toksik maddeler de dahil çeşitli oksidatif stres etkenlerine maruz kalabilmektedir (Taniguchi vd., 2015). Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) birikmesi, bağırsak epitel hücre yenilenme bozukluğu, bariyer bozulmaları, gastrointestinal kanser türleri, inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) ve enterokolit gibi çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır (Rezaie vd., 2007; Bhattacharyya vd., 2014). Bu nedenle, bağırsak sağlığını korumada bağırsak epitel bütünlüğünü ve hücrel redoks homeostazını korumak önemlidir (Okumura ve Takeda, 2017).

Bağırsak aynı zamanda vücuda giren eksojen toksik maddelere karşı sınırdır (Qu vd., 2018). BPA'nın bağırsakta morfolojik ve işlevsel bozukluklar ile ilişkili olduğu bilinmesine rağmen (Zhao vd., 2019), bağırsak mukozası homeostazını ve işlevini bozma mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır (Jiao vd., 2020).

Bağırsak epitel hücrelerinin yüzeyi, bağırsağın kimyasal bariyerini oluşturan kalın bir mukus tabakası ile kaplıdır (Garrett, Gordon ve Glimcher, 2010). Mukus tabakası, patojenlere karşı ilk savunma hattıdır (McGuckin, Linden, Sutton vd., 2011). Feng ve arkadaşları (2019), farelerde diyetle BPA alınmasının kolonun tüm uzunluğunca dağılmış olan epitelinde bulunan ve mukus tabakası üretimini sağlayan goblet hücrelerinin sayısında önemli ölçüde azalmaya neden olduğunu göstermiştir.



Şekil 1.4. Diyetle BPA alımının kolon bariyerine etkisi (Feng vd., 2019'den uyarlanmıştır).

Diyetle BPA alımında kolonik kimyasal ve fiziksel bariyerin bozulduğu, biyolojik bariyerin değiştiği ve sonucunda kolon geçirgenliğinin arttığı gözlenmiştir (Feng vd., 2019).

Jiao ve arkadaşları (2020), BPA'ya diyetle maruz kalınmasının mitokondri işlevlerinde bozulma, ROS-JNK/MAPK yolu aktivasyonu ve bunun sonucunda bağırsak immün bozuklukları ile birlikte epitel hücre yenileme bozukluklarının oluşmasına, böylelikle bağırsaklarda fiziksel bariyer sisteminin bozulmasına yol açabileceğini göstermiştir.

Ovariektomi yapılmış ve oral yol ile günde 5 mg/kg ve 50 µg/ kg BPA verilen sıçanlarda kolon dokusunda bağırsak epitel hücreleri arasında bağlantı proteinleri olan oklüdin ve JAM-A (birleşme adezyon molekülü) proteinlerine kolon dokusunda protein ekstraksiyonu yapılarak bakılmış ve anılan protein seviyelerinde BPA dozuna bağlı artış saptanmıştır. Aynı çalışmada düşük doz BPA'ya maruz kalmanın ovariektomi yapılmış ergin dişi ratlarda bağırsak geçirgenliğini azalttığı sonucuna da ulaşılmıştır (Braniste, Jouault, Gaultier vd., 2010).

Otsuka ve arkadaşları (2012), günlük 20 mg/kg BPA uygulamasının, gebe farelerin duodenum ve ileum'unda oklüdin ve JAM-A'nın mRNA ekspresyonlarını arttırdığını gözlemlemiştir. Bu sonuçlar 20 mg BPA uygulamasının kalsiyum iyonu absorpsiyonunun daha önemli olduğu gebelerde kalsiyum iyonu emilimini azalttığını, serum kalsiyum düzeyini düşürdüğünü, gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen dozda (NOAEL) (5 mg/kg vücut ağırlığı/gün) altında (2 mg/kg/gün) BPA uygulanmasının ise gebe farelerde serum Ca düzeylerini etkilemediğini göstermektedir.

Malaise ve arkadaşları (2017), perinatal yaşamları boyunca BPA'ya maruz kalan farelerin, erken erişkinlik döneminde bağırsak mukozasında mikrobiyotaya dengesinin bozulması sonucunda immün homeostaz bozuklukları ve glikoz toleransında değişiklik gerçekleştiğini, bu sorunların yaşlanmayla beraber obezite gelişimine neden olan öncüller olduğunu göstermiştir.

Braniste ve arkadaşları (2010), zayıf östrojenik aktivitesine rağmen, referans dozlardaki BPA'nın (NOAEL 5 mg/kg/g; Tolere edilebilir günlük alım (TDI) 50 µg/kg/g) epitel bariyer fonksiyonunu etkilediği ve endokrin reseptörlerine bağlanarak visceral nosiseptif yanıtı arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca, bağırsak bariyerinin perinatal gelişiminin, BPA'nın bağırsaktaki endokrin bozucu etkileri için kritik bir pencereyi temsil ettiğini ve yetişkinlikte şiddetli kolonik inflamasyon geliştirmek için dişi yavrularda bir risk faktörü olabileceğini göstermiştir.

1.3. Apoptoz

Canlı hücre ölümleri iki ayrı mekanizma ile gerçekleşir. Bu mekanizmalar apoptoz ve nekrozdur. Nekroz; aşırı ısı değişiklikleri, hipoksi, toksinler gibi hücre dışından gelen fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür (Öztürk, 2002). Apoptoz programlanmış hücre ölümü veya hücre intiharı olarak tanımlanmıştır (D'Arcy, 2019; Celepli, Bigat ve Celepli, 2020). Yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümleri apoptoz olarak adlandırılır (Öztürk, 2002).

Apoptoz sözcüğü ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü tipini tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr, Wyllie ve Currie, 1972). Yunancada 'apo' ayrı, 'ptosis' düşen anlamındadır. Apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı ise 1983 yılında Duke ve arkadaşlarının, jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu göstermesi ile sağlanmıştır (Öztürk, 2002).

Apoptozun nedenleri antineoplastik ilaçlar, yüksek glukokortikoid düzeyi, radyasyon, büyüme hormon eksikliği, insan bağışıklık eksikliği virüsü (Human Immunodeficiency Virus- HIV), hücre yaşlanması, tümör hücreleri, sitotoksik T

lenfositler, ölüm reseptörleri ailesine ait bir membran proteini olan Fas ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) reseptör aktivasyonu ve çok şiddetli olmayan oksidatif stres olarak sıralanabilir (D'Arcy, 2019; Celepli vd., 2020).

Apopitoz morfolojik olarak etrafındaki hale ile mikroskopta kolayca tanımlanabilir (Adamkov, 2019). Hücre küçülür ve membranı bozulmamıştır. Ancak membranda kabarcık oluşumu gibi morfolojik değişiklikler gözlenir. Kromatin nükleer membran çevresinde yoğunlaşır ve toplanır (Elmore, 2007). Organellerde parçalanma yoktur. Apopitoz sürecinin sonunda hücre organelleri morfolojik olarak membran ile kaplı küçük apoptotik cisimciklere dönüşürler (Celepli vd., 2020).

Apopitoz enerjiye bağımlı ve fizyolojik bir olaydır (Adamkov, 2019). Apopitoz için biyokimyasal olarak adenozin trifosfat'a (ATP'ye) ihtiyaç vardır. DNA (deoksiribonükleik asit) parçalanması pre-litik dönemde gerçekleşir ve internükleozomal alanlarda 180 kilo baz (kb) çiftinin katları olacak şekilde mono ve oligonükleozomlara ayrılır. Apopitozda tek tek hücre ölümleri gerçekleşir ve enflamasyon gözlenmez (Fink ve Cookson, 2005).

Apopitoz fizyolojik ve patolojik olarak meydana gelebilir (Celepli vd., 2020). İnsan vücudunun gelişiminde ve embriyogenezde fizyolojik apopitoz kilit rol oynar. Embriyogenezde gerçekleşen apopitoza örnek olarak fetusun el ve ayak parmakları arasındaki dokunun apopitozu verilebilir (Öztürk, 2002). Menstrüel siklusta endometriumun dökülmesi de apopitoz ile olmaktadır. Apopitoz, yara iyileşmesi sırasında enflamatuvar hücrelerin (özellikle lökosit) ölümü için de gereklidir (Elmore, 2007). Apopitoz; radyasyon ve sitotik ilaçların alımı sonrasında gelişen DNA hasarı, yanlış katlanmış proteinlerin birikimi ve apopitozun mitokondriyal yolunu aktive eden viral enfeksiyonlar sırasında da görülebilmektedir (Celepli vd., 2020).

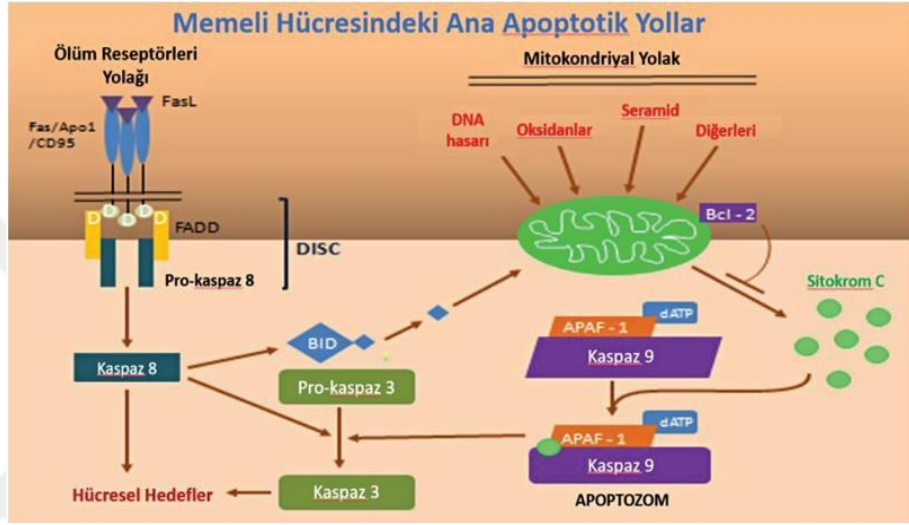
1.3.1. Apopitoz Yolakları

Fizyolojik ve patolojik apopitozda başlıca 5 farklı yolak kullanılmaktadır. Metabolik ve hipoksik stres ile tetiklenen intrinsik (iç) yolak ve ölüm ligandları olarak bilinen Fas-L veya tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi dış uyaranlar ile tetiklenen ekstrinsik (dış) yolaklar bunların en yaygın bilinenlerdir (Şekil 4.1). Bunların dışındaki yolaklar; kaspazın doğrudan aktivasyonu ile granzim-B yolağı, DNA

fragmentasyonu ile başlayan granzim-A yolağı ve DNA hasarı üzerine tümör protein 53 (p53) ile aktive olan kaspaz 2 bağımlı yolaktır (Grilo ve Mantalaris, 2019).

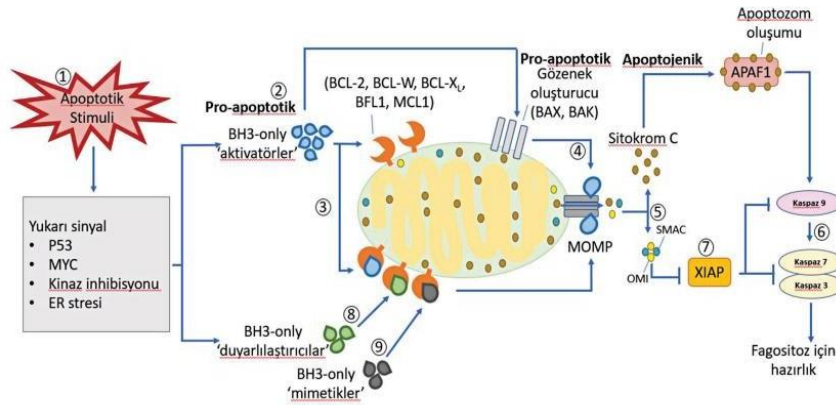
1.3.1.1. İntrensik Apoptoz

İntrensik apoptoz, mitokondriyal hasar, endoplazmik retikulum stresi, iyonlaştırıcı radyasyonun neden olduğu genotoksik hasar, onkojene bağılı hücre ölümü, aşırı mutajenik stimülasyonlar veya büyüme faktörü gibi bazı uyarıcıların yokluğunda aktive olur (Singh, Letai ve Sarosiek., 2019).



Şekil 1.5. İntrensik ve ekstrinsik apoptotik yolaklar (Celepli vd., 2020).

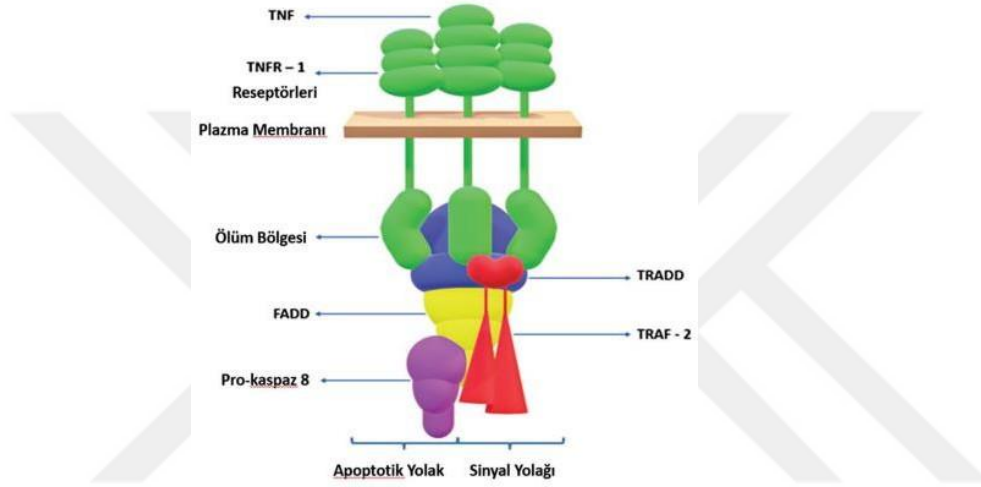
(BID: BH3 etkileşim alan ölüm agonisti (BH3 interacting-domain death agonist); APAF1: Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 (Apoptotic protease activating factor 1); DISC: Ölüme neden olan sinyal kompleksi (Death-inducing signaling complex).



Şekil 1.6. İntrensik apoptotik yolak. BCL-2 ailesi proteinleri etki mekanizması. (Celepli vd., 2020).

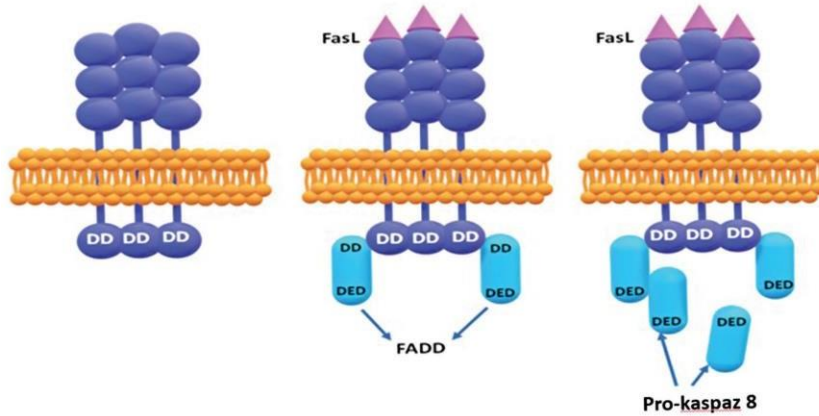
1.3.1.2. Ekstrinsik Apoptoz

Ekstrinsik apoptotik yol; doğal öldürücü (Natural killer - NK) hücreler, aktive edilmiş T lenfosit hücreler ve makrofajların hedef hücrenin zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlatılır. Tümör nekroz faktör (TNF) ve yağ asiti sentetaz reseptörü (FasR) düzenleyici proteinlerdir. Komplementer ölüm aktivatörleri olan tümör nekroz faktör alfanın (TNF- α) ve yağ asiti sentetaz ligandı (FasL) bağlanması ile prokaspaz-8, kaspaz-8'e dönüşür. Bu şekilde kaspaz kaskadı aktivasyonu başlatılmış olur (Choo, Loh ve Chen, 2019).



Şekil 1.7. Ekstrinsik apoptoz yolağında TNF- α ve TNFR-1 reseptör.

FADD: Ölüm etki alanına sahip Fas ile ilişkili protein (Fas-associated protein with death domain), TRADD: TNF reseptörü ile ilişkili öldürücü bölge (Tumor necrosis factor receptor type 1- associated death domain), TRAF-2: tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 2 (tumor necrosis factor receptor- associated factor 2) (Celepli vd., 2020).



Şekil 1.8. Ekstrinsik apoptoz yolağında Fas/FasL. (Celepli vd., 2020).

DD: Ölüm bölgesi (death domain); DED: Ölüm efektör alanı (death effector domain).

Ölüm ligandları arasında TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL), APO-3/APO-2 ligandı, FasL ve TNF- α sayılabilir. FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 bu sinyal yolunda en iyi bilinen reseptör-ligand çiftleridir. TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) molekülleri adaptör proteinler olarak ölüm reseptörlerine alınır. Prokaspaz 8 ve 10 ölümüne neden olan sinyal kompleksi (DISC) oluşturmak için adaptör proteinlere bağlanır. Bu kompleks yapı kaspaz 8 ve kaspaz 10'u aktive eder. Yürütücü kaspazlar olan kaspaz 3, 6 ve 7, aktive olan kaspaz 8- 10 tarafından aktive edilir. Kaspaz 3,6 ve 7 aktive edilmesiyle, hücre ölümüne yol açan proteinlerin ve hücre iskeletinin imhası başlamış olur (Pfeffer ve Singh, 2018). Kaspaz-8 kaspaz-10'dan farklı olarak, BH3 etkileşim alanı ölüm agonistini (BID) parçalayarak mitokondriden sitokrom C salınımına neden olur ve intrinsik yolu aktive eder (Choo vd., 2019).

1.3.1.3. Kaspazlar

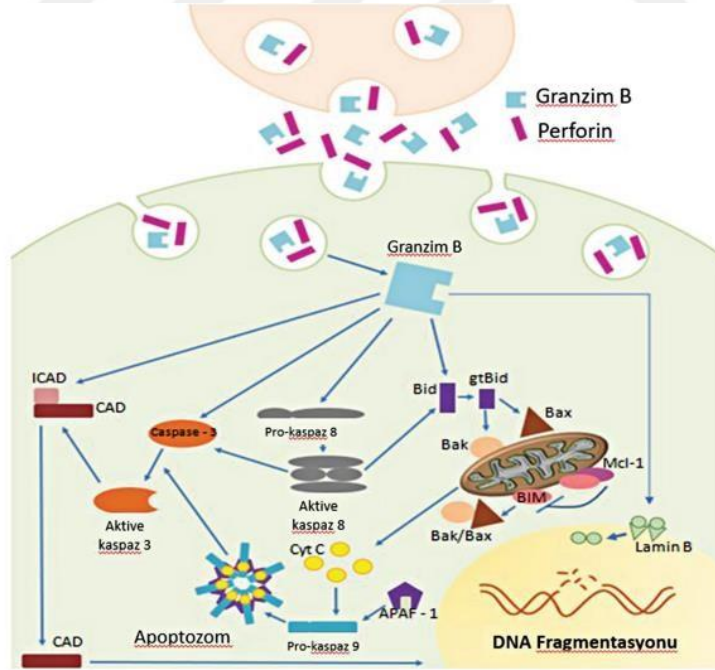
Kaspazlar (CASPASE: Cysteine Aspartate Specific ProteASEs) apoptozda önemli rolü olan sistein proteaz grubu enzimlerdir. Kaspazlar iki gruba ayrılmaktadır. Birinci grup kaspazlar; bir sinyale tepki olarak ilk etkinleştirilen başlatıcı kaspazlar (initiator caspase) (kaspaz 2, 8, 9 ve 10) iken ikinci grup kaspazlar; apoptozun yıkım aşamasını gerçekleştiren uygulayıcı kaspazlardır (executioner caspase) (kaspaz 3, 6 ve 7) (Boice ve Bouchier-Hayes, 2020).

Başlatıcı kaspazlar, N-terminal pro-alanları içerirler ve kendi kendilerini aktive edebilirler. Uygulayıcı kaspazlar, aktif başlatıcı kaspazlar 8, 9, 10 tarafından aktive edilirler. Kaspaz- 2 ise hem başlatıcı hem de uygulayıcı kaspazdır. Ayrıca kaspaz-2, uygulayıcı kaspaz- 13 ile substrat özelliklerini paylaştığı için uygulayıcı kaspaz olarak sınıflandırılabilir (Voskoboinik, Whisstock ve Trapani, 2015).

Uygulayıcı kaspazlar (kaspaz 3, 6 ve 7) aktive edildiklerinde; DNA fragmentasyonu, nükleer proteinlerin imhası, endonükleaz aktivasyonu, fagositik hücreler için ligand ekspresyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu gerçekleşir (D'Arcy, 2019). Performin/granzim yolu ile uygulayıcı kaspazlarının aktivasyonu doğrudan başlatılabilir (Voskoboinik vd., 2015). Uygulayıcı kaspazları arasında bulunan kaspaz-6, kaspaz- 3 ve kaspaz- 7'den daha az belirgin bir role sahiptir (Graham, Ehrnhoefer ve Hayden, 2011; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018).

1.3.1.4. Granzim

Granzim, lenfositlerin (NK) yabancı hücreleri öldürme işlevinde rol alan serin esteraz enzimidir yani sitolitik bir mediatördür. İnsan vücudunda A, B, H, K, ve M olmak üzere 5 tip granzim bulunmaktadır. Proapoptotik proteinlerin en güçlüsü granzim B'dir. Granzim, hücre membranında perforin tarafından oluşturulan gözeneklerden girer. Ardından BID granzim tarafından aktif membran hedefli ölüm ligandına (tBID) dönüştürülür. tBID BAK/BAX (BCL-2 antagonisti öldürücü/BCL-2 ilişkili X proteini) oligomerizasyonunu ve sitokrom C'nin mitokondriden sitozole geçişini kolaylaştırarak apoptozu başlatır (Barman, Kumar, Saha vd., 2018). Kaspaz- 3 ve kaspaz- 7, granzim B tarafından doğrudan aktive edilir, uygulayıcı yolağı harekete geçirilerek apoptoz başlatılır (Kim-Campbell, Gomez ve Bayir, 2019). Granzim-B'nin mitokondriye girmesi ile Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NADH) ayrılarak mitokondriyal solunum zincirinin [elektron taşıma zinciri (ETZ)] bozulması gerçekleşir. Granzim-B'nin reaktif oksijen radikallerinin üretilmesini sağlayarak apoptotik hücre ölümünde etkili olduğu gösterilmiştir (Adrain, Murphy ve Martin, 2005).



Şekil 1.9. Apoptoz özet (Celepli vd., 2020).

1.3.2. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Apoptoz saptamak için geliştirilen çeşitli yöntemler vardır. Apoptoz teriminin ilk kez kullanıldığı 1972 yılında, hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmiştir. Ancak günümüzde apoptoz, apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların moleküler düzeyde belirlenmesi ile de saptanabilmektedir.

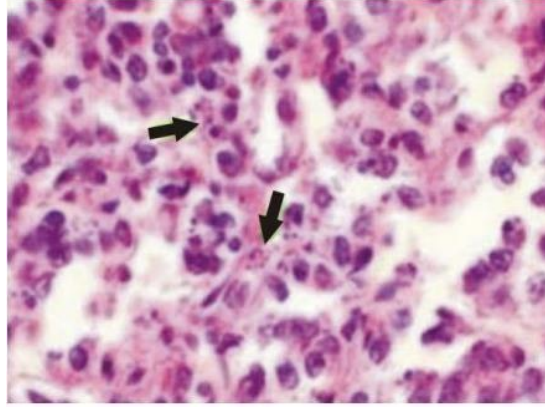
Apoptoz ilk kez 80'li yılların sonlarına doğru DNA kırıklarının saptanmasına yönelik yöntemler ile morfolojik verilere dayanarak belirlenmiştir. Apoptoz, 90'lı yılların ortalarında apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştığının bulunması ile kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metotlar ile apoptoz saptanmıştır. Fosfotidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle 90'lı yılların sonunda saptanırken; apoptotik epitelial hücrelerde kaspaz aktivitesi ile kırılan bir protein olan kreatin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanılması ile 2000'li yılların başlarında daha spesifik bir yöntemle saptanmaya başlamıştır (Kano, Takemura, Misao vd., 1999; Watanabe, Toyoda, Okuda vd., 1999; Vairetti, Ferrigno, Bertone vd., 2005).

1.3.2.1. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Morfolojik Yöntemler

I. Işık mikroskobu kullanımı

-Hematoksilen-ezoin boyama

Apoptoz da hücre nükleusundaki kromatin yoğunlaşarak nükleuslarının periferinde toplanmaktadır. Hemotoksilen boyası bu kromotini boyadığı için HxE ile boyanan ve ışık mikroskobunda incelenen örnekler ile hücre kültürü çalışmalarında kromatinin kondanse olması ve nükleus zarının periferinde toplanması, hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi şeklinde değişiklikler gözlenmektedir (Güleş ve Eren, 2008).



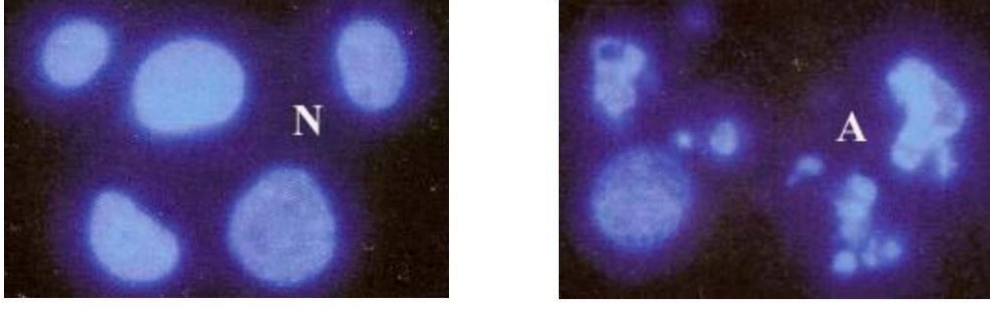
Şekil 1.10. Apoptotik hücreler (oklar) (HxE boyama)(Güleş ve Eren, 2008).

- Giemsa Boyama

Giemsa ile boyamada, apoptotik hücreler nükleus morfolojisi esas alınarak tanınır. Hematoksilen boyamaya göre sitoplazma sınırları daha iyi seçilebilmesine rağmen belirgin bir üstünlüğü yoktur (Güleş ve Eren, 2008; Erdem, 2013).

II. Floresan mikroskopu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı

Floresan mikroskopi, Hoechst boyası, 4,6-diamidine-2'-phenylindole (DAPI), akridin orange, etidyum bromür, propidium iyodür, fluorescein isothiocyante (FITC) gibi floresan maddelerin kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar, nükleustaki DNA'ya bağlanarak görünür hale getirirler. Hücre kültürü çalışmalarında canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (Hoechst boyası gibi) ile yalnızca ölü hücreleri boyayabilen başka bir boya (Propidium iyodör gibi) canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için beraber kullanılır. Bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilirken, ölü hücrelerin apoptozla veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayırımı, nükleus morfolojisine bakılarak yapılır. Çekirdek kırılması veya kromatin yoğunlaşması olan hücrelerin apoptotik hücreler olduklarını düşündürür (Güleş ve Eren, 2008; Erdem, 2013).



Şekil 1.11. Hoechst boyama (N, Normal hücreler, A, Apoptotik hücreler) (Güleş ve Eren, 2008).

III. Elektron mikroskobu

Morfolojik değişikliklerin en gerçekçi şekilde izlendiği bir yöntemdir. Kromatin kırılması ve yoğunlaşması, sitoplazmada küçülmenin izlenmesinin yanında hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı, mitokondrinin durumu gibi hücre içi detaylar da incelenebilmektedir (Erdem, 2013).

IV. Faz kontrast mikroskobu

Bu mikroskop hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla, sadece hücrelerin kültür ortamında kullanılır (Erdem, 2013). Substratından ayrılarak besiyerinde yüzmeye başlayan ölü hücreler, faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler fakat faz kontrast mikroskobu ile mitoza giden hücreler de gözlenebilir bu da apoptotik hücrelerin erken evredeki görüntüleri ile karışabilir, ayrımları çok zordur. Apoptotik hücrelerin üzerinde gelişen cepcikler (blebs) faz kontrast mikroskobu ile izlenebilir (Güleş ve Eren, 2008).

1.3.2.2. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan İmmunohistokimyasal Yöntemler

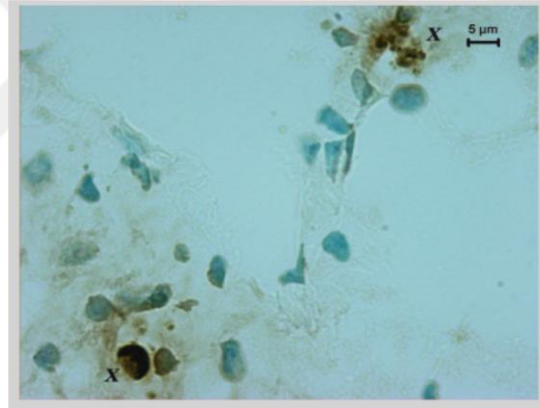
I. Anneksin V Yöntemi

Normal hücrelerde bulunan fosfatidilserin (PS), hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunan membran lipidlerinden biridir. Hücre apoptoza gittiğinde iç yüzdeki PS molekülleri hücre zarının dışına transloke olurlar. Bu durum apoptotik hücre ölümünün erken döneminde meydana gelir. Anneksin V, fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir. Hücre zarının dışına transloke olan PS'ye bağlanabilen anneksin V, FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür

hale getirilebilir (Kopman, Reutelingsperger, Kuijten vd., 1994; Bratton, Fadok, Richter vd., 1997; Gatti, Belletti, Orlandini vd., 1998).

II. TUNEL Yöntemi

Bu yöntem DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar (Gavrieli, Sherman, Y. ve Ben-Sasson, 1992; Kressel ve Groscurth, 1994). Kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde, donmuş kesitlerde, parafin bloklarda apoptozun varlığı TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transpherase- mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling) yöntemiyle saptanabilir (Erdem, 2013). DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak, apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları işaretlenebilmektedir. Fakat terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur (Güleş ve Eren, 2008).



Şekil 1.12. Karaciğer dokusunda apoptotik hücreler (X) (Güleş ve Eren, 2008).

III. M30 Yöntemi

Sitokeratin 18 (CK18) glandüler epitel hücrelerinde bulunan ve tek katlı tip 1 intermediate filament proteindir. Çoğunlukla karaciğer, göğüs, akciğer, prostat ve kolon kanser tiplerinde eksprese edilirken, nöral ve lenfoid hücrelerde bulunmaz (Caulin, Salvesen ve Oshima, 1997). M30 yönteminde, sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre apoptotik hücreler belirlenir. Yalnızca sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır (Leers, Kolgen, Bjorklund vd., 1999).

IV. Kaspaz-3 Yöntemi

Bu yöntem ile yalnızca apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir. Bu sebepten, çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının ya da dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi gerekir. Bu bilirse apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler (Overbeeke, Steffens-Nakken, ve Vermes, 1998; Güleş ve Eren, 2008).

1.3.2.3. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Biyokimyasal Yöntemler

I. Agaroz Jel Elektroforezi

Apoptozda DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan kırıldığı için merdiven görüntüsü (ladder pattern) oluşur (Erdem, 2013).

Agaroz orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için kullanılan en yaygın destek ortamıdır. Ayrıştırılacak moleküllerin büyüklüğüne bağlı olarak farklı (% 0,3-2 arasında) agaroz konsantrasyonları kullanılır. Büyük DNA parçaları için düşük, küçük DNA parçaları için ise yüksek agaroz konsantrasyonları kullanılarak nükleik asitlerin en iyi şekilde ayrılmaları sağlanır. DNA'nin jelde görünür hale gelmesi floresan bir boyanın DNA'nın iki zinciri arasına girerek 300 veya 360 nm dalga boyundaki ışığı soğurması sonucu floresan etki göstermesi ile gerçekleşir. Genellikle floresan bir boya olan ethidium bromide ile kullanılır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir (Carson ve Rbiero, 1993; Bortner, Oldenburg ve Cidlowski, 1995; Güleş ve Eren, 2008). Agaroz jel elektroforezi yöntemi güvenilir sonuçlar veren bir analiz yöntemidir (Serenio, Holzmuller, Mangot vd., 2001).

II. "Western" Blotting

İmmunoblotlama da denilen bu yöntem, bir proteinin ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. İstenilen proteine karşı yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlı bir yöntemdir. Hücrede biriken protein miktarını gösterir (Güleş ve Eren, 2008).

Bu yöntem ile apoptoza özgü, BCL-2 gibi bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının veya kaspaz-3 gibi proteinlerin kırılıp kırılmadıklarının saptanması mümkündür. Bu yöntem ile sitokrom C'nin mitokondriden çıkıp çıkmadığı da

belirlenebilir. Sitokrom C tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrenin sitoplazmik ve mitokondriyal fraksiyonları ayrılır. Sonrasında, sitokrom C'nin normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmediği halde bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoza gittikleri anlaşılır (Güleş ve Eren, 2008; Erdem, 2013).

III. "Flow" Sitometri

Parçacık ışık yayılımı analizi ile lazer kaynaklı florometre bileşiminden flow sitometre meydana gelir. Flow sitometre, düşük ve dik açılı ışık yayılımı kullanılarak, farklı molekülleri, hücreleri ve parçacıkları büyüklük ve şekil olarak ayrılabilir. FITC, 13- phycoerithrin ve rhodamine-GG gibi farklı özel floresan işaretleyicilerle veya boya işaretli antikorlarla bu hücreler, moleküller veya parçacıklar işaretlenebilir (Güleş ve Eren, 2008).

Apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteini, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak, flow sitometri yardımıyla saptanabilir. Bu sayede apoptotik hücreler belirlenebilir. Kantitatif sonuç verebilmesi, uzun zaman almaması ve kolay uygulanabilir olması açısından kullanışlıdır (Kockx, Muhring, Knaapen vd., 1998; Overbeeke vd., 1998).

Flow sitometri uygulaması ile Anneksin V ve floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak apoptoz iki şekilde belirlenir (Kockx vd., 1998; Overbeeke vd., 1998).

1.3.2.4. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan İmmunolojik Yöntemler

I. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

ELISA testi, apoptozun belirlenmesinde kullanılan, serolojik tanı yöntemlerinden biridir. Spesifik, çabuk sonuç veren ve duyarlı bir testtir (Güleş ve Eren, 2008). ELISA ile kan plazmasında ve kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında, DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. ELISA metodu ile ayrıca apoptoz belirteci olan M30 antijeni düzeylerinin ölçümü de mümkündür (Overbeeke vd., 1998).

ELISA testinde, iki nükleozomal epitopa spesifik bir çift monoklonal antikor, ELISA pleytlerindeki sitoplazmik nükleozomları belirlemek ve yakalamak için kullanılır. ELISA testi, agaroz jel elektroforez yöntemi ile apoptotik DNA merdiveninin

belirlenmesinden daha duyarlı ve çok sayıda örneğin test edilmesi açısından daha uygun bir analiz yöntemidir (Salgame, Varadhachary, Primiano vd., 1997).

II. Flourimetrik Yöntem

Bu yöntem, kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılır. Kaspazın antikorunun bulunduğu "plate"lere hücre lisatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur. Ardından ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır (Erdem, 2013).

1.3.2.5. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Biyoloji Yöntemleri

I. DNA Microarrays (DNA Mikrodizileri)

DNA microarray teknolojisi yeni ve çok pahalı bir yöntemdir. Ancak yakın gelecekte tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşımaktadır. Bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir sürede, binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA'larının) tespiti mümkün olabilecektir. Bu sayede, apoptoza özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğacaktır (Erdem, 2013).

1.4. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, oksidan ve antioksidanlar arasında dengenin bozulması, lipid peroksidasyonu ve serbest radikal/reaktif oksijen ürünlerinin açığa çıkması sonucu organizmada hücre hasarı oluşumudur. Oksidatif strese karşı organizmanın savunma sistemlerinin yetersiz kalması sonucunda, hücrelerde gelişen oksidatif hasar hücrelerin fonksiyonlarını önemli ölçüde aksatır. Oksidatif stres, yaşlanma süreci ve kardiyovasküler hastalıklar, sepsis, kanser, böbrek yetmezliği, dejeneratif nörolojik hastalıklar, infertilite, kas ve karaciğer hastalıkları gibi birçok hastalığın etiolojiden ve patogenezinden sorumludur (Tabakoğlu ve Durgut, 2013).

Aerobik organizmaların metabolizma basamaklarında, besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümü sırasında oksijen molekülü indirgenir ve yan ürün olarak süperoksit, nitrik oksit, hidroksil ve lipid peroksit gibi serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri meydana gelir (Freeman ve Crapo, 1982). Serbest radikaller iki farklı

şekilde sınıflandırılır. Birincisi reaktif oksijen (reactive oxygen species-ROS) türleridir. ROS olarak adlandırılan bu moleküller; superoksit anyon radikali (O_2^-), hidroksil radikalleri ($HO\cdot$), singlet oksijen (O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$), ozon (O_3), alkil radikali ($R\cdot$), peroksil radikali ($POO\cdot$), perhidroksil radikali (HO_2^-), organik peroksit radikali ($RCOO\cdot$), alkoksil radikali ($RO\cdot$)'dir. İkinci grup radikaller ise reaktif nitrojen türleri (reactive nitrogen species-RNS)'dir. RNS olarak adlandırılan bu moleküller ise; peroksinitrit ($ONOO^-$) ve nitrik oksit (NO) olup, vücudun normal metabolik reaksiyonları sırasında az miktarda üretilirler (Freeman ve Crapo, 1982; Halliwell, 1994; Gutteridge, 1995).

Serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklı olarak gruplandırılır. Endojen faktörler; stres, yaşlılık, kronik hastalıklar, egzersiz, enfeksiyon, malabsorbsiyon gibi antioksidanların alınmasını engelleyen durumlar olarak sıralanabilir (Gutteridge, 1995). Ekzojen faktörler ise; hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, ilaç toksikasyonları, solventler gibi çevresel faktörler, metalik katyonlar, antineoplastik ajanlar, iyonize radyasyon, pestisidler, ultraviyole ışınlar, ozon, diyet olarak sıralanabilir (Çaylak, 2011).

Malondialdehit (MDA), üç veya daha fazla çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin bölünmesiyle kanda ve idrarda oluşur. MDA üç karbonlu bir dialdehittir ve lipid peroksidasyonun en önemli ölçülebilir göstergelerinden biridir (Freeman ve Crapo, 1982). Oluşan MDA; iyon transportu, deformasyon, hücre yüzey bileşenleri ve enzim aktivitesinin agregasyonu gibi zar özelliklerinin değişmesine sebep olur (Cighetti Duca, Bortone vd., 2002).

Organizmada serbest radikallerin oluşturduğu hasarı önlemek için, radikal oluşumunu engelleyen ve oluşan zararı azaltan; antioksidan olarak bilinen çeşitli savunma mekanizmaları geliştirilmiştir (Vinson, Hsu, Possanza vd., 1994). Antioksidanlar, hedef molekülün oksidasyonunu geciktirir ya da inhibe ederler (Gutteridge, 1995). Antioksidan enzimler, serbest radikalleri tutarak veya yeni daha zayıf moleküllere dönüştürerek aktivitelerini azaltırlar. Aynı zamanda serbest radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırma/onarma şeklinde de etki gösterirler (Traber ve Packer, 1995).

Yapılarına göre enzimatik ve enzimatik olmayan, kaynaklarına göre endojen ve ekzojen, çözünürlüklerine göre suda çözünenler ve yağda çözünenler, organizmada

yerleşimlerine göre intraselluler ve ekstraselluler olarak farklı şekillerde antioksidan sınıflandırılması yapılmaktadır (Tabakoğlu ve Durgut, 2013).

Toplam antioksidan durumu (TAS), tüm antioksidanların toplam etkisini yansıtır. Toplam oksidan durumu (TOS), vücut sıvılarında ve plazmada bulunan tüm oksidanların toplam etkisini yansıtmaktadır (Aslan, Kutlu, Civi vd., 2014).

Hücrelerdeki enzim sistemleri, serbest radikallere karşı savunma sisteminde antioksidan olarak öncelikli etkiye sahiptir. Glutasyon peroksidaz (GSH- Px), superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) lipid peroksidasyonun başlamasını ve serbest radikallerin birikmesini önleyen en önemli enzimatik antioksidanlardandır (Gutteridge, 1995; Valko, Leibfritz, Moncol vd., 2007). Alfatokoferol (Vitamin E), askorbik asit (Vitamin C), vitamin D, glutasyon (GSH), β -Karoten (Vitamin A) ve diğer antioksidanlar ise enzimatik olmayan antioksidanları oluşturmaktadır. Organizmanın yaşaması ve sağlığı için antioksidanların miktarları ve aktiviteleri arasındaki denge gereklidir (Gutteridge, 1995; Valko vd., 2007).

Superoksit dismutaz (SOD) enzimi organizmada serbest radikallere karşı ilk savunma işlemini gerçekleştirir. SOD, endojen olarak üretilmektedir. Organizmayı oluşturan her hücre için esansiyel bir enzimdir. SOD, peroksinitrit oluşumunu engelleyerek ve hücrede hasara yol açan süperoksit radikalini daha az zararlı hidrojen peroksite ve moleküler oksijene dönüştürerek organizmayı oksidanların zararlı etkisinden korumaktadır (Tabakoğlu ve Durgut, 2013).

GSH-Px ve CAT lipid peroksidasyona karşı korunma mekanizmasında birincil antioksidan enzimler olarak bilinirler. GSH-Px lipid hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksitin indirgenmesi sağladığı için aktivitesinin azalması, hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (Kehrer, 1993). Bütün organlarda bulunmasının yanında özellikle karaciğerde ve eritrositlerde bulunan ve SOD aracılığıyla oluşmuş hidrojen peroksitin oksijen ve suya parçalanmasında GSH-Px ile birlikte CAT önemli bir enzim görevi yapmaktadır. Oksidatif strese bağlı olaylarda, vücutta hücresel korunmada önemli rol oynayan GSH-Px ve CAT aktivitelerinde değişmelerin olduğu bildirilmiştir (Gutteridge, 1995).

Glutasyon sistein, glutamik asit ve glisin aminoasitlerinden oluşmuş bir tripeptittir. Düşük molekül ağırlığına sahiptir ve çözünebilir en önemli antioksidandır (Kohen ve Nyska, 2002; Valko vd., 2007). Hücre bütünlüğünün devamlılığında esansiyel bir

bileşiktir ve hücre metabolizmasına katılır (Kehrer, 1993). Glutasyon serbest radikallerin toksisitelerini doğrudan reaksiyona girerek düşürmektedir. Hidroksil radikalleri ile singlet oksijenin temizlenmesinde yararlı enzimatik olmayan bir antioksidandır (Bucak, Satılmış, Kızıl vd., 2010). Doğrudan serbest radikalleri temizleyen glutasyon, GSH-Px ile birlikte enzimatik olarak etki göstermesinin yanı sıra, koruyucu enzimlerin kofaktörü olarak da işlev görür. Ayrıca önemli antioksidanların (E ve C vitaminleri gibi) rejenerasyonunda da etkilidir (Valko vd., 2007). DNA ve protein sentezinde, hücrelerde aminoasit transportunda da önemli fonksiyonlara sahiptir (Bucak vd., 2010). GSH en çok karaciğerde sentezlenir ve karaciğer vücut GSH içeriğinin en önemli kaynağıdır. Safra ile yaklaşık % 40'ı atılmaktadır (Kehrer, 1993).

GSH-Px ve E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. α , β , γ ve δ olarak adlandırılan dört tokoferol karışımı E vitaminini oluşturur. α -tokoferol en yüksek antioksidan etki gösterir (Vinson vd., 1994). Alfa-tokoferol yağda çözünen ve membranlardaki lipoproteinleri oksidasyondan koruyan ana antioksidan vitaminlerden birisidir. C vitamini birçok enzimin kofaktörü olmasının yanında güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı en güçlü suda eriyen antioksidandır. Vitamin C lipid peroksidasyonunu önlemede, vitamin E'nin organizma düzeylerinin azalmasını önleyerek yeniden kazanılmasını sağlamaktadır (Kohen ve Nyska, 2002). β -Karoten singlet oksijeni ve peroksil radikallerini temizleyerek antioksidan etki gösterir (Tabakoğlu ve Durgut, 2013). Beyin epifizinden salgılanan bir hormon olan melatonin güçlü bir antioksidandır (Kohen ve Nyska, 2002).

1.5. D Vitamini

Sağlık için gerekli olduğu bilinen D vitaminin birçok kaynağı mevcuttur. D vitamini, diğer vitaminlerle karşılaştırıldığında vücudumuz için çok önemli bir role sahiptir (Laird vd., 2010).

1.5.1. D Vitamini Diyet Kaynakları

Diyetteki iki ana D vitamini sekosteroidi, D2 vitamini (ergokalsiferol) ve D3 vitamini (kolekalsiferol)'dur. D2 vitamini bitki ve mantarlardan elde edilir ve ergosterolün ışınlanması yoluyla üretilir. D3 vitamini, 7-dehidrokolesterolden üretilir

ve diyetle yağlı balık, balık yağı, yumurta ve süt ürünleri içeren hayvansal ürünlerden elde edilir (Laird vd., 2010). Yapılan çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, iki izomerin etkinliğinde önemli bir fark olmadığını bildirmiştir (Holick, Biancuzzo, Chen vd., 2008).

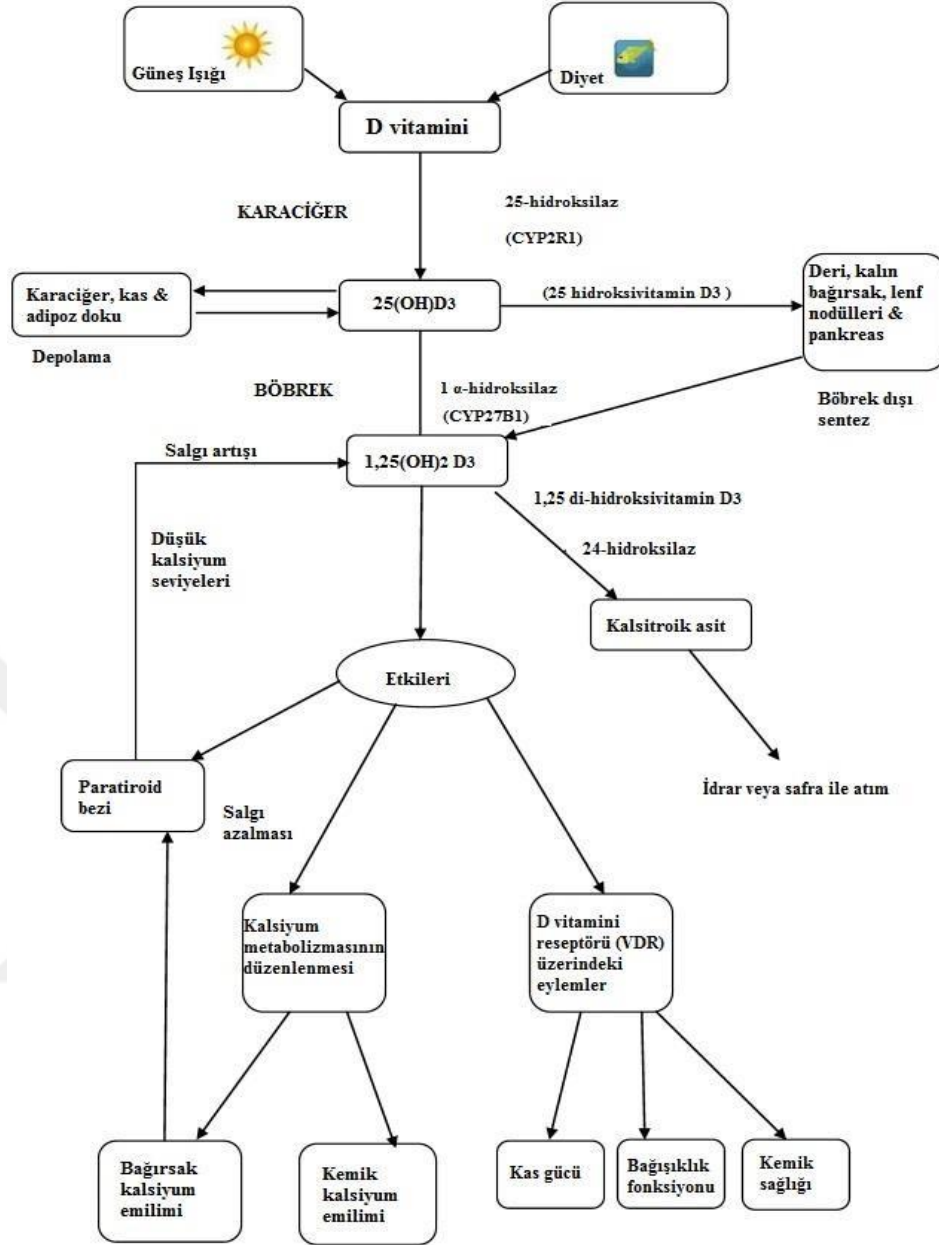
D vitamini emiliminin % 75'inin etkili bir şekilde ileum ve jejunum'da gerçekleştiği öne sürülmüştür (Bikle, 2007). Emilim, safra tuzu ve misel oluşumuna da bağlıdır. Bu nedenle Çölyak veya Crohn hastalığı gibi malabsorbtif bozuklukların varlığı emilimi önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Laird vd., 2010).

1.5.2. D Vitamini Sentezi, Metabolizması ve İşlevi

Ergokalsiferol (D2 vitamini), büyük ölçüde mantarlarda ve bazı bitkilerde bulunan bir steroid olan ergosterolün ultraviyole (UV) ışınlarına maruz kalmasıyla elde edilir (Tripkovic, Lambert, Hart vd., 2012). Kolekalsiferol (D3 vitamini), 7-dehidrokolesterolün, 290-320 nm UV dalga boylarında, hayvanların derisinde previtamin D3'e UV ışınlanması yoluyla ve ayrıca bir termal izomerizasyon adımı ile sentezlenir (Laird vd., 2010).

D vitamini, D vitamini bağlayıcı protein (DBP) tarafından bağlanır ve karaciğere taşınır (Holick, 2004). Karaciğerde D vitamini, 25-hidroksilaz (CYP2R1) tarafından hidroksile edilerek hormon 25-hidroksivitamin D [25[OH]D3]'ün dolaşımdaki ana formuna dönüştürülür (Laird vd., 2010). Hidroksillenmemiş D vitamini karaciğerde, yağ dokusunda ve kasta depolanır (Holick, 2006). DBP'ye bağlanan 25[OH]D, böbreğin proksimal tübül hücrelerine taşınır. DBP bozulur ve 25[OH]D3, 1 α -hidroksilaz (CYP27B1) tarafından hormonun biyolojik olarak aktif formu olan 1,25 di-hidroksivitamin D3 [1,25[OH]2D3] (kalsitriol)'e hidroksillenir (Khosla, 2001). Ancak böbrek, CYP27B1'in tek kaynağı değildir; kolon, beyin ve pankreas gibi dokularda da saptanmış olup, hormonun farklı otokrin işlevleri olduğunu düşündürmektedir (Khosla, 2001). CYP27B1'in renal tübüller içinde, fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF-23) ve paratiroid hormonu (PTH) tarafından kontrol edilir. PTH 1 α -hidroksilaz üretimini uyarır, FGF-23 ise bir dizi geri bildirim yoluyla böbrekte 1 α -hidroksilaz üretimini inhibe eder (Holick., 2006; Laird vd., 2010). Hormon metabolize edildikten sonra kalsitriol aside dönüştürülür ve atılır (Laird vd., 2010).

D vitamininin birincil etkisi, ince bağırsakta artan kalsiyum emilimidir (Khosla, 2001; Holick, 2006). Hipokalsemi ile artan PTH salgılanması böbrekte 1,25[OH]₂D₃ üretimini uyarır (Khosla, 2001). Hormon, bağırsak hücrelerinde D vitamini reseptörü (VDR) ile etkileşime girer ve bağırsak hücrelerinin çekirdeğindeki retinoik asit x reseptörü (RXR) ile kompleks oluşturur (Holick vd., 2006; Laird vd., 2010). Bu kompleks, hücelere kalsiyum alımını artıran ve kalsiyumun bağırsaktan emilimini artıran kalsiyum kanalının (TRPV6 "bağırsaklarda kalsiyum emilimindeki ilk adımda yer alan membran kalsiyum proteini") D vitaminine duyarlı elementine (VDRE) bağlanır (Khosla, 2001; Holick, 2006). İkinci olarak, osteoblastlar içinde, D vitamini VDR ile etkileşime girer ve Nükleer Faktör κ B Ligandı için Reseptör Aktivatörü'nün (RANKL) plazma membran ekspresyonunu artırır. Preosteoklastlar üzerindeki Nükleer Faktör Reseptör Aktivatörü (RANK), osteoblast üzerindeki RANKL'ı bağlar ve daha sonra preosteoklastları bir osteoklast'a dönüştürür. Bu dönüşüm, optimal fizyolojik aralığı korumak için kalsiyum depolarını kemiklerden dolaşıma mobilize etmek için hidroklorik asit gibi kimyasalları serbest bırakır (Khosla, 2001).



Şekil 1.13. D vitamini metabolizması ve fonksiyonunun özet diyagramı (Laird vd., 2010) 'dan uyarlanmıştır.

1.5.3. D Vitamini ve Bağırsak

Bağırsak epitel bariyeri, epitel hücreleri ve hücreler arası bağlantılardan oluşur. Bariyer, lümen ile iç ortam arasındaki makromolekül alışverişini düzenler ve bağırsakta çözünen zararlı maddelerin, mikroorganizmaların, toksinlerin ve lümen antijenlerinin vücuda girmesini engelleyerek konağı korur (Watson, Chu, Sieck vd., 2005). Bağırsak bariyer fonksiyonunun tehlikeye girmesi veya bozulması, zararlı

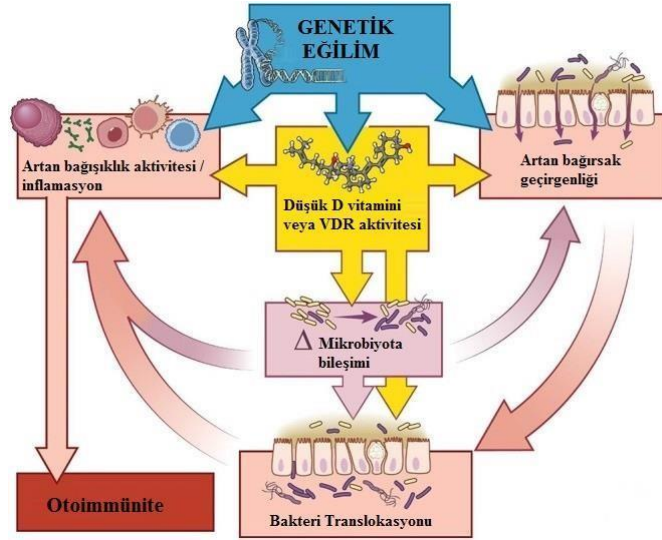
etkilere neden olur ve konağın lümen antijenlerine ve bakterilere maruz kalmasına neden olarak enflamasyona yol açar (Fasano ve Shea-Donohue, 2005).

Bağırsak mukoza bariyerinin bütünlüğü, mukoza epitelinin muazzam rejenerasyon kapasitesi ile korunur. Bağırsakta bulunan kriptlerin tabanında bulunan bağırsak kök hücreleri, hücre bölünmesi ve farklılaşması yoluyla epiteli yenilemekten sorumludur. Bağırsak epitelinin önemli ölçüde hasar görmesinden sonra, yüzey epitelinin hızlı bir şekilde yeniden oluşturulması, epitelyal hücrelerin tekrar yerlerine konulması, çoğalması ve farklılaşması ile gerçekleştirilir (Dignass, 2001).

Genetik yatkınlık, D vitamini aktivitesini, bağırsak bariyerinin bütünlüğünü ve bağışıklık aktivasyonunu etkileyebilmektedir. D vitaminin insanda kandaki referans değer aralığından daha düşük değerlerde olması, bağırsak bariyerinin geçirgenliğini ve bağışıklık aktivitesini arttırmaktadır. Ayrıca, D vitaminin yetersizliği bağırsakların mikrobiyal bileşimini ve mikroorganizmaların bağırsak lümeninde yer değiştirme yeteneğini değiştirerek konakçı bağışıklık sistemi ile etkileşimine yol açtığı bildirilmiştir (Yamamoto ve Jorgensen, 2019a).

Kong ve arkadaşları (2007), VDR'nin bağırsak mukoza bariyerinin bütünlüğünün korunmasında kritik bir rol oynadığını gösterilmiştir. VDR'nin, hücreler arası bağlantıları geliştirebildiğini; mukozal yara iyileşmesi için de gerekli olduğunu göstermiştir.

Robles-Vera ve arkadaşları (2019), rat dışkıasını analiz ederek D vitamini eksikliğinin sıçanlarda bağırsak mikrobiyotasını bozmamakla beraber bakteri taksonlarında bu hipovitaminoz ile ilişkili immünolojik düzensizlikte patofizyolojik bir rol oynayabilen spesifik değişiklikler ürettiğini göstermiştir.



Şekil 1.14. Genetik, bağırsak bütünlüğü, mikrobiyom ve D vitamini eksikliği arasındaki etkileşimlerin modeli (Yamamoto ve Jorgensen 2019a) 'dan uyarlanmıştır.

1.5.4. D Vitamini ve BPA

Biyolojik olarak aktif bir D vitamini formu olan D3'ün, VDR üzerindeki bir etki yoluyla bağışıklık sisteminde güçlü modülatör etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Mora, Iwata ve Andrian, 2008; Yamamoto ve Jorgensen, 2019b). VDR, nükleer reseptör süper ailesine aittir ve ligandla aktive olan transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. D3-VDR kompleksi, retinoid reseptörü (RXR) ile heterodimer oluşturur ve bu genlerin promotör bölgesindeki heterodimerin vitamin D yanıt elemanlarına (VDRE) bağlanması yoluyla vitamin D'ye yanıt veren genlerin ekspresyonunu indükler (Wei ve Christakos, 2015; Christakos, Dhawan, Verstuyf vd., 2016).

Wang ve arkadaşları (2020), maternal D3 takviyesinin, yavru farelerde dalak VDR mRNA ve VDR protein ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir. Bu sonuçlar, D3'ün yardımcı T lenfosit hücresi -17 (Th17) hücreleri ve VDR ile ilişkili IL-17 üzerindeki inhibitör etkisine ilişkin önceki bilgilere uygundur (Tang, Zhou, Luger vd., 2009; Chang, Chung, ve Dong, 2010).

Bu çalışmada, 150 gr ağırlığındaki ergin Wistar albino erkek ratlara oral yol ile 0,5 ml zeytinyağında çözdürülerek uygulanan 25 mg/kg/ Bisfenol A'nın oksidatif strese yol açma etkisi sebebiyle, ileumda barsak bariyer yapısını ne şekilde etkileyeceğini, bağırsak epiteli altında yer alan peyer plaklarında immun hücrelerde apoptoza yol açıp açmayacağını immunohistokimyasal olarak ve 150 gr ağırlığındaki ergin Wistar albino erkek ratlara oral yol ile 0,5 ml zeytinyağında çözdürülerek uygulanan 25 mg/kg/ Bisfenol A'nın yanında 400 IU/gün D3 vitamini uygulanmasının, D

vitamininin antioksidan etkisi sebebiyle, barsak permeabilitesini korumaya yardım edip etmeyeceğini, apoptotik faaliyeti azaltıp azaltmayacağını tespit etmek amaçlanmıştır. Aynı zamanda dokuda GSH, MDA, CAT, SOD, TAS, TOS, OSI, TNF- α , IL-6; kan serumunda da GLU, CHOL, TG, HDL, LDL değerleri belirlenerek antioksidan etkisinin biyokimyasal olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada ileum'un seçilme nedeni; diğer ince bağırsak bölümlerine nazaran kısa seyri nedeniyle alınan örneklemin geçerliliğinin artırılması, immun sistemin bir parçası olan bağırsak lenf nodüllerinin ileum'da diğer bağırsak bölümlerine göre çok daha fazla olması yönüyle BPA'nın bağırsak immunitesi üzerine etkilerinin en iyi gözlenebileceği bölge olması ve D vitamininin emiliminde jejunum ile birlikte en etkili bölge olmasıdır.



2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kimyasal Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler

Tez çalışması sırasında kullanılan kimyasallar; disodyumhidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (ISOLAB 969.053.1000), 2-tiyobarbutirik asit (TBA) (Sigma Aldrich T5500), fosforik asit (Carlo Erba 7664-38-2), n-butanol, 5,5' dithiobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB) (Sigma D8130), hidrojen peroksit (H_2O_2) (TEKKİM 3001 201 2000 1), disodium etilendiamin tetraasetik asit (Na_2EDTA) (Sigma 6381-92-6), potasyum sodyum tartarat (Carlo Erba 474465), bakır (II) sülfat pentahidrat (Sigma Aldrich 61245), sodyum hidroksit (Sigma Aldrich 06203), ksantin oksidaz (Sigma X4875), bakır (II) klorür (Carlo Erba 475685), bovine serum albumin (BSA) (Sigma A2153), sodyum karbonat, Total Antioksidan Seviyesi (TAS), Total Oksidan Seviyesi (TOS) kitleri (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Türkiye), ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/Türkiye), xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye) ve Tetrametoksiopropan n-butanol (Sigma Aldrich 537993) kullanıldı.

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).

2.2. Yöntemler

2.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

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- Vehicle (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 25 mg/kg/ Bisfenol A 0,5 ml zeytinyağı içinde çözdürülerek 30 gün boyunca her gün verildi.

Grup 4- D3 vitamini grubu, (denek sayısı 10), deneklere gavaj yoluyla intragastrik olarak 400 IU/gün D3 0,5 ml zeytinyağı içinde çözdürülerek vitamini 30 gün boyunca her gün verildi.

Grup 5- BPA ve D3 vitamini grubu (denek sayısı 10), deneklere gavaj yoluyla intragastrik olarak 30 gün boyunca her gün 400 IU/gün D3 vitamini ve 25 mg/kg/ BPA 0,5 ml zeytinyağı içinde çözdürülerek Bisfenol A verildi.

2.2.2. Ratlardan Numune Alınması

Deney sonunda deneklere intraperitoneal yoldan 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/Türkiye), 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye) ile anestezi uygulandıktan sonra laparotomi işlemi ile abdominal bölgede vena cava'dan tüplere kan alınarak hayvanlar desanguine edildi. İleum dokusunun içeriği boşaltıldıktan sonra serum fizyolojik ile yıkandı. Daha sonra ileum dokusunun bir parçası % 10'luk formol solusyonuna konarak histolojik inceleme için ayrıldı. Geriye kalan doku parçası ise alüminyum folyeye sarıldıktan sonra analiz gününe kadar -80 C°'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Tüplere alınan kan numuneleri pıhtılaşmanın gerçekleşmesi için oda ısısında yaklaşık olarak bir saat kadar bekledikten sonra 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj işlemi yapılarak serum numuneleri elde edildi. Serum numuneleri biyokimyasal testlerin yapılması için ependorf tüplere ayrıldıktan sonra analiz gününe kadar -80 C°'de derin dondurucuda saklandı.



Şekil 2.1. Karın boşluğunun açılması



Şekil 2.2. Vena cava'nın bulunması.



Şekil 2.3. İleum'un bulunması ve alınması.

2.2.3. Numunelerin Hazırlanması

Çalışma günü ileum dokuları derin dondurucudan alınarak malondialdehit (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) analizi ile tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), toplam antioksidan seviyesi (TAS), toplam oksidan seviyesi (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI) ve protein seviyelerini belirlemek için tartıldılar. Fosfat tampon (pH:7.5) ilavesi ile %10 homojenatlar elde edildi ve numuneler 12.000 rpm'de 1-2 dakika süreyle otomatik homojenizatör (Hangzhou Bioprep-24) ile homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. İleum dokusuna ait MDA seviyeleri bu homojenatlarla belirlenmiştir. Daha sonra doku homojenatları +4 °C'de 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar, GSH, SOD, CAT, TAS, TOS, OSI ve protein seviyelerini belirlemek için kullanılmıştır.

Çalışma günü derin dondurucudan çıkarılan serum örnekleri oda ısısına getirildikten sonra uygun kitler kullanılarak otoanalizörde glukoz, kolesterol, trigliserid, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) değerleri belirlenmiştir.

2.2.4. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analizi

2.2.4.1. Doku Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Ölçümü

Doku homojenatındaki MDA analizi Ohkawa ve arkadaşlarının (1979) tarif ettiği yönteme bağlı kalınarak yapılmıştır. Doku homojenatları, kapaklı cam tüp içerisinde %1'lik H₃PO₄ ve % 0,6'lık tiyobarbitürik asit ile karıştırılıp tüp kapaklarının üzeri alüminyum folyo ile sıkıca sarıldıktan sonra 45 dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra karışım, n-butanol ile ekstrakte edildikten sonra santrifüj işlemiyle n- butanol fazında ayrılan pembe renk deney gruplarına göre mikropilaya kuyucuklarına yerleştirilerek ELISA okuyucuda 535 nm dalga boyunda ölçüldü ve MDA seviyesini hesaplamak için kullanıldı. Kör olarak n-butanol ve standard olarak tetrametoksipropan kullanıldı. Bulgular nanomol/g yaş doku olarak elde edilmiştir.

2.2.4.2. Doku Redükte-Glutatyon (GSH) Seviyesinin Ölçümü

Doku süpernatantındaki redükte glutatyon (GSH) analizi Ellman'ın (1959) tarif ettiği yönteme bağlı kalınarak yapılmıştır. Doku süpernatantları deproteinize edildikten

sonra ependorf tüp içersinde 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona sokularak sarı-yeşil renk oluşması için 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. Bulgular nanomol/g yaş doku olarak elde edildi.

2.2.4.3. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Doku süpernatantındaki SOD aktiviteleri, Sun ve arkadaşlarının (1988) yöntemine bağlı kalınarak yapıldı. Deney ortamında ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonu ile süperoksit radikalleri oluşur. Oluşan bu radikaller ortamdaki NBT'yi (nitro blue tetrazolium) indirgeyerek mavi renkli formazan oluşmasına neden olur. Doku SOD aktiviteleri oluşan bu mavi renkli formazanın 560 nm'de ELISA okuyucuda ölçülmesi ile yapıldı. Bulgular U/g protein olarak elde edildi.

2.2.4.4. Doku Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Doku süpernatantındaki CAT aktiviteleri Burnie ve arkadaşlarının (1992) yöntemine bağlı kalınarak yapıldı. Deney ortamında süpernatant ile H₂O₂ içeren fosfat tamponu (pH: 7.5 mM) karıştırıldı. Süpernatandaki CAT aktivitesi ile H₂O₂, H₂O ve O₂'e parçalanır. Ortamdaki hidrojen peroksitlerin yıkımlanması 240 nm'de absorbanstaki azalmasına neden olur. CAT aktivitesini hesaplamak için absorbanstaki azalma 1 dakika boyunca gözlemlendi. Bulgular K/g protein olarak elde edildi.

2.2.4.5. Doku Total Oksidan Seviyesinin (TOS) Ölçümü

Doku süpernatantında TOS düzeylerinin ölçülmesi Erel'in (2005) metoduna bağlı kalınarak yapıldı. Total Oksidan Seviyeleri, kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Türkiye) prosedürüne bağlı kalınarak kullanılarak çalışıldı. Oluşan renkli bileşikler 530 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile ölçülerek ileum TOS seviyelerinin hesaplanmasında kullanıldı. Standart olarak 20 µmol/L'lik H₂O₂ solusyonu kullanıldı. Bulgular µmol H₂O₂ equiv /L olarak elde edildi.

2.2.4.6. Doku Total Antioksidan Seviyesinin (TAS) Ölçümü

Doku süpernatantında TAS düzeylerinin ölçümü Erel'in (2004) metoduna bağlı kalınarak yapıldı. Total Antioksidan seviyeleri, kit (Rel Assay Diagnostics,

Gaziantep, Türkiye) prosedürüne bağlı kalınarak çalışıldı. Kit talimatlarına mikropalakalara konan supernatant üzerine reaktif 1 eklenerek 660 nm’de birinci okuma ve reaktif 2 ilave edilerek ikinci okuma yapılmıştır. Elde edilen iki absorbans arasındaki farklar belirlenerek ileum TAS düzeylerinin hesaplanmasında kullanıldı. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı. Bulgular mmol Trolox Equiv/L olarak belirlendi.

2.2.4.7. Doku Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Ölçümü

Doku süpernatantında OSI ölçümü, Erel’in (2004) metoduna bağlı kalınarak hesaplandı. OSI, TOS'un TAS'a bölünmesine eşittir: $OSI \text{ (Arbitrary Unit)} = \frac{TOS (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{eqv/l})}{TAS \text{ (mmol Trolox eqv/l)}} \times 100$. Bulgular Arbitrary Unit (AU) olarak belirlendi.

2.2.4.8. Doku TNF- α Seviyesinin Ölçümü

Dokulara ait süpernatantlarda TNF- α seviyeleri AFG-BIOSCIENCE firmasından temin edilen (CAT NO: EK720127) rat kiti ile ölçüldü. Sonuçlar ng/L olarak belirlendi.

2.2.4.9. Doku IL-6 Seviyesinin Ölçümü

Dokulara ait süpernatantlarda IL-6 seviyeleri BT LAB BIOASAY TECHNOLOGY LABORATORY firmasından temin edilen (CAT NO: E0135Ra) rat kiti ile ölçüldü. Sonuçlar ng/L olarak belirlendi.

2.2.4.10. Serum Biyokimyasal Ölçümler (Kan yağları)

Biyokimyasal testleri belirlemek için analiz kitleri (Abbott, Abbott Park, Illinois, ABD) ve otoanalizör (Architect C8000) kullanılarak enzimatik kolorimetrik yöntem kullanılarak ölçüldü. Bulgular mg/dl olarak belirlendi.

Bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS istatistik program version 22’de One-Way ANOVA testi, TUKEY testi ve Tamhane-T2 testlerinden yararlanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Histopatolojik Bulgular

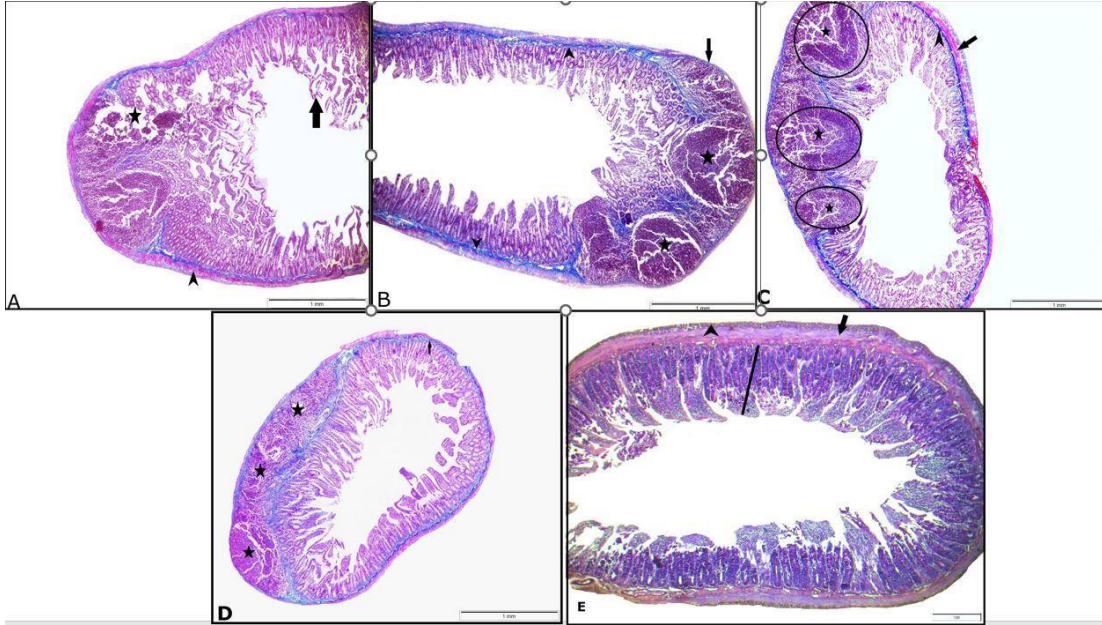
Kontrol, zeytinyağı ve D3 vitaminin uygulandığı gruplardan alınan ileum dokusuna trichrome boyama prosedürünün uygulanmasının ardından elde edilen preparatlarda; sindirim sisteminin bölümleri olan *Tunika mukoza*, *Tunika submukoza*, *Tunika muskularis*, *Tunika seroza* kısımlarının her biri sağlıklı bir şekilde gözlenmiştir. *Tunika mukoza* tabakasına ait epitel, *lamina propria* ve *lamina muskularis mukoza* bölümlerinden epitel tabakasının tek katlı prizmatik epitelten oluştuğu ve bir bütünlük arz ettiği tespit edilmiştir. Villusların uçlarının yumru ya da topuz şeklinde olduğu, villus derinliğinin az olduğu gözlenmiştir. Goblet hücrelerinin varlığı ve *lamina propria* ve *submukoza*'ya yerleşmiş lenfoid dokunun (Peyer plakları) bulunduğu gözlenmiştir. *Tunika submukoza* katmanının fibroelastik (düzensiz) sıkı bağ dokusu yapısında olduğu, aynı zamanda damar ve lenfatikler bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir. *Tunika muskularis*'e ait olan içte sirküler dışta longitudinal olan kas dokusu görülmüştür (Şekil 3.1.C Şekil 3.1.D ve Şekil 3.1.E).

Kontrol grubu, zeytinyağı grubu ve D3 vitaminin uygulandığı gruplara ait kesitlerde gruplar arasında birbirine benzer şekilde doku bütünlüğünün korunduğu, villus derinliğinin birbirine benzer uzunlukta olduğu ve Peyer plakları'nın *lamina propria* ve *submukoza* boyunca uzandığı görülmektedir. Epitel tabakasının tek katlı prizmatik çizgili hücrelerden oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 3.1.C Şekil 3.1.D ve Şekil 3.1.E).

BPA uygulanan grupta genel histolojik bakıda villus derinliğinin azaldığı ve doku bütünlüğünün bozulduğu görülmüştür. Villusların serbest uçlarında nekroz ve doku genelinde ödem tespit edilmiştir. Aynı grupta villuslarda birkaç tane plazma hücresi, eozinofil granülosit ve hiperkromatik hücreler ve mitotik hücreler de gözlenmiştir. Kontrol, zeytinyağı ve D3 vitaminin uygulandığı gruplarda Peyer plaklarının yapısı ve bütünlüğü korunmuş iken, BPA uygulanan grupta plaklarda doğurucu merkez yapısının büyük ölçüde hasara uğradığı tespit edilmiştir. Aynı grupta lamina

propriada bulunan hücrelerde hiperplazi gözlenirken, villus yapısının bozulduğu, bazı bölgelerde tamamen ortadan kalkmış olduğu görülürken, intestinal bez yapısının korunduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.1.A).

Hem BPA hem de D3 vitaminin uygulandığı grupta ise; villus derinliğinin kontrol, zeytinyağı ve D3 vitaminin uygulandığı gruplara daha yakın uzunlukta olduğu, Peyer plaklarının yapısının daha iyi korunduğu, doğurucu merkez yapısının birden fazla lenfid folikülde bütünlük gösterdiği tespit edilmiştir. Her ne kadar villuslarda dejeneratif bozukluklar görüntülenmiş olsada, bu dejenerasyonun derecesi BPA kullanılan gruplara göre daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1.B).



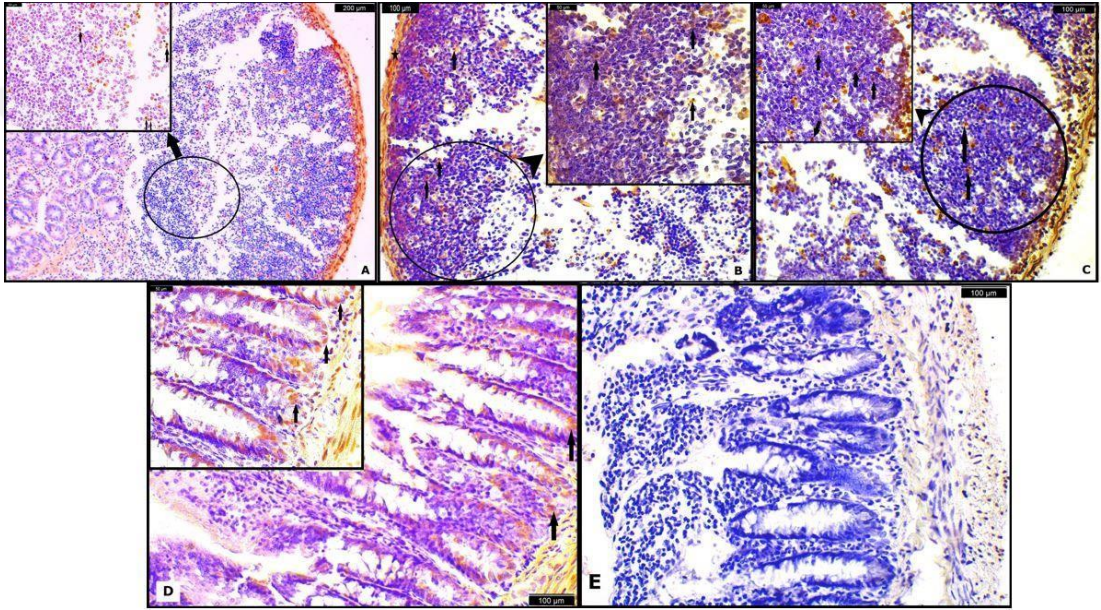
Şekil 3.1. İleumdan alınan kesitlere uygulanan Masson's trichrome boyama sonuçları (Büyütme: 4X)

(Şekil A: BPA, Yıldız: Yapısı bozulmuş Peyer plağı, Ok başı: Tunika muskularis'in kalınlığında azalma, Ok: Villus dejenerasyonu. Şekil B: BPA+D3, Yıldız: Peyer plakları, Ok başı: Lamina propria, Ok: Tunika Seroza. Şekil C: D3, Yıldız: Peyer plaklarında sentrum germinativum, Daireler: Peyer plakları, Ok başı: Lamina propria, Ok: Tunika Muskularis. Şekil D: Zeytinyağı, Yıldız: Peyer plakları, Ok: Lamina propria, Şekil E: Kontrol, Ok:Lamina muskularisin kalınlığının normal sınırlarda olduğu görülmüştür, Çizgi: Villusların uzunluğunun normal olduğu görülmüştür, Ok başı: Tunika seroza.)

3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Tüm gruplardan alınan dokulara uygulanan TUNEL metodunun ardından, ileum dokularında bulunan Peyer plakları apoptoz yönünden değerlendirilmiştir.

Kontrol grubunda çok az tutulum gözlenmiştir ve bu tutulumlar Peyer plaklarında değil, villuslarda gözlenmiştir (Şekil 3.2.E). Zeytinyağı grubunda tutulumun, villuslarda ve kontrol grubuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.2.D). D₃ vitaminin uygulandığı grupta ise; kontrole yakın şekilde sadece villuslarda tutulum görülmüştür (Şekil 3.2.C). BPA grubunda Peyer plaklarında yoğunlaşmış, tüm lenfoid dokuya yayılmış şekilde tutulum görülmüş, ancak villuslarda da tutulum tespit edilmiştir (Şekil 3.2.A). BPA ve D₃ vitaminin beraber uygulandığı grupta ise villus tutulumu yine bulunmakla beraber, Peyer plaklarındaki tutulumun miktarının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Şekil 3.2.B).



Şekil 3.2. İleumdan alınan kesitlere uygulanan TUNEL kiti boyama sonuçları

(Şekil A: BPA (Büyütme: 10X), Oklar: TUNEL (+) hücreler, küçük resim daire içerisine alınan alanın büyütülmüş görüntüsüdür (x20). Şekil B: BPA+D₃ (Büyütme: 20X), Oklar: TUNEL (+) hücreler, Yıldız: Tunika seroza, Küçük resim daire içerisine alınan alanın büyütülmüş görüntüsüdür (x40). Şekil C: D₃ (Büyütme: 20X), Oklar: TUNEL (+) hücreler, Küçük resim daire içerisine alınan alanın büyütülmüş görüntüsüdür (x40). Şekil D: Zeytinyağı (Büyütme: 20X), Oklar: TUNEL (+) hücreler, Küçük resim büyük resmin büyütülmüş görüntüsüdür (x40). Şekil E: Kontrol (Büyütme: 20X), TUNEL ile boyanma gösteren hücre olmadığı görülmüştür.)

3.3. Biyokimyasal Bulgular

Kan serumlarından yapılan glukoz, kolesterol, trigliserit, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) analizleri sonucu elde edilen değerler Tablo 3.1.' de verilmiştir.

Tablo 3.1. Serum biyokimya sonuçları.

	GLU (mg/dl)	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
K-1	62	38	98	33,9	13
K-2	69	36	62	42,3	12
K-3	78	41	71	37,6	15
K-4	83	44	124	37	15
K-5	66	40	85	36,5	14
K-6	73	38	76	36,4	13
K-7	68	37	77	36,9	14
K-8	75	38	117	36,8	13
K-9	68	41	68	37,8	14
K-10	76	42	82	37,6	13
ZY-1	69	25	58	32,6	6
ZY-2	79	35	61	35	16
ZY-3	74	37	70	37,3	11
ZY-4	69	37	66	40,6	8
ZY-5	96	32	68	33,9	10
ZY-6	87	34	71	36,5	11
ZY-7	76	31	60	34,3	10
ZY-8	89	36	68	36,7	11
ZY-9	73	35	67	35,9	9
ZY-10	78	31	67	37	11
BPA-1	131	52	113	45,1	17
BPA-2	110	56	101	50,1	22
BPA-3	125	51	137	38,1	17
BPA-4	119	52	150	45,8	17
BPA-5	128	39	138	41,2	13
BPA-6	119	54	139	49,3	21
BPA-7	123	50	148	43,5	18
BPA-8	122	53	115	44,8	19
BPA-9	127	49	137	48,7	17
BPA-10	116	50	118	42,7	17
D3-1	81	28	65	30,4	10
D3-2	65	39	60	36,5	13
D3-3	97	38	66	34,8	10
D3-4	98	28	65	30,4	10
D3-5	75	27	61	31	7
D3-6	84	40	95	37,8	16
D3-7	95	37	66	35,2	11
D3-8	73	29	69	31,4	14
D3-9	85	38	66	34,2	10
D3-10	80	29	73	33,1	9
BPA+D3-1	91	42	112	40	12
BPA+D3-2	117	39	124	33,5	12
BPA+D3-3	108	37	121	33,4	13
BPA+D3-4	103	33	81	34,8	11
BPA+D3-5	114	48	113	29,2	12
BPA+D3-6	115	34	99	34,9	10
BPA+D3-7	105	38	114	34,9	11
BPA+D3-8	109	44	119	32,8	10
BPA+D3-9	115	37	101	34,9	13
BPA+D3-10	103	36	99	34,6	12

K: Kontrol grubu, ZY: Vehicle (Zeytinyağı) grubu, BPA: BPA grubu, D3: D3 vitamini grubu, BPA+D3: BPA ve D3 vitamini grubu. GLU: Glukoz, CHOL: Kolesterol, TG: Trigliserit, HDL: yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL: düşük yoğunluklu lipoprotein.

Serum biyokimya verileri SPSS programına aktarılarak Varyans Analizi uygulanmak üzere One-Way Anova testine tabi tutulmuştur.

Tablo 3.2. Serum biyokimya Anova test sonuçları.

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GLU (mg/dl)	Between Groups	18053.680	4	4513.420	66.207	<.001
	Within Groups	3067.700	45	68.171		
	Total	21121.380	49			
CHOL (mg/dl)	Between Groups	1997.800	4	499.450	27.121	<.001
	Within Groups	828.700	45	18.416		
	Total	2826.500	49			
TG (mg/dl)	Between Groups	29592.480	4	7398.120	37.125	<.001
	Within Groups	8967.300	45	199.273		
	Total	38559.780	49			
HDL (mg/dl)	Between Groups	834.959	4	208.740	27.788	<.001
	Within Groups	338.029	45	7.512		
	Total	1172.988	49			
LDL (mg/dl)	Between Groups	365.520	4	91.380	20.927	<.001
	Within Groups	196.500	45	4.367		
	Total	562.020	49			

GLU: Glukoz, CHOL: Kolesterol, TG: Trigliserit, HDL: yüksek yoğunluklu lipoprotein yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL: düşük yoğunluklu lipoprotein.

Tüm değişkenler için Significance değeri 0.05'ten düşük olduğu için gruplar içerisinde tüm değişkenlerde en az 1 anlamlı farklılık olduğu söylenmektedir. Bu farklılığın hangi gruplar arasında olabileceğini test ederken kullanacağımız Post-Hoc test seçimi için değişkenlerin Homojen varyanslılıklarının incelenmesi gerekmektedir.

Tablo 3.3. Varyansların homojenlik testleri (Serum biyokimya).

Tests of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
GLU (mg/dl)	Based on Mean	1.005	4	45	.415
	Based on Median	.899	4	45	.472
	Based on Median and with adjusted df	.899	4	37.084	.474
	Based on trimmed mean	.978	4	45	.429

Tablo 3.3. Varyansların homojenlik testleri (Serum biyokimya) (devamı).

CHOL (mg/dl)	Based on Mean	2.467	4	45	.058
	Based on Median	1.973	4	45	.115
	Based on Median and with adjusted df	1.973	4	29.750	.124
	Based on trimmed mean	2.390	4	45	.065
TG (mg/dl)	Based on Mean	4.771	4	45	.003
	Based on Median	2.329	4	45	.070
	Based on Median and with adjusted df	2.329	4	31.375	.078
	Based on trimmed mean	4.367	4	45	.005
HDL (mg/dl)	Based on Mean	1.322	4	45	.276
	Based on Median	1.349	4	45	.267
	Based on Median and with adjusted df	1.349	4	37.915	.270
	Based on trimmed mean	1.336	4	45	.271
LDL (mg/dl)	Based on Mean	1.645	4	45	.180
	Based on Median	.968	4	45	.434
	Based on Median and with adjusted df	.968	4	30.464	.439
	Based on trimmed mean	1.630	4	45	.183

GLU: Glukoz, CHOL: Kolesterol, TG: Trigliserit, HDL: yüksek yoğunluklu lipoprotein yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL: düşük yoğunluklu lipoprotein.

GLU, CHOL, HDL ve LDL değişkenlerinin Homojen Varyans testi Significance(Sig.) değerleri 0,05'in üzerinde olduğundan grupların bu değişkenler için homojen varyanslı oldukları kabul edilmiştir, buna ek olarak eşit popülasyona sahip çok sayıda grup bulunduğundan TUKEY testi uygulanmıştır. Buna karşın TG değişkeninin Sig. değeri 0,05 in altında çıktığından, gruplar arası karşılaştırmalarda incelediğimiz Post-Hoc testlerde Tamhane-T2 testi sonucu incelenmiştir.

Yapılan Post-Hoc testlerin sonuçları tüm değişkenler için ayrı ayrı olacak şekilde, her bir grubun bir diğerine göre farklılıklarının anlamlı olup olmadığı incelenmiştir, Sig. değeri 0.05'ten küçük olan kombinasyonlar istatistiksel olarak anlamlı farklılıklara işaret etmektedir.

Tablo 3.4. Güven Aralıkları (Serum biyokimya).

GRUP	GLU (mg/dl)	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
Grup 1: K	71,8-/±4,52	39,5-/±1,79	86-/±14,84	37,28-/±1,49	13,6-/±0,69
Grup 2: ZY	79-/±6,42	33,3-/±2,63	65,6-/±3,15	35,98-/±1,59	10,3-/±1,85
Grup 3: BPA	122-/±4,46	50,6-/±3,27	129,6-/±11,84	44,93-/±2,7	17,8-/±1,78
Grup 4: D3	83,3-/±7,8	33,3-/±3,9	68,6-/±7,13	33,48-/±1,89	11-/±1,88
Grup 5: BPA+D3	108-/±5,66	38,8-/±3,32	108,3-/±9,42	34,3-/±1,9	11,6-/±0,77

K: Kontrol grubu, ZY: Vehicle (Zeytinyağı) grubu, BPA: BPA grubu, D3: D3 vitamini grubu, BPA+D3: BPA ve D3 vitamini grubu. GLU: Glukoz, CHOL: Kolesterol, TG: Trigliserit, HDL: yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL: düşük yoğunluklu lipoprotein. Grup 1 ile grup 3 arasında anlamlı fark vardır ($p<0.05$). Grup 2 ile grup 3 arasında ve grup 3 ile grup 4 arasında anlamlı fark vardır ($p<0.01$).

3.3.1. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Düzeyleri

BPA uygulanmış ratlarda D vitamininin ileum dokusu üzerindeki koruyucu etkilerini ortaya koymak için doku oksidan-antioksidan belirteçleri olan MDA, GSH, TAS, TOS ve OSİ seviyeleri ile SOD ve CAT aktivite düzeyleri çalışılmıştır.

Tablo 3.5. İleum biyokimya sonuçları (1).

	GSH (nmol/g yaş doku)	MDA (nmol/g yaş doku)	CAT (K/g protein)	SOD (U/g protein)
K-1	617,2830	268,3250	7,3831	159,4676
K-2	578,1820	387,2500	8,6741	88,5398
K-3	609,5910	132,6350	6,1816	88,0851
K-4	604,4630	290,2650	10,5738	112,1553
K-5	585,8740	385,9050	9,2510	121,9630
K-6	610,8690	270,8350	8,6990	112,6183
K-7	602,4160	287,6020	7,3688	109,0918
K-8	595,7430	360,5320	9,2606	114,5689
K-9	604,8810	240,7510	8,1212	123,2744
K-10	601,1350	267,9250	9,0910	108,2846
ZY-1	681,3830	137,0050	8,7995	133,9400
ZY-2	854,4530	229,4650	9,1652	148,7102
ZY-3	629,4620	387,2600	6,1227	103,2121
ZY-4	574,3360	131,3100	7,1441	121,8310
ZY-5	684,5880	246,0500	8,7251	165,5474
ZY-6	549,9380	219,7500	11,7437	104,5116
ZY-7	678,6650	214,5500	7,1508	127,5415

Tablo 3.5. İleum biyokimya sonuçları (1) (devamı).

ZY-8	576,7340	224,6400	9,4868	108,3241
ZY-9	695,4230	242,5200	8,8417	152,7881
ZY-10	698,6180	218,8500	8,9875	129,8476
BPA-1	272,4250	769,5050	2,0287	52,4571
BPA-2	391,6510	864,3100	2,9202	34,7992
BPA-3	436,5210	1070,6600	4,8583	19,2464
BPA-4	319,2180	719,2450	3,8625	40,5610
BPA-5	288,4500	851,5800	5,8332	94,2822
BPA-6	398,7020	938,0100	4,1685	75,4862
BPA-7	327,6240	892,6920	3,2472	42,9514
BPA-8	385,8190	738,4830	5,1373	52,8247
BPA-9	291,3570	867,7840	4,1178	73,6129
BPA-10	399,8450	976,5810	3,2783	41,8317
D3-1	661,5120	160,9600	6,6157	119,0797
D3-2	689,0750	245,8800	14,5719	122,9599
D3-3	621,7700	205,6800	11,2652	117,7309
D3-4	673,6910	258,9450	6,1438	83,5247
D3-5	2214,0140	157,9450	10,7163	158,8085
D3-6	830,0950	125,2700	8,0661	110,8401
D3-7	682,6730	273,4810	11,6483	99,3548
D3-8	1793,4870	167,6240	8,1749	124,2464
D3-9	665,2960	159,3240	10,1648	129,7631
D3-10	651,9820	169,3580	8,2653	121,9324
BPA+D3-1	562,7180	589,0900	7,3672	97,5937
BPA+D3-2	622,4110	787,7250	7,1979	97,8012
BPA+D3-3	443,5600	504,5100	5,6845	77,8100
BPA+D3-4	537,7950	654,8900	7,2461	63,6359
BPA+D3-5	482,0240	458,5850	8,5478	131,4044
BPA+D3-6	391,6390	518,5800	6,4531	87,2156
BPA+D3-7	453,2730	672,6830	6,2587	95,2048
BPA+D3-8	554,5560	469,9170	7,8534	86,5237
BPA+D3-9	565,3640	559,2780	7,0516	97,3167
BPA+D3-10	453,5720	640,3750	7,1675	91,2620

K: Kontrol grubu, ZY: Vehicle (Zeytinyağı) grubu, BPA: BPA grubu, D3: D3 vitamini grubu, BPA+D3: BPA ve D3 vitamini grubu. GSH: Glutatyon, MDA: Malondialdehit, CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit dismutaz.

3.3.1.1. İleum Dokusu MDA ve GSH Düzeyleri

İleum dokusuna ait MDA ve GSH düzeyleri Tablo 3.5.'de sunulmuştur. Ratlara BPA uygulanması kontrol grubuna göre MDA seviyelerinde ciddi bir artışa ($p<0.01$) neden olurken, GSH seviyelerinde ise ciddi düşüşle ($p<0.01$) sonuçlanmıştır. Diğer yandan BPA ile birlikte D vitamini takviyesi yapıldığında (BPA+D3) ise tedavi yapılmayan gruba (BPA) göre MDA seviyesinde anlamlı düşüşler gözlemlenirken ($p<0.01$), GSH seviyelerinde ise ciddi iyileşmeler ($p<0.01$) olduğu tespit edilmiştir.

3.3.1.2. İleum Dokusu SOD ve CAT Aktivite Düzeyleri

İleum dokusuna ait SOD ve CAT aktivite düzeyleri Tablo 3.5.'de sunulmuştur. Ratlara BPA uygulaması kontrol grubuna göre doku antioksidan enzimleri olan SOD ve CAT aktivitelerinde ciddi düşümlere neden olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan BPA ile birlikte D vitamini uygulaması yapılması (BPA+D3), uygulama yapılmayan gruba kıyasla (BPA) hem SOD ($p<0.05$) hem de CAT ($p<0.01$) enzim aktivitelerinde ciddi iyileştirmelere neden olmuştur.

Tablo 3.6. İleum biyokimya sonuçları (2).

	TAS (mmol Trolox Equiv/L)	TOS (μ mol H ₂ O ₂ equivalent/L)	OSI [Arbitrary Unit (AU)]	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)
K-1	1,266953053	2,8	221,0026641	15,35	0,854
K-2	1,454740718	3,2	219,9704704	15,81	2,443
K-3	1,543418226	8,6	557,2047714	10,85	0,96
K-4	1,205891378	5,1	422,9236641	20,29	1,52
K-5	0,901196686	4,5	499,3360572	19,18	0,534
K-6	1,421601718	9,3	654,1916685	16,296	1,8622
K-7	1,462839745	6,2	432,3225781	14,39	1,253
K-8	1,356848753	5,8	530,6212152	18,12	1,342
K-9	1,019742834	4,9	241,3236752	17,15	1,714
K-10	1,356875442	5,4	512,1524536	15,53	1,14
ZY-1	1,528996625	4,6	300,850893	18,17	0,635
ZY-2	1,283522553	2,4	186,9854172	9,1	2,195
ZY-3	1,466400736	4,8	327,3320778	11,26	2,761
ZY-4	1,379871126	3	217,4116077	12,61	0,067
ZY-5	1,070266953	4,8	448,4862385	17,18	0,181
ZY-6	1,050322185	5,1	485,5652936	15,78	0,502
ZY-7	1,587103624	4,3	308,2159745	12,28	0,628
ZY-8	1,415743821	3,9	445,1298963	14,02	0,592
ZY-9	1,041473051	4,8	221,5261745	15,58	2,324
ZY-10	1,142358724	3,4	336,2154287	14,18	0,683
BPA-1	1,03602332	15,7	1515,409904	32,95	4,207
BPA-2	0,819975453	25,2	3073,262732	43,92	5,104
BPA-3	0,639367904	15,1	2361,707539	52,86	4,051
BPA-4	1,002997852	17,1	1704,888995	33,14	3,839
BPA-5	0,536330163	13,8	2573,041936	47,96	4,832
BPA-6	0,402301319	37,7	9371,085348	55,3	7,114
BPA-7	0,677541839	17,8	1561,574665	33,54	4,561
BPA-8	0,615918349	31,3	6659,313486	45,27	5,984
BPA-9	0,872636178	16,5	2457,817396	54,36	3,995
BPA-10	0,791543672	17,4	3054,224823	44,25	4,891
D3-1	1,649892605	3,9	236,3790218	13,17	0,987
D3-2	2,360540043	3,9	165,2164305	15,16	0,343
D3-3	2,250997238	5,9	262,1060523	21,44	1,023
D3-4	1,393679043	4,6	330,0616469	12,71	0,398
D3-5	2,381098496	10,8	453,5721649	11,52	1,551
D3-6	2,510892912	4,8	191,1670536	11,45	1,271
D3-7	2,462781452	5,7	344,2748115	16,54	0,394
D3-8	1,723548169	4,9	289,2674821	14,62	1,374

Tablo 3.6. İleum biyokimya sonuçları (2) (devamı).

D3-9	1,926431267	6,2	187,5257614	11,87	0,985
D3-10	2,252533427	5,8	271,2664935	13,94	0,962
BPA+D3-1	1,198833998	13,1	1092,728436	23,17	2,695
BPA+D3-2	1,206811905	7,3	604,8995678	35,16	1,532
BPA+D3-3	1,754219086	5,4	307,8292811	21,44	1,967
BPA+D3-4	1,391224302	10,4	747,5430084	32,71	2,142
BPA+D3-5	1,150659712	13	1129,786667	21,52	2,054
BPA+D3-6	1,317275238	8,2	622,4970883	31,45	2,012
BPA+D3-7	1,623581627	7,6	1011,266738	32,48	2,031
BPA+D3-8	1,342162842	12,8	629,2686345	22,62	2,064
BPA+D3-9	1,214369742	8,7	727,6389716	31,63	2,195
BPA+D3-10	1,165364924	9,1	635,3485647	23,57	1,983

K: Kontrol grubu, ZY: Vehicle (Zeytinyağı) grubu, BPA: BPA grubu, D3: D3 vitamini grubu, BPA+D3: BPA ve D3 vitamini grubu.

3.3.1.3. İleum Dokusu TAS, TOS ve OSI Düzeyleri

İleum dokusuna ait TAS, TOS ve OSI düzeyleri Tablo 3.6.'da sunulmuştur. Deney hayvanlarına BPA uygulanması kontrol grubuna kıyasla doku TAS düzeylerinde ciddi düşümlere ($p<0.01$) neden olurken, doku TOS ve OSI değerlerinde ise ciddi artışlarla ($p<0.05$) sonuçlanmıştır. Ancak ratlara BPA ile birlikte D vitamini takviyesi yapılması (BPA+D3), tedavi yapılmayan gruba kıyasla TAS düzeylerinde ciddi artışlara ($p<0.01$) neden olurken TOS ve OSI değerlerinde ise ciddi düşümlere ($p<0.05$) neden olmuştur.

3.3.2. İnflamasyon Belirteçlerinin Düzeyi

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

3.3.2.1. İleum Dokusu TNF- α ve IL-6 Düzeyleri

İleum dokusuna ait TNF- α ve IL-6 düzeyleri Tablo 3.6.'da sunulmuştur. Ratlara BPA uygulanması ileum dokusunda inflamasyona sebep olarak, kontrol grubuna kıyasla TNF- α ve IL-6 düzeylerinde ciddi artışlara ($p<0.01$) neden olmuştur. Diğer yandan ratlara PBA yanında D vitamini verilmesi (BPA+D3), takviye yapılmayan gruba göre (BPA) inflamasyonda ciddi baskılanmaya neden olarak TNF- α ve IL-6 düzeylerinde ciddi düşümler ($p<0.01$) gözlenmesine neden olmuştur.

Tablo 3.7. İleum biyokimya Anova test sonuçları.

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GSH (nmol/g yaş doku)	Between Groups	1949022.143	4	487255.536	7.195	<.001
	Within Groups	3047525.810	45	67722.796		
	Total	4996547.954	49			
MDA (nmol/g yaş doku)	Between Groups	3350178.532	4	837544.633	116.442	<.001
	Within Groups	323675.039	45	7192.779		
	Total	3673853.571	49			
CAT (K/g protein)	Between Groups	192.314	4	48.079	19.110	<.001
	Within Groups	113.216	45	2.516		
	Total	305.530	49			
SOD (U/g protein)	Between Groups	36933.652	4	9233.413	22.683	<.001
	Within Groups	18318.075	45	407.068		
	Total	55251.727	49			
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	Between Groups	9.278	4	2.319	36.280	<.001
	Within Groups	2.877	45	.064		
	Total	12.155	49			
TOS (μ mol H ₂ O ₂ equivalent/L)	Between Groups	1853.551	4	463.388	28.899	<.001
	Within Groups	721.558	45	16.035		
	Total	2575.109	49			
OSI [Arbitrary Unit (AU)]	Between Groups	72797353.16 3	4	18199338.29 1	13.669	<.001
	Within Groups	59915335.22 2	45	1331451.894		
	Total	132712688.3 85	49			
TNF- α (ng/L)	Between Groups	6788.762	4	1697.191	65.376	<.001
	Within Groups	1168.227	45	25.961		
	Total	7956.990	49			
IL-6 (ng/L)	Between Groups	106.005	4	26.501	51.778	<.001
	Within Groups	23.032	45	.512		
	Total	129.037	49			

GSH: Glutasyon, MDA: Malondialdehit, CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit dismutaz, TAS: Toplam antioksidan durumu, TOS: Toplam oskidan durumu, OSI: Doku oksidatif stres indeksi, TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa, IL-6: İnterlökin-6.

Tüm değişkenler için Significance değeri 0.05'ten düşük olduğu için gruplar içerisinde tüm değişkenlerde en az 1 anlamlı farklılık olduğu söylenmektedir. Bu farklılığın hangi gruplar arasında olabileceğini test ederken kullanacağımız Post-Hoc test seçimi için değişkenlerin Homojen varyanslılıklarının incelenmesi gerekmektedir.

Tablo 3.8. Varyansların homojenlik testleri (İleum biyokimya).

Tests of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
GSH (nmol/g yaş doku)	Based on Mean	11.153	4	45	<.001
	Based on Median	2.040	4	45	.105
	Based on Median and with adjusted df	2.040	4	9.319	.169
	Based on trimmed mean	7.564	4	45	<.001
MDA (nmol/g yaş doku)	Based on Mean	1.492	4	45	.221
	Based on Median	1.498	4	45	.219
	Based on Median and with adjusted df	1.498	4	40.487	.221
	Based on trimmed mean	1.481	4	45	.224
CAT (K/g protein)	Based on Mean	4.175	4	45	.006
	Based on Median	3.828	4	45	.009
	Based on Median and with adjusted df	3.828	4	31.927	.012
	Based on trimmed mean	4.194	4	45	.006
SOD (U/g protein)	Based on Mean	.355	4	45	.839
	Based on Median	.342	4	45	.848
	Based on Median and with adjusted df	.342	4	43.864	.848
	Based on trimmed mean	.352	4	45	.841
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	Based on Mean	3.909	4	45	.008
	Based on Median	1.469	4	45	.227
	Based on Median and with adjusted df	1.469	4	24.682	.242
	Based on trimmed mean	3.624	4	45	.012
TOS (μ mol H ₂ O ₂ equivalent/L)	Based on Mean	10.563	4	45	<.001
	Based on Median	2.724	4	45	.041
	Based on Median and with adjusted df	2.724	4	11.886	.080
	Based on trimmed mean	8.503	4	45	<.001
OSI [Arbitrary Unit (AU)]	Based on Mean	10.373	4	45	<.001
	Based on Median	3.945	4	45	.008
	Based on Median and with adjusted df	3.945	4	9.167	.040
	Based on trimmed mean	7.330	4	45	<.001
TNF- α (ng/L)	Based on Mean	6.950	4	45	<.001
	Based on Median	6.806	4	45	<.001
	Based on Median and with adjusted df	6.806	4	18.555	.001
	Based on trimmed mean	6.933	4	45	<.001

Tablo 3.8. Varyansların homojenlik testleri (İleum biyokimya) (devamı).

IL-6 (ng/L)	Based on Mean	4.393	4	45	.004
	Based on Median	2.016	4	45	.108
	Based on Median and with adjusted df	2.016	4	25.050	.123
	Based on trimmed mean	4.011	4	45	.007

GSH: Glutatyon, MDA: Malondialdehit, CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit dismutaz, TAS: Toplam antioksidan durumu, TOS: Toplam oksidan durumu, OSI: Doku oksidatif stres indeksi, TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa, IL-6: İnterlökin-6.

MDA ve SOD değişkenlerinin Homojen Varyans testi Significance (Sig.) değerleri 0,05'in üzerinde olduğundan grupların bu değişkenler için homojen varyanslı oldukları kabul edilmiştir, buna ek olarak eşit popülasyona sahip çok sayıda grup bulunduğundan TUKEY testi uygulanmıştır. Buna karşın GSH, CAT, TAS, TOS, OSI, TNF- α ve IL-6 değişkeninin Sig. değeri 0,05 in altında çıktığından, gruplar arası karşılaştırmalarda incelediğimiz Post-Hoc testlerde Tamhane-T2 testi sonucu incelenmiştir.

Yapılan Post-Hoc testlerin sonuçları tüm değişkenler için ayrı ayrı olacak şekilde, her bir grubun bir diğerine göre farklılıklarının anlamlı olup olmadığı incelenmiştir, Sig. değeri 0.05'ten küçük olan kombinasyonlar istatistiksel olarak anlamlı farklılıklara işaret etmektedir.

Tablo 3.9. Güven Aralıkları (İleum biyokimya) (1)

GRUP	GSH (nmol/g yaş doku)	MDA (nmol/g yaş doku)	CAT (K/g protein)	SOD (U/g protein)
Grup 1: K	601,04-/ +8,41	289,2-/ +343,65	8,46-/ +0,89	113,8-/ +14,3
Grup 2: ZY	662,36-/ +62,74	225,14-/ +275,04	8,62-/ +1,11	129,63-/ +15,19
Grup 3: BPA	351,16-/ +41,33	868,89-/ +946,98	3,95-/ +0,81	52,81-/ +15,97
Grup 4: D3	948,36-/ +406,09	192,45-/ +228,58	9,56-/ +1,85	118,82-/ +14,04
Grup 5: BPA+D3	506,69-/ +51,55	585,56-/ +660,03	7,08-/ +0,58	92,58-/ +12,42

GSH: Glutatyon, MDA: Malondialdehit, CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit dismutaz. Grup 1 ile grup 3 ve grup 2 ile grup 3 arasında anlamlı fark vardır ($p < 0.05$)

Tablo 3.10. Güven Aralıkları (İleum biyokimya) (2)

GRUP	TAS (mmol Trolox Equiv/L)	TOS (μmol H₂O₂ equivalent/L)	OSI [Arbitrary Unit (AU)]	TNF-α (ng/L)	IL-6 (ng/L)
Grup 1: K	1,3-/+0,15	5,58-/+1,48	429,1-/+109,68	16,3-/+1,9	1,36-/+0,39
Grup 2: ZY	1,3-/+0,15	4,11-/+0,65	327,77-/+74,54	14,02-/+1,99	1,06-/+0,7
Grup 3: BPA	0,74-/+0,14	20,76-/+5,72	3433,23-/+1830,76	44,36-/+6,21	4,86-/+0,73
Grup 4: D3	2,09-/+0,28	5,65-/+1,42	273,08-/+62,31	14,24-/+2,17	0,93-/+0,3
Grup 5: BPA+D3	1,34-/+0,15	9,56-/+1,92	750,88-/+183,31	27,58-/+3,95	2,07-/+0,2

TAS: Toplam antioksidan durumu, TOS: Toplam oskidan durumu, OSI: Doku oksidatif stres indeksi, TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa, IL-6: İnterlökin-6. Grup 1 ile grup 3 ve grup 2 ile grup 3 arasında anlamlı fark vardır ($p<0.05$).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kontrol, zeytinyağı ve D3 gruplarında birbirine benzer ve kontrol grubuna benzer şekilde normal histolojik görüntü bulunması beklenen bir sonuçtur. Tek başına zeytinyağı ya da D3 vitamini kullanımının barsak bütünlüğünde bir değişime neden olmadığı gözlemlenmiştir. Kontrol, zeytinyağı ve D3 vitamini kullanılan gruplarda villuslar, prizmatik hücreler tarafından sınırlanmış normal epitel yapısı göstermiştir. BPA kullanılan grupta ise lamina propria hiperplazi gösteren hücrelere rastlanmış, villuslar dejenere olmuş, dejenere olmayanlar ise ödemli hale gelmiştir.

Vrdoljak vd. (2022), zeytinyağının bağırsakta inflamasyona bağlı değişiklikleri azalttığını ifade etmiştir. Her ne kadar zeytinyağında bulunan biyofenoller, bağırsaktan emiliyor ve bu yolla intestinal epitelyal homeostazı ve bağırsak mikrobiyotasını düzenliyor olsa da zeytinyağı kullanımının kullanılmamasına oranla bağırsakta belirgin değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. Bir başka deyişle, toksinler (BPA), stres ve kötü beslenme (malnütrisyon ya da belirli besin gruplarının fazladan tüketilmesi) bulunmadığı sürece zeytinyağı alımının bağırsakta bir farklılığa neden olmadığı sonucuna varılabilir. Aynı yayında kullanılan zeytinyağının niteliğinin önemine de değinilmiştir, bizim yaptığımız çalışmada, marketlerde satılan, halk tarafından kolayca ulaşılabilen, orta kalitede olduğu kabul edilen zeytinyağı kullanılmış, bağırsak bütünlüğünü korumak açısından zeytinyağının dikkat çeken bir etkinliğinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

D3 vitamini gibi yağda eriyen bütün vitaminler için emilim yeri ince bağırsaklardır. Genellikle bu vitamin de zeytinyağı gibi bir çözücü içinde takviye olarak satılmaktadır. Mouli ve Ananthakrishnan (2014), insanda bağırsağın akut ya da kronik inflamasyonlarında D3 vitaminin inflamasyonu azaltıcı etkisinden bahsetmişlerdir. 2016 yılında Johns vd. idrar BPA düzeyi ve dolaşımdaki D vitamini arasındaki bir ilişki olup olmadığını saptamak üzere Amerika'da retrospektif olarak yaptıkları çalışmada, kadınlarda belirgin bir şekilde idrardaki BPA düzeyi arttıkça kan dolaşımındaki D vitamini düzeyinin azaldığı sonucuna ulaşmışlardır. Ancak erkeklerde böyle belirgin bir ilişki tespit edilememiştir. Brandi vd. (2022) tarafından

İtalya’da yapılan bir başka retrospektif çalışmada, merkeze belirlenen zaman aralığında gelen yaşlı bireylerde serum D vitamini ve idrar BPA değerleri arasındaki ilişki saptanmaya çalışılmış, D vitamininin kemik sağlığı üzerindeki önemli etkileri sebebiyle BPA’nın bu emilimi azaltmış olabileceğine vurgu yapılmış, ileri araştırmaların gerekliliğinin altı çizilmiştir.

Wang vd. (2020), maternal kaynaklı D vitamininin, perinatal olarak BPA’ya maruz kalmış dalak Th17 tipi lenfositlerin artışını baskımlarken, Th17 tip lenfosit kaynaklı sitokinlerin salınımını artırdığı sonucuna ulaşmışlardır. Pro-inflamatuar özellikleri ile ön plana çıkan Th17 tipi hücrelerin mukozal bariyerlerin korunmasında ve mukozal yüzeylerde patojen klirensine katkıda bulunmada önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

Salehpour vd. (2021) insan yağ kaynaklı mezenşimal kök hücrelerde BPA ve D vitamini kullanarak yağ hücrelerinin verdiği cevabı izlemiştir. Sonuç olarak BPA ve D vitaminin birlikte verildiği grupta adipogenezisi indükleyen gen ekspresyonlarının arttığını bildirmişlerdir.

Otsuka vd.’nin (2012) BPA alımının gebe dişi ratlarda serum kalsiyum düzeylerini ve kalsiyum emilimini etkilediğini belirlemeye çalıştıkları araştırmalarında, BPA grubunda serum kalsiyum düzeyinin kontrol gruplarına göre belirgin derecede düşük olduğunu bildirmişler ancak, organ histolojisine ilişkin veri sunmamışlardır.

Üç farklı BPA dozunun denendiği ve Peyer plaklarında CD4⁺ ve CD8⁺ lenfositlerin miktar ve dağılımının değerlendirildiği çalışmada Özaydın vd. (2018), uygulanan BPA dozu arttıkça Peyer plaklarında lokalize olmuş CD4⁺ ve CD8⁺ lenfositlerin sayısının arttığını ve yerleşimlerinin interfoliküler alana doğru kaydığını immunohistokimyasal metotla, lenfoid dokunun genel görüntüsünün kullanılan doz ile paralel olarak bozulduğunu ise rutin histolojik teknikler kullanarak göstermişlerdir. Bu çalışmada lenfosit tiplendirmesi yapılmamıştır ancak bu araştırmanın histopatolojik bulguları Özaydın vd. (2018) ile uyum göstermektedir.

Domuz ileumunda yüksek ve düşük doz BPA’nın enterik nervöz sistem üzerine etkisi araştırılmış (Szymanska vd., 2018), yüksek doz BPA verilen domuzların ileumlarında diğer gruplara oranla çok yüksek miktarda eozinofil granülosit bulunduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ise BPA tek dozda uygulanmış ve sınırlı sayıda eozinofil granülosit gözlenmiştir. Peyer plakları ile ilgili olarak, düşük doz

grubunda bunların sınırlarının belirgin olduğuna vurgu yapan araştırmacılar, yüksek doz grubunda bu sınırların olmadığı, lenfoid dokuların birbiri ile birleştiğini de bildirmişlerdir (Szymanska vd., 2018). Bu veriler bizim verilerimizle benzerlik göstermektedir.

BPA ve di(2-ethylhexyl) fitalatın farklı visseral organlar üzerinde etkisini inceleyen Omorodion vd. (2019) bağırsak kesitlerinde bu çalışmanın bulgularına paralel şekilde villuslarda dejenerasyon, doku ödemi ve bütünlüğü bozulmuş doku örnekleri ile karşılaşmışlardır.

Ambreen vd. (2019) farklı dozlardaki BPA uygulamalarının iz element emiliminde değişikliğe yol açıp açmayacağını görmek istedikleri çalışmalarında, düşük doz ve kısa süreli BPA uygulamalarında bizim sonuçlarımıza göre daha az belirgin, yüksek doz ve uzun süreli BPA uygulamalarında ise bizim bulgularımıza oranla daha şiddetli doku dejenerasyonu ile karşılaşmışlardır. Gastrointestinal toksisitenin belirlenmesinde serum metalik konsantrasyonu en yaygın kullanılan tanısal faktör olduğu için iz elementlerin emilimine dayanan çalışmada, villuslarda görülen bu dejenerasyonun ince bağırsakta kalsiyum birikimine sebep olduğu gösterilmiş ancak bu dejenerasyonun azaltılmasına yönelik bir ajan kullanılmamıştır.

Sharma vd. nin (2021) BPA ve Bisfenol-S (BPS)'nin çeşitli dokulara etkisini değerlendirmek istediği çalışmada, yine bizim çalışmamızda bulduğumuza benzer şekilde, hiperkromatik nükleuslu hücre sayısında, eozinofil granülosit sayısında, plazma hücresi ve mitozis sayısında artış tespit etmişlerdir. Goblet hücrelerin sayısındaki dolaylı azalmayı enterit olarak yorumlayan araştırmacılar, ek olarak hücrel değişikliklerin displaziye düşündürdüğünün altını çizmiştir ve bu yönüyle bağırsak ile ilgili bulguları yine bizim çalışmamızın bulguları ile uyum göstermektedir. Ancak bu araştırmacıların çalışmasında da ileum dokusuna odaklanılarak Peyer plakları ile ilgili değerlendirme yapılmamıştır.

Prenatal dönemde BPA'ya maruz kalmanın ve postnatal trans yağlı diyet ile beslenmenin ince barsak morfolojisini ve DNA metilasyonunu değiştirdiğini gözlemleyen Zulkifli vd. (2022), prenatal dönemde BPA'ya maruz kalmanın obezite ile ilişkilendirilemeyeceğini ancak trans yağ yönünden zengin diyet ile beslenmenin obeziteye sebep olabileceği sonucuna varmıştır. Bağırsak mikromorfolojisine ilişkin bulguları bizim bulgularımız ile benzerlik gösteren araştırmacılar, çocukluk döneminde

BPA'ya maruz kalmanın obezite ile ilişkili olabileceğine de vurgu yapmışlardır (Zulkifli vd. 2022).

BPA'ya maruz bırakılan ve gebeliklerinin 2, 7, 14 ve 21. günlerinde organ örnekleri alınan ratlarda, Kamaludin vd. (2022) ileum örneklerinde intestinal bariyerin korunmadığı belirtilmiş ancak yine de Peyer plakları ile ilgili değerlendirmede bulunmamışlardır.

Yapılan araştırmada Peyer Plaklarında ve villuslarda yerleşmiş apoptotik hücre miktarının, BPA kaynaklı hasarın tespiti ve D3 vitaminin bu hasarı önleme konusundaki başarısı ya da başarısızlığı yönünden bir kriter olması hedeflenmiştir. Bunun yanında doku örnekleri, GSH, MDA, CAT, SOD, TAS, TOS, OSI, TNF- α , IL-6 yönünden de değerlendirilerek, toksik bir madde olan BPA'nın ileum dokusunda sebep olduğu oksidatif hasar ve yine D3 vitamininin antioksidan etkisinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Aynı zamanda GLU, CHOL, TG, HDL ve LDL değerleri de incelenmiştir.

Rameshrad vd. (2019) BPA'nın metabolik sendrom üzerindeki etkisini belirlemeye çalıştıkları araştırmalarında, bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak serum CHOL, TG ve LDL miktarlarının BPA (35 mg/kg/gün, gavaj, 2 ay) maruziyeti ile arttığını tespit etmişlerdir. Fadishei vd. (2020) da yaptıkları çalışmada BPA'nın metabolik hastalıklar üzerindeki etkisini incelemişler ve çalışmamızla uyumlu olarak BPA (30 mg/kg/gün, gavaj, 54 gün) maruziyeti ile TG, CHOL, LDL serum seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak oral yol ile 30 gün süreyle 25 mg/kg BPA'ya maruz bırakılan yetişkin Wistar albino erkek ratların ileum bağırsak duvarında dejeneratif bozukluklar yanında bağırsak lenf nodüllerinde apoptoz gözlenmiştir. Aynı doz ve süreyle BPA'ya maruz bırakılan yetişkin Wistar albino erkek ratlara oral yoldan günlük 400 IU D3 vitamini verilmesi durumunda ileum bağırsak duvarında ve lenf nodüllerinde gözlenen bozuklukların ortadan kalktığı histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak ortaya konmuştur. BPA'ya oral yoldan maruz kalmanın ileum bağırsak duvarında meydana getireceği olumsuz etkilerin günlük referans dozlarında vitamin D3 takviyesi ile azaltılması ya da ortadan kaldırılması mümkündür.

Yapılan literatür taramasında BPA ile yapılan çok sayıda çalışma bulunmasına karşın, antioksidan özellikleri geri planda kalan D vitamini ile BPA arasındaki

ilişkinin bağırsak sağlığını nasıl etkilediğini gösteren bir yayına rastlanmamıştır. Son dönemde karşı karşıya kalınan pandeminin ardından bağışıklık güçlendirici yönleri ile ön plana çıkan D3 vitamini ve yine ikinci beyin olarak isimlendirilmiş ve bu ismi bilim çevrelerinde kabul gören bağırsaklar ile ilgili olarak literatürde mevcut olan boşluğun doldurulması bakımından yapılan çalışma önem arz etmektedir.



KAYNAKLAR

- Acconica, F., Pallottini, V. ve Marino, M. (2015) Molecular mechanisms of action of BPA, *An International Journal*, October-December, 1-9. DOI: 10.1177/1559325815610582
- Adamkov, M. (2019). Logical complexity of Bcl-2 family proteins function in the intrinsic apoptosis. *Department of Histology and Embryology*, 147(1-2), 98-104. DOI: <https://doi.org/10.2298/SARH190124010A>
- Adrain, C., Murphy, B.M. ve Martin, S.J. (2005). 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. DOI 10.1074/jbc.M410915200
- Ambreen, S., Akhtar, T., Hameed, N. Vd. (2019) In Vivo Evaluation of Histopathological Alterations and Trace Metals Estimation of the Small Intestine in Bisphenol A-Intoxicated Rats, *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, ID 9292316, 7 pages. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/9292316>
- American Chemistry Council (2013-2021) Where is BPA used? Eriřim:[<https://www.factsaboutbpa.org/bpa-overview/bpa-basics/>], Eriřim tarihi:18.05.2021.
- Arditsoglou, A. ve Voutsas, D. (2010) Partitioning of endocrine disrupting compounds in inland waters and wastewaters discharged into the coastal area of Thessaloniki, Northern Greece, *Environ Sci Pollut Res*, 17, 529-538. DOI 10.1007/s11356-009-0172-y
- Aslan, R., Kutlu, R., Civi, S. vd. (2014). The correlation of the total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and paraoxonase activity (PON1) with smoking. *Clinical Biochemistr*, 47, 393-397. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.10.002>
- Atasever, A. (2015). Usnea Longissima Ach. Liken Türünden Elde Edilen Total Ekstraktın in Vitro Ortamda Rat İleum Motilitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bacha, W.J. ve Bacha, L.M. (2006). *Color Atlas of Veterinary Histology*. (2. Baskı). Australia: Blackwell Publishing.
- Barker, N. (2013) Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration, *Molecular Cell Biology*, 15, 19-33. doi:10.1038/nrm3721
- Barman, J., Kumar, R., Saha, G.vd. (2018). Apoptosis: mediator molecules, interplay with other cell death processes and therapeutic potentials. *Curr Pharm Biotechnol*, 19, 644-663. DOI: 10.2174/1389201019666180821093239

- Becker, K., Göen, T., Seiwert, M. vd. (2009) GerES IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 212, 685-692. doi:10.1016/j.ijheh.2009.08.002
- Belfroid, A., Velzen, M., Horst, B. vd. (2002) Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements, *Chemosphere*, 49, 97-103. DOI: 10.1016/s0045-6535(02)00157-1
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S. vd. (2014) Oxidative Stress: An Essential Factor In The Pathogenesis Of Gastrointestinal Mucosal Diseases, *American Physiological Society*, 94, 329-354. doi:10.1152/physrev.00040.2012
- Bikle, D. (2007) Vitamin D Insufficiency/Deficiency in Gastrointestinal Disorders, *Journal of bone and mineral research*, 22, 50-54. doi: 10.1359/JBMR.07S208
- Boice, A. ve Bouchier-Hayes, L. (2020). Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1867(6), 118688. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118688>
- Bortner, C.D., Oldenburg, N.B. ve Cidlowski, J.A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 5, 21–6. DOI: 10.1016/s0962-8924(00)88932-1
- Brandi, M., Bandnelli, S., Iantomasi, T. vd. (2022) Association between vitamin D and bisphenol A levels in an elderly Italian population: results from the InCHIANTI study, *Endocrine Connections*, 11, e210571. DOI: <https://doi.org/10.1530/EC-21-0571>
- Braniste, V., Jouault, A., Gaultier, E. vd. (2010) Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats, *PNAS*, 107, 448-453. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0907697107>
- Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A. vd. (1997). 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. DOI: 10.1074/jbc.272.42.26159
- Bucak, M.N., Satılmış, M., Kızıl, S. vd. (2010). Sığır Embriyolarının in vitro Gelişiminde Kültür Medyumlarına Katılan Antioksidanların Etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 16 (1), 69-74. DOI:10.9775/kvfd.2009.413
- Burnie, J.P., Coke, A., Matthews, R.C. (1992) Restriction endonuclease analysis of *Aspergillus fumigatus* DNA, *J Clin Pathol*, Apr;45(4), 324-327. doi: 10.1136/jcp.45.4.324. PMID: 1349614; PMCID: PMC495273.
- Calafat, A., Weuve, J., Ye, X. vd. (2009) Exposure to Bisphenol A and Other Phenols in Neonatal Intensive Care Unit Premature Infants, *Environmental Health Perspectives*, 117(4), 639-644. doi:10.1289/ehp.0800265
- Calafat, A., Ye, X., Wong, L. vd. (2008) Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003–2004, *Environmental Health Perspectives*, 116(1), 39-44. doi:10.1289/ehp.10753
- Cao, X., Corriveau, J. ve Popovic, S. (2010) Bisphenol A in Canned Food Products from Canadian Markets, *Journal of Food Protection*, 73(6), 1085-1089. DOI: 10.4315/0362-028x-73.6.1085

- Carson, D.A. ve Rbiero, J.M. (1993). Apoptosis and disease. *The Lancet*, 341: 1251-1254. DOI: 10.1016/0140-6736(93)91154-e
- Caulin, C., Salvesen, G.S. ve Oshima, R.G. (1997). Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 138(6), 1379-1394. doi: 10.1083/jcb.138.6.1379
- Celepli, S., Bigat, İ. ve Celepli, P. (2020). Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji*, 24(3), 103-111.
- Chang, S.H., Chung, Y. ve Dong, C. (2010) Vitamin D Suppresses Th17 Cytokine Production by Inducing C/EBP Homologous Protein (CHOP) Expression, *The Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 38751-38755. DOI 10.1074/jbc.C110.185777
- Chen, D., Kannan, K., Tan, H. vd. (2016) Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review, *American Chemical Society*, 50, 5438-5453. DOI: 10.1021/acs.est.5b05387
- Choo, Z., Loh, A.H.P. ve Chen, Z.X. (2019). Destined to die: Apoptosis and pediatric cancers. *Cancers*, 11(11), 1623. doi:10.3390/cancers11111623
- Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A. vd. (2016) Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects, *Physiol Rev*, 96, 365-408. doi:10.1152/physrev.00014.2015
- Cighetti, G., Duca, L., Bortone, L. vd. (2002). Oxidative Status and Malondialdehyde in β -thalassaemia Patients. *European Journal of Clinical Investigation*. 32, 55-601. doi: 10.1046/j.1365-2362.2002.0320s1055.x.
- Cooper, J., Kendig, E. ve Belcher, S. (2011) Assessment of Bisphenol A Released from Reusable Plastic, Aluminium and Stainless Steel Water Bottles, *National Institutes of Health*, 85(6), 943-947. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.06.060.
- Crain, D., Eriksen, M., Iguchi, T. vd. (2007) An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology, *Reproductive Toxicology*, 24, 225-239. doi:10.1016/j.reprotox.2007.05.008
- Çaylak, E. (2011). Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tip Araştırmaları Dergisi*. 9 (1) , 73-83.
- D'arcy, M. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*. 43, 582-592. doi: 10.1002/cbin.11137
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J., Giudice, L. vd. (2009) Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement, *Endocrine Reviews*, 30, 293-342. doi: 10.1210/er.2009-0002
- Dignass, A.U. (2001) Mechanisms and Modulation of Intestinal Epithelial Repair, *Inflammatory Bowel Diseases*, 7(1), 68-77. doi: 10.1097/00054725-200102000-00014.
- Dursun, N. (2001) *Veteriner Anatomi II*. (7. Baskı) Ankara: Medisan Yayınevi, 52-56.
- Eagleson, C., Gingrich, M., Pastor, C. vd., (2000) Polycystic Ovarian Syndrome: Evidence that Flutamide Restores Sensitivity of the Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator to Inhibition by Estradiol and Progesterone, *The*

- Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85, 4047-4052. doi: 10.1210/jcem.85.11.6992.
- EFSA (2015) Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. 13th ed. Vol.1, European Food Safety Authority, Parma, Italy. doi:10.2903/j.efsa.2015.3978
- Ellman, G.L., (1959) Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys*, May;82(1), 70-7. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6. PMID: 13650640.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516. DOI: 10.1080/01926230701320337
- Erdem, E. (2013). Etanolün Siçan Testis Dokusunda Meydana Getirdiği Apoptotik Değişiklikler Üzerine Elettaria Cardamomum 'Un Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*. Elazığ.
- Erel, O. (2004) A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clin Biochem*, Apr;37(4), 277-285. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015. PMID: 15003729.
- Erel, O. (2005) A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clin Biochem*, Dec;38(12), 1103-1111. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008. PMID: 16214125.
- Eurell, C. (2003). *Veterinary Histology*. United States: Teton NewMedia.
- Fadishei, M., Rahbardar, M.G., Imenshahidi, M. vd. (2020) Effects of Nigella sativa oil and thymoquinone against bisphenol A-induced metabolic disorder in rats, *Phytotherapy Research*, 1-20. DOI: 10.1002/ptr.6944
- Fasano, A. ve Shea-Donohue, T. (2005) Mechanisms of Disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases, *Gastroenterology & Hepatology*, 2(9), 416-422. doi:10.1038/ncpgasthep0259
- Feng, L., Chen, S., Zhang, L. vd. (2019) Bisphenol A increases intestinal permeability through disrupting intestinal barrier function in mice, *Environmental Pollution*, 254, 112960. DOI: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112960
- Fink, S.L. ve Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73, 1907-1916. DOI: 10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005.
- Frappier, B. (2006). Digestive System. İçinde Eurell C ve Frappier B (Edt.), *Dellman's Veterinary Histology*. (ss. 170-211). USA: Blackwell Publishing.
- Freeman, B.A. ve Crapo, J.D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47, 412-426.
- Garret, W., Gordon, J. ve Glimcher, L. (2010) Homeostasis and Inflammation in the Intestine, *National of Health Institutes*, 140(6), 859-870. doi:10.1016/j.cell.2010.01.023.
- Gatti, R., Belletti, S., Orlandini, G. vd. (1998). 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. doi: 10.1177/002215549804600804.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. ve Ben-Sasson, S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119, 493-501. doi: 10.1083/jcb.119.3.493.
- Geens, T., Goeyens, L. ve Covaci, A. (2011) Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked?, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 339-347. doi:10.1016/j.ijheh.2011.04.005
- Geens, T., Goeyens, L., Kannan, K. vd. (2012) Levels of bisphenol-A in thermal paper receipts from Belgium and estimation of human exposure, *Science of the Total Environment*, 435-436, 30-33. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.07.001
- Geens, T., Roosens, L., Neels, H. vd. (2009) Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium, *Chemosphere*, 76, 755-760. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.05.024
- Graham, R.K., Ehrnhoefer, D.E. ve Hayden, M.R. (2011). Caspase-6 and neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 34, 646-56. doi:10.1016/j.tins.2011.09.001
- Grilo, A.L. ve Mantalaris, A. (2019). Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology advances*, 37, 459-75. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.012>
- Gutteridge, J.M.C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 41, 1819-1828.
- Guyton, A.C. ve Hall, J.E. (2007) *Tıbbi fizyoloji*. (11. Baskı) Nobel Tıp Kitabevleri, 771-824.
- Güleş, Ö. ve Eren, Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 73-78.
- Haishima, Y., Hayashi, Y., Yagami, T. vd. (2001) Elution of Bisphenol-A from Hemodialyzers Consisting of Polycarbonate and Polysulfone Resins, *John Wiley & Sons*, 58, 209-215. doi: 10.1002/1097-4636(2001)58:2<209::aid-jbm1009>3.0.co;2-7
- Halliwell, B. (1994). Antioxidants and Human Disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*, 344, 721-724. doi: 10.1016/s0140-6736(94)92211-x.
- Hanaoka, T., Kawamura, N., Hara, K. vd. (2002) Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents, *Occup Environ Med*, 59, 625-628. doi: 10.1136/oem.59.9.625
- Holick, M.F. (2004) Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease, *Am J Clin Nutr*, 80, 1678-1688. DOI: 10.1093/ajcn/80.6.1678S
- Holick, M.F. (2006) Resurrection of vitamin D deficiency and rickets, *The Journal of Clinical Investigation*, 116 (8), 2062-2072. doi:10.1172/JCI29449.

- Holick, M.F., Biancuzzo, R.M., Chen, T.C. vd. (2008) Vitamin D2 Is as Effective as Vitamin D3 in Maintaining Circulating Concentrations of 25-Hydroxyvitamin D, *J Clin Endocrinol Metab*, 93(3), 677-681. doi: 10.1210/jc.2007-2308
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D. vd. (2002) Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction, *Reproductive Toxicology*, 16, 117-122. doi: 10.1016/s0890-6238(02)00006-0.
- Jiao, N., Xu, D., Qiu, K. vd. (2020) Restoring mitochondrial function and normalizing ROS-JNK/ MAPK pathway exert key roles in glutamine ameliorating bisphenol A-induced intestinal injury, *The FASEB Journal*, 0, 1-20. DOI: 10.1096/fj.201902503R
- Johns, L.E., Ferguson, K.K. ve Meeker J.D. (2016) Relationships Between Urinary Phthalate Metabolite and Bisphenol A Concentrations and Vitamin D Levels in U.S. Adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 2005–2010, *J Clin Endocrinol Metab*, 101(11), 4062-4069. doi: 10.1210/jc.2016-2134
- Kamaludin, R., Rasdi, Z., Othman, M.H.D. vd. (2022) The Effect of BPA-Treated Water on the Small Intestine via an In Vivo Study, *Toxics*, 10, 296. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxics10060296>
- Kanoh, M., Takemura, G., Misao, J. vd. (1999). 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. doi: 10.1161/01.cir.99.21.2757.
- Kehrer, J.P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 23 (1), 21-48. doi: 10.3109/10408449309104073.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-257. doi: 10.1038/bjc.1972.33.
- Khosla, S. (2001) The OPG/RANKL/RANK System, *Endocrinology*, 142(12), 5050-5055. doi: 10.1210/endo.142.12.8536.
- Kim-Campbell, N., Gomez, H. ve Bayir, H. (2019). Cell death pathways: Apoptosis and regulated necrosis. *Critical Care Nephrology*, 113-121, e112.
- Kockx, M.M., Muhring, J., Knaapen, M.W.M. vd. (1998). RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 152, 885.
- Kohen, R. ve Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30(6), 620-650. DOI: 10.1080/01926230290166724
- Kong, J., Zhang, Z., Musch, M.W. vd. (2007) Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, 208-216. doi:10.1152/ajpgi.00398.2007.
- Konieczna, A., Rutkowska, A. ve Rachon, D. (2015) Health Risk Of Exposure To Bisphenol A (BPA), *Rocz Panstw Zakl Hig*, 66(1), 5-11.
- Kopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A. vd. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing

- apoptosis. *Blood.*, 84, 1415–1420. <https://doi.org/10.1182/blood.V84.5.1415.1415> Kressel, M. ve Groscurth, P. (1994). Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.*, 278, 549–56. DOI: 10.1007/BF00331373
- Laird, E., Ward, M., McSorley, E. vd. (2010) Vitamin D and Bone Health; Potential Mechanisms, *Nutrients*, 2, 693-724. doi:10.3390/nu2070693
- Leers, M.P., Kolgen, W., Bjorklund, V. vd. (1999). Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Pathol.*, 187, 567–572. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199904)187:5<567::AID-PATH288>3.0.CO;2-J.
- Legeay, S. ve Faure, S. (2017) Is bisphenol A an environmental obesogen?, *Clinical Pharmacology*, 31, 594-609. doi: 10.1111/fcp.12300
- Li, D., Zhou, Z., Miao, M. vd. (2011) Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality, *Fertility and Sterility*, 95, 625-630. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.09.026
- Ma, R. ve Sassoon, D. (2006) PCBs Exert an Estrogenic Effect through Repression of the Wnt7a Signaling Pathway in the Female Reproductive Tract, *Environmental Health Perspectives*, 114(6), 898-904. doi:10.1289/ehp.8748
- Malaise, Y., Menard, S., Cartier, C. vd. (2017) Gut dysbiosis and impairment of immune system homeostasis in perinatally-exposed mice to Bisphenol A precede obese phenotype development, *Scientific Reports*, 7(1), DOI:10.1038/s41598-017-15196-w
- Mcgeady, T.A. ve Quinn, P.J. (2011). *Veteriner Embriyoloji*. (Çev:İ. Çelik, Y. Öznurlu). Malatya: Medipress Yayıncılık.
- Mcguckin, M., Linden, S., Sutton, P. vd. (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens, *Microbiology*, 9, 265-278. doi:10.1038/nrmicro2538
- Mora, J.R., Iwata, M. ve Andrian, U.H. (2008) Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage, *Nat Rev Immunol*, 8(9), 685-698. doi:10.1038/nri2378.
- Mouli, V.P. ve Ananthakrishnan, A.N. (2014) Review article: vitamin d and inflammatory bowel diseases, *Aliment Pharmacol Ther.*, 39(2). doi:10.1111/apt.12553.
- Munguia-Lopez, E., Peralta, E., Gonzalez-Leon, A. vd. (2002) Migration of Bisphenol A (BPA) from Epoxy Can Coatings to Jalapenõ Peppers and an Acid Food Simulant, *J. Agric. Food Chem*, 50, 7299-7302. DOI: 10.1021/jf0257502
- Navarro- Ortega, A. ve Barcelo, D. (2011) Persistent Organic Pollutants in Water, Sediments, and Biota in the Ebro River Basin, *The Handbook of Environmental Chemistry*, D Barcelo; A Kostianoy, 13, Springer, London New York, 2011. DOI 10.1007/978-3-642-18032-3
- Newbold, R., Jefferson, W. ve Padilla-Banks, E. (2009) Prenatal Exposure to Bisphenol A at Environmentally Relevant Doses Adversely Affects the Murine Female Reproductive Tract Later in Life, *Environmental Health Perspectives*, 117(6), 879-885. doi:10.1289/ehp.0800045

- Odenwald, M. ve Turner, J. (2017) The intestinal epithelial barrier: A therapeutic target?, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 14(1), 9-21. doi:10.1038/nrgastro.2016.169.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358. ISSN 0003-2697, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- Okumura, R. ve Takeda, K. (2017) Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis, *Experimental & Molecular Medicine*, 49, 1-8. doi:10.1038/emm.2017.20
- Oldring, P., Castle, L., Mahony, C. vd. (2014) Estimates of dietary exposure to bisphenol A (BPA) from light metal packaging using food consumption and packaging usage data: a refined deterministic approach and a fully probabilistic (FACET) approach, *Food Additives & Contaminants*, 31(3), 466-489. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2013.860240>
- Omorodion, N.T., Atoigwe-Ogeyemhe, B.E., Achukwu, P.U. vd. (2019) Histopathological changes associated with exposure of some viscerals and testicular tissues to bisphenol A and di(2-ethylhexyl)phthalate, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18(6), 1213-1218. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v18i6.10>
- Otsuka, H., Sugimoto, M., Ikeda, S. vd. (2012) Effects of bisphenol A administration to pregnant mice on serum Ca and intestinal Ca absorption, *Animal Science Journal*, 83, 232-237. doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00947.x
- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H. ve Vermes, I. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3: 115. doi: 10.1023/a:1009649025439.
- Özaydın, T., Öznurlu, Y., Sur, E. Vd. (2018) The effects of bisphenol A on some plasma cytokine levels and distribution of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in spleen, ileal Peyer's patch and bronchus associated lymphoid tissue in rats, *Acta Histochemica*, 120, 728-733. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.08.002>
- Özer, A. (Edt) (2007). *Veteriner Embriolojisi*. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.
- Öztürk, F. (2002). Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(2), 143-148.
- Paulose, T., Speroni, L., Sonnenschein, C. vd. (2015) Estrogens in the wrong place at the wrong time: fetal BPA exposure and mammary cancer, *Reprod Toxicol*, 54, 58-65. doi:10.1016/j.reprotox.2014.09.012.
- Peña-Blanco, A. ve García-Sáez, A.J. (2018). Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J*, 285, 416-431. doi:10.1111/febs.14186
- Pfeffer, C.M. ve Singh, A.T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci*, 19(2), 448. doi:10.3390/ijms19020448
- Qu, W., Zhao, Z., Chen, S. vd. (2018) Bisphenol A suppresses proliferation and induces apoptosis in colonic epithelial cells through mitochondrial and MAPK/AKT pathways, *Life Sciences*, 1-26. doi:10.1016/j.lfs.2018.07.040
- Rameshrad, M., Razavi, B.M., Imenshahidi M. vd. (2019) Vitis vinifera (grape) seed extract and resveratrol alleviate bisphenol- A- induced metabolic syndrome:

- Biochemical and molecular evidences, *Phytotherapy Research*, 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.6276>
- Rezaie, A., Parker, R. ve Abdollahi, M. (2007) Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause?, *Dig Dis Sci*, 52, 2015-2021. DOI 10.1007/s10620-006-9622-2
- Richter, C., Birnbaum, L., Farabollini, F. vd. (2007) *In Vivo* Effects of Bisphenol A in Laboratory Rodent Studies, *Reprod Toxicol*, 24(2), 199-224. doi: 10.1016/j.reprotox.2007.06.004
- Robles-Vera, I., Callejo, M., Ramos, R. vd. (2019) Impact of Vitamin D Deficit on the Rat Gut Microbiome, *Nutrients*, 11, 2564. doi:10.3390/nu11112564
- Rochester, J. (2013) Bisphenol A and human health: A review of the literature, *Reproductive Toxicology*, 42, 132-155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>
- Rutkowska, K. ve Rachon, D. (2014) Bisphenol A (BPA) and its potential role in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome (PCOS), *Gynecol Endocrinol*, Retrieved from: <http://informahealthcare.com/gye>. DOI: 10.3109/09513590.2013.871517
- Salehpour, A., Shidfar, F., Hedayati, M. vd. (2021) Molecular mechanisms of vitamin D plus Bisphenol A effects on adipogenesis in human adipose-derived mesenchymal stem cells, *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 13, 41. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00661-4>
- Salgame, P., Varadhachary, A.S., Primiano, L.L. vd. (1997). An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 25(3), 680–681. doi: 10.1093/nar/25.3.680
- Sereno, D., Holzmuller, P., Mangot, I. vd. (2001). Antimonial-mediated dna fragmentation in leishmania infantum amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(7), 2064–2069. DOI: 10.1128/AAC.45.7.2064–2069.2001
- Sharma, P., Mandal M.B., Katiyar, R. vd. (2021) A Comparative Study of Effects of 28-Day Exposure of Bisphenol A and Bisphenol S on Body Weight Changes, Organ Histology, and Relative Organ Weight, *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 11(4), 214-220. DOI: 10.4103/ijabmr.IJABMR_663_20
- Singh, R., Letai, A. ve Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20, 175-93. doi:10.1038/s41580-018-0089-8.
- Skakkebaek, N., Toppari, J., Söder, O. vd. (2011) The Exposure of Fetuses and Children to Endocrine Disrupting Chemicals: A European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) and Pediatric Endocrine Society (PES) Call to Action Statement, *J Clin Endocrinol Metab*, 96(10), 3056-3058. doi: 10.1210/jc.2011-1269
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y. (1988) A simple method for clinical assay of superoxide dismutase, *Clin Chem*, Mar;34(3), 497-500. PMID: 3349599.
- Szymanska, K., Makowska, K. ve Gonkowski, S. (2018) The Influence of High and Low Doses of Bisphenol A (BPA) on the Enteric Nervous System of the

- Porcine Ileum, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 917. doi:10.3390/ijms19030917
- Tabakoğlu, E. ve Durgut, R. (2013). Veteriner Hekimlikte Oksidatif Stres ve Bazı Önemli Hastalıklarda Oksidatif Stresin Etkileri, *AVKAE Derg.* 3(1), 69-75.
- Tang, J., Zhou, R., Luger, D. vd. (2009) Calcitriol Suppresses Antiretinal Autoimmunity through Inhibitory Effects on the Th17 Effector Response, *J Immunol*, 182(8), 4624-4632. doi:10.4049/jimmunol.0801543.
- Taniguchi, K., Wu, L., Grivennikov, S. vd. (2015) A gp130-Src-YAP Module Links Inflammation to Epithelial Regeneration, *Nature*, 519(7541), 57-62. doi:10.1038/nature14228.
- Traber, M.G. ve Packer, L. (1995). Vitamin E. Beyond antioxidant function. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1501- 1509. DOI: 10.1093/ajcn/62.6.1501S
- Tripkovic, L., Lambert, H., Hart, K. vd. (2012) Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis, *Am J Clin Nutr*, 95, 1357-1364. doi: 10.3945/ajcn.111.031070.
- Ünal, G. (2007) *Hayvan Embriyolojisi* (1. Baskı). Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.
- Vairetti, M., Ferrigno, A., Bertone, R. vd. (2005). Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740, 367-374. doi:10.1016/j.bbadis.2004.11.022
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J. vd. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39, 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Van Landuyt, K., Nawrot, T., Geebelen, B. vd. (2011) How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach, *Dental Materials*, 27, 723-747. doi:10.1016/j.dental.2011.05.001
- Vandenberg, L., Hauser, R., Marcus, M. vd. (2007) Human exposure to bisphenol A (BPA), *Reproductive Toxicology*, 24, 139-177. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.010
- Vinson, J., Hsu, C., Possanza, C. vd. (1994). Lipid peroxidation and diabetic complications: effect of antioxidant vitamins C and E. *Adv Exp Med Biol.* 366, 430-432.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J.C. ve Trapani, J.A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*, 15, 388- 400. doi:10.1038/nri3839
- Vrdoljak, J., Kumric, M., Vilovic, M. vd. (2022) Effects of Olive Oil and Its Components on Intestinal Inflammation and Inflammatory Bowel Disease, *Nutrients*, 14, 757. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu14040757>
- Wang, G., Li, Y., Li, Y. vd. (2020) Maternal vitamin D supplementation inhibits bisphenol A-induced proliferation of Th17 cells in adult offspring, *Food and Chemical Toxicology*, 144, 111604. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111604>
- Watanabe, I., Toyoda, M., Okuda, J. vd. (1999). 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. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1999.tb00732.x
- Watson, A., Chu, S., Sieck, L. vd. (2005) Epithelial Barrier Function In Vivo Is Sustained Despite Gaps in Epithelial Layers, *Gastroenterology*, 129, 902-912. doi:10.1053/j.gastro.2005.06.015
- Wei, R. ve Christakos, S. (2015) Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D, *Nutrients*, 7, 8251-8260. doi:10.3390/nu7105392
- Wilson, M. (2008) *Bacteriology of Humans an Ecological Perspective* (1. Baskı). Blacwell Publishing.
- Yamamoto, E. ve Jorgensen, T. (2019a) Relationships Between Vitamin D, Gut Microbiome, and Systemic Autoimmunity, *Frontiers in Immunology*, 10, 3141. doi: 10.3389/fimmu.2019.03141
- Yamamoto, E., Jorgensen, T. (2019b) Immunological effects of vitamin D and their relations to autoimmunity, *Journal of Autoimmunity*, 100, 7-16. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.03.002
- Yurteri, H. (2018). Azometin Fonksiyonlu Yeni Bisfenol-A Bileşiklerinin Sentezi Ve Bazı Metal İyonlarına Karşı Spektroskopik Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya.
- Zhao, Z., Qu, W., Wang, K. vd. (2019) Bisphenol A inhibits mucin 2 secretion in intestinal goblet cells through mitochondrial dysfunction and oxidative stress, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 901-908. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.007
- Zulkifli, S., Mohd Nor, N.S., Abdul Kadir, S.H.S. vd. (2022) Prenatal Bisphenol a Exposure and Postnatal Trans Fat Diet Alter Small Intestinal Morphology and Its Global DNA Methylation in Male Sprague-Dawley Rats, Leading to Obesity Development, *Nutrients*, 14, 2382. DOI: https://doi.org/10.3390/nu14122382.

