

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİŞİ FARELERDE BİSFENOL M İLE OLUŞTURULMUŞ
KARACİĞER HASARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammed CANİK

Biyoloji Anabilim Dalı

TEMMUZ 2025

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİŞİ FARELERDE BİSFENOL M İLE OLUŞTURULMUŞ
KARACİĞER HASARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammed CANİK

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ

Ortak Danışman: Doç.Dr.Asuman DEVECİ ÖZKAN

TEMMUZ 2025

Muhammed CANİK tarafından hazırlanan “DİŞİ FARELERDE BİSFENOL M İLE OLUŞTURULMUŞ KARACİĞER HASARININ İNCELENMESİ” adlı tez çalışması 16.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı :

Doç. Dr. Tuğba KOTİL
İstanbul Üniversitesi

Jüri Üyesi :

Prof. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ (Danışman)
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi :

Doç. Dr. Asuman DEVECİ ÖZKAN (Ortak Danışman)
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi :

Prof. Dr. Hüseyin AKSOY
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi :

Dr. Öğr. Üyesi Selen GÜÇLÜ DURGUN
Lokman Hekim Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “FARELERDE BİSFENOL M İLE OLUŞTURULMUŞ KARACİĞER HASARININ İNCELENMESİ” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, etik kurul onay belgesi aldığımı (19/02/2024 tarihli 08 numarlı), çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(...../...../20.....).

(imza)

Muhammed CANİK





Rahmetli Anneme itafen...



TEŞEKKÜR

Akademik duruşu, disiplinli yaklaşımı ve sabrıyla bana ilham veren değerli danışmanım Prof. Dr. Nazan Deniz Yön Ertuğ'a; güler yüzü, enerjisi ve yönlendirmeleriyle süreci daha keyifli ve motive edici hale getiren ortak danışmanım Doç. Dr. Asuman Deveci Özkan'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Elektron mikroskopi çalışmalarına katkılarından dolayı Doç. Dr. Tuğba Kotil'e ve İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Elektron Mikroskopi Birimi çalışanlarına; deneysel süreç için destek sağlayan SÜDETAM'a ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Çakıroğlu'na teşekkür ederim.

Deneysel aşamalarda yanımda olan Arş. Gör. Dr. Tarık Dinç, Öğr. Gör. Nurbanu Zengin, Arş. Gör. Sevdâ Bağdatlı'ya ve birlikte çalıştığım ekip arkadaşlarım Aleyna Köse, Çiğdem İbil, Gizem Gençay ve Marwa Tawfiq Ahmed Alsalim'e içten teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle daima yanımda olan değerli aileme en içten teşekkürlerimi sunarım. Eğitime verdiği önem ve bana aşıladığı öğrenme arzusu ile bu çalışmanın temelinde büyük emeği olan, rahmet ve minnetle andığım annem Havva Canik'in izleri bu sürecin her aşamasında hissedilmiştir. Babam Kadir Canik'e; sabrı, hayat bilgeliği ve her zaman sözleriyle değil, duruşuyla yol gösteren tavrı için teşekkür ederim. İlmin bir edep olduğunu, insanın öğrendikçe aslında ne kadar az bildiğini fark ettiğini ve gerçek bilginin çoğu zaman susmakla ifade edildiğini bana yaşayarak öğretti. Bu uzun akademik yolculukta, onun sakinliği ve anlayışı bana her zaman rehber oldu. Kıymetli abilerim Abdulkerim Canik, Kenan Canik ve Selim Canik'e ve sevgili ablam Merve Canik'e, verdikleri moral, motivasyon ve içten destekleri için teşekkür ederim. Ailem, akademik yolculuğum boyunca bana güç veren en büyük dayanağım olmuştur.

Yüksek lisans eğitimimi 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı ile destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na, 2024-26-62-52 proje numarası ile tezime maddi katkı sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü'ne ve ayrıca bu süreçte beni maddi olarak destekleyen Sayın Çevriye Çevik'e içten teşekkür ederim; kendilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Muhammed CANİK



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
SİMGELER	xv
TABLO LİSTESİ	xvii
ŞEKİL LİSTESİ	xix
ÖZET	xxi
SUMMARY	xxv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Endokrin Bozucular	5
2.1.1. Bisfenol A	7
2.1.2. Bisfenol M	10
2.2. Karaciğer	12
2.2.1. Histoloji	13
2.2.1.1. Hepatositler	16
2.2.1.2. Kupffer hücreleri	19
2.2.1.3. Karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri	19
2.2.1.4. Stellat hücreleri	20
2.2.1.5. Natural killer (NK, Pit hücreleri)	21
3. MATERYAL METOT	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Bisfenol M	23
3.1.2. BALB/C Mus Musculus	23
3.1.3. Bakım ve beslenmesi	24
3.2. Metot	24
3.2.1. Deneysel toksikasyonun oluşturulması	24
3.2.2. Karaciğer dokusunun ışık mikroskopi histolojisi	25
3.2.2.1. Fiksasyon	25
3.2.2.2. Dehidrasyon	25
3.2.2.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme	25
3.2.2.4. Kesit alınması	26
3.2.2.5. Boyama ve inceleme	26
3.2.3. Karaciğer dokusunun elektron mikroskopi histolojisi	28
3.2.3.1. Fiksasyon	28
3.2.3.2. Dehidratasyon ve gömme	28
3.2.3.3. Boyama ve inceleme	30
3.2.4. Biyokimyasal ve moleküler analizler	30
3.2.4.1. Protein izolasyonu ve enzim bağlı immunosorbent analizi (ELISA) ...	30
3.2.4.2. RNA izolasyon ve cDNA sentezi	31

3.2.4.3. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) analizi	33
4. ARAşTIRMA BULGULARI	35
4.1. Karaciğer Dokusunun Işık Mikroskobi Histolojisi Bulguları	35
4.1.1. Kontrol grubu	35
4.1.2. 2,5 mg/kg grubu	39
4.1.3. 5 mg/kg grubu	43
4.1.4. 10 mg/kg grubu	47
4.2. Karaciğer Dokusunun Elektron Mikroskobi Histolojisi.....	51
4.2.1. Kontrol grubu	51
4.2.2. 2,5 mg/ kg grubu	52
4.2.3. 5 mg/ kg grubu	55
4.2.4. 10 mg/ kg grubu	57
4.3. Biyokimyasal ve Moleküler Analiz Bulguları.....	59
4.3.1. Enzim bağlı immunosorbent analizi (ELISA) Bulguları.....	59
4.3.2. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) analiz bulguları	63
5. TARTIşMA VE SONUÇ	67
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEçMİş	87

KISALTMALAR

ALT	: Alanin aminotransferaz
Ark.	: Arkadaşları
AST	: Aspartat aminotransferaz
BALB	: Bagg Albino
BPA	: Bisfenol A
BPAP	: Bisfenol AP
BPC	: Bisfenol C
BPF	: Bisfenol F
BPM	: Bisfenol M
BPS	: Bisfenol S
CAR	: Chimeric Antigen Reseptör
CD	: Compact Disc
cDNA	: Komplementer DNA
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
ED	: Endokrin bozulması
EDC	: Endokrin bozucu kimyasallar
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ELISA	: Enzim bağlı immunosorbent analizi
EPA	: Çevre Koruma Ajansı
ER	: Östrojen reseptör
GAPDH	: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
H&E	: Hematoksilen & Eosin
IFN	: İnterferon
IL-6	: İnterlökin-6
LXR	: Karaciğer X Reseptör
MMP	: matrix metalloproteinase
NK	: Natural killer
OECD	: Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü
PAH	: Poliaromatik hidrokarbonlar

PBS	: Fosfat tamponlu salin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PPAR	: Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör
PVC	: Polivinil klorür
PXR	: Pregnane X Reseptör
qPCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon
RIPA	: Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	: Ribonükleik asid
ROR	: RAR-related orphan Reseptör
RT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon
RXR	: Retinoid X reseptör
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-alfa
ÜÇE	: Üzüm çekirdeği ekstraktı
Vd.	: Ve diğerleri
VDR	: Vitamin D Reseptör
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

SİMGELER

%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikro molar
µm	: Mikrometre
°C	: Celsius
g	: Gram
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojen kuvveti
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. %10'luk Nötral formaldehit fiksatifinin hazırlanışı	26
Tablo 3.2. Dehidratasyon işlemi aşamaları	26
Tablo 3.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme aşamaları	27
Tablo 3.4. Hematoksilen & Eosin (H&E) boyama yöntemi	27
Tablo 3.5. Masson Trikrom boyama yöntemi	27
Tablo 3.6. %2,5'luk glutaraldehitin hazırlanması	29
Tablo 3.7. OsO ₄ hazırlanması	29
Tablo 3.8. Dehidratasyon ve gömme aşamaları	29
Tablo 3.9. Uranil Asetat ve Kurşun Sitrata hazırlanması.....	30
Tablo 3.10. RT-PCR analizinde kullanılacak primerlerin gen dizileri.....	33
Tablo 3.11. RT-PCR koşulları.....	34
Tablo 4.1. Gruplara Göre AST ve ALT Enzim Düzeylerinin Ortalama Değerleri ...	59
Tablo 4.2. Gruplara Göre TNF- α ve IL-6 Düzeylerinin Ortalama Değerler	61
Tablo 4.3. Gruplara Göre Sitokrom c Düzeylerinin Ortalama Değerleri	62
Tablo 4.4. p53, Bax, Bcl-2 ve Kaspas-3 Gen Ekspresyonlarının Doza Bağlı Değişimi	64



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Bisfenol M çizgi formülü (Dre-C10655930, 2025).....	10
Şekil 2.2. Karaciğer lobül modelleri (Normal liver histology, 2020).....	15
Şekil 4.1. Kontrol grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme).....	36
Şekil 4.2. Kontrol grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme).....	36
Şekil 4.3. Kontrol grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme).....	37
Şekil 4.4. Kontrol grubu ait genel karaciğer histolojisi, portal triad (H&E, 100x büyütme).....	37
Şekil 4.5. Kontrol grubu ait genel karaciğer histolojisi, portal triad (Masson trikrom, 40x büyütme).	38
Şekil 4.6. Kontrol grubu ait genel karaciğer histolojisi, portal triad (Masson trikrom, 100x büyütme).	38
Şekil 4.7. 2,5 mg/kg grubu ait karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme).	40
Şekil 4.8. 2,5 mg/kg grubu ait karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme).	40
Şekil 4.9. 2,5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme). ...	41
Şekil 4.10. 2,5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme). .	41
Şekil 4.11. 2,5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (masson trikrom, 40x büyütme).....	42
Şekil 4.12. 2,5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (masson trikrom, 100x büyütme).....	42
Şekil 4.13. 5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme).	44
Şekil 4.14. 5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme).	45
Şekil 4.15. 5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme).	45
Şekil 4.16. 5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme).	46
Şekil 4.17. 5 mg/kg grubu portal triad (siyah üçgen) histolojisi (Masson trikrom, 40x büyütme).....	46
Şekil 4.18. 5 mg/kg grubu portal triad histolojisi (Masson trikrom, 100x büyütme)	47
Şekil 4.19. 10 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme).	48
Şekil 4.20. 10 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme).. ...	49
Şekil 4.21. 10 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme).).	49
Şekil 4.22. 10 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme). ..	50
Şekil 4.23. 10 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (Masson trikrom, 100x büyütme).	50
Şekil 4.24. 10 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (Masson trikrom, 100x büyütme).	51
Şekil 4.25. Kontrol gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel yapı(x20000).	52
Şekil 4.26. Kontrol gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel yapı (x20000).	52
Şekil 4.27. 2,5 mg/kg BPM uygulanan gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel değişiklikler (x12000).	54
Şekil 4.28. 2,5 mg/kg BPM uygulanan gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel değişiklikler (x10000).	54

Şekil 4.29. 5 mg/kg BPM uygulanan gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel değişiklikler (x12000)	56
Şekil 4.30. 5 mg/kg BPM uygulanan gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel değişiklikler (x20000).	56
Şekil 4.31. 10 mg/kg BPM uygulanan gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel değişiklikler (x20000).	58
Şekil 4.32. 10 mg/kg BPM uygulanan gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel değişiklikler (x20000).	58
Şekil 4.33. Gruplara Göre AST ve ALT Enzim Düzeylerinin Karşılaştırmalı Analizi.	60
Şekil 4.34. Gruplara Göre TNF- α ve IL-6 Düzeylerinin Karşılaştırmalı Analizi.	62
Şekil 4.35. Gruplara Göre Sitokrom C Düzeylerinin Karşılaştırmalı Analizi.	63
Şekil 4.36. p53, Bax, Bcl-2 ve Kaspas-3 Gen Ekspresyonlarının Doza Bağlı Değişimi.	65



DIŐİ FARELERDE BİSFENOL M İLE OLUŞTURULMUŞ KARACİĞER HASARININ İNCELENMESİ

ÖZET

Plastik üretiminde ve kullanımındaki önemli artış, plastik bileőenlerinin çevre ve insan sağlığı üzerindeki potansiyel toksik etkilerine yönelik endişeleri beraberinde getirmiőtir. Bu bağlamda, plastik sanayisinde yaygın kullanılan bisfenol türevleri özel bir ilgi alanı oluşturmaktadır. Bisfenol A (BPA), bilinen bir endokrin bozucu kimyasaldır. Hormonal yapıyı bozarak endokrin sistemin işleyişinde sorunlara yol açtığı, çeşitli dokularda hasarlar yarattığı, oksidatif stres ve hücrel hasar gibi mekanizmalarla birçok organ sisteminde toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir. BPA'nın toksik etkileri nedeniyle bazı ölkelerde kullanımına getirilen kısıtlamalar sonucunda, BPA analoglarının kullanımında bir artış gözlenmiştir. Bisfenol M (BPM), bu analoglardan biridir. Kimyasal yapılarının BPA'ya benzer olması nedeniyle bisfenol analoglarının da benzer toksikolojik özelliklere sahip olabileceği endişeleri bulunmaktadır. BPM'nin de östrojenik ve antiandrojenik aktivite gösterebildiği belirtilmiştir. Endüstriyel uygulamalarda, yapıştırıcılarda, kaplamalarda, epoksi reçinelerinde ve yüksek performanslı plastiklerde BPA alternatifi olarak artan kullanımı, bu kimyasalın güvenlik profilinin daha detaylı araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ancak yapılan literatür araőtırmalarında, BPM'nin toksikolojik etkileri üzerine yeterli sayıda bilimsel çalışma bulunmadığı belirlenmiştir. Özellikle BPM'nin memeli dokularında, insan sağlığı üzerindeki etkilerinin anlaşılması için uygun bir model organizma olan fareler üzerinde yeterli çalışma yapılmamıőtır. İnsan vücudunda detoksifikasyon ve metabolizma süreçlerinin merkezinde yer alan karaciğer, yabancı bileşiklerin işlenmesinde birincil role sahip olması nedeniyle toksikolojik çalışmalar için önemli bir hedef organdır. Bu tez çalışmasında, BPM'nin karaciğer dokusunda oluşturduğu histopatolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır. BPM'nin biyolojik etkileri ve toksikolojik profili hakkında daha fazla bilgi edinmek, çevresel ve insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında, BPM'nin karaciğer üzerindeki potansiyel toksik etkilerini değerlendirmek için deneysel bir fare modeli kullanılmıştır. Sakarya Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edilen 6 haftalık diőü BALB/c fareler kullanılmıştır. Toplam 28 adet fare, her birinde 7 fare olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrılmıştır: bir kontrol grubu ve üç deney grubu. Kontrol grubuna çözücü madde olarak %1 Dimetil Sülfoksit (DMSO) içeren serum fizyolojik uygulanmıştır. Deney gruplarına ise sırasıyla 2,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarında BPM, 14 gün boyunca her gün intraperitoneal olarak uygulanmıştır. BPM maddesi, %99 saflık derecesinde Sigma firmasından temin edilmiş ve DMSO içinde çözölürölerek serum fizyolojik ile seyreltilmiőtir. Fareler standart oda koşullarında barındırılmıő ve beslenmiőtir. Uygulama süresi sonunda tüm hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek karaciğer dokuları çıkarılmıştır.

Karaciğer dokuları, histopatolojik inceleme için rutin işlemlere tabi tutulmuştur. Doku kesitleri Hematoksilen-Eozin (H&E) ile genel doku morfolojisi ve Masson Trikrom ile kollajen birikimi (fibrozis) için boyanmış, ışık mikroskobunda incelenmiştir. Elektron mikroskobu incelemeleri için doku parçaları glutaraldehit ve Osmiyum Tetroksit ile fikse edilmiş, epona gömülmüştür. Ultra-ince kesitler Uranil asetat ve Kurşun sitrat ile boyanmış ve Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) altında ultrastrüktürel değişiklikler incelenmiştir. Uygulama sonrası alınan karaciğer doku örnekleri -80°C'de saklanmıştır. Karaciğer dokusundan yapılan protein izolasyonlarının ardından ELISA yöntemi ile karaciğer hasar belirteci enzimleri olan AST ve ALT düzeyleri, inflamatuvar yanıtla ilişkili IL-6 ve TNF- α ile mitokondriyal bütünlüğü gösteren sitokrom c protein miktarları belirlenmiştir. Moleküler düzeydeki değişiklikleri belirlemek amacıyla ise karaciğer dokusu örneklerinden total RNA izolasyonu yapılmış, ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. RT-PCR yöntemi ile apoptozla ilişkili genlerin (Bax, Bcl-2, kaspaz-3, p53) mRNA ifade düzeyleri belirlenmiştir.

Çalışmanın sonuçları, kontrol grubu farelerin karaciğer dokusunda herhangi bir patolojik lezyon bulunmadığını, dokuların normal yapıda olduğunu göstermiştir. Kontrol grubunda hepatositler normal özellikler sergilemiş, hepatik plaklar düzenli, sinüzoid boşluklar normal genişlikte bulunmuş ve anormal kollajen birikimine rastlanmamıştır. BPM uygulanan deney gruplarında ise doz artışına bağlı olarak karaciğer dokusunda çeşitli, doza bağımlı histopatolojik değişiklikler gözlenmiştir. Bu etkiler hücresel dejenerasyon (belirgin hidropik dejenerasyon, sitoplazmik vakuolizasyon, karyomegali, nükleer pleomorfizm, sitoplazmanın buzlu cam görünümü, hücre boyutlarında artış), hücre ölümü (nekrotik alanlar, apoptoz, apoptotik cisimcik oluşumu), inflamasyon (mononükleer hücre infiltrasyonu) ve fibrozis (postnekrotik fibrozis, Disse aralığında kolajen birikimi) şeklindedir. Ayrıca hepatositlerin normal ışınal dizilimlerinde bozulma, hücre plaklarında düzensizlik ve sinüzoidlerde genişleme (dilatasyon) gibi yapısal bozulmalar saptanmıştır. Safra kanallıklarında da dejeneratif değişiklikler izlenmiştir. Artan dozla birlikte hepatositlerin ışınal dizilimlerindeki bozulmalar, karyomegali ve nekrotik alan çapları artmıştır.

Ultrastrüktürel incelemelerde, BPM maruziyetinin karaciğer hepatositlerinde mitokondri merkezli, doza bağımlı olarak artan organel düzeyinde hasara yol açtığı saptanmıştır. Mitokondrielerde yaygın şişme, deformasyon, kristalarda bozulmalar (kristolizis), krista kaybı ve membran bütünlüğünde bozulmalar gözlenmiştir. Bu değişiklikler, BPM'ye bağlı mitokondriyal stres, enerji metabolizmasında bozulma ve disfonksiyonu yansıtmaktadır. Sitoplazmada çok katmanlı miyelin figürleri (bozulan lipid metabolizması ve artmış otofajik aktivite ile ilişkili), belirgin veya yaygın vakuolizasyon, serbest ribozom sayısında azalma ve lipid damlacıkları gözlenmiştir. Granüllü endoplazmik retikulumda (GER) yapısal düzensizlikler, dilatasyon ve parçalanma izlenmiştir; bu durum protein sentezi ve hücresel homeostazın etkilendiğini göstermektedir. Mitokondri ile GER arasındaki mesafenin azalması organel etkileşimlerinin değiştiğini göstermiştir. Çekirdeklerde dağınık kromatin dağılımı dikkat çekmiş, bu durum dejeneratif süreçlerin nükleer düzeyde de etkin olduğunu göstermiştir. Disse aralığında kolajen fibrilleri birikimi izlenmiştir. Elde edilen ultrastrüktürel bulgular, BPM'nin hepatositlerde apoptoz ve dejeneratif süreçleri tetikleyebileceğini göstermektedir.

ELISA analizlerinden elde edilen bulgular doğrultusunda, ALT ve AST düzeylerinde düşük ve orta dozlarda anlamlı değişiklik gözlenmezken, yüksek doz BPM (10 mg/kg)

uygulanan grupta ALT düzeyinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma saptanmıştır. Sitokin analizlerinde ise tüm deney gruplarında TNF- α düzeylerinde anlamlı artışlar belirlenmiş ve özellikle 2,5 mg/kg BPM uygulanan grupta bu artış en belirgin şekilde izlenmiştir. Aynı grupta IL-6 düzeyinde hafif fakat anlamlı bir azalma tespit edilmiş, diğer doz gruplarında IL-6 düzeylerinde anlamlı dalgalanmalar gözlenmiştir. Sitokrom C düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, 2,5 mg/kg grubunda anlamlı bir azalma, 10 mg/kg grubunda ise anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu bulgular, BPM uygulamasının doz bağımlı olarak karaciğer hasarıyla ilişkili biyokimyasal parametrelerde değişimlere neden olduğunu göstermektedir.

RT-PCR analizleri sonucunda, tüm doz gruplarında apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerinde doza bağlı değişiklikler saptanmıştır. Hücrel stres yanıtında kritik rol oynayan p53 geninin ekspresyonu, 10 mg/kg dozunda anlamlı düzeyde yükselerek 28,57 kata ulaşmıştır. Pro-apoptotik bir gen olan Bax, düşük ve orta dozlarda azalmış, ancak 10 mg/kg dozunda 2,38 kat artış göstermiştir. Anti-apoptotik özellik gösteren Bcl-2 geninin ekspresyonu tüm dozlarda artmış, ancak en yüksek artış 10 mg/kg dozunda (85,84 kat) gözlenmiştir. Apoptozun efektör aşamasında görev alan Kaspaz-3 geninin ekspresyon düzeyleri dozla paralel olarak artış göstermiş ve 10 mg/kg dozunda 27,98 kat yükselmiştir. Bu bulgular, BPM'nin yüksek doz uygulamalarında hücrel stres, apoptoz ve hayatta kalma mekanizmalarında güçlü bir genetik yanıt oluşturduğunu göstermektedir.

Elde edilen bulgular, literatürde bildirilen diğer bisfenol türlerinin (BPA, BPS, BPF, BPAF, BHPF, BPAF) çeşitli hayvan modellerinde karaciğer üzerinde neden olduğu toksik etkilerle büyük ölçüde paralellik göstermektedir. Diğer bisfenollerin de karaciğerde vakuolizasyon, dejenerasyon hepatositler, sinüzoidal dilatasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, nekroz, fibrozis, steatoz, apoptoz, mitokondriyal disfonksiyon gibi benzer histopatolojik ve hücrel hasarlara yol açtığı rapor edilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması Bisfenol M'nin fare karaciğer dokusu üzerinde doza bağımlı toksik etkiler oluşturduğunu ortaya koymuştur. Histopatolojik ve ultrastrüktürel bulgularla desteklenen bu etkiler; hücrel dejenerasyon, inflamasyon, apoptoz ve yapısal bozulmalar şeklinde kendini göstermiştir. ELISA analizleri, yüksek doz BPM uygulamasında ALT düzeyinde anlamlı bir azalma ve TNF- α düzeylerinde tüm doz gruplarında anlamlı artış olduğunu ortaya koymuştur. IL-6 ve sitokrom c düzeylerindeki anlamlı dalgalanmalar, BPM'nin inflamatuvar yanıt ve mitokondriyal stres üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. RT-PCR analizleri, yüksek doz BPM'nin p53, Bax ve kaspaz-3 gen ekspresyonlarını anlamlı düzeyde artırarak apoptozu indüklediğini; aynı zamanda Bcl-2 geninde dikkate değer bir artış oluşturarak hücrelerin hayatta kalma yanıtını da aktive ettiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, BPM'nin hücrel stres, apoptoz ve inflamasyon mekanizmaları üzerinde güçlü bir genetik ve biyokimyasal etki yarattığını göstermektedir. Çalışmanın elde ettiği veriler, BPM'nin toksikolojik profiline dair veriler sunarak, bu kimyasalın kullanımına yönelik potansiyel düzenlemeler ve risk değerlendirmeleri için bilimsel temel oluşturmaya katkı sağlamaktadır. Bu kapsamda, BPM'nin insan sağlığı üzerindeki etkilerini daha kapsamlı değerlendirebilmek adına ileri düzey çalışmalara ihtiyaç duyulduğu vurgulanmıştır.



INVESTIGATION OF LIVER DAMAGE INDUCED BY BISPHENOL M IN FEMALE MICE

SUMMARY

The significant increase in the production and use of plastics in recent years has raised concerns about the potential toxic effects of plastic components on the environment and human health. In this context, bisphenol derivatives, which are widely used in the plastics industry, are of particular interest. Bisphenol A (BPA) is a known endocrine disrupting chemical. It has been reported to cause problems in the functioning of the endocrine system by disrupting the hormonal structure, causing damage to various tissues, and causing toxicity in many organ systems through mechanisms such as oxidative stress and cellular damage. The prevalence of BPA and its potential to accumulate in tissues leads to chronic exposure despite its short half life. As a result of the restrictions imposed on the use of BPA in some countries due to its toxic effects, an increase in the use of BPA analogs has been observed. Bisphenol M (BPM) is one of these analogs. There are concerns that bisphenol analogs may have similar toxicological properties because their chemical structures are similar to BPA. BPM can also show estrogenic and antiandrogenic activity. Its increasing use as an alternative to BPA in industrial applications, adhesives, coatings, epoxy resins and high-performance plastics suggests that the safety profile of this chemical needs to be further investigated. However, a literature search revealed that there are not enough scientific studies on the toxicological effects of BPM. In particular, not enough studies have been conducted on mice, which is a suitable model organism for understanding the effects of BPM on human health in mammalian tissues. The liver, which is at the center of detoxification and metabolism processes in the human body, is an important target organ for toxicological studies due to its primary role in the processing of foreign compounds. The aim of this thesis was to investigate the histopathological, biochemical and molecular changes induced by BPM in liver tissue. It is of great importance to learn more about the biological effects and toxicological profile of BPM in order to evaluate its potential environmental and human health impacts.

In this thesis, an experimental mouse model was used to evaluate the potential toxic effects of BPM on the liver. In the study, 6-week-old female BALB/c mice obtained from Sakarya University Experimental Animal Center were used. A total of 28 mice were randomly divided into 4 groups of 7 mice each. One control group and three experimental groups; saline containing 1% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) as solvent was applied to the control group. In the experimental groups, BPM was administered intraperitoneally every day for 14 days at doses of 2.5 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg, respectively. BPM was obtained from Sigma company with 99% purity and was dissolved in DMSO and diluted with saline. Mice were housed under standard room conditions (21±2°C temperature, 12 hours light/dark cycle) and fed with pellet feed in special cages and tap water in glass bottles. At the end of the treatment period, all animals were sacrificed (decapitation) under anesthesia (ketamine and xylazine) and liver tissues were removed.

Liver tissues were subjected to routine procedures for histopathologic examination. For light microscopy examination, the tissues were first fixed with Neutral Formaldehyde. They were then dehydrated with ascending alcohol series, transparent with xylol and embedded in paraffin blocks. Serial sections of 3 μm thickness were taken from the paraffin blocks. The sections were stained with Hematoxylin-Eosin (H&E) and Masson Trichrome staining methods. H&E staining was used to evaluate general tissue morphology and Masson Trichrome staining was used to evaluate collagen deposition (fibrosis). The stained slides were examined and visualized under a light microscope (BAB).

For electron microscopy examinations, pieces smaller than 1 mm^3 were taken from the liver tissues. Initial fixation was performed in 2.5% glutaraldehyde. Then they were washed with phosphate buffer and postfixed with 1% Osmium Tetroxide (OsO_4). The tissues were dehydrated in a series of rising alcohols and blocked with epon embedding material. Semi-thin sections of 1 μm thickness were taken from the epon blocks and stained with Methylene blue and examined under a light microscope. Ultra-thin sections of 60-70 nm thickness were taken from the marked areas, stained with Uranyl acetate and Lead citrate (Reynolds solution) and examined for ultrastructural changes under Transmission Electron Microscope (TEM - JEOL brand).

In addition to histopathological methods, biochemical and molecular analyses were also planned in the study. Liver tissue samples taken after the application were stored at -80°C until the analyses were performed. After protein isolation from liver tissue, AST (Aspartate Aminotransferase) and ALT (Alanine Aminotransferase) levels, which are liver damage marker enzymes, were determined by ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) method. The amounts of IL-6 (Interleukin-6), TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha) and cytochrome c protein indicating mitochondrial integrity were analyzed by ELISA analysis. In order to determine the changes at the molecular level, total RNA was isolated from liver tissue samples, followed by cDNA synthesis. The mRNA expression levels of apoptosis (programmed cell death) related genes (Bax, Bcl-2, caspase-3, p53) were determined by RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction).

The results of the study showed that there were no pathological lesions in the histological examination of the liver tissue of the control group mice and that the tissues had a normal structure. It was observed that hepatocytes in the liver tissue of the control group exhibited morphologically normal features and had smooth cell borders and homogeneous cytoplasm. Cell nuclei were round, centrally located and contained prominent nucleolus. Hepatic plaques were found to extend towards the central vein in a regular pattern, while the sinusoid spaces were found to be of normal width. Masson Trichrome staining showed no abnormal collagen deposition in the portal areas suggestive of fibrosis.

In the experimental groups administered BPM, various histopathological changes were observed in the liver tissue depending on the dose increase. In the group administered the lowest dose of 2.5 mg/kg/day, marked hydropic degeneration (in the form of transparent vacuoles in the cytoplasm) was observed in hepatocytes. The normal radial arrangement of hepatocytes was disrupted, cell plates were disorganized and sinusoidal structures were deformed. Necrotic areas (loss of cellular integrity), postnecrotic fibrosis (connective tissue accumulation after necrosis), apoptotic (shrunken cytoplasm, dense nucleus) and necrotic cells, inflammatory cells and karyomegaly were detected. Eccentric nuclei, nuclear pleomorphism (difference in

size and shape of nuclei), mild dilatation of sinusoids and fat vesicles were also observed. These findings demonstrated that BPM initiates structural changes in the liver that can lead to permanent damage.

In the group administered the medium dose of 5 mg/kg/day, large necrotic areas with disrupted tissue integrity became more prominent on microscopic examination. Sinusoids showed marked dilatation, indicating that microcirculation was impaired. Extensive hydropic degeneration was observed in hepatocytes. Loss of homogeneity of the cytoplasm and pale, granular or vacuolated appearance indicate that the degenerative process is progressing. Degenerative changes such as karyomegaly, binucleated hepatocytes, frosted glass appearance of the cytoplasm and increased cell size (cellular adaptation) were detected. Apoptosis process was also evident; in apoptotic cells, cytoplasm became smaller, borders became irregular, nuclei became intensely basophilic and pyknotic (shrunken). In general, at this dose, BPM induced severe degenerative changes at both cytoplasmic and nuclear levels, activated necrotic and apoptotic cell death processes and affected sinusoidal structures.

In the group administered the highest dose of 10 mg/kg/day, cellular damage and structural changes were observed at various levels. Marked karyomegaly and binucleation were detected in hepatocytes. Significant enlargement of the sinusoids was observed, indicating circulatory disturbance at the microvascular level. Cytoplasmic vacuolization was observed in some hepatocytes. In necrotic areas, structural destruction with disrupted cell integrity, eosinophilic cytoplasm and nucleated cell bodies were observed. In contrast, cytoplasmic condensation, cell shrinkage and pyknotic nucleus morphology were observed in apoptotic cells. In advanced stages, it was evaluated that apoptotic cells disintegrated into apoptotic bodies. In general, it was revealed that at this dose, BPM triggered both degenerative changes and lethal processes in hepatocytes simultaneously and caused disruptions in the microvascular structures of the liver.

In line with the histopathological data obtained, it was revealed that BPM caused severe, dose dependent damage in liver histology compared to the control group. These effects included pathological changes such as cellular degeneration (hydropic degeneration, cytoplasmic vacuolization, karyomegaly, nuclear pleomorphism), cell death (apoptosis, necrosis), inflammation (mononuclear cell infiltration), fibrosis (postnecrotic fibrosis), sinusoidal expansion and disruption of hepatocyte plaques. With increasing dose, disruptions in the radial arrangement of hepatocytes increased, and the diameters of karyomegaly and necrotic areas increased. These changes, which were not observed in the control group, indicate that BPM has toxic effects on mouse liver.

It was found that exposure to different doses of BPM (Bisphenol M) caused significant ultrastructural changes in liver hepatocytes. After low dose (2.5 mg/kg) BPM administration, diffuse swelling, deformation and hydropic degeneration were observed especially in mitochondria. Significant deterioration, crystallolysis (melting of crystals) and structural irregularities were observed in the cristae forming the inner membranes of mitochondria. In some mitochondria, cristae structures were completely lost, contained vacuoles and were elongated and swollen. These changes reflect BPM-induced mitochondrial stress and impaired energy metabolism. In addition, multilayered myelin figures and marked vacuolization were observed in the cytoplasm; these structures were associated with impaired lipid metabolism and increased autophagic activity. Collagen fibrils and collagen-like structures

accumulated in the disseal space indicate extracellular matrix remodeling and the onset of fibrotic process. Degenerative changes in bile canaliculi indicate the negative effects of BPM on bile flow and canalicular structures.

In medium dose (5 mg/kg) BPM treatment, severe swelling, crystallization and disruption of cristae structures were observed in mitochondria. Irregularities and ruptures were observed in the outer membrane of mitochondria, while the inner membrane structures were completely lost in some areas. In the cytoplasm, a decrease in the number of free ribosomes and structural irregularities in the granulated endoplasmic reticulum (GER) were observed. In the nuclei, scattered chromatin distribution was observed, indicating that degenerative processes were also active at the nuclear level.

After high dose (10 mg/kg) BPM administration, hepatocytes showed widespread and significant structural disruptions. Mitochondria showed opacification, crystallolysis, loss of cristae and disruption of membrane integrity. Myelin figures were associated with membrane damage and increased autophagic activity. Reduced distance between mitochondria and the GER and some mitochondria surrounded by jagged GER cisternae indicate altered organelle interactions. In addition, dilatation, fragmentation and structural irregularities were observed in the GER, suggesting that protein synthesis and cellular homeostasis were severely affected. Widespread vacuolization, ribosome reduction and lipid droplets in the cytoplasm indicate a decrease in cellular metabolic activity and impairment in fat metabolism.

In conclusion, BPM exposure causes mitochondria-centered, dose-dependently increasing organelle-level damage in liver hepatocytes, characterized by mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress response and loss of cellular integrity. The ultrastructural findings suggest that BPM may trigger apoptosis and degenerative processes in hepatocytes.

In line with the findings obtained from ELISA analyses, no significant change was observed in ALT and AST levels in low and medium dose Bisphenol M (BPM) administrations ($p > 0.05$), whereas a significant decrease was found in ALT levels in the high dose BPM (10 mg/kg) group compared to the control group ($p < 0.01$). In cytokine analyses, significant increases in TNF- α levels were determined in all experimental groups ($p < 0.01$) and this increase was most prominent in the group administered 2.5 mg/kg BPM. In the same group, a slight but significant decrease in IL-6 levels was detected ($p < 0.05$). Fluctuations in IL-6 levels were observed in other dose groups and statistically significant differences were found at all doses ($p < 0.05$). In terms of cytochrome C levels, a significant decrease was observed in the 2.5 mg/kg BPM group ($p < 0.05$) and a significant increase was observed in the 10 mg/kg BPM group ($p < 0.05$); however, no significant difference was detected in the 5 mg/kg BPM administration compared to the control group ($p > 0.05$). These findings indicate that BPM administration causes dose-dependent changes in biochemical parameters associated with liver injury.

RT-PCR analyses revealed dose-dependent changes in the expression levels of apoptosis related genes in all dose groups. Expression of p53 gene, which plays a critical role in cellular stress response, increased 5.39 and 5.83-fold in 2.5 mg/kg and 5 mg/kg BPM treatments, respectively, while this increase increased significantly to 28.57-fold at 10 mg/kg dose. Bax, a pro-apoptotic gene, showed a 0.74 and 0.40-fold decrease in low and medium dose BPM treatments, respectively; however, it increased 2.38-fold at 10 mg/kg dose. The expression of the anti-apoptotic Bcl-2 gene increased

23.05-fold at 2.5 mg/kg BPM dose, 3.67-fold at 5 mg/kg, and 85.84-fold at the highest dose. The expression levels of Caspase-3 gene, which is involved in the effector stage of apoptosis, also increased in parallel with the dose; it increased 2.56, 7.61 and 27.98-fold in 2.5 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg BPM applications, respectively. These findings indicate that BPM induces a strong genetic response in cellular stress, apoptosis and survival mechanisms at high doses.

These findings are largely in line with the toxic effects of other bisphenol species (BPA, BPS, BPF, BPAF, BHPF, BPAF) on the liver in various animal models (mouse, rat, zebrafish, carp) reported in the literature. Other bisphenols have been reported to cause similar histopathological and cellular damage in the liver such as vacuolization, degenerated hepatocytes, sinusoidal dilatation, inflammatory cell infiltration, necrosis, fibrosis, steatosis, apoptosis, mitochondrial dysfunction. For example, BPA has been reported to cause cellular infiltration, necrosis, vacuolization, multinucleated giant cells, pyknotic nuclei and congestion in blood vessels in rat liver, as well as triggering mechanisms such as oxidative stress, ER stress-related apoptosis and mitochondrial dysfunction. BPS has been observed to cause apoptosis and inflammation in zebrafish and carp liver, and lipid accumulation and obesity in mice. BPF and BPAF have also been shown to cause hepatic lipid accumulation.

In conclusion, this thesis study revealed that Bisphenol M induced dose-dependent toxic effects on mouse liver tissue. These effects, supported by histopathological and ultrastructural findings, were manifested as cellular degeneration, inflammation, apoptosis and structural defects. ELISA analyses revealed a significant decrease in ALT level and a significant increase in TNF- α levels, which are considered as biochemical indicators of liver damage, in all dose groups in high dose BPM administration. Furthermore, significant fluctuations in IL-6 and cytochrome c levels indicate that BPM is effective on inflammatory response and mitochondrial stress. RT-PCR analyses revealed that high doses of BPM induced apoptosis by significantly increasing p53, Bax and caspase-3 gene expressions and activated the survival response of cells by inducing a significant increase in Bcl-2 gene. These findings suggest that BPM exerts a strong genetic and biochemical effect on cellular stress, apoptosis and inflammation mechanisms. By providing data on the toxicological profile of BPM, the data obtained in the study contribute to the scientific basis for potential regulations and risk assessments for the use of this chemical. In this context, further studies are needed to evaluate the effects of BPM on human health more comprehensively.



1. GİRİŞ

İnsan vücudundaki en büyük organ olan karaciğer, metabolik sistemlerin merkezinde yer almakta ve enerji üretiminin yanı sıra substratların işlenmesi ve sentezinden sorumlu bulunmaktadır (Guyton ve Hall, 2017). Karaciğer, çeşitli endojen ve eksojen maddelerin metabolizmasında önemli rol oynamakta olup, aynı zamanda birçok kimyasal ajanın hedef organı konumundadır (Batura, 2008). Histolojik olarak farklı hücre gruplarından oluşan karaciğerin yaklaşık %80'ini endoderm kökenli hepatosit hücreleri oluşturmaktadır (Zhou ve ark., 2016). Bunun yanı sıra sinüzoid duvarlarında yer alan Kupffer hücreleri, mononükleer fagosit sistemine ait özel makrofajlardır (Pietrangelo, 2004). Karaciğer, çevresel kimyasal kirleticiler ve endokrin bozucu maddeler gibi pek çok dış faktöre maruz kalmakta ve bu durum histolojik yapısında bozulmalara ve işlev kayıplarına yol açabilmektedir.

Son zamanlarda artan plastik kullanımıyla birlikte plastiklerin güvenilirliği önem arz etmiştir. Plastik sanayisinde kullanılan önemli birleşiklerden olan bisfenollerin yapılan çalışmalar ile endokrin bozucu ve çeşitli dokularda yarattığı hasarlar bildirilmiştir. Endokrin bozucular, vücutta hormon sisteminin doğal işleyişini etkileyerek homeostatik dengede bozulmalara neden olan kimyasal bileşiklerdir. Bu maddelerin pek çoğu, hormonal yapıyı taklit ederek veya reseptörlerle etkileşerek hücreler düzeyinde değişikliklere sebep olmaktadır. Bu tür kirleticiler arasında yer alan Bisfenol A (BPA), ilk olarak 1950'li yıllarda polikarbonat ve epoksi reçine üretiminde kullanılmaya başlanmış, yaygın östrojenik etkileri sebebiyle endokrin sistem üzerinde bozucu etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Ayazgök ve Küçükılınç, 2017; Kumar, 2018; Roark, 2020). BPA, glukuronidasyon yoluyla karaciğerde metabolize edilmekte ve yüksek metabolizma hızına rağmen dokularda birikim gösterebilmektedir (Sözlü ve Akdevelioğlu, 2018).

BPA'nın toksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar, bu maddenin karaciğerde nekroz, inflamasyon, vakuolizasyon, mitokondriyal hasar ve nükleer deformasyon gibi çeşitli histopatolojik bozukluklara neden olduğunu ortaya koymuştur (Nakagawa ve Tayma, 2000; Helal ve ark., 2013; Zalet ve ark., 2017; Fawzy ve ark., 2018; Nawaz ve ark.,

2021). Bu etkiler, oksidatif stres, apoptoz, ER stresi ve glikoz metabolizmasında bozulmalar gibi mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir (Jo ve ark., 2014; Gassman, 2017; Meng ve ark., 2018).

BPA'nın sağlık üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle birçok ülkede kullanımına sınırlamalar getirilmiş ve alternatif bileşiklerin geliştirilmesine yönelinmiştir. Bu doğrultuda BPA'ya yapısal olarak benzeyen ancak henüz toksikolojik profili tam olarak ortaya konmamış bisfenol analoglarının kullanımı artış göstermiştir (Schmidt ve ark., 2013; Le Fol ve ark., 2017). Bu analoglardan biri olan Bisfenol M (BPM), son yıllarda sanayide kullanım alanı bulan yeni bir BPA türevidir. BPM, BPA'nın yapısal izomeri olan Bisfenol P ile benzerlik göstermektedir ve her iki bileşiğin nükleer hormon reseptörleri üzerindeki etkilerinin sınırlı olduğu belirtilmektedir (Liu ve ark., 2019).

Bununla birlikte, literatürde BPM'nin karaciğer dokusu üzerindeki toksik etkilerine ilişkin yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Yapılan sınırlı araştırmalar, BPM'nin, kimyasal yapısal benzerliği nedeniyle Bisfenol A'ya (BPA) benzer toksik özellikler gösterebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, yapılan epidemiyolojik çalışmalar BPM'ye çevresel maruziyetin oldukça yaygın ve yüksek düzeylerde olabileceğini göstermektedir (Lucarini vd, 2020). Bu bağlamda, biyolojik sistemler üzerindeki olası zararları kapsamlı şekilde belirlenmemiş olan BPM'nin, özellikle karaciğer gibi metabolik açıdan merkezi öneme sahip organlar üzerindeki etkilerinin araştırılması bilimsel bir gereklilik haline gelmiştir.

Bu tez çalışmasında, BPM'nin karaciğerde neden olduğu yapısal ve moleküler değişimleri değerlendirmek amacıyla deneysel bir model oluşturulmuştur. Çalışmada, dişi farelere 14 gün boyunca %1 DMSO içerisinde çözündürülmüş BPM, üç farklı dozda (2,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Deney süresi sonunda hayvanlar etik kurallar çerçevesinde kurban edilerek karaciğer dokuları çıkarılmış ve çeşitli analizler için ayrılmıştır. Histolojik değerlendirme kapsamında, karaciğer dokularında meydana gelen morfolojik değişimleri incelemek amacıyla Hematoksilin-Eozin (H&E) ve Masson Trikrom boyamaları uygulanmıştır. Bu boyamalar genel doku durumunu ve kollajen birikimini değerlendirmeyi amaçlanmıştır. Hücresel düzeydeki ultrastrüktürel değişiklikleri incelemek amacıyla ise doku örnekleri transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile analiz edilmiştir.

Biyokimyasal analizler kapsamında, karaciğer dokusundan izole edilen total protein örneklerinde tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6), sitokrom c, aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri ölçülmüştür. BPM'nin karaciğer, inflamatuvar yanıt ve mitokondriyal bütünlük üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Moleküler düzeyde gerçekleşen değişiklikleri değerlendirmek amacıyla ise karaciğer dokusundan total RNA izole edilerek, p53, Caspase-3, Bax ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon düzeyleri kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) ile analiz edilmiştir.





2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endokrin Bozucular

Endokrin sistem, organizmanın büyüme, gelişme, metabolizma, üreme ve homeostaz gibi temel işlevlerini düzenleyen hormonları salgılayan bezlerden oluşan karmaşık bir sistemdir. Bu sistemin işleyişi çevresel faktörlerden etkilenebilir; çeşitli kimyasallar hormon dengesini bozarak sağlık üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir. Endokrin bozucular (Endocrine Disrupting Chemicals- EDC'ler), vücudun doğal hormon sistemine müdahale eden ekzojen bileşiklerdir. Söz konusu kimyasal bileşikler, hormonların sentezi, salgılanması, taşınması, metabolizması, bağlanma eylemi veya atılımını değiştirerek veya oluşumunu taklit ederek homeostazı bozabilir. (Casals-Casas ve Desvergne, 2011; Stukenborg vd., 2021; Padmanabhan vd., 2021; Xue vd., 2024).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, endokrin bozucuların insan sağlığı ve ekosistemler üzerindeki etkilerini daha kapsamlı değerlendirmelere imkân tanımıştır. Kimyasalların hormon bozucu işlevleri 1950'lerde bilinmesine rağmen, endokrin bozucu terimi ilk kez 1991 Wingspread toplantısında kullanılmıştır. 1995 yılında çok sayıda kimyasal kirleticinin üreme işlev bozukluğundan sorumlu olduğu bulunduğundan sonra Endokrin bozulması (ED) ve EDC'ler gibi bilimsel kavramlar ortaya çıktı. Dünya Sağlık Örgütü, Birleşmiş Milletler Çevre Programı'nda, yalnızca üremeyi değil, aynı zamanda hormonal işlevleri de doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen esas olarak insanlar da dahil olmak üzere memelilerde petrokimyadan sentezlenen malzemeler, plastikleştiriciler, pestisitler ve çeşitli kirleticilerden oluşan 176 bileşiğin bir listesini oluşturdu. Bu durum, birçok ülkenin bu kimyasalların üretimi ve kullanımı için düzenleyici politikalar oluşturmasını veya gıda, hava ve sudaki kontaminasyonu yönetmesini sağladı (Seralini ve Jungers, 2021, Padmanabhan vd., 2021).

Endokrin bozucular, toksikolojik açıdan; kimyasal yapıları, biyosentez yolları, spesifik kullanım amaçları, endokrin sistem bileşenleri üzerindeki moleküler etki mekanizmaları ve çevresel kalıcılık düzeyleri temelinde çok yönlü biçimde sınıflandırılmaktadır. Endokrin bozucu özellik taşıyan kimyasallar hem doğal hem de

antropojenik kaynaklardan gelebilmektedir. Doğal olarak bulunan endokrin bozucular arasında metaller, metaloidler, parabenler, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) ve fitoöstrojenler (bitki kaynaklı) yer almaktadır (Padmanabhan vd., 2021; Dalamaga vd., 2024). İnsan yapımı sentetik kimyasallar ise tarımsal uygulamalarda, paketleme malzemelerinde, endüstriyel süreçlerde, tüketici ürünlerinde ve tıbbi malzemelerde yaygın biçimde kullanılmakta ve çevresel ortamlarda tespit edilmektedir (Padmanabhan vd., 2021; Dalamaga vd., 2024).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2002'deki "Endokrin bozucuların bilimsel durumu hakkında küresel değerlendirme" tanımına göre, EDC'ler; "Endokrin sistemin işlevlerini değiştiren ve sonuç olarak sağlam bir organizmada veya onun yavrularında veya (alt) popülasyonlarda olumsuz sağlık etkilerine neden olan ekzojen bir madde veya karışım" (Dalamaga vd., 2024). Çevre Koruma Ajansı'na (EPA) ise EDC'leri "vücutta bulunan ve homeostaz, üreme ve gelişim süreçlerinden sorumlu olan doğal kan yoluyla taşınan hormonların sentezi, salgılanması, taşınması, metabolizması, bağlanma eylemi veya atılımına müdahale eden ekzojen ajanlardır" şeklinde tanımlamıştır (Hassan vd.,2024). 2012 yılında Endokrin Derneği tarafından; "EDC, hormon eyleminin herhangi bir yönüne müdahale edebilen ekzojen bir kimyasal veya kimyasal karışımıdır." sade bir dil ile ifade edilmiştir (Stukenborg vd., 2021) Farklı tanımlar olsa da ortak görüş EDC'ler temel özelliği hormon fonksiyonlarını bozarak hastalıklara katkıda bulunmalarıdır. Epigenetik ve toksisite mekanizmalarına dair bilgiler arttıkça, bu kimyasalların yalnızca doğal hormonları taklit eden maddelerle sınırlı olmadığı anlaşılmıştır. Endokrin sistemin, gelişimsel süreçleri ve metabolizmayı uzun vadede etkileyerek sağlık sorunlarının temelinde yer aldığı giderek daha fazla kabul edilmektedir (Ghassabian vd., 2022). Endokrin sistemin bozulması, yalnızca bireysel sağlık üzerindeki etkilerle sınırlı kalmayıp, aynı zamanda popülasyon düzeyinde üreme sağlığı, metabolik hastalıklar ve nörogelişimsel bozukluklar gibi geniş çaplı etkiler doğurabilmektedir. Bu nedenle, EDC'lerin etkilerini daha iyi anlamak ve düzenleyici politikalar oluşturmak amacıyla dünya genelinde bilimsel çalışmalar ve mevzuat düzenlemeleri giderek artmaktadır (Seralini & Jungers, 2021).

Endokrin bozucular üzerine yapılan ilk çalışmalar, çoğunlukla steroid yapılı hormonlara benzer özelliklere sahip kimyasallara odaklanmışken, günümüzde hormonal fonksiyonların geniş bir yelpazesini etkileyen farklı bileşikler de

araştırılmaktadır (Padmanabhan vd., 2021). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2012'de yaptığı bir tahmine göre, günlük hayatta kullanılan yaklaşık 800 kimyasal endokrin bozucu olarak tanımlanmıştır. Buna ek olarak, 2020 yılında Endokrin Bozulma Değişimi (Endocrine Disruption Exchange) veri tabanında endokrin bozucu potansiyele sahip 1482 kimyasalın listelendiği rapor edilmiştir (Padmanabhan vd., 2021).

Organoklor bileşikler, halojenli aromatik hidrokarbonlar, bromlu alev geciktiriciler, polifloroalkil maddeler, parabenler, ftalatlar ve bisfenoller başlıca endokrin bozucu kimyasallar arasında yer almaktadır. (Metcalf vd., 2022).

2.1.1. Bisfenol A

Bisfenol A (BPA / 4,4-izopropilidendifenol; 2,2-bis (4-hidroksi-fenil) -propan), bishidroksiarilalkanlar grubunda yer alan önemli bir kimyasal bileşiktir. İlk kez 1891 yılında kimyager A.P. Dianin tarafından tanımlanmış olan BPA, para pozisyonunda iki hidroksil grubu bulunan fonksiyonel bir difenil yapısına sahiptir. Bu özellik, BPA'nın androjen ve östrojen reseptörlerine agonist veya antagonist olarak bağlanabilmesine olanak tanır. Ayrıca BPA, yapısal olarak sentetik östrojen olan dietilstilbestrol ile büyük benzerlik göstermekte olup, bu benzerlik biyolojik aktivitelerinin temelini oluşturmaktadır (Gao vd., 2015; Gonsioroski vd., 2020; Metcalfe vd., 2022; Xing vd., 2022; Dalamaga vd., 2024). 1960'lı yıllardan bu yana ticari olarak üretilen BPA, günümüzde küresel ölçekte en yüksek üretim hacmine sahip sentetik kimyasallardan biridir. Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) tarafından listelenen bu bileşik, her yıl 15 milyar pounddan fazla üretilmekte olup, yaygın endüstriyel kullanımı ile dikkat çekmektedir (Monneret, 2017; Xing vd., 2022; Hassan vd., 2024; Dalamaga vd., 2024).

BPA; elastiklik, çapraz bağ oluşturma kapasitesi, polimerizasyon yeteneği ve yüksek ısı direnci gibi özellikleri nedeniyle polikarbonat plastikler ve epoksi reçinelerin üretiminde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Polikarbonat plastikler; gıda ve içecek ambalajları (özellikle su ve bebek şişeleri), termal kağıtlar, CD'ler, güvenlik ekipmanları ve tıbbi cihazlarda kullanılırken, epoksi reçineler genellikle konserve kutuları, şişe kapakları ve içme suyu boruları gibi metal yüzeylerin kaplanmasında kullanılmaktadır. Ayrıca bazı diş dolguları, kompozit materyaller ve PVC gibi plastiklerde katkı maddesi olarak da BPA'ya rastlanmaktadır (Andújar vd., 2019; Gonsioroski vd., 2020; Hassan vd., 2024; Dalamaga vd., 2024).

Fiziksel özellikleri açısından BPA, suda düşük çözünürlüğe sahip olmakla birlikte organik çözücülerde çözünebilir renksiz bir katı formundadır. BPA'nın çevreye salınımı; polimerin hidrolizi, yüksek ısı veya asidik-bazik ortama maruz kalma gibi etkenlerle meydana gelebilmektedir. Ayrıca polimerde üretim sürecinden kalan serbest BPA'nın zamanla yüzeye difüze olması da bir diğer maruziyet kaynağıdır. Özellikle yüksek sıcaklık ve nötr olmayan pH koşulları BPA salınımını artırırken; çizilme, çatlama ya da renk bozulması gibi fiziksel deformasyonlar da sızıntıyı hızlandırmaktadır (Gao vd., 2015; Xing vd., 2022; Dalamaga vd., 2024).

Moleküler düzeyde BPA, östrojen, androjen ve tiroid reseptörleri gibi hormon reseptörleriyle bağ kurarak endokrin sistemin doğal dengesini bozabilmektedir. Bu etkiler, hem yetişkin bireylerde hem de doğmamış fetüslerde, üreme sistemi, sinir sistemi, metabolizma ve bağışıklık sistemi üzerinde zararlı sonuçlar doğurabilmektedir (Gonsioroski vd., 2020; Xing vd., 2022). Kadınlarda erken cinsel olgunlaşma, infertilite, tekrarlayan düşükler ve meme kanseri gibi pek çok sağlık sorunuyla BPA maruziyeti arasında korelasyon bulunduğu saptanmıştır (Casals-Casas & Desvergne, 2011; Hassan vd., 2024). Ayrıca, BPA'nın anne sütü, amniyotik sıvı, plasenta ve yenidoğan kanında tespit edilmesi, kuşaklar arası etki riskini artırmaktadır (Hassan vd., 2024; Dalamaga vd., 2024).

BPA'nın insan karaciğerinde CYP2C alt ailesi tarafından metabolize edildiği ve steroidogeneizde rol alan enzimleri inhibe edebildiği saptanmıştır (Gao vd., 2015). Düşük dozlarda dahi nörotoksik, genotoksik ve kanserojen etki potansiyeline sahip olan bu bileşik, çevresel dozlarda dahi biyolojik aktivite gösterebilmektedir (Xing vd., 2022; Issac vd., 2024). BPA'nın kısa yarı ömrüne rağmen yaygınlığı, maruziyetin kronikleşmesine neden olmakta, bu da birikici etkiler doğurmaktadır (Dalamaga vd., 2024).

BPA'nın insan sağlığı üzerindeki etkileri çok yönlü ve sistemik düzeydedir. Endokrin sistem üzerindeki temel etkileri, östrojen, androjen, tiroid ve östrojenle ilişkili reseptörler ($ER\alpha$, $ER\beta$, $ER\gamma$ gibi) üzerinden gerçekleşir; bu durum, hormon dengesizliklerine ve endokrin işlevlerin bozulmasına yol açar (Gonsioroski vd., 2020; Xing vd., 2022). Kadınlarda BPA'ya maruz kalmanın; yumurtalık kistleri, polikistik over sendromu, infertilite, erken menarş ve tekrarlayan düşük gibi birçok jinekolojik soruna neden olduğu bildirilmiştir (Hassan vd., 2024; Casals-Casas & Desvergne, 2011). Bunun yanında, erkeklerde sperm kalitesinde azalma, testiküler disfonksiyon

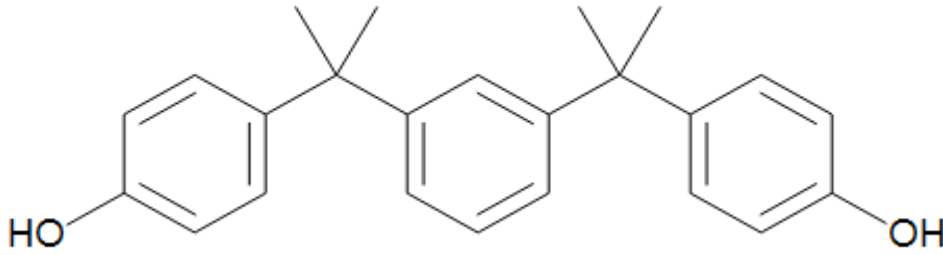
ve hormonal dengesizlikler gözlenmiştir (Xing vd., 2022; Gao vd., 2015). BPA'nın nörotoksik etkileri, gelişmekte olan beyin dokusu üzerindeki olumsuz etkilerle kendini gösterir; prenatal maruziyet, çocukluk çağında dikkat eksikliği, davranış bozuklukları ve hafıza problemleri ile ilişkilendirilmiştir (Metcalf vd., 2022; Hassan vd., 2024). Ayrıca BPA, reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak oksidatif stres yoluyla DNA hasarı oluşturabilir; bu durum epigenetik değişiklikleri tetikleyerek kansere yatkınlık yaratabilir (Issac vd., 2024). Yapılan çalışmalar, BPA maruziyetinin meme, prostat ve yumurtalık kanseri gibi hormonla ilişkili kanser türlerinin gelişiminde rol oynayabileceğini göstermiştir (Gao vd., 2015; Xing vd., 2022). Metabolik açıdan değerlendirildiğinde ise BPA'nın obezite, Tip 2 diyabet ve insülin direnci gibi durumlarla ilişkili olduğu; bu etkilerin çoğunun, adipogenez ve leptin/insülin sinyal yollarındaki bozulmalardan kaynaklandığı bildirilmektedir (Andújar vd., 2019; Dalamaga vd., 2024). Ayrıca kardiyovasküler sistem üzerinde hipertansiyon, ateroskleroz ve miyokard hasarı gibi etkiler; bağışıklık sistemi üzerinde ise otoimmün yanıtların tetiklenmesi gibi olumsuzluklar rapor edilmiştir (Gonsioroski vd., 2020; Issac vd., 2024). Bu çok yönlü etkiler, BPA'nın halk sağlığı açısından yüksek risk taşıyan bir endokrin bozucu olduğunu ortaya koymaktadır (Xing vd., 2022; Hassan vd., 2024; Dalamaga vd., 2024).

Bu riskler doğrultusunda, bazı ülkelerde BPA'nın özellikle bebek ürünlerinde kullanımı yasaklanmıştır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), 2023 yılında BPA için tolere edilebilir günlük alım miktarını 0,2 ng/kg'a kadar düşürmüştür; bu değer, önceki sınırdan yaklaşık 20.000 kat daha düşüktür (Dalamaga vd., 2024). Ancak, bu kısıtlamalara rağmen BPA halen pek çok endüstride kullanılmaya devam etmekte, alternatif olarak sunulan BPA analoglarının (örneğin BPS, BPF) ise çoğu zaman benzer veya daha güçlü toksik etkilere sahip olduğu gösterilmektedir (Andújar vd., 2019; Metcalf vd., 2022; Pelch vd., 2019).

Sonuç olarak, BPA ve türevlerinin yaygın kullanımı ve biyolojik etkileri göz önüne alındığında, bu kimyasalların hem çevre hem de halk sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturduğu söylenebilir. Endokrin bozucu etkileri başta olmak üzere; nörotoksisite, üreme toksisitesi, obezite, kanser ve metabolik bozukluklarla ilişkilendirilen BPA'ya karşı, ulusal ve uluslararası düzeyde daha sıkı düzenlemeler ve farkındalık politikaları gerekmektedir (Issac vd., 2024; Hassan vd., 2024; Xing vd., 2022).

2.1.2. Bisfenol M

Bisfenol M (1,3- bis [2- (4-hidroksifenil) -2- propil] benzen; 4,4'-(1,3-Phenylenediisopropylidene) bisphenol; BPM)(şekil 2.1), endüstride sık kullanılan bir bisfenol analogudur (Yao vd., 2019). Kullanım alanı yapıştırıcılar, kaplamalar, epoksi reçineleri, yüksek performanslı plastikler, optoelektronik malzemeler ve çeşitli teknolojik ürünlerin üretiminde yer almakta olup, diftalonitril eter reçinesi sentezinde bileşen olarak kullanılmaktadır. BPA'nın yerine alternatif olarak endüstriyel uygulamalarda yaygın şekilde kullanılmaya başlanan BPM'nin biyolojik sistemler üzerindeki potansiyel toksik etkileri, son yıllarda bilimsel ilgi odağı haline gelmiştir (Yao vd., 2019; Chen vd., 2024; Sigma, 2025).



Şekil 2.1. Bisfenol M çizgi formülü (Dre-C10655930, 2025).

Nükleer reseptörler düzeyinde Liu ve ark. (2019) yaptığı moleküler analizler, BPM'nin çok sayıda reseptöre bağlanma kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymuştur. BPM; PPAR γ , ROR α , ROR β , ROR γ , LXR α , LXR β , VDR, PXR, CAR, RXR α , RXR β , RXR γ , ER α , ER β , ERR γ ve GR gibi çeşitli nükleer reseptörlerin potansiyel ligandı olarak tanımlanmıştır. Özellikle östrojen reseptörleri ER α ve ER β ile RXR ve ROR alt tiplerine olan yüksek afiniteli bağlanması, BPM'nin endokrin sistemi hedef alan etkilerini desteklemektedir. Vitamin D reseptörü (VDR) açısından değerlendirildiğinde ise BPM, diğer bisfenol analoglarının aksine, yüksek konsantrasyonlarda dahi zayıf ancak özgül bir bağlanma sergilemiş ve bu yönüyle dikkat çekmiştir (Liu vd., 2019).

PPAR γ reseptörü yalnızca belirli bisfenol analoglarıyla — özellikle BPAP, BPC ve BPM — etkileşim göstermiş; diğer analoglar ise anlamlı bağlanma göstermemiştir. Retinoid X reseptörleri (RXR α , RXR β , RXR γ) ile yapılan analizlerde ise test edilen bisfenol analoglarından yalnızca BPAF ve BPC'nin bu reseptörlere zayıf bağlandığı gözlenirken, BPM'nin RXR alt tiplerine bağlanma kapasitesine sahip olması onu öne

çıkarmaktadır. Benzer şekilde, retinoik asit ilişkili reseptörler ($ROR\alpha$, $ROR\beta$ ve $ROR\gamma$) açısından yalnızca BPM ve BPP zayıf bağlanma göstermiştir. Bu bulgular, BPM'nin reseptör düzeyinde daha geniş bir biyolojik hedef spektrumuna sahip olduğunu ve BPA'ya kıyasla daha güçlü bir potansiyel endokrin bozucu olduğunu göstermektedir (Liu vd., 2019).

BPM'nin toksikolojik etkileri dişi üreme sistemi özelinde de dikkat çekicidir. Fare modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, BPM'nin oositlerin olgunlaşma sürecini olumsuz etkilediği belirlenmiştir. 3–4 haftalık dişi farelerden izole edilen oositler, 100 μ M, 200 μ M ve 300 μ M konsantrasyonlarında BPM'ye maruz bırakıldığında, germinal vezikül yıkımı ve polar cisim ekstrüzyonu oranlarında anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Bu durum, BPM'nin meiyotik durmaya neden olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, BPM maruziyeti oositlerde anormal iğ ipliği morfolojisi, düzensiz kromozom hizalanması ve iğ ipliği kontrol noktasının (spindle assembly checkpoint) sürekli aktif kalması gibi sitogenetik bozukluklara yol açmıştır. Hücre döngüsünde rol oynayan siklin B1 ve securin proteinlerinin degradasyonunun inhibe edilmesi de bu süreci destekleyen bulgulardandır. Sitoplazmik düzeyde, mikrotübül düzenleme merkezine ait proteinlerin yanlış lokalizasyonu, mikrotübül düzenleme merkezin işlevinde bozulmaya işaret etmektedir. Ayrıca, α -tubulin asetilasyonundaki artış mikrotübül stabilitesinin azaldığını; aktin ekspresyonundaki düşüş ise hücre iskeletinde ciddi bozulmalar yaşandığını ortaya koymuştur. Genetik materyal düzeyinde, BPM maruziyetiyle birlikte DNA hasarının arttığı ve histon modifikasyonlarında anlamlı değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, BPM'nin epigenetik regülasyon mekanizmaları üzerinde de etkili olabileceğini göstermektedir (Chen vd., 2024).

BPM'nin potansiyel karsinogenik etkilerini değerlendirmek amacıyla Liu ve ark. (2023) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında yapılan in vitro analizlerde, BPM'nin hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etkisi saptanmamış olsa da, hücre göçü ve invazyonunu belirgin şekilde artırdığı görülmüştür. Bu durum, BPM'nin tümör hücrelerinin metastatik kapasitesini artırabileceğini ve kanser progresyonunda dolaylı bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. İn vivo fare modellerinde, düşük doz BPM maruziyeti, üçlü negatif meme kanseri metastazını teşvik etmiş ve bu etkinin epitel-mezenkimal geçiş sürecine dahil olan N-kadherin, MMP-2, MMP-9 ve Snail proteinlerinin ekspresyonundaki artışla ilişkili olduğu saptanmıştır. Moleküler mekanizma düzeyinde, BPM'nin

PI3K/AKT yolunu aktive ettiği ve bu yol üzerinden epitel-mezenkimal geçiş surecini tetikleyerek metastatik kapasiteyi artırdığı gösterilmiştir (Liu vd., 2023).

Maruziyet düzeylerine ilişkin veriler, BPM'nin insan popülasyonunda yaygın olarak bulunduğunu ortaya koymaktadır. Polonya'da gerçekleştirilen bir çalışmada, 18–40 yaş aralığındaki 245 kadından elde edilen kan örneklerinin %65.8'inde BPM tespit edilmiştir (Owczarek vd., 2018). İsviçre'de yaşayan 6 ila 36 aylık 109 bebekten elde edilen idrar örneklerinin analizinde ise BPM, %25 oranında saptanarak en sık tespit edilen bisfenol türevi olmuştur. Bu oran, BPA'nın yalnızca %7 sıklıkla tespit edildiği göz önünde bulundurulduğunda oldukça yüksektir. BPM'nin ortalama konsantrasyonu 1.31 µg/g kreatinin olarak belirlenmiş; bu değer BPA'nın ortalamasından yaklaşık 22 kat daha yüksektir. Konsantrasyon aralığı ise 0.13–8.56 µg/g kreatinin gibi oldukça geniş bir dağılım göstermiştir (Lucarini vd., 2020). Bu durum, bireyler arasında ciddi maruziyet farklılıklarının bulunduğunu ve bazı bireylerde aşırı düzeyde BPM birikimi olabileceğini düşündürmektedir.

2.2. Karaciğer

En büyük iç organ olan karaciğer, aynı zamanda derinden sonra vücudun en büyük organıdır. Vücudun homeostazını korumak için safra üretimi, protein sentezi, yağ metabolizması ve glikoz homeostazı başta olmak üzere birçok metabolik süreçte görev üstlenmektedir. Ayrıca son yıllardaki kanıtlar karaciğerin bağışıklık fonksiyonunda da görev aldığını göstermektedir (Junqueira ve Carneiro, 2006; Peng ve ark., 2016). rettiği safra nedeniyle ekzokrin ve sentezlediği bazı maddeleri doğrudan kana vermesi nedeniyle de endokrin bez özelliği olan karaciğer vücudtaki en büyük bez dokusudur. Vcudtaki çoğu sistemlerle ilişkisi bulunan, karmaşık ve önemli fonksiyonları olan karaciğer en önemli metabolik merkezdir. Karaciğer hilumda kalınlaşan ince fibröz bağ dokusundan oluşan Glisson kapsülü ile evrenlenmiştir. Glisson kapsülünün etrafı, karaciğerin direkt olarak diyafragmaya ya da peritonda bulunan diğer organlara yapışığı yerler dışında, seröz bir kılıf olan visseral periton ile evrenlenmiştir. Karaciğer anatomik olarak iki büyük loba (sağ ve sol loblar) ve iki küçük loba (kuadrar ve kaudar loblar) ayrılır. Bu loblar sadece topografik önem taşımaktadır. (Junqueira ve Carneiro, 2006; Ross ve Pawlina, 2006; Seyhan, 2014; Demir, 2023).

Karaciğer, dolaşım sistemindeki konumuyla metabolitleri bir araya getirme, dönüştürme, biriktirme, bazı hormonların inaktivasyonu ve ksenobiyotiklerin indirgenmesi ve vücuttan eliminasyon işlevleri için ideal bir yapıya sahiptir. Bu süreç, karaciğerin lipid sindirimi için önemli olan safra ile gerçekleşir. Ayrıca, vücut için gerekli olan birçok substratın, aminoasit ve plazma proteinlerin depolanması ve üretilmesinden sorumludur. Karaciğer temel olarak hepatositlerden oluşur. Karaciğer poligonal/altıgen şeklindeki yapısal birimlerden oluşur. Bu birimlere karaciğer lobülü denir. Lobüllerin köşelerinde safra kanalı, lenfatikler, sinirler ve kan damarı ihtiva eden bağ doku ile çevrelenmiş portal alanlar bulunmaktadır. (Junqueira ve Carneiro, 2006)

2.2.1. Histoloji

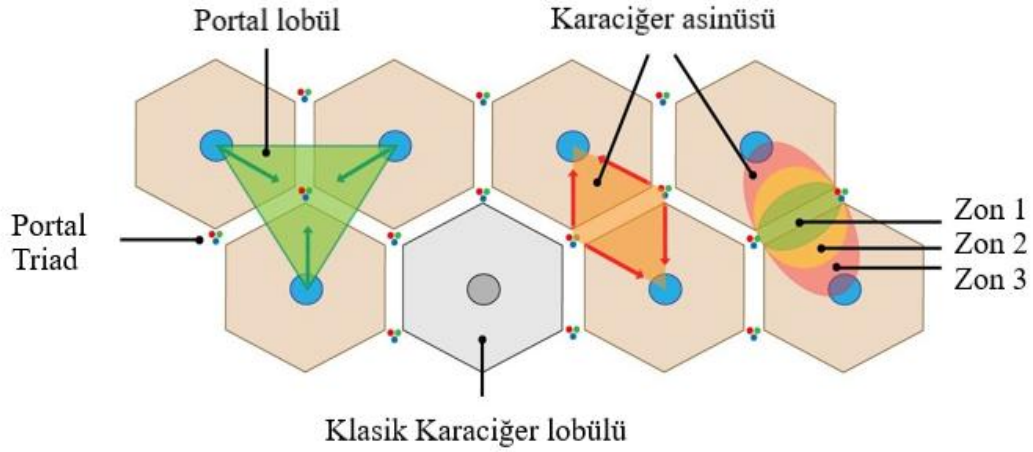
Parankima ve stromadan oluşan karaciğerin yüzeyinin büyük bir kısmı ince bir bağ tabakası ve onun üzerine yerleşmiş tek katlı yassı epitel türü mezotelyumdan oluşur. Bu yapıya seröz zar ya da visseral periton denir. Seröz zar karaciğerin diyafragmatik yüzeyindeki peritonsuz alan (area nuda/bare area) kısmı hariç devamlılık gösterir. Seröz zarın hemen altında az miktarda elastik lif ve bol miktarda kolajen lif içeren sıkı bağ dokusundan oluşan Glisson kapsülü (capsula fibrosa) vardır (Dilek, 2003; Junqueira ve Carneiro, 2006; Radu-Ionita ve Ark., 2020). Glisson kapsülü altında bulunan parankim dokusu ile yapışıktır ve dokunun içine septalar gönderir. Karaciğere damarlar, sinirler ve safra kanalları visseral yüzeydeki hilum (porta hepatis) giriş ve çıkış yaparlar. Glisson kapsülü bu bölgede kalınlaşarak damarları, sinirleri ve safra kanallarını sarar. Bağ dokusu, dallanan damarlar, sinirler ve safra kanalları karaciğerin içine nüfuz ederek karaciğeri loblara ve lobüllere ayırır. Karaciğer lobülleri ışık mikroskobunda bazı türlerle de kolayca ayırt edilebilirken, insanda interlobüler bağ dokusu az geliştiğinden lobülleri ayırt etmek zordur (Dilek, 2003; Junqueira ve Carneiro, 2006; Radu-Ionita ve Ark., 2020; Amraje, 2020). Histolojik incelemelerde lobüllerin komşu lobüllerle birleştiği köşelerde gevşek stromal bağ dokusunun genişlemesi ile oluşan üçgen ya da dörtgen şeklindeki alanlar izlenir. Bu alana Portal alan, Portal aralık, Portal kanal veya Kiernan aralığı şeklinde isimlendirilebilir. Portal alanda Portal triad adı verilen üç önemli yapı karşımıza çıkar; vena interlobülaris, arteriya interlobülaris ve safra başaltım kanalı. Vena interlobülarisin çapı arteriya interlobülaris göre daha büyük, lümeni daha düzensiz ve incedir. Safra kanalının epiteli tek katlı kübik hücrelerden oluşur. Portal alanda aynı zamanda lenf damarları

ve sinir fibrilleri (sempatik ve parasempatik) de yer alır (Dilek, 2003; Junqueira ve Carneiro, 2006; Radu-Ionita ve Ark., 2020; Amraje, 2020).

Karaciğer, hepatositlerin yan yana dizilerek oluşturduğu hepatosit (karaciğer) plaklarından oluşan bir parankime sahiptir. Karaciğer parankimin organizasyonun morfo-fonksiyonel olarak 3 önemli karaciğer lobül modeli vardır;

- 1- Klasik karaciğer lobülü,
- 2- Portal lobül ve
- 3- Portal / Karaciğer asinüsü (Şekil 2.2.).

Klasik karaciğer lobülü hekzagonal şeklin merkezinde vena santralis, köşelerde de portal alanların yer aldığı 0,7 x 2 mm boyutunda doku kitlesidir. Klasik karaciğer lobül tanımı 1833 yılında santaral ven ve portal alanlar esas alınarak Kiernan tarafından ulaşılmıştır. Hepatositler merkezden perifer doğru dizilerek tek hücre kalınlığındaki hepatosit plaklarını oluşturmaktadır (Dilek, 2003; Ross ve Pawlina, 2006; Radu-Ionita ve Ark., 2020). Hepatosit plakları arasında santral vene açılan çapları yaklaşık 5 ila 10 µm olan sinüzoidler yer alır (Warren ve ark., 2008). Karaciğer sinüzoidlerine kan akışı hem portal venden (%70) hem de hepatik arterden (%30) olmaktadır (Poisson ve ark., 2017). Sinüzoidlerdeki kan basıncı sistemik dolaşımdakinden çok daha düşüktür (Peng ve ark., 2016). Sinüzoidleri çevreleyen endotel hücreleri ile hepatositler bazal yüzeyi arasında potansiyel bir boşluk olan Disse aralığı (Perisinüzoidal aralık, subendotelyal boşluk) yer almaktadır (Dilek, 2003; Ross ve Pawlina, 2006; Radu-Ionita ve Ark., 2020). Disse aralığında elektronca yoğun bir bazal membran bulunmazken, bazal membran proteinleri olan tip IV kolajen, glikoprotein(nidogen) ve laminin bulunmaktadır (Puche ve ark., 2013). Bu boşlukta hepatositlerin bazal yüzeyinden uzanan düzensiz 0,5 µm uzunluğunda mikrovilluslar yer almaktadır. Mikrovilluslar hepatositlerin yüzey alanını 6 kat artırarak, endotel hücreleri arasındaki boşluklardan perisinüzoidal aralığa sızan kana safra hariç diğer salgıları taşır. Lobül içerisinde kan periferden merkeze doğru akmaktadır. Aynı zaman fetal dönemde disse aralığında kan yapıcı hücre adaları yer almaktadır. Bu hücre adaları yetişkinlerde kronik anemi durumunda yeniden oluşabilmektedir. Lobülün portal alanında stroma ile hepatositlerin arasında periportal aralık (Mall aralığı) adlı küçük bir alan yer almaktadır (Dilek, 2003; Ross ve Pawlina, 2006; Radu-Ionita ve Ark., 2020).



Şekil 2.2. Karaciğer lobül modelleri (Normal liver histology, 2020).

Portal lobül 1906 yılında Mall tarafından karaciğerin başlıca ekzokrin fonksiyonu olan safranin salgılanışı dikkate alınarak yapısal bir birim olarak önerilmiştir. Portal alana en yakın üç santral veni dikkate alınarak çizilen hayali çizgilerin oluşturduğu alana portal lobül denmektedir. Bu üç klasik karaciğer lobülünün ortaklaşa interlobüler safra kanalını kullandığı anlamına gelmektedir. Hepatositler tarafından salgılanan safra kanalikülüne bırakılır. Safra kanalikülünün duvarını hepatosit membranlarının oluşturduğu perisantralde $0,5 - 1 \mu\text{m}$, periportalda ise $1 - 2 \mu\text{m}$ çapındaki hücreler arasındaki boşluklardan oluşmaktadır. Hepatositler arasındaki zonula okludens sayesinde safra hepatik sinüzoidlere ulaşamayacağından kanla karışamaz. Doğrudan ışık mikroskobu görüntülerinde görüntülenemeyen safra kanalikülleri, elektron mikroskopik mikrograflarında görmek mümkündür. Küçük mikrovillusların olduğu safra kanaliküllerinde safranin akımı kanın tam tersi şeklinde merkezden periferedir. Safra, safra kanalikülünden sonra sırası ile $0,50 - 2 \mu\text{m}$ çapındaki Hering kanalına (safra kanalcığı), oradan tek katlı kübik epitel kaplı $15 - 40 \mu\text{m}$ çapındaki interlobüler safra kanalına ulaşmaktadır. İnterlobüler safra kanalları birleşerek sağ ve sol ana safra kanalına açılarak karaciğerden çıkar (Dilek, 2003; Ross ve Pawlina, 2006; Radu-Ionita ve Ark., 2020).

Karaciğerdeki mikrovasküler sorunların histopatolojik olarak incelenmesinden sonra Rappaport (1958) tarafından, Karaciğer asinüsü (Portal asinüs/Hepatik asinüs) yeni bir morfolojik ve fonksiyonel birim olarak tanımlandı. Bu tanımlama dejenerasyon, rejenerasyon, metabolik aktivite, kan akışı ve bazı toksik etkilerin açıklana bilirliliği açısından önem arz etmektedir (Dilek, 2003; Ros ve Pawlina, 2006; Radu-Ionita ve ark., 2020). İki komşu klasik karaciğer lobülünün portal ven ve hepatik arterin bir dalı

ile kanlanan santral ven ile drene olan, kabaca portal alanlardan başlayarak iki santral vene çizilen hayali çizgilerle oluşturulan dörtgen şeklindeki karaciğer parankiminin en küçük fonksiyonel birimini temsil eden alandır. Lobüldeki hepatositler altıkları farklı içerik ve miktardaki kandan ötürü heterojen bir dağılım gösterirler. Bu heterojen dağılım sonucu karaciğer üç farklı zona ayrılır (Radu-Ionita ve ark., 2020).

1. Periferik zon / Periportal bölge (Zon 1)
2. Ara zon / Ortazonal bölge (Zon 2)
3. Santral zon / Sentrilobüler bölge (Zon 3)(Şekil 2.2.).

Periferik zon klasik lobülün periferine dek gelmektedir. Kanın akış yönü periferden santrale doğru olduğundan oksijenden, glikojenden ve diğer maddelerden zengin kanın ilk karşılayan hepatositler bu bölgede yer alır. Bu yüzden bu zonda yer alan hepatositler sürekli aktivite halinde olup en çok glikojenin depolandığı ve açlık durumunda glikozu kana ilk bırakan hücrelerdir. Toksik maddelerden etkilenen ilk hepatositler yine bu bölgede yer alır. Periferik zonda yer alan hepatositlerin Granüllü Endoplazmik Retikulumu ve bol kristal mitokondri iyi gelişmiştir. Dolaşım bozulduğu zaman en son ölen, rejenerasyonun ilk gerçekleştiği hücreler bu zonda yer alır. Ara zon; periferik zondan santral zona geçiş bölgesi olup, sınırlarının net olmadığı orta düzeyde aktivite gösteren hepatositler yer almaktadır (Dilek, 2003; Ros ve Pawlina, 2006; Radu-Ionita ve ark., 2020).

Vena santralisin yanında yer alan en içteki hepatositlerin oluşturduğu santral zon diğer zondaki hepatositlere göre daha az aktiftir. Hepatositlerin organelleri daha az gelişmiş olup Düz Endoplazmik Retikulum daha zengindir. Dolaşım bozulduğu zaman ilk nekrozun gerçekleştiği, patolojik ve fizyolojik yağ birikimin ilk olarak gözlemlendiği zondur. Periferik zondaki hepatositler daha çok lipid metabolizmasına dahil olurken santral zondaki hepatositler daha çok detoksifikasyonda yer alır. Aynı zamanda glukoneogenez periferik zonda daha fazla gerçekleşirken, glikoliz ise santral zonda gerçekleşir. (Dilek, 2003; Radu-Ionita ve Ark., 2020).

2.2.1.1. Hepatositler

Karaciğerde başlıca yer alan hücreler; hepatositler, Kupffer hücreleri, karaciğer sinüzoidal hücreleri (endotel hücreleri), stellat/yıldızsı hücreler (ito hücreleri) ve natural killer (pit hücreleri)'dir. Karaciğer hücre popülasyonunun yaklaşık %80'ini oluşturan hepatositler, 6 ya da daha fazla yüzeyli, poligonal şeklinde ve 20 – 30 µm

apında hücrelerdir. Hepatositler, aralarında sinüzoidlerin yer aldığı şekilde, vena santralisine doğru ı ınsal olarak tek ya da çift hücre kalınlığında hücre plakları oluşturarak labirentsi kordonlar oluşturur. Bir hepatositin ömrü ortalama olarak 5 ile 6 aydır. Hepatosit membranında üç farklı  zelle mi  yüzey bulunur; sinüzoid ve perisinüzoidal boşluğa bakan y zeeye s n zoidal, komşu hepatosite bakan y zeeye lateral ve safra kanalik llerini çevreleyen hepatosit yüzeyine kanaliküler yüzey denir. S n zoidal yüzeyde disse aralığında retiküler liflerle (tip 3 kolajen fibrilleri) ile mikrovilluslar bulunur. Mikrovilluslar ile sekresyon ve absorpsiyon artmış olur. Aynı zamanda mikrovillusların tabanı kolesterol, spingolipidler, klatrin kaplı çukurlar ve kaveolin bolca bulunmaktadır. Disse aralığı bazal lamina içermez. Hepatositlerin sinüzoidal ve lateral yüzeyleri kanaliküler yüzeyden safra kanalik l n n alt ve üst kısmında bulunan zonula okludensler (sıkı bağlantı noktaları) ile ayrılması sağlar. Ayrıca hepatositlerin lateralinde desmozomlar ve gap junctionlar bulunur (Dilek, 2003; Ros ve Pawlina, 2006; Radu-Ionita ve Ark., 2020)

Hepatositlerin ekirdeği hücrenin yaklaşık olarak %5 – %10 kapsamaktadır. Doğumda hepatositler genellikle mononükleer şeklinde olup yetişkinliğe ulaşıldığında toplam hepatositlerin %25 bin kleerdir. Aynı zamanda ya  ilerledikçe hücre büyüklüğü ve poliploidi sayısı artar.. Hepatositler fetal yaşam ve yaşamın erken dönemlerinde ortanın boyutunun artması amacıyla çok fazla mitotik figür görülür. Hasar sonrası iyileşme döneminde çok sayıda mitoz figürü görülebilir (Dilek, 2003; Radu-Ionita ve Ark., 2020).

Endoplazmik Retikulum hücre hacminin %15 olup, hücre zarından 35 kat daha fazla yüzey alanına sahiptir. Granüllü Endoplazmik Retikulum sayıca düz retikulumdan fazladır. Hepatosit yer aldığı portal asinus zonu Endoplazmik Retikulumun sayısını etiler. Santal zonda yer alan hepatositlerdeki Düz Endoplazmik Retikulum sayısı periferik zondakinin 2 katıdır. Düz Endoplazmik Retikulum lipit metabolizması, kolesterol sentezi ve birçok yağda çözünebilir ilacın parçalanmasından sorumlu enzimleri ihtiva eder. Granüllü Endoplazmik Retikulum ve serbest ribozomların bulunduğu bazofilik boyan sitoplazmadaki bu bölgelere bazofilik cisimcik denir. Bu bazofilik cisimciklerde dolaşıma salınan albümin, fibrinojen ve plazma proteinlerinin sentezi gerçekleştirilir. Düz Endoplazmik Retikulumun membranında bulunan sitokrom P-450, hepatositlerin ksenobiyotikleri metabolize ve detoksifiye edildiği oksidasyon ve konjugasyon ile ilişkilidir. Sitoplazmada diffüz olarak yayılım gösteren

Düz Endoplazmik Retikulum çeşitli ksenobiyotik maruziyetinde sayısını artabilir. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde Düz Endoplazmik Retikulum kümelerinin içinde toplanmış 20 – 30 nm çapında glikojenler dikkat çeker. Hepatositler, çapları 0,2 – 1 µm arasında olan Endoplazmik Retikulumdan türeyen immünohistokimyasal boyamalar ile görülebilen yaklaşık 200 – 300 adet peroksizom içermektedir. Hücre içinde oksijenin kullanıldığı başlıca yerlerden biri olan peroksizomlar büyük miktarlarda oksidaz içermektedir. Oksidaz ile oluşan hidrojen peroksit, katalaz enzimi ile su ve oksijene parçalanır. Birçok detoksifikasyon olayında bu tip reaksiyonlar görülebilmektedir (Dilek, 2003; Ros ve Pawlina, 2006; Radu-Ionita ve Ark., 2020).

Enerji gereksinimi yüksek olan hepatositler, çapı 1,5 µm ve uzunluğu 4 µm'ye kadar ulaşabilen çeşitli boyamalar ile görülebilen 800 ila 2000 adet mitokondriye sahiptir. Mitokondriler, küresel ya da oval şekildedir. Hepatositlerdeki mitokondriler santral zonda, periferik zona göre daha küçük ve daha az sayıdadır. Mitokondri sayısı toplam sitoplazmik hacmin yaklaşık %20'sine oluşturduğundan dolayı hematoksilen-eozin boyamalarında sitoplazma asidofilik boyanmaktadır. Mitokondrinin iç zarı ve lamelleri ATP üretimi için gerekli olan oksidatif fosforilasyon sürecini gerçekleştiren solunum zinciri enzimlerini içerir. Bu enzimler, hepatositlerin enerji üretiminde önemli bir rol oynar. Mitokondrinin matriksinde bulunan dairesel DNA, mitokondriyal proteinlerin bir kısmının sentezi için genetik bilgiyi taşımaktadır (Dilek, 2003; Radu-Ionita ve Ark., 2020).

Özel boyamalar ile görülebilen golgi cisimciği, elektron mikroskobu incelemelerinde hepatositlerde yaklaşık 40 ila 50 adet yassılaştırmış veziküller nükleus ve safra kanalikülü yakınlarına dağılmış bir vaziyette görülmektedir. Yüksek miktarlarda glikozilasyon enzimine sahip olan golgi cisimciği ayrıca membran proteinleri için varış yeri öncesi bir durak görevini üstlenir. Golgi cisimciği lipozomları oluşturmasının dışında, plazma proteinlerinin, glikoproteinlerin ve lipoproteinlerin salgılanmasını da sağlar (Dilek, 2003; Radu-Ionita ve Ark., 2020).

Lizozomlar yaklaşık 60 çeşit asidik hidrolaz içeren, hücre içi organellerin yıkımı ve değişimi önemli, membran kaplı veziküllerdir. Asidik hidrolazlardan membranı korumak için membranın iç yüzeyinde kalın bir polisakkarit tabakası olan glikoliks yer alır. Demirin ferritin kompleksi hepatosit lipozomlarında depolanmaktadır. Hücrenin metabolik faaliyetlerini düzenleyen lipozomlar ayrıca nükleus, hücre zarı,

lipid damlacıkları ve mitokondri ile çeşitli ağlar kurarak hücrenin otofajisinde görev alır. Hematoksilen-eozin boyamalarında lipozomlarda bulunan lipofuksin pigmenti çeşitli secilerde görülebilir (Dilek, 2003; Radu-Ionita ve Ark., 2020).

2.2.1.2. Kupffer hücreleri

Kupffer hücresi ya da diğer adı ile sinüzoidal makrofajlar mononükleer fagositik hücrelerdir. Uzun süredir kemik iliğinden köken aldığı sanılan Kupffer hücreleri, yapılan çalışmalar ile yumurta kesesinden köken alındığı ortaya çıkarılmıştır (Li ve ark., 2017; Ginhoux ve ark., 2014). Organizmadaki tüm makrofajların %80-90 karaciğerde bulunmaktadır. Sitoplazmik membranın birçok yerinde mikrovillus, psödopod ve lamellipodia bulunmaktadır (Basit ve ark., 2018). Elektron mikroskopisi ile Kupffer hücreleri sanıların aksine endotel hücrelerinin apikal yüzeyinde değil sinüzoid sınırında yer aldığı gösterilmiştir (Ross ve Pawlina, 2006). Endotel hücrelerinden büyük olan Kupffer hücreleri, nükleusları oval, büyük ve son derece belirgindirler. Histolojik boyamalarda nükleusun şekli ve soluk boyanmasından ötürü endotel hücrelerinden kolayca ayırt edilebilmektedirler. Kupffer hücrelerinde sitoplazmik bağlantı bulunmadığından migrasyon yapabilmektedirler. Aktif olarak fagositoz yaptıklarından dolayı tripan mavisi veya çini mürekkebi ile boyanması mümkündür (Dilek, 2003). Sitoplazmasında eritrosit parçacıkları ve demirin ferritin formunda bulunması Kupffer hücrelerin eritrosit yıkımında görev aldığını göstermektedir (Ross ve Pawlina, 2006). Ayrıca çeşitli sitokinler salgılayarak immünomodülatör özelliği olan Kupffer hücresi karaciğer hasarına karşı ilk savunma hattını oluşturur (Radu-Ionita ve ark., 2020).

2.2.1.3. Karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri

Sinüzoid duvarı geniş fenestralı (kesintili-devamsız-transselüler gözenekli) endotel (sinüzoidal) hücrelerinden oluşur. Endotel hücreleri fiziksel bir bariyer olmanın yanında aynı zamanda hemostaz/tromboz, metabolitlerin taşınması, inflamasyon ve anjiyogenez fizyolojik ve patolojik süreçlerde de yer almaktadır (Poisson ve ark., 2017). Endotel hücrelerinde sitoplazma ve organel azdır. Yassı ve küçük nükleusları rutin boyamalarda koyu olarak boyanmaktadır. Endotel hücrelerin de çapları 0,1-0,2 µm arasında değişen çok sayıda por bulunmaktadır. (Dilek, 2003; Radu-Ionita, 2020). Az sayıda mitokondrisi bulunan endotel hücreleri anaerobik bir metabolizmaya sahiptirler (Sørensen ve ark., 2011). Düşük çoğalma oranına ve uzun bir yaşam süresine sahip oldukları tahmin edilmektedir (Poisson ve ark., 2017). Karaciğer

sinüzoidal endotel hücrelerinde bazal membran bulunmaması nedeni ile çözünen maddeler ve kolloidler, ito hücrelerinin uzantılarına ve disse aralığına doğrudan ulaşabilmektedir. Endotel hücrelerinde genellikle hücresel uzantılar bulunmamaktadır. Fenestralar olmaksızın kadherin ve Zonula okludens gibi bağlantılar ile endotel hücreleri birbirlerine bağlandıkları gösterilmiştir (Sørensen ve ark., 2011; Gracia-Sancho ve ark., 2021). Karaciğer hücrelerinin yaklaşık %15 ila 20'sini oluşturan endotel hücreleri toplam karaciğer hacminin yalnızca %3'ünü oluşturmaktadır (Poisson ve ark., 2017). Karaciğer sinüzoidal endotel hücrelerinin diğer endotel hücrelerine kıyasla yüksek endositotik kapasitesi, vücuttaki kan yoluyla taşınan atık makromoleküllerin ve nanopartiküllerin kandan temizlenmesinde önemli rol alır. Endotel hücreleri ayrıca sinüzoidal kan akışının düzenlenmesi, karaciğer rejenerasyonunun tetiklenmesinde, karaciğer fibrozu ve karaciğer metastazı gibi hepatik komplikasyonlara katkıda bulunur (Sørensen ve ark., 2011). Karaciğer sinüzoidal endotel hücrelerinde fenestralar 1970 yılında Eddie Wisse'nin transmisyon elektron mikroskobu ile ilk kez gözlemlendi. 2008 gelindiğinde sağlıklı sinüzoidal fenestraların çapının türe bağlı olarak 100 ila 200 nm arasında değiştiği (fare için 140 nm), fenestraların çapının oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak sinüzoid boyunca farklılık gösterdiği, en küçük çapın ve fenestra sayısının periportal bölgede olduğu bildirilmiştir (Peng ve ark., 2016; Gracia-Sancho ve ark., 2021). Ayrıca kan basıncı, hormonlar, ilaçlar, toksinler, hücre dışı matristeki değişiklikler, hastalıklar, yaşlanma ve arsenik gibi çevresel kirleticilere maruz kalmak fenestraların çapları değiştirebilmektedir (Sørensen ve ark., 2011).

2.2.1.4. Stellat hücreleri

Stellat hücreleri eskiden Ito hücreleri, perisinüzoidal hücreler, karaciğer perisitleri ve lipositler isimlendiriliyordu (Ezhilarasan, 2022; Moreira, 2007). İlk olarak 1876'da Alman anatomist Carl von Kupffer tarafından hepatik stellat hücreleri olarak adlandırılan daha sonra 1951'de Japon anatomist Toshio Ito tarafından yağ depolayan hücreler olarak tanımlanmıştır (Winau ve ark., 2007). Stellat hücreleri perisinüzoidal veya Disse boşluğunda yer alan 5-10 µm büyüklüğündeki yerleşik mezenkimal hücrelerdir (Ezhilarasan, 2022; Kamm ve McCommis, 2022). Karaciğerde bulunan hücrelerin popülasyonunun %5-%8 gibi küçük bir grubunu oluşturan stellat hücreleri karaciğer hasarında kritik görevler almaktadır. Karaciğerde olası bir hasar durumunda aktive olarak, karaciğer fibrozunda kolajen açısından zengin ekstraselüler matrisi

üretmeye başlar. Stellat hücreleri aktif olmadıkları zaman da A vitaminin depolanması ve kontrollü salımından sorumludur. Ayrıca karaciğer rejenerasyonunda, inflamatuvar yanıtta ve sinüzoidal dolaşımın sürdürülmesinde görev alır (Kitto ve Henderson, 2021; Ezhilarasan, 2022; Kamm ve McCommis, 2022). Vücutta bulunan A vitamininin toplam %70-%95'i sitoplazmik lipid damlacıkları şeklinde stellat hücrelerinde bulunur (Kamm ve McCommis, 2022). Normal karaciğerde stellat hücreleri hareketsiz, köşeli, yuvarlak hücre gövdelerine sahip ve sitoplazmik uzantıları endotel hücrelerinin yüzeyine kadar uzanabilmektedir. Stellat hücrelerinin inaktif hali sitoplazmik lipid damlacıkları içeren A vitamini metabolitleri ve retinol ile karakteristiktir. Karl Wilhelm von Kupffer'in altın klorür boyaması bu hücreler için ayırıcı metottur (Ezhilarasan, 2022; Kamm ve McCommis, 2022). Stellat hücrelerinin sitoplazmik uzantıları üç hücre yüzeyine ayrılır; iç, dış ve yan yüzey. İç yüzey pürüzsüz ve endotel hücrelerin bazal yüzeyine yapışıktır. Dış yüzey ise disse boşluğuna bakan kısımda, hepatositlerle temas halindedir (Puche ve ark., 2013). Stellat hücrelerinin ince yapısına bakıldığında orta derecede gelişmiş Granüllü Endoplazmik Retikulumu, iyi gelişmiş jukstanükleer küçük Golgi kompleksine ve belirgin dendritik sitoplazmik çıkıntılara sahiptirler. Çok sayıda dikenli mikroprojeksiyon bulunduran subendotelial çıkıntılar, endotel hücreleri ve hepatositler arasındaki sinüzoidleri girer (Friedman, 2008; Puche ve ark., 2013).

2.2.1.5. Natural killer (NK, Pit hücreleri)

Natural killer hücreleri ilk olarak 1970'lerde önceden uyarılma olmadan tümör hücrelerini öldürme özelliğine ve belirgin sitoplazmik granüllerin varlığına dayanarak tanımlanmıştır (Tian ve ark., 2013; Peng ve ark., 2016). İlk olarak 1976 yılında Wisse ve arkadaşları tarafından sitoplazmasındaki küresel yoğun granüllerin karakteristik şeklinden dolayı "pit hücreleri" olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Kaneda ve arkadaşları tarafından natural killer olarak ifade edildi. Bouwens ve arkadaşları tarafından tümör hücrelerine karşı sitotoksositeye sahip oldukları gösterilmiştir (Luo ve ark., 2000; Nakatani ve ark. 2004) NK hücreleri sitolitik efektör lenfositler olmalarının dışında ayrıca, IFN- γ gibi belirli sitokinlerin başta gelen üreticileri olduğu bilinmektedir. Adaptif bağışıklık cevaplarını şekillendirilmesinde de karşımıza çıkmaktadır. NK hücrelerinde antijen-spesifik reseptörlerin bulunmamasından ötürü doğuştan gelen bağışıklık hücreleri olarak anılsa da çeşitli çalışmalar NK hücrelerinin antijen-spesifik immünolojik hafızayla ilişkisini ortaya çıkardı (Peng ve ark., 2016).

Karaciğerde sinüzoidlerinde bulunan NK hücreleri diğer dokularda bulunan NK hücrelerinden immünofenotipik, morfolojik ve işlevsel özellikleri açısından farklılıklar gösterebilmektedir. Karaciğerde bulunan NK hücreleri, periferik NK hücrelerine göre daha yüksek bir öldürme yeteneğine sahiptir. NK hücreleri karaciğerde bulunan toplam lenfositlerin insanda yaklaşık olarak %25-40 (farede %10-20) oluşturuyorken, bu oran periferik kanda %10-15'tir. Karaciğerde bu oranın fazla olmasının sebebi net olarak bilinmemektedir (Tian ve ark., 2013; Fasbender, ve ark., 2016).

Karaciğerde bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan NK hücreleri patojenlere ve tümörlere karşı konuk savunmasında kritik rol üstlenir. Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand bağımlı sitotoksikite ve belirli sitokin profilleri gibi benzersiz fenotipik özelliklere sahiptir. NK hücreleri viral hepatit, karaciğer fibrozisi ve karaciğer tümörleşmesinin kontrolünde dışında karaciğer hasarı ve iltihabının patogenezinde katkıda bulunmaktadır (Tian ve ark., 2013). NK hücreleri, karaciğerde genellikle sinüzoidlerde endotel hücreleriyle temas halindedirler, bazen Kupffer hücreleriyle de temas edebilirler. NK hücrelerinin psödopodları, fenestraları aşarak hepatositlerin mikrovilluslarıyla temas sağlayabilir. Doğrudan kan ile teması olan NK hücreleri nadiren disse aralığında görülebilmektedir. NK hücreleri elektronca yoğun azurofilik granülleri Giemsa boyaması ile ışık mikroskopunda gözlemlenir. Bu granüller zar ile çevrilidir. Perforin ve granzim içeren granüllerin ekzositozu ile hedef hücrelerde reseptörleri aracılığıyla apoptozu başlatır ve diğer bağışıklık hücrelerinin aktivitelerini artıran çeşitli sitokinlerin üretimini tetikler. Perforin ve granzim yanı sıra ayrıca lizozomal enzim olarak asit fosfataz bulunur. Golgide oluşan bu veziküller multiveziküler cisimcikte yoğun matriksin birikmesiyle oluşmaktadır (Luo ve ark., 2000; Nakatani ve ark., 2004). NK hücreleri hem insan hem de fare karaciğerinde tipik yoğun granüllerin sayısının daha az ve boyutlarının daha küçük olmasının yanı sıra, çubuk çekirdekli veziküllerin de çok az bulunması nedeniyle sıçanlara göre daha zor tanımlanmaktadır (Luo ve ark., 2000).

3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bisfenol M

Bisfenol M [4-[2-[3-[2-(4-hidroksifenil)propan-2-il]fenil]propan-2-il]fenol; $C_{16}H_{16}O_2$; CAS No: 13595-25-0; BPM], Sigma-Aldrich firmasından temin edilerek, deneysel uygulamalarda farelere verilmek üzere kullanılmıştır. Moleküler ağırlığı 346,46 g/mol olan BPM (Tardif vd., 2023), potansiyel bir endokrin bozucu kimyasal olarak sınıflandırılmakta olup, toz veya kristal formda, beyaz renkte bir maddedir. Fiziksel özellikleri arasında 135–139 °C aralığında bir erime noktası dikkat çekmektedir (Sigma, 2025).

3.1.2. BALB/C Mus Musculus

Laboratuvar faresi (*Mus musculus*), küçük boyutu, hızlı üreme döngüsü, düşük bakım maliyeti ve insan ile yüksek genetik benzerliği nedeniyle biyolojik araştırmalarda en yaygın kullanılan model organizmalardan biridir (Standley ve ark., 2024). Bu tür, yaklaşık 2–3 yıl yaşam süresine sahip olup, 6–8 haftalık yaşta cinsel olgunluğa ulaşır (Latham ve Mason, 2004; Phifer-Rixey ve Nachman, 2015). Dişiler genellikle erkeklerden daha erken olgunlaşmaktadır (Latham ve Mason, 2004). Gebelik süresi ortalama 19–21 gün olup, her doğumda ortalama 6–12 yavru dünyaya getirirler. Diploid kromozom sayısı 40 olan *Mus musculus*, genomu tam olarak dizilenmiş ilk memelilerden biri olup, genetik, fizyolojik ve gelişimsel süreçlerin moleküler temellerinin araştırılmasında kritik rol oynamaktadır (Phifer-Rixey ve Nachman, 2015; Suckow ve ark., 2023).

Fizyolojik açıdan erişkin bir farenin vücut ağırlığı 20–40 gram arasında değişmekte olup, vücut sıcaklığı 36.5–38.0 °C'dir. Günlük yem tüketimi genellikle 12–18 g/100 g vücut ağırlığı, su tüketimi ise yaklaşık 15 ml/100 g vücut ağırlığıdır. Solunum hızı 80–230 soluk/dakika, kalp atım hızı ise 500–600 atım/dakika arasındadır. Karaciğeri sol lateral, median, sağ lateral ve kaudal lob olmak üzere dört ana lobdan oluşur; hepatik lobüller ise periferde portal triadlar ve ortada santral venin yer aldığı klasik memeli organizasyonunu yansıtır. Hepatositler santral venden çevreye doğru ışınal plakalar

hâlinde dizilmiş olup, Disse aralığı aracılığıyla sinüzoidlerle temas hâlinindedir. Karaciğer yapısında Kupffer hücreleri, Ito hücreleri ve pit hücreleri gibi özelleşmiş hücreler yer almakta ve bu yapı sayesinde immun yanıt, metabolizma ve toksik yanıtlar gibi çok sayıda fizyolojik süreç düzenlenmektedir. Tüm bu özellikleri sayesinde Mus musculus, endokrin bozucu kimyasallar (EDC'ler) gibi çevresel toksinlerin karaciğer üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak tercih edilen memeli modelidir (Krinke ve Weber, 2012; Suckow ve ark., 2023).

3.1.3. Bakım ve beslenmesi

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Uygulamaları ve Araştırmaları Merkezi (SÜDETAM)'dan temin edilen fareler %40-60 nem oranına sahip 21 ± 2 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda tutuldu. Ad libitum olarak palet yemlerle birlikte cam biberonlarda bulunan su (çeşme suyu) ile beslendi. Çalışmamızda 6 hafta boyunca yetiştirilen 17,5-26 gram ağırlığındaki dişi fareler kullanıldı. Rastgele seçilen 7'şer hayvandan oluşan 4 grup oluşturuldu. Çalışmada kullanılan deney hayvanları için Sakarya Üniversitesi Yerel Hayvan Etik Kurulundan gereken izinler alındı (karar no:08 ve 19/02/2024 tarihli). Deneyler başlamadan önce tüm fareler tartıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Deneysel toksikasyonun oluşturulması

Çalışmanın başlangıcında, 7. ve 14. günlerinde farelerin ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Her gruptaki sıçanların ortalama canlı ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde gruplar oluşturuldu. Kontrol grubuna serum fizyolojik ve çözücü madde DMSO (Dimetilsülfoksit) intraperitoneal olarak uygulanırken diğer gruplara %1 DMSO ile serum fizyolojik içerisinde Bisfenol M günlük olarak 2,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarında intraperitoneal olarak uygulandı. 14. günün sonunda intraperitoneal yöntemle farelere 100 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin anestezisi uygulanarak dekapite edildi. Karaciğer çıkarıldıktan sonra serum fizyolojik ile kan dokulardan uzaklaştırıldı. Ardından doku örnekleri tespit solüsyonlarına ve eppendorf tüplere alındı.

Kontrol Grubu (Grup 1): Bu grupta bulunan 7 fareye 14 gün boyunca intraperitoneal olarak 0,2 ml serum fizyolojik içerisinde %1'lik DMSO (2 µl/gün) uygulandı. DMSO

miktarı deney gruplarında ilaçları dilüe etmek için kullanılan miktar dikkate alınarak hesaplandı.

Düşük Doz Deney Grubu (Grup 2): Bu grupta bulunan 7 farenin vücut ağırlıklarının tartımları gerçekleştirildikten sonra grubun ortalama vücut ağırlığına göre, günlük olarak 2,5 mg/kg dozunda BPM, %1'lik DMSO (2 µl/gün) içinde çözündürülerek 0,2 ml serum fizyolojik içerisinde 14 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulandı.

Orta Doz Deney Grubu (Grup 3): Bu grupta bulunan 7 farenin vücut ağırlıklarının tartımları gerçekleştirildikten sonra grubun ortalama vücut ağırlığına göre, günlük olarak 5 mg/kg dozunda BPM, %1'lik DMSO (2 µl/gün) içinde çözündürülerek 0,2 ml serum fizyolojik içerisinde 14 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulandı.

Yüksek Doz Deney Grubu (Grup 4): Bu grupta bulunan 7 farenin vücut ağırlıklarının tartımları gerçekleştirildikten sonra grubun ortalama vücut ağırlığına göre, günlük olarak 10 mg/kg dozunda BPM, %1'lik DMSO (2 µl/gün) içinde çözündürülerek 0,2 ml serum fizyolojik içerisinde 14 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulandı.

3.2.2. Karaciğer dokusunun ışık mikroskopi histolojisi

3.2.2.1. Fiksasyon

Işık mikroskobu değerlendirmesi için farelerden alınan karaciğer dokuları canlılığın sona erdiği andaki yapısal özelliklerini korumak ve otolizi önlemek amacıyla nötral formaldehit fiksatifinde tespit edildi (Tablo 3.1.). Dokular 24 saat %10'luk nötral formaldehit fiksatifinde bekletildikten sonra dehidrasyon işlemine tabi tutuldu.

3.2.2.2. Dehidrasyon

Nötral formaldehit fiksatifinden alınan dokular içerdikleri suyun uzaklaştırılması amacıyla yükselen konsantrasyonlardaki alkol (etanol) serilerinden geçirildi (Tablo 3.2.).

3.2.2.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme

Dokulardaki su yükselen alkol serileriyle uzaklaştırıldıktan sonra, karaciğer dokusundaki alkol yerine ksilolün geçişi sağlandı. Parafin çözücü bir madde olan ksilol ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ksilol uygulanması sonucunda dokulardaki alkol ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra bu dokulardaki ksilol ile sıvı parafin yer değiştirilerek kesit alma düzlemine uygun şekilde gömüldü (Tablo 3.3.).

Tablo 3.1. %10'luk Nötral formaldehit fiksatifinin hazırlanışı

Solüsyonun İçerdiği Maddeler	Madde Miktarı
%40 Formaldehit	100 ml
Distile su	900 ml
NaH ₂ PO ₄	4 g
NaHPO ₄	6,5 g

Tablo 3.2. Dehidratasyon işlemi aşamaları

Solüsyon Adı	Solüsyonun İçerdiği Maddeler	Madde Miktarı	Uygulama Süresi
%70 Alkol	Etil Alkol	70 ml	24 saat
	Distile Su	30 ml	
%90 Alkol	Etil Alkol	90 ml	24 saat
	Distile Su	10 ml	
%95 Alkol	Etil Alkol	95 ml	24 saat
	Distile Su	5 ml	
%100 Alkol	Etil Alkol	100 ml	24 saat

3.2.2.4. Kesit alınması

Parafin bloklar içerisine gömülü karaciğer doku örneklerinden Leica marka döner mikrotom (Leica RM2255) kullanılarak 3 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler su banyosuna yerleştirildikten sonra lamaların üzerine aktarıldı.

3.2.2.5. Boyama ve inceleme

Lamlara alınan kesitler boyama işleminden önce 60,2°C 'de etüvde 45 dakikabekletildi. Daha sonra kesitler Hematoksilen & Eosin (H&E) (Tablo 3.4.) ve Masson Trikrom (Tablo 3.5) boyama yöntemleri ile boyandı. Boyama sonrası preparatlar, entellan ile kapatılarak kurumaya bırakıldı. Preparatlar, BAB-TAM-D

model ışık mikroskobu altında, BAB-TCA-6 mikroskop kamerası ve Bs2000Pro yazılımı kullanılarak görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

Tablo 3.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme aşamaları

Solüsyon Adı	Uygulama Süresi
Ksilol	1 saat
Ksilol	1 saat
%50 Ksilol	1 saat (Etüvde 60,2°C)
%50 Parafin	24 saat (Oda sıcaklığında)
Parafin	1 saat (Etüvde 60,2°C)
Parafin	1 saat (Etüvde 60,2°C)
Dokuların Parafin ile kasetlere gömülmesi	

Tablo 3.4. Hematoksilen & Eosin (H&E) boyama yöntemi

Kullanılan maddeler	Süresi
Ksilol	15 dakika
Ksilol	15 dakika
%100 Etanol	5 dakika
%96 Etanol	5 dakika
%90 Etanol	5 dakika
%70 Etanol	5 dakika
Distile su	5 saniye
Hematoksilen	10 dakika
Akar musluk suyu	5 dakika
Eozin	4 dakika
%70 Etanol	5 saniye
%90 Etanol	5 saniye
%100 Etanol	5 saniye
Ksilol	12 saat

Tablo 3.5. Masson Trikrom boyama yöntemi

Kullanılan maddeler	Süresi
Ksilol	10 dakika

Tablo 3.5. (Devamı) Masson Trikrom boyama yöntemi

Kullanılan maddeler	Süresi
Distile su	30 saniye
Bouin solüsyonu	56°C etüvde 15 dakika
Akar musluk suyu	30 saniye
Akar musluk suyu	30 saniye
Weigert demir hematoksilen solüsyonu	5 dakika
Akar musluk suyu	5 dakika
Distile su	5 saniye
Biebrich kırmızı asit fuksin	5 dakika
Distile su	10 saniye
Fosfotungstik / fosfomolibdik asit	5 dakika
Anilin mavisi	6 dakika
% 1 Asetik asit	2 dakika
%70 Etanol	5 saniye
%90 Etanol	5 saniye
%100 Etanol	5 saniye
Ksilol	3 dakika

3.2.3. Karaciğer dokusunun elektron mikroskopi histolojisi

3.2.3.1. Fiksasyon

Elektron mikroskobu incelemeleri için alınan 1 mm³'ten küçük dokular hazırlanan %2,5'lik fosfat tamponlu glutaraldehit (Tablo 3.6) ile 24 saat tespit edildi.

3.2.3.2. Dehidratasyon ve gömme

Fiksatiften arındırmak amacıyla, tespit edilen dokular fosfat tamponlu salin (PBS) tampon çözeltisi ile yıkandı ve daha sonra dokular sekonder fiksatif olan %1'lik OsO₄ (Osmiyum Tetraoksit) (Tablo 3.7.) ile ikinci kez tespit edildi. Dokulardaki suyun

uzaklaştırılması için artan alkol serilerinden geçirildi ve sonrasında propilen oksit kullanılarak epona indirildi (Tablo 3.8.).

Saf epon aşamasının ardından dokular kapsüllere gömüldü. 60°C’de 18-24 saat boyunca etüvde bekletildi. Daha sonra bloklardan 1µm’lik yarı ince kesitler alındı.

Tablo 3.6. %2,5’luk glutaraldehitin hazırlanması

Fiksatif	Miktarı	Madde Adı
%2,5’luk Gluteraldehit	2,5 ml	Gluteraldehit
	97,5 ml	PBS

Tablo 3.7. OsO₄ hazırlanması

Solüsyon Adı	Madde Adı	Miktarı
%1’lik OsO ₄	OsO ₄	100 mg
	PBS	100 ml

Tablo 3.8. Dehidratasyon ve gömme aşamaları

Kullanılan maddeler	Süresi	Ortamı
PBS	10 dakika(2 kez)	Buzdolabı
Osmiyum tetraoksit (OsO ₄)	1 saat	Buzdolabı
PBS	10 dakika	Buzdolabı
Uranyl asetat (%1)	60 dakika	Buzdolabı
PBS	10 dakika	Buzdolabı
%30 Alkol	10 dakika	Buzdolabı
%50 Alkol	10 dakika	Buzdolabı
%70 Alkol	10 dakika	Oda sıcaklığı
%90 Alkol	10 dakika	Oda sıcaklığı
%100 Alkol	10 dakika	Oda sıcaklığı
%100 Alkol	10 dakika	Oda sıcaklığı
Propilen oksit	10 dakika(2 kez)	Oda sıcaklığı
Propilen oksit:Epon(1:1)	60 dakika	Oda sıcaklığı

Tablo 3.8. (Devamı) Dehidratasyon ve gömme aşamaları

Kullanılan maddeler	Süresi	Ortamı
Propilen oksit:Epon(1:3)	60 dakika	Oda sıcaklığı
Saf epon	60 dakika	Oda sıcaklığı

3.2.3.3. Boyama ve inceleme

Alınan 1µm'lik yarı ince kesitler Metilen mavisi ile boyandı ve lam üzerinde çalışılacak alan işaretlendi. Ardından bu işaretli alanlardan 60-70 nm aralığında ince kesitler alındı ve Uranil asetat ve Reynolds çözeltisi (Kurşun sitrat) (Tablo 3.9.) ile boyandı.

Tablo 3.9. Uranil Asetat ve Kurşun Sitrat hazırlanması

Solüsyon Adı	Madde Adı	Miktarı
%5'lik Uranil Asetat	Uranil Asetat	5 g
	Saf su	100 ml
	Saf su	30 ml+12 ml
Kurşun Sitrat	Sodyum Sitrat	1,76 gr
	Kurşun Sitrat	1,33 gr
	NaOH	8 ml

3.2.4. Biyokimyasal ve moleküler analizler**3.2.4.1. Protein izolasyonu ve enzim bağlı immunosorbent analizi (ELISA)**

BPM'nin karaciğer hasarı üzerindeki etkisini anlamak amacıyla karaciğer hasar belirteçleri olan AST ve ALT, ayrıca BPM'nin inflamatuvar yanıt üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla IL-6, TNF- α ve sitokrom c protein miktarı analizi ELISA kitleri kullanılarak gerçekleştirildi. Deney sonunda elde edilen karaciğer doku örnekleri -80°C'den çıkarılıp her gruptan 3 doku örneği (n=3) 100mg tartıldıktan sonra ayrı ayrı havanlarda sıvı azot yardımı ile toz haline getirildi. Toz haldeki doku örnekleri eppendorflara alınarak üzerine 1ml soğuk RIPA tamponu ekledikten sonra vorteksle karıştırıldı. Ardından -20°C'de dondurulup oda sıcaklığında çözündürüldü (bu işlem 2 kez tekrarlandı). 15 dakikabuzda bekletildikten sonra 4°C'de 13.000 rpm 10

dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant başka bir eppendorf tüplerine alınarak protein ölçümü gerçekleştirildikten sonra ELISA analizi yapılınca kadar -20°C’de muhafaza edildi.

ELISA analizi için üretici firmanın (Elkbiotechnology/ABD) önerdiği protokol uygulandı. ELISA analiz prosedürü kapsamında, her bir deney için Standard, Blank ve Örnek kuyucukları belirlendi. Standart eğri için 7 kuyucuğa 100 µL Standart Çalışma Çözeltisi, Blank için de 1 kuyucuk boş bırakıldı. Her bir kuyucuğa 100 µL örnek eklendi. Mikro ELISA plakasının alt kısmına dikkatlice çözelti eklenerek köpük oluşumu engellendi. Plaka kapağı kapatılarak 37°C’de 80 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda her bir kuyucuktaki sıvı boşaltıldı ve 200 µL %1’lik Yıkama Tamponu eklenerek 1-2 dakika bekletildi. Yıkama işlemi toplamda 3 kez tekrarlandı. Son yıkamadan sonra kuyucuklarda kalan tampon tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama işleminin ardından, her bir kuyucuğa 100 µL Biotinile Antikor Çalışma Çözeltisi eklendi ve plaka kapağı kapatılarak 37°C’de 50 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından yıkama işlemi tekrar edilerek toplamda 3 kez gerçekleştirildi. Daha sonra, her bir kuyucuğa 100 µL Streptavidin-HRP Çalışma Çözeltisi eklendi, plaka kapağı kapatılarak 37°C’de 50 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra yıkama işlemi bu kez 5 kez tekrarlandı. Sonrasında her kuyucuğa 90 µL TMB Substrat Çözeltisi eklendi ve plaka kapağı kapatılarak karanlık ortamda 37°C’de 20 dakika inkübe edildi. Bu süre zarfında çözelti mavi renge döndü. İnkübasyon süresi 30 dakikayı aşmayacak şekilde dikkatle takip edildi. Ardından her kuyucuğa 50 µL Durdurucu Reaktif eklendi ve solüsyonun sarı renge dönüşmesi sağlandı. Renk değişiminin homojen olması için plaka hafifçe çalkalandı. Son olarak, plakadaki su damlacıkları veya parmak izleri temizlendi, sıvı yüzeyinde hava kabarcığı bulunmadığı kontrol edildi. Mikrolaka okuyucu (BioTek Epoch /ABD) 450 nm dalga boyunda çalıştırılarak absorbans değerleri ölçüldü.

3.2.4.2. RNA izolasyon ve cDNA sentezi

RNA izolasyonu

BPM’nin karaciğer hasarı üzerine olan etkisinin gen ifade düzeyi üzerine olan etkisini değerlendirmek amacıyla farelerden elde edilen karaciğer doku örnekleri -80°C’de eppendorf tüpler içerisinde muhafaza edildi. Daha sonra Xtrazol Reagent (Biofroxx / Almanya) kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA

düzeyleri spektrofotometrede 260 nm’de ölçülerek kalitesi ve konsantrasyonu kontrol edildi.

RNA izolasyonu sırasında üretici firmanın önerdiği protokole uyuldu. Her gruptan 100 mg doku tartılarak ayrı ayrı soğuk havan içerisine alındı ve sıvı azot yardımıyla toz haline getirildi. Toz haldeki doku örnekleri eppendorf tüplerine alınarak üzerine 1 mL Xtrazol Reagent eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından, üzerine 200 µL kloroform eklendi ve 15 saniye boyunca çalkalandı. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından 4°C’de, 12.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve oluşan üst faz dikkatlice başka bir eppendorf tüpüne alındı. Santrifüj sonrası elde edilen üst faza 500 µL 2- propanol eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından, 4°C’de 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletin yıkanması için 1 mL %75 etanol eklendi, vortekslendikten sonra 4°C’de 7.500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, pellete zarar vermeden süpernatant uzaklaştırıldı ve Eppendorf tüpleri ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde pelletin kuruması sağlandı. Kurumuş olan pelletin üzerine 100 µL RNase free su eklenerek 37°C’de 10 dakika inkübe edildi. Elde edilen RNA’ların miktar tayini Qubit 3 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific/ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA sentezi öncesinde RNA örnekleri -20°C’de muhafaza edildi.

cDNA sentezi

Elde edilen total RNA’nın cDNA’ya sentezinde Enhanced Avian RT First Strand Synthesis cDNA sentez kiti (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Üretici firmanın önerdiği protokole uyulmuştur. PCR tüplerine; kontrol grubu için 1,4 µL, 2,5 mg/kg grubu için 1,4 µL, 5 mg/kg grubu için 1,2 µL ve 10 mg/kg grubu için 1,3 µL total RNA eklenmiştir. Üzerine 2,5 µL dNTP, 5 µL Random nonomers eklenmiş ve en son PCR suyu ilave edilerek toplam hacim 10 µL’ye tamamlanmıştır. Hafifçe alt üst yapıldıktan sonra, tüpler 70°C’de 10 dakika inkübe edilmiş ve ardından buz üzerine alınmıştır. Daha sonra her tüpe 2 µL 10X buffer, 1 µL Enhanced Avian RT, 1 µL RNase inhibitörü ve 6 µL PCR suyu eklenmiştir. Hafifçe alt üst yapıldıktan sonra, tüpler Bio-Rad T100 Thermal Cycler (ABD) cihazında 25°C’de 10 dakika, 50°C’de 10 dakika, 60°C’de 10 dakika ve 65°C’de 30 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra -20°C’de muhafaza edildi.

3.2.4.3. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) analizi

Deney sonunda karaciğer dokularından elde edilen cDNA'lar kullanılarak Bax, Bcl-2, kaspaz-3, ve p53 genlerinin mRNA ifade düzeyleri RT-PCR ile gösterildi. Kontrol geni olarak GAPDH (β -gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz) geni kullanıldı. Primerlerin gen dizilimi tablo 3.10. verildi.

Tablo 3.10. RT-PCR analizinde kullanılacak primerlerin gen dizileri

Gen adı	Dizisi	Uzunluk (bç)	Kaynak
<i>Bax</i>	F: 5'- CTACAGGGTTTCATCCAG -3' R: 5'- CCAGTTCATCTCCAATTCG -3'	133	Ghatei vd., 2017
<i>Bcl-2</i>	F: 5'- GTGGATGACTGAGTACCT -3' R: 5'- CCAGGAGAAATCAAACAGAG -3'	118	Ghatei vd., 2017
<i>Kaspaz-3</i>	F: 5'-AAGATACC GGTGGAGGCTGA-3' R: 5'- AAGGGACTGGATGAACCACG3'	120	Changizi vd., 2020
<i>p53</i>	F: 5'- GTATTTCACCCTCAAGATCC- 3' R: 5'- TGGGCATCCTTTAACTCTA -3'	84	Ghatei vd., 2017
<i>GAPDH</i>	F: 5'- GAGAAACCTGCCAAGTATG -3' R: 5'- GGAGTTGCTGTTGAAGTC -3'	123	Ghatei vd., 2017

*F: ileri primer, R: geri primer, bç: baz çifti

Belirlenen genlerin mRNA ifade düzeylerini analiz etmek amacıyla, qRT-PCR SYBR-Green Master Mix (A.B.T. Laboratory Industry) kullanıldı. Reaksiyonlar, üretici firmanın önerdiği protokole uygun şekilde yürütülmüştür. Her bir strip tüp kuyusuna 2 μ L örnekler eklendi. Ardından her tüpe 1 μ L primer karışımı ve 10 μ L SYBR Green ilave edilmiş, RNase-free su ile toplam hacim 20 μ L'ye tamamlanarak pipetleme işlemi

gerçekleştirilmiştir. qPCR reaksiyonları, Tablo 3.11 'da belirtilen döngü protokolüne göre Bio-Rad marka gerçek zamanlı PCR cihazında yürütülmüştür.

Tablo 3.11. RT-PCR koşulları

PCR aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü sayısı
Polimeraz aktivasyonu ve DNA denatürasyonu	95	300	1
Denatürasyon	95	10	40
Bağlama/Uzama ve Plate Okuma	60	10	
Melting Curve	65	30	1

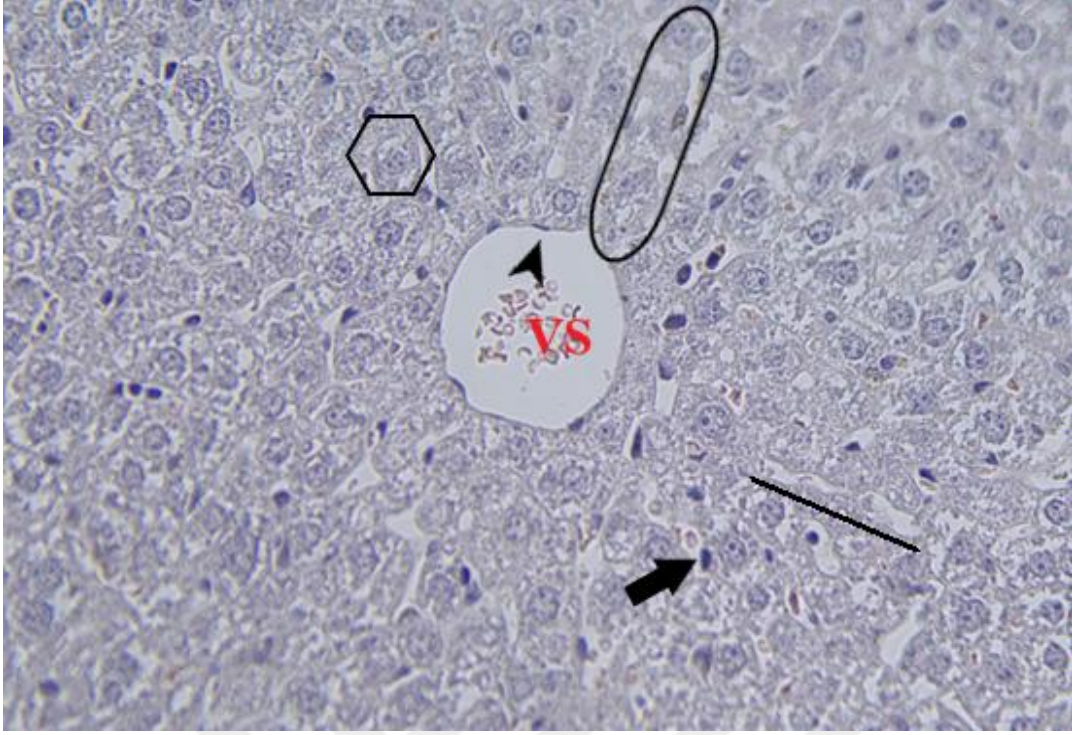
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Karaciğer Dokusunun Işık Mikroskopi Histolojisi Bulguları

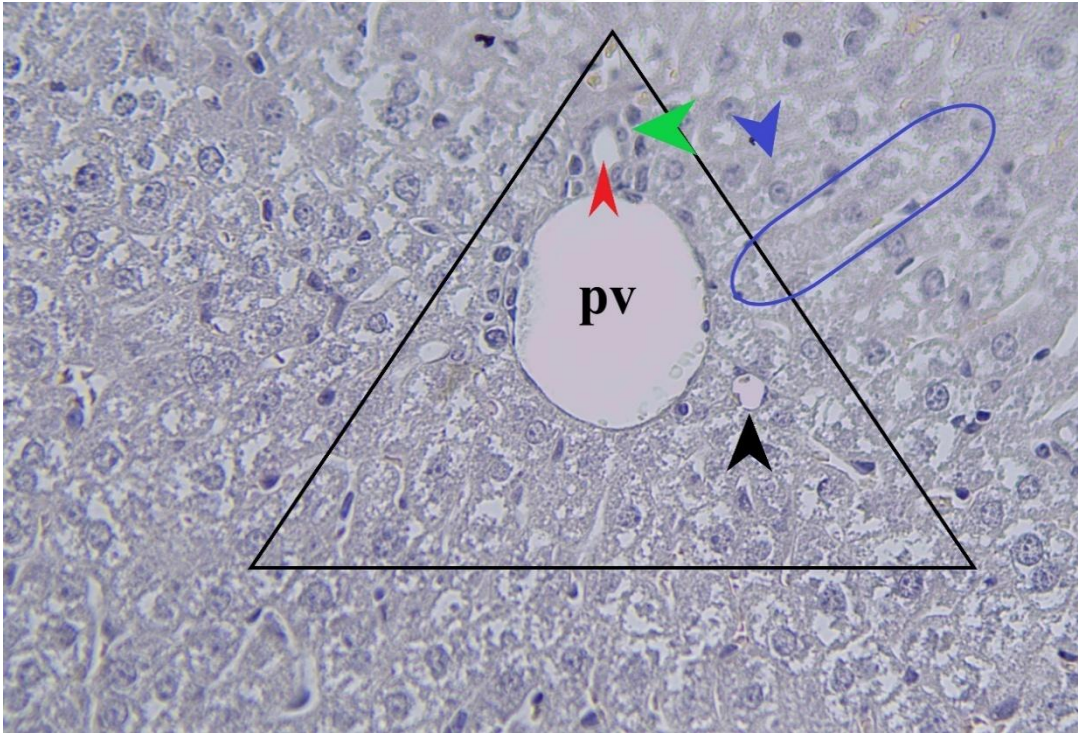
4.1.1. Kontrol grubu

Kontrol grubundaki farelerden elde edilen karaciğer dokusu kesitlerinin histopatolojik değerlendirmesi sonucunda, herhangi bir patolojik lezyona rastlanmamış, dokuların mikroskopik olarak normal histolojik yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hepatositler, belirgin ve düzgün hücre membranları ile çevrili olup, sitoplazmaları homojen bir dağılım göstermekte ve sitoplazmik içerikte herhangi bir düzensizlik ya da vakuolizasyon izlenmemektedir. Nükleer morfoloji açısından değerlendirildiğinde, hücre çekirdeklerinin yuvarlak konturlu, merkezi yerleşimli olduğu ve nükleolusların belirgin biçimde seçilebildiği kaydedilmiştir. Bu özellikler, hepatositlerin fizyolojik durumlarını koruduklarını ve herhangi bir yapısal stres ya da hasara maruz kalmadıklarını göstermektedir. Ayrıca, hepatositlerin organize şekilde oluşturduğu hücre plaklarının klasik radyal (ışınsal) dizilim sergilediği, bu düzenin karaciğerin lobüler mimarisiyle uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Sinüzoidal boşluklar, normal boyut ve yerleşimde olup, portal alan ile santral ven arasındaki mikroskopik yapısal bütünlük korunmuş; bu durum, dokuların kanlanma ve metabolik işlevleri açısından herhangi bir aksaklık yaşanmadığını desteklemektedir (Şekil 4.1., 4.2., 4.3. ve 4.4.).

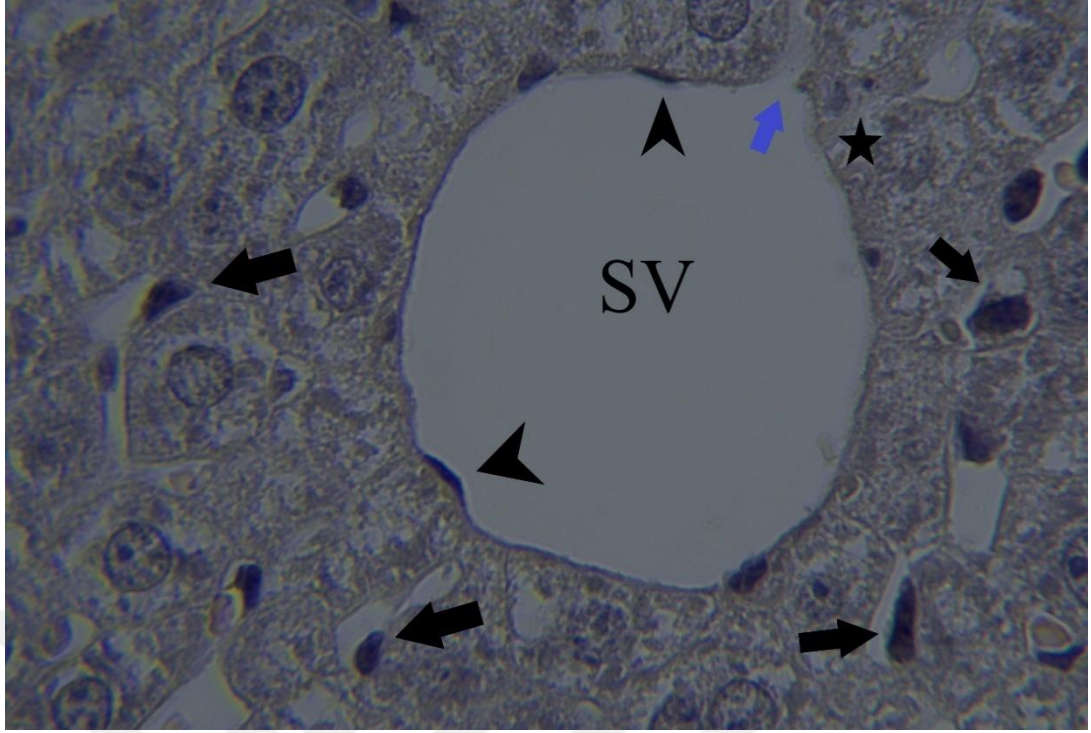
Masson Trikrom boyama yöntemiyle gerçekleştirilen histokimyasal analizlerde ise portal alanlarda fibrotik değişimi düşündürecek düzeyde anormal kollajen birikimine rastlanmamış, normal sınırlar içinde kabul edilen kollajen yoğunluğu gözlenmiştir. Bu bulgu, kontrol grubundaki karaciğer dokularında fibrozis gelişiminin söz konusu olmadığını açıkça ortaya koymaktadır (Şekil 4.5. ve 4.6.).



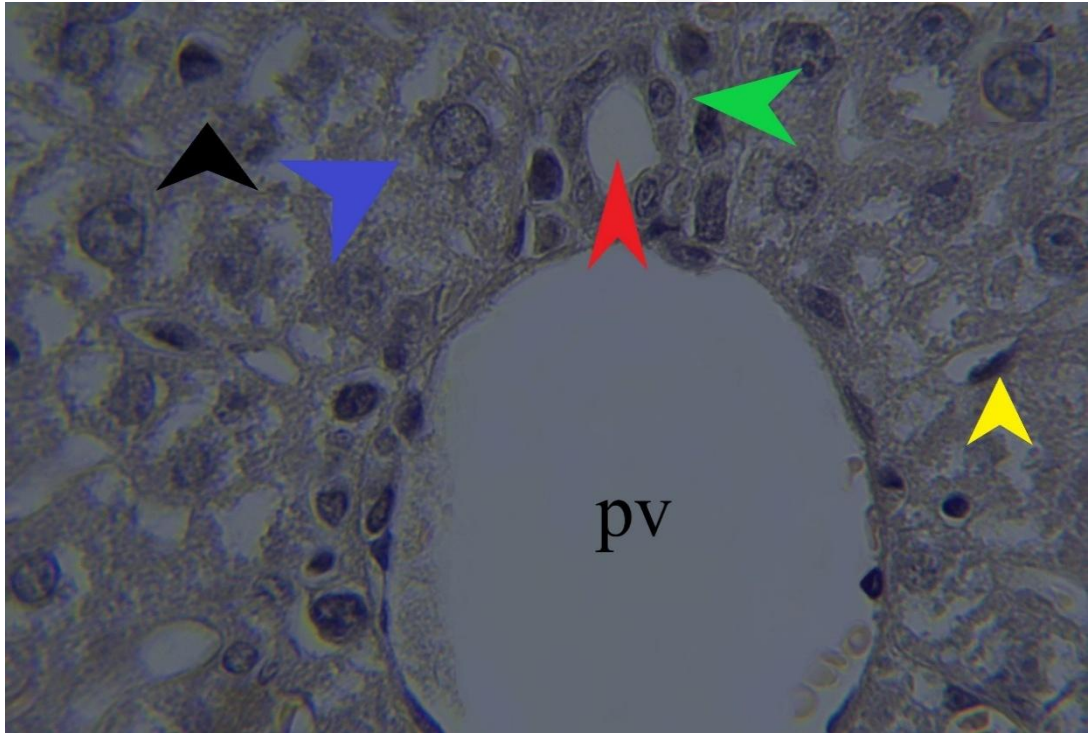
Şekil 4.1. Kontrol grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme). VS; vena santralis, siyah altıgen; hepatosit, siyah elip hepatosit plağı, siyah ok başı; endotel hücresi, siyah ok; kupffer hücresi, siyah çizgi; sinüzoid.



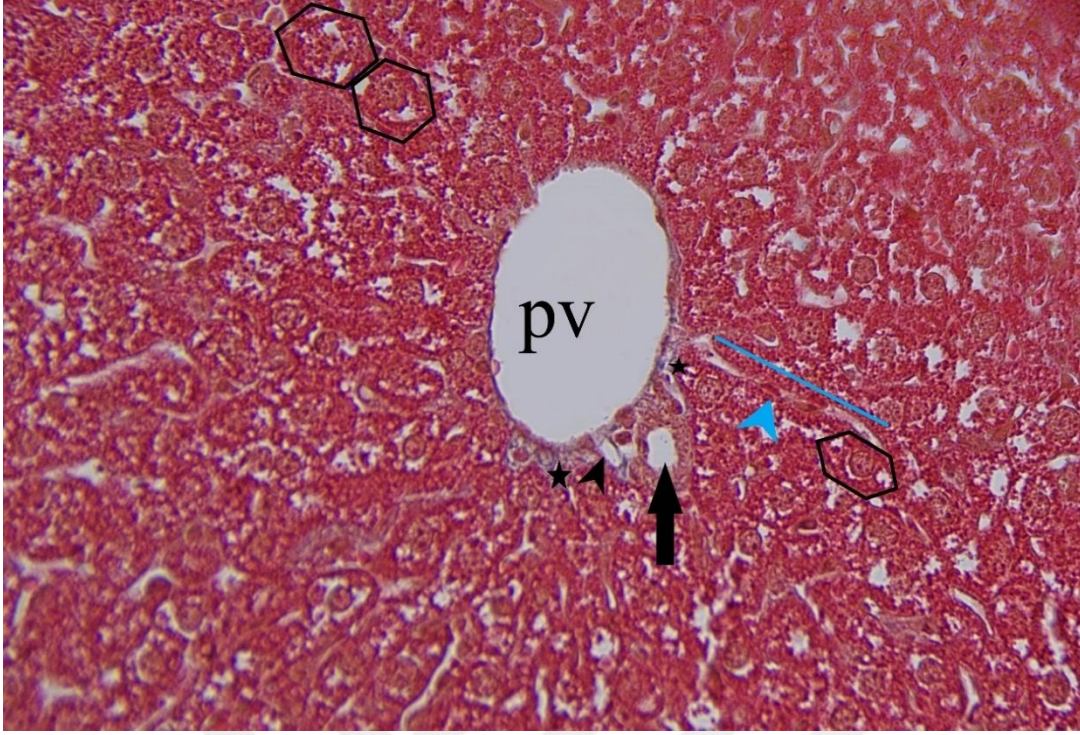
Şekil 4.2. Kontrol grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme). Siyah üçgen; portal triad, pv; portal ven, kırmızı ok başı; safra kanalı, siyah ok ucu; hepatik arter, yeşil ok ucu; kolanjiyosit, mavi ok ucu; hepatosit ve mavi elips; hepatosit plağı.



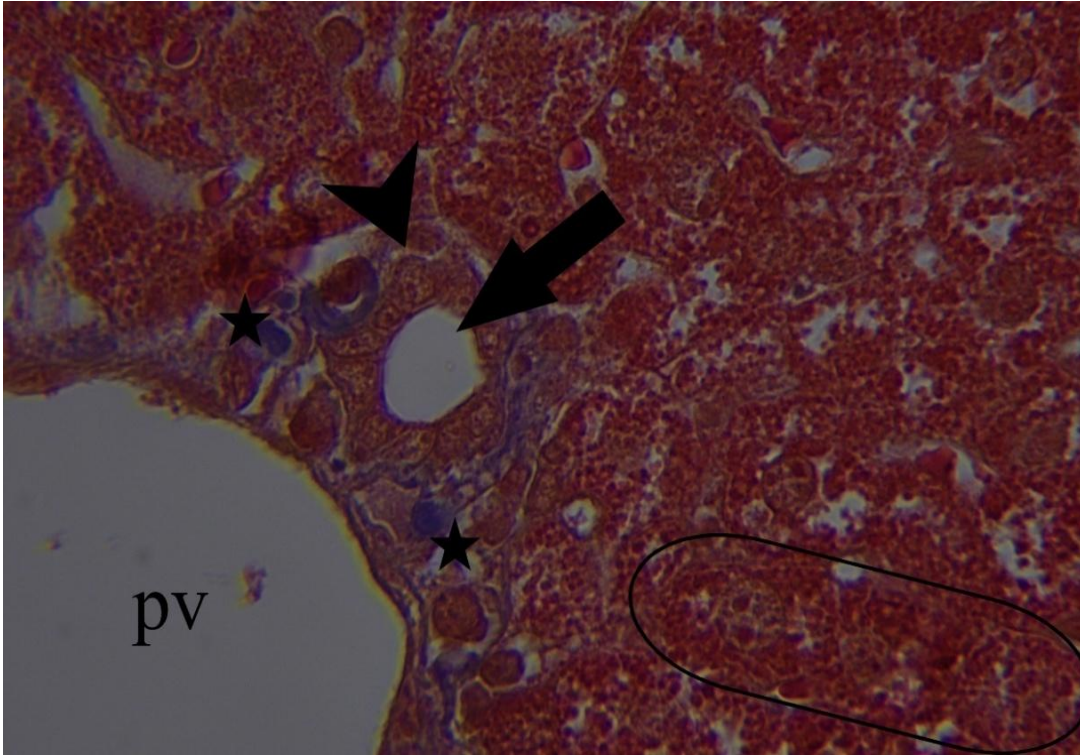
Şekil 4.3. Kontrol grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme). SV; santral ven, siyah ok ucu; endotel hücresi, siyah ok; kupffer hücresi, siyah yıldız bağ doku ve mavi ok; sinüzoidin santral vene açıldığı alan.



Şekil 4.4. Kontrol grubu ait genel karaciğer histolojisi, portal triad (H&E, 100x büyütme). Pv; portal ven, kırmızı ok ucu; safra kanalı, siyah ok ucu; kupffer hücresi, yeşil ok ucu; kolanjiyosit, mavi ok ucu; hepatosit.



Şekil 4.5. Kontrol grubu ait genel karaciğer histolojisi, portal triad (Masson trikrom, 40x büyütme). Pv; portal ven, mavi ok ucu; endotel, siyah ok ucu; hepatik arter, siyah ok; safra kanalı, siyah yıldız; bağ doku, siyah altıgen; hepatosit ve mavi çizgi; sinüzoid.



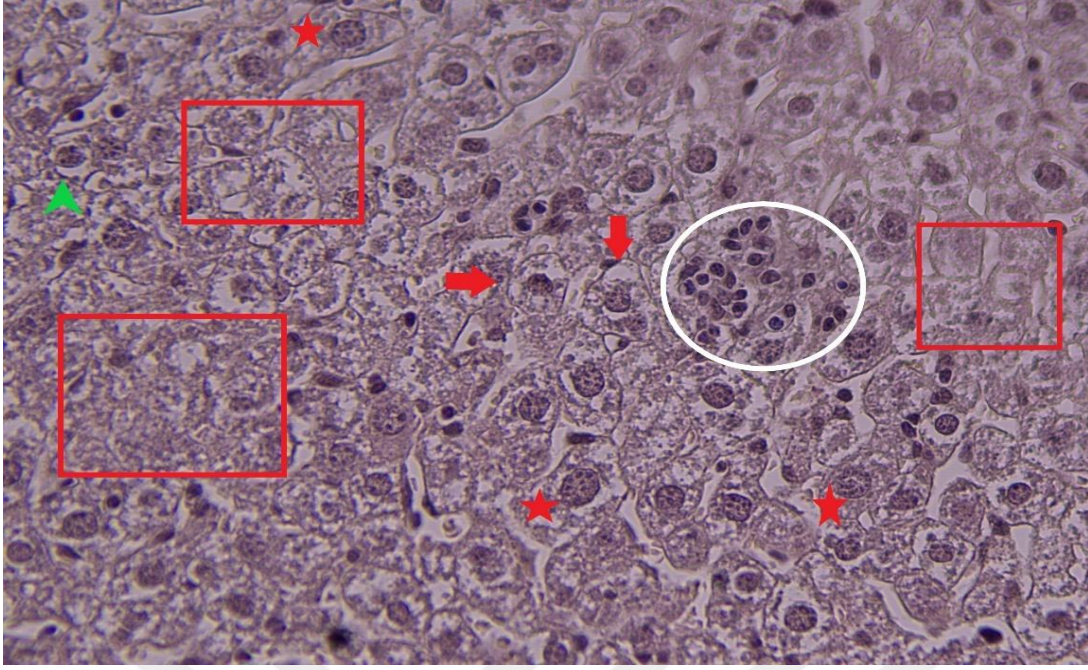
Şekil 4.6. Kontrol grubu ait genel karaciğer histolojisi, portal triad (Masson trikrom, 100x büyütme). Pv; portal ven, siyah ok ucu; kolanjiyosit, siyah ok; safra kanalı, siyah yıldız; bağ doku ve siyah elips hepatosit plağı.

4.1.2. 2,5 mg/kg grubu

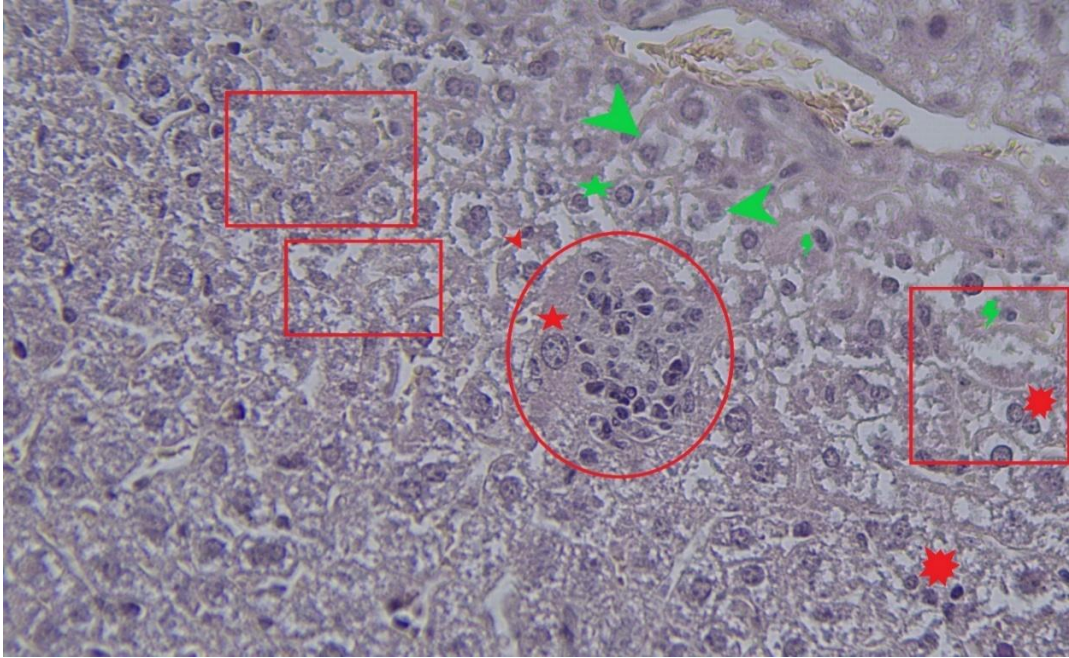
2,5 mg/kg dozunda BPM uygulanan deney grubuna ait karaciğer dokularında, H&E boyamasıyla yapılan incelemelerde yaygın nekrotik değişiklikler, belirgin karyomegali ve hücrelerde sitoplazmik düzeyde vakuolizasyon gözlenmiştir. Hepatositlerin sitoplazmasında yağ vezikülleri dikkat çekerken, özellikle periportal ve lobüler bölgelerde mononükleer hücre infiltrasyonu ile inflamatuvar yanıt izlenmiştir. Apoptotik morfoloji gösteren hücrelerde sitoplazma ve çekirdek büzülmesi, piknoz, çekirdek eksantrisitesi ve bazofilik çekirdek yoğunluğu dikkat çekmiş; bazı bölgelerde ise sitoplazmik fragmantasyon sonucu oluşan apoptotik cisimcikler (apoptotik body) tespit edilmiştir.

Hidropik dejenerasyon gösteren hepatositlerde BPM'nin hücrenin dengesini bozarak şişmeye neden olduğunu düşündürmektedir. Hücre plaklarının normal dizilimi bozulmuş, sinüzoidal yapılar deformasyona uğramış ve hafif düzeyde sinüzoidal dilatasyon gözlenmiştir. Nekrotik alanlarda çekirdeksiz, eozinofilik hücre kalıntıları ve yapısal bütünlüğü bozulmuş hepatositler belirlenirken; bu alanlara komşu hücrelerde dejeneratif değişiklikler, büzüşmüş çekirdekler ve azalmış sitoplazma hacmi saptanmıştır. Ayrıca, post-nekrotik fibrozis ile uyumlu bağ doku artışı ve kolligasyon nekrozu ile uyumlu soluk, periferik yerleşimli çekirdekler görülmüştür. Nükleer pleomorfizm ve bazı hepatositlerde belirgin çekirdek büyümesi (karyomegali), nükleer aktivitenin arttığı bölgeleri göstermekte olup, BPM'nin hücre proliferasyonu ve ölüm mekanizmaları üzerindeki etkisini yansıtmaktadır. Tüm bu bulgular, düşük doz BPM maruziyetinin dahi karaciğer dokusunda hem nekrotik hem de apoptotik süreçleri eşzamanlı olarak başlatabildiğini ve yapısal bozulmalara neden olabildiğini göstermektedir (Şekil 4.7., 4.8., 4.9. ve 4.10.)

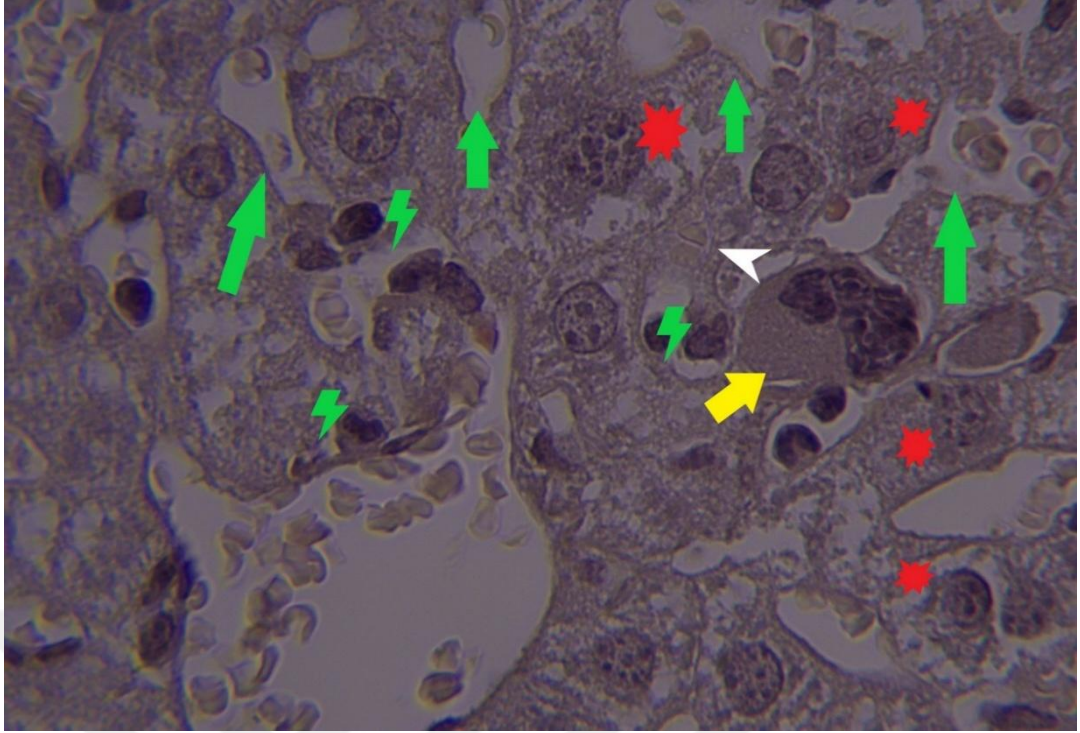
Masson Trikrom boyasıyla yapılan histolojik analizlerde de bu bulgular desteklenmiştir. Şekil 4.11'de 2,5 mg/kg BPM uygulanan grupta, hidropik dejenerasyon gösteren hepatositler, piknotik çekirdekler ve fibrozise doğru ilerleyen sürece işaret eden köprüleşen kolajen fibrillerin varlığı dikkat çekmektedir. Ayrıca, sinüzoidlerde belirgin genişleme ve ayrılma izlenmiştir. Daha yüksek büyütmede incelenen Şekil 4.12'de ise safra kanalı, kolanjiyositler ve portal ven gibi yapılar ayırt edilebilmiş; fibrozis varlığını düşündüren yaygın kolajen birikimi gözlemlenmiştir. Bu bulgular, düşük doz BPM maruziyetinin histolojik düzeyde karaciğerde fibrotik değişimlerle birlikte hücresel dejenerasyonu tetikleyebileceğini desteklemektedir.



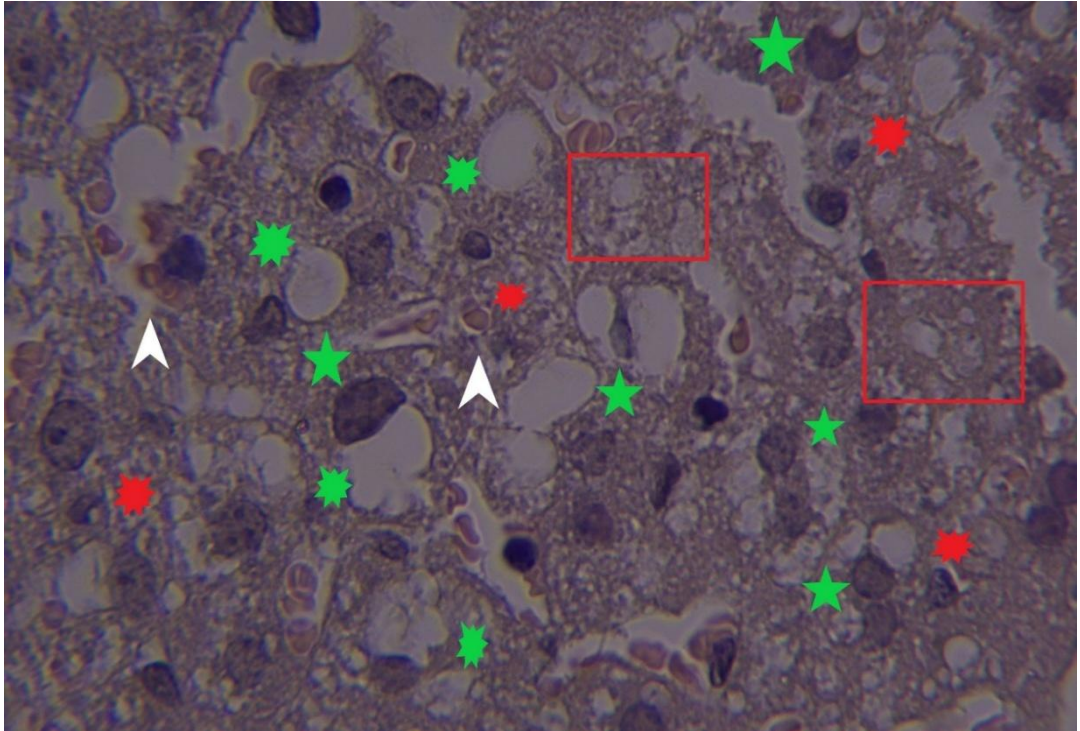
Şekil 4.7. 2,5 mg/kg grubu ait karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme). 2,5 mg/kg dozunda uygulama yapılan deney grubuna ait karaciğer dokusunda, belirgin nekrotik alanlar (kırmızı kare), karyomegali (kırmızı yıldız), vakuolizasyon (kırmızı ok) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (beyaz daire) gözlenmiştir. Ayrıca bazı hepatositlerde dejeneratif değişiklikler (yeşil ok ucu) izlenmektedir.



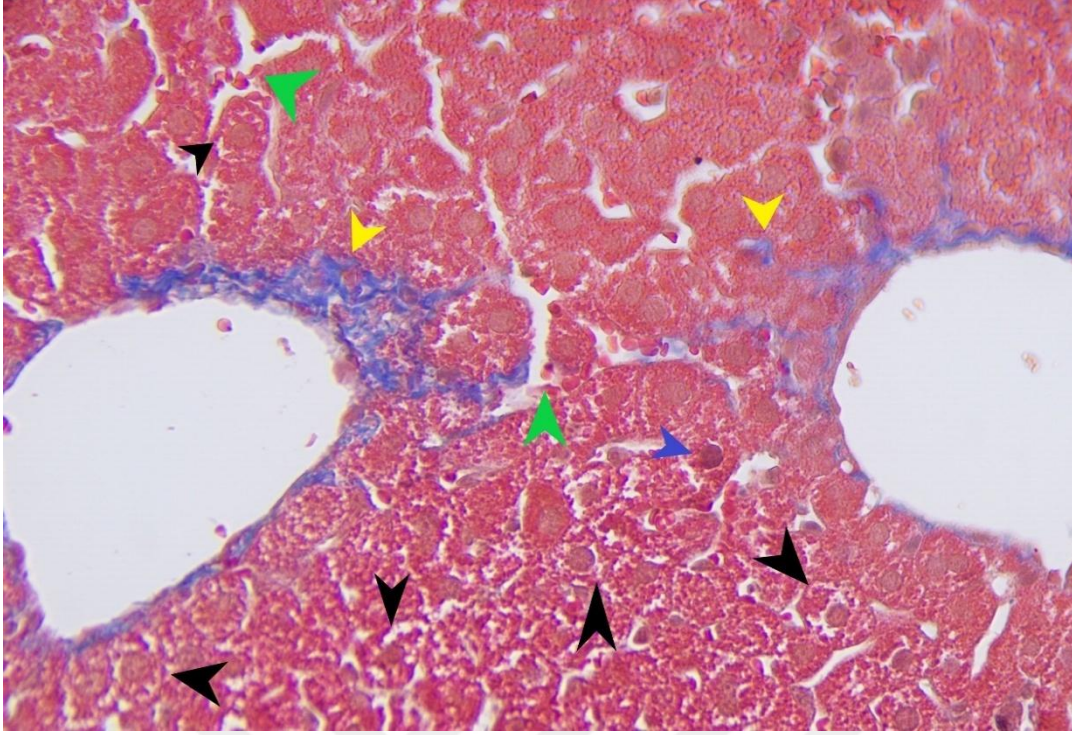
Şekil 4.8. 2,5 mg/kg grubu ait karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme). Nekrotik değişiklikler (kırmızı kare), karyomegali (kırmızı yıldız), post-nekrotik fibrozis ile uyumlu alanlar (kırmızı daire), çekirdek eksantrisitesi (kırmızı ok ucu), çekirdeği büzüşmüş hücreler (kırmızı çok kenarlı yıldız), hidropik dejenerasyon gösteren hepatositler (yeşil yıldız), piknotik yapıdaki çekirdekler (yeşil şimşek) ve dejeneratif değişiklikler gösteren hepatositler (yeşil ok ucu).



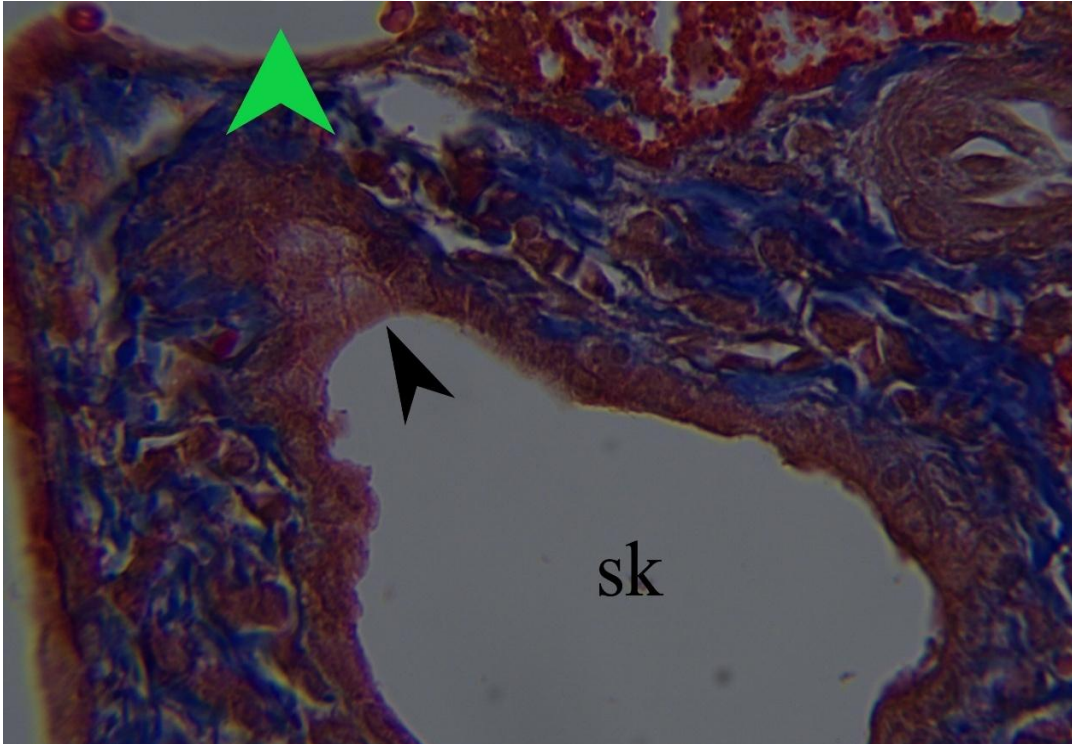
Şekil 4.9. 2,5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme). Nükleus değişiklikleri (kırmızı çok köşeli yıldız), hemoraji odakları (beyaz ok ucu), ilişkili nükleer hacim azalması (yeşil şimşek), belirgin sinüzoidal genişleme (yeşil ok) ve nükleer pleomorfizm (sarı ok).



Şekil 4.10. 2,5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme). Yağ vezikülleri (yeşil çok köşeli yıldız), nekrotik alanlar (kırmızı kare), sitoplazması küçülmüş hücreler (kırmızı çok köşeli yıldız), hidropik dejenerasyon gösteren hepatositler (yeşil yıldız), kan hücresi(hemoraji, beyaz ok).



Şekil 4.11. 2,5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (masson trikrom, 40x büyütme). Hidropik dejenerasyon(siyah ok ucu), piknotik çekirdek (mavi ok ucu), kolajen fibriller (sarı ok ucu) ve sinüzoidlerde genişleme / ayrılma (yeşil ok ucu).



Şekil 4.12. 2,5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (masson trikrom, 100x büyütme). Sk; safra kanalı, siyah ok ucu; kolanjiyosit ve yeşil ok ucu portal ven. Fibrozis varlığını düşündüren yaygın kolajen birikimi gözlenmiştir.

4.1.3. 5 mg/kg grubu

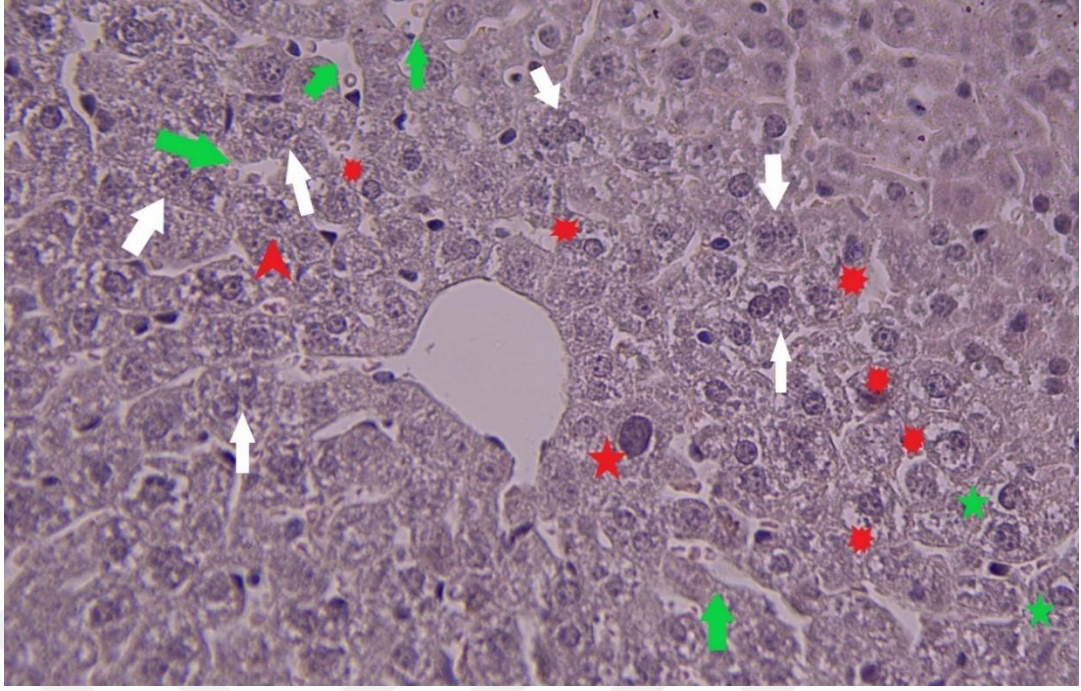
5 mg/kg/gün dozunda BPM uygulanan deney grubuna ait karaciğer dokularında, H&E boyası ile yapılan histopatolojik incelemelerde belirgin doku hasarı saptanmıştır. Özellikle parankim bölgelerinde geniş nekrotik alanlar dikkat çekmiş, bu alanlarda hücre sınırlarının silindiği, eozinofilik hücre kalıntılarının yer aldığı ve çekirdeksiz hepatosit formlarının yoğunlaştığı görülmüştür. Sinüzoidlerde belirgin genişleme (dilatasyon) izlenmiş, bu bulgu mikrosirkülasyonun bozulduğuna ve damar içi basınç değişikliklerine işaret etmektedir. Hepatositlerde yaygın hidropik dejenerasyon izlenmiş; bu hücrelerde sitoplazmanın açık, şeffaf vakuollerle dolu olduğu, hücre hacminde artış meydana geldiği ve hücre sınırlarının daha belirgin hale geldiği gözlemlenmiştir. Sitoplazmik homojenitenin kaybı, granüler veya vakuollü görünüm ile birleşerek hücresel dejenerasyonun ilerlediğini ortaya koymuştur.

Bazı hepatositlerde belirgin karyomegali (çekirdek büyümesi) izlenmiş olup, bu çekirdeklerde açık kromatin yapısı, belirgin nükleoller ve nükleer pleomorfizm dikkati çekmiştir. Çift çekirdekli hepatositlere de sıkça rastlanmıştır; bu hücreler özellikle hidropik dejenerasyon bölgelerinde yoğunlaşmış ve rejeneratif yanıtın göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca bazı hücrelerde buzlu cam benzeri sitoplazmik görünüm ile birlikte hücre boyutlarında artış gözlemlenmiştir; bu durum karyomegali ile birlikte değerlendirildiğinde, hücresel adaptasyon sürecine işaret etmektedir.

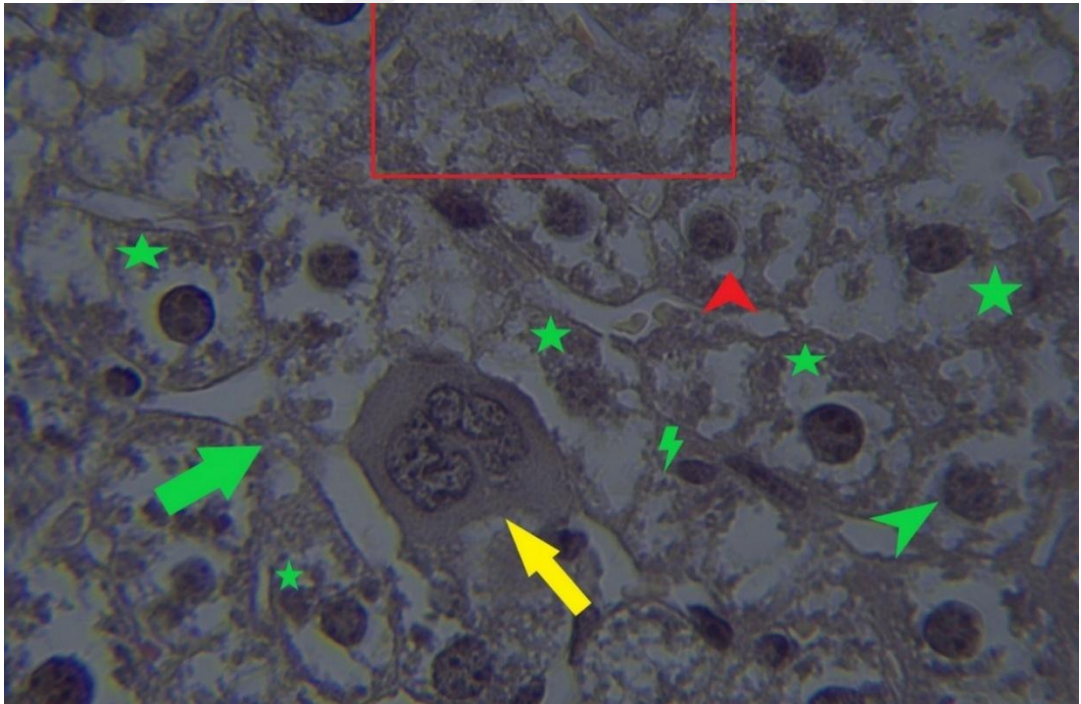
Apoptotik morfolojiye sahip hücrelerde sitoplazmik büzülme, çekirdekte piknoz, kromatin yoğunlaşması, çekirdek eksantrisitesi ve düzensiz hücre membran yapısı belirgin hale gelmiştir. Bu morfolojik değişikliklerin ileri evrelerinde sitoplazmik fragmentasyon sonucunda oluşan apoptotik cisimcikler (apoptotic bodies) tespit edilmiştir. Bazı alanlarda bu cisimciklerin kümeler halinde bulunması, yaygın programlanmış hücre ölümünü göstermektedir.

Genel olarak elde edilen bulgular, yüksek doz BPM uygulamasının karaciğer dokusunda hem nekrotik hem de apoptotik hücre ölüm süreçlerini eş zamanlı olarak başlattığını ve bu süreçlerin sitoplazmik ve nükleer düzeyde belirgin dejeneratif değişikliklere yol açtığını ortaya koymaktadır. Ayrıca sinüzoidal yapıların da bu patolojik süreçlerden etkilendiği, doku mimarisinde belirgin bozulmalar meydana geldiği anlaşılmaktadır (Şekil 4.13., 4.14., 4.15. ve 4.16.).

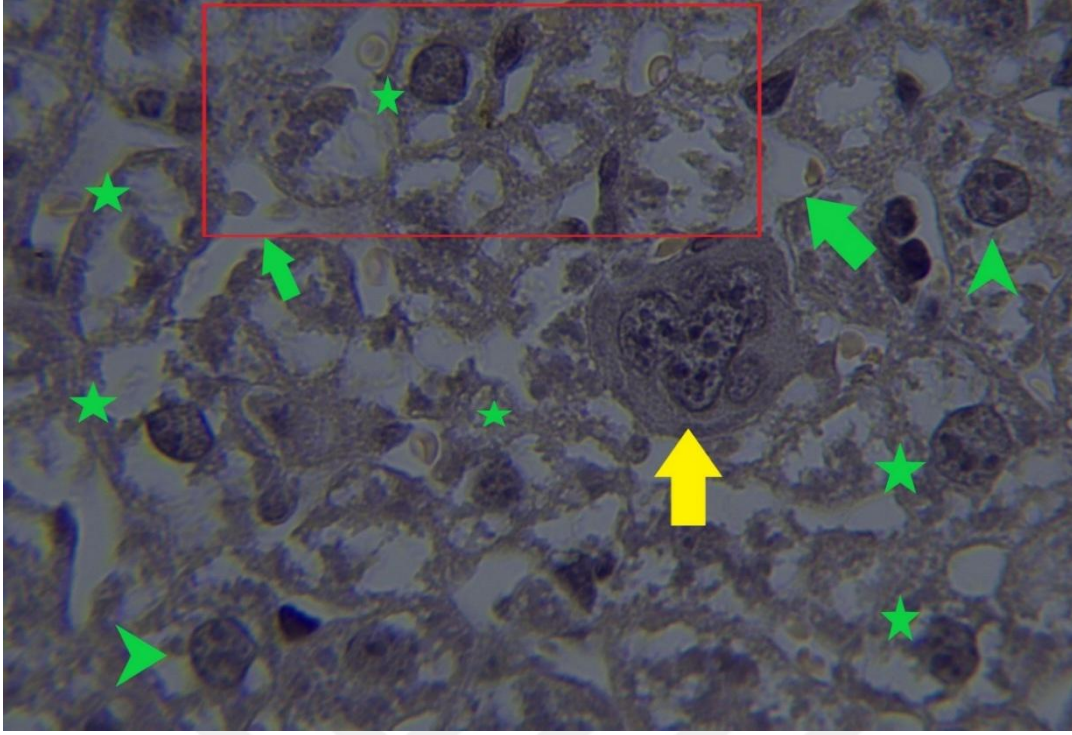
Masson trikrom ile yapılan histolojik incelemelerde portal triad çevresinde yoğun patolojik bulgular gözlenmiştir. Hidropik dejenerasyon gösteren hepatositler dikkati



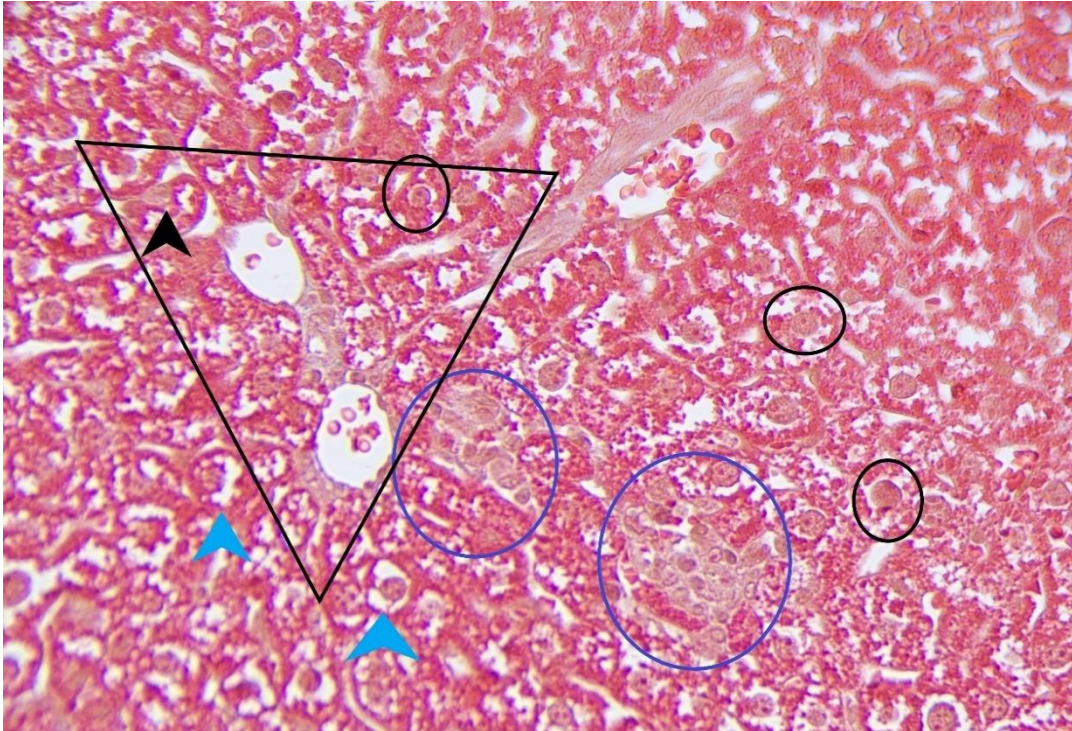
Şekil 4.14. 5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme). Eksantrik çekirdek yapısı (kırmızı ok ucu), çekirdeği büzüşmüş (piknotik) hepatositler (kırmızı çok köşeli yıldız), karyomegali (kırmızı yıldız), binükleer (iki çekirdekli) hepatositler (beyaz ok), hidropik dejenerasyona uğramış hepatositler (yeşil yıldız), sinüzoidal genişleme (yeşil ok) izlenmiştir.



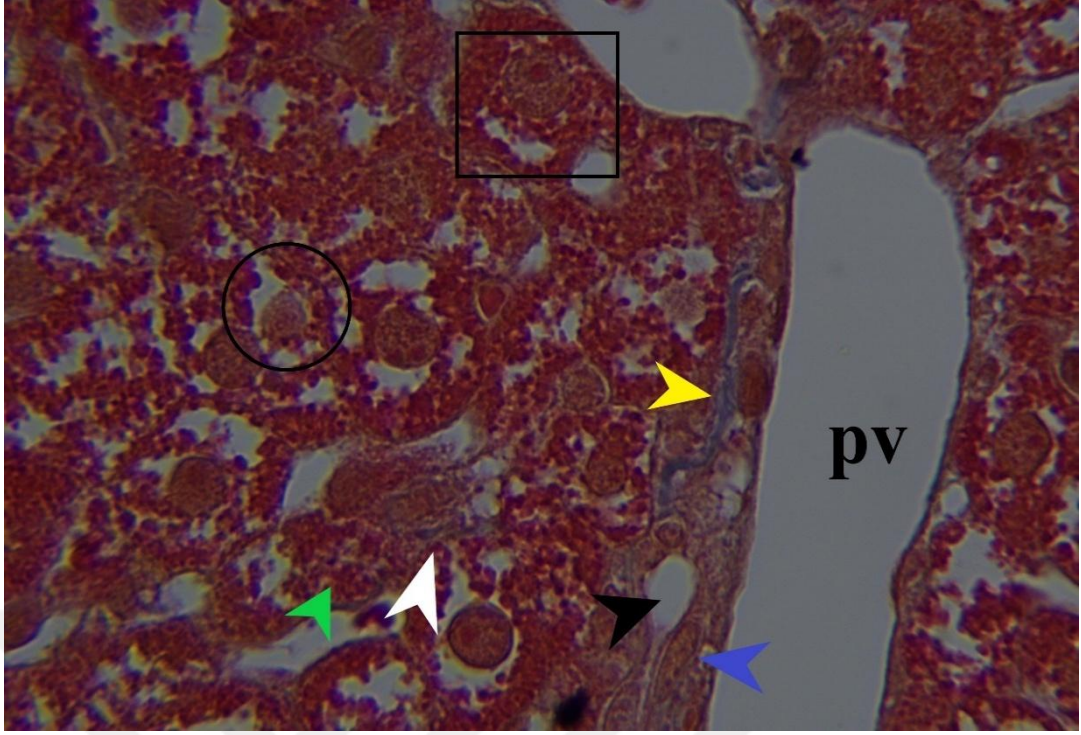
Şekil 4.15. 5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme). Nekrotik alanlar (kırmızı kare), çekirdek eksantrisitesi (kırmızı ok ucu), nükleer pleomorfizm (sarı ok), hidropik dejenerasyon (yeşil yıldız), dejenere hepatositler (yeşil ok ucu), sinüzoidal genişleme (yeşil ok) ve piknotik çekirdekler (yeşil şimşek).



Şekil 4.16. 5 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme). Nekrotik alanlar (kırmızı kare), sinüzoid genişlemeleri (yeşil ok), hidrofik dejenerasyon (yeşil yıldız), dejenere hepatositler (yeşil ok ucu), pleomorfizm gösteren, deforme ve büyümüş nükleuslar (sarı ok).



Şekil 4.17. 5 mg/kg grubu portal triad (siyah üçgen) histolojisi (Masson trikrom, 40x büyütme). Hipropik dejenerasyon (mavi ok ucu), apoptotik hücreler (siyah daire), çekirdek eksantrisitesi (siyah ok ucu) ve infiltrasyon (mavi daire).



Şekil 4.18. 5 mg/kg grubu portal triad histolojisi (Masson trikrom, 100x büyütme) (pv; portal ven, siyah ok ucu; safra kanalı ve mavi ok ucu; fibroblast). Karyomegali (siyah kare), apoptotik hücre (siyah daire), çekirdek eksantrisitesi (yeşil ok ucu), bağ doku alanları (beyaz ok).

4.1.4. 10 mg/kg grubu

10 mg/kg dozunda BPM uygulanan deney grubuna ait karaciğer dokularında, H&E ve Masson Trikrom boyamalarıyla yapılan histopatolojik incelemelerde yaygın ve çok yönlü doku hasarı saptanmıştır. Özellikle hepatositlerde belirgin karyomegali, binükleasyon (çift çekirdekli hücreler) ve nükleer pleomorfizm dikkat çekmiş; bu bulgular hücresel stres ve artmış rejeneratif aktiviteyle ilişkilendirilmiştir.

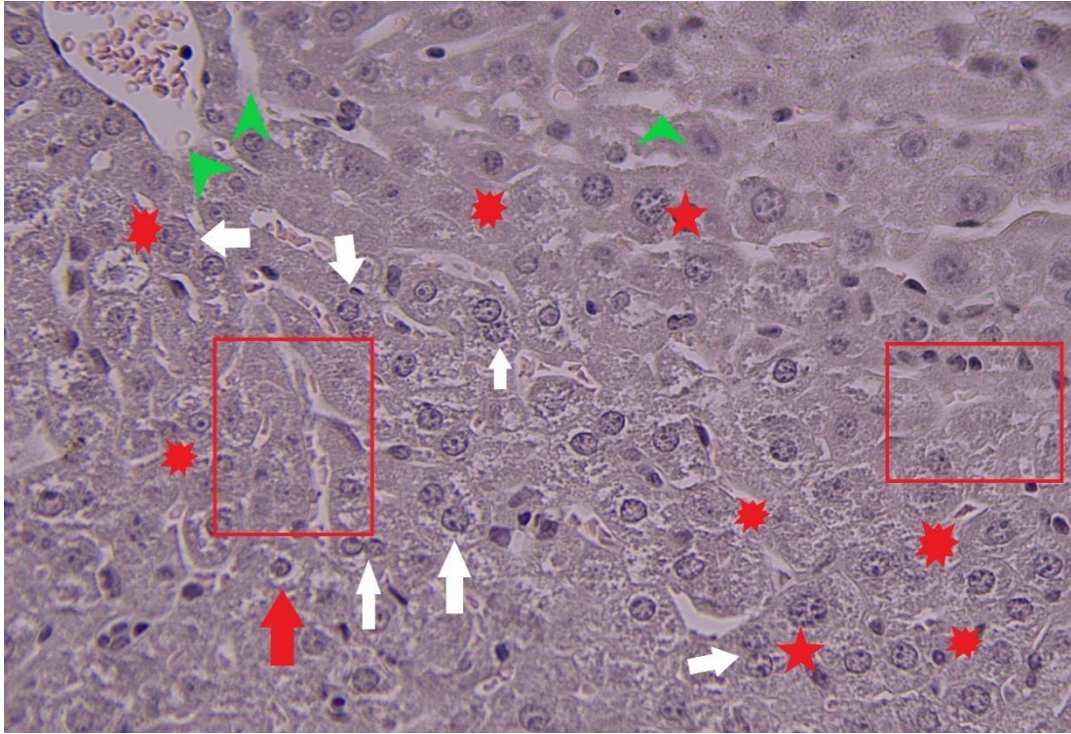
Nekrotik alanlarda, hücre bütünlüğünün bozulduğu, eozinofilik sitoplazmalı ve çekirdeksiz hücre kalıntıları gözlenmiş, komşu bölgelerde ise apoptotik morfoloji taşıyan hücrelerde piknoz, çekirdek büzülmesi, çekirdek eksantrisitesi ve apoptotik cisimcikler tespit edilmiştir. Bu bulgular, nekroz ve apoptozun eş zamanlı olarak ilerlediğini göstermektedir.

Ayrıca bazı bölgelerde hidropik dejenerasyon ve sitoplazmik vakuolizasyon ile karakterize hücresel şişmeler izlenmiş; bu durum BPM'nin hücresel homeostazı bozarak dejeneratif süreci tetiklediğine işaret etmektedir. Sinüzoidlerde belirgin genişleme, portal alanlara açılan bölgelerdeki yapısal deformasyonla birlikte mikrovasküler düzeyde dolaşım bozukluğu oluştuğunu düşündürmektedir.

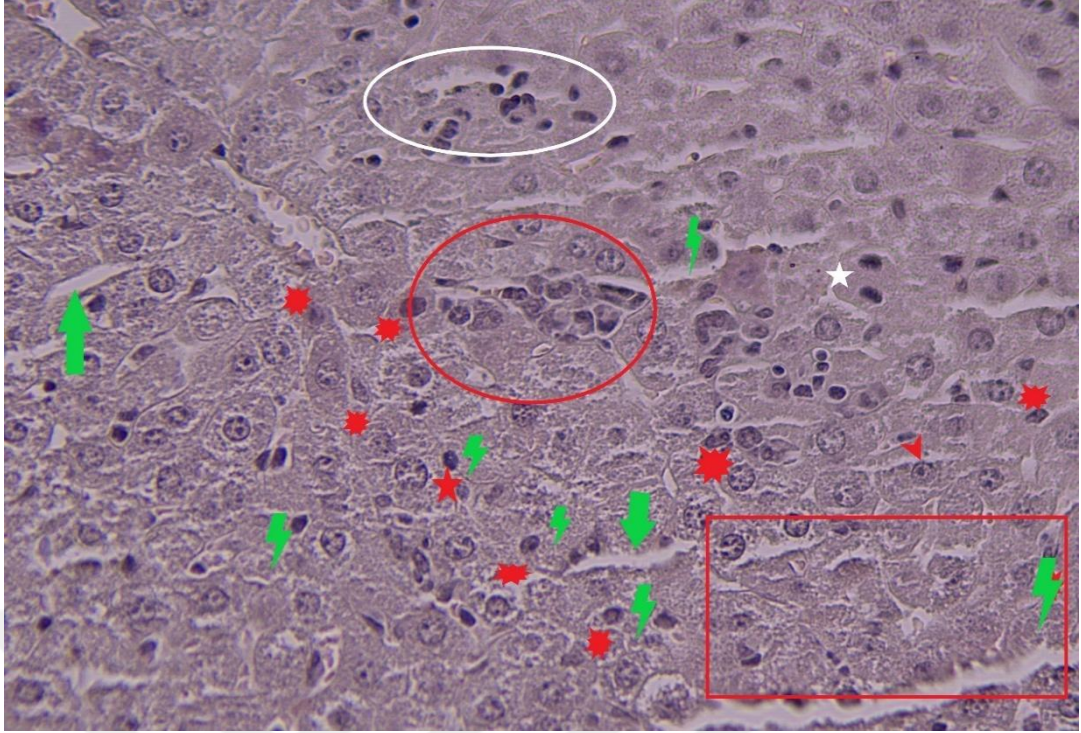
Masson Trikrom boyasıyla yapılan analizlerde, nekroz sonrası gelişen bağ doku artışı, köprüleşen kolajen fibriller ve fibrotik alanlar belirgin hale gelmiştir. Özellikle ven çevresinde ve post-nekrotik bölgelerde kolajen birikimi, BPM'nin yüksek doz uygulamasının fibrotik süreci hızlandığını ortaya koymaktadır.

Bazı kesitlerde çok çekirdekli dev hücreler, mitotik figürlerde artış ve nükleer aktivite artışı gözlemlenmiş; bu bulgular BPM'nin aynı anda hem hücre proliferasyonu hem de hücre ölümü mekanizmalarını uyardığını göstermektedir.

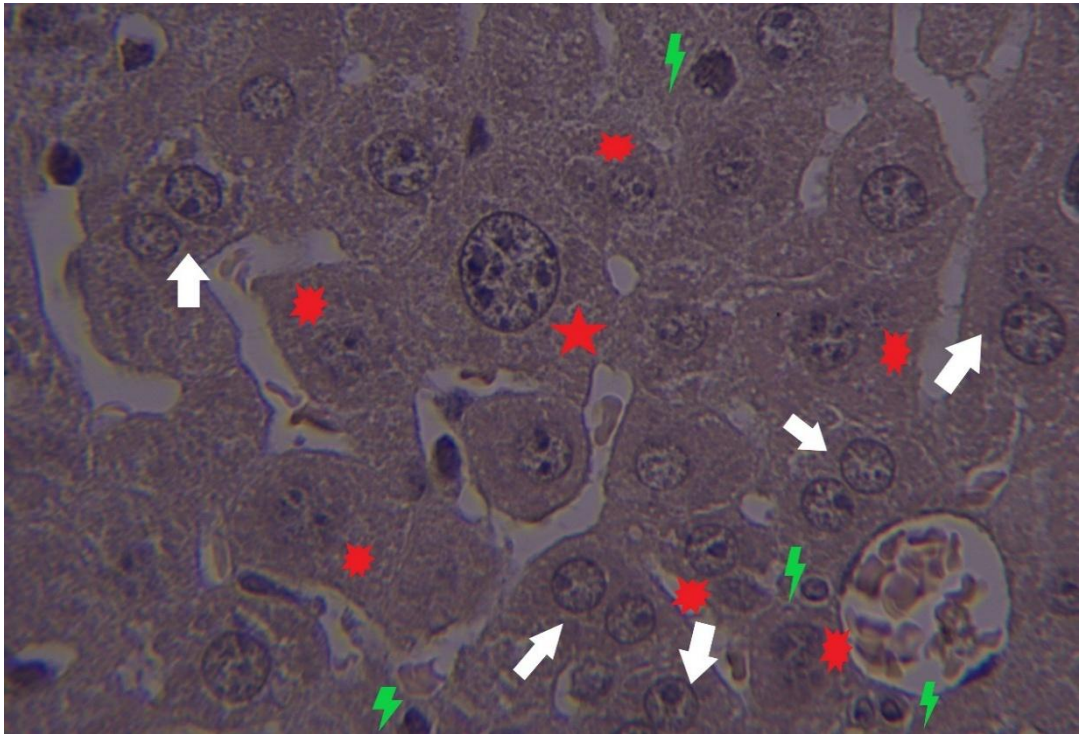
Tüm bu veriler, 10 mg/kg BPM maruziyetinin karaciğer dokusunda ileri düzeyde hücresel hasar, fibrotik değişiklikler, rejeneratif yanıtlar ve ölümcül süreçleri (apoptoz ve nekroz) eş zamanlı olarak başlattığını; ayrıca mikrovasküler yapının ve hepatosit bütünlüğünün ciddi şekilde etkilendiğini göstermektedir (Şekil 4.19–4.24).



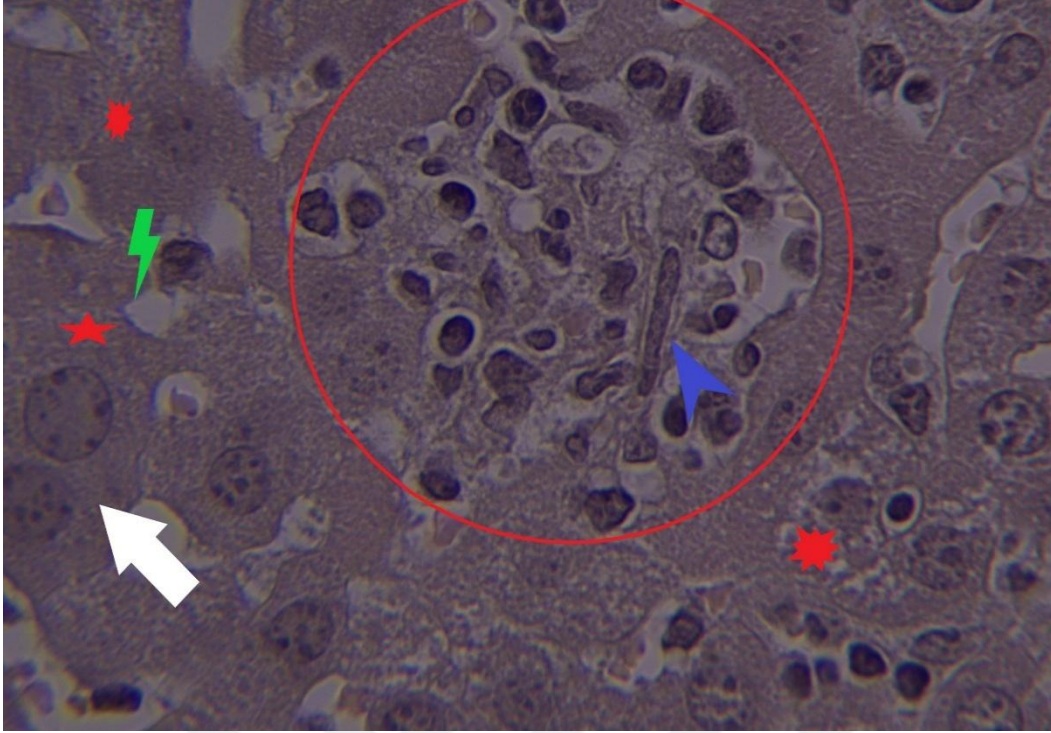
Şekil 4.19. 10 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme). Yaygın çift çekirdekli hücre (beyaz ok), nekrotik alanlar (kırmızı kare), apoptotik hücreler (kırmızı çok kenarlı yıldız), çekirdek büyümesi (kırmızı yıldız), sinüzoidlerde genişleme (yeşil ok ucu).



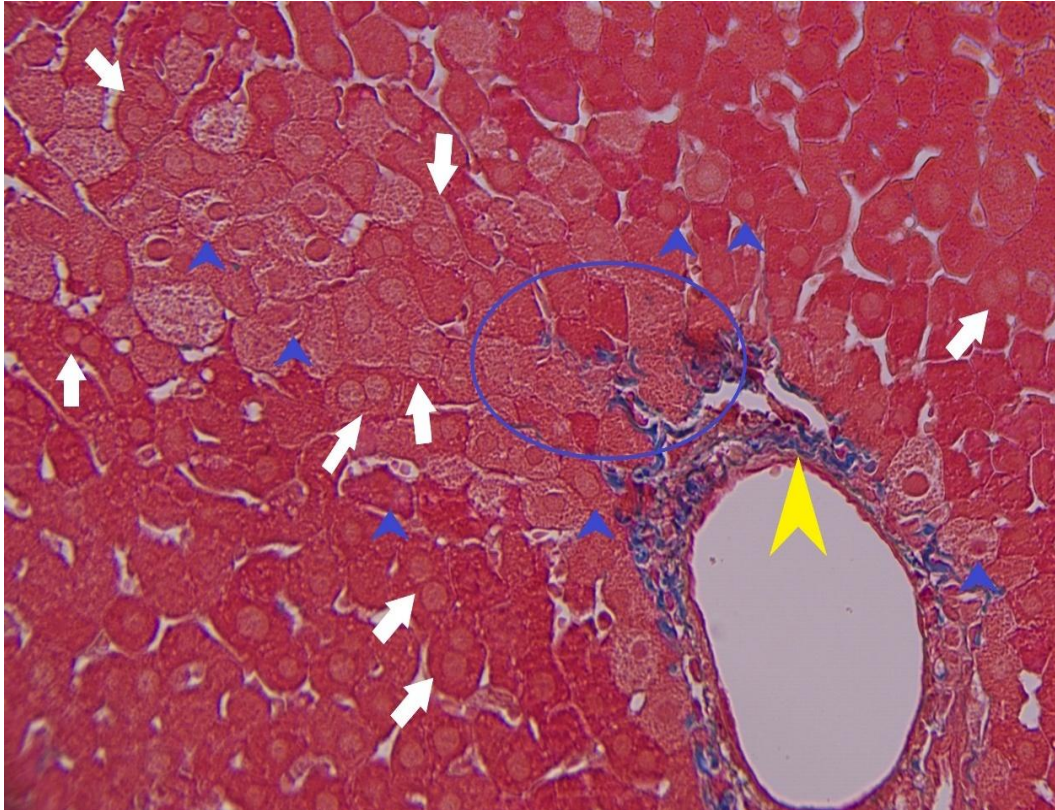
Şekil 4.20. 10 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 40x büyütme). Nekrotik (kırmızı kare), post nekrotik (kırmızı daire) alanlar, apoptotik hücreler (kırmızı çok kenarlı yıldız), piknotik yapıdaki çekirdekler, karyomegali (kırmızı yıldız), çekirdek eksantrisitesi (kırmızı ok ucu), infiltrasyon başlangıcı (beyaz daire), sinüzoidlerde genişleme (yeşil ok), mitotik figür (beyaz yıldız).



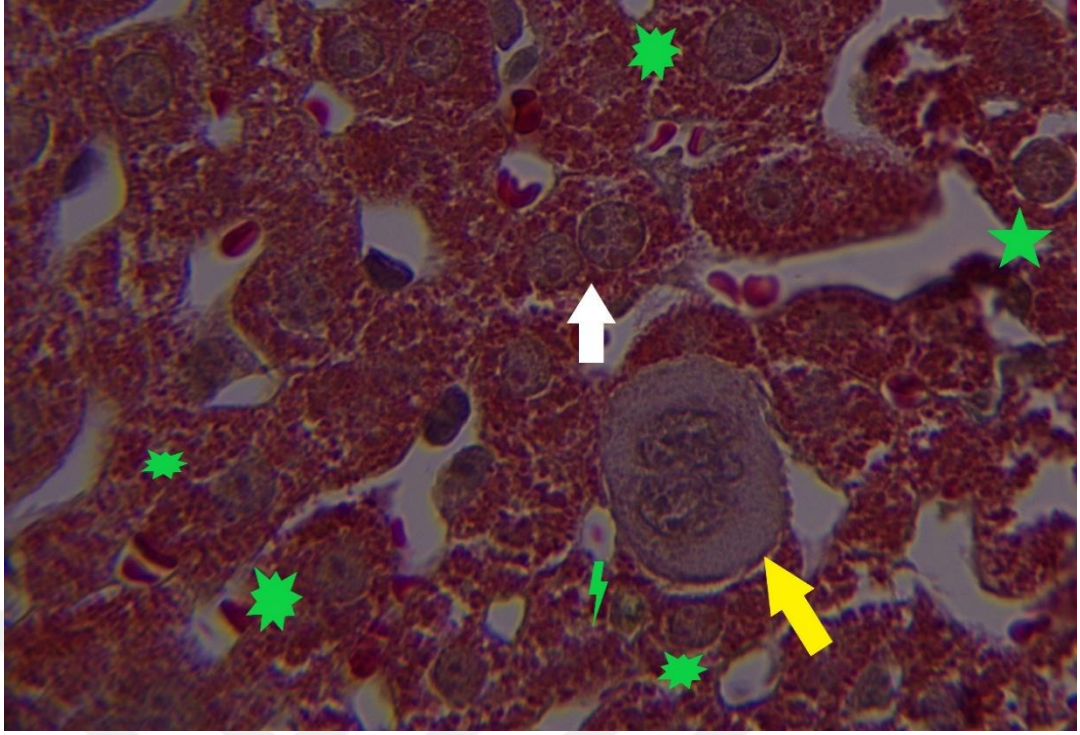
Şekil 4.21. 10 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme). Çok sayıda çift çekirdekli hücre (beyaz ok), piknoz (yeşil şimşek), apoptozla (kırmızı çok kenarlı yıldız), karyomegali (kırmızı yıldız).



Şekil 4.22. 10 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (H&E, 100x büyütme). Çift çekirdekli hücre (beyaz ok), piknoz (yeşil şimşek), apoptozla (kırmızı çok kenarlı yıldız), karyomegali (kırmızı yıldız), post nekrotik alan (kırmızı daire) fibroblast (mavi ok ucu).



Şekil 4.23. 10 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (Masson trikrom, 100x büyütme). Kolajen birikimi (mavi daire), kolajen demetleri (sarı ok ucu), çift çekirdekli hücrelerde (beyaz ok), apoptoz (mavi ok ucu).

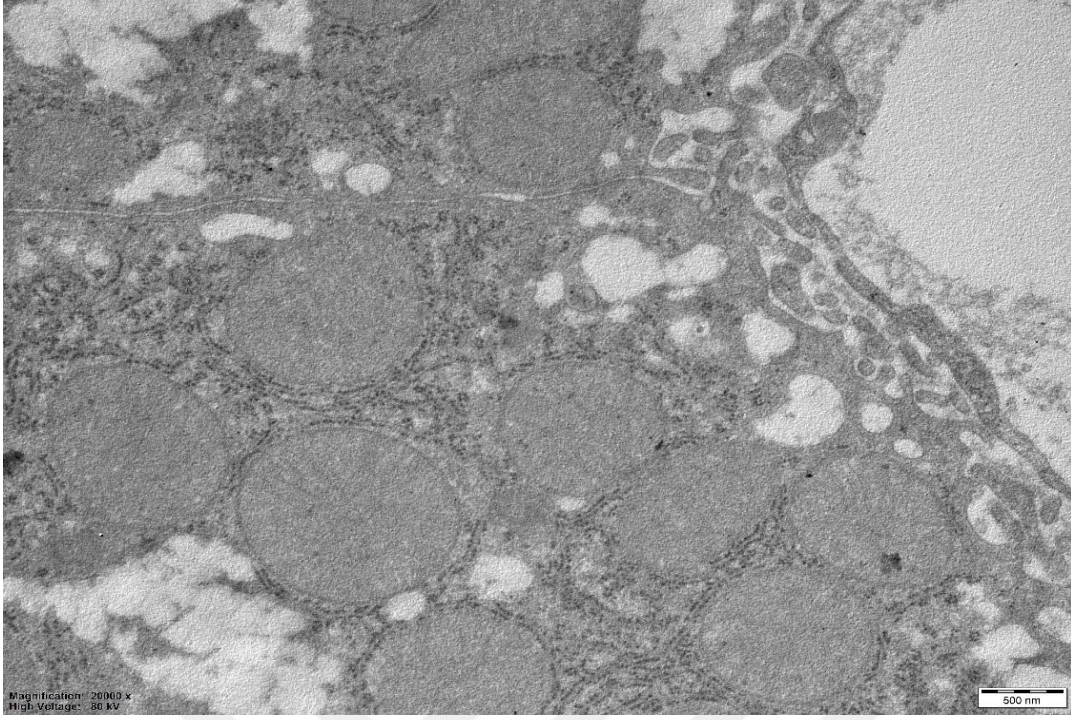


Şekil 4.24. 10 mg/kg grubu ait genel karaciğer histolojisi (Masson trikrom, 100x büyütme). Nükleer pleomorfizm gösteren hepatositler (sarı ok), çift çekirdek (beyaz ok), piknotik çekirdekler (yeşil şimşek), apoptotik hücreler (yeşil çok kenarlı yıldız) hidropik dejenerasyon (yeşil yıldız).

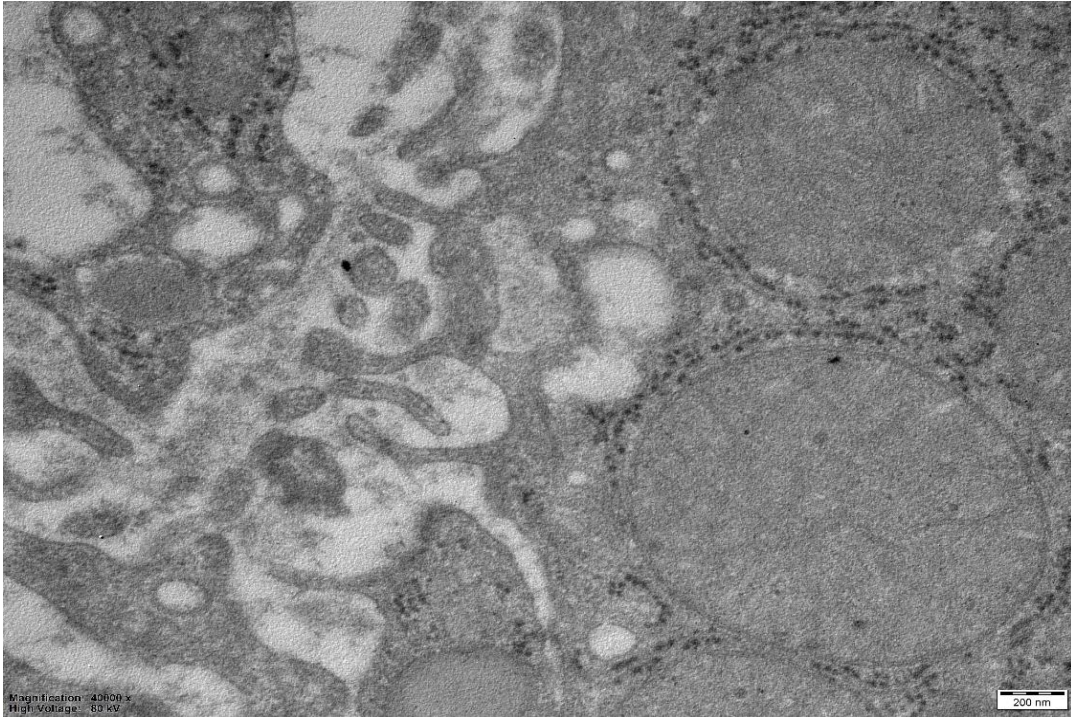
4.2. Karaciğer Dokusunun Elektron Mikroskopi Histolojisi

4.2.1. Kontrol grubu

Kontrol grubu sıçan karaciğer dokusunda, hepatositlerin iyi organize olmuş koronlar halinde sinüzoit etrafında dizildiği ve hücrelerin poligonal şekilli, normal nükleuslara sahip olduğu gözlemlendi. Sitoplazmada bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum (GER) sisternaları ve serbest ribozom kümeleri mevcuttu. Ayrıca, mitokondriler yoğun olarak sitoplazma boyunca dağılmıştı ve çoğu elongate veya yuvarlak morfolojideydi. Sinüzoidleri çevreleyen Disse aralığında mikrovilüs uzantıları belirgindi. Endotelyal hücreler fenestrasyonlar içermekteydi. Genel olarak, kontrol grubu karaciğer dokusunda hücresel bütünlüğün ve organellerin ultrastrüktürel olarak korunduğu izlendi (Şekil 4.25. ve 4.26.)



Şekil 4.25. Kontrol gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel yapı(x20000).



Şekil 4.26. Kontrol gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel yapı (x20000).

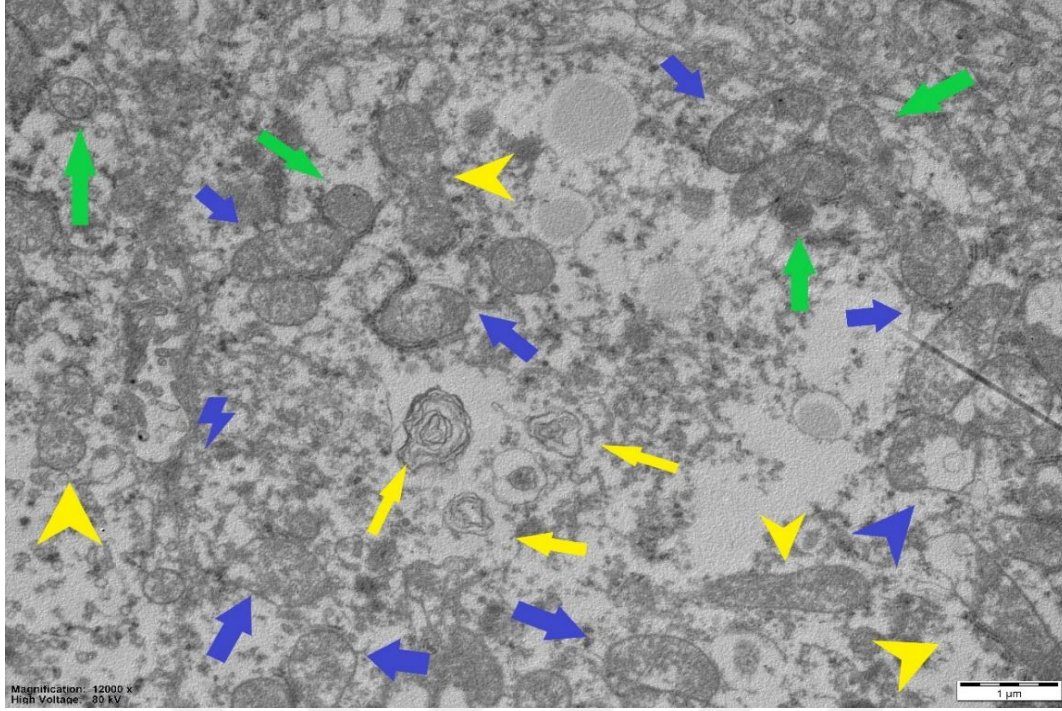
4.2.2. 2,5 mg/ kg grubu

Düşük doz Bisfenol M (BPM) uygulamasının ardından gerçekleştirilen elektron mikroskopik incelemelerde, hepatositlerde belirgin ultrastrüktürel değişiklikler gözlenmiştir. Özellikle mitokondriyal yapılarda yaygın şişme, deformasyon ve

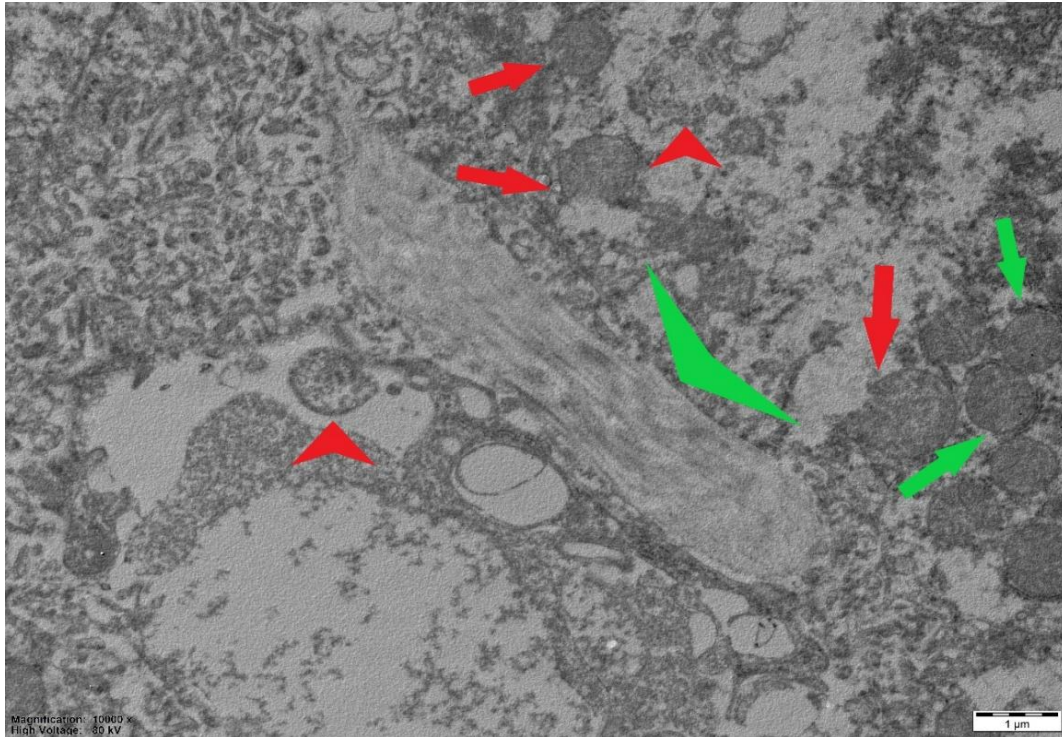
hidropik dejenerasyon dikkat çekmektedir. Mitokondri iç membran yapısını oluşturan kristalarda belirgin bozulmalar, kristolizis ve düzensizlikler saptanmış; bazı mitokondrilerde ise krista yapılarının tamamen kaybolduğu, vakuol içerdiği ve uzamış, şişmiş formlarda olduğu görülmüştür. Bu yapısal değişiklikler, BPM maruziyetine bağlı mitokondriyal stres ve enerji metabolizmasında bozulmayı yansıtmaktadır.

2,5 mg/kg dozda krista kaybı gösteren mitokondriler ile deforme mitokondriler, mitokondriyal zar bütünlüğünün kaybı ve organel düzeyinde yapısal bozulmalarla ilişkilendirilmiştir. Kristalize içerikli ve belirgin şekilde şişmiş mitokondriler, ileri düzey mitokondriyal disfonksiyonu ve hücrel stresin birikici etkisini göstermektedir. Bunun yanı sıra, Disse aralığında birikmiş kolajen fibrilleri, ekstraselüler matriks yeniden yapılanmasına ve fibrotik sürecin başlangıcına işaret etmektedir (Şekil 4.26).

Hepatosit sitoplazmasında çok katmanlı miyelin figürler dikkat çekmiş, bu yapılar bozulan lipid metabolizması ve artmış otofajik aktivite ile ilişkilendirilmiştir. Uzamış ve şişmiş mitokondriler, mitokondriyal füzyon mekanizmalarının aktivasyonuna ve organel stresine işaret ederken; krista kaybı izlenen mitokondriler, mitokondriyal fonksiyonel bozukluğu düşündürmektedir. Ayrıca, vakuol içeren şişmiş mitokondriler ile belirgin şekilde şişmiş mitokondriler, hücrel enerji metabolizmasındaki ciddi aksamayı ve dejeneratif süreci yansıtmaktadır. Safra kanaliküllerinde gözlenen dejeneratif değişiklikler, BPM maruziyetinin safra akışı ve kanal yapıları üzerindeki olumsuz etkilerini göstermektedir (Şekil 4.25).



Şekil 4.27. 2,5 mg/kg BPM uygulanan gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel değişiklikler (x12000). Çok katmanlı miyelin figürleri (sarı ok), uzamış mitokondriler (sarı ok ucu), krista kaybı izlenen mitokondriler (yeşil ok), vakuol içeren mitokondriler (mavi ok ucu) ile şişmiş mitokondriler (mavi ok), safra kanaliküllerinde dejeneratif değişiklikler (mavi şimşek).



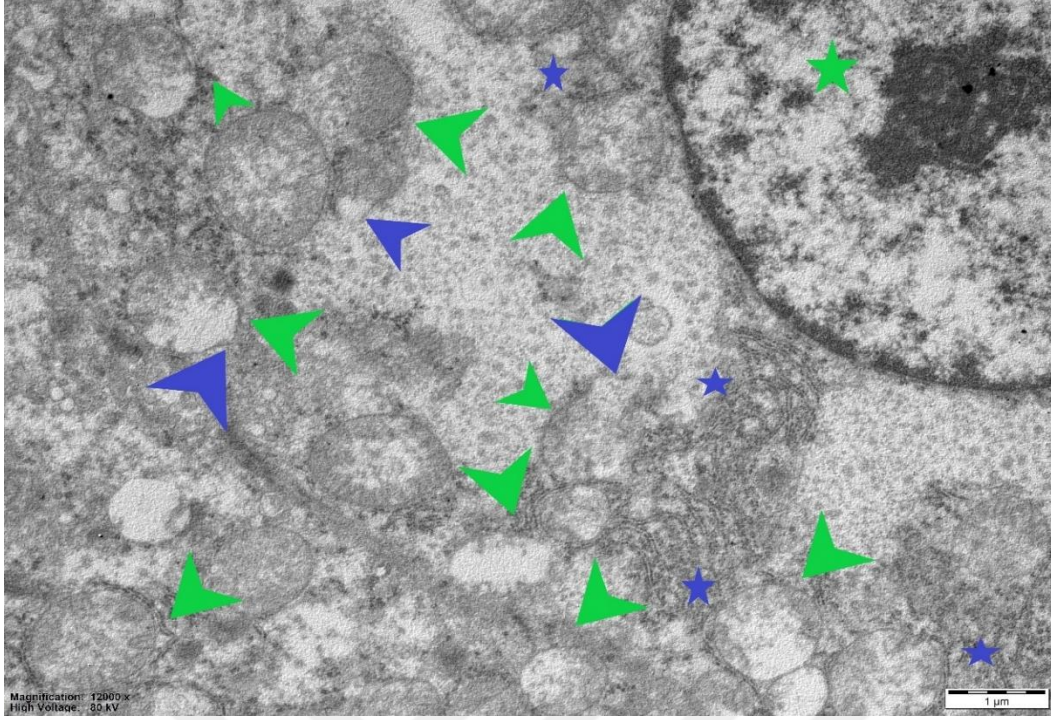
Şekil 4.28. 2,5 mg/kg BPM uygulanan gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel değişiklikler (x10000). Krista kaybı gösteren mitokondriler (yeşil ok) ile deforme mitokondriler (kırmızı ok), kristalize içerikli ve şişkin mitokondriler (kırmızı ok ucu), kolajen fibrilleri (yeşil ok ucu).

4.2.3. 5 mg/ kg grubu

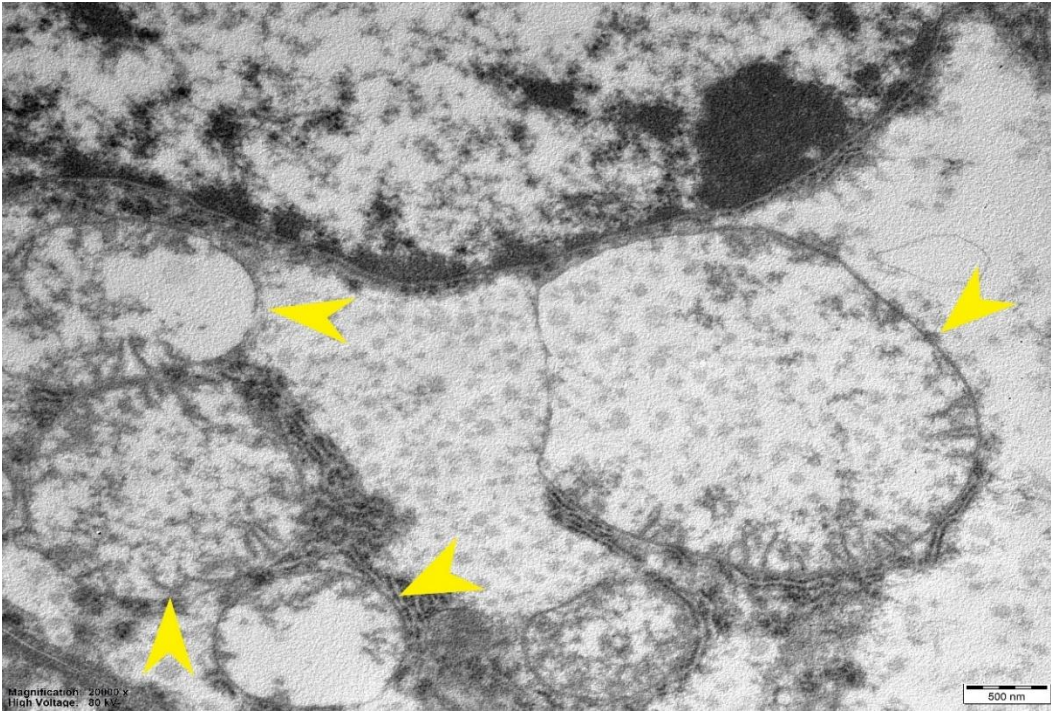
5 mg/kg BPM dozuna maruz bırakılan gruptaki hepatositlerde, elektron mikroskopi incelemeleri sonucunda belirgin mitokondriyal hasar ve organel düzeyinde yapısal bozulmalar saptanmıştır. Mitokondrilerde ileri düzeyde şişme, kristolizis, dejeneratif morfolojik değişiklikler ve genişleme (hipertrofi) dikkati çekmiştir. Ayrıca krista sayısında belirgin azalma, kristaların çevreye doğru yönelmesiyle düzenli yapının bozulması ve mitokondri iç yapısında düzensizlikler gözlenmiştir. Bu bulgular, mitokondriyal disfonksiyonun ve hücresel enerji metabolizmasında aksaklıkların varlığını işaret etmektedir.

Mitokondri dış membranında düzensizlikler ve bazı bölgelerde yırtılmalar gözlenmiş; iç membran yapıların belirgin şekilde kaybolduğu alanlar tespit edilmiştir. Bu yapısal bozulmalar, organel bütünlüğünün kaybı ile birlikte, hücresel apoptoz sürecinin ilerlediğini düşündürmektedir. Hücre sitoplazmasında serbest ribozomların sayısında azalma saptanmıştır. Bu durum, protein sentez kapasitesinde azalmayı ve metabolik aktivitede bozulmayı göstermektedir. Ayrıca granüllü endoplazmik retikulumda belirgin düzensizlikler ve yapısal bütünlük kayıpları izlenmiş; bu durumun endoplazmik stres yanıtını tetikleyebileceği düşünülmektedir. Nükleer düzeyde, çekirdeklerde dağınık kromatin dağılımı dikkati çekmiştir. Bu nükleer organizasyon bozukluğu, hücresel stresin ve dejeneratif süreçlerin varlığını göstermektedir (şekil 4.27. ve 4. 28.).

Tüm bu ultrastrüktürel değişiklikler, BPM maruziyeti sonucunda hepatositlerde yaygın organel düzeyinde bozulmayı ve özellikle mitokondri merkezli hücresel hasarın oluştuğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.29. 5 mg/kg BPM uygulanan gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel değişiklikler (x12000). Mitokondri dış membranında yırtılma izlenen bölgeler (mavi ok ucu), granüllü endoplazmik retikulumda görülen düzensizlikler (mavi yıldız), mitokondri dış membranında düzensizlik (yeşil ok ucu), çekirdek bölgesinde gözlenen dağınık kromatin dağılımı (yeşil yıldız).



Şekil 4.30. 5 mg/kg BPM uygulanan gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel değişiklikler (x20000). Bu değişiklikler; mitokondriyal şişme, kristolizis, dejeneratif morfolojik bozulmalar ve genişleme (hipertrofi) (sarı ok).

4.2.4. 10 mg/ kg grubu

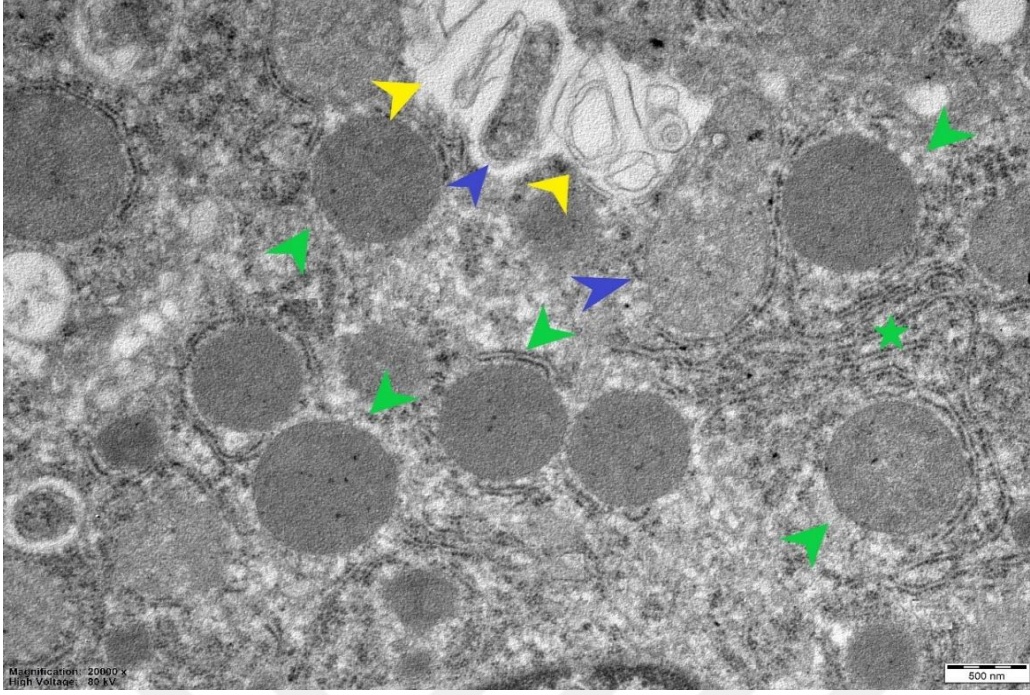
10 mg/kg BPM uygulanan grupta, hepatositlerde yaygın ve belirgin ultrastrüktürel değişiklikler gözlenmiştir. Mitokondrilerde yoğunluk artışı ve opaklaşma, mitokondri membran geçirgenliğinde azalma ile ilişkilendirilmiş ve bu durum mitokondriyal disfonksiyonun önemli bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Aynı zamanda mitokondriyal iç membranlarda düzensizlik, krista yapılarında belirgin bozulmalar, kristolizis ve krista sayısında azalma dikkat çekmiştir. Bazı örneklerde mitokondri membranlarının bütünlüğünü kaybettiği, yırtılmaların izlendiği ve kristaların çevreye yönelerek düzenli yapının bozulduğu tespit edilmiştir. Ayrıca miyelin figürlerinin gözlenmesi, membran yapılarındaki bozulmalara ve otofajik süreçlerin aktive olduğuna işaret etmektedir.

Sitoplazmada yer yer uzamış ve şekilsel olarak belirginleşmiş mitokondriler, mitokondriyal stresin ve füzyon mekanizmalarının aktive olduğunu düşündürmektedir. Mitokondri ile granüllü endoplazmik retikulum (GER) arasındaki mesafenin azaldığı, bazı mitokondrilerin kısa ve pürüzlü GER sisternalarıyla çevrili olduğu dikkat çekmiştir. Bu durum, hücrel organel etkileşimlerinin değiştiğini ve olası adaptif ya da patolojik yanıtların geliştiğini göstermektedir.

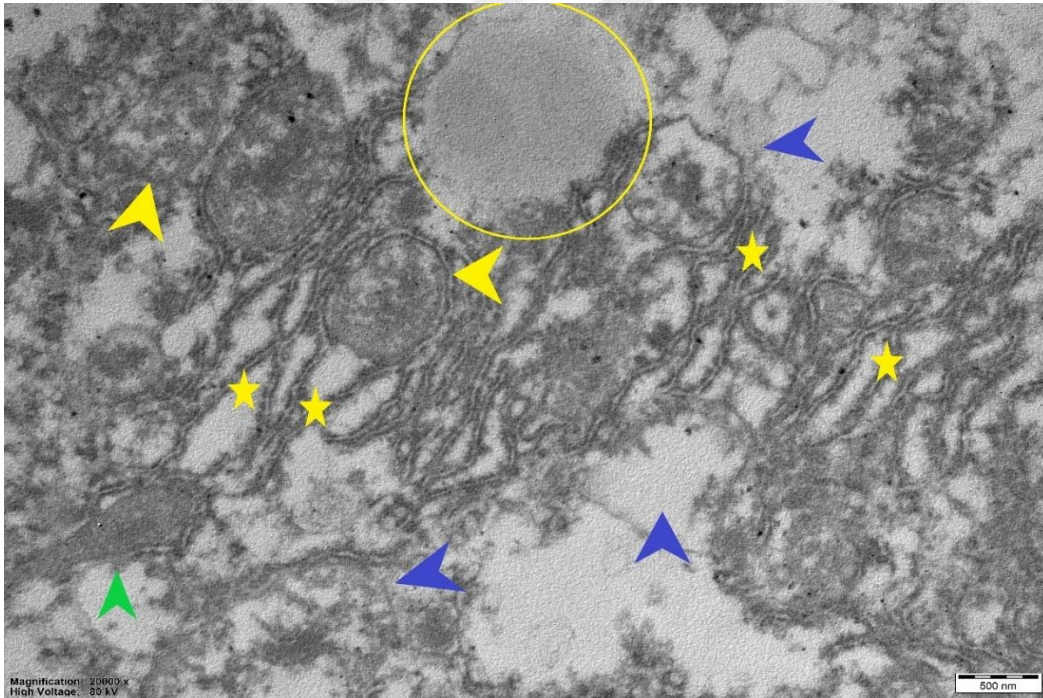
Endoplazmik retikulumda yaygın dilatasyon, parçalanma ve yapısal düzensizlikler izlenmiştir. GER'nin normal sisternal düzeninin bozulduğu, protein sentez sürecinde aksamalara ve endoplazmik stres yanıtına işaret eden yapısal değişikliklerin ortaya çıktığı görülmüştür. Bu değişiklikler, hücrel homeostazın ciddi düzeyde bozulduğunu göstermektedir.

Sitoplazmada gözlenen yaygın vakuolizasyon, serbest ribozom sayısında azalma ve lipid damlacıklarının varlığı, hücrel metabolik aktivitenin düştüğüne ve yağ metabolizmasında düzensizliklerin oluştuğuna işaret etmektedir. Ribozomal azalmanın, protein sentez kapasitesinde düşüşe neden olduğu düşünülmektedir.

Tüm bu bulgular, yüksek doz BPM maruziyetinde hepatositlerde mitokondri merkezli olmak üzere yaygın organel düzeyinde hasarın oluştuğunu ve hücrel stresin yanı sıra apoptoza ilerleyen dejeneratif süreçlerin aktive olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.31. 10 mg/kg BPM uygulanan gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel değişiklikler (x20000). Mitokondrilerde opaklaşma ve yoğunluk artışı (yeşil ok ucu), miyelin figürlerinin varlığı (sarı ok ucu), uzamış ve şekilsel olarak belirginleşmiş mitokondriler (mavi ok), Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER) da dilatasyon (yeşil yıldız).



Şekil 4.32. 10 mg/kg BPM uygulanan gruba ait hepatositlerde ultrastrüktürel değişiklikler (x20000). Endoplazmik retikulumda belirgin genişleme ve parçalanma (sarı yıldız), lipid damlacıkları (sarı daire), mitokondrilerde gözlenen değişken boyutlu, bozulmuş krista yapıları (sarı ok ucu), uzamış mitokondriler (yeşil ok ucu), deforme olmuş mitokondriler (mavi ok ucu).

4.3. Biyokimyasal ve Moleküler Analiz Bulguları

4.3.1. Enzim bağı immunosorbent analizi (ELISA) Bulguları

Bu tez çalışmasında, karaciğer hasarının biyokimyasal boyutunu ortaya koymak amacıyla çeşitli inflamatuvar ve apoptozla ilişkili biyobelirteçlerin düzeyleri ELISA yöntemiyle kantitatif olarak belirlenmiştir. Deneysel gruplara ait karaciğer dokularından izole edilen protein örneklerinde, AST (Aspartat aminotransferaz), ALT (Alanin aminotransferaz), TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü-alfa), ve sitokrom C düzeyleri ölçülmüştür. Bu parametreler, karaciğer hücre hasarının, inflamasyonun ve apoptozisin varlığını göstermek amacıyla tercih edilmiştir.

Karaciğer hasarının değerlendirilmesinde en sık kullanılan biyokimyasal belirteçler arasında aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) enzimleri yer almaktadır. Bu enzimler, fizyolojik koşullarda hepatositlerin sitoplazmasında ve mitokondrisinde yer almakta olup, hücre bütünlüğünün bozulması durumunda kana salınırlar. Özellikle ALT, karaciğere özgü bir enzim olarak kabul edilmekte ve hepatoselüler hasarın doğrudan bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Goorden ve ark., 2013; Liu ve ark., 2018)

Elde edilen veriler doğrultusunda kontrol grubunda AST düzeyi ortalama 151,02 U/L, ALT düzeyi ise 188,58 U/L olarak belirlenmiştir. BPM uygulanan gruplarda bu değerlerde dozlara göre hafif dalgalanmalar gözlenmiştir (tablo 4. 1.).

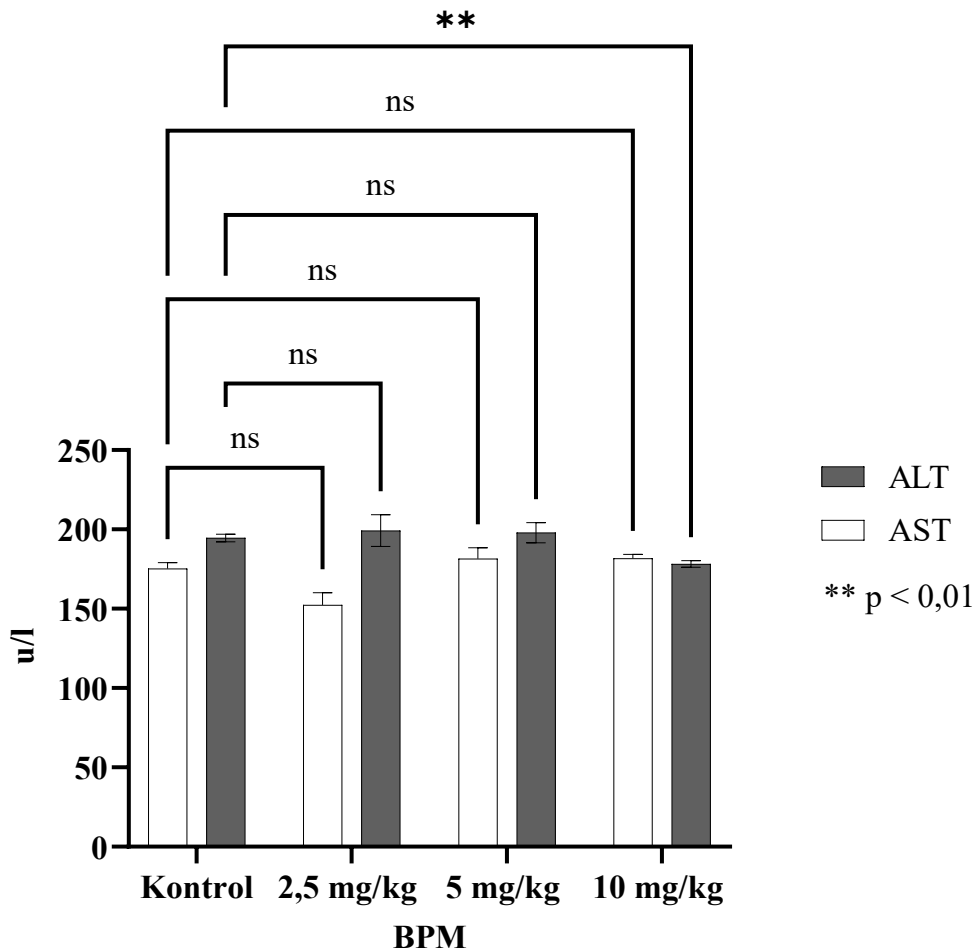
Tablo 4.1. Gruplara Göre AST ve ALT Enzim Düzeylerinin Ortalama Değerleri

	ALT u/l	AST u/l
Kontrol	188,5782	151,0259
2,5 mg/kg BPM	187,9071	130,9425
5 mg/kg BPM	189,0678	149,7835
10 mg/kg BPM	175,4117	156,6702

İstatistiksel analizler sonucunda, ALT ve AST düzeyleri açısından düşük ve orta doz gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (ns; $p > 0,05$). Ancak, 10 mg/kg BPM grubunda kontrol grubuna kıyasla ALT oranında azalma saptanmıştır ($p = 0,0084$; $p < 0,01$) (Şekil 4. 33.).

Hücresel yanıtların değerlendirilmesinde önemli biyobelirteçlerden biri olan sitokin düzeyleri, inflamasyonun varlığını ve şiddetini yansıtan kritik parametrelerdir. Bu tez çalışmada, uygulanan deneysel protokol sonrası oluşan inflamatuvar yanıtın belirlenmesi amacıyla dokuda TNF- α ve IL-6 düzeyleri ELISA yöntemi ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. TNF- α , erken inflamatuvar yanıtın temel düzenleyicilerinden biri olarak; IL-6 ise hem akut faz yanıtı hem de kronik inflamasyon süreçlerinde rol oynayan çok yönlü bir sitokin olarak değerlendirilmiştir (Steensberg ve ark., 2003). Aşağıda, gruplar arasında bu sitokinlerin düzeylerinde gözlenen değişimler sunulmakta ve istatistiksel olarak karşılaştırılmaktadır.

Elde edilen veriler doğrultusunda kontrol grubunda TNF- α düzeyi ortalama 247,3173 pg/ml, IL-6 düzeyi ise 268,3624 pg/ml olarak belirlenmiştir. BPM uygulanan gruplarda bu değerlerde dozlara göre farklılıklar gözlenmiştir (Tablo 4.2.).



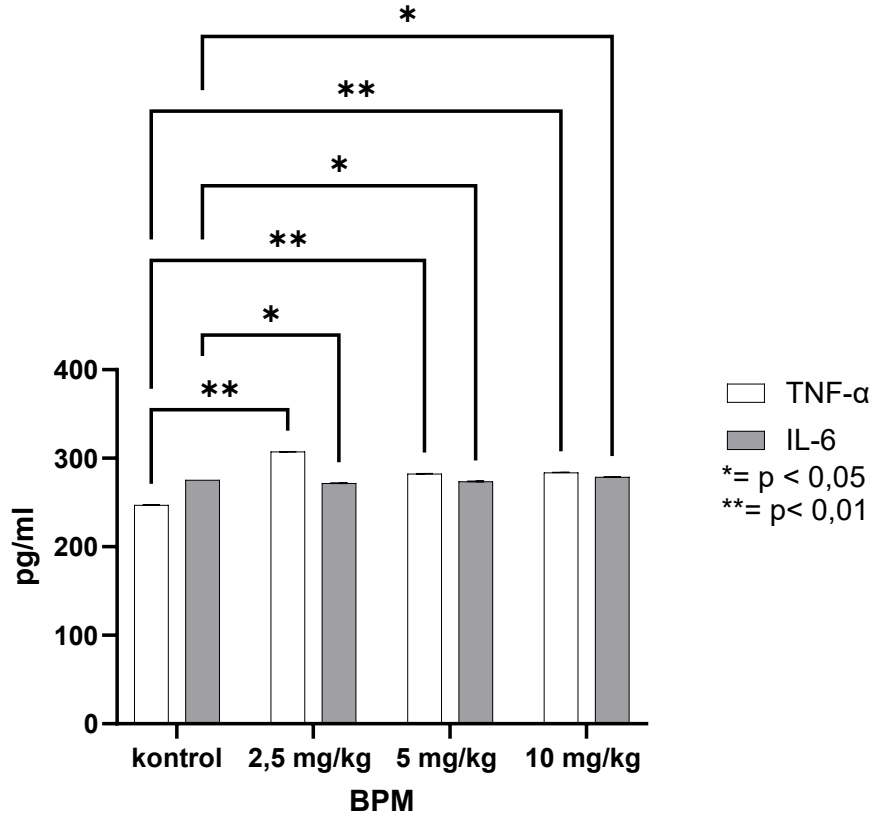
Şekil 4.33. Gruplara Göre AST ve ALT Enzim Düzeylerinin Karşılaştırmalı Analizi.

Tablo 4.2. Gruplara Göre TNF- α ve IL-6 Düzeylerinin Ortalama Değerler

	TNF-α pg/ml	IL-6 pg/ml
Kontrol	247,3173	268,3624
2,5 mg/kg BPM	307,3062	264,5064
5 mg/kg BPM	282,744	266,4344
10 mg/kg BPM	283,9264	271,4286

İstatistiksel analizler neticesinde, TNF- α ve IL-6 düzeyleri bakımından tüm doz grupları arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Bisfenol M (BPM) uygulanan deney gruplarında bu sitokin düzeylerinde doza bağlı dalgalanmalar gözlenmiştir. 2,5 mg/kg BPM uygulanan grupta TNF- α düzeyinde belirgin bir artış saptanmış ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (307,31 pg/ml; $p < 0,01$). Aynı doz grubunda IL-6 düzeyinde ise hafif bir azalma gözlemlenmiş olup, bu değişim de istatistiksel olarak anlamlıdır (264,51 pg/ml; $p < 0,05$). 5 mg/kg BPM uygulanan grupta TNF- α düzeyi 282,74 pg/ml olarak ölçülmüş ve bu artış da anlamlı bulunmuştur ($p < 0,01$). Bu gruptaki IL-6 düzeyi ise 266,43 pg/ml olarak belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir ($p < 0,05$). En yüksek doz olan 10 mg/kg BPM uygulamasında TNF- α düzeyi 283,93 pg/ml'ye yükselmiş ($p < 0,01$), IL-6 düzeyi ise 271,43 pg/ml olarak kaydedilmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4. 34.).

Hücrel stres yanıtını ve mitokondriyal hasarı yansıtan biyokimyasal belirteçlerden biri olan sitokrom c düzeyleri, ELISA yöntemi ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. Sitokrom c, hücre içi mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulması sonucu sitoplazmaya salınan ve apoptoz sürecinde anahtar rol oynayan bir protein olması nedeniyle, BPM uygulamasının hücrel toksisite üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olarak ele alınmıştır (Ow ve ark., 2008). Bulgular, BPM uygulamasının farklı dozlarının sitokrom c salınımı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, doz grupları kontrol grubu ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir.



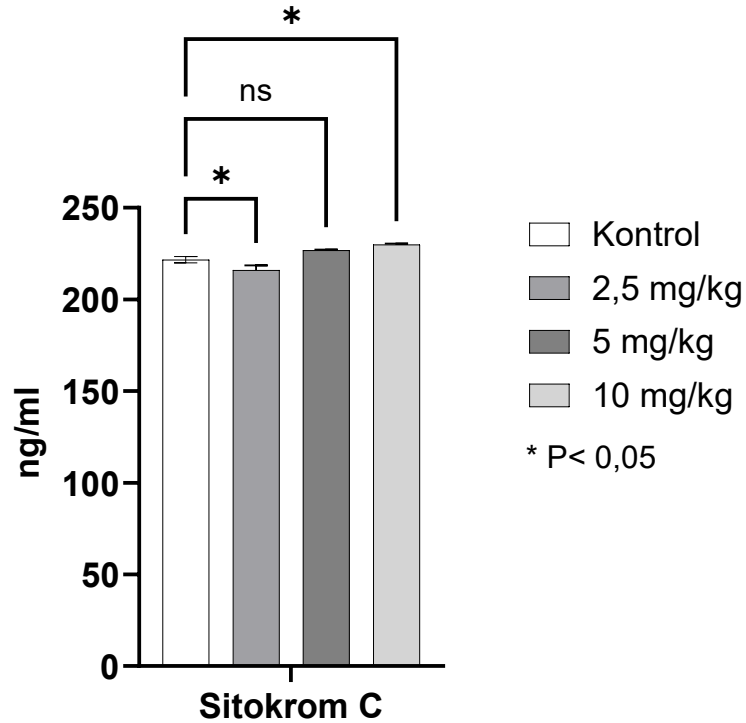
Şekil 4.34. Gruplara Göre TNF-α ve IL-6 Düzeylerinin Karşılaştırmalı Analizi.

Kontrol grubunda sitokrom c düzeyi ortalama 221,70ng/ml olarak belirlenmiştir. BPM uygulanan gruplarda bu düzeylerde hafif değişimler gözlenmiştir. 2,5 mg/kg BPM uygulanan grupta sitokrom c düzeyi 215,99ng/ml olarak ölçülmüş ve kontrol grubuna oldukça yakın bir değer göstermiştir. 5 mg/kg BPM uygulamasında bu düzey 226,79 ng/ml'ye yükselmiş, 10 mg/kg dozunda ise sitokrom c düzeyi en yüksek ortalama olarak 230,01ng/ml değerinde kaydedilmiştir (tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Gruplara Göre Sitokrom c Düzeylerinin Ortalama Değerleri

	Sitokrom- C ng/ml
Kontrol	221,70
2,5 mg/kg BPM	215,99
5 mg/kg BPM	226,79
10 mg/kg BPM	230,01

İstatistiksel analizler neticesinde, Sitokrom C düzeyleri bakımından deney grupları arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Bisfenol M (BPM) uygulanan gruplarda bu biyomarker düzeylerinde doza bağlı değişiklikler gözlenmiştir. 2,5 mg/kg BPM uygulanan grupta Sitokrom C düzeyinde belirgin bir düşüş saptanmış ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Buna karşılık, 10 mg/kg BPM uygulanan grupta Sitokrom C düzeyi artış göstermiş bir değerde ölçülmüştür; bu artış da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Öte yandan, 5 mg/kg BPM uygulanan grupta Sitokrom C düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 4. 35.).



Şekil 4.35. Gruplara Göre Sitokrom C Düzeylerinin Karşılaştırmalı Analizi.

4.3.2. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) analiz bulguları

Hücre ölüm sürecinde önemli rol oynayan apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. p53, Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 genlerine ait mRNA düzeyleri, kantitatif RT-PCR yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, gen ekspresyonunda meydana gelen değişimleri kat değişimi (fold change) (Tablo 4. 4.) cinsinden ortaya koymuş ve kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4. 36.). Bu sayede, uygulanan BPM'nin apoptotik yolağın düzenlenmesine etkisi moleküler düzeyde incelenmiştir.

p53 geninin ekspresyonu, 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg doz uygulamaları sonrasında sırasıyla 5,39 ve 5,83 kat artış göstermiş olup; bu artış 10 mg/kg dozda belirgin şekilde yükselerek 28,57 kata ulaşmıştır. Apoptozda rol oynayan bir diğer gen olan Bax, düşük ve orta doz gruplarında sırasıyla 0,74 ve 0,40 katlık bir azalma gösterirken, yüksek doz grubunda 2,38 kat artış sergilemiştir. Anti-apoptotik özellik gösteren Bcl-2 geninin ekspresyonu, 2,5 mg/kg dozda 23,05 kat, 5 mg/kg dozda 3,67 kat artmış; 10 mg/kg doz uygulamasında ise anlamlı bir şekilde artarak 85,94 katına ulaşmıştır. Apoptotik sürecin anahtar yürütücü enzimlerinden biri olan Kaspaz-3 geninin ekspresyon düzeyleri, sırasıyla 2,5 mg/kg'da 2,56 kat, 5 mg/kg'da 7,61 kat ve 10 mg/kg'da 27,98 kat artış göstermiştir.

Tablo 4.4. p53, Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 Gen Ekspresyonlarının Doza Bağlı Değişimi

	2,5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
p53	5,39	5,83	28,57
bax	0,74	0,4	2,38
bcl-2	23,05	3,67	85,84
kaspaz-3	2,56	7,61	27,98
p53	5,39	5,83	28,57



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğer, vücuttaki detoksifikasyon süreçlerinin merkezinde yer alan önemli bir organdır. Çevresel toksinlere maruz kalındığında, organizmalar üzerindeki sistemik etkilerin ilk gözlemlendiği dokuların başında gelmektedir. Endüstriyel kimyasallar arasında yer alan bisfenoller, yaygın kullanımları nedeniyle son yıllarda toksikolojik araştırmalarda ön plana çıkmıştır. Bisfenol A'nın (BPA) olumsuz etkileri konusunda literatürde geniş bir birikim bulunurken, BPA'nın yerine önerilen alternatif maddelerden biri olan Bisfenol M (BPM) hakkında bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, BPM'nin organizma üzerindeki etkilerinin, özellikle de karaciğer dokusu gibi hedef organlarda oluşturabileceği hücresel ve histopatolojik değişimlerin araştırılması büyük önem taşımaktadır.

13 bisfenol analogunun karaciğer dokusunda lipid birikiminin değerlendirildiği çalışmada, BPE, BPF, BPB, BPAF, BPA, BPC, TMBPA ve BPAP'ın lipid birikimi üzerinde önemli etkiler gösterdiği belirtilmiştir. Yüksek sitotoksosite ve yüksek lipid birikiminin BPAP, TMBPA ve BPC' de gözlemlendiği, BPF ve BPE ise düşük sitotoksositeye ve yine yüksek lipid birikimine neden olduğu belirtilmiştir (Liu ve ark.,2020). Yüksek yağlı diyetlerle beslenen farelerde BPA, BPF ve BPAF maruziyetinin (8 haftalık süre boyunca farelere 0,05 mg/kg- 5 mg/kg) plazmadaki ALT ve AST seviyeleri kontrole kıyasla tüm bisfenol analoglarına maruziyetten sonra arttığı, yükselmiş AST ve ALT aktivitesi karaciğer hasarıyla ilişkilendirildiğinden, bu bulgular Yüksek yağlı diyetlerde BPA, BPF ve BPAF maruziyetinin karaciğer fonksiyonunu bozduğunu göstermiştir (Sun ve ark., 2023). 28 gün boyunca gavaj yoluyla 3 farklı dozda BFAF (0,5 µg/kg/gün, 5 µg/kg/gün, 50 µg/kg/gün) uygulanan erkek Sprague-Dawley sıçanlarda düşük BPAF (%33,3) ve yüksek BPAF gruplarında (%33,3) karaciğer dokusunda hepaositlerin sitoplazmalarında yuvarlak vakuoller gözlemlenmiştir (Zhu ve ark.,2024). BPAF'ya (5000 µg/kg/gün) maruz bırakılan farelerde karaciğerde hepatositlerde şişme ve mikrovakuollerin oluşumu, lipid birikimi gözlemlendiği açıklanmıştır (Guo ve ark., 2025). Bisfenol M maruziyeti sonucunda, fare karaciğerinde hepatosit hücrelerinde belirgin dejenerasyon gözlemlenmiştir.

Hamile Wistar sıçanlar, gebeliklerinin 4. Gününden 21. gününe kadar gavaj yoluyla BPS ve BPA'ya (0,4 ve 4,0 µg/kg vücut ağırlığı) maruz bırakıldığında 90 günlük erkek sıçan yavrularının karaciğer dokusunda azonal köpüklü hepatosit kümeleri, mikroveziküler yamalar şeklinde orta büyüklükte lipid damlacıkları, çekirdeğin merkezde yer aldığı şişkin hepatositler tespit edilmiştir. 90 günlük erkek sıçan yavrularında karaciğer yağ içeriğinin arttığı ve bunun yanında mikroveziküler steatoz tespit edilmiştir (Sharma ve ark., 2021). Erkek İsviçre fareleri 10 hafta boyunca içme suyu yolu ile 100 µg/kg/gün BPS'ye maruz kaldığında hepatik steatoz gözleendiği, mitokondriyal işlev ve oksidatif stres parametrelerinin bozulduğu gösterilmiştir (Mornagui ve ark., 2022). Hamile farelerin doğum öncesi BPS maruziyeti (50 µg/kg/gün) erkek yavru farelerde hepatik lipid birikimine neden olmuştur (Zhang ve ark., 2023). Farelerin uzun süreli (154 gün) BPS'ye maruz kalması sonucunda karaciğer dokusunda hepatositlerde ciddi lipid birikiminin meydana geldiğini, obeziteye ve hepatik lipid birikimine yol açtığını gözlenmiştir (Chi ve ark., 2024). Erkek SD sıçanlarında düşük doz (10 mg/kg vücut ağırlığı/gün) ve yüksek doz (50 mg/kg vücut /gün) BPS maruziyetinin (32 gün) karaciğerde lipid damlacıklarının alanlarının önemli ölçüde arttığını, portal alanları etrafında az miktarda kolajen lif kalınlaşması olduğunu, yağlı dejenerasyon ve karaciğer lezyonlarının oluşumunun meydana geldiği ve ayarica ALT düzeyleri yükselmiş olduğu belirtilmiştir. (Li ve ark., 2024). BPS maruziyetinin (25 µg/kg) yüksek yağlı bir diyetle beslenen erkek farelerde karaciğerde hepatik mitokondriyal dinamiklerde değişikliklere, ER stresine ve bozulmuş hepatik morfolojiye, vücut kütlelerinde artışa yol açtı ve lipid ve glikoz metabolizmasında bozulmaya yol açmıştır (Barreto-Reis ve ark., 2024). Yapılan bu çalışmada ise Bisfenol M maruziyetine bağlı olarak karaciğer dokusunda yapısal bütünlüğü bozulmuş hepatositler ile bunların çevresinde yer alan komşu hücrelerde dejeneratif değişiklikler saptanmıştır. Ve doz artışına bağlı olarak fibrotik alanlarda artış izlenmiştir.

Sattar ve ark. (2024) yaptıkları çalışmada, 28 gün boyunca Wistar dişi sıçanların gavaj yoluyla Bisfenol P (5 mg (BPP5), 50 mg (BPP50) ve 100 mg (BPP100)/kg) maruziyeti sonucunda en yüksek doz uygulamasında karaciğerde çekirdek yapısının bozulması, hepatositlerin aşırı nekrozu, çekirdek büzülmesi ve hücre yapısı bozulmuş hücrelerin piknozu gözlenmiştir. BPP 50 doz gruplarında karaciğerde hücresel konjesyon, hafif nekroz, hepatosit dejenerasyon gözlenirken, BPP 5 doz gruplarında kontrole kıyasla

karaciğer dokusunda hafif hücresel konjesyon meydana gelmiştir. 30 gün boyunca mısır yağında Floren-9-bisfenol (BHPF)(0,5 ve 50 mg/kg) maruziyeti dışı Balb/c farelerin karaciğerlerinde hepatosit şişmesi ve sitoplazmik vakuolleşme dahil olmak üzere belirgin değişiklikler belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2024). Bu çalışmalarda elde edilen bulgular bizim çalışmamızda gözlenen bulgularla benzerdir.

BPA' nın LD50'sinin 1/ 50 'sine maruz kalan farelerde karaciğer dokusunda sentral vende tıkanıklık ve dilatasyon, portal ve hepatik sinüzoidlerde hepatositler arasında yaygın kupfer hücreleri gözlenirken, 1/40'ına maruz kalan fare karaciğer dokusunda dejenere hepatositler arasında yaygın kupfer hücreleri, sinüzoidlerde dilatasyon, karaciğerin trabeküler yapısında bulanıklaşma, sitoplazma köpüklü görünümde vakuollerle dolu bir yapıda izlenmiştir. BPA'nın 1/30'una maruziyette karaciğer dokusunda portal ve sentral vende dilatasyon, dilate sinüzoidler arasında hepatositler arasında yaygın kupfer hücreleri gözlenirken, 1/20'sine maruziyette mononükleer hücrelerde infiltrasyon, dejenere hepatositler arasında büzülmüş çekirdek yapısında yaygın kupfer hücreleri tanımlanmıştır (Hussein ve Eid, 2013). Oral yoldan (50 mg/kg) BPA'ya maruz kalan sıçanların karaciğer dokusunda hepatositlerde vakuolar dejenerasyon, hepatik Sinüzoidlerde tıkanıklık, sentral vende genişleme, Masson trikrom boyamada ise portal kanal bölgesindeki damarların çevresinde kollejen miktarında artış, düzensiz hepatositlerin yapısında düzensiz çekirdek yapısı, sitoplazmasında vakuolizasyon ve glikojen taneleri ve mitokondrilerin hasarlı yapısı belirlenmiştir (Mohamed ve Bastwrous, 2021). Bizim çalışmamızda da benzer bulgular tanımlanmıştır. 6 hafta boyunca (haftada iki kez) intraperitoneal olarak BPA (50 µg/kg)'ya maruz kalan İsviçre albino farelerin karaciğer dokusunda karaciğer hasarı belirteçleri olan ALT, ALP ve GGT önemli artış, apoptotik indeksler de dahil olmak üzere karaciğer histopatolojik değişiklikler belirlenmiştir (Al-Griw ve ark., 2023). 30 gün boyunca oral yoldan 50 mg/kg BPA uygulanan Wistar erkek sıçanlarda karaciğer dokusunda periportal inflamasyon ve LDH, ALP ve AST seviyelerinde artış, eritrosit birikimi, mikroveziküler steatoz ve inflamasyona neden olduğunu belirtilmiştir (Mahdavinia ve ark., 2021). Bisfenol M maruziyeti sonucunda fare karaciğer dokusunda nekroz ve inflamasyon tanımlanan benzer bulgulardır. 2 hafta boyunca BPA'ya (3, 4 mg/kg/gün / oral yolla) maruz kalan albino farelerin karaciğer dokusunda belirgin hepatoselüler dejenerasyon, artmış sitoplazmik granülarite, hücre şişmesi, değişken çekirdekli soluk hücre sitoplazması ile karakterize olan

hepatoselüler hidropik dejenerasyon, sitoplazmik eozinofilik değişiklikler, karyopiknoz, karyoliz ve hepatositlerin nükleer kromatinlerinin tam çözünmesi, sitoplazmik membran parçalanması olarak yorumlanan hepatoselüler koagülatif nekroz belirlenmiştir (Al-Griw ve ark., 2022). 30 gün boyunca BPA (100 mg/kg) maruz kalan Wistar albino sıçanlarda hepatositlerde dejenerasyon, nekroz, Kufper aktivasyonu, safra yolu hiperplazisi, konjesyon belirlenmiştir (Ateş ve ark., 2022). Yetişkin erkek albino sıçanlara 8 hafta boyunca oral yoldan BPA (50 mg/kg vücut ağırlığı) maruziyetine bağlı olarak karaciğerde hepatik mimarinin kaybı, vasküler dilatasyon, konjesyon ve eksüdasyon ile hücresel vakuolleşme, yağ birikimi, piknotik çekirdekler, portal triadda inflamatuvar infiltrasyon, lokalize metaplazi ve aşırı kollajen birikimi gözlenmiştir. Ek olarak, hepatositlerin sitoplazmasının seyrekleşmesi, vakuolleşmesi ile koyu boyalı çekirdeklere sahip yaygın olarak dağılmış hücreler, hücre zarlarıyla çevrili geniş yağ dolu boşluklar olarak görünen yağlı birikim ve hepatositlerin balonlaşması olan alanları tespit edilmiştir (Amin ve ark., 2023). Erkek CD-1 farelere 24 hafta boyunca günlük 50 µg/kg BPA uygulanması sonucunda karaciğerde küçük vakuollü anormal morfolojili hepatositlerin düzensiz yerleşimi gözlenmiştir (Hong ve ark., 2023). Karabekir ve ark. (2024)'nın yaptıkları çalışmada, 250 mg/kg BPA'ya (oral yolla) maruz kalan sıçanlarda karaciğerde sinüzoid dilatasyon, konjesyon, piknotik çekirdek, mononükleer hücre infiltrasyon, portal alan ve çevresinde fibrosiz gözlenirken, caspaz 3 artış belirlenmiştir. Aydın ve ark. (2024) yaptıkları çalışmada, günlük 50 mg/kg/gün BPA oral yolla uygulanan sıçanların karaciğer parankim dokusunda düzensiz sınırlı alanlar, inflamasyon alanları inflamatuvar hücreler, apoptotik hücreler, iltihaplı bölgelere dağılmış, pembe sitoplazmalı, çeşitli şekillerde, büzülmüş çekirdekli ölü hücreler, bu bölgelerde sitoplazması pembe boyalı çok sayıda eozinofil belirlenmiştir. Ayrıca AST düzeyinde artma saptanmıştır. Erkek CD-1 farelere 6 hafta boyunca günde 50 µg/kg vücut ağırlığında BPA'a muamelesi sonucunda karaciğerde histopatolojik olarak hepatositlerin büyüdüğünü, portal alanın inflamatuvar hücrelerle yoğun bir şekilde arttığı ve hepatik kordonun düzensiz olduğunu ortaya konulmuştur (Zhou ve ark., 2024). 30 gün boyunca 50 µg/kg Bisfenol A'ya maruz kalan erkek albino Wistar sıçanların karaciğer dokusunda hafif sinüzoidal konjesyonu, oksidatif stresi, lipid anormalliklerini ve inflamatuvar faktör (TNF-α ve IL-6) ekspresyonunu artırdığını göstermiştir (Nagarajan ve ark., 2024). 6 haftalık ferelere BPA (oral yoldan 5 mg/kg) uygulanmasından sonra, hepatositler arasında büyük lipid

vakuolleri ortaya çıkarken, karaciğer kordonun kaybolduğu BPA'nın neden olduğu ciddi karaciğer hasar vurgulanmıştır (Tian ve ark., 2024). Bu çalışmalarda olduğu gibi BPM maruziyetinin fare karaciğer dokusunda ileri düzeyde hücresel hasar ile apoptoz gibi süreçleri başlattığı belirlenmiştir. Bu bulguları takiben hepatosit bütünlüğünün ciddi şekilde etkilenmesiyle dokusal bütünlüğün bozulduğu çalışmamızda tanımlanmıştır.

Zhu ve ark. (2024a), sıçanların doğum öncesi 100 mg/kg/gün Bisfenol AF (BPAF) maruziyeti sonrasında merkezi hepatik venin endotel hücrelerinde deformasyon, ödem ve hepatositlerde vakuol oluşumu gözlemlendiğini bildirmiştir. Elijah ve ark. (2024), 28 gün boyunca 65 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarında BPA'ya maruz bırakılan sıçanlarda karaciğer dokusunda vakuolizasyon, lipid birikimi ve karaciğer dejenerasyonu tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Aja ve ark. (2024), 42 gün süresince 100 mg/kg BPA maruziyeti ile sıçanların karaciğer dokusunda şiddetli intrahepatik inflamasyon ve dejenerasyonun yanı sıra hücresel infiltrasyon, büyük sitoplazmik vakuoller, hepatik sinüzoidlerde genişleme ve Kupffer hücrelerinde artış gibi morfolojik değişikliklerin saptandığını aktarmışlardır.

BPA uygulamasının 21 gün boyunca 250 mg/kg dozunda gerçekleştirilmesi sonucunda sıçan karaciğerinde sinüzoidlerde genişleme, inflamasyon, balonlaşma ve mikro ile makro-veziküler steatoz olduğu, bu durumun karaciğer patolojisinde ciddi artışa yol açtığı belirtilmiştir (Alotaibi ve ark., 2024). Tang ve arkadaşları (2024), erkek sıçanlara 30 gün boyunca 0,5, 5 ve 50 mg/kg dozlarında BPA uygulayarak karaciğer üzerindeki toksik etkileri değerlendirmiştir. Çalışmada, düşük doz BPA maruziyetinde dahi orta düzeyde periportal büyüme ve hepatosit ölümü gözlenmiş, doz arttıkça lokalize nekroz, hücresel vakuolizasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, hidropik dejenerasyon ve apoptoz gibi ciddi histopatolojik değişiklikler belirginleşmiştir. Ayrıca hepatosit çekirdeklerinde piknozis, artmış mitokondri sayısı, düzensiz ve şişmiş endoplazmik retikulum gibi ultrastrüktürel bozukluklar saptanmıştır. Benzer bulgularla bizim çalışmamızda karşılaşılmıştır. Çalışmada ayrıca proinflamatuvar sitokin düzeyleri değerlendirilmiş; IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nın serum ve karaciğer dokusu düzeylerinde farklılaşmalar gözlemlenmiştir. Bu sitokinlerden sadece TNF- α düzeyi, 5 mg/kg BPA ile tedavi edilen grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermiştir. kaspaz-3 proteini ise tüm BPA dozlarında karaciğer sitoplazmasında belirgin şekilde artmıştır.

Hassan ve ark. (2024), 30 günlük 50 mg/kg BPA uygulamasında sıçan karaciğer dokusunda orta düzeyde vakuolar dejenerasyona uğramış hepatosit hücreleri ve santral damarda konjesyon oluştuğunu bildirmiştir. Wang ve ark. (2024), 300 mg/kg BPA maruziyetinde hepatositler arası alanda açılma, artmış vakuoler dejenerasyon ve erkek bireylerin karaciğer dokusunda genişlemiş konjesyon saptandığını belirtmişlerdir. Linillos-Pradillo ve ark. (2023), emziren annelere düşük doz BPA uygulamasının karaciğerde toksisiteye neden olduğunu; dişi PND6 yavrularında ise inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve hepatosit agregasyonuna yol açtığını aktarmışlardır.

Ghafoor ve ark. (2022), 15 gün boyunca 40, 200 ve 400 mg/kg/gün BPS'ye maruz bırakılan erkek Wistar albino sıçanlarda karaciğer dokusunda hafif ve orta düzeyde santral ven ve hepatik hücre konjesyonu gibi hepatohistopatolojik bulgulara ulaşmışlardır. Morsi ve ark. (2023), Wistar albino sıçanlara uygulanan 4.5 µg/L ve 8 µg/L BPA dozları ile düşük dozda apoptotik hepatositlerin tanımlandığını, yüksek dozda ise vakuoler değişikliklerle birlikte hepatik düzensizliklerin belirlendiğini ifade etmişlerdir. Ojo ve ark. (2023), 21 gün süresince 10 mg/kg BPA maruziyetinin karaciğerde nükleer sitoplazmada hafif piknoz ve fibrozise neden olduğunu bildirmiştir.

Elbakry ve ark. (2022), 100 mg/kg dozda ve 5 hafta süresince BPA maruziyetinin sıçan karaciğer dokusunda hepatositlerde hücre içi yağ damlacıkları, balonlaşan dejenerasyon, Kupffer hücrelerinde hiperplazi, koagülatif nekroz, hepatik kordonlarda düzensizlik ve daralma gibi patolojik değişimlere neden olduğunu belirtmişlerdir. Tian ve ark. (2022), 6 hafta boyunca günlük 5000 µg/kg BPA maruziyeti sonucunda farelerin karaciğer dokusunda vakuoler dejenerasyon, nekroz ve konjesyon gibi histopatolojik hasarların meydana geldiğini raporlamışlardır. Bu bulgular bizim bulgularımızla uyumludur.

Nawaz ve ark. (2021), 28 gün boyunca 300–600 mg/kg/gün BPA uygulamasında fare karaciğerinde belirgin dokusal hasar, kan damarlarında tıkanıklık, hepatositlerde vakuolizasyon, inflamatuvar hücre yapıları ve safra kanalında infiltrasyon gibi patolojik bulgular tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Reis ve ark. (2024), 12 hafta boyunca 25 µg/kg BPS maruziyeti sonrasında C57BL/6 erkek farelerin karaciğerinde makro ve mikro steatotik damlacıklar ile retiküler lif kaybına bağlı yapısal bozulma saptamışlardır.

Pennanen (2024), farelere uygulanan 5 µg/kg, 50 µg/kg ve 500 µg/kg BPA dozlarında Oil red boyaması sonucunda hücrelerde mikrosteatoz gözlenmiş; özellikle 50 µg/kg dozunda karaciğer yağlanmasında belirgin artış rapor edilmiştir. Fan ve ark. (2024), C57BL/6 erkek farelerde 0, 100 ve 1000 µg/kg dozlarda Bisfenol F maruziyeti ile yapılan H&E boyamalarında orta ve yüksek dozlarda hepatosit steatozu izlendiğini ancak lipid damlacıkları açısından anlamlı bir farklılık oluşmadığını aktarmışlardır.

Hong ve ark. (2022), 24 hafta boyunca 0,5 mg/kg BPA uygulanan CD-1 farelerde steatoz, düzensiz karaciğer plakaları ve Oil red boyamasında lipid damlacıklarında belirgin artış gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Hong ve ark. (2023a), 24 hafta boyunca 0,5 mg/kg BPA maruziyeti sonrasında CD-1 farelerin karaciğer dokusunda hepatosit şişmesi, karaciğer plakalarında düzensizlik ve lipid birikimi belirlediklerini belirtmişlerdir. Zhang ve ark. (2023a), 30 gün boyunca 0,05, 0,2 ve 0,5 mg/kg BPF uygulanan C57BL/6 J farelerde serum ALT ve AST düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiş; histopatolojik olarak ise karaciğer dokusunda balonlaşma dejenerasyonu ve belirgin lipid birikimi tespit edilmiştir. Bu yapısal bozulmalara mitokondriyal düzeyde dikkat çekici değişiklikler eşlik etmiş; özellikle Drp1 aracılı aşırı mitokondriyal fizyon, mitokondriyal bütünlüğün bozulmasına, kristallerin parçalanmasına ve mitokondriyal kopmaya neden olmuştur. Bu anormal mitokondriyal dinamikler, karaciğer hücrelerinde artmış lipid damlacığı birikimiyle paralel ilerlemiş ve BPF'nin lipid metabolizması üzerindeki bozucu etkisinin temel mekanizması olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile paralel bulgular elde edilmiştir.

Moon ve arkadaşları (2012), beş gün süreyle 0,05 mg/kg ve 1,2 mg/kg dozlarında BPA uygulanan C57BL/6 erkek farelerde, özellikle 1,2 mg/kg doz grubunda hepatik mitokondrilerde belirgin şişme gözlemlenmiş ve bu değişiklik transmisyon elektron mikroskobu ile doğrulanmıştır. Tek doz 1,2 mg/kg BPA enjeksiyonunu takiben 24 saat içinde serum AST ve ALT seviyelerinde anlamlı bir artış saptanmıştır. Ayrıca, BPA'nın oksidatif stres yanıtı ve inflamasyonu tetikleyebileceği düşüncesiyle ölçülen inflamatuvar sitokinlerden IL-6'nın hepatik ekspresyonu, BPA enjeksiyonundan sonra 1. ve 6. saatlerde artış göstermiştir; bu durum IL-6'nın BPA'ya bağlı karaciğer hasarında patojenik bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. TNF-α ekspresyonunda ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Wang ve ark. (2021), 30 gün boyunca 50 µg/kg BPF uygulanan erkek C57BL/6 farelerin karaciğerinde interstisyel yapılarda ve boşluklarda anormal görünümle ile

hepatositlerde lipid damlacığı birikimi tanımlamışlardır. Long ve ark. (2021), gebe C57BL/6J farelere uygulanan 1–1000 µg/kg/gün BPA dozlarının doğan erkek yavruların karaciğer dokusunda hücre içi lipid oranı ve glikojen içeriğinde belirgin artışa neden olduğunu belirtmişlerdir.

Feng ve ark. (2020), CD-1 farelere 24 hafta süresince 50 µg BPA verilmesiyle karaciğer hücrelerinde küçük vakuollü, düzensiz morfolojide hepatik hücrelerin görüldüğünü ve Oil red boyası ile lipid birikiminde artışın saptandığını bildirmişlerdir. Figueiredo ve ark. (2020), yumurtalıkları alınmış dişi farelerde 3 ay boyunca 70 µg/kg BPA maruziyeti sonucunda karaciğerde yağlanma, hepatosit morfolojisinde bozulma, balonlaşma, çekirdek yer değişimi ve kollajen artışıyla tanımlanan hepatik steatoz ilerlemesi olduğunu açıklamışlardır.

Zaulet ve ark. (2017), erkek CD-1 farelere uygulanan 200 mg/kg BPA'nın sentrilobüler hepatositlerde nekrotik değişiklikler, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve IL-6 ile TNF-α immünopozitif parankimal hücre sayısında artışa neden olduğunu; ince yapı analizinde düzensiz çekirdeğe sahip hepatositler, azalmış mitokondri sayısı, hasarlı granüllü endoplazmik retikulum, azalmış glikojen içeriği ve genişlemiş safra kanalları gözlemlendiğini açıklamışlardır. Pirozzi ve ark. (2020), yüksek yağlı diyetle beslenen erkek C57BL/6J farelerde 50 µg/kg BPA'nın steatotik bulguların ilerlemesine, balonlaşma dejenerasyonu, inflamasyon ve nekroz gelişimine sebebiyet verdiğini rapor etmişlerdir.

Yaptığımız bu çalışma, endüstride yaygın olarak kullanılan ve Bisfenol A'nın alternatiflerinden biri olarak sunulan Bisfenol M'nin, karaciğer dokusunda ciddi düzeyde hepatoselüler hasara yol açabileceğini ortaya koymuştur. Işık ve elektron mikroskobu ile yapılan histopatolojik incelemelerde doku bütünlüğünde belirgin bozulmalar gözlenmiş, biyokimyasal ve moleküler analizler bu hasarı destekler nitelikte sonuçlar vermiştir. Bu bulgular, BPM'nin güvenli bir alternatif olmayabileceğini ve maruziyetin organizma sağlığı üzerinde potansiyel olarak zararlı etkiler doğurabileceğini göstermektedir. Çevresel ve halk sağlığı açısından, BPM gibi yeni nesil bisfenollerin toksisite profillerinin detaylı bir şekilde araştırılması gerekliliği açıktır. Bu doğrultuda, çalışmamız BPM'nin karaciğer üzerindeki olumsuz etkilerine dair literatüre önemli katkılar sunmakta ve bu kimyasalın kontrollü kullanımı konusunda dikkatli olunması gerektiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Aja, P. M., Chukwu, C. A., Ugwu, O. P.-C., Ale, B. A., Agu, P. C., Deusdedi, T., C. Chukwu, D., Ani, O. G., Ekpono, E. U., Ogwoni, H. A., Awoke, J. N., Ogbu, P. N., Aja, L., Ugochukwu Ukachi, O., Uche Orji, O., Peter Nweke, C., Egwu, C., Ugbala Ekpono, E., Onyinyechi Ewa, G., ... Daniel Eze, E. (2023). cucumeropsis mannii seed oil protects against bisphenol A-induced hepatotoxicity by mitigating inflammation and oxidative stress in rats. *RPS Pharmacy and Pharmacology Reports*, 3(1). <https://doi.org/10.1093/rpsppr/rqad033>
- Al-Griw, M. A., Alshibani, Z. O., Alghazeer, R., Elhensheri, M., Tabagh, R. M., Eskandrani, A. A., ... & Shamlan, G. (2022). Histone deacetylase 2 inhibitor valproic acid attenuates bisphenol A-induced liver pathology in male mice. *Scientific Reports*, 12(1), 10258. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12937-4>
- Al-Griw, M. A., Zaed, S. M., Hdud, I. M., & Shaibi, T. (2023). Vitamin D ameliorates liver pathology in mice caused by exposure to endocrine disruptor bisphenol A. *Open Veterinary Journal*, 13(1), 90-98. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2023.v13.i1.9>
- Alotaibi, K. S., Elobeid, M., Virk, P., Awad, M. A., Al-Qahtani, M. A., & Elnagar, D. M. (2024). Plausible effect of hesperetin and nano-hesperetin against bisphenol-A induced hepatotoxicity in a rat model. *Arabian Journal of Chemistry*, 17(2), 105563. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105563>
- Amin, M. A. S., Sonpol, H. M., Gouda, R. H. E., & Aboregela, A. M. (2023). Bisphenol A enhances apoptosis, fibrosis, and biochemical fluctuations in the liver of adult male rats with possible regression after recovery. *The Anatomical Record*, 306(1), 213-225. <https://doi.org/10.1002/ar.25032>
- Amraje, F. F. M. (2020). Deneysel Nonalkolik Steatohepatit Modelinde Kolsişinin Karaciğer Üzerine Etkisinin İncelenmesi [Doktora Tezi] Gazi Üniversitesi
- Andújar, N., Gálvez-Ontiveros, Y., Zafra-Gómez, A., Rodrigo, L., Álvarez-Cubero, M. J., Aguilera, M., ... & Rivas, A. (2019). Bisphenol A analogues in food and their hormonal and obesogenic effects: a review. *Nutrients*, 11(9), 2136. <https://doi.org/10.3390/nu11092136>
- Ateş, M. B., & Hatipoğlu, D. (2022). Effect of nigella sativa oil on bisphenol a-induced hepatotoxicity in wistar albino rats: histopathological and biochemical investigation. *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*, 6(3), 402-409. <https://doi.org/10.31015/jaefs.2022.3.9>
- Ayazgök, B., & Küçükkilinç, T. T. (2017). Düşük Doz Bisfenol A'nın Büyük Etkileri. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(2), 139.
- Aydın, M., Köse, E., Karaca, E. T., Tanbek, K., & Sandal, S. (2024). Investigation of the protective effect of Lavandula stoechas against the damage caused by Bisphenol A in the liver tissue of rats. *Heliyon*, 10(20). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39386>

- Barreto-Reis, E., Sepúlveda-Fragoso, V., Diniz, L. G., Soares, D. S., Carvalho-Laureano, T. D. S., Alves, A. D. P., Magliano, D. A. (2024). Chronic Exposure to Bisphenol S Impairs Hepatic Mitochondrial Dynamics, Induces Endoplasmic Reticulum Stress, and Worsens Metabolism in Diet-Induced Obesity Male Mice. *Chronic Exposure to Bisphenol S Impairs Hepatic Mitochondrial Dynamics, Induces Endoplasmic Reticulum Stress, and Worsens Metabolism in Diet-Induced Obesity Male Mice*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.126780>
- Basit, H., Tan, M. L., & Webster, D. R. (2018). *Histology, Kupffer Cell*.
- Butura, A. (2008). Drug and alcohol induced hepatotoxicity. Karolinska Institutet (Sweden).
- Casals-Casas, C., & Desvergne, B. (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology*, 73(1), 135-162. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142200>
- Changizi Z, Moslehi A, Rohani AH, Eidi A. Chlorogenic acid induces 4T1 breast cancer tumor's apoptosis via p53, Bax, Bcl-2, and caspase-3 signaling pathways in BALB/c mice. *J Biochem Mol Toxicol*. 2021 Feb;35(2):e22642. doi: 10.1002/jbt.22642. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33058431. <https://doi.org/10.1002/jbt.22642>
- Chen, H., Liu, Y., Huang, Y., Zhang, P., Du, D., Yu, W., ... & Xiang, H. (2024). Bisphenol M inhibits mouse oocyte maturation in vitro by disrupting cytoskeleton architecture and cell cycle processes. *Reproductive Toxicology*, 129, 108667. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2024.108667>
- Chi, Y., Zhu, L., Wang, Y., Peng, C., Lin, Y., Ji, S., & Wei, J. (2024). Long-term Bisphenol S exposure induced gut microbiota dysbiosis, obesity, hepatic lipid accumulation, intestinal lesions and dyslipidemia in mice. *Toxicology*, 504, 153798. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2024.153798>
- Dalamaga, M., Kounatidis, D., Tsilingiris, D., Vallianou, N. G., Karampela, I., Psallida, S., & Papavassiliou, A. G. (2024). The role of endocrine disruptors bisphenols and phthalates in obesity: current evidence, perspectives and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 675. <https://doi.org/10.3390/ijms25010675>
- Demir, C. (2023). Fare Karaciğer Fibroz Modelinde Trpc İyon Kanal Aile İfadelerinin Ve TRPC6 İnhibisyonunun Tedavi Etkinliğinin Araştırılması [Doktora Tezi]. Fırat Üniversitesi
- Dilek, O. N. (2003). Karaciğer: I. Cilt. Afyon Kocatepe Üniversitesi
- Dre-C10655930. CAS 13595-25-0 | LGC Standards. (n.d.). (2025) <https://www.lgcstandards.com/DE/en/Bisphenol-M/p/DRE-C10655930>
- Elbakry, M. M., Mansour, S. Z., Helal, H., & Ahmed, E. S. (2022). Nattokinase attenuates bisphenol A or gamma irradiation-mediated hepatic and neural toxicity by activation of Nrf2 and suppression of inflammatory mediators in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(49), 75086-75100. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21126-9>

- Elijah, S. O., Auza, M. I., Abraham, A., & Ayara, C. O. (2024). Curcumin Attenuates Cytotoxic Effect of Bisphenol A in the Liver of Adult Wister Rats. *Biological Sciences*, 4(2), 650-656. <https://doi.org/10.55006/biolsciences.2024.4210>
- Ezhilarasan, D. (2022). Hepatic stellate cells in the injured liver: Perspectives beyond hepatic fibrosis. *Journal of Cellular Physiology*, 237(1), 436-449 <https://doi.org/10.1002/jcp.30582>
- Fan, Y., Li, S., Yang, X., Bai, S., Tang, M., Zhang, X., ... & Qin, Y. (2024). Multi-omics approach characterizes the role of Bisphenol F in disrupting hepatic lipid metabolism. *Environment International*, 187, 108690. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108690>
- Fasbender, F., Widera, A., Hengstler, J. G., & Watzl, C. (2016). Natural killer cells and liver fibrosis. *Frontiers in immunology*, 7, 19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00019>
- Fawzy, E. I., El Makawy, A. I., El-Bamby, M. M., & Elhamalawy, H. O. (2018). Improved effect of pumpkin seed oil against the bisphenol-A adverse effects in male mice. *Toxicology reports*, 5, 857-863. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.08.014>
- Feng, D., Zhang, H., Jiang, X., Zou, J., Li, Q., Mai, H., ... & Feng, X. (2020). Bisphenol A exposure induces gut microbiota dysbiosis and consequent activation of gut-liver axis leading to hepatic steatosis in CD-1 mice. *Environmental Pollution*, 265, 114880. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114880>
- Figueiredo, L. S., Oliveira, K. M., Freitas, I. N., Silva Jr, J. A., Silva, J. N., Favero-Santos, B. C., ... & Ribeiro, R. A. (2020). Bisphenol-A exposure worsens hepatic steatosis in ovariectomized mice fed on a high-fat diet: Role of endoplasmic reticulum stress and fibrogenic pathways. *Life sciences*, 256, 118012. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118012>
- Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*, 88(1), 125-172. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>
- Gao, H., Yang, B. J., Li, N., Feng, L. M., Shi, X. Y., Zhao, W. H., & Liu, S. J. (2015). Bisphenol A and hormone-associated cancers: current progress and perspectives. *Medicine*, 94(1), e211. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000211>
- Gassman, N. R. (2017). Induction of oxidative stress by bisphenol A and its pleiotropic effects. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(2), 60-71. <https://doi.org/10.1002/em.22072>
- Ghafoor, S., Abbasi, M. H., Khawar, M. B., Tayyeb, A., Saleem, T., Ashfaq, I., & Sheikh, N. (2022). Bisphenol S induced dysregulations in liver; iron regulatory genes and inflammatory mediators in male Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(55), 83711-83722. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21672-2>
- Ghassabian, A., Vandenberg, L., Kannan, K., & Trasande, L. (2022). Endocrine-disrupting chemicals and child health. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 62(1), 573-594. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-021921-093352>

- Ghatei, N., Nabavi, A. S., Toosi, M. H. B., Azimian, H., Homayoun, M., Targhi, R. G., & Haghir, H. (2017). Evaluation of bax, bcl-2, p21 and p53 genes expression variations on cerebellum of BALB/c mice before and after birth under mobile phone radiation exposure. *Iranian journal of basic medical sciences*, 20(9), 1037–1043. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.9273>
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 392-404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
- Gonsioroski, A., Mourikes, V. E., & Flaws, J. A. (2020). Endocrine disruptors in water and their effects on the reproductive system. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 1929. <https://doi.org/10.3390/ijms21061929>
- Goorden, SM, Buffart, TE, Bakker, A. ve Buijs, MM (2013). Liver disorders in adults: ALT and AST. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* , 157 (43), A6443-A6443.
- Gracia-Sancho, J., Caparrós, E., Fernández-Iglesias, A., & Francés, R. (2021). Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 18(6), 411-431. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00411-3>
- Guo, C., Lv, L., Chen, X., Wang, H., Song, S., Li, Y., & Qin, Z. (2025). Low-dose bisphenol AF exerts slight effects on glycolipid metabolism but causes metabolic disorders under the stress of Western diet in mice. *Environmental Pollution*, 125861. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.125861>
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2017). *Guyton ve Hall tıbbi fizyoloji*. 13. Baskıdan çeviri Güneş Tıp Kitabevleri.
- Hassan, A. A., Abdelgayed, S. S., & Mansour, S. Z. (2024). Liver and ovarian toxicities boosted by bisphenol and gamma radiation in female albino rats. *Human & Experimental Toxicology*, 43, 09603271231219264. <https://doi.org/10.1177/09603271231219>
- Hassan, S., Thacharodi, A., Priya, A., Meenatchi, R., Hegde, T. A., Thangamani, R., ... & Pugazhendhi, A. (2024). Endocrine disruptors: Unravelling the link between chemical exposure and Women's reproductive health. *Environmental research*, 241, 117385. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117385>
- Helal EGE, Badawi MM, Soliman MG, AbdelKawi NA, Fadel HAE, Abozaid NMG (2013). Physiological and histological studies on bisphenol A compound as xenoestrogen in male albino rats. *Egyp J Hospit Med*,50: 127-136. <https://doi.org/10.21608/ejhm.2018.16081>
- Hong, T., Jiang, X., Zou, J., Yang, J., Zhang, H., Mai, H., ... & Feng, D. (2022). Hepatoprotective effect of curcumin against bisphenol A-induced hepatic steatosis via modulating gut microbiota dysbiosis and related gut-liver axis activation in CD-1 mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 109, 109103. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109103>

- Hong, T., Zou, J., He, Y., Zhang, H., Liu, H., Mai, H., ... & Feng, D. (2023a). Bisphenol A induced hepatic steatosis by disturbing bile acid metabolism and FXR/TGR5 signaling pathways via remodeling the gut microbiota in CD-1 mice. *Science of The Total Environment*, 889, 164307. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164307>
- Hong, T., Zou, J., Yang, J., Liu, H., Cao, Z., He, Y., & Feng, D. (2023). Curcumin protects against bisphenol A-induced hepatic steatosis by inhibiting cholesterol absorption and synthesis in CD-1 mice. *Food Science & Nutrition*, 11(9), 5091-5101. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3468>
- Hussein, R. M., & Eid, J. I. (2013). Pathological mechanisms of liver injury caused by oral administration of bisphenol A. *Life Sci J*, 10(1), 663-673.
- Issac, P. K., Ravindiran, G., Velumani, K., Jayaseelan, A., Greff, B., Mani, R., ... & Awasthi, M. K. (2024). Futuristic advancements in phytoremediation of endocrine disruptor Bisphenol A: A step towards sustainable pollutant degradation for rehabilitated environment. *Waste Management*, 179, 216-233. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2024.03.010>
- J. Schmidt, P. Kotnik, J. Trontelj, Ž. Knez, L.P. Mašič. Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes *Toxicol. Vitro*, 27 (2013), pp. 1267-1276 <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.02.016>
- Jo, A., Ji, K., & Choi, K. 2014. Endocrine disruption effects of long-term exposure to perfluorodecanoic acid (PFDA) and perfluorotridecanoic acid (PFTrDA) in zebrafish (*Danio rerio*) and related mechanisms. *Chemosphere*, 108, 360-366. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.080>
- Junqueira, L. C. and Carneiro, Jose. (2006). *Temel Histoloji*. (Çev. Y. Aytekin, ve S. Solakoğlu.). Nobel Tıp Kitabevleri. 2006.
- Kamm, D. R., & McCommis, K. S. (2022). Hepatic stellate cells in physiology and pathology. *The Journal of physiology*, 600(8), 1825-1837. <https://doi.org/10.1113/JP281061>
- Karabekir, S. C., Gultekin, B., Ayan, I. C., Savas, H. B., Cuce, G., & Kalkan, S. (2024). Protective effect of astaxanthin on histopathologic changes induced by bisphenol a in the liver of rats. *Pak Vet J*, 44, 244-51. <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2024.178>
- Kitto, L. J., & Henderson, N. C. (2021). Hepatic stellate cell regulation of liver regeneration and repair. *Hepatology Communications*, 5(3), 358-370.
- Krinke, G. J., & Weber, K. (2012). Histology. In H. J. Hedrich (Ed.), *The laboratory mouse* (2nd ed., pp. 161–192). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382008-2.00008-8>
- Kumar, P. (2018). Role of plastics on human health. *The Indian Journal of Pediatrics*, 85(5), 384-389. <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2595-7>
- Latham, N., & Mason, G. (2004). From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3-4), 261-289. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.006>

- Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Sonavane, M., Porcher, J. M., Balaguer, P., Cravedi, J. P., ... & Brion, F. (2017). In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicology and environmental safety*, 142, 150-156. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.009>
- Li, J., Peng, H., Ru, S., Wang, B., Su, E., Wu, D., & Wang, W. (2024). Lower-dose vs high-dose oral bisphenol S action of lipid metabolism in liver of male SD rat via mediating different SREBP isoforms. *Environmental Pollution*, 363, 125186. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.125186>
- Li, P., He, K., Li, J., Liu, Z., & Gong, J. (2017). The role of Kupffer cells in hepatic diseases. *Molecular immunology*, 85, 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.018>
- Linillos-Pradillo, B., Rancan, L., Paredes, S. D., Schlumpf, M., Lichtensteiger, W., Vara, E., & Tresguerres, J. Á. (2023). Low Dose of BPA Induces Liver Injury through Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Long-Evans Lactating Rats and Its Perinatal Effect on Female PND6 Offspring. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4585. <https://doi.org/10.3390/ijms24054585>
- Liu, J., Wang, H., Hou, X., Fan, L., Yang, F., Dai, Y., ... & Liu, Y. (2023). Bisphenol P and bisphenol M promote triple-negative breast cancer metastasis through activation of AKT pathways. *Science of The Total Environment*, 892, 164748. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164748>
- Liu, Q., Shao, W., Weng, Z., Zhang, X., Ding, G., Xu, Gu, A. (2020). In vitro evaluation of the hepatic lipid accumulation of bisphenol analogs: A high-content screening assay. *Toxicology in Vitro*, 68, 104959. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104959>
- Liu, X., Sakai, H., Nishigori, M., Suyama, K., Nawaji, T., Ikeda, S., ... & Shimohigashi, Y. (2019). Receptor-binding affinities of bisphenol A and its next-generation analogs for human nuclear receptors. *Toxicology and applied pharmacology*, 377, 114610. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114610>
- Liu, Y., Zhao, P., Cheng, M., Yu, L., Cheng, Z., Fan, L., & Chen, C. (2018). AST to ALT ratio and arterial stiffness in non-fatty liver Japanese population: a secondary analysis based on a cross-sectional study. *Lipids in health and disease*, 17, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0920-4>
- Long, Z., Fan, J., Wu, G., Liu, X., Wu, H., Liu, J., ... & Wang, X. (2021). Gestational bisphenol A exposure induces fatty liver development in male offspring mice through the inhibition of HNF1b and upregulation of PPAR γ . *Cell biology and toxicology*, 37, 65-84. <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09535-3>
- Lucarini, F., Krasniqi, T., Bailat Rosset, G., Roth, N., Hopf, N. B., Broillet, M. C., & Staedler, D. (2020). Exposure to new emerging bisphenols among young children in Switzerland. *International journal of environmental research and public health*, 17(13), 4793. <https://doi.org/10.3390/ijerph17134793>
- Luo, D. Z., Vermijlen, D., Ahishali, B., Triantis, V., Plakoutsi, G., Braet, F., ... & Wisse, E. (2000). On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. *World Journal of Gastroenterology*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.3748/wjg.v6.i1.1>

- Mahdavinia, M., Khorsandi, L., Alboghobeish, S., Samimi, A., Dehghani, M. A., & Zeidooni, L. (2021). Liver histopathological alteration and dysfunction after bisphenol A administration in male rats and protective effects of naringin. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 11(4), 394. <https://doi.org/10.22038/AJP.2021.17649>
- Meng, Z., Wang, D., Yan, S., Li, R., Yan, J., Teng, M., ... & Zhu, W. (2018). Effects of perinatal exposure to BPA and its alternatives (BPS, BPF and BPAF) on hepatic lipid and glucose homeostasis in female mice adolescent offspring. *Chemosphere*, 212, 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.076>
- Metcalf, C. D., Bayen, S., Desrosiers, M., Muñoz, G., Sauvé, S., & Yargeau, V. (2022). An introduction to the sources, fate, occurrence and effects of endocrine disrupting chemicals released into the environment. *Environmental research*, 207, 112658. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112658>
- Mohamed, H. Z., & Bastwrous, A. E. (2021). A histological study on the effects of bisphenol an administration on the liver, spleen and pancreas of adult male albino rats and the possible protective role of lycopene. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, D. Histology & Histochemistry*, 13(1), 43-61. <https://doi.org/10.21608/eajbsd.2021.159174>
- Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor?. *Comptes Rendus. Biologies*, 340(9-10), 403-405. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.004>
- Moon, M. K., Kim, M. J., Jung, I. K., Do Koo, Y., Ann, H. Y., Lee, K. J., ... & Park, Y. J. (2012). Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *Journal of Korean medical science*, 27(6), 644-652. DOI: <https://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.6.644>
- Moreira, R. K. (2007). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 131(11), 1728-1734. <https://doi.org/10.5858/2007-131-1728-HSCALF>
- Mornagui, B., Rezg, R., Repond, C., & Pellerin, L. (2022). Bisphenol S favors hepatic steatosis development via an upregulation of liver MCT1 expression and an impairment of the mitochondrial respiratory system. *Journal of Cellular Physiology*, 237(7), 3057-3068. <https://doi.org/10.1002/jcp.30771>
- Morsi, A. A., Mersal, E. A., Alsabih, A. O., Alakabawy, S., Elfawal, R. G., Sakr, E. M., ... & Abdelmoneim, A. M. (2023). Bisphenol-A exposure alters liver, kidney, and pancreatic Klotho expression by HSP60-activated mTOR/autophagy pathway in male albino rats. *Cellular and Molecular Biology*, 69(7), 109-117
- Nagarajan, M., Maadurshni, G. B., & Manivannan, J. (2024). Bisphenol a (BPA) exposure aggravates hepatic oxidative stress and inflammatory response under hypertensive milieu—impact of low dose on hepatocytes and influence of MAPK and ER stress pathways. *Food and Chemical Toxicology*, 183, 114197. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114197>
- Nakagawa Y, Tayma S (2000). Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rats hepatocytes. *Arch Toxicol.*, 74: 99- 105. <https://doi.org/10.1007/s002040050659>

- Nakatani, K., Kaneda, K., Seki, S., & Nakajima, Y. (2004). Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Medical Electron Microscopy*, 37, 29-36. <https://doi.org/10.1007/s00795-003-0229-9>
- Nawaz, F., Ullah, A., Ara, C., Mehboob, M., & Idnan, M. (2021). The Assessment of Histopathological Impacts of Bisphenol-A on the Liver in Mice Model. *RADS Journal of Biological Research & Applied Sciences*, 12(2), 90-97.
- Nawaz, F., Ullah, A., Ara, C., Mehboob, M., & Idnan, M. (2021). The Assessment of Histopathological Impacts of Bisphenol-A on the Liver in Mice Model. *RADS Journal of Biological Research & Applied Sciences*, 12(2), 90-97. <https://doi.org/10.37962/jbas.v12i2.358>
- Normal liver histology 101. AASLD (2020). <https://www.aasld.org/liver-fellow-network/core-series/pathology-pearls/normal-liver-histology-101>
- Ojo, O. O., Imhansuomon, P. T., & Nwaechefu, O. O. (2023). Green hen weed (*Petiveria alliacea*) protects against bisphenol A-induced toxicity in the hepatorenal system. *Comparative Clinical Pathology*, 32(4), 607-615. <https://doi.org/10.1007/s00580-023-03469-y>
- Ow, Y. L. P., Green, D. R., Hao, Z., & Mak, T. W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(7), 532-542. <https://doi.org/10.1038/nrm2434>
- Owczarek, K., Kubica, P., Kudłak, B., Rutkowska, A., Konieczna, A., Rachoń, D., ... & Wasik, A. (2018). Determination of trace levels of eleven bisphenol A analogues in human blood serum by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Science of the total environment*, 628, 1362-1368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.148>
- Padmanabhan, V., Song, W., & Puttabyatappa, M. (2021). Praegnatio perturbatio—impact of endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine Reviews*, 42(3), 295-353 <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa035>
- Peng, H., Wisse, E., & Tian, Z. (2016). Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cellular & molecular immunology*, 13(3), 328-336. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.96>
- Pennanen, E. (2024). The Effects of Bisphenol A on Liver Morphology and Energy Metabolism (Master's thesis, Itä-Suomen yliopisto).
- Phifer-Rixey, M., & Nachman, M. W. (2015). Insights into mammalian biology from the wild house mouse *Mus musculus*. *elife*, 4, e05959.
- Pietrangelo, A. (2004). The ferroportin disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 32(1), 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2003.08.003>
- Pirozzi, C., Lama, A., Annunziata, C., Cavaliere, G., Ruiz-Fernandez, C., Monnolo, A., ... & Meli, R. (2020). Oral bisphenol A worsens liver immune-metabolic and mitochondrial dysfunction induced by high-fat diet in adult mice: cross-talk between oxidative stress and inflammasome pathway. *Antioxidants*, 9(12), 1201. <https://doi.org/10.3390/antiox9121201>
- Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., & Rautou, P. E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of hepatology*, 66(1), 212-227. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009>

- Puche, J. E., Saiman, Y., & Friedman, S. L. (2013). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*, 3(4), 1473-1492. <https://doi.org/10.1002/j.2040-4603.2013.tb00529.x>
- Radu-Ionita, F., Pyrsopoulos, N. T., Jinga, M., Tintoiu, I. C., Sun, Z., & Bontas, E. (Eds.). (2020). *Liver diseases: A multidisciplinary textbook* (No. 180813). Berlin: Springer.
- Roark, A. M. (2020). *Endocrine disruptors and marine systems*.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Sattar, S., Nadeem, A., Shehzad, W., ur Rehman, H., & Javed, M. (2024). A biochemical and histological evaluation of in vivo exposure of bisphenol P for multi-organ toxicity and pathology in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 40(4), 194-205. <https://doi.org/10.1177/07482337241233312>
- Seralini, G. E., & Jungers, G. (2021). Endocrine disruptors also function as nervous disruptors and can be renamed endocrine and nervous disruptors (ENDs). *Toxicol Rep* 8: 1538–1557. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.07.014>
- Seyhan, O. (2014). Farede (Mus Musculus) Omethoate Toksisitesine Karşı B Vitamininin İyileştirici Etkilerinin Histopatolojik Olarak Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Kafkas Üniversitesi.
- Sharma, P., Mandal, M. B., Katiyar, R., Singh, S. P., & Birla, H. (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. https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR_663_20
- Sørensen, K. K., Simon-Santamaria, J., McCuskey, R. S., & Smedsrød, B. (2011). Liver sinusoidal endothelial cells. *Comprehensive Physiology*, 5(4), 1751-1774. <https://doi.org/10.1002/j.2040-4603.2015.tb00660.x>
- Sözlü, S., & Akdevelioğlu, Y. (2018). Bisfenol A (BFA) ve insan üreme sağlığı. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 11(1), 86-99. <https://doi.org/10.26559/mersinsbd.330432>
- Specification sheet. Sigma. (n.d.). (2025) <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/specification-sheet/SIAL/23454>
- Standley, A., Xie, J., Lau, A. W., Grote, L., & Gifford, A. J. (2024). Working with Miraculous Mice: Mus musculus as a Model Organism. *Current Protocols*, 4(10), e70021. <https://doi.org/10.1002/cpz1.70021>
- Steensberg, A., Fischer, C. P., Keller, C., Møller, K., & Pedersen, B. K. (2003). IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 285(2), E433-E437. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00074.2003>
- Stukenborg, J. B., Mitchell, R. T., & Söder, O. (2021). Endocrine disruptors and the male reproductive system. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 35(5), 101567. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101567>
- Suckow, M. A., Hashway, S., & Pritchett-Corning, K. R. (2023). *The laboratory mouse*. CRC press. <https://doi.org/10.1201/9780429353086>

- Sun, F., Huang, Y., Chen, H., Huang, J., Zhang, L., Wei, S., ... & Huang, W. (2023). BPA and its alternatives BPF and BPAF exaggerate hepatic lipid metabolism disorders in male mice fed a high fat diet. *Science of The Total Environment*, 867, 161521. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161521>
- Tang, J., Wang, K., Shen, D., & Li, C. (2024). Oxidative Stress and Keap1-Nrf2 Pathway Involvement in Bisphenol A-Induced Liver Damage in Rats. *Toxics*, 12(12), 864. <https://doi.org/10.3390/toxics12120864>
- Tardif, S., Rwigemera, A., Letourneau, N., Robaire, B., & Delbes, G. (2023). Reproductive toxicity of emerging plasticizers, flame retardants, and bisphenols, using culture of the rat fetal testis. *Biology of Reproduction*, 108(5), 837-848. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioad018>
- Tian, J., Lu, Y., Zhao, Q. L., Pu, Q. Y., Jiang, S., & Tang, Y. P. (2024). DHA-enriched phosphatidylserine alleviates bisphenol A-induced liver injury through regulating glycerophospholipid metabolism and the SIRT1-AMPK pathway. *Heliyon*, 10(14).
- Tian, M., Xia, P., Gou, X., Yan, L., Yu, H., & Zhang, X. (2022). CRISPR screen identified that UGT1A9 was required for bisphenols-induced mitochondria dyshomeostasis. *Environmental Research*, 205, 112427. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112427>
- Tian, Z., Chen, Y., & Gao, B. (2013). Natural killer cells in liver disease. *Hepatology*, 57(4), 1654-1662.
- Wang, J., Su, C., Qian, M., Wang, X., Chen, C., Liu, Y., ... & Xu, B. (2024). Subchronic toxic effects of bisphenol A on the gut-liver-hormone axis in rats via intestinal flora and metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1415216. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1415216>
- Wang, J., Yu, P., Xie, X., Wu, L., Zhou, M., Huan, F., ... & Gao, R. (2021). Bisphenol F induces nonalcoholic fatty liver disease-like changes: Involvement of lysosome disorder in lipid droplet deposition. *Environmental Pollution*, 271, 116304. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116304>
- Warren, A., Chaberek, S., Ostrowski, K., Cogger, V. C., Hilmer, S. N., McCuskey, R. S., ... & Le Couteur, D. G. (2008). Effects of old age on vascular complexity and dispersion of the hepatic sinusoidal network. *Microcirculation*, 15(3), 191-202.
- Winau, F., Hegasy, G., Weiskirchen, R., Weber, S., Cassan, C., Sieling, P. A., ... & Kaufmann, S. H. (2007). Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity*, 26(1), 117-129.
- Xing, J., Zhang, S., Zhang, M., & Hou, J. (2022). A critical review of presence, removal and potential impacts of endocrine disruptors bisphenol A. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 254, 109275. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109275>
- Xue, S., Li, X., Zhou, S., Zhang, J., Sun, K., Peng, X., ... & Yan, W. (2024). Effects and mechanisms of endocrine disruptor bisphenol AF on male reproductive health: A mini review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 276, 116300. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116300>

- Yao, J., Gao, M., Guo, X., Ai, F., & Wang, Z. (2019). Enhanced degradation performance of bisphenol M using peroxydisulfate activated by zero-valent iron in aqueous solution: Kinetic study and product identification. *Chemosphere*, 221, 314-323. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.036>
- Zaulet, M., Kevorkian, S. E. M., Dinescu, S., Cotoraci, C., Suciuc, M., Herman, H., ... & Hermenean, A. (2017). Protective effects of silymarin against bisphenol A-induced hepatotoxicity in mouse liver. *Experimental and therapeutic medicine*, 13(3), 821-828. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4066>
- Zhang, L., Xie, X., Tao, J., Wang, S., Hu, M., Wang, X., ... & Wang, J. (2023a). Mystery of bisphenol F-induced nonalcoholic fatty liver disease-like changes: Roles of Drp1-mediated abnormal mitochondrial fission in lipid droplet deposition. *Science of The Total Environment*, 904, 166831. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166831>
- Zhang, R., Guo, J., Wang, Y., Sun, R., Dong, G., Wang, X., & Du, G. (2023). Prenatal bisphenol S exposure induces hepatic lipid deposition in male mice offspring through downregulation of adipose-derived exosomal miR-29a-3p. *Journal of Hazardous Materials*, 453, 131410. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131410>
- Zhang, S., Zuo, X., Luan, J., Bai, H., Fu, Z., Sun, M., ... & Feng, X. (2024). The deleterious effects and potential therapeutic strategy of fluorene-9-bisphenol on circadian activity and liver diseases in zebrafish and mice. *Journal of Environmental Sciences*, 145, 13-27. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2023.09.014>
- Zhou, B., Niu, Y., Wang, D., Liu, L., & Guo, J. (2024). Geraniol alleviates liver injury induced by bisphenol A via modulating NLRP3/caspase-1 pathway and gut microbiota in mice model. *Food Science and Biotechnology*, 33(13), 3119-3130. <https://doi.org/10.1007/s10068-024-01564-6>
- Zhou, Z., Xu, M. J., & Gao, B. (2016). Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular & molecular immunology*, 13(3), 301-315. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.97>
- Zhu, X., Cao, L., Liu, Y., Tang, X., Miao, Y., Zhang, J., ... & Chen, J. (2024). Genotoxicity of bisphenol AF in rats: Detrimental to male reproductive system and probable stronger micronucleus induction potency than BPA. *Journal of Applied Toxicology*, 44(3), 428-444. <https://doi.org/10.1002/jat.4552>
- Zhu, Y., Liu, X., Shi, Y., Liu, X., Li, H., Ru, S., & Tian, H. (2024a). Prenatal exposure to bisphenol AF causes toxicities in liver, spleen, and kidney tissues of SD rats. *Food and Chemical Toxicology*, 192, 114939.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Muhammed CANİK

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2021, Sakarya Üniversitesi , Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- **Yükseklisans** : 2025, Sakarya Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, TÜBİTAK BİDEB

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

- Canik M., Deveci Ö. A. Ve Yön, N. D.. (2025, 22-24, Mayıs). Investigation Of Biosphenol M Induced Liver Injury In Female Mice. *I International Yıldırım Bayezid Scientific Research And Innovation Symposium-I*, Bursa, Turkey.

DİĞER ESERLER:

- Yön Ertuğ, N. D., Koçak, Ş., Bağdatlı, S., Dinç, T., İkican, K., Canik, M., & Kayhan, F. E. (2025). Recent advances of microplastics toxicity and fate on zebrafish-a review. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 22(6), 5143-5158.