



Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi

<http://dergipark.gov.tr/yyufbed>



Araştırma Makalesi

Bisfenol F'nin Sıçan Pankreası Üzerindeki Toksik Etkileri*

Emine DOĞAN¹, Burak KAPTANER*¹, Abdulahad DOĞAN²

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 65080, Van, Türkiye

² Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, 65080, Van, Türkiye

Emine DOĞAN, ORCID No: 0000-0002-4484-5625, Burak KAPTANER, ORCID No: 0000-0003-2366-6756,

Abdulahad DOĞAN, ORCID No: 0000-0002-5438-8560

* Sorumlu yazar e-posta: bkaptaner@yyu.edu.tr

Makale Bilgileri

Geliş: 22.04.2022

Kabul: 09.06.2022

Online August 2022

DOI: 10.53433/yyufbed.1107438

Anahtar Kelimeler

β hücreleri,
Antioksidan belirteçler,
Bisfenol F,
Histopatoloji,
Pankreas

Öz: Bu çalışmada, bisfenol F (BPF)'nin sıçan pankreası üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda yirmi sekiz adet *Wistar albino* erkek sıçan, BPF'ye 0, 20, 100 ve 500 mg/kg vücut ağırlığı (v.a.) konsantrasyonlarda, 28 gün boyunca oral gavaj ile maruz bırakıldı. Histolojik incelemelere göre BPF maruziyeti sonrasında, pankreatik Langerhans adacıklarında vakuolar dejenerasyon gösteren hücrelerin varlığı tespit edildi. Histomorfolojik ölçümler, BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. konsantrasyonlarına maruz bırakılan gruplarda, adacık çap ve alan ortalamalarının düştüğünü gösterdi. Ek olarak, adacıklarda immunohistokimyasal olarak boyanan insülin pozitif β hücre yüzdesinin, BPF uygulanan bütün gruplarda, anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. Serum açlık glukoz, total kan HbA1c ve serum C-peptid ile insülin seviyelerinin, BPF maruziyeti sonrasında anlamlı değişimler göstermedikleri gözlemlendi. BPF'nin malondialdehit düzeyi dışında, pankreas antioksidan savunma sistemi belirteçlerinde anlamlı değişimlere yol açtığı belirlendi. Elde edilen sonuçlar BPF'nin endüstriyel alanlarda, bisfenol A yerine güvenilir bir alternatif olarak, kullanımına daha fazla dikkat edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Toxic Effects of Bisphenol F on Rat Pancreas

Article Info

Received: 22.04.2022

Accepted: 09.06.2022

Online August 2022

DOI: 10.53433/yyufbed.1107438

Keywords

β cell,
Antioxidant indicators,
Bisphenol F,
Histopathology,
Pancreas

Abstract: In this study, it was aimed to investigate the toxic effects of bisphenol F (BPF) on rat pancreas. Toward this aim, twenty eight male *Wistar albino* rats were exposed to BPF at concentrations of 0, 20, 100, and 500 mg/kg of body weight (b.w.) via oral gavage for 28 days. According to the histological examinations, the presence of cells displaying vacuolar degeneration in the pancreatic Langerhans islets was determined after BPF exposure. Histomorphometric measurements demonstrated that averages of the islet diameter and area decreased in the groups exposed to BPF concentrations of 100 and 500 mg/kg of b.w. In addition, the percentage of immunohistochemically-stained insulin-positive β cells in the islets was determined to have diminished significantly at all of the groups exposed to BPF. The levels of serum fasting glucose, total blood HbA1c, serum C-peptide or insulin did not display significant changes after BPF exposure. BPF was determined to lead significant changes in the antioxidant defense system indicators of the pancreas, except for the malondialdehyde level. The results obtained herein showed that more attention should be given regarding the usage of BPF instead of bisphenol A as a safe alternative in industrial areas.

* Bu çalışma Emine DOĞAN'ın yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

1. Giriş

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

BPA'nın Dünya genelinde kullanımının kısıtlanması, BPA'ya alternatif olarak, bisfenol F (BPF) ve bisfenol S (BPS) gibi BPA analoglarının kullanımına neden olmuştur ancak son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar BPA analoglarının, BPA'ya benzer olumsuz etkilere sahip olduklarını ve kullanımlarının, insan ve çevre sağlığı açısından, risk oluşturabileceğini ortaya koymuştur (İyigündoğdu ve ark., 2020). Bisfenol AF (BPAF), BPF ve BPS gibi BPA analoglarının, abiyotik çevrelerde ve bazı bölgelerdeki insanların idrar örneklerinde, BPA'ya benzer veya BPA'dan daha yüksek seviyelerde, tespit edildiği rapor edilmiştir. Birçok BPA analogunun, endokrin bozucu etkiler, sitotoksik etkiler, genotoksik etkiler, dioksin benzeri etkiler, üreme ile ilgili toksik etkiler ve nörotoksik etkiler meydana getirdiği, çok sayıda laboratuvar çalışmasında ortaya konulmuştur. Ek olarak, yapılan çalışmalarda, BPAF, BPF, BPS ve bisfenol B gibi BPA analoglarının, BPA'nın sahip olduğu östrojenik ve antiandrojenik aktivitelere benzer, hatta onunkinden daha fazla aktiviteye sahip oldukları, belirlenmiştir (Chen ve ark., 2016).

Tip II diyabet, insülin direnci ve insülin eksikliği ile belirti gösteren metabolik bir hastalıktır. Erişkin bireylerde küresel Tip II diyabet prevalansının 415 milyon civarında olduğu ancak Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun tahminlerine göre bu sayısının, 2040'ta 642 milyona ulaşacağı bildirilmiştir. Yapılan meta-analiz çalışmalarına göre, insanlarda BPA maruziyeti ile tip II diyabet riski arasında pozitif bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Hwang ve ark., 2018). Erişkinlerde yapılan saha çalışmalarında ise, BPA'ya yüksek konsantrasyonlarda maruziyet ile artan glikolize hemogloblin (HbA1c) ve insülin seviyeleri, insülin direnci, prediyabet riski ve tip II diyabet gelişme riski arasında korelasyon olduğu, ifade edilmiştir (Mustieles ve ark., 2020). Yapılan deneysel çalışmalarda ise endokrin pankreasın BPA'ya karşı hassas bir doku olduğu ve BPA'nın, 17 β -östradiolün meydana getirdiği etkileri aynı şekilde taklit ederek, aşırı insülin uyarımına sebep olduğu ve insülin direncini tetiklediği, gösterilmiştir (Nadal ve ark., 2009). BPA'nın tip II diyabet gelişim riskini, direkt olarak pankreatik β hücrelerini etkileyerek, insülin ve glukagon salgılanmasını bozarak, β hücre gelişimini inhibe ederek, β hücre apoptozunu tetikleyerek, kas, karaciğer ve yağ hücre fonksiyonunu etkileyerek ve insülin direnci durumunu harekete geçirerek, arttırabileceği, ifade edilmiştir (Provisiero ve ark., 2016). BPA'nın, özellikle streptozotosin ile tip I diyabet oluşturulmuş fare modelinde, β hücresi kalsiyum homeostazisinde bozulmaya ve endoplazmik retikulum stresinde artışa neden olarak, insülin direncine yol açtığı bildirilmiştir (Ahn ve ark., 2018). BPA'nın düşük dozlarına (5, 50 ve 500 μ g/kg vücut ağırlığı/gün) maruz bırakılan sıçanların kan plazmasında oksidatif stres belirteçlerinin uyarıldığı, bildirilmiştir. Öte yandan, plazma total kolesterol, trigliserit, düşük dansiteli lipoprotein, yüksek dansiteli lipoprotein, insülin ve glukoz düzeylerinin, BPA maruziyeti sonrasında değişmediği ancak Langerhans adacıklarında, insülin pozitif β hücre yüzdesinin anlamlı bir şekilde arttığı ve pankreatik β hücre fonksiyonunun bozulduğu ifade edilmiştir (Özaydın ve ark., 2018).

Bisfenol ailesine ait olan BPF'nin, kimyasal ismi bis (4-hidroksifenil) metan'dır. Yapısal olarak, metilen vasıtasıyla bağlanan iki fenol halkasına sahiptir. BPF'nin BPA epoksi rezinlerine kıyasla düşük vizkositesinden ve solventlere karşı daha dayanıklı olmasından dolayı üretimi ve kullanımı, birçok ülkede giderek artmaktadır. BPF, epoksi rezinlerin ve polikarbonatların üretiminde kullanılmaktadır. Bu nedenle endüstriyel sektörün birçok uygulama alanında BPF ile karşılaşmakta ve BPF dereceli olarak

BPA'nın yerini almaktadır. Gıda paketleri, boru kaplamaları, diş dolguları, endüstriyel döşemeler, derz, vernikler, kaplamalar, plastikler ve adezivlerin üretiminde, BPF kullanılmaktadır. BPF, kişisel bakım ürünleri, meşrubat ve enerji içecekleri, konserve gıdalar, hazır yemekler, gıdalar ile temaslı geri dönüşüm kağıtları, evlerde günlük olarak kullanılan atık kağıt veya kağıt ürünleri, ticari süt ve külotlu çorap gibi birçok tüketici ürününde, tespit edilmiştir. BPF'nin gıda maddelerinde baskın bulunan bir bisfenol tipi olduğu ve gıda maddelerindeki varlığının, diğer bisfenoller içerisinde %17'ye karşılık geldiği, ifade edilmiştir (Usman ve ark., 2019).

In vivo'da yapılmış olan deneysel çalışmalar, BPF'nin östrojenik, androjenik ve tiroidojenik etkilerinin olduğunu ve organizmalarda fizyolojik/biyokimyasal değişimlere yol açabildiğini göstermiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda ise, BPF'nin sitotoksik etkiler gösterdiği, oksidatif stresi uyardığı, kromozomal aberasyonlara sebep olduğu, DNA hasarına yol açtığı ve genotoksisiteye neden olduğu rapor edilmiştir (İyigündoğdu ve ark., 2020). Yapılan bir *in vitro* çalışmada, BPF ve BPS'ye maruz bırakılan fare pankreatik β hücrelerinde, glukoz ile uyarılan insülin salınımının arttığı, gözlenmiştir. Bu durumun, kısa süreli uygulamalarda, potasyum kanallarının inhibe edilmesi sonucunda meydana geldiği ifade edilirken, uzun süreli maruziyette voltaj-kapılı kalsiyum, sodyum ve potasyum kanallarının düzenlenmesi ile ilgili daha kompleks mekanizmaları kapsadığı, bildirilmiştir. Dolayısıyla bu bisfenol analoglarının, östrojen reseptörü β agonistleri oldukları ve ekstrasnükleer olarak harekete geçirilen bir yolağı aktive edebildikleri belirlenmiştir (Marroqui ve ark., 2021).

BPF'nin pankreas üzerindeki olumsuz etkilerine ilişkin bilgi, sınırlıdır. Bu çalışmada, BPF'nin pankreas üzerindeki toksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, *Wistar albino* erkek sıçanlar, BPF'nin farklı dozlarına oral gavaj ile 28 gün boyunca maruz bırakılmış, daha sonra BPF'nin pankreatik Langerhans adacık histolojisi ile histomorfolojisi, adacık β hücre yüzdesi, pankreas antioksidan sistem belirteçleri ve kanda bazı biyokimyasal değerler üzerindeki etkisi araştırılmış ve elde edilen bulgular tartışılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Deneysel hayvanı

Çalışmada ağırlıkları 160-290 g olan 2-3 aylık, toplam 28 adet, *Wistar albino* ırkı erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Sıçanlar, deney süresince, ortalama 25 °C sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık ışık periyodu altında barındırıldı ve standart plastik kaplarda *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Deneyler, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Deneyler sırasında meydana gelebilecek olumsuzlukların en aza indirilmesi için gereken bütün önlemler alındı. Çalışma süresince, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen kurallara riayet edildi. Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (VAN YUHADYEK) tarafından onaylanmıştır (Karar no: 2022/03-20).

2.2. Deneysel dizayn

Her grupta yedi (7) adet sıçan olacak şekilde, toplam dört (4) deney grubu oluşturuldu. Sıçanlar gruplara rastgele olarak dağıtıldı. Deneysel uygulamalar, toplam 28 gün süre ile gerçekleştirildi. Test kimyasalı olan bisfenol F (BPF, 4,4'-dihidroksidifenilmetan, $C_{13}H_{12}O_2$, saflık: %98, Alfa Aesar, Kandel, Almanya)'nin, etanol-zeytinyağı karışımı (1:4 v/v) içerisinde tamamen çözünmesi sağlandı (Pal ve ark., 2017; Silva ve ark., 2018). Hayvanlara oral gavaj ile günlük olarak uygulanan BPF konsantrasyonları, Higashihara ve ark. (2007)'na göre belirlendi. Toplam yirmi sekiz gün süren çalışmadaki deney grupları aşağıda belirtilmiştir:

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

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

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

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

2.3. Kan ve doku örneklerinin alınması

Deney süresinin tamamlanmasından hemen sonra sıçanlar, ketamin/ksilazin karışımı ile anestezi edildi. Hayvanların kalbinden enjektör ile alınan kan örnekleri, biyokimyasal analizler için biyokimya tüplerine aktarılırken, total kan HbA1c ölçümü için EDTA'lı tüplere alındı. Daha sonra, her hayvanın pankreasının bir bölümü histolojik incelemeler için, diğer bir bölümü ise antioksidan indikatörlerin ölçümü için dikkatlice çıkartıldı.

2.4. Histolojik prosedürler

Hayvanlardan çıkartılan pankreas dokuları, % 10'luk nötral tamponlu formaldehit fiksatifisi ile 24 saat tespit edildi. Tespit edilen dokular, fosfat tuz tamponu (PBS; 0.01 M, pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra dereceli etanol (%70, %80, %96 ve absolü) serilerinden geçirilerek, dehidrate edildi. Dokular daha sonra ksilende şeffaflaştırılarak parafine gömüldü. Parafin bloklardan Rotary mikrotom (MICROM H315, Microm GmbH) ile alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler, adeziv kaplı lamlara aktarıldı. Kesitler rutin histolojik incelemeler için, Hematoksilin & Eozin (H&E) ile boyandı. H&E ile boyanan kesitler, kamera ataçmanlı mikroskop (Leica DMI 6000B, Leica Microsystems, Almanya) ile incelendikten sonra, uygun büyütmede fotoğrafları çekildi.

2.5. Pankreas langerhans adacıklarında β hücrelerinin immunohistokimyasal olarak boyanması

Langerhans adacıklarında insülin-pozitif β hücrelerinin işaretlenmesi için immunohistokimya yöntemi tercih edildi. Bu yöntem uygulanırken, spesifik "insülin monoklonal primer antikoru" (Katalog no: MA5-12037, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD) ve avidin-biyotin mikropolimer işaretleme sistemine göre çalışan ticari bir immunohistokimya kiti (Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detetion Kit-Micropolymer, katalog no: ab236466, Abcam Cambridge, UK) kullanıldı. İmmun boyama esnasında kitin protokollerine riayet edildi. Kısaca; adeziv kaplı lamlara aktarılan pankreas kesitleri, deparafinize ve rehidrate edildikten sonra, tris tuz tamponu (TBS: 20 mM Tris 140 mM NaCl, pH: 7.6) ile bir kaç kez yıkandı. Kesitler, yukarıda belirtilen immunohistokimya kiti içinde sağlanmış olan H₂O₂ ile inkübe edilerek dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi inaktif hale getirildi. TBS ile yıkamadan sonra kesitlere bu kez, kitte mevcut olan protein bloke edici solüsyon damlatılarak, protein blokasyonu sağlandı. Daha sonra kesitler, içerisinde % 1 oranında sığır serum albumin bulunan TBS ile 1:40 oranında sulandırılmış olan, insülin primer antikoru ile bir gece boyunca +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon, kesitlerin kurumaması için, nemli oda kullanılarak gerçekleştirildi. Kesitler, TBS ile birkaç defa yıkandıktan sonra kitin komplement solüsyonu ile inkübe edildi. TBS ile tekrar yıkanan kesitlere bu kez, horseradish peroksidaz (HRP) konjugatı uygulandı. HRP-konjugat ile inkübe edilen kesitler, TBS ile yıkandıktan sonra DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromojen solüsyonu ile muamele edildi ve β hücrelerinde kahverengi renk oluşumu gözleninceye kadar (1-3 dk) bu solüsyonda bekletildi. Zemin boyaması Mayer'in hematoksilen boyası ile yapıldı. Lamlar dereceli etanolden (%95, %100) ve ksilenden geçirilerek Entellan ile kapatıldı. Negatif kontrol kesitlerinde, primer antikor yerine TBS kondu. Preparatlar mikroskop ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

2.6. Adacık morfolometri ve β hücre sayımı

Deney gruplarındaki sıçanlardan (n = 7) alınan ve H&E ile boyanmış olan pankreas kesitlerinde, Langerhans adacığı çap ve alan ölçümleri gerçekleştirildi. Bunun için, deney gruplarındaki her sıçana ait olan pankreas kesitinin birbirinden farklı en az 10 farklı sahasında yer alan Langerhans adacıklarından, mikroskop ile bağlantılı bir kamera (Leica DFC490, Leica Microsystems, Almanya)

kullanılarak, 200× veya 400× büyütmede, fotoğraflar çekildi. Adacık çap ve alan ölçümleri <https://imagej.nih.gov/ij/download.html> internet adresinden serbest olarak indirilebilen, ImageJ 1.46 yazılımından yararlanılarak gerçekleştirildi. Çekilen fotoğraflar yazılıma aktarıldıktan sonra, yazılımın “analiz” eklentisi kullanılarak adacık çap ve alan ölçümleri yapıldı. Adacık çap ve alan ölçümleri, yazılımın kullanıcı rehberi (ImageJ User Guide, version revised edition IJ 1.46r)'ndeki tariflere uyularak gerçekleştirildi. Adacık çap ölçümünde belirlenen kriterler ise, Dra ve ark. (2019) ve Hanalp ve ark. (2021)'ndan bazı modifikasyonlar yapılarak belirlendi. Kısaca; bir sıçana ait olan pankreas kesitindeki en az 10 farklı Langerhans adacığının çekilen resimler üzerinde en ve boy uzunlukları, ölçüldü. Daha sonra her adacık için belirlenen en ve boy uzunluklarının ortalaması alındı. Bu şekilde, deney hayvanının her adacığı için “ortalama çap uzunluğu” belirlendi. Hayvanın her adacığı için elde edilen “ortalama çap uzunluğu” değerlerinin ortalaması alınarak, o hayvan için “ortalama Langerhans adacık çapı” belirlendi. Gruplardaki her hayvan için belirlenen “ortalama Langerhans adacığı çap değerleri” istatistiksel analizler için kullanıldı. Alan ölçümü için, çap ölçümüne benzer olarak, her hayvanın en az 10 farklı Langerhans adacığından çekilmiş olan fotoğraflar, ImageJ 1.46 yazılımına aktarıldı. Daha sonra, bir hayvana ait pankreas kesitindeki en az 10 farklı Langerhans adacığının alanı ölçüldü. En az 10 farklı Langerhans adacığından elde edilen alan ölçüm sonuçlarının ortalaması alınarak, hayvana ait olan “ortalama adacık alanı” belirlendi. Her hayvan için “ortalama Langerhans adacığı alan değeri” belirlendikten sonra, elde edilen veriler istatistiksel analizler için kullanıldı.

Langerhans adacıklarında immunohistokimya yöntemi ile boyanan insülin pozitif β hücrelerinin sayısı, Hanalp ve ark. (2021)'nin belirttiğı şekilde gerçekleştirildi. Her sıçanın immunohistokimya ile boyanmış olan pankreas kesitinin, birbirinden farklı en az 10 farklı sahasında yer alan Langerhans adacıklarından, mikroskop ile bağlantılı bir kamera kullanılarak, 200× veya 400× büyütmede, fotoğraflar çekildi. Çekilen fotoğraflar, ImageJ 1.46 yazılımına aktarıldı. Daha sonra bu yazılımın hücre sayıcı eklentisi kullanılarak, insülin-pozitif boyanan β hücrelerinin ve boyanmayan negatif hücrelerin sayısı yapıldı. Sayımın yapıldığı her adacık için β indeks değeri, aşağıda verilen eşitliğe göre, hesaplandı:

$$\beta \text{ hücre indeksi} = (\text{Adacıkta sayılan insülin pozitif } \beta \text{ hücre sayısı} \div \text{Adacıkta sayılan toplam hücre sayısı}) \times 100 \quad (1)$$

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

2.7. Biyokimyasal analizler

Serum glukoz ve total kanda HbA1c düzeyleri, Cobas 6000 otoanalizör cihazı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ve bu cihaza spesifik olarak kullanılan glukoz ölçüm kiti (Glucose HK Gen.3, Cobas Integra / Cobas c systems, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ve HbA1c ölçüm kiti (Tina-quant HemoglobinA1c Gen.3, Cobas Integra / Cobas c systems, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılarak belirlendi. Sonuçlar, mg/dL olarak ifade edildi. Serum C-peptid ve insülin seviyeleri ise sıçan C-peptid ve sıçan insülin ELISA kitleri (Hangzhou Eastbiopharm Co., Ltd., Hangzhou, Çin) kullanılarak ve bu kitlerin protokollerine uyularak belirlendi. Ölçümler mikropilaka okuyucu ile yapıldı. Sonuçlar; C-peptid düzeyi için pg/mL olarak, insülin düzeyi için mIU/L olarak verildi.

2.8. Antioksidan savunma sistemi belirteçlerinin tayini

Derin dondurucuda saklanan pankreas dokuları, homojenizasyon öncesinde çıkartılarak buz üzerinde erimeleri sağlandı. Daha sonra, dokular PBS (pH: 7.4) ile ultrasonik parçalayıcı (Bandelin Sonopuls, HD 2070, Bandelin Electronic GmbH & Co KG) kullanılarak, 5 dk. boyunca, homojenize edildi. Homojenatlar, 15000 × g'de 25 dk boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak, tüplere aktarıldı. Yapılan bu işlemlerin hepsi, +4 °C veya buz üzerinde gerçekleştirildi. Elde edilen

süpernatantlar, antioksidan savunma sistemi belirteçlerinin analizleri ve total protein tayini için -20°C 'de saklandı.

Süperoksit dizmutaz (SOD) aktivitesi, Ransod ticari kiti (Randox Lab., İngiltere) kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçüm, 37°C ve 505 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ve kit prokollerine uyularak yapıldı. SOD aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

Katalaz (CAT) aktivitesi, 10 mM hidrojen peroksitin 240 nm dalga boyundaki absorbansının düşüşüne dayanan metoda göre ölçüldü (Aebi, 1974). CAT aktivitesi, tüketilen $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{dk/g}$ protein olarak ifade edildi.

Redükte glutatyon (GSH) içeriği Beutler (1984)'in tanımladığı metoda göre, 412 nm'de spektrofotometrik olarak, ölçüldü. Örneklerdeki GSH konsantrasyonu, eksternal standartlardan elde edilen eğriye göre hesaplandı. Sonuçlar $\mu\text{mol GSH/mg}$ protein olarak ifade edildi.

Glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi, Ransod ticari kiti (Randox Lab., İngiltere) kullanılarak gerçekleştirildi. Paglia & Valentine (1967)'nin tanımladığı metoda dayanan bu ölçüm, 37°C ve 340 nm dalga boyunda, kit prokollerine uyularak yapıldı. GPx aktivitesi U/g protein olarak ifade edildi.

Glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesi, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'in substrat olarak kullanımı ile ölçüldü. Ölçüm, 0.1 M fosfat tampon (pH: 6.5), 1 mM CDNB ve 1 mM indirgenmiş GSH karışımı içeren kuvartz küvete, süpernatantın eklenmesinden sonra spektrofotometre kullanılarak, gerçekleştirildi. Örneğin eklenmesi ile başlatılan reaksiyondaki absorbans artışı, 340 nm optik dansitede kaydedilip enzim aktivitesi hesaplandı (Habig ve ark., 1974). Sonuçlar, CDNB-glutatyon konjugatı (nmol) /dk/mg protein olarak ifade edildi.

Lipid peroksidasyon ölçümü, süpernatantlardaki malondialdehit (MDA) içeriği ölçülerek belirlendi. MDA içeriği, tiyobarbitürik asit reaktivitesine dayanan Buege & Aust (1978)'un tanımladığı metoda göre belirlendi. Örneklerdeki MDA konsantrasyonu, eksternal 1,1,3,3-tetraetoksipropan standartlarından türetilen, standart eğri kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak ifade edildi.

Süpernatantlardaki total protein konsantrasyonu, Bradford (1976) metoduna göre, sıgır serum albumin (BSA)'in standart olarak kullanılması ile belirlendi.

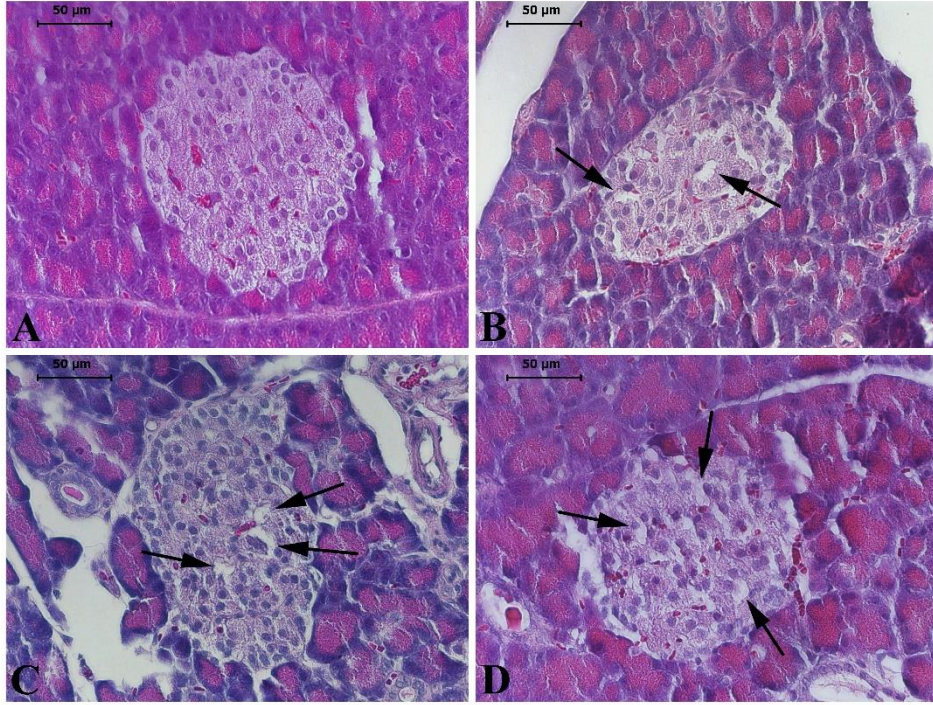
2.9. İstatistiksel analizler

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

3. Bulgular

3.1. Histopatolojik değişimler

Kontrol grubuna ait sıçanların pankreas kesitlerinde yapılan histolojik incelemeler sonucunda, Langerhans adacıklarının ve adacık hücrelerinin normal görünümde oldukları gözlemlendi (Şekil 1A). BPF'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda ise hafif histopatolojik değişimlerin meydana geldiği belirlendi. Bu gruplarda, pankreasın bazı Langerhans adacıklarının küçüldükleri (atrofi) ve bu adacıkların bazı hücrelerinde vakuolar dejenerasyona sahip adacık hücrelerinin olduğu, gözlemlendi (Şekil 1B, C, D)



Şekil 1. Farklı grupların H&E ile boyanmış pankreas kesitleri. A: Kontrol grubuna ait bir sıçanın normal görünümüne sahip olan Langerhans adacığı. B: BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan bir sıçanın atrofiye olmuş ve hücrelerinde vakuolar dejenerasyon (oklar) meydana gelen Langerhans adacığı. C: BPF'nin 100 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan bir sıçanın Langerhans adacığında hasarlı veya dejeneratif hücreler (oklar). D: BPF'nin 500 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan bir sıçanın adacık hücrelerinde vakuolar dejenerasyon (oklar).

3.2. Adacık morfometrisi

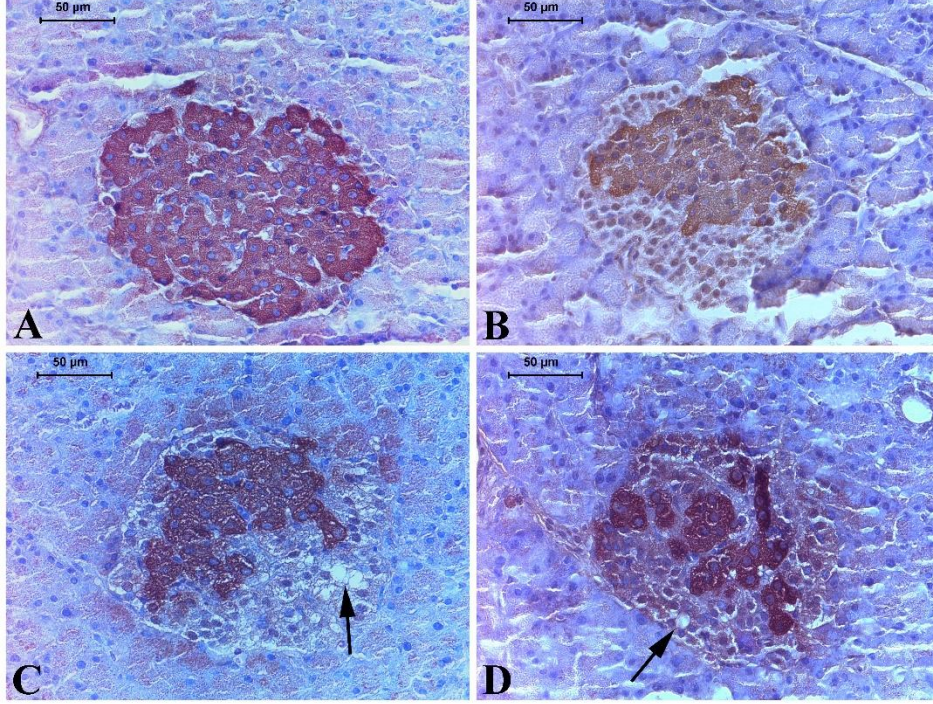
Langerhans adacıklarında yapılan morfometrik ölçümler (adacık çapı ve adacık alanı)'e ait değerler, Çizelge 1'de gösterilmiştir. Adacık çap ortalamasının BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi ($p > 0.05$). Öte yandan adacık çap ortalamasının BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$). Adacık alan ortalamasının ise BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği ($p > 0.05$) ancak BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, azaldığı belirlendi ($p < 0.05$).

Çizelge 1. Farklı gruplara ait adacık çap ve alan ortalamaları. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur ($n = 7$). Değerler üzerindeki birbirinden farklı küçük harfler, Duncan *post hoc* çoklu karşılaştırma testine göre, aynı sütunda farklı gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları, ifade etmektedir ($p < 0.05$).

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

3.3. Pankreatik β hücrelerinin immunohistokimyasal boyanması ve β indeks değerleri

İmunohistokimyasal olarak işaretlenen β hücrelerinin, kontrol grubuna ait hayvanların Langerhans adacıklarında, çoğunlukla merkezi alanda lokalize oldukları ve güçlü immun boyanma gösterdikleri gözlemlendi (Şekil 2A). BPF'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplardaki sıçanların adacıklarının bazılarında insülin-pozitif β hücrelerinde azalmaların olduğu, belirlendi. Özellikle adacık hücrelerinde vakuolizasyonun gözlemlendiği alanlarda immun boyanmanın çok az olduğu veya hiç olmadığı tespit edildi (Şekil 2B, C, D).



Şekil 2. Farklı grupların Langerhans adacıklarında, immunohistokimya yöntemi ile boyanmış olan, β hücreleri. A: Kontrol grubuna ait bir sıçanın güçlü sitoplazmik immun boyanma (kahverengi) gösteren ve çoğunlukla adacık merkezinde lokalize olan β hücreleri. B: BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan bir sıçanın Langerhans adacığında azalmış olan β hücreleri. C: BPF'nin 100 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan bir sıçanın Langerhans adacığında azalmış olan β hücreleri. Adacıkta vakuolar dejenerasyon (ok) olduğu alanlarda immun boyanmanın gerçekleşmediği görülmektedir. D: BPF'nin 500 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan bir sıçanın Langerhans adacığının merkezinde azalmış olan β hücreleri ve bir adacık hücresinde vakuolar dejenerasyon (ok).

Kontrol grubuna ve BPF uygulanan gruplara ait β hücre indeks değerleri, Çizelge 2'de gösterilmiştir. Yukarıda sözü edilen gözlemler ile uyumlu olarak, β hücre indeks değerlerinin, BPF'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, azaldıkları belirlendi ($p < 0.05$).

Çizelge 2. Kontrol grubuna ve BPF uygulanan gruplara ait β hücre indeks değerleri. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur ($n = 7$). Değerler üzerindeki birbirinden farklı küçük harfler, Duncan *post hoc* çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları, ifade etmektedir ($p < 0.05$).

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

3.3. BPF'nin glukoz, HbA1c, C-peptid ve insülin seviyeleri üzerindeki etkisi

Kontrol grubuna ve BPF uygulanan gruplara ait serum açlık glukoz, total kan HbA1c ve serum C-peptid ile insülin seviyeleri, Çizelge 3'de gösterilmiştir. Serum açlık glukoz, total kan HbA1c ve serum C-peptid ile insülin seviyelerinin, BPF uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermedikleri gözlemlendi ($p > 0.05$).

Çizelge 3. Kontrol grubuna ve BPF uygulanan gruplara ait serum açlık glukoz, total kan HbA1c, serum C-peptid ve insülin seviyeleri. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur ($n = 7$). Aynı sütun içerisinde yer alan değerler üzerindeki harf (a), Duncan *post hoc* çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığını ifade etmektedir ($p > 0.05$).

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

3.4. BPF'nin pankreas antioksidan savunma sistemi belirteçleri üzerindeki etkisi

BPF'nin, pankreasta antioksidan savunma sistem belirteçleri üzerinde oluşturduğu etkiler, Çizelge 4'te gösterilmiştir. SOD aktivitesinin, BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği ($p < 0.05$) ancak BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta değişmediği ($p > 0.05$) gözlemlendi. CAT aktivitesinin, BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($p < 0.05$) ancak BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta değişmediği ($p > 0.05$) belirlendi. GPx aktivitesinin BPF uygulanan bütün gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü tespit edildi ($p < 0.05$). GST aktivitesinin, BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği ($p < 0.05$) ancak BPF'nin 20 mg/kg v.a. dozuna maruz bırakılan grupta değişmediği ($p > 0.05$) belirlendi.

Çizelge 4. BPF'ye maruz bırakılan sıçanların pankreas bezinde antioksidan savunma sistem belirteçlerindeki değişimler. Değerler, ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur ($n = 7$). Aynı sütun içerisinde yer alan değerler üzerindeki farklı harfler, Duncan *post hoc* çoklu karşılaştırma testine göre gruplar arasında, istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$).

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

GSH içeriğinin, BPF'nin 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($p < 0.05$) ancak BPF'nin 20 mg/kg v.a.

dozuna maruz bırakılan grupta değişmediği ($p > 0.05$) gözlemlendi. MDA düzeyinin, BPF'ye maruz bırakılan grupların herhangi birisinde kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi ($p > 0.05$).

4. Tartışma ve Sonuç

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

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

Bu çalışmada, insülin pozitif β hücre indeks değerlerinin, BPF'nin 20, 100 ve 500 mg/kg v.a. dozlarına maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, düştüğü belirlendi. BPA'nın düşük dozuna (50 µg/kg/gün) 35 hafta maruz bırakılan erkek sıçanlarda, β hücre kitlesinin yükseldiği belirlenmiştir (Ding ve ark., 2014). BPA'nın düşük konsantrasyonları (5, 50, ve 500 µg/kg/gün)'na maruz bırakılan erkek sıçanlarda, adacık alanında anlamlı değişimlerin meydana gelmemesine karşılık, en yüksek BPA konsantrasyonunda insülin immunreaktif β hücre yüzdesinin, anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Özaydın ve ark., 2018). BPA'nın düşük dozlarına (10 ve 100 µg/kg/gün) maruz bırakılan gebe farelerin erkek yavrularında, doğum gününde ve doğumdan 20 ile 30 gün sonra, Langerhans adacığı β hücre kitlesinde artışın meydana geldiği ve apoptozun azaldığı, gösterilmiştir ancak doğumdan 120 gün sonra yavrulardan alınan pankreas örneklerinde, Langerhans adacığı β hücre kitlesinin kontroller ile eşit düzeyde veya kontrollerden anlamlı derecede daha düşük seviyede olduğu bildirilmiştir (García-Arévalo ve ark., 2016). BPA'ya 10 ve 100 µg/kg/gün dozlarında uzun süre maruz bırakılan gebe farelerin, Langerhans adacıklarında β hücre kitlesinin doğumdan 7 ay sonra azaldığı, β hücre proliferasyonunun düştüğü ve β hücre apoptozunun yükseldiği bildirilmiştir (Alonso-Magdalena ve ark., 2006). Bir başka çalışmada, BPA'ya diyet ile 25 mg/kg konsantrasyonda maruz bırakılan gebe farelerin fötüslerinde, immunohistokimyasal olarak işaretlenen insulin ifadesinin değişmediği ancak glukagon ifadesinin arttığı belirlenmiştir (Whitehead ve ark., 2016). BPA'nın yüksek dozlarına (1 ve 100 mg/L) içme suyu ile uzun süre (7 – 12 hafta) maruz bırakılan obez olmayan farelerde insülit gelişiminin BPA tarafından hızlandırıldığı bildirilmiş, aynı zamanda BPA'nın, insülit gelişimden önce, adacıklardaki β hücre apoptozunu uyardığı belirlenmiştir (Bodin ve ark., 2013). Yıldız ve ark. (2020) ise, yüksek doz (100 mg/kg/gün) BPA'nın erişkin erkek sıçanlarda, adacık çapı, adacık alanı ve β hücre alanı üzerinde anlamlı farklılıklar meydana getirmediğini bildirmişlerdir. Yapılan bir *in vitro* çalışmada, sıçan insülinoma hücre (INS-1)'lerinin BPA'ya düşük konsantrasyonda ve kısa süreli olarak maruziyet sonrasında, hücre canlılığında anlamlı değişimlerin meydana gelmediği ancak BPA'nın doz artışı ile birlikte apoptozu uyararak hücre canlılığını azalttığı, aynı zamanda glukoz ile uyarılan insülin salınımını düşürdüğü ifade edilmiştir (Lin ve ark., 2013). Benzer şekilde BPA'ya, *in vitro*'da uzun süreliğine (72 saat) maruz bırakılan sıçan pankreatik β -hücreleri (INS-1E)'nde, hücre canlılığının ve insülin

sekresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Weldingh ve ark., 2017). BPA'ya *in vitro*'da maruz bırakılan murin pankreatik adacıklarında, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulduğu, reaktif oksijen türlerinde artışın meydana geldiği ve apoptozun arttığı bildirilmiştir. Ek olarak BPA'nın, *in vivo*'da, adacıkların hasara karşı verdiği yanıtı zayıflattığı ifade edilmiştir (Carchia ve ark., 2015). BPF'nin pankreatik β hücresi üzerindeki etkisine yönelik geçmişte yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır ve bu çalışmada ilk kez, BPF'nin pankreatik β hücre yüzdesi üzerinde anlamlı azalışlara neden olduğu gözlenmiştir. BPA ile yapılmış olan ve yukarıda sözü edilen çalışmalar göz önünde tutulduğunda BPA'nın, uygulama süresine, uygulama konsantrasyonuna ve deneysel dizayna bağlı olarak, β hücreleri üzerinde, artışlara ve azalışlara sebep olabilmektedir yahut herhangi bir değişime neden olmamaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmada BPF'nin β hücreleri üzerindeki azaltıcı etkisi uygulanan konsantrasyonların yüksek olmasına bağlı olarak meydana gelen toksik etkilerden kaynaklanabilir.

Bu çalışmada serum açlık glukoz, total kan HbA1c ve serum C-peptid ve insülin seviyelerinde, anlamlı değişimler gözlenmedi. Düşük doz BPA'nın fareden izole edilen Langerhans adacıklarında, ER α aracılığı ile insülin içeriğini artırdığı belirlenmiştir (Alonso-Magdalena ve ark., 2008). 17- β östradiol (E2) ve BPA'ya maruziyetin erişkin farelerde pankreatik β hücre insülin içeriğini, ER'ye bağımlı bir tarzda, artırdığı gözlenmiştir (Alonso-Magdalena ve ark., 2006). BPA'ya maruz bırakılan farelerde yemek sonrası hiperinsülinemi ve insulin direnci ile birlikte, β hücresi insülin içeriğinin arttığı, bildirilmiştir (Ropero ve ark., 2008). BPA'nın E2'yi taklit ederek veya E2'nin sahip olduğu aynı potansiyel ile insülin uyarım sinyali ürettiği, β hücre tükenmişliğine sebebiyet verdiği ve sonuçta insülin direncine yol açabileceği ifade edilmiştir (Nadal ve ark., 2009). Pankreatik β hücrelerinin E2 ve BPA'ya nanomolar konsantrasyonlarda (1-10 nM) maruz bırakılması sonucunda, potasyum kanallarının inhibe olduğu ve ER β 'ya bağımlı bir mekanizma vasıtasıyla glukoz ile uyarılan insülin salınımının artırdığı, gözlenmiştir (Soriano ve ark., 2009 ve 2012). Öte yandan bu çalışmadaki bulgulara benzer olarak, BPA'nın düşük dozlarına maruz bırakılan sıçanlarda, pankreatik β hücre miktarındaki artışa rağmen, plazma glukoz ve insülin seviyelerinin değişmediği rapor edilmiştir (Özaydın ve ark., 2018). BPA'nın 20 mg/kg v.a konsantrasyonuna 28 gün boyunca maruz bırakılan erkek sıçanlarda, plazma insulin düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Agustine ve ark., 2019). Başka bir çalışmada ise, BPA'nın 20 ve 200 mg/kg v.a./gün dozlarına maruz bırakılan erkek sıçanlarda plazma insülin düzeyinin arttığı ancak açlık kan glukoz düzeyinin değişmediği bildirilmiştir (Indumathi ve ark., 2013). Pankreatik β hücrelerinin BPF'ye kısa süreli maruziyeti sonrasında, potasyum iyon kanallarının inhibe olduğu ve insülin salınımının arttığı bildirilmiştir. Hücrelerin BPF'ye uzun süreli maruziyetinde ise mekanizmaların daha kompleks olduğu ve artan insülin salınımının voltaj-kapılı kalsiyum, sodyum ve potasyum kanallarının düzenlenmesi ile ilgili olabileceği, ifade edilmiştir (Marroqui ve ark., 2021). Bu çalışmada, BPF'ye maruziyet sonrasında pankreatik β hücre yüzdesinde bir azalma olmasına rağmen, plazma insülin düzeyinde anlamlı değişimlerin meydana gelmediği gözlemlendi. Bu durum BPF'nin BPA'ya benzer şekilde, β hücre insülin salınımını artırmış olmasından kaynaklanabilir. Bununla birlikte, BPF'nin plazma insülin seviyesi ve glukoz homeostazisi üzerindeki etkilerinin aydınlatılması için daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

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

substratı, bir oksidan olarak davranabilir. Dolayısıyla düşük CAT aktivitesi, süperoksit radikallerinin üretimi sonucunda hızlanan SOD aktivitesi sonucunda meydana gelen hidrojen peroksitin aşırı bir şekilde artmasından, kaynaklanabilir (Pigeolet ve ark., 1990; Modesto ve Martinez, 2010; Aboul Ezz ve ark., 2015). Bu çalışmadaki bulgular ile uyumlu olarak Kabuto ve ark. (2003), BPA'ya maruz bırakılan sıçanların karaciğerinde, SOD aktivitesindeki artışlar ile birlikte, CAT aktivitesinin düştüğünü rapor etmişlerdir.

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

Bu çalışmada GPx aktivitesinin, BPF uygulanan bütün gruplarda anlamlı azalışlar gösterdiği gözlemlendi. Benzer olarak, BPF'ye maruz bırakılan insan eritrositlerinde, GPx aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir (Maćczak ve ark. 2017). Ayrıca, BPA'ya (50 mg/kg/gün) intraperitoneal olarak 5 gün boyunca maruz bırakılan sıçanların böbrek dokusunda, GPx aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (Kabuto ve ark., 2003). Özaydın ve ark. (2018), BPA'ya 5, 50, ve 500 µg/kg v.a./gün konsantrasyonlarına 8 hafta süre ile maruz bıraktıkları sıçanların kan plazmasında, GPx seviyelerinde anlamlı düşüşlerin meydana geldiğini, bildirmişlerdir. Süpürücü bir antioksidan enzim olan GPx, GSH'ı kofatör olarak kullanır ve organik peroksitler ile lipid peroksitlerin indirgenmesini gerçekleştirir. Bununla birlikte GPx aktivitesi, GSH düzeyi ile yakından ilişkilidir ve GSH düzeyindeki azalmalar, enzimin aktivitesinin azalmasına neden olabilir (Łukaszewicz-Hussain, 2003). Dolayısıyla, GSH'ın GPx tarafından kullanılabilirliğinin BPF maruziyeti sonucunda azalması, enzimin aktivitesinde düşüşlerin meydana gelmesine yol açmış olabilir. Bu çalışma ile uyumlu olarak BPA'ya maruz bırakılan sıçanların karaciğerinde de, GSH düzeyindeki azalmalar ile birlikte GPx aktivitesinin de düştüğü, rapor edilmiştir (Hassan ve ark., 2012; Abdel-Wahab ve ark., 2014).

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

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

intraperitoneal olarak maruz bırakılan farelerin karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularında, reaktif oksijen türlerinde anlamlı artışlar gözlenmesine rağmen, MDA düzeylerinin değişmediğini bildirmişlerdir. Pankreas MDA düzeylerinin BPF'ye maruziyet sonrasında değişimler göstermemesi, uygulama süresinin kısa olmasından kaynaklanabilir.

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

Teşekkür

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Van YYÜ BAPB) tarafından, "FYL-2021-9360" numaralı proje olarak desteklenmiştir. Van YYÜ BAPB'na sağladığı maddi destekten dolayı, teşekkür ederiz.

Kaynakça

- Abdel-Wahab, W. M. (2014). Thymoquinone attenuates toxicity and oxidative stress induced by bisphenol A in liver of male rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17(11), 1152-1160. doi: 10.3923/pjbs.2014.1152.1160
- Aboul Ezz, H. S., Khadrawy, Y. A., & Mourad, I. M. (2015). The effect of bisphenol A on some oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity in the heart of male albino rats. *Cytotechnology*, 6 (1), 145-155. doi: 10.1007/s10616-013-9672-1
- Aebi, H. (1974). Catalase. In H. U. Bergemeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* (pp. 673–684). Academic Press.
- Agustine, F. N., Prasetyarini, S., & Hamzah, Z. (2019). Effect of BPA (Bisphenol A) on blood serum insulin levels in adult male wistar ras. *Stomatognatic-Jurnal Kedokteran Gigi*, 16 (1), 28-32.
- Ahn, C., Kang, H. S., Lee, J. H., Hong, E. J., Jung, E. M., Yoo, Y. M., & Jeung, E. B. (2018). Bisphenol A and octylphenol exacerbate type 1 diabetes mellitus by disrupting calcium homeostasis in mouse pancreas. *Toxicology Letters*, 295, 162-172. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.06.1071
- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2006). The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic β -cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 106-112. doi: 10.1289/ehp.8451
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A. B., Carrera, M. P., Cederroth, C. R., Baquie, M., Gauthier, B. R., Nef, S., Stefani, E., & Nadal, A. (2008). Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER α . *PLoS One*, 3(4), e2069. doi: 10.1371/journal.pone.0002069
- Andújar, N., Gálvez-Ontiveros, Y., Zafra-Gómez, A., Rodrigo, L., Álvarez-Cubero, M. J., Aguilera, M., Monteagudo, C., & Rivas, A. (2019). Bisphenol A analogues in food and their hormonal and obesogenic effects: a review. *Nutrients*, 11(9), 2136. doi: 10.3390/nu11092136
- Arroyo-Salgado, B., Garcia-Espiñeira, M., & Olivero-Verbel, J. (2018). Effects of bisphenol A on streptozotocin treated female mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 56(6), 419-429.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity*, 2014: 360438. doi: 10.1155/2014/360438
- Aydoğan, M., Korkmaz, A., Barlas, N., & Kolankaya, D. (2008). The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats. *Toxicology*, 249(1), 35-39. doi: 10.1016/j.tox.2008.04.002

- Ayktut, H., & Kaptaner, B. (2021). In vitro effects of bisphenol F on antioxidant system indicators in the isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2591-2599. doi: 10.1007/s11033-021-06310-3
- Beutler, E. (1984). Red cell metabolism. In E. Beutler (Eds), *A Manual of Biochemical Methods*. 3rd, ed. (pp. 105–106). Orlando, FL: Grune & Startton.
- Bindhumol, V., Chitra, K. C., & Mathur, P. P. (2003). Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*, 188(2-3), 117-124. doi: 10.1016/s0300-483x(03)00056-8
- Bodin, J., Bølling, A. K., Samuelsen, M., Becher, R., Løvik, M., & Nygaard, U. C. (2013). Long-term bisphenol A exposure accelerates insulinitis development in diabetes-prone NOD mice. *Immunopharmacology & Immunotoxicology*, 35(3), 349-358. doi: 10.3109/08923973.2013.772195
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6
- Carchia, E., Porreca, I., Almeida, P. J., D'angelo, F., Cuomo, D., Ceccarelli, M., Felice, M. De., Mallardo M., & Ambrosino, C. (2015). Evaluation of low doses BPA-induced perturbation of glycemia by toxicogenomics points to a primary role of pancreatic islets and to the mechanism of toxicity. *Cell death & Disease*, 6(10), e1959. doi: 10.1038/cddis.2015.319
- Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y., & Widelka, M. (2016). Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity- a review. *Environmental Science & Technology*, 50(11), 5438-5453. doi: 10.1021/acs.est.5b05387
- Ding, S., Fan, Y., Zhao, N., Yang, H., Ye, X., He, D., Jin, X., Liu, J., Tian, C., Li, H., Xu, S., & Ying, C. (2014). High-fat diet aggravates glucose homeostasis disorder caused by chronic exposure to bisphenol A. *Journal of Endocrinology*, 221(1), 167–179. doi: 10.1530/JOE-13-0386
- Dra, L. A., Sellami, S., Rais, H., Aziz, F., Aghraz, A., Bekkouche, K., Markouk, M., & Larhsini, M., (2019). Antidiabetic potential of *Caralluma europaea* against alloxan-induced diabetes in mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1171-1178. doi: 10.1016/j.sjbs.2018.05.028
- García-Arévalo, M., Alonso-Magdalena, P., Servitja, J. M., Boronat-Belda, T., Merino, B., Villar-Pazos, S., Medina-Gómez, G., Novials, A., Quesada, I., & Nadal, A. (2016). Maternal exposure to bisphenol-A during pregnancy increases pancreatic β -cell growth during early life in male mice offspring. *Endocrinology*, 157(11), 4158-4171. doi: 10.1210/en.2016-1390
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. doi: 10.1016/S0021-9258(19)42083-8
- Hanalp, H. C., Kaptaner, B., & Doğan, A. (2021). Protective Effects of Lyophilized Ethanolic Extract of *Achillea arabica* Kotschy. On the Islet β Cells of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *KSU Journal of Agriculture & Nature* 24(4), 689-700. doi: 10.18016/ksutarimdog.vi.811253
- Hassan, Z. K., Elobeid, M. A., Virk, P., Omer, S. A., ElAmin, M., Daghestani, M. H., & AlOlayan, E. M. (2012). Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity*, 2012, 194829. doi: 10.1155/2012/194829
- Higashihara, N., Shiraishi, K., Miyata, K., Oshima, Y., Minobe, Y., & Yamasaki, K. (2007). Subacute oral toxicity study of bisphenol F based on the draft protocol for the “Enhanced OECD Test Guideline no. 407”. *Archives of Toxicology*, 81(12), 825-832. doi: 10.1007/s00204-007-0223-4
- Hwang, S., Lim, J. E., Choi, Y., & Jee, S. H. (2018). Bisphenol A exposure and type 2 diabetes mellitus risk: a meta-analysis. *BMC Endocrine Disorders*, 18(1), 81. doi:10.1186/s12902-018-0310-y
- Indumathi, D., Jayashree, S., Selvaraj, J., Sathish, S., Mayilvanan, C., Akilavalli, N., & Balasubramanian, K. (2013). Effect of bisphenol-A on insulin signal transduction and glucose oxidation in skeletal muscle of adult male albino rat. *Human and Experimental Toxicology*, 32(9), 960-971. doi: 10.1177/0960327112470273

- İyigündoğdu, İ., Üstündağ, A., & Duydu, Y. (2020). Toxicological evaluation of bisphenol A and its analogues. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(4), 457-462. doi: 10.4274/tjps.galenos.2019.58219
- Kabuto, H., Hasuike, S., Minagawa, N., & Shishibori, T., (2003). Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environmental Research*, 93(1), 31-35. doi: 10.1016/s0013-9351(03)00062-8
- Kaya, Ö., & Kaptaner, B. (2016). Antioxidant defense system parameters in isolated fish hepatocytes exposed to bisphenol A - Effect of vitamin C. *Acta Biologica Hungarica*, 67(3), 225-235. doi: 10.1556/018.67.2016.3.1
- Korkmaz, A., Ahabab, M. A., Kolankaya, D., & Barlas, N. (2010). Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food & Chemical Toxicology*, 48(10), 2865-2871. doi: 10.1016/j.fct.2010.07.019
- Li, X. (2009). Glutathione and glutathione-s-transferase in detoxification mechanisms. *General, Applied & Systems Toxicology*. doi: 10.1002/9780470744307.gat166
- Lin, Y., Sun, X., Qiu, L., Wei, J., Huang, Q., Fang, C., Ye, T., Kang, M., Shen, H., & Dong, S. (2013). Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death & Disease*, 4(1), e460-e460. doi: 10.1038/cddis.2012.206
- Łukaszewicz-Hussain, A. (2003). The role of glutathione and glutathione-related enzymes in antioxidative process. *Medycyna Pracy*, 54(5), 473-479.
- Maćczak, A., Cyrkler, M., Bukowska, B., & Michałowicz, J. (2017). Bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce different oxidative stress and damage in human red blood cells (*in vitro* study). *Toxicology in Vitro*, 41, 143-149. doi: 10.1016/j.tiv.2017.02.018
- Marroqui, L., Martinez-Pinna, J., Castellano-Muñoz, M., Dos Santos, R. S., Medina-Gali, R. M., Soriano, S., Quesada, I., Gustafsson, J. A., Encinar, J. A., & Nadal, A. (2021). Bisphenol-S and Bisphenol-F alter mouse pancreatic β -cell ion channel expression and activity and insulin release through an estrogen receptor ER β mediated pathway. *Chemosphere*, 265, 129051. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129051
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52(1), 711-760. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431
- Minghong, W., Hai, X., Ming, Y. & Gag, X. (2011) Effects of chronic bisphenol A exposure on hepatic antioxidant parameters in medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicological & Environmental Chemistry* 93(2), 270–278. doi: 10.1080/02772248.2010.530136
- Modesto, K. A., & Martinez, C. B. R. (2010). Roundup[®] causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78, 294–299. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.047
- 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. doi: 10.21608/eajbsd.2021.159174
- Mustieles, V., D'Cruz, S. C., Couderq, S., Rodríguez-Carrillo, A., Fini, J. B., Hofer, T., Steffensen, I. L., Dirven, H., Baroukig, R., Olea, N., Fernández, M. F., & David, A. (2020). Bisphenol A and its analogues: a comprehensive review to identify and prioritize effect biomarkers for human biomonitoring. *Environment International*, 144, 105811. doi: 10.1016/j.envint.2020.105811
- Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Quesada, I., & Ropero, A. B. (2009). The pancreatic β -cell as a target of estrogens and xenoestrogens: implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 304(1-2), 63-68. doi: 10.1016/j.mce.2009.02.016
- Özaydın, T., Öznurlu, Y., Sur, E., Çelik, I., Uluşık, D., & Dayan, M. O. (2018). Effects of bisphenol A on antioxidant system and lipid profile in rats. *Biotechnic & Histochemistry*, 93(4), 231-238. doi: 10.1080/10520295.2017.1420821
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*, 70(1), 158-169.

- Pal, S., Sarkar, K., Nath, P. P., Mondal, M., Khatun, A., & Paul, G. (2017). Bisphenol S impairs blood functions and induces cardiovascular risks in rats. *Toxicology Reports*, 4, 560-565. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.10.006
- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., & Remacle, J. (1990). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of Ageing & Development*, 51(3), 283-297. doi: 10.1016/0047-6374(90)90078-t
- Provisiero, D. P., Pivonello, C., Muscogiuri, G., Negri, M., De Angelis, C., Simeoli, C., Pivonello, R., & Colao, A. (2016). Influence of bisphenol A on type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Environmental Research & Public Health*, 13(10), 989. doi: 10.3390/ijerph13100989
- Ropero, A. B., Alonso-Magdalena, P., Garcia-Garcia, E., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2008). Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *International Journal of Andrology*, 31(2), 194-200. doi: 10.1111/j.1365-2605.2007.00832.x
- Silva, M. M. D., Xavier, L. L. F., Gonçalves, C. F. L., Santos-Silva, A. P., Paiva-Melo, F. D., De Freitas, M. L., Fortunato, R. S., Miranda-Alves, L., & Ferreira, A. C. F. (2018). Bisphenol A increases hydrogen peroxide generation by thyrocytes both in vivo and in vitro. *Endocrine Connections*, 7(11), 1196-1207. doi: 10.1530/EC-18-0348
- Soriano, S., Alonso-Magdalena, P., Garcia-Arevalo, M., Novials, A., Muhammed, S. J., Salehi, A., Gustafsson, J. A., Quesada, I., & Nadal, A. (2012). Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor β . *PLoS One*, 7, e31109. doi: 10.1371/journal.pone.0031109
- Soriano, S., Ropero, A. B., Alonso-Magdalena, P., Ripoll, C., Quesada, I., Gassner, B., Kuhn, M., Gustafsson, J. A., & Nadal, A. (2009). Rapid regulation of KATP channel activity by 17 β -estradiol in pancreatic β -cells involves the estrogen receptor β and the atrial natriuretic peptide receptor. *Molecular Endocrinology*, 23(12), 1973-1982. doi: 10.1210/me.2009-0287
- Ullah, A., Pirzada, M., Afsar, T., Razak, S., Almajwal, A., & Jahan, S. (2019). Effect of bisphenol F, an analog of bisphenol A, on the reproductive functions of male rats. *Environmental Health & Preventive Medicine*, 24(1), 1-11. doi: 10.1186/s12199-019-0797-5
- Usman, A., Ikhlas, S., & Ahmad, M. (2019). Occurrence, toxicity and endocrine disrupting potential of Bisphenol-B and Bisphenol-F: A mini-review. *Toxicology Letters*, 312, 222-227. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.05.018
- Weldingh, N. M., Jørgensen-Kaur, L., Becher, R., Holme, J. A., Bodin, J., Nygaard, U. C., & Bølling, A. K. (2017). Bisphenol A is more potent than phthalate metabolites in reducing pancreatic β -cell function. *BioMed Research International*, 2017, 4614379. doi: 10.1155/2017/4614379
- Whitehead, R., Guan, H., Arany, E., Cernea, M., & Yang, K. (2016). Prenatal exposure to bisphenol A alters mouse fetal pancreatic morphology and islet composition. *Hormone Molecular Biology & Clinical Investigation*, 25(3), 171-179. doi: 10.1515/hmbci-2015-0052
- Yıldız, M., Güleş, Ö., Sandıkçı, M., & Kum, Ş. (2020). Sıçanlarda bisfenol A'nın neden olduğu pankreatik değişimler üzerine koenzim Q10'un etkileri. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(3), 335-341. doi: 10.35440/hutfd.688689