

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

**PRENATAL BİSFENOL A VE/VEYA Dİ-2-ETİL HEKZİL
FTALAT MARUZİYETİNİN ERKEK ÜREME SİSTEMİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ecz. Aylin BALCI

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2018

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

**PRENATAL BİSFENOL A VE/VEYA Dİ-2-ETİL HEKZİL
FTALAT MARUZİYETİNİN ERKEK ÜREME SİSTEMİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ecz. Aylin BALCI

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Belma KOÇER GÜMÜŞEL**

**ANKARA
2018**

**PRENATAL BİSFENOL A VE/VEYA Dİ-2-ETİL HEKZİL FTALAT
MARUZİYETİNİN ERKEK ÜREME SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Ecz. Aylin BALCI

Bu çalışma 28.12.2017 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN*

Hacettepe Üniversitesi



Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL*

Hacettepe Üniversitesi



Üye: *Prof. Dr. Tülay ÇOBAN*

Ankara Üniversitesi



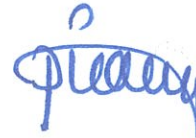
Üye: *Prof. Dr. Ahmet Oğuz Ada*

Ankara Üniversitesi



Üye: *Doç. Dr. Pınar Erkekoğlu*

Hacettepe Üniversitesi



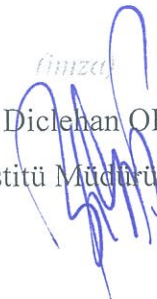
Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Tarih

17 Ocak 2018

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü



YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

- ✓ **Tezimin/Raporumun 28.12.2047 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

- **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**


 (İmza)
Aylin BALCI

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Ecz. Aylin BALCI

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında bana destek olduğu için başta değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Belma Gümüşel'e,

Eğitimime katkıda bulunan Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki bütün Öğretim Üyelerine,

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan hocam Sayın Doç. Dr. Ü. Pınar Erkekoğlu'na,

Deneylerim sırasında bilimsel birikimleri ile yanımda olan Sayın Doç.Dr. N. Dilara Zeybek ve Uzm.Bio Nilgün Yersal'a

Çalışmalarım sırasında bana destek olan değerli arkadaşım Gizem Özkemahlı'ya,

Her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Bilge Kılıçarslan ve Duygu Paslı'ya,

Hayatımın her aşamasında sevgi ve destekleriyle yanımda oldukları ve bana güç verdikleri için Annem, Babam ve Ağabeyime,

Çok teşekkür ederim.

ÖZET

Aylin, B. Prenatal Bisfenol A ve/veya Di-2-Etil Hekzil Ftalat Maruziyetinin Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018.

Bisfenol A (BPA) ve di-2-etil hekzil ftalat (DEHP), plastizer olarak birçok endüstriyel üründe kullanılan ve endokrin bozucu özelliği olduğu bilinen kimyasal maddelerdir. Günümüzde bu kimyasal maddelerin artan kullanımı ile birlikte aynı anda birden fazla kimyasal maddeye maruziyet söz konusudur. Gelişim açısından kritik olan prenatal ve erken postnatal dönemde maruziyetin çeşitli mekanizmalarla organların gelişiminde bozukluklar, üreme sorunları, metabolik ve hormonal bozukluklara yol açabileceği düşünülmektedir. Bu dönemde enzim ve savunma sistemleri tam olarak gelişmediği için görülebilecek ters etkilerin daha ciddi olabileceği kaygısı, bu alanda araştırma yapma ihtiyacını artırmaktadır. Bu tez kapsamında, prenatal ve erken postnatal (laktasyon) dönemde BPA ve DEHP'e bir arada maruziyetin tekli maruziyet ve kontrol grubuna kıyasla erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri ile bu etkilerin altında yatan mekanizmalardan biri olarak oksidatif stres varlığı değerlendirilmiştir. Sprague Dawley türü gebe sıçanlar kontrol, BPA, DEHP, BPA ve DEHP olmak üzere dört gruba ayrılmış; gebelik ve laktasyon döneminde oral gavaj yolu ile dozlanmışlardır. Dozlama yapılan gebelerin doğan erkek yavruları randomize olarak seçilmiş; erişkin döneme (12.hafta) ulaştıklarında sperm parametreleri, plazma üreme hormon düzeyleri, testiküler histopatolojik ve apoptotik değişimleri incelenerek üreme sistemi üzerindeki istenmeyen etkiler değerlendirilmiştir. Ayrıca, testis dokusunda oksidatif stres parametreleri (lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu, glutatyon düzeyleri, oksidatif DNA hasarı) incelenmiştir. Elde edilen bulgular, endokrin bozucu maddelere fetal ve neonatal dönemde maruziyet ile testis dokusunda önemli histopatolojik ve apoptotik değişikliklerin olduğunu; sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisinin değiştiğini göstermektedir. Özellikle kombine maruziyetin etkilerinin çok daha belirgin olduğu saptanmıştır. BPA+DEHP grubunda kontrol grubuna kıyasla gözlenen total glutatyon düzeylerinde azalma ve lipit peroksidasyonu düzeylerinde artış, istenmeyen etkilerin temelinde oksidatif stresin olası mekanizmalardan biri olabileceğini düşündürmektedir. Tüm sonuçlar, prenatal ve erken postnatal (laktasyon) dönemde BPA ve/veya DEHP maruziyetinin erkek yavrularda, erişkinlik döneminde üreme sistemi üzerindeki ters etkilerine işaret eder niteliktedir.

Anahtar kelimeler: Ftalat, bisfenol A, erkek üreme sistemi, prenatal maruziyet, oksidatif stres

Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir.
Proje no: THD-2017-12150

ABSTRACT

Aylin, B. Investigation of the effects of prenatal bisphenol A and/or di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on male reproductive system. Hacettepe University Health Sciences Institute, Pharmaceutical Toxicology Program, PhD Thesis, Ankara, 2018.

Bisphenol A (BPA) and di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) are chemical substances that are used in a wide variety of industrial products, with proven endocrine disrupting properties. Today, with the increasing use of these substances, it is possible that exposure to more than one substance at a time can occur. As prenatal and early postnatal periods are critical periods for development, exposure to endocrine disruptors in these periods are suggested to cause developmental defects of organs, reproductive problems and metabolic and hormonal disturbances by different mechanisms. In such periods, as the enzyme and defense mechanisms are not fully developed, the apprehension for the observation of adverse effects arises the need to perform research. In this thesis, the prenatal and early postnatal (lactation) exposure to BPA and DEHP together versus single exposures and as well as versus control group are evaluated and oxidative stress as one of the underlying mechanisms was commented. Pregnant Sprague Dawley rats were divided into four groups as control, BPA, DEHP and BPA plus DEHP and dosed by oral gavage during pregnancy and lactation period. The male offspring of born from those rats were chosen randomly and their sperm parameters, plasma reproductive hormone levels, testicular histopathological and apoptotic changes were evaluated when they reach to adulthood (twelfth week) in order to evaluate the unwanted effects on reproductive system. In addition, oxidative stress parameters (lipid peroxidation, protein oxidation, glutathione levels, and oxidative DNA damage) were investigated in the testicular tissue. The results showed that fetal and neonatal exposure to endocrine disrupting chemicals can lead to significant histopathological and apoptotic alterations in testicular tissue, along with changes in sperm count, motility and morphology. Combined exposure particularly caused more significant effects. In BPA plus DEHP group, decreases in total glutathione levels and increases in lipid peroxidation vs. control group suggests that oxidative stress may be one of the possible underlying mechanisms for the adverse effects. All of the findings suggests that prenatal and early postnatal (lactation) exposures to BPA and/or DEHP can lead to undesired effects in adulthood of the male offspring.

Keywords: phthalate, bisphenol A, male reproductive system, prenatal exposure, oxidative stress

**This thesis is supported by Hacettepe University Scientific Projects Coordination Unit.
Project no: THD-2017-12150**

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xviii
TABLolar	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Erkek Üreme Sistemi ve Bozuklukları	5
2.1.1. Erkek Üreme Sistemi	5
2.1.2 Erkek Üreme Sistemi Bozuklukları	11
2.2 Üremede Rol Alan Hormonlar	12
2.2.1. Gonadotropin Salıcı Hormon	14
2.2.2. Folikül Stimüle Edici Hormon	14
2.2.3. Lüteinize Edici Hormon	15
2.2.4. Testosteron	15
2.2.5 Estrojenler	17
2.2.6. Dihidroepiandesteron Sülfat	18
2.3. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler	18
2.3.1. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelerin Etkilerini Değiştirebilen Etmenler	19
2.3.2. Ftalatlar	32
2.3.3. Bisfenol A	36
2.4.Oksidatif Stres	40
2.4.1. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri	40
2.4.2. Oksidatif Stres	43

2.4.3. Oksidatif Stresin Biyogöstergeleri	45
2.5. Konu ile İlgili Çalışmalar	51
2.5.1. Bisefenol A ile İlgili Çalışmalar	51
2.5.2. Ftalat ile İlgili Çalışmalar	58
2.5.3. Kombine Maruziyet ile İlgili Çalışmalar	63
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	67
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	67
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	69
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	71
3.3.1. Dozlamada Kullanılan Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	71
3.3.2. Histopatolojik Analizlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	71
3.3.3. Folikül Stimüle Edici Hormon Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	72
3.3.4. Lüteinize Edici Hormon Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	72
3.3.5. Testosteron Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	73
3.3.6. Estradiol Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	74
3.3.7. Dihidroepiandesteron Sülfat Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	74
3.3.8. Seks Hormon Bağlayıcı Globülin Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	75
3.3.9. Doku Homojenatı Hazırlanırken Kullanılan Çözeltiler	76
3.3.10 Protein Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	76
3.3.11. Glutasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	77
3.3.12. Lipid Peroksidasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	77
3.3.13. Protein Karbonil Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler	78
3.3.14. DNA izolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	78
3.3.15. DNA Baz Hasarı Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	79
3.3.16. Apoptotik İncelemelerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	80
3.4. Deneysel İşlemler ve Yöntemler	80
3.4.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Dozlanması	80
3.4.2. Vücut ve Organ Ağırlıklarının Belirlenmesi	81
3.4.3. Biyolojik Örneklerin Hazırlanması	81
3.4.4. Histopatolojik Analizler	82
3.4.5. Folikül Stimüle Edici Hormon Tayini	83
3.4.6. Lüteinize Edici Hormon Tayini	84

3.4.7. Testosteron Tayini	85
3.4.8. Estradiol Tayini	87
3.4.9. Dihidroepiandesteron Sülfat Tayini	88
3.4.10. Seks Hormon Bağlayıcı Globülin Tayini	90
3.4.11. Sperm Parametreleri	91
3.4.12. Doku Homojenatlarının Hazırlanması	92
3.4.13. Protein Miktar Tayini	92
3.4.14. Total Glutasyon Düzeylerinin Ölçümü	93
3.4.15. Lipit Peroksidasyonu Düzeylerinin Ölçümü	93
3.4.16. Protein Karbonil Düzeylerinin Ölçümü	94
3.4.17. DNA İzolasyonu	96
3.4.18. DNA Baz Hasarı Ölçümü	97
3.4.19. Apoptotik Analizler	98
4. BULGULAR	100
4.1. Deney Gruplarında Vücut Ağırlığının İzlenmesi	100
4.2. Testis ve Epididimis Ağırlıkları	103
4.3. Histopatolojik Analizler	106
4.3.1. Kontrol Grubu	106
4.3.2. Bisfenol A Grubu	108
4.3.3. Di-2-Etil Hekzil Ftalat Grubu	109
4.3.4. Bisfenol A ve Di-2-Etil Hekzil Ftalat Grubu	110
4.4. Hormon Düzeyleri	111
4.4.1. Folikül Stimüle Edici Hormon Düzeyleri	111
4.4.2. Lüteinize Edici Hormon Düzeyleri	112
4.4.3. Testosteron Düzeyleri	113
4.4.4. Estradiol Düzeyleri	114
4.4.5. Dihidroepiandesteron Sülfat Düzeyleri	115
4.4.6. Seks Hormon Bağlayıcı Globülin Düzeyleri	116
4.5. Sperm Parametreleri	117
4.5.1. Sperm Sayısı	117
4.5.2. Sperm Motilitesi	117
4.5.3. Sperm Morfolojisi	118

4.6. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi	122
4.6.1. Total Glutasyon Düzeyleri	122
4.6.2. Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri	123
4.6.3. Protein Karbonil Düzeyleri	124
4.6.4. DNA Baz Hasarı Düzeyleri	125
4.7. Apoptotik Analizler	125
5. TARTIŞMA	129
5.1. Vücut Ağırlığı	130
5.2. Testis ve Epididimis Ağırlıkları	131
5.3. Histopatolojik Analizler	132
5.4. Hormon Düzeyleri	134
5.5. Sperm Parametreleri	136
5.6. Sperm Morfolojisi	137
5.7. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi	139
5.8. Apoptotik Analizler	141
5.9. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelerin Etkilerini Değiştirebilen Etmenlerin Değerlendirilmesi	143
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	145
7. KAYNAKLAR	148
8. EKLER	
EK-1: Etik Kurul Onayı	
EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

3-NT	3-Nitrotirozin
8-dG	8-Hidroksiguanozin
8-OHdG	8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin
8-oksodG	8-Okzo-7-Hidro-2'-Deoksiguanozin
ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
AChE	Asetilkolinesteraz
AhR	Aril Hidrokarbon Reseptörü
AMH	Antimüllerian Hormon
AR	Androjen Reseptörü
ATP	Adenozintrifosfat
BBP	Benzil Butil Ftalat
BPA	Bisfenol A
BSA	Sığır Serum Albümini
CAT	Katalaz
CRH	Kortikotropin Salıcı Hormon
CRP	C Reaktif Protein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DBP	Dibütil Ftalat
DDT	Diklorodifeniltriikloroetan
DEHP	Di 2-Etilhekzil Ftalat
DEP	Dietil Ftalat
DES	Dietilstilbesterol
DHEAS	Dihidroepiandesteron Sülfat
DIDP	Diizodesil Ftalat
DIP	Dibutil Ftalat
DiNP	Diizononil Ftalat
DMP	Dimetil Ftalat

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DnBP	Di-n-Butil Ftalat
DNOP	Di-n-Oktil Ftalat
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazin
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTNB	5,5'-Diti-Bis-(2-Nitrobenzoik) Asit
DTPA	Dietilentriamin Pentaasetik Asit
DYD	Düşük Yağ İçerikli
EDC	Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi
Eozin Y	Eozin Yellowish
EPA	Çevre Koruma Ajansı
ER	Estrojen Reseptörü
ERR-γ	Estrojen İlişkili Reseptör Gama
ERβ	Estrojen Reseptörü Beta
ERα	Estrojen Reseptörü Alfa
ETC	Elektron Taşıma Zinciri
FDA	Amerikan Gıda Ve İlaç Dairesi
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GH	Büyüme Hormonu
GnRH	Gonadotropin Salıcı Hormon
GPR30	G Protein Reseptör 30
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
HCl	Hidroklorik Asit
HNE	4-Hidroksi-2-Nonenal

HOCl	Hipokloröz Asit
HRP	Horseradish Peroksidaz
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IBP	İzobütil Paraben
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IgG	İmmünoglobülin G
IL	İnterlökin
IL-10	İnterlökin 10
IL-1α	İnterlökin 1 Alfa
IL-1β	İnterlökin 1 Beta
IL-6	İnterlökin 6
INSL3	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 3
LH	Lütinize Edici Hormon
LHCGR	LH-Koryogonotropin Reseptörü
LOAEL	Ters Etki Gözlenen En Düşük Düzey
LOOH	Lipit Hidroperoksitler
LP	Lipid Peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
MECPP	Mono-(2-Etil-5-Karboksipentil) Ftalat
MEHHP	Mono-(2-Etil-5-Hidroksihekzil) Ftalat
MEHP	Mono-(2-Etilhekzil) Ftalat
MEOHP	Mono-(2-Etil-5-Oksohekzil) Ftalat
mER α	Membran Estrojen Reseptörü Alfa
MES	2-(N-Morfolin)Etansülfonik Asit
MMP	Mono Metil Ftalat
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADP+	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat, Redükte form
NaOH	Sodyum Hidroksit

NIH	Ulusal Sağlık Enstitüsü
NMDR	Monotonik Olmayan Doz Cevap İlişkisi
NOAEL	Hiçbir Ters Etki Gözlenmeyen Doz Düzeyi
NOX	NADPH Oksidaz
NTP	Ulusal Toksikoloji Programı
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
PBB	Polibromlu Bifeniller
PBDE	Polibromlu Difenil Eterler
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PCB	Polikarbonlu Bifeniller
PFOA	Perflorooktanoik Asit
PMSF	Fenilmetil Sulfonil Florür
PPAR- γ	Peroksizom Proliferatör-Aktive Reseptör Gama
RfD	Referans Doz
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SD	Sprague Dawley
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Standart Hata
SHBG	Seks Hormon Bağlayıcı Globülin
SOD	Süperoksit Dismutaz
STAR	Steroidojenik Akut Düzenleyici Protein
SULT	Sulfotransferaz
TBA	Tiyobarbütirik Asit
TBARs	Tiyobarbütirik Asit Reaktif Bileşikleri
TCA	Trikloroasetik Çözeltisi
TDI	Tolere Edilebilir Günlük Alım Düzeyi
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
TLV-TWA	Çalışanların Sağlığını Bozmayacak Havadaki En Yüksek

	Konsantrasyon
TNB	5-Tiyo- 2- Nitrobenzoik Asit
TNF-α	Tümör Nekroz Edici Faktör-Alfa
TrxR	Tiyoredoksin Redüktaz
TSH	Tiroid Stimüle Edici Hormon
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP çentik uç işaretleme
UGT	Uridin 5'-Difosfo-Glukronosiltransferazlar
UV	Ultraviyole
YYD	Yüksek Yağ İçerikli Diyet



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Erkek üreme sistemi yapısı.	5
2.2. Testis dokusu histolojik yapısı.	6
2.3. Testis ve epididimis yapısı.	7
2.4. Spermatogenez.	9
2.5. Spermin yapısı.	9
2.6. Hipotalamus-hipofiz-gonad aksı.	12
2.7. Ftalatların genel kimyasal yapısı.	32
2.8. Di-2-etilhekzil ftalat biyotransformasyonu.	34
2.9. Bisfenol A' nın kimyasal yapısı	36
2.10. Bisfenol A biyotransformasyonu.	38
2.11. Oksidatif Stres.	44
2.12. Redükte glutasyonun yapısı.	46
2.13. Okside glutasyonun yapısı.	46
2.14. Malondialdehit'in yapısı.	48
2.15. 8-oksodG ve 8-OHdG'nin yapıları.	50
4.1. Ortalama doğum ağırlıkları.	100
4.2. Çalışma gruplarının laktasyon dönemi sonu erkek yavruların ortalama vücut ağırlıkları.	101
4.3. Laktasyon dönemi sonrası erkek yavruların ortalama vücut ağırlıklarının değişimi.	102
4.4. Ötenazi öncesi (12. Hafta) ortalama vücut ağırlıkları.	103
4.5. Ortalama testis ağırlıkları.	104
4.6. Ortalama epididimis ağırlıkları.	104
4.7. Rölatif testis ağırlıkları.	105
4.8. Rölatif epididimis ağırlıkları.	106
4.9. Kontrol grubuna ait seminifer tübül ışık mikrografı.	107
4.10. Kontrol grubuna ait seminifer tübül ışık mikrografı.	107
4.11. BPA grubuna ait seminifer tübül ışık mikrografı.	108
4.12. BPA grubuna ait seminifer tübül ışık mikrografı.	108
4.13. DEHP grubuna ait seminifer tübül ışık mikrografı.	109
4.14. DEHP grubuna ait seminifer tübül ışık mikrografı.	109

4.15.	BPA+DEHP grubuna ait seminifer tübül ışık mikrografı.	110
4.16.	BPA+DEHP grubuna ait seminifer tübül ışık mikrografı.	110
4.17.	Plazma folikül stimüle edici hormon düzeyleri.	111
4.18.	Plazma lüteinize edici hormon düzeyleri.	112
4.19.	Plazma testosteron düzeyleri.	113
4.20.	Plazma estradiol düzeyleri.	114
4.21.	Plazma dehidroepiandrosteron sülfat düzeyleri.	115
4.22.	Plazma seks hormon bağlayıcı globulin düzeyleri.	116
4.23.	Sperm sayısı.	117
4.24.	Çalışma gruplarına ait sperm motilitesi.	118
4.25.	Sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan kriterler.	119
4.26.	Çalışma gruplarındaki normal sperm oranı.	120
4.27.	Çalışma gruplarında baş anomali olan sperm oranı.	121
4.28.	Çalışma gruplarında kuyruk anomali olan sperm oranı.	121
4.29.	Testis total glutatyon düzeyleri.	122
4.30.	Testis malondialdehit düzeyleri.	123
4.31.	Testis karbonil düzeyleri.	124
4.32.	Testis 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin düzeyleri.	125
4.33.	Deney gruplarında ortalama apoptotik hücre sayısı.	126
4.34.	Kontrol grubuna ait seminifer tübül kesitlerinde apoptotik inceleme.	127
4.35.	BPA grubuna ait seminifer tübül kesitlerinde apoptotik inceleme.	127
4.36.	DEHP grubuna ait seminifer tübül kesitlerinde apoptotik inceleme.	128
4.37.	BPA+DEHP grubuna ait seminifer tübül kesitinde apoptotik inceleme.	128

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sperm parametreleri.	10
2.2. Hipotalamus-hipofiz-gonad aksı kontrol mekanizması.	13
2.3. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri.	43
4.1. Ortalama doğum ağırlıkları.	100
4.2. Çalışma gruplarının laktasyon dönemi sonu ortalama vücut ağırlıkları.	101
4.3. Ötenazi öncesi (12. Hafta) ortalama vücut ağırlıkları.	102
4.4. Ortalama testis ağırlıkları.	103
4.5. Ortalama epididimis ağırlıkları.	104
4.6. Rölatif testis ağırlıkları.	105
4.7. Rölatif epididimis ağırlıkları.	106
4.8. Plazma folikül stimüle edici hormon düzeyleri.	111
4.9. Plazma lüteinize edici hormon düzeyleri.	112
4.10. Plazma testosteron düzeyleri.	113
4.11. Plazma estradiol düzeyleri.	114
4.12. Plazma dehidroepiandrosteron sülfat düzeyleri.	115
4.13. Plazma seks hormon bağlayıcı globulin düzeyleri.	116
4.14. Ortalama sperm sayısı.	117
4.15. Çalışma gruplarına ait sperm motilitesi.	118
4.16. Çalışma gruplarına ait sperm morfolojisi.	120
4.17. Testis total glutatyon düzeyleri.	122
4.18. Testis malondialdehit düzeyleri.	123
4.19. Testis karbonil düzeyleri.	124
4.20. Testis 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin düzeyleri.	125
4.21. Testis dokusu apoptotik hücre sayısı.	126
5.1. Sperm parametrelerinin değerlendirilmesi.	136
5.2. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi.	138
5.3. Testis apoptotik hücre sayısı.	142

1. GİRİŞ

Endokrin bozucu kimyasal maddeler (EDC), hormonların sentez, salgılama, taşıma, metabolizma, eliminasyon, reseptöre bağlanma ve doğal homeostazını etkileyen, üreme ve gelişimsel sorunlara neden olabilen, doğal veya sentetik yapıda bulunabilen ekzojen maddelerdir (1).

Bu maddeler, sentetik olarak endüstriyel alanlarda üretilbileceği gibi çevrede doğal olarak da bulunabilir. Sentetik endokrin bozucular, endüstriyel çözücüler/kaydırıcılar olarak kullanılan kimyasal maddeler ve bunların yan ürünleri, plastikler, ağır metaller, plastizerler, pestisitler, fungusitler ve farmasötik bileşikler gibi çok farklı kimyasal yapıya ve kullanım alanına sahip geniş bir gruptan oluşmaktadır (2-4). Gıda yoluyla temas edilebilen, çeşitli bitkilerde bulunan bazı doğal kimyasal bileşikler de doğal endokrin bozucular olarak tanımlanmaktadır (5, 6).

Endokrin bozucu maddelere, çok yaygın bir şekilde ve çok farklı kaynaklardan maruz kalmak mümkündür. Özellikle endüstriyel alanlarda çevresel kontaminasyona bağlı olarak çok sayıda kimyasal madde karışım halinde toprağı ve yeraltı sularını kontamine edebilmekte ve yakın çevredeki bireylerin doğrudan temasına yol açabilmektedir. Bu kimyasal karışımların yine besin zincirinde birikerek çevreye, hayvanlara ve insanlara ulaşabileceği bilinmektedir (2, 3). Ayrıca kozmetik ürünlerin, oyuncakların, kaplama materyallerinin, plastik yemek kaplarının, şişelerin, bebek ürünlerinin ve çeşitli ev kimyasallarının kullanımı endokrin bozucu maddelere bireysel maruziyetin önemli bir diğer kaynağıdır. Bu maddelerin üretildiği çeşitli endüstriyel alanlarda çalışan kişilerde görülebilecek mesleki maruziyetler de çok önemli sonuçlar doğurabilmektedir (2).

Endokrin bozucu maddeler arasında bisfenol A (BPA) ve ftalatlar sıklıkla maruz kalınan bileşiklerdir. Ftalatlar, plastik malzemelerin esneklik ve yumuşaklığını arttırmak için kullanılan kimyasal maddeler olup tekstil ürünleri, oyuncaklar, plastik şişeler, kan transfüzyon torbaları ve medikal malzemeler, kozmetikler, parfümler ve sabunlar dahil kişisel bakım ürünlerinde ve gıda ambalajlamada kullanılır ve yüksek miktarlarda üretilip tüketilir (7-9). Kullanımlarının yaygın olması ve plastik materyalden kolayca uzaklaşabilmeleri nedeniyle ftatlara oral, inhalasyon ve dermal

yollarla ciddi maruziyetler söz konusudur (10). BPA, plastik monomeri olarak yemek kapları, bebek biberonları, yapıştırıcılar, boya tozları ve diş hekimliğinde dolgu maddesi olarak kullanılan östrojenik etkili endokrin bozucu bir kimyasal maddedir. BPA, günümüzde dünya genelinde en çok üretilen kimyasal maddelerden biridir (11, 12). BPA'nın çevrede yaygın olarak bulunduğu bilinmekte ve başlıca maruziyetin diyet ve su ile olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, otomobil, elektronik eşya, spor malzemeleri, CD ve DVD kaplama işlerinde çalışanlarda mesleki maruziyetin de söz konusu olduğu bilinmektedir (13-15). Diğer taraftan, BPA'ya solunum ve deri yoluyla maruziyet de söz konusudur (16, 17).

Endokrin bozucu maddelere yaşamın değişik dönemlerinde maruziyet başta üreme sistemi olmak üzere organizmada pek çok sistem üzerinde istenmeyen etkilere yol açabilmektedir. Özellikle fetal dönem ile çocukluk dönemindeki maruziyetin etkilerinin çok daha önemli olabileceği ve ciddi sonuçlara yol açabileceği üzerinde durulmaktadır. Bununla birlikte, prenatal maruziyetin etkilerini inceleyen çalışmalar son derece sınırlıdır. Mevcut çalışmaların sonuçları, bu kimyasal maddelere prenatal maruziyetin normal hücre ve doku gelişimini bozarak ve gelişim süresince birçok işlevi etkileyerek sonraki dönemlerde görülebilecek üreme sorunları, metabolik ve hormonal bozukluklara yol açabileceğine işaret etmektedir. Gelişim açısından kritik olan bu dönemlerde endüstrileşme ve değişen yaşam koşulları nedeniyle değişik kimyasal maddelere karışım halinde maruz kalınması da önemli bir sorundur ve kombine maruziyet ile ortaya çıkabilecek ters etkilerin şiddetlenebileceği öngörülmektedir.

Bu bilgiler ışığında planlanan bu tez çalışmasında, yaygın kullanılan çevresel kirleticiler olarak tanımlanan ve endokrin bozucu etkileri ile ön plana çıkan BPA ve di 2-etilhekzil ftalata (DEHP) prenatal dönem ve erken postnatal (laktasyon) dönemde tek tek veya karışım halinde maruziyetin, erkek üreme sistemi üzerindeki istenmeyen etkilerinin sıçanlarda, sperm sayısı, motilitesi, morfolojisi, üreme hormon düzeylerindeki değişikliklerin incelenmesi, testiküler dokudaki histopatolojik ve apoptotik değişikliklerin irdelenmesi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu istenmeyen etkilerin altında yatması olası mekanizmalardan biri olarak oksidatif stres oluşumunun, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, oksidatif DNA hasarı ve

glutasyon düzeylerinin incelenmesi ile değerlendirilmesi de tezin diğer amacını oluşturmaktadır.

Tez çalışması kapsamında Sprague Dawley türü gebe sıçanlar kontrol, BPA, DEHP, BPA ve DEHP olmak üzere dört gruba ayrılmış; gebeliğin 6-21.günleri ve laktasyon döneminde (21 gün) test maddeleri oral gavaj yolu ile uygulanmıştır. BPA ve DEHP için seçilen dozlar üreme sistemi için en düşük ters etki gözlenen düzey (LOAEL) olarak belirlenen dozlardır.

Tüm gruplardaki gebelerden doğan erkek yavrular laktasyon dönemi (3 hafta) sonrası 21. günde sütten kesilmiş; randomize olarak seçilerek alt çalışma grupları oluşturulmuş ve erkek üreme sisteminin gelişiminin tamamlandığı erişkinlik döneminde (postnatal 12. haftada) derin anestezi altında intrakardiyak kan alınması yöntemi ile hayatları sonlandırmıştır. Bu erkek sıçanların sperm parametreleri (sperm sayısı, sperm motilitesi, sperm morfolojisi) incelenmiş, plazma üreme hormon düzeyleri saptanmış, testiküler histopatolojik ve apoptotik değişimler kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, testis dokusunda oksidatif stres parametreleri (lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu, total glutasyon düzeyleri, oksidatif DNA hasarı) belirlenmiştir.

Tez çalışmasından elde edilen verilerin karşılaştırmalı değerlendirilmesi ile

- Gebenin endokrin bozucu kimyasal maddelere gebeliği süresince ve takiben laktasyon döneminde devam eden maruziyetinin yavrulardaki etkilerinin özellikle erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri yönüyle detaylı olarak değerlendirilmesi mümkün olabilmektedir. Dolayısıyla endokrin bozucuların etkilerine en duyarlı olduğu bilinen fetal ve neonatal dönemde olası maruziyetin sonuçları incelenebilmiştir.
- Aynı anda BPA ve DEHP'e maruz kalınması durumunda ortaya çıkabilecek istenmeyen etkilerin gerek kontrol grubu gerekse tek başına maruziyet grupları ile karşılaştırmalı değerlendirilmesi suretiyle fetal ve neonatal dönemde kombine maruziyetin erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri irdelenebilmiştir.

- BPA ve DEHP maruziyeti ile oluşabilecek erkek üreme sistemi üzerindeki istenmeyen etkilerin altında yatması olası mekanizmalardan biri olarak oksidatif stres varlığı (protein oksidasyonu, lipit peroksidasyonu, glutatyon düzeylerindeki değişim, oksidatif DNA hasarı) kapsamlı olarak değerlendirilebilmiştir.

Özellikle, endokrin bozucu maddelere aynı anda prenatal ve erken postnatal maruziyetin etkilerinin incelendiği bu kapsamda bir çalışmaya rastlanmamış olması yönünden, sunulan tez çalışması özgün bir çalışma niteliğindedir.

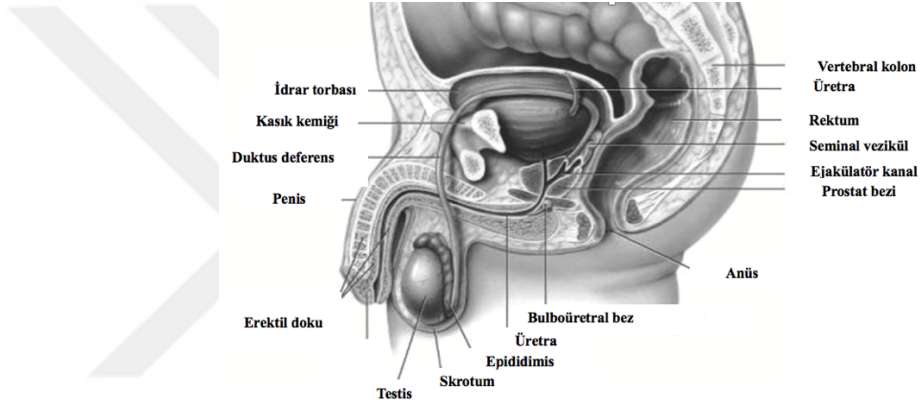


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi ve Bozuklukları

2.1.1. Erkek Üreme Sistemi

Memelilerde erkek üreme sistemi, iç ve dış genital organlar olarak iki gruba ayrılır. Testis, epididimis, vas deferens, aksesuar bezler (seminal vezikül ve prostat) iç genital organları oluşturur. Dış genital organlar ise skrotum ve penistir (Şekil 2.1.). Birlikte çalışan ancak farklı görevlere sahip olan bu organların ana görevi spermatozoa üretmek ve bunları dışı üreme organına bırakmaktır (18, 19).

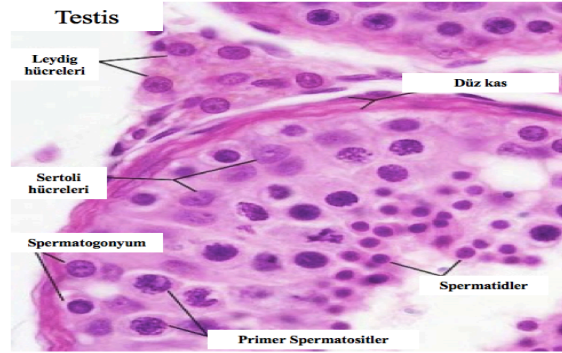


Şekil 2.1. Erkek üreme sistemi yapısı.

Skrotum testisi içine alan, deri ve fibromusküler yapıda bir torbadır. Penisin alt kısmında her iki uyluk arasında yer alır. Skrotum cildi incedir ve üzerinde yoğun olarak sinir ucu bulunmaktadır. Bu sinir uçları nedeniyle ısıya oldukça hassastır. Torbanın vücut dışında bulunmasının nedeni spermilerin canlı kalabilmeleri için vücut ısısından daha düşük bir ortama (35°C) ihtiyaç duymalarıdır. Skrotum bu ısı dengesini kremasterik refleks, spermatik kordda kan akımının değiştirilmesi, skrotal derinin katlanması, ve skrotal derideki ter bezlerinin çalışması gibi farklı fizyolojik mekanizmalarla sağlamaktadır (20, 21).

Testisler skrotumun içinde yer alır, fibröz septumla yaklaşık 300 lobüle bölünür. Erkek üreme sisteminin merkezi kabul edilen testisler, seminifer tübüller ve interstisyel olmak üzere iki bölümden oluşan bir çift organdır (22). Kıvrımlı seminifer tübül halkalarından her birinin iki ucu da epididimisin başındaki bir kanal ağına açılır.

İnterstisyel alanda kan ve lenf damarları, fibroplastik destek hücreleri, mast hücreleri, makrofajlar ve Leydig hücreleri bulunur. Testislerin seminifer tübüllerinde Sertoli hücreleri ve Sertoli hücrelerinin aralarında da spermatogenik hücreler bulunmaktadır (Şekil 2.2.). Spermatazoa oluşumu burada gerçekleşir. Androjen üretimi ve spermatogenez bu organlarda gerçekleşmektedir (23, 24).



Şekil 2.2. Testis dokusu histolojik yapısı.

Sertoli hücreleri seminifer tübül içindeki somatik hücrelerdir. Seminifer epitelin gerçek epitel hücrelerini temsil eder ve bazal laminadan lümeneye kadar uzanır. Bu hücreler, sperm hücreleri etrafında farklı bağlantılar oluşturarak sperm hücrelerine olgunlaşmalarının her aşamasında destek olur (22, 25, 26).

Komşu Sertoli hücreleri birbirlerine sıkı bağlantılarla bağlıdır ve kan testis engelini oluşturur. Bu sıkı bağlantının amacı seminifer tübül lümeninde bulunan ve içerik olarak plazmadan oldukça farklı olan sıvının dolaşıma geçerek immün yanıt oluşturmalarını engellemektir. Sertoli hücrelerinin görevleri aşağıda sıralanmıştır (21, 22, 25, 26):

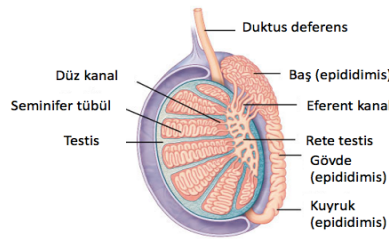
- Sertoli hücrelerinin çalışması hormonal (folikül stimüle edici hormon [FSH], testosteron) ve parakrin kontrole bağlıdır. Sertoli hücreleri androjen reseptörlerini ve FSH reseptörlerini eksprese eder.
- Sertoli hücreleri CYP19 enzimini (aromataz) eksprese eder. Bu enzim Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronu estradiole dönüştürür. Bu lokal estrogen oluşumunun spermatogenezi artırdığı düşünülmektedir.

- Sertoli hücreleri adluminal kompartman, seminifer tübül lümeni ve erkek üreme sisteminin proksimal kısmında androjen seviyesini yüksek tutan androjen bağlayıcı proteinleri (ABP) de üretir.
- Sertoli hücreleri yüksek hacimlerde ürettikleri salgılar sayesinde spermatozoanın epididimise hareketini sağlar.
- Spermiyogenez sırasında spermatozoa tarafından dökülecek artık cisimcikleri ve ölü sperm hücrelerini ortadan kaldırmaktır.
- Önemli bir endokrin role sahip olan Sertoli hücreleri, antimüllerian hormon (AMH) ve inhibin salgılar

Peritübüler kompartmanda Leydig hücreleri ve testosteronu periferik dolaşıma gönderen ve Sertoli hücreleri aracılığıyla seminifer tübüllere besin sağlayan kılcak damar ağları bulunmaktadır (22).

Leydig hücreleri, testiste peritübüler kompartmanda bulunan steroidojenik stromal hücrelerdir ve ana görevleri testosteron üretimidir. Lütinize edici hormon (LH) Leydig hücrelerinde reseptör uyarımı oluşturur ve testosteron üretimi meydana gelir. LH salgılanması uzun dönemde Leydig hücre büyümesi ve çoğalmasını destekler (25-27).

Spermatozoaların iletiliği yolun ikinci bölümü olan epididimis, spermilerin depolandığı organdır. Baş (caput), gövde ve kuyruk (cauda) olmak üzere üç bölümden oluşur (Şekil 2.3). Testiste oluşan spermatozoalar epididimisin baş kısmına girerler ve kuyruk kısmına geçip burada depolanırlar. Girişte olgunlaşması ve motilitesi tam olmayan spermier bu taşınma esnasında hareket yeteneği kazanır ve vas deferense peristaltik hareketlerle taşınırlar. Spermier ejakülasyon esnasında vas deferensten üretraya aktarılır (20, 22, 27-29).



Şekil 2.3. Testis ve epididimis yapısı.

Spermatozoaları ileten kanalın epididimisten sonra gelen kısmı vas deferenstir, epididimisin kuyruk kısmından başlayarak testisin arka kenarında yukarı doğru uzanır (21).

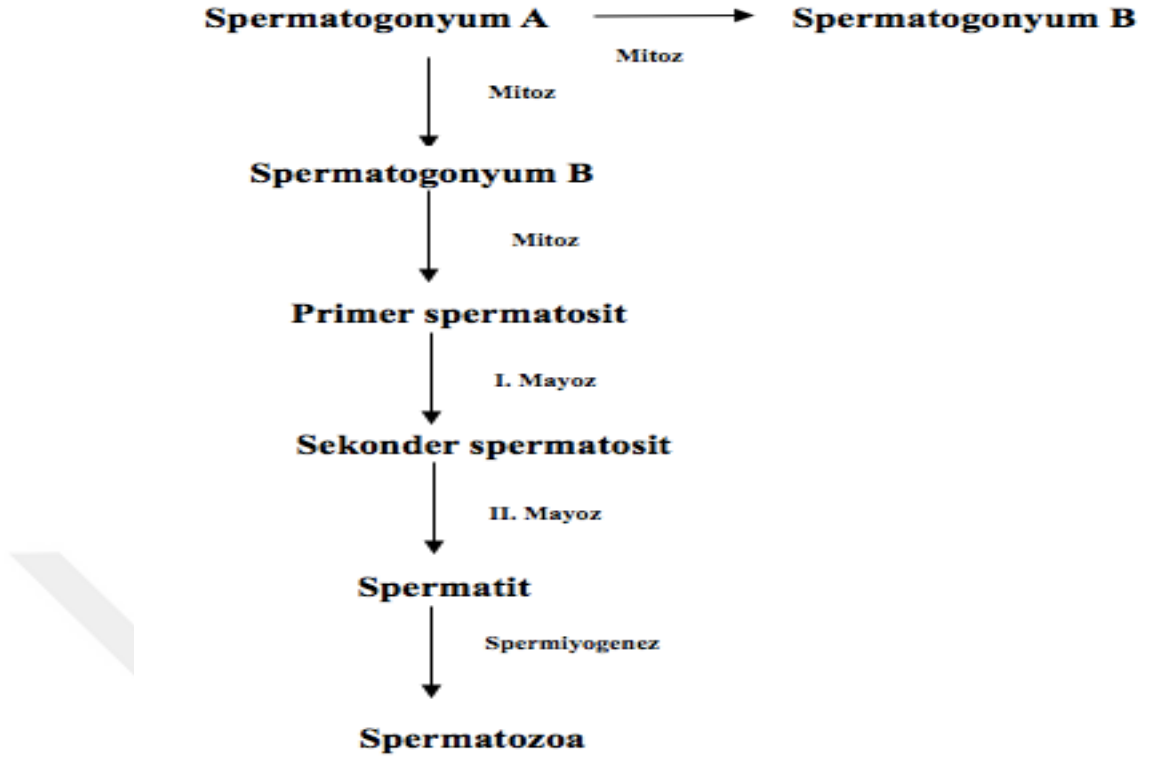
Aksesuar bezler, seminal vezikül ve prostattan oluşur. Prostat, mesanenin alt tarafında ve rektumun önünde bulunur. Çinko, spermin, kolesterol, proteazlar, asit fosfataz, sitrik asit ve fosfolizin içeren alkali bir sıvı salgılar. Bu salgı döllenmenin gerçekleşmesi için oldukça önemlidir. Mesane tabanının arkasında bulunan seminal vezikülün iç tarafında üreter, arka tarafında ise rektum bulunur. Salgısı spermatozoa gelişimi açısından oldukça önemlidir (21, 22, 29).

Penis, ejakülatı vajinaya taşıma ve üretilen idrarın vücuttan atılması gibi görevlere sahiptir. Yüzeyinde cinsel uyarılmayı sağlayan hassas sinir uçları bulunmaktadır (22).

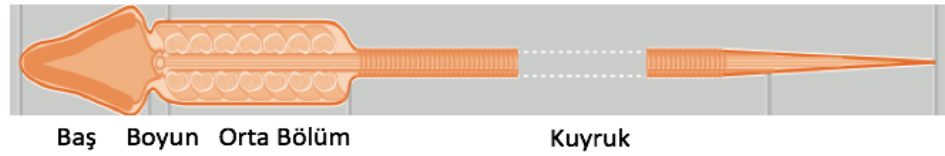
Spermatogenez ve Spermiyogenez

Spermatogonyumun spermatozoaya dönüşmesi sırasında gerçekleşen olaylar spermatogenez olarak adlandırılır. Spermatogenez ergenlik ile başlar ve gonadotropik hormonların uyarısı sonucunda testislerin seminifer tübül epitelinde gerçekleşir. Erişkin erkeklerin testis ve epididimisinde yaklaşık 64-74 günde endokrin ve parakrin kontrolle gerçekleşen bir prosestir (20, 22).

Spermatogonyum adı verilen erkek üreme kök hücreleri, iki diploid hücreye mitozla bölünür. Bunlardan biri “Spermatogonyum A” hücresi olarak kalırken, diğeri “Spermatogonyum B” hücresine dönüşür. Takiben “Primer spermatosit”ler oluşur. Her diploid spermatosit mayoz I sürecine girer ve 2 haploid ikincil spermatositlere ayrılır. İkincil spermatositler, 4 haploid spermatid hücre oluşturmak için mayoz II'den geçer ve yuvarlak spermatidleri oluştururlar. Yuvarlak spermatid hücreler spermiyogenez olarak bilinen karmaşık bir süreçten geçer. Bu süreç sırasında çekirdek olgunlaşması ve hücre zarına doğru hareket etmesi, akrozom oluşumu ve diğer farklılaşma mekanizmalarından oluşur. Spermiyogenezden sonra sperm hücresi ya da spermatozoa olarak adlandırılırlar ve epididimise aktarılırlar (Şekil 2.4.). Epididimiste olgunlaşmalarını tamamlar ve hareket yeteneği kazanırlar (22, 29, 30). Sperm yapısı Şekil 2.5.'de yer almaktadır.



Şekil 2.4. Spermatogenez.



Şekil 2.5. Spermin yapısı.

Ergenlik öncesi hormonal uyarı olmadığı için spermatogenez gerçekleşmez. Ergenlikle birlikte, LH ve FSH üretimi ile spermatogenez başlar. FSH'nın Sertoli hücreleri ve spermatogonyaların sayısının artmasına katkıda bulunduğu ve Sertoli hücrelerindeki spesifik reseptörlerle etkileşerek spermatogonyal olgunlaşmayı teşvik ettiği düşünülmektedir. LH salgılanması ile testislerde testosteron üretimi tetiklenir. Testosteron, spermatogonyum (diploid, 46 kromozom) olarak bilinen testislerdeki kök hücrelerinin spermatozoidlere dönüşme sürecini ve bu süreçte normal mayoz ve mitoz bölünmeler gerçekleşmesini kontrol eder (29, 31).

Sperm Parametreleri

“Semen” seminal sıvı da denilen ve fertil memelilerde spermatzoa’yı da içinde bulunduran, orgazm sırasında dışarı atılan (ejakülasyon) organik bir sıvıdır. Spermle birlikte, seminal veziküller, prostat Cowper bezleri ve üretral bezlerin salgılarını içerir. Sperm dişi üreme sisteminde çeşitli aşamalardan sonra, yumurtayı döller. Bu olaya “fertilizasyon” adı verilir (19, 21). Spermin fertilizasyon yeteneği sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi gibi parametrelerle belirlenir (32, 33).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından belirlenen kriterlere göre sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi değerlendirilmektedir. DSÖ’nün 2010 yılında yayınladığı rehberine göre sperm parametreleri için normal kabul edilen değerler aşağıdaki Tablo 2.1.’de yer almaktadır (29, 34).

Tablo 2.1. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sperm parametreleri.

Parametre	Düzey	%5’lik Aralık
Semen Hacmi	1,5 mL	1,4-1,7
Sperm Sayısı (sayı/ejak.)	39×10^6	33-46
Sperm Konsantrasyonu (sayı/mL)	15×10^6	12-16
Progresif Motilite	%32	31-34
Total Motilite	%40	38-42
Canlılık	%58	55-63
Normal Morfoloji	%4	3-4

Normal sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi normozoospermi ile ifade edilmektedir. Sperm anomalileri aşağıdaki şekilde sıralanabilir (29).

- Aspermi: Semen ya da ejakulat üretilmemesi ya da ejakulatın ters yöne (mesaneye) hareket etmesi
- Oligozoospermi: Toplam sperm sayısında azalma
- Astenozoospermi: Motilite yüzdesinde azalma

- Tetrazoospermi: Morfolojik olarak normal sperm yüzdesinde azalma
- Azospermi: Ejakülatta sperm olmaması
- Hematospermi: Semen içerisinde kırmızı kan hücresi bulunması
- Lökospermi: Semen içerisinde beyaz kan hücresi bulunması
- Nekrozospermi: Canlı sperm sayısında azalma ve hareketsiz sperm sayısında artma

Sperm Morfolojisi: Normal insan spermlerinin baş çapı 5-6 μm x 2.5-3.5 μm , kontürleri düzgün ve oval olmalıdır. Akrozom, ön sperm başının %40-70'ini oluşturmaktadır. Spermin orta kısmı baş kısmına aksiyel olarak bağlı ve 1 μm 'den dar olmalıdır. Orta kısmın uzunluğunun baş kısmın uzunluğunun 1,5 katı olması gerekmektedir. Kuyruğun düz, orta kısımdan biraz ince olması gerekir. Sperm başları amorf, küçük, büyük, duplike, olgunlaşmamış olabilir. Orta kısmın kalın veya ince olması mümkündür. Kuyruk boyu 4.5 μm olmalıdır. Anomali olarak kuyruklarda çatallanma, dolanma, helezon oluşumu veya kopmalar, başsız kuyruklar veya kuyruksuz başlar görülebilir. Sperm morfolojisi için genelde "DSÖ Kriterleri", "Kruger'in Kriterleri (Kruger's Strict Criteria)" veya "Tygerberg'in Kriterleri (Thyberg Strict Criteria)" kullanılır (35, 36).

2.1.2 Erkek Üreme Sistemi Bozuklukları

Erkek üreme sistemi, birçok organ ve dokunun birlikte çalışmasıyla işlevini yerine getirir. Hormonal düzenlemeler de sağlıklı bir işleyiş açısından oldukça önemlidir. Bu karmaşık çalışma sisteminin herhangi bir basamağında ortaya çıkacak bozukluk sağlıklı işleyişi bozacaktır. Çok sayıda ilaç, kimyasal madde, çevresel kirletici, kronik hastalık, enfeksiyon etkeni, tümör, travma, genetik bozukluklar ve yapısal anomaliler erkek üreme sisteminde aşağıdaki bozukluklara neden olabilmektedir (37).

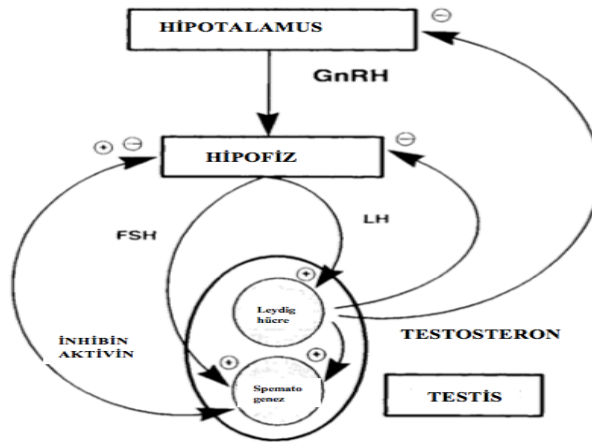
- Hipotalamus ve hipofiz bezi: Kallmann sendromu, hipogonadizm, gecikmiş puberte, hormon salgılanmasında bozukluklar
- Testisler: Konjenital bozukluklar, Klinefelter sendromu, steroid sentez bozuklukları, yapısal kromozal anomaliler, testiküler tümörler, ekzojen kaynaklı sistemik bozukluklar, idiyopatik infertilite

- Geç başlangıçlı hipogonadizm
- Seminal kanallar ve aksesuar bezler: Enfeksiyonlar, kistik fibrozis, immünolojik infertilite
- Erektile disfonksiyon, penis deformasyonu
- Androjen hedef organları: Jinekomasti, androjen insensitivite sendromu, estrogen rezistansı, estrogen eksikliği, androjenik alopesi

Fertilite bozukluklarının altında yatan temel nedenlerin en önemlilerinden biri oksidatif stresdir. Oksidatif stresin hem birçok hastalığın nedeni ve/veya sonucu olarak, hem de birçok çevresel kirlenici ve sigara, alkol, marihuana gibi bağımlılık yapan maddelere ve çevresel kirlenicilere maruziyet esnasında gelişerek spermatogenez olumsuz etkilediği bildirilmektedir. Bu etkinin spermiyogenezin hangi aşamasında olursa olsun, fertiliteyi olumsuz yönde etkilediği ve fertilitenin azalmasına ya da tamamen ortadan kalkmasına neden olduğu rapor edilmiştir (38, 39).

2.2 Üremede Rol Alan Hormonlar

Üremede rol alan hormonlar hipotalamus-hipofiz-gonad aksını (Şekil 2.6.) oluşturan endokrin bezler tarafından salgılanır. Bu aksı oluşturan bezlerin çalışmaları uyarılmalarına ve bazı negatif geribildirimlere göre düzenlenir. Negatif geribildirim, periferik bir bezden salgılanan hormonun hipotalamus ve hipofiz bezindeki hücrelerde reseptörlere bağlanarak salgıladıkları hormonları inhibe etmesi olarak özetlenebilir. Bu geribildirim mekanizması sayesinde hormonal homeostaz sağlanır (19, 22, 29).



Şekil 2.6. Hipotalamus-hipofiz-gonad aksı (40).

Hormonal homeostazın sağlanmasındaki diğer bir mekanizma da reseptörlerde azalma (down regülasyon), artma (up regülasyon) ve desensitizasyon (duyarsızlaşma)'dır. Reseptörlerdeki azalma mekanizması normalden yüksek hormon seviyesine aşırı tepki vermeyi önlemek amacıyla çalışır. Reseptörlerdeki artma ise bunun tersi olarak reseptör sayısının artmasını ve daha düşük düzeydeki hormonlara cevap verilmesini sağlayan bir işleve sahiptir. Desensitizasyon reseptörlerin salgılanan hormonlara duyarsızlaşması olarak açıklanabilir (22).

Bu kontrolü sağlayan üçüncü mekanizma ise otokrin, endokrin ve parakrin düzenlemelerdir (Tablo 2.3.). Otokrin kontrol, bir hormonun üretildiği hücredeki etkiyle kontrol edilmesidir. Parakrin kontrolde hormonu üreten hücre tipi ile aynı dokudan olan başka bir hücre tipinin kontrolü söz konusudur. Endokrin kontrolde ise hormon salgılayan başka salgı bezleri tarafından salgılanan hormonlar ile kontrol sağlanır (22, 41-43).

Tablo 2.2. Hipotalamus-hipofiz-gonad aksı kontrol mekanizması (11).

Hormon	Otokrin Kontrol	Parakrin Kontrol	Endokrin Kontrol
Gonadotropin salıcı hormon (GnRH)	GnRH (-)	GnRH II (+), IGF-1 (+), Kisspeptin (+)	Testosteron (-), Estrojen (-), Nörotensin (+), Norepinefrin (+)
FSH	-	Aktivin (+), Follistatin (-)	GnRH (+), Estrojen (-), İnhibin B (-)
LH	-	Aktivin (+), Follistatin (-)	GnRH (+), Testosteron (-)
Testosteron	-	IGF-1 (+), GH (+) CRH (-), TGF- β (-), IL-1a ($\pm$)	LH (+)

(+) Stimulan Etki, (-) İnhibitör Etki. Dönüştürücü Büyüme Faktörü β (TGF- β), Kortikotropin Salıcı Hormon (CRH), İnterlökin 1 A (IL-1a), Büyüme Hormonu (GH), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1(IGF-1)

2.2.1. Gonadotropin Salıcı Hormon

Hipotalamustan salgılanan gonadotropin salıcı hormon (GnRH), LH ve FSH gibi gonadal hormonların salımını kontrol eden, çok kısa yarı ömürlü bir dekaeptittir. Nöronlarda üretildikten sonra özelleşmiş bir portal sistemle dokulara ulaşır (29, 41).

Otokrin kontrol mekanizmasına sahip olan GnRH'nin, GnRH I ve II olarak adlandırılan iki alt ünitesi vardır. GnRH I'in FSH ve LH salımında rol oynadığı, GnRH II'nin ise GnRH salgılanmasının parakrin kontrolünde etkili olduğu düşünülmektedir (22, 36, 43). Parakrin kontrolde etkili olan diğer bir endojen madde de insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1)'dir. IGF-1 hipotalamustaki GnRH nöronlarını etkiler ve GnRH gen transkripsiyonunu artırır, ayrıca puberte başlangıcında da çok önemli bir rolü vardır (22, 41, 43). Parakrin kontrolde ve puberte başlangıcında etkili olan son bileşik kisspeptindir (34). Endokrin kontrolde estrogen ve testosteron önemli bir yere sahiptir. Testosteron estradiol aromatisasyonu yoluyla etki gösterir. Estradiol, çeşitli nörotransmitterlerin salgılanması ile GnRH sistemine etki eder. GnRH salımı sırasındaki elektriksel iletimin sağlanmasında nörotensin ve norepinefrin etkilidir (29, 41, 44).

2.2.2. Folikül Stimüle Edici Hormon

Folikül stimüle edici hormon, ön hipofizdeki gonadotropinler tarafından sentezlenip salınan glikoprotein yapısında bir hormondur. Salımı GnRH tarafından kontrol edilir (29). FSH- α ve FSH- β olmak üzere iki alt üniteden oluşur; α alt ünitesinde 92 amino asit bulunmaktadır (45). Hormonun şeker kısmında fruktoz, mannoz, galaktoz, galaktozamin, glukozamin ve sialik asit bulunur ve bu kısım hormonun biyolojik yarı ömrü (3-4 saat) yönünden önemlidir (45). Erişkin erkeklerde normal FSH düzeyi 1.5-12.4 IU/L, erişkin kadınlarda ise, siklus ortasında 4.7-21.5 IU/L, menapozda ise 25.8-134.8 IU/L'dir (46).

Folikül stimüle edici hormon, üremede LH ile sinerjik etki gösterir. Erkeklerde FSH Sertoli hücrelerinden salınan androjen bağlayıcı protein üretimini artırır. Bu nedenle spermatogenezde önemli bir göreve sahiptir (44).

Aktivin ve follistatin FSH üretiminin parakrin kontrolünde; GnRH, estrogen, inhibin B ise endokrin kontrolünde rol oynar. Artan FSH konsantrasyonları Sertoli

hücrelerinin inhibin salımını artırır. İnhibin ve follistatin FSH sentezi ve salımının inhibitörü olarak etki gösterirken, aktivin tam tersi etki gösteren bir peptiddir. Sertoli hücreleri inhibin ve aktivin salımını sağlayarak FSH salımının regülasyonunu ve böylece testosteron salımının düzenlenmesini sağlar (47, 48). Testosteron, dihidrotestosteron (DHT) ve estrogenin, FSH ve özellikle de LH salgılanması üzerine negatif etkileri vardır. Sertoli hücreleri testosteron ve FSH ile stimüle olur. Bu stimülasyon ABP gibi proteinlerin ekspresyonunu uyardığı gibi dimerik bir protein olan inhibinin de salgılanmasını uyarır (47, 49).

2.2.3. Lüteinize Edici Hormon

“Lutropin” olarak da bilinen LH, FSH gibi ön hipofizdeki gonadotroplar tarafından sentezlenip salınan glikoprotein yapısında bir hormondur. LH hem erkeklerde hem de dişilerde üreme için esansiyeldir (22, 29). Dişilerde ovülasyonu tetiklerken, erkeklerde Leydig hücrelerinin testosteron üretimini stimüle eder. Dolayısıyla spermatogenezde çok önemli bir role sahiptir. LH proteini, LH- α ve LH- β olmak üzere iki alt üniteden meydana gelir. LH’nın yarı ömrü 20 dakikadır (50). LH reseptörü LH-koryogonotropin reseptörü (LHCGR) olarak adlandırılır (51). Normal LH düzeyleri erkekler için 7-24 IU/L, kadınlar için ise 5-20 IU/L olarak belirlenmiştir (52).

Lüteinize edici hormon salımı da GnRH tarafından kontrol edilir (29). Aktivin LH salgılanmasını uyarırken testosteron ve follistatinin LH salgılanması üzerine negatif geribildirim etkisi vardır (47).

2.2.4. Testosteron

Testosteron, erkeklerde testiste Leydig hücreleri ve kadınlarda yumurtalık tekal hücreleri tarafından üretilen androjen grubundan bir steroid hormondur. Testosteron aynı zamanda her iki sekste de adrenal korteksin zona retikularis bölgesinde ve plasentada üretilir. Tüm diğer steroid hormonlar gibi kolesterolden sentezlenir (53). Erişkin erkeklerdeki testosteron düzeyleri erişkin kadınlara kıyasla 5-90 kez yüksektir. Normal düzeyler erişkin erkeklerde 270-1,070 ng/dL iken, erişkin kadınlarda 15-70 ng/dL olarak verilmektedir (54).

Testosteron kanda plazma proteinlerine bağıl şekilde bulunur. Bu proteinlerden en önemlisi seks hormon bağılayıcı globülin (SHBG)'dir. Fizyolojik koşullarda dolaşımdaki testosteronun %30-45'i SHBG'ne bağıl halde taşınmaktadır. Geri kalan kısım daha düşük affiniteye sahip albümin ve kortikosteroid bağılayıcı globüline bağıl olarak taşınır, kalan %1-2'lik kısım ise serbest halde bulunur. Dolaşımdaki testosteronun serbest formu biyolojik olarak en aktif, proteine gevşek bağıl formu da daha az aktif, ama taşınabilir kısmı oluşturmaktadır (53).

Dolaşımdaki SHBG konsantrasyonları suprafizyolojik düzeylerdeki bazı hormonlara (androjen, glukokortikoidler, östrojen, tiroksin) bağıl olarak değişebilir. SHBG düzeyi; kronik karaciğer hastalığı ve androjen eksikliğine bağıl olarak artabilir, obezite, protein kaybettiren durumlar ve genetik SHBG eksikliği gibi nedenlerle azalabilir (53, 55).

Testosteronun kan düzeyi LH ile doğrudan ilişkilidir. Hipofiz bezinden salgılanan LH'nın kan düzeyi arttıkça Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronun da artacaktır. Ancak, LH ve testosteron düzeyindeki artış GnRH-LH-testosteron eksenini içerisinde geri bildirim bağıl olarak LH düzeyinde bir düşüşe neden olur. IGF-1 testislerde de üretilir. Testiste IGF-1 reseptörleri Leydig hücreleri, spermatositler ve peritübüler hücrelerde bulunur. LH, IGF-1 salgılanmasını ve Leydig hücresi prekürsörlerinin çoğalmasını uyarır. Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), testosteron salgılanmasının parakrin kontrolünde negatif geri bildirim yaparak görev alır. Özellikle LH kendi steroidojenik etkisini azaltmak için TGF- β sistemini kullanır. İnterlökin 1 alfa (IL-1 α), testis Sertoli hücrelerinde üretilir ve steroidojenik akut düzenleyici proteinin (STAR) ekspresyonunu uyararak testosteron salımının parakrin kontrolüne katkıda bulunur. Büyüme hormonu (GH) steroidogenez ve gametogenezde doğrudan ya da IGF-1 salımını düzenleyerek dolaylı olarak rol oynar. Çeşitli çalışmalarda GH eksikliğinin erkeklerde gecikmiş puberte, sperm sayısında ve motilitesinde azalma ve testiküler boyutta küçülme gibi etkileri olduğu görülmüştür (22, 29).

Testosteronun görevleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. Erkeklerde prenatal hayatta skrotum oluşumunu, prostat, seminal veziküller ve fallik mesanenin gelişmesini ve doğumdan sonra seks organlarının özellikle de penisin gelişimini ve daha sonraki dönemde maskülinizasyonu sağlar (53, 56).
2. Ergenlikte sekonder seks karakterleri olarak bilinen sesin kalınlaşması, sakalların çıkması ve vücudun diğer bölgelerinde kıllanmanın oluşmasını sağlar. Ayrıca adem elmasının gelişimi, sebum bezlerinin genişlemesi ve buna bağlı akne oluşumunda rolü vardır. Testislerde doğrudan etkisiyle spermatogenezin başlamasını sağlar (57, 58).
3. Diğer androjenler gibi protein sentezinin ilerlemesini sağlamaktadır. Anabolik etkilerinin arasında kas kitlesini ve gücünü artırmak, kemik dansitesini ve gücünü artırmak, uzamayı ve kemik olgunlaşmasını sağlamak sayılabilir. Testosteronun osteoporoza karşı kemikleri korumada önemli görevleri vardır (57, 59).
4. Her iki sekste de libidonun ve enerjinin artırılmasını sağlar (53, 60).
5. Eritrosit üretiminde rolü vardır (61).
6. Saldırganlık, agresiflik ve motivasyon gibi davranışsal etkileri de bulunmaktadır (53).

Sıçanların ve insanların gestasyon süreleri farklı olduğu için testosteron üretimi farklı zamanlarda gelişir. İnsanlarda testosteron üretimi gestasyonunun 8-37. haftalarında, sıçanlarda ise 15-21. günlerinde olur. İnsanlar için seksüel farklılaşmada en kritik süre ilk trimesterin son günleridir ve farklılaşma 16. haftada tamamlanır. Sıçanlarda ise kritik periyod gestasyonunun son dönemleridir ve bazı seksüel farklılaşmalar postnatal olarak gerçekleşir (62).

2.2.5 Estrojenler

Estrojenler menstrüel siklusda önemli görevleri olan steroid yapısında primer dişi seks hormonlarıdır. Diğer tüm steroidler gibi hücre membranlarından difüze olur

ve estrogen reseptörleri ile etkileşerek etkilerini gösterirler (63, 64). Erişkin erkeklerde normal estradiol düzeyi 10-60 pg/ml, premenapozal kadınlarda 320-400 pg/ml, postmenapozal kadınlarda ise 5-25 pg/ml'dir (65).

Estrojenlerin temel görevleri sekonder dişi seks karakterlerinin oluşturulması, metabolizmanın hızlanması, kas kitlesinin azaltılması, uterusun büyümesinin sağlanması, vajinal duvarın kalınlaştırılması, damar ve derinin sağlamlaştırılması, endometriyumun büyümesinin sağlanması, kemik resorpsiyonunun önlenmesi ve kemik oluşumunun artırılması, yağ alımının azaltılması ve lipolizi artırarak adipoz doku kitlesinin azaltılmasıdır (66). Erkeklerde adipoz doku oluşumu ve farklılaşması, metabolik işleyiş, pankreatik β hücrelerinin çalışması, kemik yapımı, kardiyovasküler sistem ve kan damarlarının çalışması, immün sistem ve beyin işleyişinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir (67). Ayrıca, protein sentezinin artırılması, koagülasyon, lipid metabolizmasını düzenlenmesi, kortizol ve SHBG düzeylerinin artırılmasını sağlarlar (68).

2.2.6. Dehidroepiandesteron Sülfat

Adrenal kortekste kolesterolden sentezlenen dihidroepiandesteron sülfat (DHEAS), 5-6 yaşlarından itibaren üretilir. Bu adrenal androjen üretiminin başlangıcı adrenarş olarak adlandırılır ve yaklaşık 8-9 yaşlarında aksiller ve kasık kılların oluşumuna katkıda bulunur. DHEAS seviyeleri 20'li yaşların ortalarında pik yapar ve daha sonra giderek azalır. Bazı periferik dokularda (meme, saç folikülleri) DHEA ve androstenedion'u potent androjenlere (testosteron ve dihidrotestosteron) veya potent estrogenlere (estradiol) dönüştürebilir. Periferik dokulardaki bu dönüşüm fazla adrenal androjen üretimine bağlı olarak dişi fetüs ya da erişkin kadınlarda maskülinizasyona yol açabilir. DHEAS albümine yüksek affiniteyle bağlanır ve yarı ömrü 7-10 saattir. Erkeklerde adrenal androjenlerin periferde aktif androjenlere dönüşümü çok azdır, kadınlarda ise bu oran vücutta üretilen toplam androjenlerin %50'sini bulmaktadır (22).

2.3. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler

Endokrin bozucular, Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından homeostazın korunması ve gelişim süreçlerinin düzenlenmesinden sorumlu olan hormonların

üretimi, salgılanması, taşınması, metabolizması, eliminasyonu, reseptörlere bağlanması ya da etkisi ile ilgili değişikliğe neden olan ekzojen (dış kaynaklı) maddeler olarak tanımlanmıştır (69). DSÖ ise endokrin sistemin fonksiyonunu değiştiren ve buna bağlı olarak maruz kalan organizmada ve sonraki nesillerde ters etkilere yol açan dış kaynaklı bir madde veya madde karışımlarını endokrin bozucu olarak ifade etmiştir (70).

Endokrin bozucu kimyasal maddelere (EDC) maruziyetle ilişkisi olduğu düşünülen çeşitli hastalıkların günümüzde artış göstermesi bu konuya olan ilgiyi arttırmıştır. Toksik etkilerinin anlaşılması, toksisite mekanizmalarının aydınlatılması, risk değerlendirmelerinin yapılması ve bu kimyasal maddelerin kullanımının sınırlandırılması açısından çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Endokrin bozucular sentetik olarak endüstriyel alanlarda üretilebileceği gibi çevrede doğal olarak da bulunabilir. Sentetik EDC'ler; endüstriyel çözücüler/kaydırıcılar olarak kullanılan kimyasal maddeler ve bunların yan ürünleri (polikarbonlu bifeniller [PCB], polibromlu bifeniller [PBB]), plastikler (bisfenol A [BPA]), ağır metaller (kurşun, kadmiyum, civa), plastizerler (ftalatlar), pestisitler (metoksiklor, klorprifos, diklorodifeniltrikloroetan [DDT]), fungusitler (vinklozolin) ve farmasötik bileşikler (dietilstilbesterol [DES]), gibi çok farklı kimyasal yapıya ve kullanım alanına sahip geniş bir gruptan oluşmaktadır (2-4). İnsan ve hayvanlara besin olarak ulaşabilen, çeşitli bitkilerde bulunan doğal kimyasal bileşikler (genistein, daidzein gibi fitoöstrojenler) de doğal endokrin bozuculardır. Fitoöstrojenler olarak bilinen doğal endokrin bozucu bileşiklerin estrogen reseptörlerine (ER) affiniteleri çok düşük olsa da özellikle çocuk besinlerinin içeriğinde bulunmaları nedeniyle önemli sorunlara yol açabileceği bilinmektedir (5, 6). Bu doğal ve sentetik kimyasal maddeler molekül yapısı ve molekül ağırlığı gibi fizikokimyasal özellikler açısından hormonlardan çok farklı olsalar bile endokrin bozucu etki gösterebilmektedir (2, 3).

Endokrin bozucu kimyasal maddelere dünya genelinde çok yaygın bir şekilde ve çok farklı kaynaklardan maruz kalmak mümkündür. Kazai olarak toplu maruziyetin ve doğurdıkları ciddi sonuçların tarihte çeşitli örnekleri bulunmaktadır. Özellikle endüstriyel alanlarda çevresel kontaminasyona bağlı olarak çok sayıda kimyasal

madde karışım halinde toprağı ve yeraltı sularını kontamine edebilmekte ve yakın çevredeki bireylere doğrudan temas edebilmektedir. Bu kimyasal karışımların yine besin zincirinde birikerek çevreye, hayvanlara ve insanlara ulaşabileceğı bilinmektedir (2, 3). Ayrıca kozmetik ürünlerin, oyuncakların, kaplama materyallerinin, plastik yemek kaplarının, şişelerin, bebek ürünlerinin ve çeşitli ev kimyasallarının kullanımı EDC'lere bireysel maruziyetin başka önemli bir yoludur. Pestisit/fungisit kullanımı veya bu maddelerin üretildiğı çeşitli endüstriyel alanlarda çalışan kişilerde görülebilecek mesleki maruziyetler de çok önemli sonuçlar doğurabilmektedir (2).

Bazı EDC'lerin endüstriyel kullanımları açısından uzun yarılanma ömrüne sahip olmaları üstünlük sağlamakla birlikte, çevre ve insan sağlığı açısından daha uzun yıllar risk oluşturabilmektedirler. Yıllar önce yasaklanmış çeşitli maddelerin (DDT gibi) çevrede, insan ve hayvan vücudunda hala tespit ediliyor olması bu dayanıklılığın bir sonucudur (71, 72). Dayanıklılığı yüksek olan, uzun yarılanma ömürlü kimyasal maddeler birikerek besin zinciri ile aktarılabilir. Su döngüsü, kuvvetli rüzgarlar ve çeşitli doğa olaylarına bağılı olarak uzun yıllar etki gösterebilir ve dünyanın çeşitli bölgelerine bozulmadan yayılabilirler. BPA gibi yarılanma ömrü çok uzun olmadığı düşünülen (son araştırmalar yarılanma ömrünün düşünüldüğünden daha yüksek olduğunu düşündürmektedir) bileşiklerin de yaygın kullanımlarına bağılı olarak yüksek kontaminasyon riski olduğu bilinmektedir (2, 73).

Endokrin bozucu kimyasal maddeler; normal hormon salgılanmasını inhibe ya da stimüle ederek, hormonların metabolizmalarını değiştirerek ya da bağlanma yerlerini etkileyerek fizyolojik hormon düzeylerini değiştirir ve hormonal homeostazi bozar. EDC'lerin başlıca nükleer hormon reseptörleri (ER, androjen reseptörleri [AR], progesteron reseptörleri ve tiroid reseptörleri), retinoid reseptörler ve diğer hormon reseptörleri aracılığıyla etki gösterdiği düşünülmektedir (2, 74). Yapılan araştırmalar, EDC'lerin nonsteroid reseptörleri, transkripsiyonel koaktivatörleri, steroid biyosentezi ve/veya metabolizmasında rol oynayan enzimatik yolları etkileyerek farklı mekanizmalarla da etkilerini gösterebileceğini ifade etmektedir (3, 74). Diğer az bilinen mekanizmalar ise; genler üzerindeki doğrudan etkiler ve bunların epigenetik etkileridir (74-76). Bu etkilerin gelişimin erken dönemlerinde görülmesi; ileriki yıllarda ortaya çıkabilecek rahatsızlıklara yol açması ve gelecek nesillere aktarılma

ihtimali açısından oldukça önemlidir (76).

Endokrin bozucu kimyasal maddelere maruziyet ile ortaya çıkabilecek bozukluklara aşağıda bazı örnekler verilmiştir (2-4, 74, 77-80).

- Prenatal maruziyete bağlı olarak; prematüre doğum, düşük doğum ağırlığı, malformasyonlar, ileriki yaşlarda kanserler (DDT, PCB'ler, BPA, ftalat esterleri)
- Erkek üreme sistemi; erken ve gecikmiş puberte, düşük sperm kalitesi, malformasyonlar, infertilite, testiküler kanserler, prostat kanseri (Ftalat esterleri, pestisitler, PCB'ler, DES, BPA, arsenik, kadmiyum)
- Kadın üreme sistemi; puberte prekoks, prematür telarş, gecikmiş puberte, polikistik over sendromu, kısırlık, üreme organlarında anomaliler, endometriozis, menstrüel döngü ve yumurtalık işlevlerinde bozulmalar, erken menapoz, meme ve üreme sistemi kanserleri (BPA, PCB'ler, ftalat esterleri, pestisitler, kurşun, DES, dioksinler)
- Tiroid hormon bozuklukları (BPA, dioksinler, PCB'ler, pestisitler, DES, geistein, ftalatlar, furanlar, polibromlu difenil eterler [PBDE], perkloratlar)
- Nöroendokrin etkiler; GnRH nöronları üzerine etkiler, hipotalamus-hipofiz-gonad aksında problemler, davranışsal problemler, öğrenme ve hafıza bozuklukları (PCB'ler, pestisitler, genistein, BPA, dioksinler, PBDE'ler, kadmiyum, metil civa, kurşun, bakır)
- Obezite ve diyabet gibi metabolik bozukluklar (pestisitler, BPA, DES, genistein, kurşun, ftalatlar, PCB'ler, perflorooktanoik asit [PFOA], nonifenol, PBDE'ler)

2.3.1. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelerin Etkilerini Değiştirebilen Etmenler

Endokrin bozucu kimyasal maddelere maruziyetin etkilerini değiştirebilen çok çeşitli etmen bulunmaktadır. Bu etmenler; maruz kalınan yaş dönemi, maruz kalınan doz ve süre, birden fazla EDC'ye aynı anda kombine olarak maruz kalma, maruz kalınan dönemden uzun süreler sonra gözlenebilen ters etkiler ve bu etkilerin sonraki nesillere aktarılabilmesi olarak sıralanabilir.

Maruziyet Yaşı

Endokrin bozucu kimyasal maddelere maruz kalınan yaş, ortaya çıkabilecek ters etkiler açısından oldukça önemlidir. Maruziyet yetişkinler üzerinde de önemli sonuçlara neden olabilir, ancak gelişmekte olan organizmalarda bu etkilerin daha ciddi sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir. Yetişkinlerde etki gözlenmeyen maruziyet dozlarında bile gelişmekte olan organizmaların olumsuz olarak etkilenebileceği görülmüştür (2, 81, 82). Embriyonik gelişim döneminde organogenez, doku farklılaşması, biyokimyasal ve moleküler düzeylerde ciddi değişiklikler olmaktadır. Bu değişiklikler sayesinde organizma işlevlerini yerine getirebilecek şekilde olgunlaşmaktadır. Dolayısıyla bu dönemde meydana gelecek küçük aksaklıklar bile çok ciddi sonuçlar doğurabilmektedir (80). Ayrıca, fetus ve yeni doğanda DNA onarım mekanizmalarının, bağışıklık sisteminin, detoksifikasyonda görevli enzimlerin ve karaciğer metabolizmasının tam gelişmemiş olması, kan beyin engeli gibi koruyucu bariyerlerin işlevini tam olarak yerine getirememesi gibi nedenlerle yetişkinlere oranla daha hassas oldukları bilinmektedir. Bu fizyolojik durumlar göz önünde bulundurulduğunda savunma mekanizmaları tam olarak gelişmemiş organizmaların EDC maruziyetine karşı daha dayanıksız olması anlaşılabilir bir durumdur. Ayrıca gelişmekte olan organizmaların metabolik hızlarının yüksek olması bazı durumlara toksisite artışına neden olabilmektedir (3, 82). Çevresel faktörlere prenatal dönemde maruziyet normal hücre ve doku gelişimini bozabilir. Bu dönemdeki maruziyete bağlı olarak bireyler, yaşamlarının ileriki dönemlerinde üreme ve endokrin sistem bozuklukları açısından daha yüksek risk altında olabilir. Bu nedenle gelişim için kritik önem taşıyan yaşamın ilk dönemlerinde EDC'lere maruziyet yaşamın ileriki zamanlarına kadar ortaya çıkmayabilir (2, 3). Bu durumla ilgili Baker tarafından öne sürülen ve kabul gören “fetal orijinli yetişkin hastalığı” adlı bir hipotezden ileride daha ayrıntılı olarak bahsedilecektir (83).

Gecikmiş Etkiler

Baker tarafından öne sürülen ve bilim çevrelerince kabul gören “fetal orijinli yetişkin hastalığı” adlı hipoteze göre, yaşamın erken dönemlerinde kimyasal maddelere maruziyet, çok uzun yıllar sonra çeşitli bozukluklara ve hastalıklara neden olabilmektedir (83, 84). Sağlığın ve hastalığın gelişimsel kökenleri olarak da ifade

edilen bu kavram, gelişmekte olan organizma ve çevresi arasında, o bireyin ömrü boyunca hastalık gelişme eğilimini belirleyen etkileşimleri tanımlar. Özellikle fetal dönemdeki maruziyet vurgulanmış olsa da çocukluk ve ergenlik dönemi de endokrin sistemin gelişimi açısından oldukça önemlidir ve bu dönemlerdeki maruziyetin de ileriki dönemlerde ciddi sonuçlara neden olabileceği bilinmektedir (3, 80).

Bu hipotez öncelikle fetusun yetersiz beslenmesine bağlı olarak ileriki dönemlerde ortaya çıkabilecek ters etkilerle ilişkilendirmiştir (85). Bu kavram daha sonra beslenme dışında, vücudun fizyolojik işleyişini değiştirdiği düşünülen ekzojen kaynaklı bileşiklere maruziyeti de kapsayacak şekilde genişletilmiştir (84).

Her organ ve dokunun gelişim dönemi ve mekanizması farklıdır. Ortaya çıkacak toksisitede, maruz kalınan doz ve kimyasal madde özelliklerinin yanı sıra doku için hassas gelişim döneminde maruz kalınması da oldukça önemli bir etkidir (86). Heindel ve Newbold erken yaşta EDC maruziyetinin erişkinlikte görülen hastalık risklerini arttırması ile ilgili bazı ilkeleri vurgulamışlardır (87).

- Büyüme ve gelişme döneminde maruz kalınan kimyasal madde maruz kalınan zamana ve farklı dokulara özgü sonuçlar doğurabilir. Maruz kalınan kimyasal maddeler gelişim sürecindeki dokuların gen ekspresyonlarında, protein aktivitelerinde, hücre iletişimde aksamalara neden olarak ve daha birçok mekanizma ile kalıcı hasarlara neden olabilir.
- *In utero* maruziyet etkisini tek başına gösterebilir ya da başka çevresel stresörlerle (beslenme bozuklukları, farklı kimyasal maddeler, fiziksel etmenler vb) birlikte etki gösterebilir. Bu durumda erişkinlik döneminde bu etkilerin kombine sonuçları gözlenebilir.
- Bu etkiler sonraki nesillere aktarılabilir.

Yapılan çeşitli çalışmalar, günümüzde çok sık rastlanan hastalıklarda (astım, öğrenme problemleri ve davranışsal problemler, erken ergenlik, infertilite, meme ve prostat kanserleri, Parkinson, obezite) gözlenen artışla erken dönem maruziyet arasında ilişki olduğunu gösterir niteliktedir (88-92).

Doz ve Süre

Maruz kalınan doz ve maruziyet süresi kavramları, diğer tüm ekzojen maddelere maruziyette önemli olduğu gibi EDC'lerin etkileri açısından da oldukça önemlidir. Ancak hormon reseptörlerine bağlanmada doluluk ve doygunluğun karmaşık dinamikleri olması, geleneksel doz yanıt eğrilerinden (monotonik doz yanıt eğrileri) farklı bir profil ortaya çıkarabilmektedir. Dolayısıyla bazı EDC'ler için düşük dozlarda maruziyet, hedef doku üzerinde yüksek dozlardan daha fazla etki gösterebilmekte ve doz yanıt eğrisi (monotonik olmayan [NMDR], U, ters U gibi) çok farklı şekillerde olabilmektedir. Bu da endokrin bozucuların etkisinin anlaşılması ve yorumlanmasını karmaşıklaştıran diğer bir etmendir (2, 3).

Amerika Çevre Koruma Ajansı'nın (EPA) ve Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) ortaklığı ile 2001 yılında EDC'lerde düşük doz etkisine ilişkin bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaya göre düşük doz kavramı; tipik insan maruziyetinin ve standart toksikoloji testlerinde kullanılan dozun altındaki düzeylerde ters etki görülmesi olarak tanımlanmıştır (93). Diğer bir tanıma göre, belirli bir kimyasal madde için belirlenmiş olan, hiçbir ters etki gözlenmeyen doz düzeyinin (NOAEL) altındaki dozlarda etki gözlenmesidir (94).

Hormonların düşük dozlarda bile etki gösterebilmelerinin çeşitli nedenleri vardır. Bu nedenler arasında; hormon reseptörlerinin çok düşük dozlardaki hormonları bağlayıp etki oluşturabilecek kadar yüksek affiniteye sahip olmaları, hormon konsantrasyonu ile hormon bağlı reseptör sayısı arasında ve bağlı reseptör sayısı ile gözlenen cevap arasında lineer olmayan bir ilişki olması sayılabilir (95). Dolayısıyla, hormon konsantrasyonunda düşük miktarlarda değişim, reseptöre bağlanmada ve ortaya çıkan yanıtta çok önemli düzeylerde değişikliğe neden olabilmektedir. Bu kimyasal maddeler de hormon gibi etki gösterdikleri ve hormon reseptörlerine bağlandıkları için bu mekanizmalar EDC'ler için geçerlidir (80, 96).

Geleneksel doz yanıt eğrileri çok düşük dozlarda ortaya çıkabilecek toksisitenin değerlendirilmesi için öngörü oluşturabilmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda EDC'ler için oluşturulan doz yanıt eğrileri ile bu öngörünün mümkün olmadığı ortaya çıkmıştır. Çok sayıda EDC'nin çok düşük dozlarda bile hücre

çoğalması ve organ gelişimi üzerine ciddi ters etkileri olabileceği, birçok EDC'nin NMDR eğrilerine sahip olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (96, 97).

Düşük doz kavramı ile ilgili çalışma ve tartışmalar devam ederken, NMDR eğrilerinin oluşum nedeni ve mekanizmaları ile ilgili çeşitli görüşler vardır. Bu mekanizmaları aşağıda kısaca özetlenmiştir:

- Sitotoksosite; yüksek dozlarda uygulanan kimyasal maddeler değişik mekanizmalarla sitotoksik etkilere neden olur. Dolayısıyla endokrin bozucu etkileri ortaya çıkmadan daha ciddi toksik etkiler gözlemlendiği için bu dozlarda endokrin bozucu etkiler gözlenmemiş olur (98).
- Reseptör seçiciliği; bazı kimyasal maddeler düşük dozlarda bazı resptörlere bağlanırken yüksek dozlarda başka resptörlere de bağlandığı için ortaya çıkan cevap ve dolayısıyla doz yanıt eğrisi değişebilmektedir. Örneğin, BPA düşük dozlarda ER'ye affinite gösterirken yüksek dozlarda diğer hormon reseptörlerine (androjen, tiroid resptörleri gibi) de bağlanır (99, 100). Yüksek dozlarda birden fazla reseptöre bağlanan kimyasal madde daha düşük etkiye neden olacaktır.
- Reseptör sayısında azalma ve desensitizasyon; hormonlar nükleer resptörlere bağlandıklarında hedef genlerin transkripsiyonlarında değişikliklere neden olur. Bu değişiklik ve hormon konsantrasyonu arasında da doğrusal olmayan bir ilişki bulunmaktadır (98). Reseptör cevabı oluşup hedef gen transkripsiyonu arttıktan sonra hormon etkisini sona erdirmek amacıyla nükleer hormon reseptörleri genellikle proteazom aracılığıyla yer değiştirir ve parçalanır (101). Hormon seviyeleri çok fazla arttığında yeni üretilen reseptör sayısı bozulan reseptör sayısını dengeleyemez ve zamanla reseptör üretimini de etkiler, reseptör sayısında azalma görülür (101). Reseptör duyarsızlaşması ise benzer nedenlerle sayıda azalma değil de biyokimyasal olarak işlevlerinde azalma olarak açıklanabilir. Bu iki mekanizma farklı reseptörlerde görüleceği gibi aynı reseptörde de ortaya çıkabilir (102).
- Reseptör yarışması; Endojen hormon ve EDC'lerin vücutta karışım halinde bulunmaları ve resptöre bağlanmak için yarışmaları NMDR eğrilerinin

oluşmasının diğer bir sebebi olarak düşünülmektedir. Kohn ve Melnick matematiksel modelleme yöntemlerini kullandıkları çalışmalarında; EDC'ye maruz kalındığında, EDC'lerin bazı işgal edilmemiş hormon reseptörlerine bağlandığını ve biyolojik cevapta artışa neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (103). Düşük doz maruziyetlerde endojen hormonlar ve EDC'ler reseptörlere birlikte bağlanırken yüksek dozlarda maruz kalındığında EDC'lerin normal ligand oluşumunun dışına çıkabileceği düşünülmektedir (95).

- Endokrin sistem negatif geri bildirim döngüleri; vücutta hormon salgılanmasının kontrol mekanizmalarından en önemlisi pozitif ve negatif geribildirim mekanizmalarıdır. Bu mekanizmalarla hormonların kandaki konsantrasyonlarının çok yükselmesi salgılanmasını inhibe etmektedir. Düşük dozlarda EDC maruziyeti hormonların etkisini artırırken, çok yüksek dozlarda maruz kalındığında negatif geribildirim mekanizmalarını tetiklediği için etkileri daha az görülebilir (95, 104).

Endokrin bozucu kimyasal maddeler için tanımlanan düşük doz kavramı ve NMDR eğrileri, toksik dozların tanımlanması ve toksisitenin değerlendirilmesi açısından problemlere neden olmaktadır. Mevcut analitik yöntemlerle saptanması ve deney tasarımı zor olan dozlarda bile EDC'lerin etkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bu dozlarla çalışmalar yapmak ve kimyasal maddeler için önemli olan limit doz değerlerinin (NOAEL, referans doz [RfD]) belirlenmesi EDC'ler için zorlaşmaktadır (95).

Kombine Maruziyet

Günümüzde gelişen endüstrileşmeye bağlı olarak çok çeşitli kimyasal maddelere aynı anda maruz kalmak mümkündür. Bir kişinin günlük yaşantısı değerlendirildiğinde bu kimyasal maddelere; mesleki, çevresel (su kaynakları, ortama havası gibi) ve bireysel (ev ortamına, beslenme alışkanlıklarına, kullandığı kişisel bakım ürünlerine) olarak maruz kalabileceği bilinmektedir.

Karışımlar basit ve kompleks karışımlar olarak kategorize edilebilir (105). Basit karışımlar, içeriğindeki kimyasal madde sayısının az olduğu ve

değerlendirmenin daha kolay yapılabilirdiği karışımlardır. Kompleks karışımların (egzoz dumanı, sigara dumanı, asfalt dumanları gibi) içeriğini tanımlamak çok kolay değildir. Bu karışımlar çok fazla sayıda kimyasal madde içerebilir, üretim şekilleri ve maruz kalma durumuna göre çok farklı sonuçlar doğurabilir. Bilinçli olarak üretilen (PCB'ler, pestisitler) ya da tesadüfen ortaya çıkabilen (egzoz gazları vb) kompleks karışımların etkilerinin anlaşılması oldukça zordur (106-108).

Birden fazla kimyasal maddeye aynı anda maruziyetle ortaya çıkan etkinin bu kimyasal maddelere ayrı ayrı maruziyetle ortaya çıkan etkilerden farklı olacağı düşünülmektedir. Çünkü aynı anda maruz kalınan kimyasal maddelerin birbirlerinin etkilerini değiştirebileceği çeşitli mekanizmalarla gösterilmiştir. Ancak bu mekanizmaların anlaşılması ve risk değerlendirme metodlarının uygulanabilmesi amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Kimyasal karışımların toksisiteleri farklı şekillerde gözlenebilir. Aşağıda tanımlanan şekilde farklı değerlendirmeler mevcuttur.

- **Doz toplamı:** Benzer mekanizmalarla etki gösterdiği bilinen kimyasal maddelerden oluşan karışımlar için kullanılan bir kavramdır. Ortaya çıkan etkinin kimyasal maddelerin dozlarının toplamı ile orantılı olarak artacağı düşünülmektedir.
- **Etki toplamı:** Kimyasal maddelerin toksisitelerinin ya da mekanizmalarının birbirinden çok farklı olduğu durumlar için kullanılır. Bu kimyasal maddelere karışım halinde maruz kalındığında tekli maruziyette gözlenen toksik etkilerin toplamı ortaya çıkar.

Etkileşim: Etkileşim terimi yukarıda bahsedilen etki toplamı ve doz toplamı terimlerini kapsamaktadır (109). Kimyasal karışımlar birbirlerinin etkilerini, tekli maruziyete göre arttırabilir, değiştirmeyebilir ya da azaltabilir. Bu değişimler aşağıda özetlenmiştir (108, 110-112).

- **Değişikliğe neden olmayan;** kimyasal maddelerin toksisite için hedef organları farklı ise karışım halinde maruz kalınması ortaya çıkacak toksisitede değişikliğe neden olmaz.
- **Sinerjizma;** Kimyasal maddelere karışım halinde maruz kalınması

maddelere tekli maruziyette görülen toksisitenin toplamından daha yüksek şiddette sonuçlara neden olabilir. Sonuçları aditif etki veya potansiyalizasyon olarak ortaya çıkabilir.

- Aditif etki (Sumasyon); karışımın etkisinin tekli maruziyette ortaya çıkan etkilerin matematiksel toplamı olarak görülmesidir.
- Potansiyalizasyon; Kimyasal maddelerden biri etki gözlenen sistem veya organ üzerinde etkisiz olduğu halde, karışımdaki diğer kimyasal maddenin etkisini arttırmasıdır.
- Antagonizma; Karışımın etkisinin kimyasal maddelerin ayrı ayrı etkilerinden daha düşük olması durumudur.
- İnhibisyon; Kimyasal maddelerden biri etki gözlenen sistem veya organ üzerinde etkisiz olduğu halde, karışımdaki diğer kimyasal maddenin etkisini azaltabilir.
- Maskeleye; Bileşikler aynı sistem veya organ üzerinde birbirlerine zıt etkiler gösteriyorlarsa, birlikte maruz kalındığında birbirlerinin etkilerini azaltabilir ya da ortadan kaldırabilir.

Bu etkileşmeler; kimyasal etkileşmeler şeklinde doğrudan maddeler arasında olabileceği gibi, farmakokinetik (absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım) ve farmakodinamik (reseptörelere bağlanma) düzeyde de gerçekleşebilir (113-115).

Bilimsel çevreler, kimyasal maddelere kombine ve karışımlar halinde maruziyetin sonuçlarının değerlendirmesi ile ilgili çeşitli modellemeler oluşturmaya çalışmaktadır. Tüm bu modellemelerde karışım halindeki kimyasal maddelerin toksik etkilerinin matematiksel olarak anlaşılması hedeflenir. Karışımların toksisitelerini değerlendirmek amacıyla “bütün karışımlar (karışımı tekbir madde olarak değerlendiren whole-mixture)” ve “bileşen bazlı işlemler (karışımın içindeki kimyasal maddeleri ayrı ayrı değerlendiren component-based procedures)” gibi farklı yaklaşımlar bulunmaktadır (105, 107-109, 116).

Karışım halindeki kimyasal maddelerin risk değerlendirmelerinin yapılması oldukça zordur ve bazı belirsizlikler içerir. Karışımın tek bir madde gibi ele alınması ve ikiden fazla kimyasal maddeyi içeren karışımların basit karışımlar olarak

değerlendirilmesi toksisite ile ilgili yanlış sonuçlara varılmasına neden olur. Bu maddelere heterojen karışımlar halinde maruz kalındığı bilinmektedir. Bu maruziyetin heterojen ve tam olarak öngörülemez olması değerlendirmeleri karmaşıklaştıran ve gerçeğe yakın olacak şekilde risk değerlendirilmelerinin yapılmasını zorlaştıran bir durumdur. Bilimsel çevrelerin bu konu ile ilgili çalışmaları eski yıllardan beri devam etmektedir. Yapılacak değerlendirmeler için tüm varsayımları kapsayan geniş tabanlı modellere ihtiyaç duyulmaktadır (105, 106).

Etkilerin Kuşaklararası Gözlenebilmesi

Çevresel kimyasal maddelerin etkilerini çoğunlukla somatik hücreler üzerine gösterdiği ve sadece maruz kalan bireyi etkilediği düşünülmektedir. Ancak bazı çalışmalar EDC'lere maruziyetin sadece maruz kalan birey üzerinde değil sonraki nesillerde de ters etkilere neden olabileceğini göstermiştir (117-121).

Bu aktarımın en eski ve en bilinen örneği 1950 ve 60'lı yıllarda gebelik komplikasyonlarını azaltmak amacıyla DES kullanılmasıdır (122, 123). DES kullanımının, maruz kalan bireylerden doğan çocuklarda ve sonraki nesillerde üreme sistemi anomalileri ve üreme sistemi işlev bozukluklarına neden olduğu görülmüştür. Benzer çalışmalar DES, BPA, PAH, kokain, pestisit ve fitoöstrojenlerle yapılmış ve bu kimyasal maddelere maruziyetin sonraki nesillerde ters etkilere neden olduğu görülmüştür (3, 121, 124).

Son yıllarda genomla ilgili yapılan çalışmalar yaygın görülen hastalıklarda genetik varyansların çok önemli olduğunu gösterse de tek nedenin bu olmadığı ileri sürülmektedir (125). Bu durum, epigenetik faktörlerin hastalık riskleri ve etiyolojisini değerlendirmede önemli bir belirleyici olabileceğini düşündürmektedir (126, 127).

Gelişimin erken dönemlerinde meydana gelen epigenetik değişiklikler bireylerin ömür boyunca taşıyacağı fenotipik özelliklerin oluşmasını sağlar. Dolayısıyla bu dönemde meydana gelen aksaklıklar yaşam boyunca ortaya çıkabilecek çeşitli hastalıklara ve bozukluklara zemin hazırlar. Bu epigenetik aksaklıklar üremede görev alan doku ve hücrelerde gerçekleşecek olursa sonraki nesillere aktarılacak; bu hastalıklar ve bozukluklar sonraki nesillerde de görülebilecektir (121).

Epigenetik, DNA diziliminde değişikliğe yol açmadan gen ifadesinde meydana gelen değişiklikler (DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, mikroRNA ekspresyonunda değişiklikler) olarak tanımlanır. Gelişimin erken dönemlerinde (embriyonik ve fetal), doku ve hücre farklılaşmasını kontrol eden bir mekanizma olarak düşünülebilir. Epigenetik mekanizmalar, yaşamın sonraki dönemlerinde de farklılaşmanın kritik olduğu gebelik, ergenlik ve yaşlılık gibi süreçlerde çeşitli genlerin ekspresyonlarının veya inaktivasyonlarının kontrolünde de görev almaktadır (120). Bu süreçlerde epigenetik mekanizmaların da rol oynadığı gen dizilimi veya içeriği ile ilgili oluşacak problemler gelişimsel bozukluklara ve hastalıklara neden olacaktır (121). Çalışmalar genellikle DNA metilasyonu ile EDC ilişkisi üzerinde durmuştur. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar histon modifikasyonu ve mikroRNA ekspresyonunda değişikliklerin de oldukça önemli olduğunu göstermiştir (121, 128). EDC'ler aşağıda sıralanan mekanizmaları etkileyerek epigenetik değişikliklere neden olmaktadır (129).

- DNA metilasyonu, metil gruplarının DNA metiltransferaz enzimleri aracılığıyla sitozinlere bağlanması durumudur. Genellikle sitozin-guanin dinükleotidindeki sitozinin 5. karbonundan yapıya katılması şeklinde oluşur (130, 131). DNA metilasyonu gametogenez ve embriyogenez gibi gelişimsel ve üreme işlemleri için oldukça önemlidir. Bu süreçte meydana gelebilecek problemlerin genetik kodlamada bir değişikliğe neden olmadan sonraki nesillere aktarılabilceği düşünülmektedir (124, 132-135). EDC'lerin yeni sentezlenen DNA'nın metilasyonunu bloke ederek ya da DNA onarımı aşamasında görev alan metilasyonu etkileyerek epigenetik değişikliklere neden olabileceği ileri sürülmektedir (136).
- Histon modifikasyonu, histonların N-terminal ucundaki aminoasitlerde meydana gelen postranslasyonel modifikasyonlar olarak tanımlanabilir. Bu modifikasyonlar, histon asetiltransferaz, deasetilaz, metiltransferaz ve demetilaz enzimleri aracılığıyla gerçekleşen asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, sumolasyon ve ubiquitinasyon gibi işlemleri kapsar (137-139). Histon modifikasyonları DNA transkripsiyonunda ve kromozom replikasyonunda önemli bir role sahiptir. Dolayısıyla meydana gelecek küçük bir aksaklığın bu işlemlerde ciddi problemlere yol açabileceği

düşünülmektedir (140-142).

- mikroRNA; MikroRNA'ların ve diğer kodlamayan RNA'ların gen ekspresyonunu etkilediği moleküler mekanizmalar tamamen anlaşılamamıştır, ancak mikroRNA'ların gen düzenlemesinde ve kromatin organizasyonunda rol oynadıkları düşünülmektedir (143, 144). Çalışmalar, mikroRNA'ların DNA metilasyonu ve histon modifikasyonunda rol oynayan enzimlerin ekspresyonunu da etkileyebileceğini göstermiştir (145, 146). Kodlanmamış RNA'ların transkripsiyon, transkripsiyon sonrası gen sessizleştirme, germ hücre programlanması ve genetik imprinting gibi epigenetik mekanizmalarda rol oynadığı düşünülmektedir (147). Kanser, Alzheimer, santral sinir sistemi bozuklukları ve kardiyovasküler sistem hastalıkları gibi birçok hastalıkta mikroRNA'ların ekspresyonunda sağlıklılara göre farklı eksprese edildiği görülmüştür (145, 148, 149).

Yukarıda açıklanan epigenetik değişikliklerin fenotipik sonuçları, EDC maruziyetinden hemen sonra ya da uzun bir zaman sonra ortaya çıkabilir. Özellikle gelişimin erken dönemlerinde ortaya çıkan epigenetik değişiklikler, epigenom ve germ hücre hatlarında değişikliklere yol açar ve sonraki nesillere aktarılabilir (118, 120, 124).

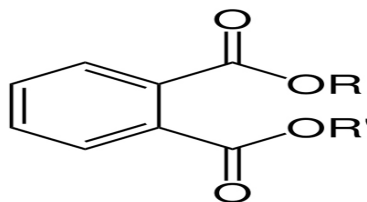
Bir EDC'nin etkilerinin kuşaklararası (transgenerational) gözlenebilmesi için gelişim döneminde maruz kalınması ve etkilerin 3. nesil üzerinde bile görülebilmesi gerekmektedir (119). Çünkü 0. nesil olarak düşünülen ve doğrudan EDC'ye maruz kalan gebenin germ gücre hattındaki hücreler EDC'ye doğrudan maruz kalır ve bu hücreler 1. nesile aktarılır. Bu maruz kalmış ve 1. Nesile aktarılmış germ hücreleri 2. nesli üretmek için kullanılır. Dolayısıyla 2. nesil bireylerin de EDC'ye maruz kalmış hücrelerden oluştuğu kabul edilir. Bu senaryoya göre 3. neslin EDC'ye doğrudan maruz kalmayan hücrelerden oluşan ilk nesil olduğu kabul edilir (150-152).

Sonuç olarak; gelişimin erken dönemlerinde EDC maruziyeti, yetişkinlikte ve sonraki nesillerde çeşitli hastalıkların görülme riskini arttıracak epigenetik değişikliklere neden olmaktadır (80). EDC maruziyeti ile germ hücrelerinde ortaya çıkan epigenetik değişiklikler düzeltilemez ve sonraki nesillere bu şekilde aktarılır. Dolayısıyla, epigenetik mekanizmalarda rol oynayan enzimlerin ve mekanizmaların

aydınlatılması ve tam olarak anlaşılması kuşaklararası aktarımın anlaşılması açısından çok önemlidir (152).

2.3.2. Ftalatlar

Ftalatlar, 1,2-benzendikarboksilik asitin dialkil veya alkil/aril esterleri olan bir kimyasal madde grubunun genel adıdır. Ftalik anhidridin uygun bir alkol ile (genelde 6-13 karbonlu) reaksiyona girmesi sonucu elde edilen bu kimyasal maddeler 1930’lardan bu yana katkı maddesi olarak çok yaygın kullanıma sahiptir. Spesifik bir kokusu olmayan, renksiz ve oda sıcaklığında sıvı olan ftalatların kimyasal yapısı Şekil 2.7.’de gösterilmiştir (153).



Şekil 2.7. Ftalatların genel kimyasal yapısı.

$$R \text{ ve } R' = C_nH_{2n+1}; n = 4-15$$

Kimyasal maddelerin değerlendirilmesi, onaylanması ve kullanımının kısıtlanması ile düzenlemelerin yer aldığı REACH regülasyonlarına göre ftalatlar molekül ağırlıklarına göre iki gruba ayrılmıştır. İlk grup, yüksek molekül ağırlıklı diizoonil ftalat (DiNP) ve diizodesil ftalat (DIDP) gibi Avrupa’da yaygın olarak kullanılan ve insan sağlığına zararları olmadığı düşünülen bileşiklerden oluşur. Molekül ağırlığı düşük olan di-n-butil ftalat (DnBP), benzil butil ftalat (BBP) gibi ftalat türevlerinden ve yüksek molekül ağırlığına sahip di-(2-etilhekzil) ftalat (DEHP)’den oluşan ikinci grup ise çok tehlikeli toksik madde (1B) sınıfında yer almaktadır (154). En yaygın kullanılan düşük molekül ağırlıklı ftalat türevleri; dietil ftalat (DEP), dimetil ftalat (DMP), ve dibütül ftalat (DBP); daha yüksek molekül ağırlığına sahip yaygın kullanılan ftalatlar ise DEHP, DIDP, DiNP ve BBP olarak sıralanabilir (154, 155). DEHP yüksek molekül ağırlıklı, çok tehlikeli ftalat sınıfında yer alması ve çok geniş bir kullanıma sahip olması nedeniyle ftalat toksisitesi denildiğinde akla gelen başlıca kimyasal maddedir (154). Yüksek molekül ağırlığına sahip ftalatlar genelde plastizer olarak, düşük molekül ağırlığına sahip olanlar ise

çözücü, kozmetik ve ilaç katkı maddeleri, insektisit gibi amaçlarla kullanılır (154, 155).

Ftalatların Kullanım Alanları

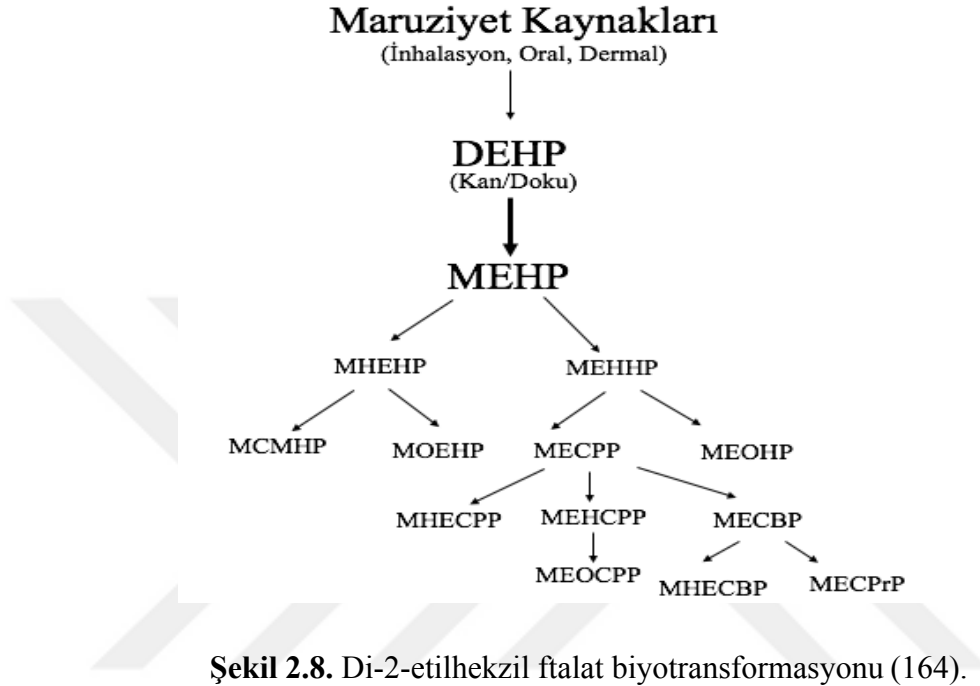
Ftalatlar, plastik malzemelerin esneklik ve yumuşaklığını arttırmak için yer ve duvar kaplamaları, yemek kapları, oyuncaklar ve medikal malzemelerde kullanılmaktadır. Ayrıca, kozmetik ürünler, kişisel bakım ürünleri ve farmasötik formülasyonlarda kullanımları bulunmaktadır (2, 8). Endüstriyel çözücüler, kaydırıcılar, tekstil ürünleri ve pestisitler ftalatların kullanıldığı diğer alanlardır (7). İnek sütü, bebek besinleri, ambalajlı yiyecekler, plastik oyuncaklar ve medikal malzemelerde bulunmaları nedeniyle özellikle çocuklarda ciddi maruziyetler gözlemlenmektedir (9). DEHP, kan ve parenteral beslenme torbaları, kataterler ve diğer medikal amaçlı kullanılan tüplerde çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (156). DBP enterik kaplı tabletlerde kaplayıcı ajan olarak kullanıldığı bilinmektedir (10, 157). Bu bileşikler, polimerlere kimyasal olarak bağlı değildir, dolayısıyla plastik materyalden kolayca uzaklaşabilir. Kolayca çevreye yayılabilmeleri ve yaygın kullanımlarına bağlı olarak ftalatlara oral, inhalasyon dermal ve medikal malzemeler aracılığıyla parenteral yollarla ciddi maruziyetler söz konusudur (10). Yaygın kullanımları ve biyolojik etkilerine bağlı olarak ftalatlar, EPA ve AB gibi kurumlar tarafından öncelikli kirleticiler listesine alınmıştır (8).

Ftalatların Biyotransformasyonu

Ftalalar, kısa yarılanma (6–12 saat) ömrüne sahip, birikme eğilimi göstermeden hızla metabolize edilen ve başlıca idrar ve feçes yolu ile atılan bileşiklerdir (2, 158). Maruziyet sonrası ftalat diesterleri lipaz ve esterazlar aracılığıyla genellikle biyolojik olarak daha etkin olan kendi monoesterlerine dönüşür. Daha sonra oluşan hidrolitik monoesterlerin alkil zincirleri, oksidasyon reaksiyonları ile metabolize olur (9, 10, 158, 159). Son aşamada ise bu hidrolitik monoesterler ve okside olmuş sekonder metabolitler glukuronik asit transferaz ve sulfon transferaz enzimleri ile konjuge olur (10, 160).

Di-2-etilhekzil ftalat, genel popülasyonun özellikle oral yolla en çok maruz kaldığı ftalat türevidir (161). DEHP öncelikle ana metaboliti olan mono-(2-etilhekzil)

ftalat (MEHP)'e dönüşür. Oluşan MEHP'in büyük bir kısmı mono-(2-etil-5-hidroksihekzil) ftalat (MEHHP), mono-(2-etil-5-oksohekzil) ftalat (MEOHP) ve mono-(2-etil-5-karboksipentil) ftalat (MECPP)'e dönüşür (162-164). DEHP biyotransformasyonu Şekil 2.8.'de özetlenmiştir.



Mono-2-etilhekzil ftalat (MEHP), mono-(2-etil-5-hidroksihekzil) ftalat(MHEHP), mono-(2-etil-5-hidroksihekzil) ftalat (MEHHP), mono-(2-etil-5-oksohekzil) ftalat (MOEHP), mono(2-karboksimetilhekzil) ftalat (MCMHP), mono-(2-etil-5-karboksipentil) ftalat (MECPP), mono-(2-etil-5-oksohekzil) ftalat (MEOHP), mono-2-(1-hidroksietil)-5-karboksipentil ftalat (MHECPP), mono-(2-etil-4-hidroksi-5-karboksipentil) ftalat (MEHCPP), mono(2-etil-4-karboksibütül) ftalat (MECBP), mono-(2-etil-4-okso-5-karboksipentil) ftalat (MEOCPP), mono-2-(1-hidroksietil)-4-karboksibütül ftalat (MHECBP), mono(2-etil-3-karboksipropil) ftalat (MECPrP).

Ftalatların Toksik Etkileri

Ftalat toksisitesi 1950'lerden beri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (165). Akut toksisiteyi çok düşüktür kronik toksisiteyi hedef organlar karaciğer, böbrek, tiroid ve testislerdir. Laboratuvar hayvanlarında fetal ölüm, malformasyon, karaciğer hasarı, antiandrojenik etki, testiküler hasar, peroksizom proliferasyonu ve özellikle de reproduktif toksisiteye neden oldukları gösterilmiştir. Ftalat esterlerinin bazıları kemiricilerde karsinojen etkilidir. Örneğin DEHP hepatokarsinojendir (166). En belirgin yan etkilerini üreme sistemi ve normal gelişim süreçleri üzerine gösterdikleri bilinen DEHP'in özellikle erkek üreme sisteminde (testosteron seviyelerinde düşüş,

anogenital açıklıkta azalma, testiküler anomaliler, inmemiş testis, testiküler atrofi gibi) çeşitli problemlere neden olduğu hayvan çalışmalarıyla gösterilmiştir (167-169). Dişi hayvanlarda yapılan çalışmalarda da (serum estradiol düzeylerinde değişiklikler, gecikmiş ergenlik ya da erken ergenlik gibi) DEHP maruziyetinin ciddi sonuçlar doğurduğu görülmüştür (168, 170). Gözlenen diğer etkiler; karaciğer kanserleri, böbrek fonksiyonlarında değişiklikler, tiroid hormon bozuklukları ve metabolik işleyişte bozulma olarak sıralanabilir (154, 169-172). Daha az sayıdaki insan çalışmaları DEHP maruziyetinin prematür telarşa, puberte prekoksia, endometriyozise, sperm kalitesinde ve testosteron düzeylerinde düşüşe, obeziteye, diyabete ve meme kanseri riskinde artışa neden olduğunu göstermiştir (8, 173). Bu etkilerin dışında ftalat maruziyeti ile astım, dikkat bozukluğu, hiperaktivite, meme kanseri, obezite, tip 2 diyabet, düşük IQ, nörogelişimsel problemler, davranış bozuklukları ve otizm arasında ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (9, 174). Prenatal ve postnatal DEHP maruziyetinin; erkek üreme sistemi bozuklukları, intrauterin ölümler, testiküler atrofi, teratojenite gibi sonuçları olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (175, 176). DEHP, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından olası insan karsinojeni (2B) olarak sınıflandırılmıştır (172).

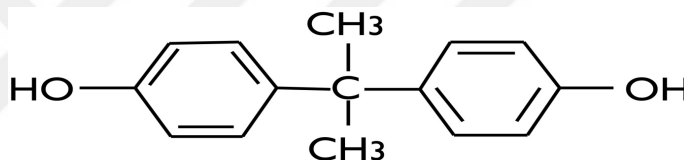
Amerika ve Avrupa’da özellikle çocukların kullandığı oyuncaklarda ve çocuk bakım ürünlerinde DEHP kullanımının sınırlandırılması ile ilgili çeşitli yasal düzenlemeler yapılmıştır (9). Avrupa Birliğinde gıda katkı maddeleri ile ilgili bilimsel panel (AFC), “tolere edilebilir günlük alım düzeyi”ni (TDI) 50 µg/kg olarak belirlemiştir. Sıçanlarda yapılan deneylerde testiküler toksisite için belirlenen NOAEL değeri 5.8mg/kg/gün, ters etki gösterdikleri en düşük doz düzeyi (LOAEL) ise 29 mg/kg/gün’dür (164, 166). Mesleki maruziyet göz önünde bulundurularak; DEHP’e günde 8, haftada 40 saat çalışma süresince uzun süreli ve tekrar edebilen maruziyetlerde, çalışanların sağlığını bozmayacak en yüksek konsantrasyon (TLV-TWA) 5 mg/m³ olarak belirlenmiştir. DEHP’in gebelerde oluşturacağı etkiler göz önünde bulundurulduğunda gebelik risk kategorisi C olarak belirlenmiştir (177).

Ülkemizde 2011 ve 2015 yılında yayınlanan kararlarla, DEHP, DBP, BBP DiNP, DIDP ve di-n-oktil ftalat (DNOP)’nin bazı ürün gruplarında kullanımı plastik içeriğinin %0,1’den daha yüksek konsantrasyonlarda olmayacak şekilde

sınırlandırılmıştır. Bu ürün grupları arasında: çocuk kullanım ve bakım ürünleri, oyuncaklar, kırtasiye ürünleri, beslenme ve okul çantaları, spor malzemeleri, tekstil ürünlerindeki baskılar ve ayakkabılar yer almaktadır (178, 179).

2.3.3. Bisfenol A

Bisfenol A, kuvvetli bir asit katalizörlüğünde fenolün aseton ile reaksiyona girmesi sonucu oluşur (17). İlk olarak 1800'lü yılların sonuna doğru steroid yapılı olmayan östrojen analogu olarak sentezlenmiştir, ancak DES'in östrojenik etkisinin daha yüksek olması BPA'nın ilaç olarak kullanılmasını engellemiştir. İlaç olarak kullanılmayan BPA, 1940'larda epoksi reçineler ve polikarbonat yapılı plastik maddelerin üretiminde kullanılmaya başlanmıştır (180, 181). BPA'nın kimyasal yapısı Şekil 2.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı.
4,4-dihidroksi-2,2- difenilpropan

Bisfenol A'nın Kullanım Alanları

Bisfenol A çevrede en çok rastlanan kirleticilerden biridir, günümüzde polikarbonat ve epoksi reçine üretiminde yaklaşık %95 oranında BPA kullanıldığı düşünülmektedir (11, 12). Plastik şişeler ve torbalar, gıda paketleri, kaplanmış teneke kutular, medikal malzemeler, diş hekimliği dolgu malzemeleri, oyuncaklar, bebek bakım ürünleri, biberonlar, çeşitli endüstriyel cihazlar, güneş gözlükleri, lensler, CD ve DVD'ler, otomotiv sanayi, cep telefonları, bilgisayarlar, geri dönüşümlü kağıtlar, fakslarda ve yazar kasalarda kullanılan termal kağıtlar gibi çok çeşitli ürünlerde kullanımları vardır (13-15, 182).

Bisfenol A moleküllerini polikarbonat bileşiklerine ya da epoksi reçinelere bağlayan ester bağının sıcaklık, güneş ışınları ya da asidik-bazik yapılı bileşiklere teması ile kolayca kopabileceği bilinmektedir (17, 183). Bu nedenle BPA içeren gıda

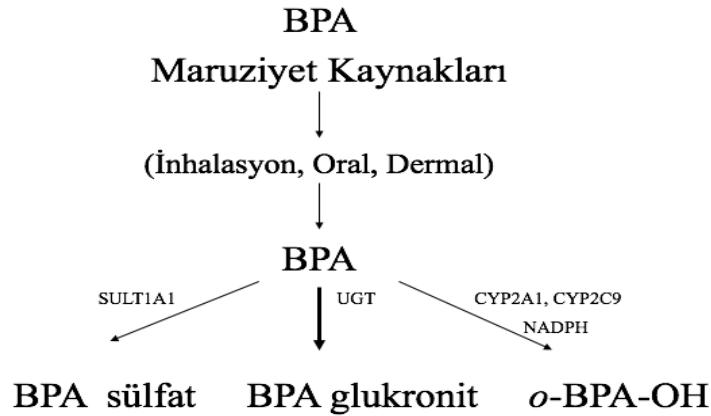
kaplama materyalleri ya da yiyecek kapları bilinçli bir şekilde kullanılmazsa çok ciddi oranda kontaminasyon riski taşır. Ayrıca, tekrarlayan yıkama, sterilizasyon ya da sürtme gibi fiziksel etkiler de bu malzemelerden BPA sızıntı riskini arttırmaktadır (184).

Bisfenol A taşıyan ürünlerin kullanımları; çok sayıdaki endüstriyel ürünün içeriğinde bulunmaları, polimer yapılı ürünlerden kolayca ayrılmaları ve özellikle oral yoldan iyi absorbe edilmeleri gibi özelliklerine bağlı olarak insan sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. BPA'ya bu endüstriyel ürünlerin kullanımı sırasında ve çevreden (üretimleri ve depolanmaları sırasında, atıklarından sızıntı) oral, inhalasyon ve dermal yolla maruz kalınabilir (16, 17). En büyük maruziyet kaynağı kontamine besin ya da içme sularıdır. BPA maruziyetinin, bebeklerde ve küçük çocuklarda oyuncak, biberon gibi malzemelere daha çok temas ettikleri için daha yüksek oranda olduğu görülmüştür (17). Literatürde insan idrar, serum, plazma, tükürük, anne sütü gibi vücut sıvılarında BPA düzeylerini ölçen çalışmalar, maruziyetin yaygınlığını göstermektedir (16, 72, 185-187).

Bisfenol A'nın Biyotransformasyonu

Oral yoldan maruz kalınan BPA gastrointestinal sistemden hızla emilmekte, karaciğer ve barsakta ilk geçiş etkisine uğramaktadır. İnhalasyon yolu ya da dermal yol ile alınan BPA'nın ise ilk geçiş etkisine uğramadığı ve daha yavaş atıldığı bildirilmektedir (188, 189). BPA oral absorpsiyonu takiben, insan karaciğerinde hızla esas olarak CYP2C18 ve daha az olarak CYP2C19 ve CYP2C9 enzimleri ile metabolize edilir (190). BPA'nın faz I (sitokrom enzimleri, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat [NADPH]'a bağımlı enzimler aracılığıyla) metabolizma reaksiyonları ile çok fazla metabolize edilemediği, daha çok karaciğer ve böbrekte faz II reaksiyonları ile aktif olmayan glukronit konjugatları haline dönüştüğü, daha az kısmının da sülfat konjugatları şeklinde atıldığı saptanmıştır. Çok yüksek miktarda BPA varlığında glukronidasyon yolağı doyumluğa ulaşmakta ve sülfatasyon yolağı devreye girmektedir (191). Bu konjugasyon reaksiyonları detoksifikasyon mekanizması olarak düşünülebilir, sadece serbest haldeki BPA'nın etkili olduğu bilinmektedir (192). Hepatik uridin 5'-difosfo-glukronoziltransferazlar (UGT) (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7 ve UGT2B15) BPA'nın

glukronidasyonunu katalizleyen ana enzimlerdir (193). Ayrıca ekstrahepatik UGT'ler, UGT2A1 ve UGT1A10 solunum sistemi ve barsaklardaki UGT1A1 ise meme dokusunda gerçekleşen BPA glukronidasyonu için önemlidir (194). Sulfotransferaz (SULT) 1A1 sülfatasyondan sorumlu ana enzimdir (195). BPA biyotransformasyonu Şekil 2.10.'da özetlenmiştir. Karaciğerde konjugatlarına dönüşen BPA kana geçmekte ve idrarla atılmaktadır (188, 189). BPA alımından 1-3 saat sonra idrarda BPA glukronit konjugatlarının konsantrasyonun pik yaptığı ve BPA'nın eliminasyon yarı ömrünün 4-6 saat olduğu ve yaklaşık 42 saatte tamamına yakınının ifade idrarla atıldığı belirlenmiştir (190, 191). Az sayıda gönüllü ile yapılan bir çalışmada BPA'nın %9,5'inin hiç değişmeden, %69,5 oranında BPA glukuronit ve %21'inin BPA sülfat konjugatları şeklinde idrarla atıldığı gösterilmiştir (190).



Şekil 2.10. Bisfenol A biyotransformasyonu.

Bisfenol A'nın Toksik Etkileri

Bisfenol A, ER'nü bağlayan ve zayıf östrojenik etki gösteren kimyasal bir maddedir, estrogen reseptörü alfa ($ER\alpha$) ve estrogen reseptörü beta ($ER\beta$)'ya bağlanma kapasitesi estradiole göre 10.000 kat daha düşüktür ve $ER\beta$ 'ye daha yüksek affinite gösterir (196). Ancak hücre çekirdeğinde ve zarında bulunan başka birçok reseptöre çok düşük düzeylerde bile bağlanabileceği ifade edilmektedir (192, 196). Bu durum, BPA'nın çok düşük dozlarda bile estradiol kadar yüksek etki gösterebilmesine yol açmaktadır (197).

Bisfenol A'nın, ER reseptörlerinin dışında, hipofiz ve pankreatik α

hücrelerinde bulunan membran estrogen reseptör (mER)'lerini, meme kanseri hücrelerinde, Langerhans hücrelerinin β -adacıklarında ve adipoz dokuda bulunan G protein reseptör 30 (GPR30) reseptörlerini, fetal beyin ve plasentada kuvvetli şekilde eksprese edilen estrogen ile ilişkili reseptör gama (ERR- γ) reseptörlerini, tiroid hormon reseptörlerini, AR'leri, aril hidrokarbon reseptör (AhR)'lerini ve peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama (PPAR- γ) reseptörlerini de bağlayarak etki gösterdiği bilinmektedir (183, 198-206). Ayrıca hücre çoğalması, apoptoz, intraselüler iletişim, proteomik ve epigenetik mekanizmalarda da değişikliklerle ters etkilere neden oldukları bilinmektedir (207-209).

Yapılan *in vitro*, *in vivo* ve insan çalışmaları BPA'nın insan sağlığı üzerinde çok çeşitli ters etkileri olabileceğini göstermiştir. Bu etkiler arasında BPA'nın östrojenik ve antiandrojenik etkilerine bağlı olarak görülen üreme ve gelişme problemleri, diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklar, tiroid hormon bozuklukları, oksidatif strese bağlı çeşitli organ (testis, beyin, karaciğer, böbrek, kalp) hasarları, estradiol düzeyinde artış, sperm motilitesinde azalma, gebelikte maruziyetle düşük doğum ağırlığı ve fetal merkezi sinir sistemde kromozomal olmayan malformasyonlar, beyin dokusu hasarı, davranış bozuklukları ve otizim gibi çok çeşitli bozukluklar sayılabilir (181, 195, 207, 209-217). BPA'nın ters etkilerinin anlaşılması açısından geleneksel doz yanıt eğrilerinin çizilmesinin mümkün olmadığı, belirlenen sınır düzeylerin ve dozların altındaki maruziyetlerde bile ters etkilerin gözlemlendiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (3, 218, 219). Bu durum sınır değerlerin belirlenmesini daha karmaşık ve zor bir hale getirmektedir.

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA, 2006) geçmişte yapılan çalışmaların verilerine göre, BPA için NOAEL düzeyini 5 mg BPA/kg/gün, üreme sistemi için LOAEL değerini ise 50 mg/kg/gün olarak belirlemiştir (220, 221). EPA tarafından BPA'nın TDI değeri 50 μ g/kg (vücut ağırlığı)/gün olarak belirlenmiştir (14). Yapılan çeşitli çalışmalar göz önünde bulundurularak çocuklar gibi hassas gruplar da dahil olmak üzere, insan popülasyonlarında yaşam boyu herhangi bir ters etki oluşturmadan alınabilecek günlük oral alım düzeyi olan RfD, EPA tarafından 0,016 mg/kg olarak belirlenmiştir (191).

Avrupa Birliği ülkelerinde 2011 yılında bebek biberonları ve bebek

besinlerinde kullanılan ambalaj malzemelerinin üretiminde BPA kullanılması yasaklanmıştır (220). FDA ise 2012 yılında bebek biberonları ve bardaklarının üretiminde; 2013 yılında bebek besinlerinde kullanılan ambalaj malzemelerinin üretiminde BPA kullanılmasını yasaklamıştır. Termal kağıtlarda çok yüksek miktarlarda BPA bulunmasına bağlı olarak ABD'deki en büyük termal kağıt üreticisi, üretimlerinden BPA kullanımını çıkarmıştır (181).

Ülkemizde 2011 yılında yayınlana Türk Gıda Kodeksi Tebliği'nde bebeklerde kullanılan plastik ve benzeri ürünlerde BPA kullanılması yasaklanmıştır (222).

2.4.OKSİDATİF STRES

2.4.1. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri

Serbest radikal, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip olan atom veya molekül olarak tanımlanabilir. Serbest radikaller yapısında, kısa ömürlü ve oldukça reaktif olmalarına neden olan ve kararlı olmalarını engelleyen, tek sayıda elektron içerir, bu elektronu eşleyerek kararlı duruma geçebilmek amacıyla diğer bileşiklerle hızla tepkimeye girme eğilimindedir (222). Serbest radikaller normal molekül veya atomların kovalent bağlarının kopmasıyla ya da elektron transferi sırasında oluşabilir (223).

Reaktif oksijen türleri (ROT) yapılarında oksijen bulunduran son derece yüksek reaktiviteye sahip organik veya inorganik serbest radikaller veya peroksitlerdir. ROT biyolojik sistemlerde en çok rastlanan ve en önemli serbest radikalleri oluşturur (224, 225).

Oksijen, enerji üretimi ve detoksifikasyon gibi çok önemli metabolik olaylarda çeşitli rollere sahiptir. Bu işlemler sırasında oksijen son (terminal) elektron alıcısı olarak görev yapar ve en sonunda kararlı bir bileşik olan suya dönüşür. Ancak bazı reaksiyonlarda tek elektrona ihtiyaç duyulur, bir dizi eksik tek değerlikli indirgenme gerçekleşir ve sonuç olarak ROT oluşur (224, 225). Aerobik koşullarda yaşayan organizmalarda tüketilen oksijenin %90'dan fazlası, elektron taşıma zincirinde (ETC), ROT salımı olmadan suya indirgenmektedir. ETC, oksidatif fosforilasyon ile birlikte çalışarak adenosintrifosfat (ATP) formunda enerji üretmektedir. ATP, hücrelerin

mitokondrilerinde proton ve elektron reaksiyonları sonucu oksijenin indirgenmesiyle sentezlenmektedir. Bu işlem sırasında oksijenin küçük bir yüzdesi tamamen indirgenmemekte, O_2^- radikalleri oluşmaktadır. ROT çoğu mitokondride oluşan hücresel oksidatif metabolizmanın yan ürünleridir (226-228). ROT'un hücresel kaynakları aşağıda sıralanmıştır.

- Mitokondri: Mitokondri, endojen ROT havuzuna en fazla katkıda bulunan organeldir. Mitokondri, amino asitler, glikoz ve lipidlerin oksidasyonu yoluyla ATP üretmektedir bu sırada tüketilen O_2 'nin yaklaşık %1'inin O_2^- üretmek için kullanıldığı tahmin edilmektedir. Mitokondriyal ROT hücre sinyal özelliklerinin yanı sıra, zararlı rollere de sahiptir. Mitokondriyal ROT'un serbest olması, çeşitli kanser vakalarının başlangıcına ve ilerlemesine neden olabilmektedir (227, 229, 230).
- Endoplazmik retikulumda ROT üretimi sitokrom P450 enzim ailesinin enzimlerinin rol aldığı hidroksilasyonreaksiyonları sonucu oluşur. Substratların oksidasyonu sırasında, elektronların bir kısmı ETC'den kaçmakta ve mitokondriye benzer şekilde O_2 'e katılarak O_2^- 'ne dönüşmektedir. Hidroksilasyon reaksiyonları sırasında oluşan ürünler de oksidasyon döngülerine girebildikleri için ROT üreticisi haline gelebilmektedir (227).
- NADPH oksidazlar (NOX), yan ürün olarak değil, birincil işlev olarak ROT üreten enzim ailesi olarak düşünülmektedir. NOX ailesi yapı ve enzim fonksiyonu açısından benzerliklere sahip 7 farklı NOX izoformu, NOX 1-5 ve çift oksidaz (DUOX) 1-2'den oluşmaktadır. NOX'lar, hızla H_2O_2 'e dönüştürülen O_2^- 'u üretebilmek için elektronları biyolojik membrana aktarmaktadır (228).

Biyolojik sistemlerde ROT'lar biyolojik mekanizmalar dışında ilaç kullanımı (parasetamol, bleomisin, doksorubisin, etanol), çevresel etmenlere maruziyet (pestisitler, radyasyon, yüksek sıcaklık), alkol ve sigara kullanımı, beslenme bozuklukları ve mineral dengesizlikleri (Fe ve Cu gibi minerallerin normalden fazla olması) gibi çok çeşitli nedenlerle oluşabilmektedir (222, 227, 231, 232).

Hücrelerin ROT üretimlerinin dengelenmesinden üç tip süperoksit dismutaz (SOD1, SOD2, SOD3), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimler sorumludur. E vitamini, karotenoidler ve C vitamini (askorbat) gibi küçük antioksidan moleküller, oksidan-antioksidan dengesinin korunması için antioksidan enzimleri desteklemektedir. $O_2^{\cdot-}$, SOD ile H_2O_2 gibi diğer reaktif türlere dönüştürülebilmekte, süperoksit radikalleri oluşturmak üzere yeniden kullanılabilmekte veya katalaz ve/veya glutatyon (GSH) ile suya dönüştürülebilmektedir. Geçiş metallerinin varlığında (Fe^{+2} gibi) H_2O_2 , oldukça reaktif olan ve lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar verebilecek hidroksil radikallerine ($OH^{\cdot}$) dönüştürülmektedir (233).

Reaktif nitrojen bileşikleri (RNT), yapısında oksijen ve azot bulunduran nitrik oksit kaynaklı serbest radikaller veya peroksitlere verilen genel isimdir. Bunlar da yüksek reaktiviteye sahiptir ve oksidatif reaksiyonlarda yer alabilir (223, 231, 232). RNT'nin aşırı üretimi, nitrozatif stres olarak adlandırılmaktadır. Nitrozatif stres bir sistemdeki RNT üretimi, sistemin nötralize etme yeteneğini aştığı zaman meydana gelmektedir. Nitrozatif stres, proteinlerin yapısını değiştirebilen ve normal işlevlerini engelleyebilen nitrozilasyon reaksiyonlarına neden olmaktadır (226, 234).

Oksidanlar, tek elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküllerle kolayca elektron alışverişi yapabilen oksidanlar (radikaller) ve elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküllere radikallerden daha zayıf bağlarla bağlanabilen oksidanlar (non-radikaller) olmak üzere iki farklı gruptan oluşur (223). Radikallere süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), non-radikallere ise hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO), hipoklorit ($ClO^{\cdot}$) örnek olarak verilebilir. Özellikle Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu gibi reaksiyonlarla ortaya çıkan hidroksil anyonu ($OH^{\cdot}$), tümör süpresör genlerin inaktivasyonuna ve nokta mutasyonlarına yol açmaktadır (Tablo 2.4.).

Ortaya çıkan bu ROT'lar çevrelerindeki makromoleküllerle (proteinler, DNA, nükleik asitler, membran lipitleri, kolajen ve hyaluronik asit) etkileşime girerek ciddi doku hasarına neden olabilir (235-238). ROT ve RNT'ler Tablo 2.4.'da özetlenmiştir.

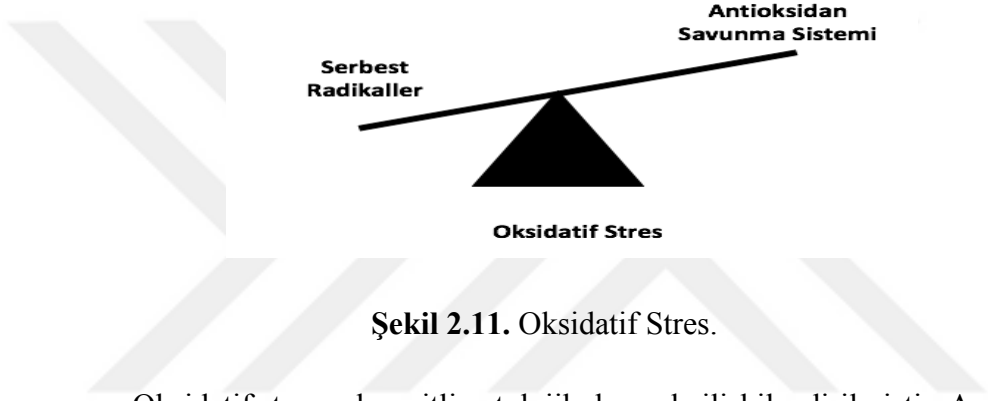
Tablo 2.3. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri (239-246).

ROT ve RNT	Sembolü	Oluşumu ve Tanımı
Moleküler oksijen	O ₂	Eşleşmemiş iki elektrona sahiptir.
Singlet oksijen	¹ O ₂ , ¹ Δ	Oksijenin diamagnetik halidir.
Ozon	O ₃	UV radyasyon veya fosil yakıtların yakılması ile oluşabilir.
Süperoksit anyonu	·O ₂ ⁻	O₂ + e⁻ → ·O₂⁻ Otooksidasyon ve fotooksidasyon reaksiyonları, fagositik hücre aktiviteleri gibi çeşitli reaksiyonlar sonucu ortaya çıkabilir. Oksijenin tek redükte elektrona sahip olduğu şeklidir.
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	2·O₂⁻ + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂ Oksijenin doğrudan indirgenmesi veya ·O ₂ ⁻ 'in dismutasyonu sonucu oluşur.
Hidroksil radikali	·OH	Fe²⁺ + H₂O₂ → ·OH + OH⁺ (Fenton Reaksiyonu) ·O₂⁻ + H₂O₂ → ·OH + OH⁺ + O₂ (Haber Weiss Reaksiyonu) ·OH radikalının çoğu vücutta geçiş metalleri (Fe, Cu, Co, Ni) tarafından Fenton reaksiyonu ile oluşturulur. Ayrıca, H ₂ O ₂ 'in O ₂ ⁻ ile Haber Weiss reaksiyonuna girmesi ile de oluşur.
Alkoksi ve peroksi radikalleri	RO· ve ROO·	Oksijen merkezli organik radikaldır. Oksijen varlığında çift bağlara radikal eklenmesi ve hidrojen çıkışı ile oluşur.
Hipokloröz asit	HOCl	H ₂ O ₂ 'den miyeloperoksidaz ile oluşturulur.
Nitrik oksit	NO·	L-arjinin → NO· + L-sitrülin 3 farklı nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-arjinin'den oluşturulur.
Organik hidroperoksit	ROOH	Lipit ve nükleobazlar gibi hücrel bileşenlerde gerçekleşen radikal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkar.

2.4.2. Oksidatif Stres

Serbest radikaller biyolojik sistemlerde normal işleyişin sonucu olarak oluşur ve serbest radikallerle endojen antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Çeşitli sebeplerle (hücrel indirgeme potansiyelinin bozulması, hasara uğraması veya doyumluğa ulaşması ve GSH gibi hücrel indirgemeyi sağlayan

ögeler baskılanması gibi) serbest radikal oluşumunun artması veya antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması ve bu dengenin serbest radikaller yönünde bozulması durumuna oksidatif stres adı verilir (236, 238). Oksidatif stresin büyüklüğü hücresel indirgeme mekanizmalarında ortaya çıkan değişimlerin boyutuna bağlıdır. Bu değişimlerin düzeltilmesi hücre tarafından sağlanabiliyorsa ve hücre normal haline geri dönebiliyorsa ya hasar görülmez ya da küçük bir hasar ortaya çıkar. Ancak hücresel onarım sağlanamıyorsa ve ATP deplesyonu da varsa, hücre ölümü gerçekleşir. Orta düzeydeki hasarlarda, hücre apoptoza gider; büyük hasarlarda ise nekroz gerçekleşir (226, 247).



Şekil 2.11. Oksidatif Stres.

Oksidatif stres çok çeşitli patolojik durumla ilişkilendirilmiştir. Aşağıda bazı örnekleri yer almaktadır (238, 248-250).

- Yaşlanma
- Esansiyal hipertansiyon
- Karsinogenez
- İskemik hasarlar
- Ateroskleroz
- Karaciğer hasarı
- Kas defektleri
- Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar
- İnflamatuvar hasar
- Diyabet
- Astım, Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

Ayrıca çeşitli fizyolojik mekanizmalarda da rol oynadıkları bilinmektedir (251-254).

- Mukus salgılanması
- Redoks sinyalleşmesi
- Hücre içi veya hücreler arası sinyalleşme
- Tümör hücreleri ve patojenlerde oksidatif hasar oluşturulması
- Tiroksin biyosentezinde tirozinin iyodinasyonu
- Hücre çoğalması, farklılaşması ve büyümesinde transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu

2.4.3. Oksidatif Stresin Biyogöstergeleri

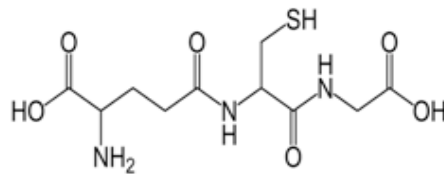
Oksidatif stres oldukça karmaşık bir süreçtir ve nicel olarak tespit edilmesi oldukça zordur. Ancak oksidatif stresin değerlendirilmesinde çeşitli biyogöstergeler kullanılmaktadır. Sıklıkla kullanılan biyogöstergeler aşağıda sıralanmıştır (255-258).

- Doğrudan ROT/RNT'nin ölçümü
- Total antioksidan kapasite
- Antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, glutatyon peroksidaz [GPx], tiyoredoksin redüktaz [TrxR])
- Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (Vit-C, E, GSH, flavonoidler ve karotenoidler)
- Redükte/okside glutatyon (GSH/GSSG) oranı
- Lipid oksidasyon ürünleri (konjuge dienler, hidroperoksitler, tiyobarbütirik asit reaktif türleri [TBARs], malondialdehit [MDA], 8-izoprostan F_{2a})
- Protein oksidasyon ürünleri (karbonil grupları, AOPPs, nitrozaminler)
- DNA oksidasyonu (8-hidroksi-2-deoksi guanozin ve 8-hidroksi guanin düzeyleri)

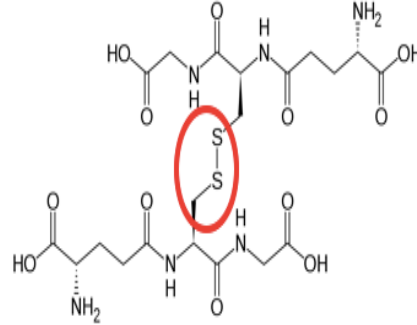
Glutatyon

Organizmada yer alan en önemli antioksidan moleküllerden biri glutatyonur. “ γ - Glutamil Sisteinil Glisin” yapısında atipik bir tripeptittir ve vücutta L-sistein, L-

glutamik asit ve glisinden sentezlenir. Canlı dokularında bulunur (hayvan, bitkiler ve bakteri) ve hücrelerin önemli bir bileşenidir (259, 260). Vücutta GSH (Şekil 2.12.) ve GSSG (Şekil 2.13.) halde bulunabilir. İnsanlarda GSH, oldukça yüksek konsantrasyonlarda (1-10 mM) bulunmaktadır, doğrudan veya dolaylı olarak ROT'ların temizlenmesine yardımcı olmaktadır (226, 261). GSH'daki sisteinin tiyol grubu stabil olmayan (ROT gibi) molekülleri redükleyebilir. Bu durumda kendisi de reaktif hale gelir ve iki reaktif glutatyon birleşerek glutatyon disülfiti (GSSG) oluşturur. GSSG daha sonra glutatyon redüktaz (GR) ile tekrar GSH'a dönüşür (259, 262). Glutatyon vücutta başta karaciğer hücreleri olmak üzere farklı hücrelerde bulunur ve dokularda glutatyon havuzunun %90'ından fazlası GSH'tan oluşur. Çekirdekteki glutatyon, DNA'nın onarımı ve ekspresyonu için protein sülfidlerin redoks durumunu korumaktadır. Ciddi oksidan stres altında hücrenin GSSG'yi GSH'a indirgeme özelliği azalır ve böylece GSSG hücrede akümüle olur. Okside GSH, hücrelerde birikebilir ve GSH/GSSG oranı oksidatif stresin önemli bir ölçüsüdür (259, 260, 262, 263).



Şekil 2.12. Redükte glutatyonun yapısı.



Şekil 2.13. Okside glutatyonun yapısı.

Glutatyon molekülü oksidatif strese karşı koruyucu rol oynamaktadır. Bu rolleri (259, 262, 264):

1. GPx, glutatyon S transferaz (GST) gibi oksidatif strese karşı detoksifikasyonda yer alan enzimlerin kofaktörüdür ve vücudun tüm elektrofilik, halojenli yapılarının epoksitlere karşı korunmasında rol oynar.
2. Plazma membranından aminoasit taşınımına katılır.
3. Hidroksil radikali ve singlet oksijen süpürücüsü olarak görev yapar.

4. GPx'in kofaktörü olması nedeniyle H_2O_2 ve lipid peroksidlerin detoksifikasyonuna katkıda bulunur.
5. Vitamin C ve vitamin E gibi nonenzimatik antioksidanları aktif formuna dönüştürebilir.
6. Apoptozise karşı hücreleri korur. Bu koruyucu etki, detoksifikasyon ve hücre redoks durumunu kapsayan çok faktörlü mekanizmalardan kaynaklanmaktadır.

Sigara içme, alkol tüketimi, kafein, asetaminofen, aşırı egzersiz, x-, γ - ve UV radyasyon, iyi beslenmeme, enfeksiyonlar, stres, bazı ilaçlar ve bazı çevresel kirleticiler GSH tüketimine neden olur. Ayrıca yaşla beraber de vücuttaki GSH miktarında azalma gözlenir (265, 266).

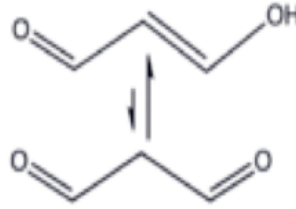
Lipid Peroksidasyonu

Tüm biyolojik sistemler yaşam için uygun koşulları sağlamak amacıyla oksitlenme ve indirgenme reaksiyonlarını dengeleyerek redoks eşitliğini sağlamaktadır. Redoks homeostazındaki bozulmalar ile biriken oksitleyici maddeler DNA, proteinler ve lipidleri oksitleyebilmekte, böylece yapılarını, aktivitelerini ve fiziksel özelliklerini değiştirebilmektedir (226).

Lipid peroksidasyonu (LP), genellikle oksidanların karbon-karbon bağı içeren membran lipidlerinden (özellikle doymamış yağ asitlerinin) bir elektron koparılması olarak tanımlanabilir. Bunun sonucu olarak membran bütünlüğü oksidatif hasarla bozulur, membran yapısında ve fonksiyonlarında değişiklikler görülebilir (267-269). LP'nun biyolojik membranlardaki sonuçları (269, 270);

- Membran akışkanlığının değişmesi, membran potansiyelinin düşürülmesi
- H^+ ve diğer iyonlara permeabilitesinin artması ve membranın yırtılarak hücre içeriğinin ve lizozomal hidrolitik enzimlerin dışarıya salınması şeklinde görülür.
- Sonuçta hücre ölümüne kadar giden bir tablo görülebilir.

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler başlıca lipit hidroperoksitler (LOOH), MDA ve 4-hidroksialkaneller olarak sıralanabilmektedir (268, 269). Bu ürünlerin çeşitli toksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (271, 272). MDA, hücre membranlarında yer alan hidroperoksitleri etkileyerek iyon geçirgenliğini bozar ve enzim aktivitelerini değiştirebilir. Ayrıca, DNA gibi makromolekülleri etkileyerek ciddi hasarlara neden olabilen MDA uzun yıllardır LP'nin belirlenmesinde önemli bir biyogösterge olarak kullanılmaktadır (269). LP'nin en önemli bir diğer aldehit ürünü 4-hidroksi-2-nonenal (HNE)'dir. MDA bakteri ve memeli hücrelerinde mutajen, sıçanlarda kanserojendir. HNE, zayıf bir mutajendir ancak LP'nin en önemli toksik ürünüdür (226, 270).



Şekil 2.14. Malondialdehit'in yapısı.

Yapılan birçok çalışma lipit peroksidasyonunun; inflamasyon, kanser, nörodejeneratif hastalık, böbrek dejenerasyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca LP, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısını, fonksiyonunu değiştirmekten ve bu moleküllerin sitotoksitesinden sorumludur (226, 270).

Glutasyon peroksidaz enzimleri, özellikle GPx4, lipit peroksitleri alkollere indirgemek için yardımcı substrat olarak GSH kullanmaktadır. Bu enzimin inaktivasyonu LP birikimine ve genellikle hücre ölümüne neden olmaktadır (270).

Protein Oksidasyonu

Proteinlerdeki sülfhidril ve aromatik aminoasit grupları oksidatif hasara karşı savunmasızdır. Protein oksidasyonu, ROT ile doğrudan veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu indüklenen protein modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (273, 274). ROT üretimine neden olan tüm reaksiyonlar ve ajanlar protein oksidasyonuna yol açabilmektedir (275, 276). Bu protein hasarı, bölgesel

amino asit modifikasyonu, peptit zinciri fragmentasyonu, hücrede elektriksel yükün farklılaşması, enzim aktivitesinde değişiklikler, membran taşıyıcılarının hasarı ve reseptörlerle etkileşme gibi çeşitli mekanizmalarla oluşabilmektedir (241, 277).

Radikal kaynaklı reaksiyonlar genellikle protein omurga hasarına neden olmaktadır. Bu reaksiyonlar sonucunda hidrojen atomunun α -karbondan ayrılması ile karbon (C) merkezli radikal oluşmaktadır. C-merkezli radikal O_2 ile reaksiyona girebilir, peroksil radikali oluşumuna ve peroksil radikalleri de hidroperoksit üretimine neden olabilir. Her iki durum protein omurgasının parçalanması ile sonuçlanmaktadır (278, 279).

Aminoasit yan zincirlerinin oksidasyonu protein omurga oksidasyonundan daha karmaşık bir mekanizma olup, alkoksil radikalleri, hidroperoksitler, alkoller, karboniller gibi birkaç oksidasyon ürününün oluşumuna neden olmaktadır. Protein karbonilleri prolin, arginin, lizin, treonin ve diğer aminoasit artıklarının oksidasyonu ve protein omurgasının oksidasyonu sonucu üretilmektedir. Protein karbonilleri aminoasitler (sistein, histidin ve lizin) ile reaktif karbonil bileşikler (ketonlar ve aldehitler) arasındaki reaksiyonlar sonucu oluşabilir, LP veya glikasyon/glikoksidasyon reaksiyonlarına neden olabilir (279, 280).

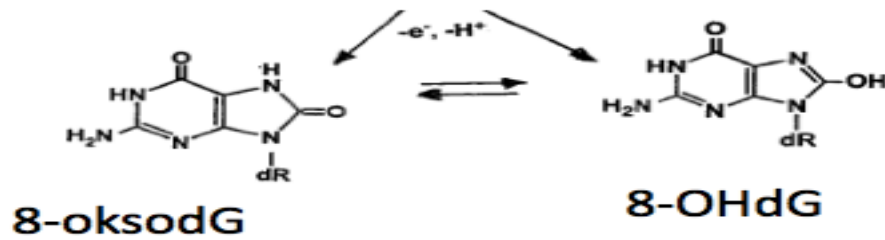
Aromatik amino asit artıklarının oksidasyonuna örnek olarak tirozin verilebilir. Tirozinin oksidatif hasarı sonucunda tirozil radikalleri oluşmaktadır. Tirozin oksidasyonunun diğer önemli ürünleri 3-klorotirozin, 3,4-dihidroksifenilalanin ve 3-nitrotirozin (3-NT) dir. Oksidatif protein modifikasyonlarından en yaygın olarak ölçülenler, protein oksidasyonunun hücresel durumunu değerlendirmek için kullanılan protein karbonilleri ve 3-NT'dir (278, 280)

Protein oksidatif modifikasyonunun pek çok farklı tipi olduğu için tek bir gösterge olmamakla birlikte, protein karbonil grupları oksidatif strese bağlı hücresel hasarın en genel belirteci olarak kabul edilmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır (275, 276, 281).

Oksidatif DNA Hasarı

“Oksidatif DNA Hasarı” UV-A, UV-B, iyonize radyasyon, yüksek ısı, endüstriyel kimyasallar gibi ekzojen veya çeşitli endojen kaynakların etkisiyle oluşan serbest radikallerin DNA’da oluşturduğu hasardır (DNA çift ve tek dal kırıkları ve baz modifikasyonları gibi) ve genelde DNA onarım mekanizmaları ile onarılır. Ancak bazı durumlarda bu onarım mekanizmaları yetersiz kalır ve DNA’da gerçekleşen oksidatif hasar onarılamaz (282, 283).

Özellikle $\cdot\text{OH}$ radikalının onkogenlerin aktivasyonuna ve DNA hasarının onarımının önlenmesine neden olduğu ve karsinojenik etkinin başlamasında çok etkili bir molekül olduğu bilinmektedir (242, 284, 285). $\cdot\text{OH}$, dört DNA bazına da saldırabilir, ancak DNA hasarına neden olan diğer bir radikal singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) daha seçicidir ve dal kırığından daha çok guanin türevi ürünlerin (8-hidroksi-2’-deoksiguanozin [8-OHdG]) oluşumuna neden olur. RNT’ler, lipid peroksidasyonu ürünleri ve hipokloröz asit (HOCl) gibi reaktif ürünlerin de DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir (283, 286, 287). Çeşitli reaktif bileşiklerle hasara en fazla maruz kalan bazın guanin olduğu görülmüştür. Bu hasarın ürünü olarak ortaya çıkan 8-hidroksiguanozinin (8-dG)’nin hidroliz ürünü olan 8-OHdG’nin veya tatomeri olan 8-okso-7-hidro-2’-deoksiguanozinin (8-oksoG) (Şekil 2.15.) deteksiyonunun kolay olması bu ürünlerin DNA hasarının belirlenmesinde biyogösterge olarak tercih edilmesine neden olmuştur (286, 288). 8-oksoG hücrelerin UVA ve metilen mavisine maruziyeti sonucu singlet oksijen tarafından üretilmektedir. 8-oksoG lezyonu guanin – timin değişimine neden olabilir. Adenin replikasyon sırasında 8-oksoG ile eşleşme oranı yüksektir. Ayrıca sitozin ile eşleştirilmiş 8-oksoG anormal eşleşme olarak kabul edilmektedir (289, 290).



Şekil 2.15. 8-oksoG ve 8-OHdG’nin yapıları.

8-oksoguanin en sık karşılaşılan lezyon olsa da, $\cdot\text{OH}$ radikali adenin, timin ve sitozin ile de etkileşime girebilir. Oksidatif DNA hasarından kaynaklanan başlıca lezyonlar; 5- hidroksi-6-hidrotimin, timin glikol, sitozin glikol, 5-hidroksisitozin, urasil glikol, 5- hidroksiurasil, 8-hidroksiadenin, 2-hidroksiadenin olarak bilinmektedir (289).

Reaktif oksijen türleri tarafından hasar gören DNA, genetik kararlılık için doğrudan risk oluşturmaktadır. DNA oksidatif hasara eğilimli olduğu için, tehlikeli lezyonlardan hücreleri korumak üzere onarım sistemleri geliştirilmiştir. Oksidatif DNA hasarı; baz eksizyon onarımı, nükleotid eksizyon onarımı ve nükleotid insizyon onarımını içeren bir dizi DNA onarım mekanizması ile giderilebilir (226, 289, 290).

Onarılmayan hasarların sonucunda mutagenез, karsinogenез veya yaşlanma olayları ortaya çıkar (291, 292). ROT oluşumu ve kalıcı oksidan stresin karsinoma hücrelerinin karakteristik özelliği olduğu, hem in vivo hem de in vitro olarak gösterilmiştir (242, 293). Ayrıca oksidatif DNA hasarının, Alzheimer hastalığında, diyabette, aterosklerozda, immün ve inflamatuvar hastalıklarda rol oynadığı da bilinmektedir (294-296).

2.5. Konu ile İlgili Çalışmalar

2.5.1. Bisfenol A ile İlgili Çalışmalar

Hayvan Çalışmaları

Bisfenol A maruziyetinin, prenatal ve erken postnatal gibi hassas dönemlere denk gelmesinin sonraki nesillerde çok önemli ters etkilere neden olabileceğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Kobayashi ve ark. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, Sprague Dawley (SD) türü sıçanlara gebeliğin 6. gününden başlanarak laktasyon bitimine kadar gavaj yardımı ile BPA (4, 40, 400 mg/kg/gün) uygulanmıştır. Doğumdan sonraki 1, 3 ve 9. haftalarda yapılan çeşitli incelemeler, 400 mg/kg BPA uygulanan gebelerden doğan yavruların doğumdan sonraki 2. günde hayatlarını kaybettiğini, BPA'ya maruz kalan diğer gruplarda; anogenital açıklıkta, organ ağırlıklarında, yavru vücut ağırlıklarında ve doku gelişimlerinde maruziyetin etkilerine rastlanmamıştır (297). Watanabe ve ark.

(2003) tarafından yapılan benzer bir diğer çalışmada da SD türü sıçanlara aynı dozlarda ve dönemde BPA uygulanmıştır. Doğan erkek yavruların 9. ve 36. haftalarında yapılan incelemeler vücut ve organ ağırlıklarında, morfolojik incelemelerde ve hormon (estrogen, LH, FSH, testis testosteron) düzeylerinde kontrole kıyasla anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Plazma testosteron düzeylerinde literatür verisinin aksine kontrole kıyasla anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (298).

Howdeshell ve ark. (2008) tarafından Long Evans sıçanlarda BPA ve etinil estradiol (günlük 0,05, 0,5, 1,5, 5, 15, 50 $\mu\text{g/kg}$) prenatal maruziyetinin etkilerini incelemek amacıyla yapılan bir diğer çalışmada, sıçanlara gebeliğin 7. günü ile doğum sonrası 18. günü arası oral yoldan gavaj yardımı ile BPA (günlük 2, 20, 200 $\mu\text{g/kg}$) uygulanmıştır. Doğan erkek yavrular 5 aylıkken yapılan incelemelerde, yavru ağırlıklarında, fetal ve neonatal ölüm oranında, anogenital açıklıkta, sperm sayısında ve serum hormon (LH, testosteron, estradiol) düzeylerinde kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır (299). Okada ve ark. (2008) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise, ICR farelere gebelik ve laktasyon döneminde subkütan tüp yardımı ile estradiol (120 pg/gün, 6 ng/gün, 12 ng/gün, 120 ng/gün) ve BPA (1,2 $\mu\text{g/gün}$, 60 $\mu\text{g/gün}$) uygulanmıştır. Doğan erkek yavrular 4 haftalıkken incelemeler yapılmış ve vücut ağırlıklarında (sadece 1,2 $\mu\text{g/gün}$ BPA grubunda artış), organ ağırlıkları ve neonatal ölümlerde fark olmadığı, 1,2 $\mu\text{g/gün}$ BPA uygulanan grupta testosteron düzeylerinde belirgin artış olduğu görülmüştür ($p<0,01$). Yapılan histopatolojik incelemeler 60 $\mu\text{g/gün}$ BPA uygulanan gruptan doğan erkek yavrularda spermatogenezin bozulduğunu göstermektedir. Araştırmacılar maruziyet yolunun çok önemli olduğunu ve subkütan yolla maruziyetin oral yola kıyasla yaklaşık 20 kat daha etkili olabileceğini vurgulamışlardır (300). Maruziyet yolunun yanı sıra tür farkının da ortaya çıkabilecek toksikolojik sonuçlar açısından çok önemli bir faktör olduğu bu iki çalışma incelendiğinde akla gelecek diğer bir sonuçtur.

Salian ve ark. (2009) dişi gebe sıçanlarda (F0) yaptıkları çalışmada oral yoldan gavaj yardımı ile prenatal dönemde BPA (1,2, 2,4 $\mu\text{g/kg/gün}$) ve pozitif kontrol olarak dietilstilbesterol (10 $\mu\text{g/kg/gün}$) uygulamışlardır. F1 erkek yavruları olgunluk döneminde normal dişilerle çiftleştirilerek F2 ve F3 jenerasyonları elde edilmiştir.

Sonuç olarak F1, F2 ve F3 erkek yavruların sperm sayısı ve motilitesinde azalma ($p<0,05$; $p<0,0001$), post implantasyon kayıplarda artış ($p<0,05$; $p<0,001$) ve yavru sayısında ve F2, F3 jenerasyonlarında prostat ağırlığında kontrol grubuna kıyasla azalmalar görülmüştür ($p<0,001$; $p<0,0001$). F1 erişkin erkek sıçanlarda serum FSH, LH, testosteron ve estradiol düzeylerinde yine kontrole kıyasla belirgin azalma görülmüştür ($p<0,05$; $p<0,001$). Bu bilgiler ışığında perinatal BPA maruziyetinin erişkin erkek üreme sistemi üzerine uzun süreli ve jenerasyonlar arası geçiş gösteren ters etkileri olduğu yorumu yapılmıştır (301).

Xi ve ark. (2011) tarafından CD-1 farelerle yapılan bir diğer çalışmada, perinatal ve kronik BPA maruziyetinin etkileri izlenmiştir. Gebeliğin 1. gününden laktasyon sonuna kadar gavaj yardımıyla BPA (12, 25, 50 mg/kg/gün) uygulanmıştır; doğan yavrulara laktasyon sonrası bu dozlarda uygulama yapılmaya devam edilmiştir. Perinatal mortalitede, doğumdan sonraki 50. günde vücut ve organ ağırlıklarında, histopatolojik incelemelerde ve hormon (FSH, LH, testosteron ve estrojen) düzeylerinde değişiklik olmadığı görülmüştür. Sadece prenatal maruziyete bağlı olarak gonadal steroidojenik enzimlerin (GnRH, FSH, StAR) ekspresyonunda değişiklikler olduğu saptanmıştır (302).

Kass ve ark. (2014) tarafından yapılan diğer bir çalışmada Wistar dişi gebe sıçanlar prenatal (subkutan, 25-250 $\mu\text{g/kg}$) ve perinatal dönemde (içme suyu yoluyla 64 $\mu\text{g/kg}$) BPA'ya maruz bırakılmıştır. Bu çalışmada da reseptör ekspresyonları incelenmiş ve 250 $\mu\text{g/kg}$ ve 64 $\mu\text{g/kg}$ doz uygulanan gruplarda, postnatal 30. günde erkek yavrularda androjen reseptör ekspresyonunda, doku gelişimi ve duktal büyümede azalma olduğu görülmüştür. 60. günde spermatogenezde bozulma olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, maruziyet yoluna bağlı olmaksızın gelişimin erken dönemlerinde BPA maruziyetinin erkek üreme sistemine ters etkileri olduğu yorumu yapılmıştır (303).

BPA maruziyetinin histopatolojik etkilerinin anlaşılması açısından da çeşitli çalışmaların yapıldığı görülmektedir. Bunlardan bazıları aşağıda yer almaktadır (304-306).

LaRocca ve ark. (2011) çalışmalarında C57/B16 farelere gavaj yardımı ile oral yoldan gebeliğin 10-16. günleri arası BPA (50 µg/kg/gün, 1mg/kg/gün) ve pozitif kontrol olarak DES (2 µg/kg/gün) uygulamıştır. Bu gebelerden doğan erkek yavrular 8 haftalık olduklarında dekapite edilmiş ve BPA'nın erkek üreme sistemi üzerine etkileri incelenmiştir. Diğer çalışmalara benzer şekilde, testis ve vücut ağırlıkları, anogenital açıklık, sperm üretimi ve serum testosteron düzeyleri değerlendirilmiş; ayrıca testis dokusunda histopatolojik ve apoptotik incelemeler yapılmıştır. İncelenen parametrelerde BPA maruziyetine bağlı anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır (304).

Gamez ve ark. (2014) tarafından yapılan diğer bir çalışmada Wistar türü gebe sıçanlara gebelik ve laktasyon dönemi boyunca içme suyu ile BPA (3µg/kg/gün) uygulanmış ve doğan erkek yavrular 35 günlükken dekapite ederek çeşitli incelemeler yapılmıştır. BPA maruziyetine bağlı olarak yavru vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış ($p<0,001$), testis ağırlıklarında ise anlamlı bir azalma ($p<0,0001$) olduğu gözlenmiştir. Serum LH ve FSH düzeyleri maruziyete bağlı olarak anlamlı ($p<0,05$) şekilde artarken testosteron düzeylerinde değişiklik gözlenmemiştir. Histolojik incelemelerde testis tübül lümeninde olgunlaşmamış spermatik hücreler ve makrofaj hücrelerinin olduğu saptanmış ve BPA'nın germinal epitel doku üzerinde ters etkilere neden olabileceği yorumu yapılmıştır (305). Histopatolojik ve apoptotik incelemelerin de yapıldığı diğer bir çalışmada, Kunming türü farelere gebelik süresince gavaj yolu ile (50, 500, 2500 mg/kg) BPA uygulamıştır. Erkek yavrular 8 haftalıkken ötenazi işlemi gerçekleştirilmiş ve çeşitli incelemeler yapılmıştır. Yavruların vücut ağırlığında anlamlı bir değişim bulunamazken, BPA uygulamasının testis ağırlıklarında azalmaya neden olduğu saptanmıştır ($p<0,01$). BPA uygulanan gruplarda yavru ölümünde doz bağımlı bir artış olduğu görülmüştür ($p<0,01$). BPA uygulanan gebelerden doğan yavruların serum estrogen düzeyleri kontrole kıyasla doz bağımlı olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,01$). Testosteron ve FSH düzeylerinde ise kontrole kıyasla anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0,01$). BPA uygulamasının apoptozu tetiklediği, testis dokusunda tübüler lümeninde genişlemeler ve Sertoli hücrelerinde vakuol oluşumu gibi histopatolojik etkileri olduğu belirtilmiştir (306).

Kobayashi ve ark. (2012) çalışmalarında SD sıçanları gebeliğin 6. Gününden başlayarak laktasyon dönemi sonuna kadar 0,33, 3,3, 33 ppm BPA içeren yemle

beslemiştir. Doğan yavrular 5 haftalıkken ya da 3 aylıkken dekapite edilmiş ve incelemeler yapılmıştır. Doğan yavruların vücut ağırlıkları sadece en düşük konsantrasyonda BPA içeren yem ile beslenen grupta (0,33 ppm) düşük bulunmuştur. Anogenital açıklık, organ ağırlıkları (sadece 33 ppm içeren yemle beslenen grupta epididimis ağırlığında anlamlı azalma), sperm sayısı ve serum testosteron düzeyinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Araştırmacılar, BPA'nın klinik bir ters etkiye neden olmadığı epididimisteki ağırlık azalmasının da toksikolojik açıdan öneminin tartışmalı olduğu yorumunu yapmışlardır (307). Christiansen ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmalarda gebe Wistar sıçanlara benzer şekilde gebeliğin 7. gününden laktasyon döneminin sonuna kadar gavaj yardımı ile BPA (0,025, 0,25, 5, 50 mg/kg/gün) uygulanmıştır. Erkek yavrular 16. günde dekapite edilerek çeşitli incelemeler yapılmıştır. Vücut ve organ ağırlıklarında anlamlı bir değişim olmadığı, ancak diğer çalışmanın aksine BPA maruziyetine bağlı olarak anogenital açıklıkta azalma ve meme ucu sayısında artış olduğu saptanmıştır ($p<0,05$) (308).

Nanjappa ve ark. (2014) da benzer bir çalışmayı planlamışlar; Long Evans türü sıçanlarla yaptıkları çalışmalarında, gebeliğin 12. gününden başlayarak laktasyonun sonuna kadar gavajla 2,5 ve 25 $\mu\text{g/kg/gün}$ BPA uyguladıkları gebelerin erkek yavrularını farklı olarak 70-98. günler arası yüksek yağ içerikli (YYD) ya da düşük yağ içerikli (DYD) diyet ile beslenmişlerdir. Yapılan incelemelerde testis ağırlıklarında, serum estrogen düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Serum testosteron düzeylerinin DYD ile beslenen sıçanlarda değişikliğe neden olmadığı gözlenirken, YYD ile beslenen yavrularda prenatal BPA maruziyetinin testosteron düzeyini arttırdığı görülmüştür. Leydig hücre testosteron sekresyonunun ise diyetten bağımsız olarak BPA maruziyeti ile azaldığı saptanmıştır. Bu çalışmada, oksidatif stres parametreleri de değerlendirilmiş, serum TBARs ve GSH düzeylerinde YYD ile beslenen yavrularda, Leydig hücre ROS üretiminde beslenmeden bağımsız olarak 25 $\mu\text{g/kg/gün}$ BPA uygulamasına bağlı artış olduğu görülmüştür. Leydig hücre SOD, CAT, GPx ve GSH düzeylerinde 25 $\mu\text{g/kg/gün}$ BPA maruziyetine bağlı olarak artış olduğu gözlenmiştir (309). Kabuto ve ark. (2004) tarafından yapılan bir diğer çalışmada da embriyonik/fetal dönemde BPA maruziyetinin oluşturabileceği oksidatif hasar incelenmiştir. Dişi gebe fareler gebelik ve laktasyon dönemi boyunca 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ BPA içeren içme suyu ile BPA'ya maruz

bırakılmış ve doğan yavrular 4. haftanın sonunda dekapite edilerek karaciğer, böbrek ve testis doku TBARs, SOD, CAT, GPx, GSH düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçlar embriyonik ve fetal dönemde BPA maruziyetinin yavru dokularında oksidatif stres ve peroksidasyona neden olabileceğini kanıtlar niteliktedir. Yavru vücut ağırlıklarında değişme gözlenmezken, testis ağırlıklarında maruziyete bağlı anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Doku BPA düzeyleri ölçülmüş, testis ve böbreklerde yüksek bulunmuştur. Bu da BPA'nın fetusa geçtiğine işaret etmektedir (214).

İnsan Çalışmaları:

İnsanlarda BPA maruziyetinin düzeylerinin belirlenmesi ve neden oldukları toksik etkilerin anlaşılması amacıyla farklı popülasyonlarda çalışmaların yapıldığı görülmektedir. BPA maruziyetine bağlı gözlenen oksidatif stres ve prenatal BPA maruziyetinin etkilerini inceleyen sınırlı sayıdaki çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Yang ve ark. (2009) çalışmalarında 485 yetişkin bireyin (erkek $n=259$, kadın $n=92$, menapoz döneminde kadın $n=134$) idrar örneklerinde BPA düzeyleri ile oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkiyi saptamaya çalışmıştır. Sadece postmenapozal dönemdeki kadınların idrar MDA ve 8-OHdG düzeyleri ile BPA düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu ($p<0,05$) bulunmuştur ve bu dönemde kadınların BPA'nın östrojenik etkisine karşı daha hassas olabileceği vurgulanmıştır (310).

Lv ve ark. (2016) Çin'de 3-6 yaş aralığındaki 96 çocuğun (59 erkek, 37 kız) inhalasyon yolu ile BPA maruziyetini ve oksidatif stres ile ilişkisini saptamayı amaçlamıştır. Şehrin (Guangzhou) farklı yerlerinden iç ortam ve dış ortamdaki alınan toz örnekleri incelenince dış ortamda bulunan toz örneklerinde BPA düzeyinin daha yüksek olduğu ve bu düzeyin çocuklardan alınan idrar BPA düzeylerine yaklaşık %10 oranında yansıdığı saptanmıştır. İdrar BPA düzeylerindeki artışın idrar 8-OHdG düzeylerinde artışa neden olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (311). Kim ve Hong (2017) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, 60 yaş ve üzeri toplam 560 (142 erkek, 406 kadın) kişiden alınan idrar BPA düzeyleri ile idrar MDA düzeylerindeki artışın ilişkili olduğu ($p<0,0001$) ve bu ilişkinin cinsiyet, genetik polimorfizm gibi etkenlerden bağımsız olduğu gösterilmiştir (312).

Bu çalışmalar BPA maruziyetinin çok farklı popülasyonlarda oksidatif strese neden olabileceğine işaret eder niteliktedir. Aşağıda özetlenen diğer çalışmalarda genel olarak maternal BPA maruziyetinin erkek çocuklarda üreme sistemi üzerindeki ters etkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

Miao ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada, mesleki BPA maruziyeti olduğu düşünülen bireylerin erkek çocuklarında (18 yaş altı) anogenital açıklık ölçülmüş ve bireylerin BPA maruziyetiyle çocuklarının anogenital açıklığı arasındaki ilişki saptanmaya çalışılmıştır. Kontrol grubu aynı yaş dönemlerinde ebeveynlerinden herhangi birinin BPA maruziyeti olmadığı düşünülen bireylerden (n=97), çalışma grubu ise annesi (n=15), babası (n=38) ya da anne ve babası (n=3) bu endüstride çalışan çocuklardan oluşturulmuştur. Çocukların prenatal maruziyetinin değerlendirilmesi açısından, maruziyet düzeyleri ebeveynlerinin çalışma şartları, yaşam şartları ve idrar BPA düzeyleri değerlendirilerek kategorize edilmiştir. Anneleri bu endüstride çalışan çocukların anogenital açıklığında anlamlı bir azalma olduğu ve bu azalmanın artan BPA maruziyeti ile korele olduğu tespit edilmiştir ($p<0,01$) (313).

Diğer bir çalışmada Fenichel ve ark. (2012) kordon kanında serbest BPA (unconjugated) düzeyleri ile erkek yenidoğan hormon düzeyleri ve kriptorşidizm arasındaki ilişkiyi saptamayı amaçlamıştır. Kordon kanı BPA düzeyleri testosteron ($p<0,05$) ve inhibin B ($p<0,01$) arasında pozitif bir korelasyon bulunurken, kordon kanı BPA düzeyleri ile kriptorşidizm arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (314).

Ferguson ve ark. (2014) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise Meksika'da 1994-2004 arası doğum yapan kadınların 3. trimesterlerinde alınan idrar örneklerinde ftalat ve BPA düzeyleri ölçülmüş ve bu gebelerden doğan 118 erkek çocukta 2010 yılında çeşitli incelemeler yapılmıştır. Ayrıca bu çocukların idrar ftalat ve BPA düzeyleri ölçülmüştür. Prenatal ftalat maruziyeti ile serum DHEAS ve inhibin B düzeyleri arasında negatif korelasyon olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Prenatal BPA maruziyetinin ergenlik döneminin başlama zamanı ile ilişkili olabileceği; ftalat ve BPA'ya prenatal maruziyetin büyük ölçüde adrenarj için düşük rölatif risk ile ilişkili olduğu; daha az ölçüde de puberte için rölatif risk ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Çocukluk dönemi BPA ve ftalat maruziyetinin ergenlik dönemi başlangıcını etkilemediği tespit edilmiştir. Ancak bazı ftalat metabolitlerinin ve BPA düzeylerinin

artmasıyla serum SHBG düzeylerinde artış, total ve serbest testosteron düzeylerinde ise azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (315). Aynı popülasyondan farklı bir çalışma için toplanan 1., 2. ve 3. trimester idrar örneklerinde BPA ve ftalat metabolit düzeyleri ile 8-14 yaş arası erkek üreme sisteminde gözlenen etkiler arasındaki ilişki saptanmaya çalışılmıştır. 1. ve 2. trimester DEHP düzeyleri ile erkek çocukların serum estrogen düzeyleri arasında pozitif korelasyon, 3. trimester ftalat düzeyleri ile pubik kıllanma ve testis hacmi arasında negatif korelasyon olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiştir. 2. trimester BPA düzeyleri ile erkek çocukların serum inhibin B düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu ($p<0,05$) görülmüştür. Araştırmacılar farklı dönemlerde maruz kalınan BPA ve ftalat gibi endokrin bozucuların çok farklı etkileri olabileceği, maruziyet döneminin toksik etkileri tamamen değiştirebileceğini vurgulamışlardır (316).

2.5.2. Ftalat ile İlgili Çalışmalar

Hayvan Çalışmaları

Ftalatlar antiandrojenik etkileri olduğu bilinen endokrin bozucu kimyasal maddelerdir. Bu etkilerin yaşamın hangi döneminde nasıl ortaya çıktığının anlaşılması açısından aşağıda özetlenecek çalışmalar fetal/neonatal dönem, pubertal dönem ve yetişkinlik döneminden örnekler içerecek şekilde derlenmiştir.

Borch ve ark. (2006) çalışmalarında Wistar sıçanlara gebeliğin 6-21. günleri arası gavaj yardımı ile DEHP (10, 30, 100, 300 mg/kg/gün) uygulamış ve 21. günün sonunda yavrularda yaptıkları incelemelerde yüksek dozlarda (100 ve 300 mg/kg/gün) testis dokusunda histopatolojik değişiklikler ve steroidojenik gen ekspresyonlarında azalma, Leydig hücre testosteron üretiminde azalma (300 mg/kg/gün) ($p<0,05$) olduğunu; ancak diğer dozlarda bu değişikliklerin gözlenmediğini ve plazma testosteron düzeylerinin DEHP maruziyeti ile değişmediğini vurgulamışlardır (317).

Yapılan diğer bir çalışmada Christiansen ve ark. (2010) gebe Wistar sıçanlara gebeliğin 7. günü ile laktasyon döneminde (16. gününe kadar) 3-900 mg/kg arası değişen dozlarda oral yoldan DEHP uygulamıştır. Erkek yavrular 16 günlükken yapılan incelemeler DEHP maruziyetinin erkek yavrularda 10 mg/kg gibi düşük dozlarda bile antiandrojenik etkileri olduğu (anogenital açıklığı azalttığı ve meme

sayısını arttırdığı) bildirilmiştir ($p<0,05$). Maruz kalınan daha yüksek dozlarda ise testiste histopatolojik bozukluklar, prostat ve testis ağırlığında ve prostatta androjen düzenleyici gen ekspresyonlarında azalma ($p<0,05$) görüldüğü bildirilmiştir (318).

Li ve ark. (2013) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, SD türü sıçanlara gebeliğin 12-19. günlerinde oral yoldan DEHP (500, 750, 1000 mg/kg/gün) uygulanmıştır. Erkek yavrularda yapılan incelemeler (30. günde) anogenital açıklık (500, 750, 1000 mg/kg/gün) ve penis uzunluğunda (750, 1000 mg/kg/gün) azalma olduğunu ($p<0,05$), hipospadias insidansında doz bağımlı artış olduğunu ($p<0,05$) ve hipospadiasın testis dokusunda histopatolojik bozuklukları beraberinde getirdiğini göstermiştir (319).

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda araştırmacılar fetal maruziyetinin fetal ve neonatal dönemde erkek üreme sistemine etkilerini saptamayı amaçlamıştır. Bu maruziyetin pubertal ve erişkinlik dönemlerindeki etkilerini incelemek amacıyla yapılan farklı çalışmalar da bulunmaktadır.

Kobayashi ve ark. (2006) dişi sıçanlara gebeliğin 6. gününden başlayarak laktasyon dönemi sonuna kadar gavaj yardımı ile DEHP (25, 100, 400 mg/kg/gün) uygulamıştır. Erkek yavrular 3 ve 6 haftalıkken çeşitli incelemeler yapılmıştır. Maternal ağırlık, yavru vücut ve organ ağırlıkları ve hormon düzeylerinde DEHP maruziyetine bağlı anlamlı bir değişim görülmemiştir (320). Akingbemi ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmalarda, DEHP'in doğrudan prepubertal dönem ve erişkinlik dönemindeki maruziyeti ile maternal (gebelik dönemi ve laktasyon dönemi) maruziyetinin sonuçlarını saptamak amaçlanmıştır. Maternal maruziyetin serum LH ve testosteron düzeylerinde azalmaya ($p<0,05$), fetal ve prepubertal dönem maruziyetlerinin Leydig hücre testosteron üretiminde azalmaya ($p<0,05$) neden olduğu görülmüştür. Bu etkiler erişkinlik dönem maruziyetinde gözlenmemiştir (321).

Andrade ve ark. (2006) Wistar sıçanlarla yaptıkları çalışmalarında, sıçanlara gebelik ve laktasyon dönemi boyunca gavaj yardımı ile düşük (0,015, 0,045, 0,135, 0,405 ve 1,215 mg/kg/gün) ve yüksek dozlarda (5, 15, 45, 135, 405 mg/kg/gün) DEHP uygulamıştır. Erkek yavrularda (144 ± 7 günlükken) DEHP maruziyetinin etkileri çeşitli incelemelerle saptanmaya çalışılmıştır. Yüksek doz maruziyetinde, seminal

vezikül ağırlığında azalma (405 mg/kg/gün), testislerde makroskopik değişiklikler ve inmemiş testis (5, 135, 405 mg/kg/gün), spermatogenezde bozulma (405 mg/kg/gün) ve plazma testosteron düzeylerinde (405 mg/kg/gün) artış görülmüştür ($p<0,05$). Düşük düzeylerde de (0,045, 0,405 mg/kg/gün) plazma testosteron düzeylerinde artış, sperm üretiminde azalma (0,045 mg/kg/gün) ve anormal sperm sayısında artış (0,045, 0,135 mg/kg/gün) görülmüştür ($p<0,05$) (322). Benzer bir çalışma Dalsenter ve ark. (2006) tarafından Wistar sıçanlar ile yapılmıştır. Gebelik ve laktasyon dönemi DEHP (20, 100, 500 mg/kg/gün) uygulaması ile maternal ağırlık, yavru vücut ve organ ağırlıklarında anlamlı fark bulunamamıştır. Sadece 500 mg/kg/gün uygulanan grupta puberte ve erişkinlik döneminde (10 ve 25. haftalarda) seminal vezikül ve prostat ağırlıklarında anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Yine bu dozda ftalat maruziyetinin puberte ve erişkinlik döneminde günlük sperm üretimi ve sperm sayısında anlamlı azalmaya neden olduğu ifade edilmiştir ($p<0,05$) (323).

Culty ve ark. (2008) tarafından SD türü sıçanlar kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada gebeliğin son haftası oral yoldan DEHP (58,117, 234, 469,700, 938, 1250 mg/kg/gün) uygulanmıştır. Doğan erkek yavruarda yüksek dozlarda (938, 1250 mg/kg/gün) anogenital açıklıkta anlamlı azalma (3. gün) ($p<0,05$), kriptorşidizm oranında artış (%10, %25) ve testiküler atrofi (ağırlıkta %40 azalma) gözlemlendiği ifade edilmiştir (60. gün). Ayrıca, serum testosteron düzeylerinde (234, 469,700, 938, 1250 mg/kg/gün) anlamlı azalmalar gözlenmiştir ($p<0,05$), ancak estrogen düzeylerinde fark bulunamamıştır (324). Barakat ve ark. (2017)'nin çalışmalarında ise, CD-1 farelere gebeliğin 11. gününden başlayarak doğuma kadar oral yoldan DEHP (20, 200 ug/kg/gün, 500,750 mg/kg/gün) uygulanmıştır. Erişkinlik döneminde dozdan bağımsız olarak serum testosteron düzeylerinde azalma (16. ay) estradiol (16. ay) ve LH (22. ay) düzeylerinde artış ($p<0,05$), semen kalitesi (22. ay) ve fertilitede (7, 19. ay) azalma ($p<0,05$) ve testiste patolojik oluşumlar (22. ay) gözlenmiştir (325).

Ftalat maruziyetinin nesiller arası etkilerini gösterebilmek amacıyla tasarlanmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Blystone ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışma örnek olarak verilebilir. Araştırmacılar çalışmalarında hem dişi hem erkek SD sıçanlara 1,5-10000 ppm (0,1-400 mg/kg/gün) arası değişen miktarlarda DEHP içeren yem aracılığıyla 6 hafta DEHP uygulamıştır. 6 haftanın sonunda bu

sıçanlar çiftleştirilerek sonraki (F1 ve F2) jenerasyonlardaki etkileri araştırılmıştır. İki jenerasyonda da 7500 ppm doz uygulanan grupta testis, epididmis ve prostat ağırlıklarında belirgin azalma olduğu saptanmıştır. Ayrıca, 10000 ppm uygulanan grupta F1 jenerasyonunda üreme olmamıştır (326). Diğer bir nesiller arası çalışma ise Doyle ve ark. (2013) tarafından yapılmıştır. CD-1 türü farelere gebeliğin 7-14. günleri arası oral yoldan 500 mg/kg/gün DEHP uygulamıştır. F1 neslinde DEHP maruziyetine bağlı olarak vücut ağırlığında artış, anogenital açıklıkta azalma, meme ucu sayısında artış olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bu etkiler sonraki nesillerde gözlenememiştir, ancak histopatolojik incelemeler testis dokusunda DEHP etkisinin nesiller arası (F1, F2, F3) aktarılabilirliğini göstermiştir. F1, F3 ve F4 neslinde DEHP maruziyetinin kontrole kıyasla sperm sayısında azalmaya neden olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (327).

Yapılan diğer bir çalışma, ftalat maruziyetinin vücudun oksidan/antioksidan dengesini bozarak etki gösterebileceğini göstermiştir. Zhang ve ark. (2014) tarafından yapılan bu çalışmada, SD erkek sıçanlarda DEHP maruziyetinin zararlı etkilerinin antioksidan özelliği olduğu bilinen genistein uygulaması ile azaltılabileceği hipotezinde yola çıkılmıştır. Prepubertal sıçanlara (22. gün-33. gün) gavaj yolu ile genistein (50 mg/kg/gün), DEHP (50 mg/kg/gün, 150 mg/kg/gün, 450 mg/kg/gün) ve iki bileşik aynı dozlarda karışımlar halinde uygulanmıştır. Erişkinlik döneminde (90. gün) çeşitli incelemeler yapılmış ve 50 mg/kg/gün DEHP uygulanan grupta anogenital açıklığın kontrol grubuna göre azaldığı ve DEHP maruziyetine bağlı olarak görülen testiküler oksidatif stresin (SOD, CAT, GSH, GPx, MDA) genistein uygulaması ile iyileştirilebileceği görülmüştür ($p<0,05$) (328).

İnsan Çalışmaları

İnsanlardaki ftalat maruziyeti ve bunun etkilerinin anlaşılması için farklı popülasyonlarda yapılmış çok çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle maternal maruziyetin doğacak erkek çocuklarda ileriki yaşlarda görülebilecek üreme sistem bozukluklarının incelendiği çalışmalar bu tez kapsamında sonuçların değerlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Araki ve ark. (2014) tarafından 2002-2005 yılları arasında Hokkaido (Japonya)'da yapılan bir çalışmada, gebelerden gebeliğin 23-35. haftaları arasında kan

örnekleri (1796) ve doğum sırasında kordon kanları (514) alınmıştır. Kordon kanları alınamayan gebeler çalışmaya dahil edilmemiştir. Gebelere ait kan örneklerinde DEHP ve MEHP düzeyleri, kordon kanlarında ise estrogen, testosteron, SHBG, FSH, LH, progesteron, inhibin B ve INSL3 düzeyleri ölçülmüştür. Gebe kan MEHP düzeyleri ile erkek çocuklarına ait kordon kanı P, inhibin B, INSL3, testosteron ve testosteron/estrogen düzeyleri arasında negatif korelasyon olduğu saptanmıştır ($p<0,05$) (329).

Benzer bir çalışma Su ve ark. (2014) tarafından 2001-2009 arasında Taiwan'da doğum yapan kadınların 3. trimester idrar örnekleri alınarak yapılmış ve bu gebelerden doğan çocuklar (61 erkek, 69 kız) 8 yaşına gelene kadar izlenmiştir. Yeni doğan incelemeleri (baş çevresi, boy, kilo, doğum haftası, meme çevresi), 8 yaşındaki çocuklarda Tanner kriterlerine göre cinsiyet gelişiminin değerlendirilmesi ve diğer çeşitli incelemeler (kilo, boy, kemik yaşı, vücut kitle indeksi, kan basıncı, kan testosteron, progesteron, estrogen, FSH düzeyleri) yapılmış ve çocukların idrar ftalat düzeyleri ölçülmüştür. Yapılan incelemelerde sadece anne idrar mono metil ftalat (MMP) düzeyleri ile erkek çocuklarının doğum ağırlığı arasında negatif bir korelasyon olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Anne idrar ftalat düzeyleri ile diğer parametreler ve çocuk idrar ftalat düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (330).

Axelsson ve ark. (2015) fetal dönem ftalat maruziyetinin etkilerini saptamayı amaçlamış ve Malmö (İsveç)'de 1989-1992 yılları arasında doğan erkeklerden bir çalışma grubu oluşturmuştur. Maternal maruziyetin saptanabilmesi amacıyla gebeliğin farklı dönemlerinde (8-14. hafta) alınan ve kan bankasında saklanmış olan kan örneklerinde (n:153) ftalat (DEHP ve DİNP'nin) metabolit düzeyleri ölçülmüştür. Anne serum ftalat metabolit düzeyleri arttıkça, popülasyonun semen hacmi ve testiküler hacminde azalma, FSH ve LH düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$) (331). Swan ve ark. (2015), 2010-2012 yılları arasında Amerika'nın çeşitli yerlerinde (California, Minneapolis, Seattle) gebelerden toplanan 1. trimester idrar ftalat düzeyleri ile erkek çocuklardaki anogenital açıklık arasında negatif ilişki olduğunu ifade etmişlerdir ($p<0,05$) (332). Martino-Andrade ve ark. (2016) yine bu proje kapsamında toplanan örneklerde 1., 2. ve 3. trimester idrar ftalat düzeyi ile erkek üreme sistemi bozuklukları arasındaki ilişkiyi saptamaya çalışmıştır. 1. trimester ftalat

maruziyetinin anogenital açıklığı azaltabileceği ($p<0,05$), 2. trimester ftalat maruziyetinin penis genişliğini ters yönde etkileyebileceğini ($p<0,05$), ancak 3. trimester ftalat maruziyeti ile bu parametreler arasında ilişki olmadığını ifade etmişlerdir. Bu bilgiler ışığında gebeliğin farklı dönemlerinde maruziyetin farklı sonuçlar doğurabileceği vurgusu yapmışlardır (333).

Ftalat maruziyetinin oksidatif stres ile ilişkilendirildiği çalışmalar da mevcuttur. Ferguson ve ark. tarafından yapılan çeşitli çalışmalar bu ilişkiyi kanıtlar niteliktedir. Porto Riko (2014)'da yapılan çalışmada gebelerden 1., 2. ve 3. trimesterde idrar ve kan örnekleri alınmış ($n=139$) ve ftalat maruziyetinin inflamasyon ve oksidatif stres ile ilişkisi saptanmaya çalışılmıştır. İnflamasyon parametreleri (CRP, IL-1B, IL-6, IL-10, TNFa) ile idrar ftalat metabolit düzeylerinde sadece IL-10-MECPP ve IL-6-MCNP arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca idrar oksidatif stres parametrelerinin (8-OHdG, izoprostan) idrar ftalat düzeyleri ile artış gösterdiği saptanmıştır (334). Diğer çalışmada ise 2006-2008 yılları arası Boston (Amerika)'da 482 gebeden, gebeliklerinin farklı haftalarında (10, 18, 26, 35) toplanan idrar ftalat düzeyleri ile idrar oksidatif stres parametre (8-OHdG, ve 8-izoprostan) düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (335).

2.5.3. Kombine Maruziyet ile İlgili Çalışmalar

Endokrin bozucu olduğu bilinen birden fazla kimyasal maddeye aynı anda maruz kalmak tekli maruziyete göre farklı sonuçlar doğurabilir. Günümüze kadar yapılmış olan çok sayıda çalışmanın bu kimyasal maddelere tekli maruziyetin sonuçlarını incelediği görülmektedir. Ancak az sayıda çalışma birden fazla kimyasal madde maruziyetinin değerlendirilebileceği şekilde tasarlanmıştır.

Howdeshell ve ark. (2007) çalışmalarında DEHP (500 mg/kg/gün) ve dibutil ftalatın (DIP) (500 mg/kg/gün) tekli ve bir arada (500 mg/kg/gün DEHP+500 mg/kg/gün DIP) maruziyetlerinin erkek üreme sistemi üzerine etkilerini saptamayı amaçlamıştır. SD türü gebe sıçanlara gebeliğin 14-18. günleri arası oral yoldan bu kimyasal maddeler uygulanmıştır. Bu gebelerden doğan erkek yavruların tamamında kontrol grubuna kıyasla anogenital açıklıkta azalma, DEHP ve kombine grupta meme başı sayısında artış olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bu iki parametrede de kontrole

kıyasla en büyük farkın kombine grupta olduğu ve bu grupta fetal/neonatal ölümlerde artış olduğu ($p<0,005$) ifade edilmiştir. Erişkinlik dönemine gelen (7. ay) yavrularda kombine maruziyet grubunda artan meme ucu sayısının kalıcı olduğu, penis anomalilerinde artış olduğu ve testis dokusunda histolojik bozukluklar bulunduğu ifade edilmiştir. Fetal testis Leydig hücre testosteron üretimi tüm gruplarda azalmıştır ($p<0,01$), ancak azalma kombine maruziyette daha dramatik ($p<0,001$) miktarlarda bulunmuştur (336).

Xi ve ark. (2011) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, 8 haftalık CD-1 farelere gebelik ve laktasyon dönemi boyunca (gebeliğin 1. gününden başlanarak laktasyonun sonu olarak düşünülen doğum sonrası 21. güne kadar) BPA ve DEHP kombine şekilde (0,1, 1 ve 10 mg/kg/gün dozlarda) uygulanmıştır. Bu gebelerden doğan yavruların bir kısmında neonatal dönemde (doğumdan sonraki 15. günde) bir kısmında ise prepubertal dönemde (doğumdan sonraki 42. günde) incelemeler yapılmıştır. Doğum anında dişi ve erkek yavru sayısı, ölü doğum sayısı doğan yavruların belirli aralıklarla vücut ağırlıkları ve anogenital açıklıkları ölçülerek kaydedilmiştir. Sadece 1 ve 10 mg/kg/gün dozlarda maruz kalan yavruların erkek/dişi yavru oranının azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Her iki dönemde de gruplarda testis ağırlıkları ölçülmüş ve maruz kalan yavrularda anlamlı azama olduğu saptanmıştır ($p<0,01$). Prepubertal dönemde çalışma gruplarının epididimal sperm sayıları incelenmiş ve plazma FSH ve testosteron düzeyleri ölçülmüştür. 1 ve 10 mg/kg/gün dozda maruz kalan grupların sperm sayılarında ($p<0,05$) ve tüm dozlarda plazma FSH ve testosteron düzeylerinde kontrole kıyasla anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Gen ekspresyonlarına bakılan yavruların hipofizde FSH ve TSH ekspresyonlarında (sadece prepubertal dönemde) azalma ($p<0,05$), testiste AR ve AMH ekspresyonlarında (sadece neonatal dönemde) azalma ($p<0,05$), Cyp19a ekspresyonlarında ise artış olduğu saptanmıştır ($p<0,01$) (337).

Manikkam ve ark. (2013) çalışmalarında, SD türü sıçanları 3 gruba ayırmış ve gebeliğin 8-14. günleri intraperitoneal injeksiyon (ip) yolu ile dozlama yapmıştır. Kontrol grubuna sadece taşıyıcı, plastik grubuna karışım halinde BPA (50 mg/kg/gün), DEHP (750 mg/kg/gün) ve DBP (66 mg/kg/gün) ve düşük doz plastik grubuna bu maddeler yine karışım halinde yarı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Bu gebelerden

doğan yavrular (F1) ve iki jenerasyon sonrası (F3) yavrular 1 yıllarını doldurduklarında çeşitli incelemeler yapılmıştır. Testosteron düzeylerinde, dişi erkek yavru oranlarında, vücut ve organ ağırlıklarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark bulunamamıştır. Testis dokusunda histopatolojik anomalilerde anlamlı artış (F1 neslinde; $P<0,001$) ve F3 neslinde apoptotik spermatojenik hücre sayısında anlamlı artışlar gözlenmiştir ($P<0,001$). Araştırmacılar bu dozları seçerken amaçlarının insanların maruz kaldığı düzeyleri seçerek risk değerlendirmesi yapmak olmadığını, daha yüksek dozlarda bu maddelerin etkilerini görmeyi amaçladıklarını belirtmişlerdir. F3 neslinde inceleme yapma amaçlarını ise kuşaklararası etkinin gözlemlendiği nesil olması olarak açıklamışlardır. F1 ve F2 neslinin F0'a uygulanan kimyasal maddeye doğrudan maruz kaldığı, ancak 3. nesil yavrularda epigenetik etkilerin gözlenebileceği vurgulanmıştır (338).

Jones ve ark. (2014) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, SD sıçanlara gebeliğin son haftası genistein (10 mg/kg/gün), DEHP (10 mg/kg/gün) ve karışımlarını (10 mg/kg/gün genistein+10 mg/kg/gün DEHP) uygulamış ve bu endokrin bozucu bileşiklerin erkek yavrular üzerindeki etkisini saptamaya çalışmıştır. Yavrular 2, 4 ve 6 aylıkken çeşitli incelemeler yapılmış, vücut ağırlıklarında, serum testosteron, LH ve FSH düzeylerinde değişiklik olmadığı kombine maruziyet grubunun testis ağırlıklarında artış olduğu görülmüştür. Ancak gen ekspresyonlarında (mast hücre biyogöstergeleri, proinflamatuvar mekanizmalarda görevli genler ve Leydig, Sertoli hücrelerindeki spesifik genlerde) kontrole kıyasla üç grupta da ciddi değişiklikler olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (339).

Isling ve ark. (2014) çalışmalarında gebe Wistar türü sıçanlara gebeliğin 7. günü ile doğumdan sonraki 22. gün arasında 4 östrojenik (BPA'nın da aralarında bulunduğu) ve 13 antiandrojenik (DEHP ve DBP'yi içeren) maddeden oluşan karışımı uygulamışlardır. Doz seçimini insanların günlük maruz kalabileceklerin düzeyin 150 ve 450 katı olarak belirlemişlerdir. Sıçanlar kontrol grubu, 150 katlık karışım grubu, 450 katlık karışım grubu ve 450 katlık sadece anti androjenlerden oluşan karışım grubu olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Bu annelerden doğan yavrular dişi ve erkekler olarak dozlama sonrası ayrılmıştır. Hayvanlar 19 aylık olana kadar çeşitli incelemeler yapılmıştır. Puberte başlangıcında anlamlı bir değişim olmadığı görülmüştür.

Erişkinlik dönemi sperm sayılarında tüm gruplarda kontrole kıyasla anlamlı azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Hayvanların vücut ve testis ağırlıklarında maruziyete bağlı anlamlı bir değişme olmadığı görülmüş ve plazma testosteron, inhibin düzeylerinde kontrole kıyasla anlamlı bir fark bulunamamıştır. Araştırmacılar gruplar arası değişiklikleri incelerken karışıma östrojenik maddelerin eklenmesinin anti androjenik maddelerin etkisinde değişikliğe neden olmadığı sonucuna varmışlardır. Olgun hayvanlarda saptanan sperm sayısında azalmanın insanlarda görülen infertilitenin göstergesi olabileceği belirtilmiştir (340).

Yang ve ark. (2016) ise çalışmalarında BPA (0,05 mg/kg/gün) ve izobütil paraben (IBP)'nin (2,5 mg/kg/gün) tekli ve kombine haldeki maruziyetinin etkilerini incelemeyi amaçlamıştır. Gebeliğin 6. gününden başlanarak gebelik ve laktasyon dönemi gavajla madde uygulanan gebelerden doğan erkek yavrular 10 haftalıkken dekapite edilmiş ve çeşitli incelemeler yapılmıştır. Yavru vücut ağırlıkları ve organ ağırlıkları, anogenital açıklık ve serum hormon (LH, FSH, estrojen, testosteron) düzeylerinde ve histolojik incelemelerde anlamlı bir değişim bulunamamıştır. Sperm sayısı ve motilitede kontrole kıyasla tüm gruplarda azalma olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). En büyük azalma kombine maruziyet grubunda görülmüştür (341).

Yukarıda özetlenen sınırlı sayıdaki çalışma, BPA ve DEHP'e prenatal dönemde gerek tek tek gerekse bir arada maruziyetin etkilerinin daha geniş kapsamlı incelenmesi gerektiğine dikkat çekmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

8-OHdG Tayin kiti (BIOXYTECH® 8-OhdG-EIATM)	Oxis International, Inc.
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Lab Vision Ultra Vision Plus Detection System
Alüminyum potasyum sülfat	Sigma-Aldrich
Amonyak	Atabay Kimya Sanayi ve Ticaret A.Ş.
Apoptoz kiti (In Situ Cell Death Detection Kit)	Roche
Asetik asit	Sigma-Aldrich
Bisfenol A	Sigma-Aldrich
Dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS) kiti	MyBioSource
Di (2-etilhekzil)ftalat (DEHP)	Sigma-Aldrich
Dietilentriamin pentaasetik asit (DTPA)	Sigma-Aldrich
DiffQuik Stat III® Sperm Boyama Seti	MidAtlantic Diagnostics
DNA İzolasyon kiti (Quick-DNATM Miniprep Kit)	Zymo Research
Eozin Yellowish (Eozin Y)	H&E
Estradiol kiti	Cayman Chemical
Etil Alkol (%96)	Alkomed
Fenilmetil sülfonil florür (PMSF)	Sigma-Aldrich
Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) kiti	Elabscience

Formaldehit	Sigma-Aldrich
Fosfat tampon tuzu (PBS)	Abcam
Glutasyon Ölçüm Kiti	Cayman Chemical
Hematoksilen kristali	Merck
Heparin (Nevparin)	Mustafa Nevzat
Hidrojen peroksit	Merck
Kloral hidrat	Riedel-de Haen
Koyun serumu	A. Ü. Veterinerlik Fakültesi'nden alınmıştır.
Ksilol	VWR Prolabo Chemicals
Lüteinize Edici Hormon (LH) kiti	Elabscience
Pikrik Asit	Sigma-Aldrich
Protein Karbonil kiti	Cayman Chemical
Protein Miktar Tayini kiti (BCA kiti)	Sigma – Aldrich
Pure Sperm Wash	NidaCon International
Seks Hormon Bağlayıcı Globulin (SHBG) kiti	Elabscience
Serum Fizyolojik	Osel İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma-Aldrich
Sitrik asit	Merck
Sodyum iyodat	Sigma-Aldrich

TBARS Deney kiti	Cayman Chemical
Testosteron kiti	Cayman Chemical
Tris	Merck
Tris hidroklorür	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Merck

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

96 kuyucuklu plak	Orlab
Buz kırma makinası	Scotsman AF100
Buzdolabı	Arçelik, 2 kapılı
Çok kanallı mikropipet (150-1200 µl)	Finpipette
Deiyonize su cihazı	Barnstead
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik, Tek kapılı
Derin dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Dijital Kamera	Leica DC490
Distile su cihazı	MES, mes08/Thermo Scientific,
Doku Prosesleme Aleti	Leica EM Tissue Processor
Etüv	Dedeoğlu
Hassas terazi	Mettler Toledo
Hemositometre	Marienfeld
Homojenizatör	Thomas Scientific

Işık mikroskobu	Leica DM 6000, Leica TP1020
Lam	Isolab
Lamel	Isolab
Mikro Santrifüj	Heraeus, Hettich, Mikro22
Mikro Santrifüj Tüpü (Kapaklı, 2 ml, 1.5 ml, 0,5 ml)	Isolab, Orlab
Mikropipet (10 – 100 µl, 100–1000 µl, 1–5 ml)	Eppendorf, Finnpiette, Labsystems
Parafin İstasyonu	Leica Eg1150H
pHmetre	Isolab
Pipet ucu (0,5–10, 10–200 µl, 100– 000 µl’lik)	Eppendorf, Top-Line
Santrifüj	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
Sıvı rezervuarı	Isolab
Spektrofotometre / Spektroflorometre	Molecular Devices, SpektraMax M2
Su Banyosu	Memmert
Terazi	XS105 Dual Range
Ultrasonik Banyo	Transsonic 460/H
Vida kapaklı deney tüpü	Isolab
Vida kapaklı şişe	Isolab
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX- 3000L

Yatay çalkalayıcı

Edmund Bühler

Yüklü Adezivli Lam

Histobond

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

3.3.1. Dozlamada Kullanılan Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

DEHP (15 mg/ml): 3,75 g DEHP tartılır, 250 ml mısır özü yağı içinde çözülür.

BPA (25 mg/ml): 6,25 g BPA tartılır, 1ml etil alkol içinde çözülür. Mısır özü yağı ile 250 ml'ye tamamlanır.

3.3.2. Histopatolojik Analizlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Bouin Fiksasyon Çözeltisi: 75 ml doymuş pikrik asit çözeltisi, 25 ml formaldehit çözeltisi (%40, h/h) ve 5 ml glasiyal asetik asit karıştırılarak hazırlanır.

Doymuş Pikrik Asit Çözeltisi: Pikrik asidin deiyonize sudaki doymuş çözeltisidir.

%90'lık alkol çözeltisi: 100 ml %96'lık alkole 7 ml distile su eklenerek hazırlanır.

%80'lik alkol çözeltisi: 100 ml %96'lık alkole 20 ml distile su eklenerek hazırlanır.

%70'lik alkol çözeltisi: 100 ml %96'lık alkole 37 ml distile su eklenerek hazırlanır.

Mayer's Hematoksilen Boyası: 1 g hematoksilen kristali, 50 gr alüminyum potasyum sülfat ve 0,2 gr sodyum iyodat 1000 ml distile suda çözülür. Daha sonra 50 gr kloral hidrat ve 1 gr sitrik asit karışıma eklenir. Karışım kaynatılıp soğumaya bırakılır. Soğuyan karışım (gerekirse) süzülür.

Amonyaklı su: 500 ml distile suya 3 damla amonyak eklenir.

Eozin Boyası: 3 g eozin Y, 1000 ml distile suda çözülerek, üzerine 125 ml etanol çözeltisi (%96, h/h) eklenir. 375 ml distile su ve 2 damla glasiyal asetik asit eklenerek hazırlanır.

3.3.3. Folikül Stimüle Edici Hormon Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: Ticari kit içinde bulunan 30 ml'lik konsantre haldeki yıkama çözeltisi distile su ile 750 ml'ye tamamlanır. Çözelti içindeki kristallerin su banyosunda 40 °C'de çözünmesi sağlanır ve oda sıcaklığına geldikten sonra kullanılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içinde bulunan stok çözelti 10000 g'de 1 dakika santrifüjlenir ve 1 ml standart/numune seyreltici çözelti eklenerek hazırlanır. Hazırlanan 200 ng/ml'lik stok çözeltiden hesaplanan miktarlarda alınarak standart/numune seyreltici çözelti ile 1ml'ye tamamlanır ve 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 0 ng/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler taze olarak hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, biyotinlenmiş deteksiyon seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

HRP Konjugat Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, HRP konjugat seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

Substrat Reaktif: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.3.4. Lüteinize Edici Hormon Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: Ticari kit içinde bulunan 30 ml'lik konsantre haldeki yıkama çözeltisi distile su ile 750 ml'ye tamamlanır. Çözelti içindeki kristallerin su banyosunda 40 °C'de çözünmesi sağlanır ve oda sıcaklığına geldikten sonra kullanılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içinde bulunan stok çözelti 10000 g'de 1 dakika santrifüjlenir ve 1 ml standart/numune seyreltici çözelti eklenerek hazırlanır. Hazırlanan 100 mIU/ml'lik stok çözeltilerden hesaplanan miktarlarda alınarak standart/numune seyreltici çözelti ile 1ml'ye tamamlanır ve 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0 mIU/ml'lik konsantrasyonlarda standart çözeltiler taze olarak hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, biyotinlenmiş deteksiyon seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

HRP Konjugat Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, HRP konjugat seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

Substrat Reaktif: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.3.5. Testosteron Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

ELISA Tampon Çözeltisi: Kit içinde 10 kat konsantre halde bulunan çözelti, 90 ml deiyonize su eklenerek 1/10 oranında seyreltilir.

Yıkama Çözeltisi: Kit içinde 400 kat konsantre halde bulunan çözelti, deiyonize su eklenerek 1/400 oranında seyreltilir (2 litre) ve 1 ml polisorbata 20 ilave edilir.

Testosteron ELISA antiserumu: Kit içinde hazır bulunan antiserum üzerine 6 ml ELISA tampon çözeltisi eklenerek hazırlanır.

Testosteron AChE Tracer: Kit içinde hazır bulunan AChE tracer üzerine 6 ml ELISA tampon çözeltisi eklenerek hazırlanır.

Testosteron ELISA Standart: Kit içinde hazır halde bulunan testosteron stok çözeltisinden 100 µl alınır, üzerine 900 µl deiyonize su eklenir; 5 ng/ml'lik ara stok

çözeltisi hazırlanır. Bu ara stok çözeltisinden hesaplanan miktarlarda alınarak 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9 pg/ml konsantrasyonda standart çözeltiler ELISA tampon çözeltisi kullanılarak taze hazırlanır.

Polysorbate 20: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Ellman Reaktifi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.3.6. Estradiol Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

ELISA Tampon Çözeltisi: Kit içinde 10 kat konsantre halde bulunan çözelti, 90 ml deiyonize su eklenerek 1/10 oranında seyreltilir.

Yıkama Çözeltisi: Kit içinde 400 kat konsantre halde bulunan çözelti, deiyonize su kullanılarak 1/400 oranında seyreltilir (2 litre) ve 1 ml polisorbate 20 ilave edilir.

Estradiol ELISA antiserumu: Kit içinde hazır bulunan antiserum üzerine 6 ml ELISA tampon çözeltisi eklenerek hazırlanır.

Estradiol AChE Tracer: Kit içinde hazır bulunan AChE tracer 6 ml ELISA tampon çözeltisi eklenerek hazırlanır.

Estradiol ELISA Standart: Kit içinde hazır halde bulunan estradiol stok çözeltisinden 100 µl alınır, üzerine 900 µl deiyonize su eklenir ve 40 ng/ml'lik ara stok çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltiden hesaplanan miktarlarda alınarak 4000, 1600, 640, 256, 102,4, 41, 16,4, 6,6 pg/ml konsantrasyonda standart çözeltiler ELISA tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanır.

Polysorbate 20: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Ellman Reaktifi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.3.7. Dihidroepiandesteron Sülfat Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: Kit içinde hazır bulunan 30 ml'lik konsantre haldeki yıkama çözeltisi distile su ile 750 ml'ye tamamlanır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içinde bulunan stok çözelti 10000 g'de 1 dakika santrifüjlenir ve 1 ml standart/numune seyreltici çözelti eklenerek hazırlanır. Hazırlanan 2000 pg/ml'lik stok çözeltiden hesaplanan miktarlarda alınarak 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 0 pg/ml'lik konsantrasyonlarda standart çözeltiler taze olarak hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, biyotinlenmiş deteksiyon seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

HRP Konjugat Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, HRP konjugat seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

Substrat Reaktif: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.3.8. Seks Hormon Bağlayıcı Globülin Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: Kit içinde hazır bulunan 30 ml'lik konsantre haldeki yıkama çözeltisi distile su ile 750 ml'ye tamamlanır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içinde bulunan stok çözelti 10000 g'de 1 dakika santrifüjlenir ve 1 ml standart/numune seyreltici çözelti eklenerek hazırlanır. Hazırlanan 1000 pg/ml'lik stok çözeltiden hesaplanan miktarlarda alınarak 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 0 pg/ml'lik konsantrasyonlarda standart çözeltiler taze olarak hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, biyotinlenmiş deteksiyon seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

HRP Konjugat Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, HRP konjugat seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

Substrat Reaktifi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.3.9. Doku Homojenatı Hazırlanırken Kullanılan Çözeltiler

Tris/PMSF/DTPA Tamponu: 10 mM Tris, 1 mM PMSF ve 1 mM DTPA içerir ve deney öncesi taze hazırlanır. Çözelti hazırlanırken 1.2114 g Tris, 0.1741 g PMSF ve 0.393 g DTPA tartılır ve deiyonize suda çözülür.

3.3.10 Protein Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

QuantiPro Buffer QA: 0,2 M NaOH içinde sodyum karbonat, sodyum tartarat ve sodyum bikarbonattan oluşur (pH 11,25). Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

QuantiPro BCA QB: %4'lük bişinkoninik asit (BCA) çözeltisidir (pH 8,5). Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Bakır (II) Sülfat: %4'lük bakır (II) sülfat pentahidrat çözeltisidir ve kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Protein Stok ve Standart Çözeltileri: Stok protein çözeltisinden 100 µl alınır, 1,9 ml distile su ile seyreltilir ve 50 µg/ml ara stok çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltiden hesaplanan miktarlarda alınarak 0, 0,5, 5, 10, 20, 30 µg/ml konsantrasyonlarında protein standart çözeltileri hazırlanır.

3.3.11. Glutasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Metafosforik Asit Çözeltisi (0,1 g/ml): 5g metafosforik asitin 50 ml distile suda çözülmesi ile metafosforik asit çözeltisi hazırlanır.

2-(N-morfolin)etansülfonik Asit Tamponu: Kit içinde konsantre halde bulunan 60 ml MES tamponu, 60 ml distile su ile ½ oranında seyreltilerek hazırlanır.

Okside Glutasyon Stok ve Standart Çözeltileri: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunan 25 µM GSSG stok çözeltisinden hesaplanan miktarlarda alınır ve MES tampon çözeltisi kullanılarak 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 µM konsantrasyonlarında GSSG standartları hazırlanır.

Ko-Faktör Karışımı: Kit, içinde liyofilize toz karışımı halinde bulunan NADP⁺ ve glukoz-6-fosfat, 0,5 ml distile suda çözülür. 0-4°C'de saklandığında 2 hafta dayanıklıdır.

Enzim Karışımı: Kit içinde bulunan tampon çözelti, GR ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz içerir. MES tampon çözeltisinden 2 ml eklenerek seyreltilir. 0-4°C'de saklandığında 2 hafta dayanıklıdır.

5,5'-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit: Kit, liyofilize toz halinde 5,5'-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit (DTNB) içerir. Kullanmadan önce 0,5 ml distile suda çözülerek hazırlanır. Reaktif çözeltisi hazırlandıktan itibaren 10 dakika içerisinde kullanılmalıdır.

3.3.12. Lipit Peroksidasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Tiyobarbitürik Asit: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Asetik Asit: Kit, 2 adet 20 ml konsantre asetik asit içerir. 40 ml asetik asit 160 ml distile su ile seyreltilerek hazırlanır.

Sodyum Hidroksit: Kit, 2 adet 10 ml NaOH çözeltisi içerir. 20 ml NaOH çözeltisi 180 ml distile su ile seyreltilerek 1/10 seyreltilmiş çözelti elde edilir.

Malondialdehit Stok ve Standart Çözeltileri: Kit, kullanıma hazır halde 500 µM MDA stok çözeltisi içerir. 250 µl MDA stok çözeltisi 750 µl distile su ile seyreltilir ve

125 μ M ara stok çözeltisi elde edilir. Bu çözeltiden hesaplanan miktarlarda alınarak 0, 0,625, 1,25, 2,5 5, 10, 25 ve 50 μ M konsantrasyonlarında MDA standart çözeltileri hazırlanır.

Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Renk Reaktifi: Renk reaktifi; 530 mg TBA'nın, seyreltilmiş asetik asit çözeltisi (50 ml) ve seyreltilmiş sodyum hidroksit çözeltisi (50 ml) içinde çözülmesi ile hazırlanır.

3.3.13. Protein Karbonil Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler

Hidroklorik Asit: Kit içinde kullanıma hazır halde 12 M hidroklorik asit (HCl) bulunur. 2,5 M HCl elde etmek için bu içerik 40 ml distile suya eklenir eklenir.

2,4-dinitrofenilhidrazin: Kit içinde hazır halde bulunan 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) 10 ml 2,5 M HCl içerisinde çözülür. 4°C'de saklandığında 1 hafta dayanıklıdır. Karanlıkta saklanmalıdır.

Trikloroasetik Çözeltisi (%20): Kit içinde 1 g/ml trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi bulunur. 12 ml TCA çözeltisi 48 ml distile su ile seyreltilir ve %20'lik TCA çözeltisi hazırlanır.

Trikloroasetik Çözeltisi (%10): %20'lik TCA çözeltisinin 20 ml'sine 20 ml distile su eklenerek %10'luk TCA çözeltisi elde edilir.

Guanidin Hidroklorür: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Etanol: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Etil Asetat: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Etanol:Etıl Asetat: 30 ml etil asetat, 30 ml etanol ile karıştırılarak, 1:1 oranında etanol:etil asetat çözeltisi elde edilir.

3.3.14. DNA izolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Katı Doku Tamponu: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Proteinaz K: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Genomik Bağlayıcı Tampon: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

DNA Ön Yıkama Tamponu: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

g-DNA Yıkama Tamponu: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

DNA Elüsyon Tamponu: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.3.15. DNA Baz Hasarı Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Primer Antikor Seyreltme Tamponu: 6 ml fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) içermektedir. Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Primer Antikor Çözeltisi: Kit içinde bulunan primer antikor, primer antikor seyreltme tamponu ile çözülerek taze kullanılır.

Sekonder Antikor Seyreltme Tamponu: 12 ml PBS içermektedir. Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Sekonder Antikor Çözeltisi: Kit içinde bulunan HRP-konjuge sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme tamponu ile çözülerek kullanılır.

Kromojen: Kit içinde 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin kullanıma hazır halde bulunur.

Kromojen Seyreltme Tamponu: Hidrojen peroksit/sitrat–PBS (12 ml) içermektedir. Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Yıkama Tamponu: Kit içinde konsantre PBS (26 ml) hazır halde bulunur. Distile su ile 1/5 oranında seyreltilerek kullanılır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözeltileri: Kit içinde her biri 1 ml olmak üzere 0,5 ng/ml, 2 ng/ml, 8 ng/ml, 20 ng/ml, 80 ng/ml, 200 ng/ml 8-OHdG standart çözeltileri kullanıma hazır bulunur. Reaktifler kit içinde kullanıma hazır olarak temin edilir. Reaktifler karanlık ortamda ve 2-8°C'de saklanmalıdır.

3.3.16. Apoptotik İncelemelerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Hidrojen peroksit çözeltisi (%3): %30'luk hidrojen peroksit çözeltisinden 200 µl alınarak 900 µl distile su ve 900 µl metanol karışımında seyreltilir.

Triton X-100 çözeltisi (%0,1): 0,01 gr trisodyum sitrat 10 ml distile suda çözülür ve 10 µl Triton X-100 eklenir.

PBS tampon çözeltisi: 40 ml PBS 960 ml distile su eklenerek seyreltilir (pH: 7,6).

PBS-BSA çözeltisi (%2,5): 2.5 ml BSA (Bovine Serum Albumin), 100 ml PBS ile seyreltilir.

Koyun serumu çözeltisi (1/20): 100 µl koyun serumu 1900 µl %2,5'luk PBS-BSA ile seyreltilir.

DAB çözeltisi: 40 µl DAB kromojen 2 ml DAB substrast ile seyreltilir ve filtre edilir.

3.4. Deneysel İşlemler ve Yöntemler

3.4.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Dozlanması

Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'den alınan Sprague-Dawley gebe sıçanlar rastgele yöntemle her grupta 3 gebe olacak şekilde 4 gruba ayrılmış ve deney grupları, doğan erkek yavrulardan aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur.

1. Kontrol Grubu: Gebeliğinin 6-21. günü ve takiben 3 haftalık (21 gün) laktasyon döneminde oral gavajla mısır özü yağı uygulanan gebe sıçanların (n=3) doğan erkek yavrularından rastgele seçilen sıçanlardan (n=6) oluşturulmuştur.

2. DEHP Grubu: Gebeliğinin 6-21. günü ve takiben 3 haftalık laktasyon döneminde oral gavajla 30 mg/kg/gün DEHP uygulanan gebe sıçanların (n=3) doğan erkek yavrularından rastgele seçilen sıçanlardan (n=6) oluşturulmuştur.

3. BPA Grubu: Gebeliğinin 6-21. günü ve takiben 3 haftalık laktasyon döneminde oral gavajla 50 mg/kg/gün BPA uygulanan gebe sıçanların (n=3) doğan erkek yavrularından rastgele seçilen sıçanlardan (n=6) oluşturulmuştur.

4. DEHP ve BPA Grubu: Gebeliğinin 6-21. günü ve takiben 3 haftalık laktasyon döneminde oral gavajla kombine 50 mg/kg/gün BPA ve 30 mg/kg/gün DEHP uygulanan gebe sıçanların (n=3) doğan erkek yavrularından rastgele seçilen sıçanlardan (n=6) oluşturulmuştur.

Dozlama sadece gebelik ve laktasyon döneminde dişi sıçanlara yapılmıştır. Doğan yavrulara herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Tüm gruplarda yer alan erkek yavrular laktasyon dönemi (3 hafta) sonrası 21. günde sütten kesilmiştir. Erkek üreme sisteminin gelişiminin tamamlandığı postnatal 12. haftada ötenazi (derin anestezi altında intrakardiyak kan alınması) yöntemi ile hayatları sonlandırılmıştır.

3.4.2. Vücut ve Organ Ağırlıklarının Belirlenmesi

Doğumun ilk günü henüz cinsiyet ayırımı yapılamadığı için gebe dişilerden doğan tüm yavruların (dişi ve erkek yavrular) doğum ağırlıkları tartılmış ve tüm yavrular için ortalama doğum ağırlıkları bulunmuştur. Laktasyon dönemi sonunda erkek yavrular randomize olarak seçilip ayrılmış ve gruplar oluşturulmuştur, bu sırada yavrular tekrar tartılmıştır. Çalışma gruplarında yer alan erkek sıçanların vücut ağırlıklarındaki değişimler haftalık olarak izlenmiş ve 12. haftada, ötenazi öncesi de kaydedilmiştir. Dekapitasyonu takiben testis ve epididimis ağırlıkları saptanmıştır.

3.4.3. Biyolojik Örneklerin Hazırlanması

Kan Örnekleri: Üreme hormon parametrelerinin ölçümleri için ötenazi işlemi sırasında heparin içeren tüplere kan örneği alınır. Tüpler 3500devir/dakika hızda 10 dakika santrifüjlenir ve üst faz olarak ayrılan plazmalar alikotlarına ayrılarak -80 °C’de analize dek saklanır.

Doku Örnekleri: Sıçanların dekapitasyonunu takiben çıkarılan testis dokularından biri serum fizyolojik ve deiyonize suda yıkamayı takiben hemen sıvı azota atılarak dondurulur. Sıvı azottan çıkarılan testis oksidatif stres parametrelerinin analizleri için parçalara ayrılarak analizlere dek -80 C’de saklanır. Diğer testis dokusu ise histopatolojik analiz ve apoptoz tayini için kullanılır. Ayrıca, epididimis dokusunun kuyruk (cauda) kısmı ayrılarak 1 ml PureSperm Wash içeren bir tübe alınır

ve anatomik makasla parçalanır. Böylece epididimal spermilerin açığa çıkması sağlanır ve sperm parametrelerinin değerlendirilmesinde kullanılır.

3.4.4. Histopatolojik Analizler

Bouin Çözeltisi ile Doku Örneklerinin Fiksasyonu ve Doku Takibi

1. Alınan testis dokuları Bouin fiksasyon çözeltisi içinde 18 saat süreyle fikse edilir.
2. Takiben testis doku örnekleri Leica TP 1020 ışık mikroskobu takip cihazına alınır.
3. Takip cihazında dehidratasyonu sağlamak için sırayla %70, %80, %90, %96'lık ve mutlak alkollerde birer saat bekletilir.
4. Şeffaflandırma için doku örnekleri 1'er saat süreyle 2 kez ksilol'den geçirilir.
5. Parafine alıştırma evresi: Örnekler 2,5 saat saf parafinde bekletilir.
6. Gömme: Doku takip cihazından alınan örnekler Leica Eg1150H parafin istasyonunda saf parafine gömülür.
7. Elde edilen parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınır.

Hematoksilen-Eozin ile Boyama

1. Alınan kesitler bir gece 60⁰C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 3x15 dk. olmak üzere toplamda 45 dk. ksilolde tutularak deparafinize edilir.
2. Ksilolden sonra kurutulan kesitler, %96'lık alkolde 2x10 dk. olmak üzere toplamda 20 dk. ve %80'lik alkolde 10 dk. tutularak rehidrate edilir.
3. Çeşme suyunda yıkama yapıldıktan sonra, Mayer's Hematoksilen ile 15 dk. boyama yapılır.
4. Çeşme suyunda yıkanan kesitler amonyaklı suya batırıp çıkarılarak tekrar çeşme suyu ile yıkanır.
5. Eozin ile 1 dk. boyama yapılır.
6. Kesitler, %80'lik ve 2 kere %96'lık alkollere batırılıp çıkartılarak dehidrate edilir.
7. Ksilol ile en az 45 dk. şeffaflandırma işleminden sonra, kesitler entellan ile kapatılır.

8. Kesitler DC490 dijital kameraya bağlı Leica DM6000B mikroskop ile incelenir ve fotoğraf çekimi yapılır.

3.4.5. Folikül Stimüle Edici Hormon Tayini

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak sıçan FSH'ya özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart veya numune çözeltileri uygun koşullarda spesifik antikorlara kombine edilir. Oluşan FSH-HRP konjugatına spesifik biyotinlenmiş deteksiyon antikorları eklenir. Substrat reaktifi eklenerek FSH-HRP konjugatı ile antikor bileşimine özgü mavi rengin oluşmasının sağlanmasından sonra durdurma çözeltisi ile enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalı, örnekler vortekslenmelidir.

1. Kit içerisinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 100µL standart, kör, veya örnek eklenir. Kör çözelti olarak standart/örnek seyreltme çözeltisi kullanılır. Örnek/standart/kör eklendikten sonra plak yavaşça çalkalanır ve üzeri kapatılarak 37 °C'ye ayarlanmış etüvde 90 dakika inkübe edilir.
2. Kuyucuklardaki sıvı mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara çoklu mikropipetle hızlıca 100µL biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edilir.
3. Kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 350 µL yıkama çözeltisi eklenir 1-2 dakika bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti çekilir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak iyice kurutulur.
4. Her kuyucuğa 100µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üstü kapatılarak 37 °C'de 30 dakika inkübe edilir.
5. 3. Basamakta yapılan yıkama işlemi 5 kez tekrarlanır.
6. Her kuyucuğa 90µL substrat reaktifi eklenir. Plağın üstü kapatılır ve ışık almayacak şekilde 15 dakika 37 °C'de inkübe edilir.

7. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50µL durdurma çözeltisi eklenir.
8. Kuyucukların absorbanı spektrofotometre yardımı ile 450 nm’de belirlenir.

Folikül Stimüle Edici Hormon Düzeylerinin Hesaplanması: FSH düzeyleri, Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart ve örnek grupları program için tanımlanmış ve absorban değerleri programa girilmiştir. Programda bulunan semi-log algoritması kullanılmış; konsantrasyona karşı standart absorbanlarının ortalaması ile standart eğri elde edilmiştir. Örneklerin FSH düzeyleri bu eğriye göre saptanmıştır. Sonuçlar ng/ml cinsinden verilmiştir.

3.4.6. Lüteinize Edici Hormon Tayini

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içerisinde bulunan 96 kuyucuklu plak sıçan LH’ya özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart veya numune çözeltileri uygun koşullarda spesifik antikorlara kombine edilir. Oluşan LH-HRP konjugatına spesifik biyotinlenmiş deteksiyon antikorları eklenir. Substrat reaktifi eklenerek LH-HRP konjugatı ile antikor bileşimine özgü mavi rengin oluşmasının sağlanmasından sonra durdurma çözeltisi ile enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Ortaya çıkan sarı renk 450 nm’de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalı, örnekler vortekslenmelidir.

1. Kit içerisinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 100µL standart, kör, veya örnek eklenir. Kör çözelti olarak standart/örnek seyreltme çözeltisi kullanılır. Örnek/standart/kör eklendikten sonra plak yavaşça çalkalanır ve üzeri kapatılarak 37 °C’ye ayarlanmış etüvde 90 dakika inkübe edilir.
2. Kuyucuklardaki sıvı mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara çoklu mikropipetle hızlıca 100µL biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üstü kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edilir.
3. Kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 350 µL yıkama çözeltisi eklenir 1-2 dakika bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti

çekilir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak iyice kurutulur.

4. Her kuyucuğa 100µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37 °C’de 30 dakika inkübe edilir.
5. 3. Basamakta yapılan yıkama işlemi 5 kez tekrarlanır.
6. Her kuyucuğa 90µL substrat reaktifi eklenir. Plağın üzeri kapatılır ve ışık almayacak şekilde 15 dakika 37 °C’de inkübe edilir.
7. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50µL durdurma çözeltisi eklenir.
8. Kuyucukların absorbansını spektrofotometre yardımı ile 450 nm’de belirlenir.

Lüteinleştirici Hormon Düzeylerinin Hesaplanması: LH düzeyleri, Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart ve örnek grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri programa girilmiştir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standart absorbanslarının ortalaması ile standart eğri elde edilmiştir. Örneklerin LH düzeyleri bu eğriye göre saptanmıştır. Sonuçlar mIU/mL cinsinden verilmiştir.

3.4.7. Testosteron Tayini

Yöntemin Esası: Yöntem testosteron ve testosteronasetilkolinesteraz konjugatının (testosteron AChE tracer) ortamda sınırlı miktarda bulunan testosteron antiserumuna bağlanmak için yarışması esasına dayanır. Ortamdaki testosteron miktarı örnekten örneğe değişirken, testosteron AChE tracer konsantrasyonu sabittir. Dolayısıyla testosteron antiserumuna bağlanacak testosteron AChE tracer konsantrasyonu testosteron konsantrasyonu ile ters orantılı olarak değişir. Oluşan antiserum-testosteron kompleksi kuyucukların yüzeyine önceden kaplanmış olan monoklonal fare antirabbit-IgG’ye bağlanır. Bağlanmamış bileşikler yıkama yolu ile atıldıktan sonra kuyucuklara Ellman Reaktifi (AChE’ye substrat olacak bileşikler içerir) eklenir ve sarı renkli bir çözelti elde edilir. Plağın absorbansı 412 nm’de ölçülür. Ölçülen absorbans değeri testosteron AChE tracer konsantrasyonu ile doğru, serbest testosteron konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalı, örnekler vortekslenmelidir.

Plaktaki kuyucuklar aşağıdaki şekilde isimlendirilir.

Kör: Ellman Reaktifinin absorbansının ölçülmesini ve diğer kuyucuklardan bu değerin düşülerek doğru hesap yapılmasını sağlar.

Total aktivite: AChE-tracer enzimatik aktivitesinin absorbans değerinin ölçülmesini sağlar.

Spesifik olmayan bağlanma: Tracer'ın kuyucuklarda immünolojik olmayan bağlanmasının ölçülmesini sağlar.

B₀ (Maksimum Bağlanma): Bir antikorun serbest analit yokluğunda bağlayabileceği maksimum tracer miktarının ölçülmesini sağlar.

İşlemler:

1. “Spesifik olmayan bağlanma kuyucuğu” na 100 µl, B₀ kuyucuğuna 50 µl ELISA tampon çözeltisi eklenir. Diğer kuyucuklara da 50 µl standart/örnek eklenir.
2. Tüm kuyucuklara (kör ve total aktivite hariç) 50 µl testosteron AChE tracer eklenir.
3. Kuyucuklara (spesifik olmayan bağlanma kuyucuğu, kör ve total aktivite hariç) 50 µl testosteron ELISA antiserumu eklenir
4. Plak oda sıcaklığında 2 saat bekletilir.
5. Kuyucuklardaki sıvılar boşaltılarak 300 µl yıkama çözeltisi eklenir, 1-2 dakika hafifçe çalkalandıktan sonra kuyucuklar boşaltılır. Bu işlem 5 defa tekrarlanır. Son yıkamadan sonra kuyucukların iyice boşaltılmış olmasına dikkat edilmelidir.
6. Tüm kuyucuklara 200 µl Elmann Reaktifi eklenir.
7. Total aktivite kuyucuğuna 5 µl testosteron AChE tracer eklenir.
8. Plak oda sıcaklığında 60-90 dakika bekletilir.
9. Absorbans değerleri, 405-420 nm’de okunur.
10. Örnek veya standart kuyucuğunun absorbans değerinin (B), B₀’a bölünmesi ile %B/ B₀ değeri bulunur.

Testosteron Düzeylerinin Hesaplanması: Testosteron düzeyleri, Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart ve örnek grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri programa girilmiştir. Programda bulunan lineer algoritması kullanılmış; %B/B₀ değerleri ve konsantrasyon ile standart eğri elde edilmiştir. Örneklerin T düzeyleri bu eğriye göre saptanmıştır. Sonuçlar pg/mL cinsinden verilmiştir.

3.4.8. Estradiol Tayini

Yöntemin Esası: Yöntem estradiol ve estradiol asetilkolinesteraz konjugatının (estradiol AChE tracer) ortamda sınırlı miktarda bulunan testosteron antiserumuna bağlanmak için yarışması esasına dayanır. Ortamdaki estradiol miktarı örnekten örneğe değişirken estradiol AChE tracer konsantrasyonu sabittir. Dolayısıyla estradiol antiserumuna bağlanacak estradiol AChE tracer konsantrasyonu estradiol konsantrasyonu ile ters orantılı olarak değişir. Oluşan antiserum-estradiol kompleksi, kuyucukların yüzeyine önceden kaplanmış olan monoklonal fare antirabbit-IgG'ye bağlanır. Bağlanmamış bileşikler yıkama yolu ile atıldıktan sonra kuyucuklara Ellman Reaktifi (AChE'ye substrat olacak bileşikler içerir) eklenir ve sarı renkli bir çözelti elde edilir. Plâkın absorbansı 412 nm'de ölçülür. Ölçülen absorbans değeri estradiol AChE tracer konsantrasyonu ile doğru, serbest estradiol konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalı, örnekler vortekslenmelidir.

Plaktaki kuyucuklar aşağıdaki şekilde isimlendirilir.

Kör: Ellman Reaktifinin absorbansının ölçülmesini ve diğer kuyucuklardan bu değerin düşülerek doğru hesap yapılmasını sağlar.

Total Aktivite: AChE-tracer enzimatik aktivitesinin absorbans değerinin ölçülmesini sağlar.

Spesifik Olmayan Bağlanma: Tracer'ın kuyucuklarda immünolojik olmayan bağlanmasının ölçülmesini sağlar.

B₀ (Maksimum Bağlanma): Bir antikorun serbest analit yokluğunda bağlayabileceği maksimum tracer miktarının ölçülmesini sağlar.

İşlemler:

1. “Spesifik olmayan bağlanma kuyucuğu”na 100 µl, B₀ kuyucuğuna 50 µl ELISA tampon çözeltisi eklenir. Diğer kuyucuklara da 50 µl standart/örnek eklenir.
2. Tüm kuyucuklara (kör ve total aktivite hariç) 50 µl estradiol AChE tracer eklenir.
3. Kuyucuklara (spesifik olmayan bağlanma kuyucuğu, kör ve total aktivite hariç) 50 µl estradiol ELISA antiserumu eklenir
4. Plak oda sıcaklığında 2 saat bekletilir.
5. Kuyucuklardaki sıvılar boşaltılarak, 300 µl yıkama çözeltisi eklenir 1-2 dakika hafifçe çalkalandıktan sonra kuyucuklar boşaltılır. Bu işlem 5 defa tekrarlanır. Son yıkamadan sonra kuyucukların iyice boşaltılmış olmasına dikkat edilmelidir.
6. Tüm kuyucuklara 200 µl Elmann Reaktifi eklenir.
7. Total aktivite kuyucuğuna 5 µl estradiol AChE tracer eklenir.
8. Plak oda sıcaklığında 60-90 dakika bekletilir.
9. Absorbans değerleri, 405-420 nm’de okunur.
10. Örnek veya standart kuyucuğunun absorbans değerinin (B), B₀’a bölünmesi ile %B/ B₀ değeri bulunur.

Estradiol Düzeylerinin Hesaplanması: Estradiol düzeyleri, Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart ve örnek grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri programa girilmiştir. Programda bulunan 4-parameter algoritması kullanılmış; %B/B₀ değerleri ve konsantrasyon ile standart eğri elde edilmiştir. Örneklerin E düzeyleri bu eğriye göre saptanmıştır. Sonuçlar pg/mL cinsinden verilmiştir.

3.4.9. Dihidroepiandesteron Sülfat Tayini

Yöntemin Esası: Yöntem yarışmalı ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak sıçan DHEAS’ye özgü bir antikorla kaplanmıştır.

Reaksiyon sırasında standart veya örneklerdeki DHEAS, DHEAS'ye özgü biyotinlenmiş deteksiyon antikorlara bağlanmak için yarışır. Kuyucuklara HRP ve substrat reaktifi eklenir. Durdurma çözeltisi ile enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalı, örnekler vortekslenmelidir.

1. Kit içinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğana 50µL standart, kör, veya örnek eklenir. Kör çözelti olarak standart/örnek seyreltme çözeltisi kullanılır. Kuyucuklara çoklu mikropipetle hızlıca 50µL biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi eklenir ve yavaşça çalkalanır, üzeri kapatılarak 37 °C'ye ayarlanmış etüvde 45 dakika inkübe edilir.
2. Kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 350 µL yıkama çözeltisi eklenir 1-2 dakika bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti çekilir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak iyice kurutulur.
3. Her kuyucuğa 100µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37 °C'de 30 dakika inkübe edilir.
4. 2. Basamakta yapılan yıkama işlemi 5 kez tekrarlanır.
5. Her kuyucuğa 90µL substrat reaktifi eklenir. Plağın üzeri kapatılır ve ışık almayacak şekilde 15 dakika 37 °C'de inkübe edilir.
6. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50µL durdurma çözeltisi eklenir.
7. Kuyucukların absorbans değerleri spektrofotometre yardımı ile 450 nm'de belirlenir.

Dihidroepiandesteron Sülfat Düzeylerinin Hesaplanması: DHEAS düzeyleri, Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart ve örnek grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri programa girilmiştir. Programda bulunan lineer algoritması kullanılmış; konsantrasyona karşı standart absorbanslarının ortalaması ile standart eğri elde edilmiştir. Örneklerin DHEAS düzeyleri bu eğriye göre saptanmıştır. Sonuçlar pg/mL cinsinden verilmiştir.

3.4.10. Seks Hormon Bağlayıcı Globülin Tayini

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak sıçan SHBG'ye özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart veya numune çözeltileri uygun koşullarda spesifik antikorlara kombine edilir. Oluşan SHBG-HRP konjugatına spesifik biyotinlenmiş deteksiyon antikorları eklenir. Substrat reaktifi SHBG-HRP konjugatı ile antikor bileşimine özgü mavi rengin oluşmasının sağlanmasından sonra durdurma çözeltisi ile enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalı, örnekler vortekslenmelidir.

1. Kit içinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 100µL standart, kör, veya örnek eklenir. Kör çözelti olarak standart/örnek seyreltme çözeltisi kullanılır. Örnek/standart/kör eklendikten sonra plak yavaşça çalkalanır ve üzeri kapatılarak 37 °C'ye ayarlanmış etüvde 90 dakika inkübe edilir.
2. Kuyucuklardaki sıvı mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara çoklu mikropipetle hızlıca 100µL biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edilir.
3. Kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 350 µL yıkama çözeltisi eklenir 1-2 dakika bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti çekilir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak iyice kurutulur.
4. Her kuyucuğa 100µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37 °C'de 30 dakika inkübe edilir.
5. 3. Basamakta yapılan yıkama işlemi 5 kez tekrarlanır.
6. Her kuyucuğa 90µL substrat reaktifi eklenir. Plağın üzeri kapatılır ve ışık almayacak şekilde 15 dakika 37 °C'de inkübe edilir.
7. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50µL durdurma çözeltisi eklenir.
8. Kuyucukların absorbansı spektrofotometre yardımı ile 450 nm'de belirlenir.

Seks Hormon Bağlayıcı Globülin Düzeylerinin Hesaplanması: SHBG düzeyleri, Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart ve örnek grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir. Örneklerin SHBG düzeyleri bu eğriye göre saptanmıştır. Sonuçlar pg/mL cinsinden verilmiştir.

3.4.11. Sperm Parametreleri

Sıçanlar dekapite edildikten hemen sonra sağ epididimis çıkartılmış, PureSperm wash içeren bir petri içine alınmış ve çevresindeki yağlı kısımlar ayrılır.

1. Epididimisin kuyruk (cauda) kısmı ayrılarak 1 ml PureSperm Wash içeren bir tübe alınır ve anatomik makasla parçalanır. Böylece epididimal spermelerin açığa çıkması sağlanır.
2. Spermier 1500 devir/dk'de 10 dakika santrifüj edilir.

Sperm Sayımı ve Motilite Değerlendirmesi: Pellet uygun şekilde PreSperm Wash ile seyreltilir ve sperm süspansiyonunun 10 µl'si hemositometreye yayılıp, örneğin sperm sayımı ve motilite değerlendirilmesi yapılır. Sperm motilitesi, ileri hareketli sperm ve hareketsiz sperm olarak değerlendirilir.

Sperm Morfoloji Değerlendirmesi: Her grupta bulunan her örnekten hazırlanan sperm süspansiyonundan 10µl, lam üzerine konulduktan sonra 45 derecelik açı verilen başka bir lam yardımıyla sperm yayma preparatı hazırlanır. Örnekler kurutulduktan sonra fikse edilip DiffQuick boyası ile boyanır. Hazırlanan her örnek mikroskop altında X40'luk büyütmede morfolojik olarak değerlendirilir. Her hayvan için 100 sperm sayılır, işlem 2 kez tekrarlanarak bulunan sonuçların % olarak ortalaması alınır.

Sperm morfoloji değerlendirmeleri normal morfolojili spermierin ve anormal spermierin sayımı ile yapılır. Anormal morfolojili spermier şu şekilde sınıflanmıştır: Başsız kuyruk taşıyan spermier, kuyruksuz baş taşıyan spermier, olgunlaşmamış kuyruklu spermier, kıvrık kuyruklu spermier, sarmal kuyruklu spermier, düğümlü kuyruklu spermier

3.4.12. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Yöntemin Uygulanışı:

1. Tartılan testis doku örneklerine 1:5 (a/h) olacak şekilde Tris/DTPA/PMSF tamponu eklenir.
2. Homojenizasyonu takiben homojenat 10 dk 4000 devir/dakika hızda ve 4°C'de santrifüj edilir.
3. Süpernatant kısmı alikotlarına ayrılarak analize dek üzere -80°C derin dondurucuda saklanır.

3.4.13. Protein Miktar Tayini

Yöntemin Esası: Deney alkali koşullar altında Cu^{+2} -protein kompleksinin oluşumuna, ardından Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesi esasına dayanmaktadır. İndirgenme miktarı mevcut protein ile orantılı olarak artmaktadır. BCA, alkali ortamlarda Cu^{+1} ile mavi-mor renkli kompleks oluşturmakta ve böylece proteinler ile alkali Cu^{+2} indirgenmesi spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Doku homojenatları distile su ile 1/300 oranında seyreltilir.
2. 5 ml QA tamponu, 5 ml QB tamponu ve 200 µl bakır (II) Sülfat içeren çalışma çözeltisi hazırlanır.
3. Standartlar veya örneklerden 150 µl kuyucuklara eklenir.
4. Daha sonra bu kuyucuklara çok kanallı mikropipet yardımıyla 150 µl çalışma çözeltisi eklenir.
5. Plak, yatay çalkalayıcıda 5 dakika ve takiben etüvde 37°C'de 2 saat inkübe edilir.
6. Örneklerin absorbans değerleri 562 nm'de ölçülür.

Protein Miktarının Hesaplanması: Standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri ile elde edilen standart eğrilerinden hareketle protein miktarları hesaplanır. Sonuçlar µg/ml cinsinden verilmiştir.

3.4.14. Total Glutasyon Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası: Yöntem, DTNB'nin glutasyon redüktaz (GR) ile katalizlenen bir reaksiyonla, sarı renkli 5-tiyo- 2- nitrobenzoik asit (TNB)'ye dönüşmesi ve oluşan TNB'nin absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Üretilen disülfür GSTNB (GSH ve TNB arasında), GSH'yi geri dönüştürmek ve daha fazla TNB üretmek amacıyla GR tarafından indirgenmektedir. Üretilen TNB oranı doğrudan bu geri dönüşüm reaksiyonu ve dolayısıyla örnekteki GSH konsantrasyonu ile orantılıdır. TNB'nin absorbansının ölçülmesi ile örnekteki GSH düzeyi belirlenebilmektedir.

Yöntemin Uygulanışı:

1. 0,5 ml doku homojenat örneğine, 0,5 ml 0,1 g/ml metafosforik asit çözeltisi eklenir ve vortekslenir.
2. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilen bu örnekler 5000 devir/dakika hızda 2 dakika santrifüj edilir.
3. Süpernatant kısımları temiz mikrosantrifüj tüpüne alınır ve üzerine 50 µl 4M tirtanolamin çözeltisi eklenir. Örnekler bu aşamadan sonra hemen kullanılır.
4. Kuyucuklara 50 µl GSSG standart çözeltisi veya örnek çözeltisi eklenir.
5. Bu aşamada taze hazırlanan, MES tamponu (11,25 ml), ko-faktör karışımı (0,45 ml), enzim karışımı (2,1 ml), distile su (2,3 ml) ve DTNB (0,45 ml) deney karışımından kuyucuklara 150 µl eklenir.
6. Plak yatay çalkalayıcıda ışıktan korunarak 25 dakika karıştırılır.
7. Örneklerin ve standartların absorbans değerleri 414 nm'de ölçülür.

Total Glutasyon Düzeylerinin Hesaplanması: GSSG standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri ile elde edilen standart eğriden hareketle örneklerdeki total GSH konsantrasyonları hesaplanır. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.

3.4.15. Lipit Peroksidasyonu Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası: Lipit peroksidasyonu ile doğal olarak meydana gelen malondialdehit ve tiyobarbitürik asidin yüksek sıcaklık ve asidik koşullar altında reaksiyonu ile oluşan MDA-TBA kompleksinin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına

dayanmaktadır.

Yöntemin Uygulanışı:

1. 100 µl standart çözelti veya doku homojenatı 10ml'lik cam tübe eklenir
2. Bu cam tüplere 100 µl SDS çözeltisi eklenir ve tüpler vortekslenir.
3. Her cam tübe 4 ml renk reaktifi eklenir.
4. Su banyosunda (90°C) bir saat boyunca bekletilir
5. Bir saatin sonunda tüpler kaynar sudan hızlıca alınarak buzda 10 dakika inkübe edilir.
6. Tüpler daha sonra 3500 devir/dakika hızda 10 dakika süre ile santrifüj edilir.
7. Santrifüj sonrası tüplerden 150 µl alınarak 96 kuyucuklu plaklara eklenir.
8. Örneklerin ve standartların absorbans değerleri 530'de ölçülür.

MDA Düzeylerinin Hesaplanması: Standart çözeltilere ait absorpsiyon değerlerinden hareketle elde edilen standart eğri kullanılarak örneklerin MDA düzeyleri hesaplanır. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.

3.4.16. Protein Karbonil Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası: Protein oksidasyonunun en genel göstergesi protein karbonilleridir. Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi redoks döngüsü kanyonları, proteinler üzerindeki kanyon bağlama bölgelerine bağlanmakta, H_2O_2 veya O_2 'nin yardımı ile birkaç aminoasidin yan zincir amin grupları karbonillere dönüştürülmektedir. 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ve protein karbonilleri arasındaki reaksiyon sonucu spektrofotometrik olarak analiz edilebilen hidrazon oluşmaktadır.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Her numune için örnek ve kontrol grubu olarak kullanılmak üzere ayrı mikrosantrifüj tüplerine (2ml) 200 µl doku homojenatı alınır.
2. Örnek gruplarına 800 µl DNPH, kontrol gruplarına ise 800 µl HCl (2,5 M) eklenir.
3. Mikrosantrifüj tüpleri oda sıcaklığında ve karanlık ortamda (her 15 dakikada bir vorteksle karıştırılmak üzere) 1 saat süre ile inkübe edilir.
4. İnkübasyon süresinin sonunda tüplere 1 ml %20'lik TCA eklenir, tüpler

vortekslenir ve buzda 5 dakika inkübe edilir.

5. Buzdan alınan tüpler 15000 devir/dakika hızda 10 dakika süre ile 4°C’de santrifüj edilir.
6. Santrifüj sonrası tüplerden süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti 1 ml %10 TCA ile süspande edilir.
7. Takiben tüpler buzda 5 dakika inkübe edilir.
8. Buzdan alınan tüpler tekrar 15000 devir/ dakika hızda 10 dakika süre ile 4°C’de santrifüj edilir.
9. Tüplerden süpernatant uzaklaştırılır ve hücre pelleti 1 ml (1:1) etanol/etil asetat karışımı ile süspande edilir.
10. Tüpler 15000 devir/ dakika hızda 10 dakika süre ile 4°C’de santrifüj edilir. İki kere tekrarlanan bu işlem sonrası tüplerden süpernatant uzaklaştırılır.
11. Protein pelletleri 500 µl guanidin hidroklorür ile süspande edilir.
12. Tüpler 15000 devir/ dakika hızda 10 dakika süre ile 4°C’de santrifüj edilir.
13. Örnek ve kontrol tüplerinden 220 µl 96 kuyucuklu plaklara eklenir.
14. Örneklerin absorbans değerleri 370 nm’de ölçülür.

Karbonil Düzeylerinin Hesaplanması: Kontrol gruplarının absorbans değerleri, örnek gruplarının absorbans değerlerinden çıkarılır (CA); aşağıdaki formül kullanılarak karbonil konsantrasyonları nmol/ml cinsinden hesaplanır.

$$\text{Protein Karbonil (nmol/ml)} = [(CA) / (*\Sigma)] \times (V_1 / V_2)$$

$$V_1 = 500 \mu\text{l (guanidin hidroklorür)} \quad V_2 = 200 \mu\text{l (doku homojenatı)}$$

$$*\Sigma = 0,011 \mu\text{M}^{-1}$$

*DNPH 370 nm’deki ekstinksiyon katsayısı $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($0,022 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dir. Bu değer kuyucuktaki çözeltiye da bağlı olan yol uzunluğu da hesaba katılarak yeniden hesaplanmıştır. Karbonil düzeyleri nmol/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.

$$\text{Protein Karbonil (nmol/mg protein)} = \text{Protein Karbonil (nmol/ml)} / \text{Protein miktarı (mg/ml)}$$

3.4.17. DNA İzolasyonu

Yöntemin Esası: DNA izolasyonu, çeşitli biyolojik örnek kaynaklarından DNA'nın (genomik, mitokondriyal, viral) izolasyonunu sağlayan "Quick-DNA" kiti ile gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Testis dokuları 25 mg'dan küçük miktarlarda tartılır ve mikrosantrifüj tüplerine alınır.
2. Bu mikrosantrifüj tüplerine 95 µl su, 95 µl katı doku tamponu ve 10 µl proteinaz K eklenir ve vortekslenir.
3. Su banyosunda 55 °C'de 1-3 saat (çözülene kadar) inkübe edilir.
4. Su banyosundan alınan mikrosantrifüj tüpleri 15000 devir/dakika hızda 1 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısımları temiz mikrosantrifüj tüplerine alınır.
5. Bu tüplere süpernatant kısımların (200 µl) iki katı hacimde genomik bağlayıcı tampon (400 µl) eklenir ve vortekslenir.
6. Bu karışım deney kiti kolonlarına yüklenir ve kolon ile birlikte 15000 devir/dakika hızda 1 dakika santrifüjlenir.
7. Örnek kolonlarına 500 µl g-DNA yıkama tamponu eklenir ve 15000 devir/dakika hızda 1 dakika santrifüjlenir.
8. Kolona 400 µl DNA ön yıkama tamponu eklenir ve örnekler kolon ile birlikte 15000 devir/dakika hızda 1 dakika santrifüj edilir.
9. Kolona 700 µl g-DNA yıkama tamponu eklenir ve kolon ile birlikte 15000 devir/dakika hızda 1 dakika santrifüj edilir.
10. Kolona tekrar 200 µl g-DNA yıkama tamponu eklenir ve kolon ile birlikte 15000 devir/dakika hızda 1 dakika santrifüj edilir.
11. Santrifüj sonrası örnek kolonları temiz tüplere alınır ve örnek kolonlarına 125 µl DNA elüsyon tampon çözeltisi eklenir. Örnekler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir ve ardından 15000 devir/dakika hızda 1 dakika santrifüj edilir.
12. Santrifüj sonrası tüpteki süpernatantlar (125 µl) ependorflara alınır ve -20°C'de saklanır.

3.4.18. DNA Baz Hasarı Ölçümü

Yöntemin Esası: DNA'nın oksidatif hasarından kaynaklı doku, serum, plazma ve idrarda 8-hidroksi- 2'deoksiguanozin (8-OHdG) oluşumunun ELISA ile ölçümü esasına dayanmaktadır. 8-OHdG, DNA onarımı sırasında üretilmektedir ve ölçümü yaşlanma, kanser ve diğer dejeneratif hastalıklara bağlı oksidatif hasarın göstergesi olarak yararlı olabilir. 8-OHdG – EIATM Kiti 8-OHdG monoklonal antikoru ve örnek veya standartların 8-OHdG'lere bağlanma özelliğinden yararlanarak 8-OHdG tayini yapmaktadır. Standart veya örnekteki 8-OHdG'lere bağlanmış antikörlerin yıkanması ile sadece sabit 8- OHdG'ler ortamda kalmaktadır. Sabit 8-OHdG'leri belirlemek için ikinci bir antikör daha eklenmekte, bu antikör ortamda kalan monoklonal antikörlere bağlanmaktadır. Tekrar yıkama işleminden sonra kromojen eklenmesi ortamdaki antikör miktarı oranına göre renk değişimine neden olmaktadır. Renk reaksiyonu sonlandırıldıktan sonra 450 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılmaktadır.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Primer antikör, primer antikör seyreltme çözeltisi ile seyreltilir.
2. 50 µl standart çözelti veya dokulardan izole edilen DNA çözeltisi kuyucuklara eklenir.
3. Kör dışında bütün kuyucuklara seyreltilmiş 50 µl primer antikör çözeltisi eklenir, plak 1 saat boyunca etüvde 37°'de bekletilir.
4. Kuyucukların içindeki çözeltiler dökülür, kuyucuklara 250 µl yıkama tamponu eklenir, hafifçe çalkalanır ve dökülür. Bu yıkama işlemi 2 defa tekrarlanır. Son yıkama sonrası kuyucuklar tamamen kuru olmalıdır.
5. Sekonder antikör, sekonder antikör seyreltme çözeltisi ile seyreltilir. 100 µl seyreltilmiş sekonder antikör çözeltisi tüm kuyucuklara eklenir, plak 1 saat boyunca etüvde 37°'de bekletilir.
6. Konsantre kromojen çözeltisi kromojen seyreltme tamponu ile seyreltilir.
7. 4. basamaktaki yıkama işlemi tekrarlanır.
8. Kuyucuklara 100 µl seyreltilmiş kromojen çözeltisi eklenir ve plak 15 dakika boyunca oda sıcaklığında, ışıktan korunarak inkübe edilir.
9. 100 µl durdurma çözeltisi eklenir, 3 dakika beklenir daha sonra örneklerin

absorbans değerleri 450 nm’de ölçülür.

DNA Hasarı Hesaplanması: DNA hasarı, Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standart absorbans değerleri kullanılarak standart eğri elde edilir. Örneklerin DNA hasarı bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar ng/ml cinsinden ifade edilmiştir.

3.4.19. Apoptotik Analizler

TUNEL Boyama: Kontrol ve deney grubundan elde edilen testis dokularındaki apoptotik hücreler, In Situ Cell Death Detection Kit, POD kiti kullanılarak TUNEL (terminal deoksinnükleotidil transferaz dUTP çentik uç işaretleme) yöntemi ile belirlenir. Bu yöntem üç basamaktan oluşur:

1. **Dokuların deparafinizasyonu,** TUNEL ile işaretleme ve sinyal dönüşümü: Alınan kesitler öncelikle 60°C’de 1 gece inkübe edilir. İnkübasyon süresinin ardından kesitler ksilen ve azalan alkol serilerinden geçirilir. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz inaktivasyonu için %3’lük H₂O₂’de 10 dk bekletilir. PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra taze olarak hazırlanan %0,1 Triton X-100 ile kesitler 8 dk buz üzerinde muamele edilerek permeabilizasyon sağlanır. Kesitler PBS ile 3 kez yıkanır.
2. **İşaretleme basamağı:** Non-spesifik boyanmayı engellemek için kesitler 1/20 oranında koyun serumu ile 30 dk inkübe edilir ve işaretleme için reaksiyon karışımı hazırlanır. Reaksiyon karışımı için 450µl işaretleme çözeltisi, 50µl enzim çözeltisi konularak karıştırılır. Blokaj sonrası yıkama yapılmadan hazırlanan karışımdan her örneğe 50µl ve negatif kontrol için enzim solüsyonu konmamış olan işaretleme çözeltisinden 50µl kesitlere homojen bir şekilde dağıtılır. Preparatlar 37 °C’de karanlık ve nemli ortamda 1 saat inkübe edilir. İnkübasyon bittiğinde preparatlar 3 kez PBS ile yıkanır.
3. **Sinyal dönüşümü:** Bu basamakta her kesite 50µl converter-POD homojen bir şekilde dağıtıldıktan sonra kesitler 30 dk oda ısısında inkube edilir. Yıkama işleminden sonra kesitler ile DAB (3,3'-Diaminobenzidine) ile 5 dk muamele

edilir. Distile su ile yıkanan kesitler çekirdek boyaması için 45 sn Hematoksilen ile boyanır. Yıkama ile boya uzaklaştırıldıktan sonra, kesitler ksilende 15 dk bekletilir ve entellan ile kapatılarak Leica DM 6000 mikroskobu ışık mikroskopunda değerlendirilir.

Her gruptaki kesitlerden X40'lık büyütme ile 20 tane seminifer tübülde TUNEL ile pozitif boyanan apoptotik hücre sayısı belirlenerek, gruplar arasında karşılaştırma yapılır.



4. BULGULAR

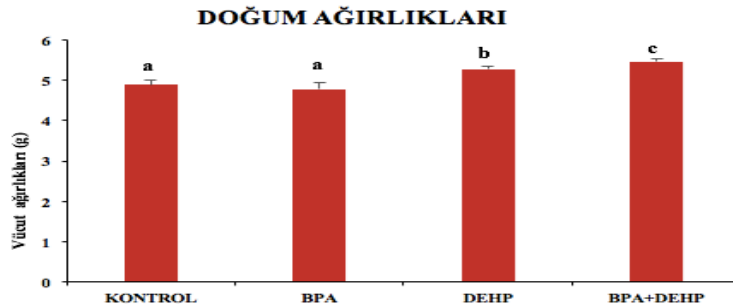
4.1. Deney Gruplarında Vücut Ağırlığının İzlenmesi

Doğumun ilk günü henüz cinsiyet ayırımı yapılamadığı için gebe dişilerden doğan tüm yavruların (dişi ve erkek yavrular) doğum ağırlıkları tartılmış ve tüm yavrular için ortalama doğum ağırlıkları bulunmuştur (Tablo 4.1.). Bu ortalama ağırlıklar doğan tüm yavrulara aittir. BPA grubunda yer alan yavruların doğum ağırlıklarının kontrol grubuna göre farklı olmadığı; DEHP grubundaki yavruların doğum ağırlıklarının ise gerek kontrol (%8), gerekse BPA (%10) gruplarına kıyasla anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 4.1. ve Şekil 4.1.). Ayrıca, BPA+DEHP grubundaki yavruların doğum ağırlıklarının da kontrol (%12), BPA (%14) ve DEHP (%4) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1. ve Şekil 4.1.).

Tablo 4.1. Ortalama doğum ağırlıkları.

Çalışma Grupları	Ortalama Doğum Ağırlıkları (g)
Kontrol (n=19)	4,90± 0,11 ^a
BPA (n=29)	4,79± 0,16 ^a
DEHP (n=12)	5,29± 0,06 ^b
BPA+DEHP (n=18)	5,48± 0,05 ^c

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p < 0,05).



Şekil 4.1. Ortalama doğum ağırlıkları.

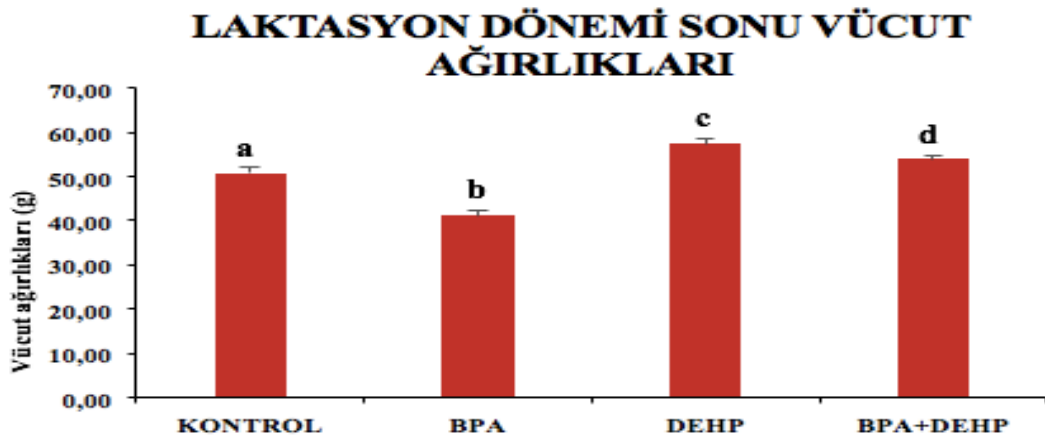
Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p < 0,05).

Laktasyon dönemi doğumdan sonraki 21. günde sonlanır. Ancak yavruların 21. günde diğer yavrulardan ayrılmasının stres sebebi olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle, laktasyon döneminin bitimi yerine doğumdan sonraki 30. günde erkek yavrular randomize olarak seçilip ayrılmış ve gruplar oluşturulmuştur. Laktasyon dönemi sonu vücut ağırlıkları, doğumdan sonraki 30. günde yapılan tartıma aittir. Bu döneme ait ortalama vücut ağırlıklarında gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu görülmüştür (Tablo 4.2). DEHP (%12,69) ve BPA+DEHP (%6,30) gruplarında belirlenen ortalama vücut ağırlıklarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde arttığı, BPA (%19,06) grubundaki erkek yavrulara ait ortalama vücut ağırlıklarının ise kontrole kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı belirlenmiştir.

Tablo 4.2. Çalışma gruplarının laktasyon dönemi sonu ortalama vücut ağırlıkları.

Çalışma Grupları	Ortalama Vücut Ağırlıkları (g)
Kontrol (n=6)	50,87± 1,17 ^a
BPA (n=6)	41,17± 1,05 ^b
DEHP (n=6)	57,33± 1,12 ^c
BPA+DEHP (n=6)	54,08± 0,61 ^d

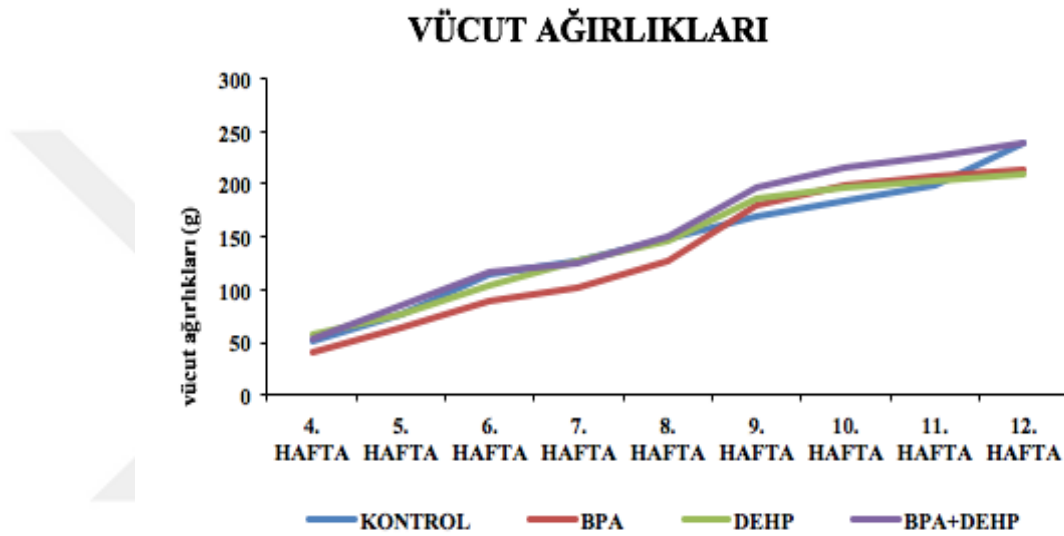
Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c, d}Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p < 0,05).



Şekil 4.2. Çalışma gruplarının laktasyon dönemi sonu erkek yavruların ortalama vücut ağırlıkları.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c, d}Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p < 0,05).

Çalışma gruplarında yer alan sıçanların vücut ağırlıklarındaki değişimler haftalık olarak izlenmiş ve bu değişim tüm gruplar için Şekil 4.3’de sunulmuştur. Ayrıca vücut ağırlıkları 12. haftada, ötenazi öncesi de kaydedilmiş ve gruplara ait ortalama vücut ağırlıkları Tablo 4.3. ve Şekil 4.4.’te verilmiştir. Sadece DEHP grubunda belirlenen ortalama vücut ağırlığının kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde düşük (%15) olduğu saptanmış (Şekil 4.4.); diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.



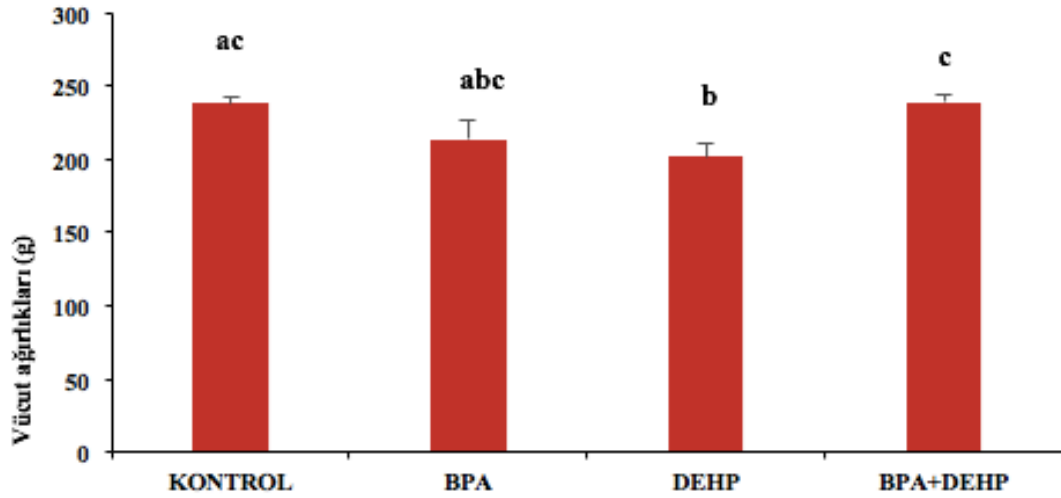
Şekil 4.3. Laktasyon dönemi sonrası erkek yavruların ortalama vücut ağırlıklarının değişimi.

Tablo 4.3. Ötenazi öncesi (12. Hafta) ortalama vücut ağırlıkları.

Çalışma Grupları	Ortalama Vücut Ağırlıkları (g)
Kontrol (n=6)	238,18± 4,52 ^{ac}
BPA (n=6)	213,75± 12,40 ^{abc}
DEHP (n=6)	201,67± 9,76 ^b
BPA+DEHP (n=6)	238,68± 4,67 ^c

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p < 0,05).

ÖTENAZİ ÖNCESİ VÜCUT AĞIRLIKLARI



Şekil 4.4. Ötenazi öncesi (12. Hafta) ortalama vücut ağırlıkları.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

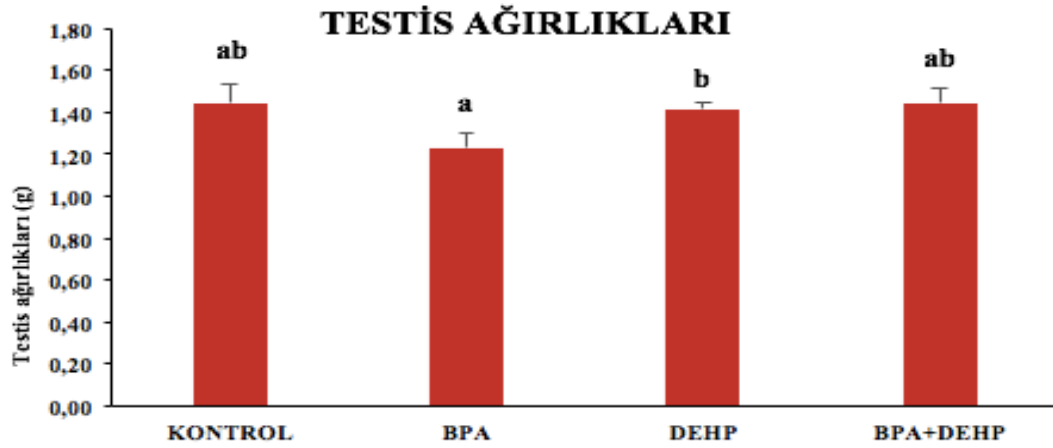
4.2. Testis ve Epididimis Ağırlıkları

Çalışma gruplarında yer alan sıçanların dekapitasyonu takiben testis ve epididimis ağırlıkları saptanmış, Tablo 4.4., 4.5. ve Şekil 4.5., 4.6.'da verilmiştir. Ortalama testis ve epididimis ağırlıkları yönünden gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark saptanamamıştır.

Tablo 4.4. Ortalama testis ağırlıkları.

Çalışma Grupları	Ortalama Testis Ağırlıkları (g)
Kontrol (n=6)	1,45 $\pm$ 0,09 ^{ab}
BPA (n=6)	1,23 $\pm$ 0,06 ^a
DEHP (n=6)	1,41 $\pm$ 0,04 ^b
BPA+DEHP (n=6)	1,45 $\pm$ 0,07 ^{ab}

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



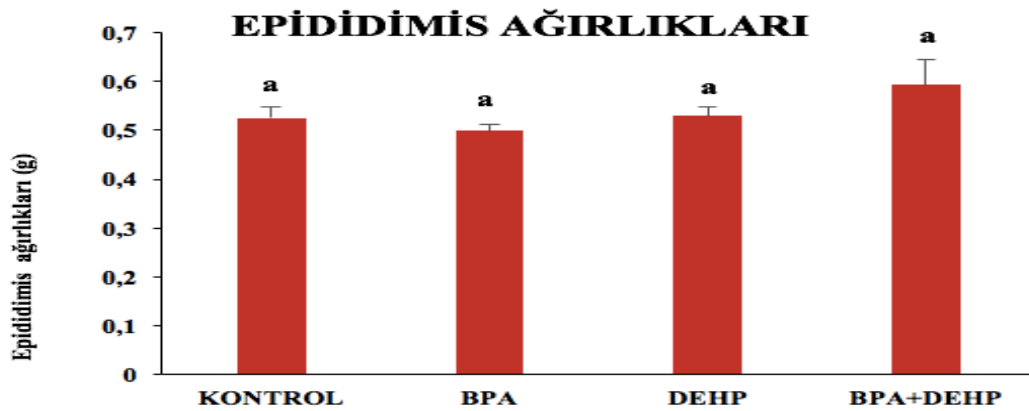
Şekil 4.5. Ortalama testis ağırlıkları.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

Tablo 4.5. Ortalama epididimis ağırlıkları.

Çalışma Grupları	Ortalama Epididimis Ağırlıkları (g)
Kontrol (n=6)	0,53 $\pm$ 0,02 ^a
BPA (n=6)	0,50 $\pm$ 0,01 ^a
DEHP (n=6)	0,53 $\pm$ 0,02 ^a
BPA+DEHP (n=6)	0,59 $\pm$ 0,50 ^a

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.6. Ortalama epididimis ağırlıkları.

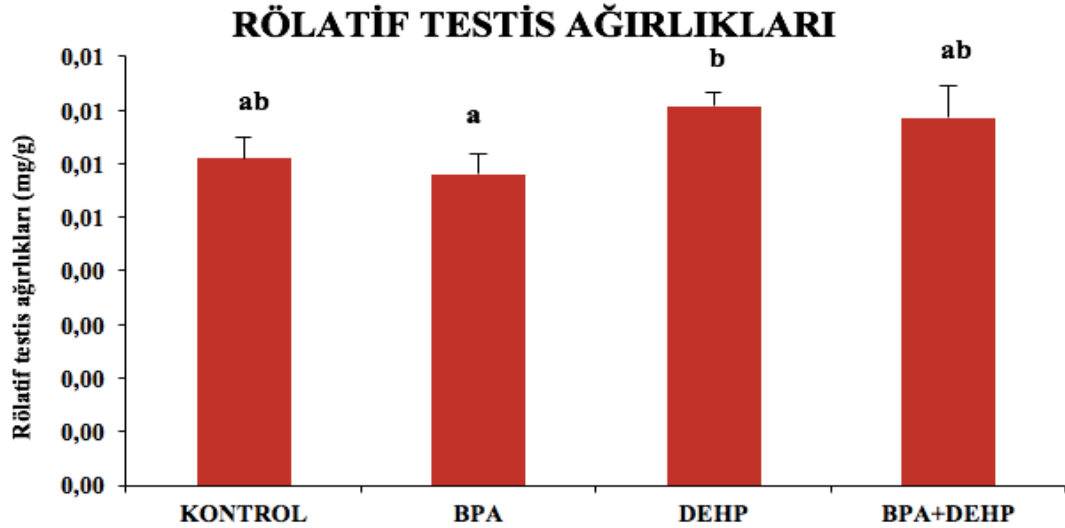
Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

Çalışma gruplarında yer alan sıçanlara ait testis ve epididimis ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranlanması ile elde edilen rölatif testis ve epididimis ağırlıkları Tablo 4.6., 6.7. ve Şekil 4.7., 4.8.'de yer almaktadır. BPA grubuna ait rölatif testis ağırlıkları, kontrol grubuna göre değişmezken, DEHP ve BPA+DEHP gruplarındaki rölatif testis ağırlığının kontrol grubuna oranla arttığı (sırasıyla %18, $p<0,05$; %15, $p>0,05$) belirlenmiştir. Benzer şekilde rölatif epididimis ağırlıkları BPA grubunda değişmezken, DEHP ve BPA+DEHP gruplarında kontrol grubuna oranla önemli düzeyde arttığı saptanmıştır (sırasıyla %18, %32, $p<0,05$).

Tablo 4.6. Rölatif testis ağırlıkları.

Çalışma Grupları	Rölatif Testis Ağırlıkları (mg/g)
Kontrol (n=6)	0,0060± 0,0004 ^{ab}
BPA (n=6)	0,0058± 0,0004 ^a
DEHP (n=6)	0,0071± 0,0003 ^b
BPA+DEHP (n=6)	0,0069± 0,0006 ^{ab}

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



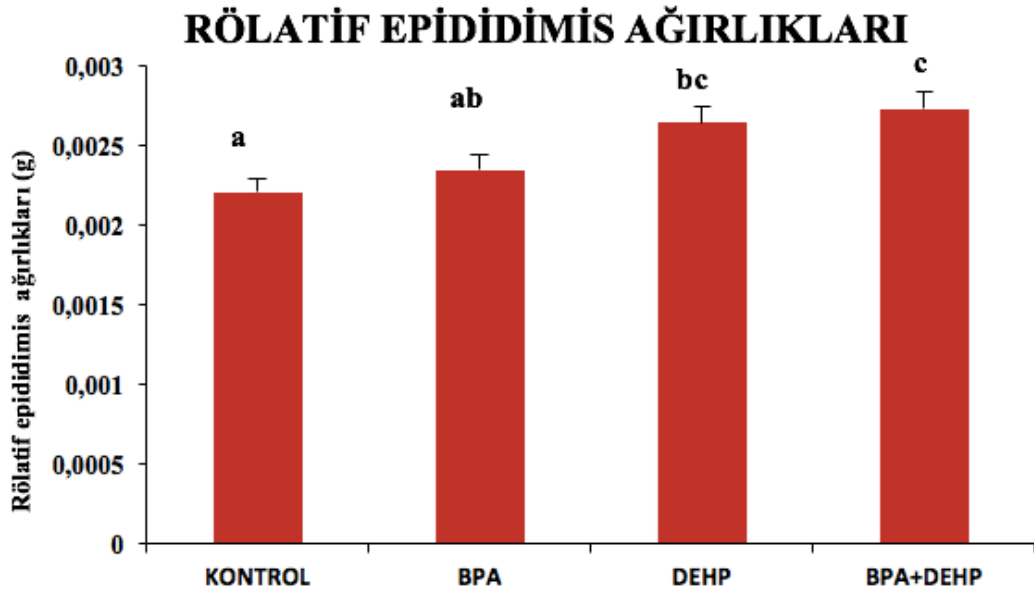
Şekil 4.7. Rölatif testis ağırlıkları.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

Tablo 4.7. Rölatif epididimis ağırlıkları.

Çalışma Grupları	Rölatif Epididimis Ağırlıkları (mg/g)
Kontrol (n=6)	0,0022± 0,0001 ^a
BPA (n=6)	0,0023± 0,0001 ^{ab}
DEHP (n=6)	0,0026± 0,0001 ^{bc}
BPA+DEHP (n=6)	0,0027± 0,0001 ^c

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p < 0,05).

**Şekil 4.8.** Rölatif epididimis ağırlıkları.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p < 0,05).

4.3. Histopatolojik Analizler

4.3.1. Kontrol Grubu

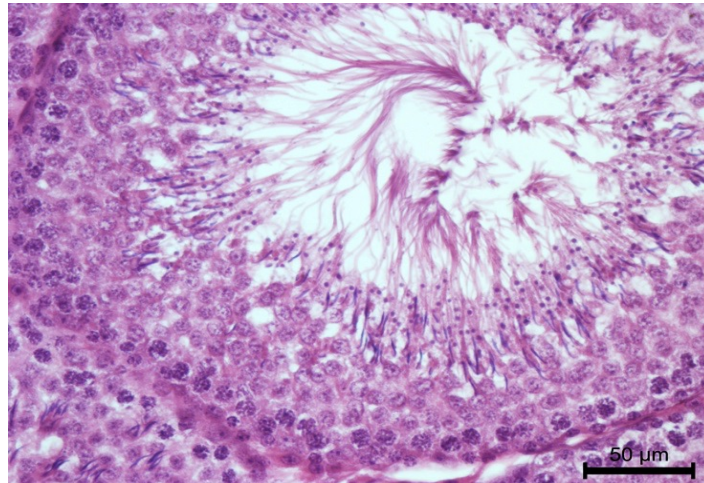
Kontrol grubunda dıştan “tunica albuginea” adı verilen bağ dokusu ile çevrili testis kesitlerinin içinde seminifer tübül kesitleri ve aralarında interstisyel doku normal morfolojik görünümde izlenmiştir. Seminifer tübüller dıştan yassı çekirdekli myoid hücreler içeren “tunica propria” adı verilen ince bağ dokusu ile sarılı olduğu görülmüştür. Seminifer tübüllerin duvarını oluşturan spermatogenetik seriye ait

hücreler ve Sertoli hücrelerinde herhangi bir dejenerasyon gözlenmemiştir. Spermatogenez ve spermiyogenez oluşumunda herhangi bir bozukluk izlenmemiştir. İnterstiyeel doku içinde oval veya poligonal şekilli asidofilik sitoplazmalı Leydig hücreleri kapillerler çevresinde gözlenmiştir (Şekil 4.9., Şekil 4.10.).



Şekil 4.9. Kontrol grubuna ait seminifer tübül ışık mikrofrafı.

Seminifer tübül duvarında spermatogenetik seriye ait hücreler, sertoli hücreleri ve tübüller arasında Leydig hücreleri (ok) normal histolojik görünümle izlenmektedir (Hematoksilen-Eozin X200).

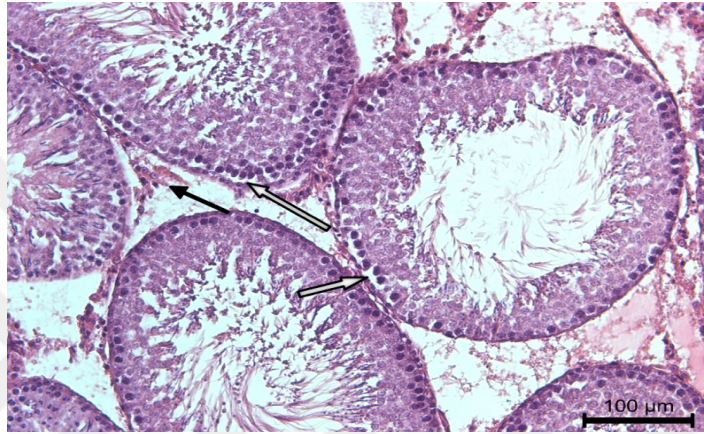


Şekil 4.10. Kontrol grubuna ait seminifer tübül ışık mikrofrafı.

Daha büyük büyütmede seminifer tübül duvarında spermatogenezin ileri sürecinde gözlenen uzamış (elongated) spermatidler ve spermiyumlar izlenmektedir (Hematoksilen-Eozin X400).

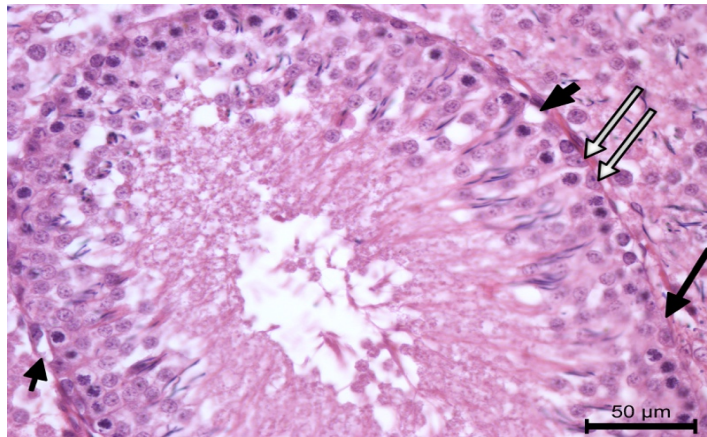
4.3.2. Bisfenol A Grubu

Bisfenol A uygulanan gruba ait örneklerin kesitlerinde seminifer tübüller ve aralarındaki interstisyel dokuda Leydig hücreleri incelenmiştir. Bu grupta bazı seminifer tübüllerde epitelin bütünlüğünün bozulduğu izlenmiştir. Primer spermatositler in bazı bölgelerde bazalden ayrıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.11.). Normal yapıda seminifer tübüllerin bazalinde Sertoli hücrelerine hemen komşu olarak bulunan spermatogonyumlar tübüllerin bazı alanlarında gözlenmemiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.11. BPA grubuna ait seminifer tübül ışık mikroskopi.

BPA grubuna ait ışık mikroskopi seminifer tübüller arasında Leydig hücreleri (siyah ok) normal histolojik görünümünde izlenmektedir. Seminifer tübül duvarında yer yer spermatogenik seriye ait hücrelerde bazalden ayrılma (beyaz ok) izlenmektedir (Hematoksilen-Eozin X200).

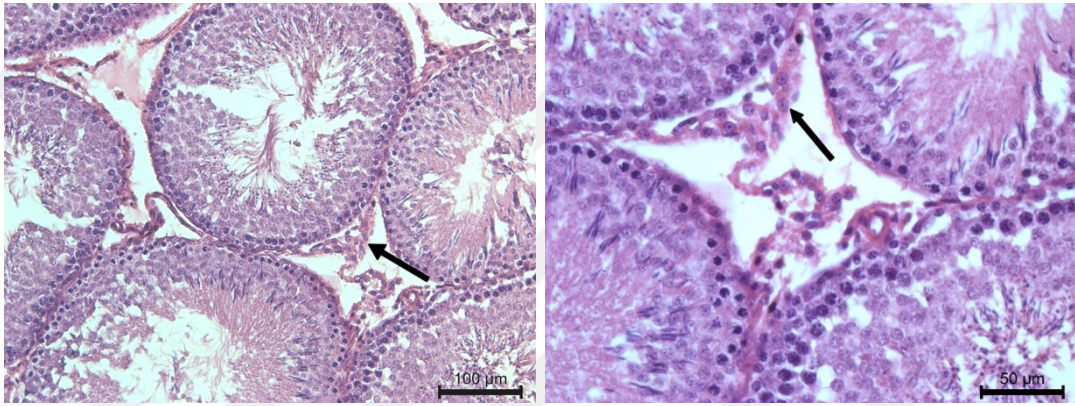


Şekil 4.12. BPA grubuna ait seminifer tübül ışık mikroskopi.

Seminifer tübül duvarında bazalde Sertoli hücreleri (beyaz ok), bu hücrelerin yanında yer yer spermatogonyum kaybı (siyah ok) daha büyük büyütmede izlenmektedir. Sertoli hücreleri yanında boş alanlar (ok başı) yer yer gözlenmektedir (Hematoksilen-Eozin X400).

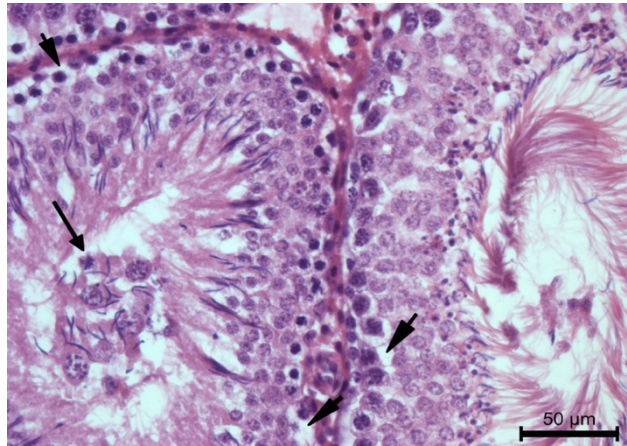
4.3.3. Di-2-Etil Hekzil Ftalat Grubu

Di-2-etil hekzil ftalat uygulanan gruba ait örneklerde seminifer tübüllerin bazalinde Sertoli hücreleri ile spermatogonyumlar arasında hücreler arası bağlantıların bozulduğunu gösteren belirgin ayrılmalar izlenmiştir. Seminifer tübül duvarında farklılaşmakta olan spermatogenetik seriye ait hücreler arasında da ayrılmalar gözlenmiştir. Bazı seminifer tübüllerin lümeninde spermiyuma farklılaşmanın erken evresine ait yuvarlak şekilli spermatogenetik hücrelerin lümene dökülerek hücre debrisı oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.13., Şekil 4.14.).



Şekil 4.13. DEHP grubuna ait seminifer tübül ışık mikrografı.

DEHP uygulanan grupta interstisyel alanda Leydig hücreleri (ok), yassı çekirdekli fibroblastlar ve kollagen fibriller izlenmektedir. Seminifer tübül duvarında hücreler arasında ayrılmalar izlenmektedir (Hematoksilen-Eozin A X200, B X400).

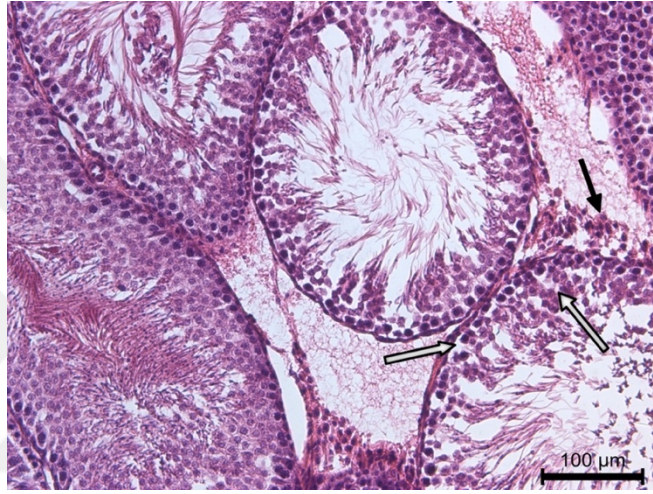


Şekil 4.14. DEHP grubuna ait seminifer tübül ışık mikrografı.

Primer spermatosit aralarında ve primer spermatositler ile ileri evre farklılaşan spermatogenetik seri hücreleri arasında ayrılmalar (ok başı), seminifer tübül lümeninde hücre debrisı (ok) aynı grubun büyük büyütmesinde izlenmektedir (Hematoksilen-Eozin X200).

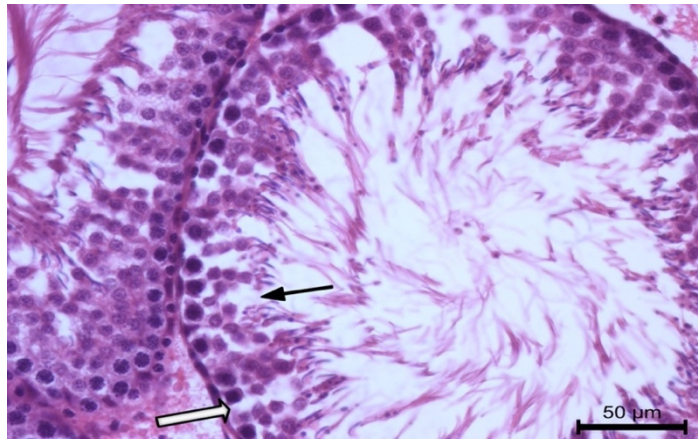
4.3.4. Bisfenol A ve Di-2-Etil Hekzil Ftalat Grubu

Bisfenol A ve Di-2-etil hekzil ftalat beraber uygulanan gruba ait örneklerin kesitlerinde seminifer tübüller arasında interstisyel dokuda Leydig hücrelerinin normal histolojik yapısını koruyarak varlığını devam ettirdiği izlenmiştir. Bu grupta etkilenen seminifer tübüllerde spermatogenetik seriye ait hücreler arasında geniş boşluklar izlenmiştir (Şekil 4.15.). Seminifer tübül epitelinde farklanmanın ileri evresine ait hücrelerin kaybı ile epitel kalınlığının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.16.). Spermatogenez ve spermiyogenezin bozulduğu saptanmıştır.



Şekil 4.15. BPA+DEHP grubuna ait seminifer tübül ışık mikrografı.

BPA +DEHP uygulanan gruba ait örneklerin kesitlerinde spermatogenetik seriye ait hücreler arasında geniş boşluklar (beyaz ok) izlenmektedir. İnterstisyel alanda Leydig hücreleri (siyah ok) varlığını korumaktadır (Hematoksilen-Eozin X200).



Şekil 4.16. BPA+DEHP grubuna ait seminifer tübül ışık mikrografı.

Primer spermatositler ile bazal ve komşu hücreler arasında boşluklar (beyaz ok) daha büyük büyütmede izlenmektedir. Seminifer tübül epitelinde farklanmanın ileri evresine ait hücrelerin kaybı (siyah ok) gözlenmektedir (Hematoksilen-Eozin X400).

4.4. Hormon Düzeyleri

4.4.1. Folikül Stimüle Edici Hormon Düzeyleri

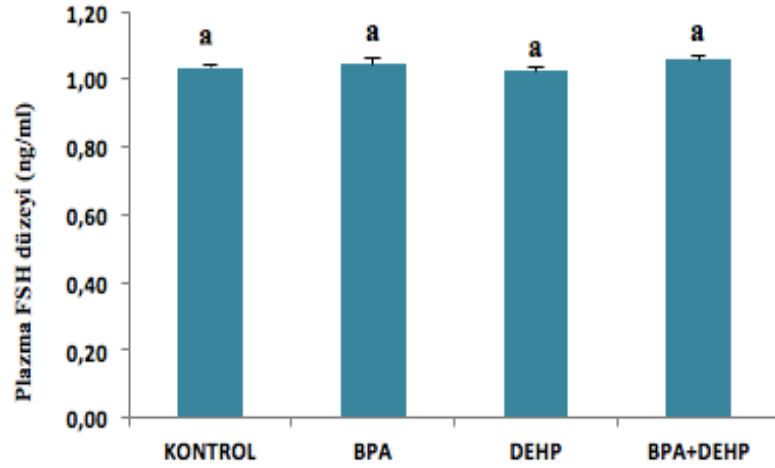
Plazma FSH düzeylerine ait sonuçlar Tablo 4.8. ve Şekil 4.17.'de sunulmuştur. Bu verilere göre gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir ($p>0,05$).

Tablo 4.8. Plazma folikül stimüle edici hormon düzeyleri.

Çalışma Grupları	Plazma FSH Düzeyleri (ng/mL)
Kontrol (n=6)	1,04± 0,01 ^a
BPA (n=6)	1,04± 0,02 ^a
DEHP (n=6)	1,02± 0,01 ^a
BPA+DEHP (n=6)	1,06± 0,01 ^a

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

FOLİKÜL STİMÜLE EDİCİ HORMON DÜZEYLERİ



Şekil 4.17. Plazma folikül stimüle edici hormon düzeyleri.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

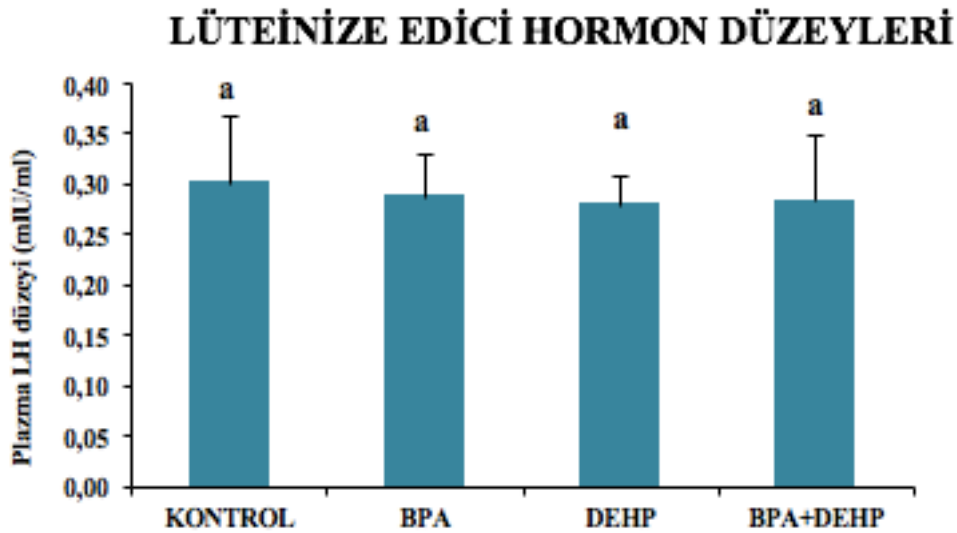
4.4.2. Lüteinize Edici Hormon Düzeyleri

Plazma LH düzeylerine ait sonuçlar Tablo 4.9. ve Şekil 4.18.'de yer almaktadır. Bu verilere göre gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir ($p < 0,05$).

Tablo 4.9. Plazma lüteinize edici hormon düzeyleri.

Çalışma Grupları	Plazma LH Düzeyleri (mIU/mL)
Kontrol (n=6)	0,30± 0,07 ^a
BPA (n=6)	0,29± 0,04 ^a
DEHP (n=6)	0,28± 0,03 ^a
BPA+DEHP (n=6)	0,28± 0,06 ^a

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.18. Plazma lüteinleştirici hormon düzeyleri.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

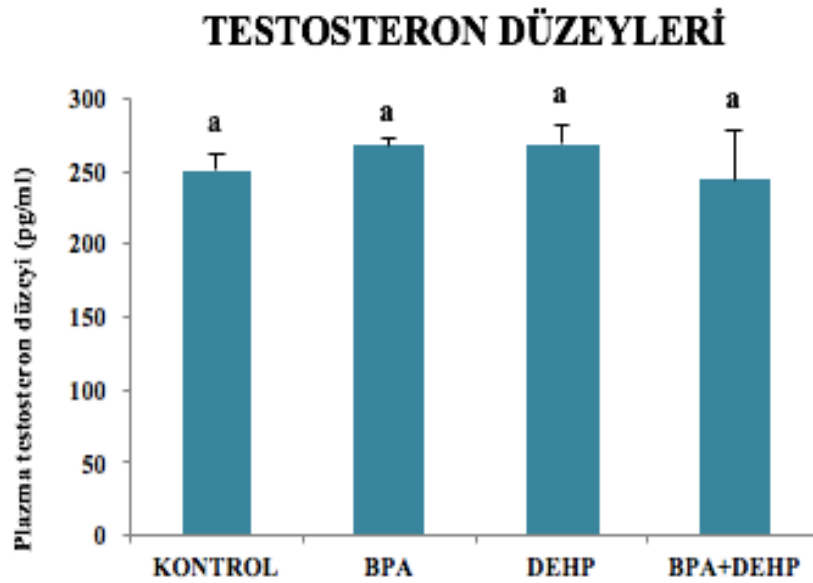
4.4.3. Testosteron Düzeyleri

Plazma testosteron düzeyleri Tablo 4.10 ve Şekil 4.19’de sunulmuştur. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p < 0,05$).

Tablo 4.10. Plazma testosteron düzeyleri.

Çalışma Grupları	Plazma Testosteron Düzeyleri (pg/mL)
Kontrol (n=6)	250,58± 11,58 ^a
BPA (n=6)	267,96± 4,31 ^a
DEHP (n=6)	268,76± 13,01 ^a
BPA+DEHP (n=6)	244,67± 33,11 ^a

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.19. Plazma testosteron düzeyleri.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

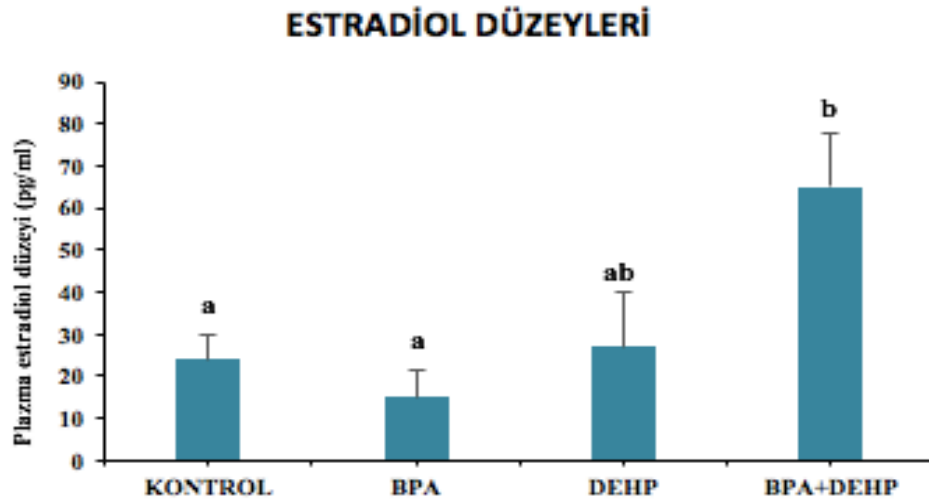
4.4.4. Estradiol Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait plazma estradiol düzeyleri Tablo 4.11. ve Şekil 4.20.'de verilmiştir. BPA grubunda plazma estradiol düzeyleri kontrol grubuna göre %37 oranında azalmış olmakla birlikte, grup içi yüksek varyasyon nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). BPA+DEHP grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir artış (%14) olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.11. Plazma estradiol düzeyleri.

Çalışma Grupları	Plazma Estradiol Düzeyleri (pg/mL)
Kontrol (n=6)	24,01± 5,69 ^a
BPA (n=6)	15,15± 6,22 ^a
DEHP (n=6)	26,97± 13,01 ^{ab}
BPA+DEHP (n=6)	65,15± 12,50 ^b

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.20. Plazma estradiol düzeyleri.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.4.5. Dehidroepiandesteron Sülfat Düzeyleri

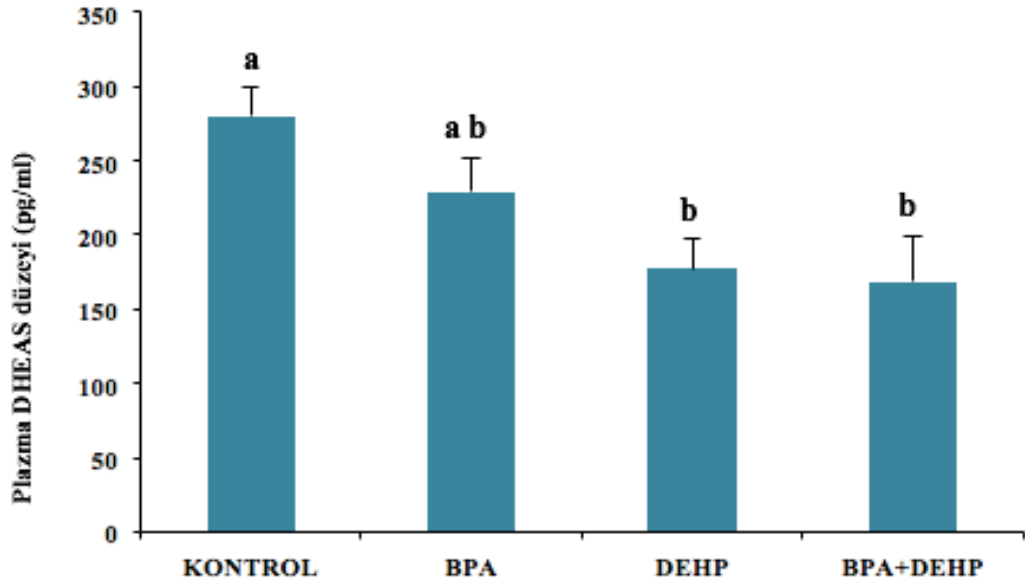
Çalışma gruplarında ölçülen DHEAS düzeyleri Tablo 4.12. ve Şekil 4.21.'de yer almaktadır. Kontrol grubuna kıyasla BPA grubunda anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, DEHP ve BPA+DEHP gruplarında plazma DHEAS düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı (sırasıyla %37, %40; $p < 0,05$) belirlenmiştir.

Tablo 4.12. Plazma dehidroepiandrosteron sülfat düzeyleri.

Çalışma Grupları	Plazma DHEAS Düzeyleri (pg/mL)
Kontrol (n=6)	279,90± 20,02 ^a
BPA (n=6)	228,81± 22,33 ^{ab}
DEHP (n=6)	177,37± 19,77 ^b
BPA+DEHP (n=6)	168,58± 30,74 ^b

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

DEHİDROEPIANDESTERON SÜLFAT DÜZEYLERİ



Şekil 4.21. Plazma dehidroepiandrosteron sülfat düzeyleri.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.4.6. Seks Hormon Bağlayıcı Globülin Düzeyleri

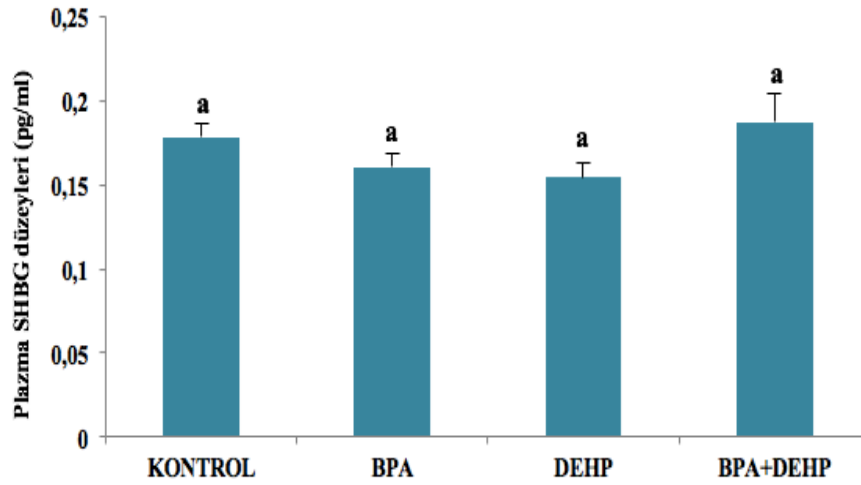
Çalışma gruplarına ait plazma SHBG düzeyleri Tablo 4.13. ve Şekil 4.22.'de yer almaktadır. Bu sonuçlara göre gruplara ait SHBG düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.13. Plazma seks hormon bağlayıcı globulin düzeyleri.

Çalışma Grupları	Plazma SHBG Düzeyleri (pg/mL)
Kontrol (n=6)	0,18± 0,01 ^a
BPA (n=6)	0,16± 0,01 ^a
DEHP (n=6)	0,15± 0,01 ^a
BPA+DEHP (n=6)	0,19± 0,02 ^a

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

SEKS HORMON BAĞLAYICI GLOBULİN DÜZEYLERİ



Şekil 4.22. Plazma seks hormon bağlayıcı globulin düzeyleri.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.5. Sperm Parametreleri

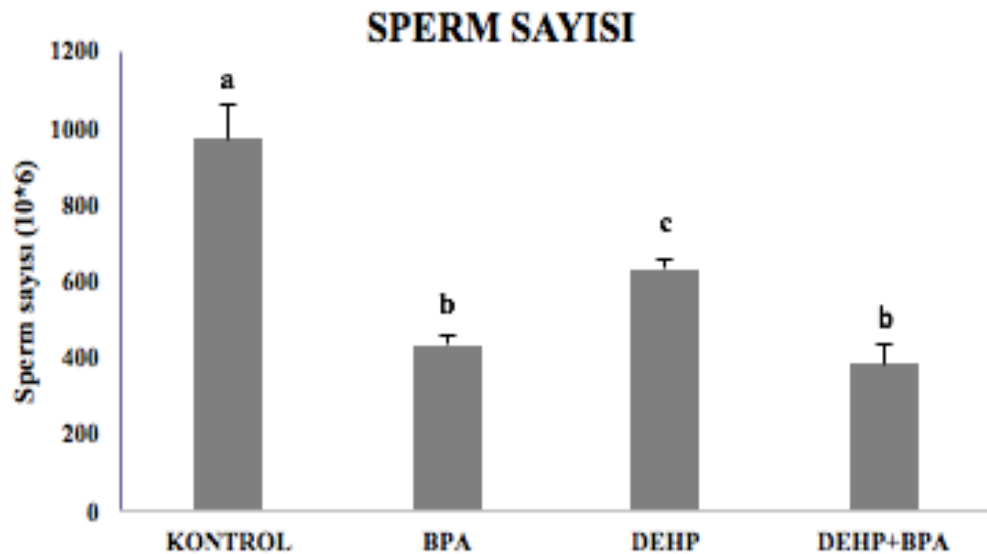
4.5.1. Sperm Sayısı

Çalışma gruplarına ait sperm sayıları Tablo 4.14. ve Şekil 4.23.'de sunulmuştur. Sperm sayılarında, kontrol grubuna oranla BPA grubunda %55, DEHP grubunda %35, BPA+DEHP grubunda %61 oranında ve anlamlı düzeyde ($p < 0,05$) azalma olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.14. Ortalama sperm sayısı.

Çalışma Grupları	Ortalama Sperm Sayısı
Kontrol (n=6)	971,46± 85,33 ^a
BPA (n=6)	433,07± 26,48 ^b
DEHP (n=6)	628,63± 25,38 ^c
BPA+DEHP (n=6)	381,75± 51,98 ^b

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.23. Sperm sayısı.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.5.2. Sperm Motilitesi

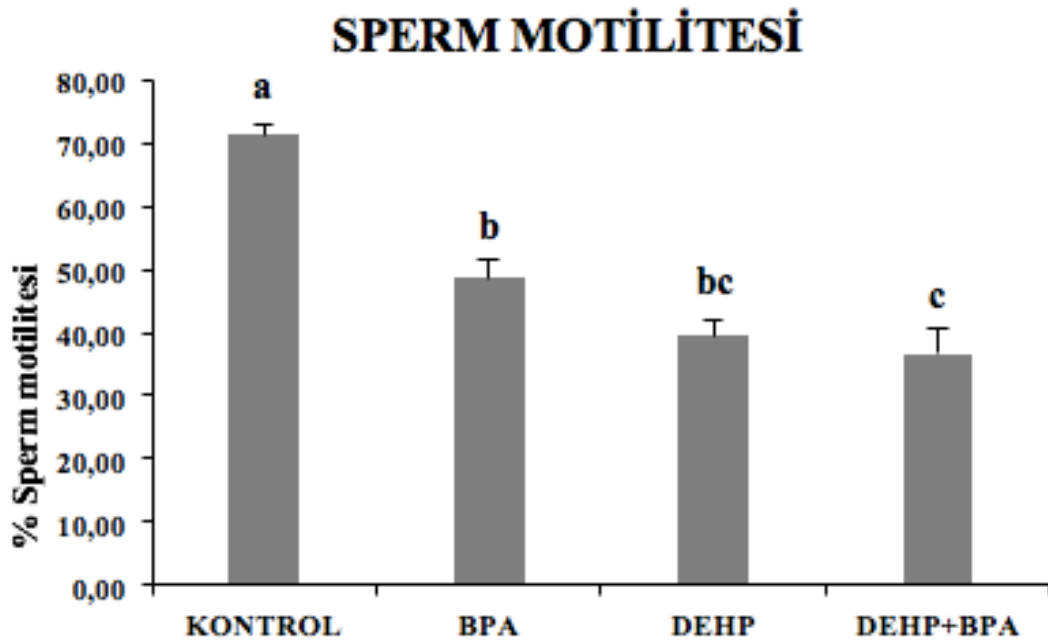
Çalışma gruplarına ait sperm örneklerinde tayin edilen sperm motilitesi Tablo 4.15. ve Şekil 4.24.'te sunulmuştur. BPA grubunda sperm motilitesi %48,65, DEHP

grubunda %39,49 ve BPA+DEHP grubunda %36,62 olarak belirlenmiştir. Her üç çalışma grubunda saptanan sperm motilitesinin de kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde düşük olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 4.15. Çalışma gruplarına ait sperm motilitesi.

Çalışma Grupları	Ortalama Sperm Motilitesi (%)
Kontrol (n=6)	71,18± 1,61 ^a
BPA (n=6)	48,65± 2,91 ^b
DEHP (n=6)	39,49± 2,68 ^{bc}
BPA+DEHP (n=6)	36,62± 4,02 ^c

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



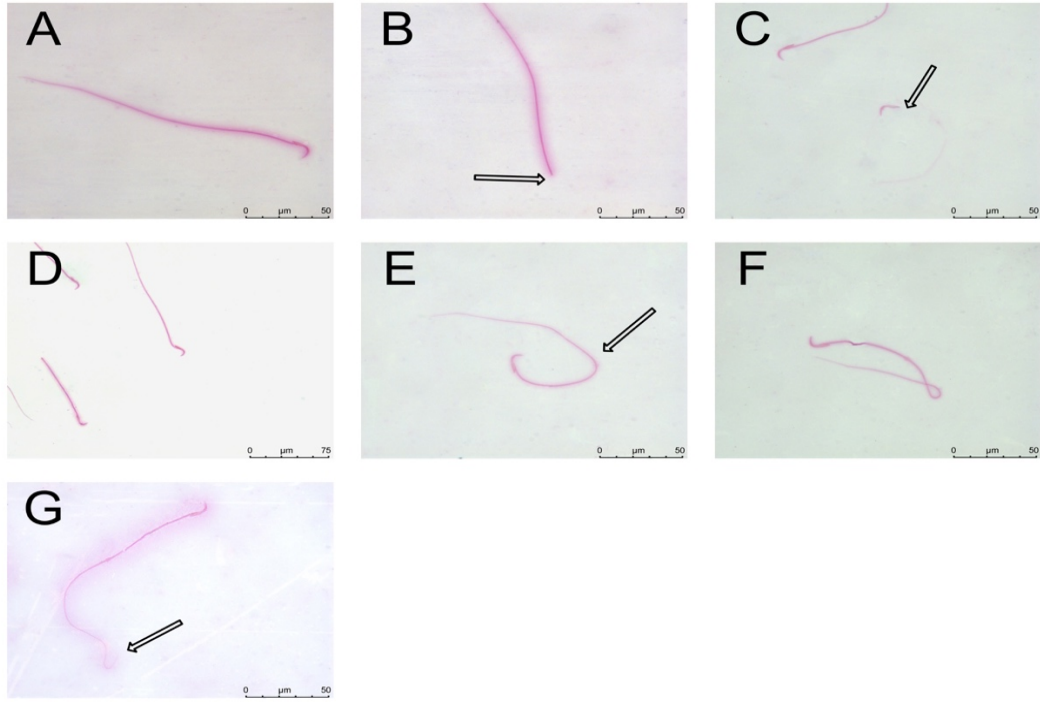
Şekil 4.24. Çalışma gruplarına ait sperm motilitesi.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.5.3. Sperm Morfolojisi

Morfolojik değerlendirmede normal sperm morfolojisi gösteren sperm, başsız, kuyuksuz, olgunlaşmamış kuyruklu, kıvrık kuyruklu, sarmal kuyruklu,

düğümlü kuyruklu sperm (Şekil 4.25.) olmak üzere toplam 200 sperm sayılmış ve her birinin toplam içindeki % değeri hesaplanmıştır.



Şekil 4.25. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan kriterler.

A- Normal sperm B- Başsız sperm (ok) C- Kuyuksuz sperm (ok) D- İki normal sperm ve bir olgunlaşmamış kuyruğa sahip sperm E- Kıvrık kuyruğa sahip sperm (ok) F- Düğümlü kuyruğa sahip sperm G- Sarmal kuyruğa sahip sperm (ok) (DiffQuick X400).

Kontrol grubunda %90,9 oranında normal sperm, %9,1 oranında anormal sperm morfolojisi izlenmiştir. BPA, DEHP, BPA+DEHP uygulanan gruplarda anormal sperm yüzdesinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu belirlenmiş olup sırasıyla % 39, %28 ve %58 olarak saptanmıştır. BPA+DEHP'e birlikte maruz kalan grupta gözlenen anormal sperm morfolojisi gerek kontrole gerekse tek başına uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksektir ($p < 0,05$) (Tablo 4.16.).

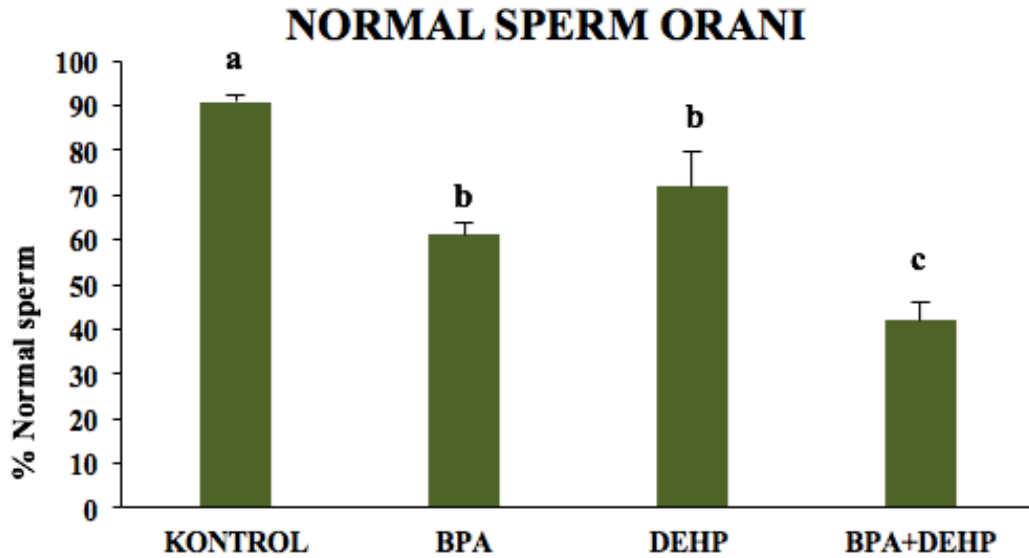
Deney gruplarında sperm morfolojisi değişikliklerine ait ortalama yüzde değerler Tablo 4.16.'da sunulmuştur. Normal sperm oranları (%), baş anomali oranları (%) ve kuyruk anomali oranları (%) Şekil 4.26., Şekil 4.27., Şekil 4.28.'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda normal sperm oranı anlamlı düzeyde düşük bulunmuş olup, en düşük normal sperm oranına sahip grubun BPA+DEHP grubu olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde baş anomali ve kuyruk

anomalisi görülme oranları da tüm deney gruplarında kontrole kıyasla anlamlı ölçüde yüksektir; ancak en yüksek anomali görülme oranı kontrol grubuna kıyasla BPA+DEHP grubuna aittir.

Tablo 4.16. Çalışma gruplarındaki sperm morfolojisi.

	KONTROL (n=6)	BPA (n=6)	DEHP (n=6)	BPA+DEHP (n=6)
Normal sperm (%)	90,92 ^a	61,08 ^b	71,92 ^b	41,92 ^c
Anormal sperm (%)	9,08 ^a	38,92 ^b	28,08 ^b	58,08 ^c
Başsız kuyruk (%)	2,33 ^a	5,58 ^b	3,75 ^b	9,42 ^c
Kuyruksuz baş (%)	0,33 ^a	3,75 ^b	0,92 ^a	3,67 ^b
Olgunlaşmamış kuyruk (%)	0,83 ^a	3,08 ^b	3,08 ^b	5,67 ^c
Kıvrık kuyruk (%)	4,42 ^a	17,42 ^b	12,42 ^b	22,83 ^c
Sarmal kuyruk (%)	0,75 ^a	7,83 ^b	7,25 ^b	14,42 ^c
Düğümlü kuyruk (%)	0,42 ^a	1,25 ^b	0,67 ^b	2,08 ^c
Toplam sperm	100,00	100,00	100,00	100,00

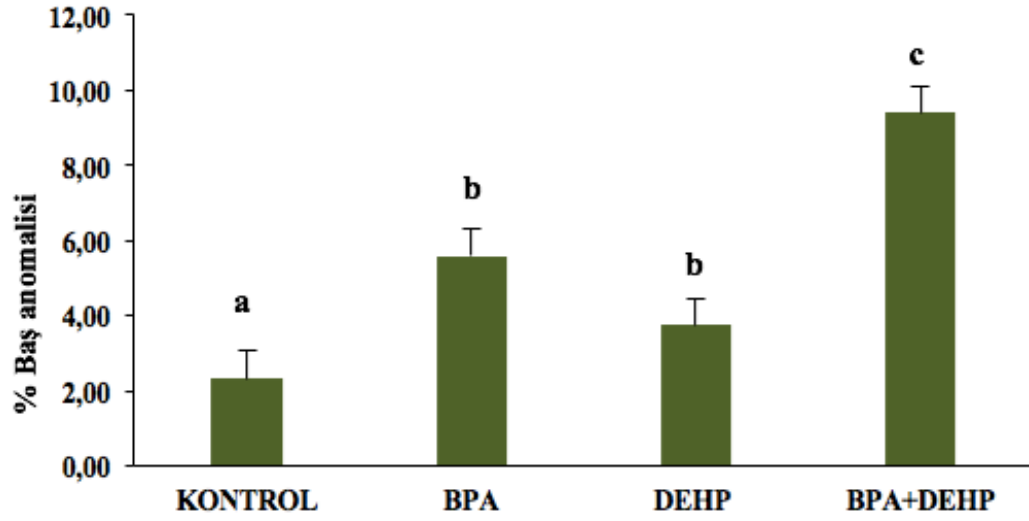
Değerler normal spermin yüzdesi olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.26. Çalışma gruplarındaki normal sperm oranı.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

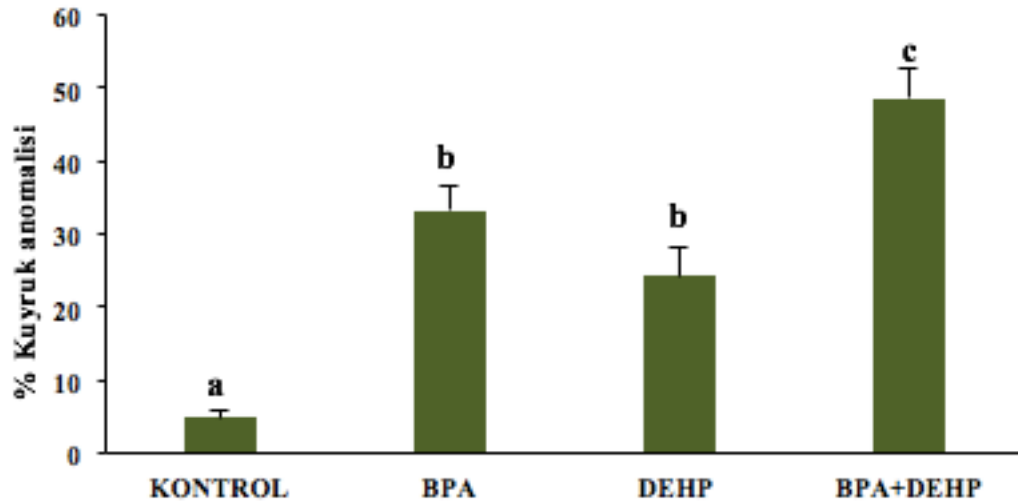
BAŞ ANOMALİSİ ORANI



Şekil 4.27. Çalışma gruplarında baş anomalisi olan sperm oranı.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

KUYRUK ANOMALİSİ ORANI



Şekil 4.28. Çalışma gruplarında kuyruk anomalisi olan sperm oranı.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.6. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

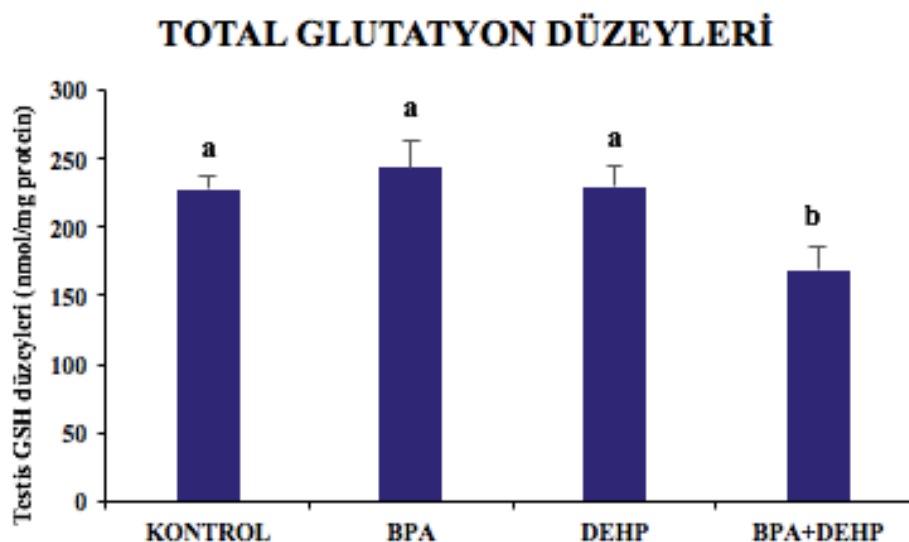
4.6.1. Total Glutasyon Düzeyleri

Çalışma gruplarında yer alan sıçan testis dokularında ölçülen total glutasyon düzeyleri Tablo 4.17. ve Şekil 4.29.'da yer almaktadır. BPA ve DEHP gruplarında ölçümü yapılan total GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmazken, BPA+DEHP grubundaki total glutasyon düzeylerinin gerek kontrol (%26) gerekse diğer gruplara oranla (sırasıyla %31, %27) önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 4.17. Testis total glutasyon düzeyleri.

Çalışma Grupları	Testis Total GSH Düzeyleri ($\mu\text{mol/mg protein}$)
Kontrol (n=6)	227,98 $\pm$ 9,65 ^a
BPA (n=6)	243,73 $\pm$ 18,64 ^a
DEHP (n=6)	229,40 $\pm$ 14,54 ^a
BPA+DEHP (n=6)	168,27 $\pm$ 18,19 ^b

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.29. Testis total glutasyon düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.6.2. Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri

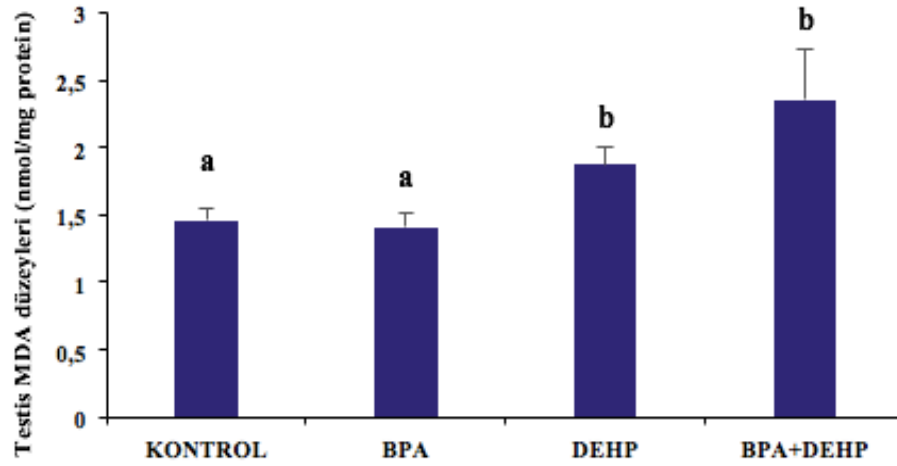
Testis dokularında ölçülen MDA düzeyleri Tablo 4.18. ve Şekil 4.30.'da gösterilmiştir. Testis MDA düzeyleri BPA grubunda kontrole kıyasla anlamlı ölçüde değişmezken, DEHP ve BPA+DEHP gruplarında istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir (sırasıyla %28, %60; $p < 0,05$).

Tablo 4.18. Testis malondialdehit düzeyleri.

Çalışma Grupları	Testis MDA (nmol/mg protein)
Kontrol (n=6)	1,46± 0,08 ^a
BPA (n=6)	1,40± 0,11 ^a
DEHP (n=6)	1,87± 0,12 ^b
BPA+DEHP (n=6)	2,35± 0,38 ^b

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİ



Şekil 4.30. Testis malondialdehit düzeyleri.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.6.3. Protein Karbonil Düzeyleri

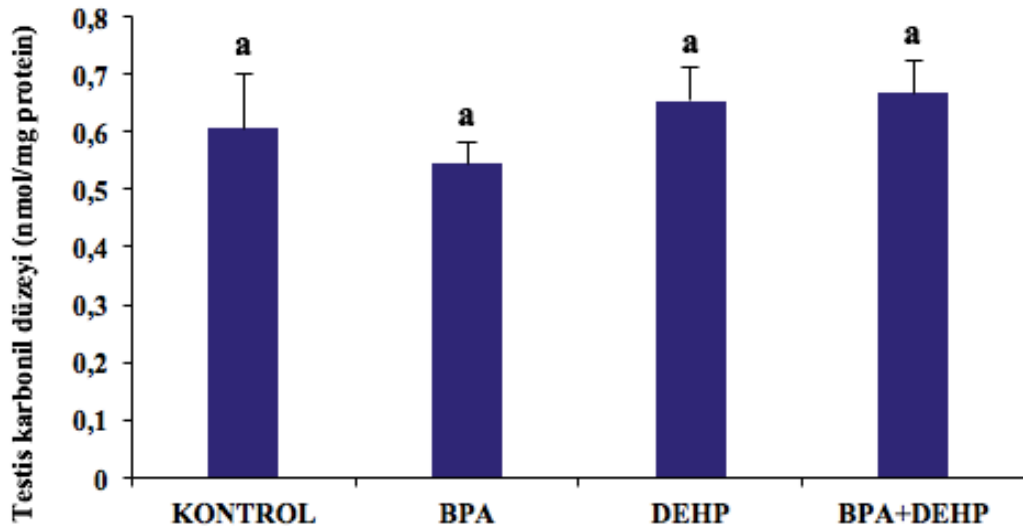
Testis dokularında protein hasarını belirlemek amacıyla ölçülen karbonil düzeyleri Tablo 4.19. ve Şekil 4.31.'de yer almaktadır. Bu verilere göre gruplara ait karbonil düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.19. Testis karbonil düzeyleri.

Çalışma Grupları	Testis Karbonil Düzeyleri (nmol/mg protein)
Kontrol (n=6)	0,61± 0,09 ^a
BPA (n=6)	0,54± 0,04 ^a
DEHP (n=6)	0,65± 0,06 ^a
BPA+DEHP (n=6)	0,67± 0,06 ^a

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

PROTEİN OKSİDASYONU DÜZEYLERİ



Şekil 4.31. Testis karbonil düzeyleri.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

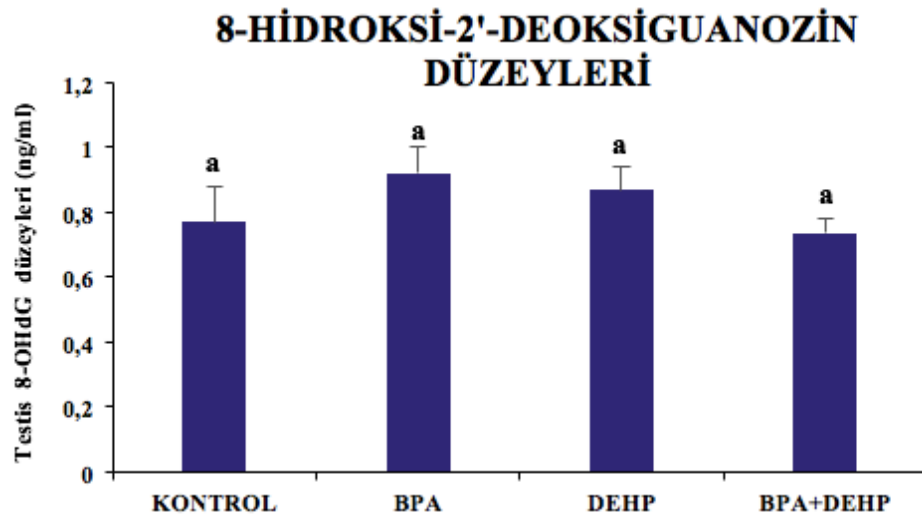
4.6.4. DNA Baz Hasarı Düzeyleri

Testis dokularında oksidatif DNA baz hasarının tespiti için yapılan analiz sonucu saptanan 8-OHdG düzeyleri Tablo 4.20. ve Şekil 4.32.'de verilmiştir. Bu verilere göre gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.20. Testis 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin düzeyleri.

Çalışma Grupları	Testis 8-OHdG Düzeyleri (ng/ml)
Kontrol (n=6)	0,77± 0,11 ^a
BPA (n=6)	0,92± 0,08 ^a
DEHP (n=6)	0,87± 0,07 ^a
BPA+DEHP (n=6)	0,74± 0,04 ^a

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.32. Testis 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin düzeyleri.

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.7. Apoptotik Analizler

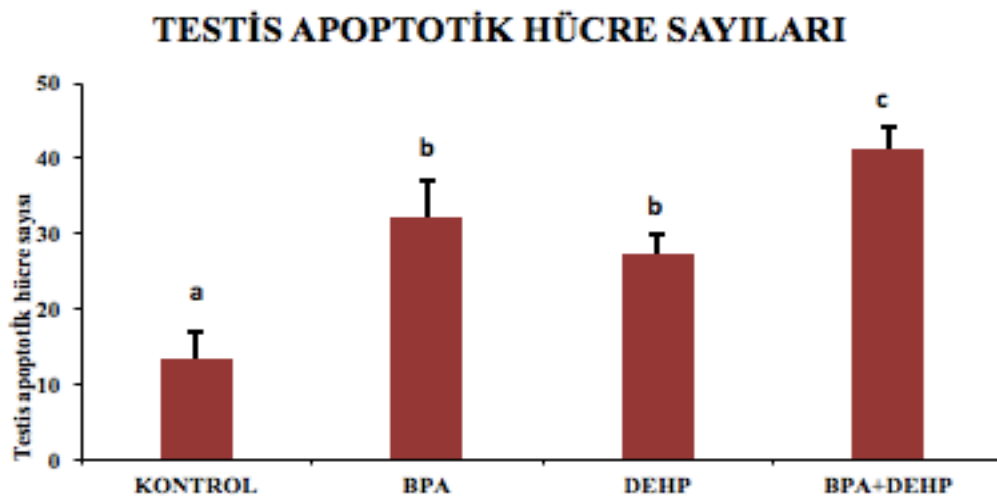
Deney gruplarında apoptotik hücre sayısını belirlemek için TUNEL işaretlemesi yapılmıştır ve her grupta X40'luk büyütmede 20 seminifer tübülde

TUNEL pozitif boyanan hücreler sayılıp ortalaması alınarak deney grupları için ortalama apoptotik hücre sayısı belirlenmiştir. Testis dokusu apoptotik hücre sayısı Tablo 4.21. ve Şekil 4.33.'de sunulmuştur. BPA, DEHP ve BPA+DEHP uygulanan gruplarda apoptotik hücre sayısının kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). Ortalama apoptotik hücre sayısı BPA+DEHP grubunda en yüksek olarak saptanmıştır; bu sayı DEHP ve BPA gruplarındaki ortalama apoptotik hücre sayısı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). Seminifer tübül kesitlerine ait görüntüler Şekil 4.34., Şekil 4.35., Şekil 4.36., Şekil 4.37.'de sunulmuştur. Tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna kıyasla artmış TUNEL-pozitif spermatogonyumlar ve TUNEL pozitif apoptotik hücreler saptanmıştır.

Tablo 4.21. Testis dokusu apoptotik hücre sayısı.

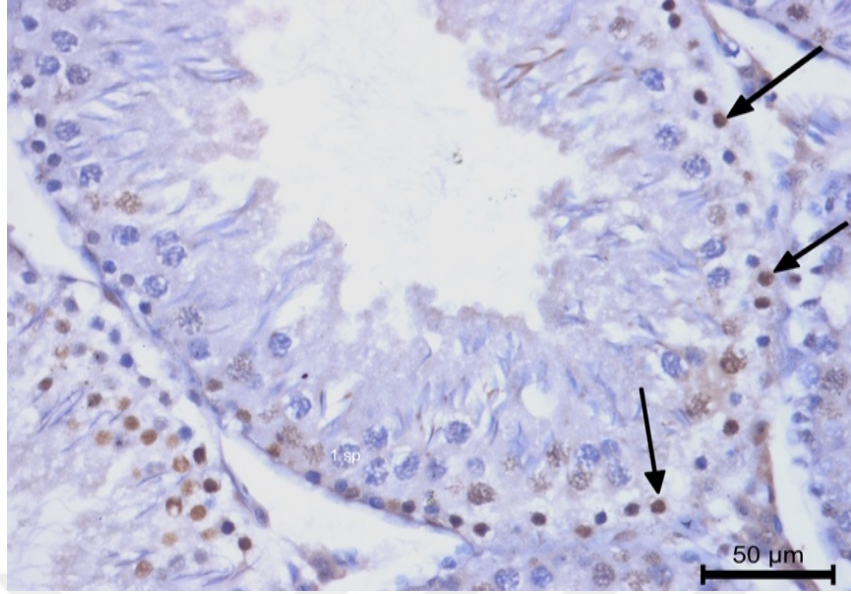
Çalışma Grupları	Apoptotik Hücre Sayısı
Kontrol (n=6)	$13,29 \pm 3,52^a$
BPA (n=6)	$32,07 \pm 5,15^b$
DEHP (n=6)	$27,18 \pm 2,77^b$
BPA+DEHP (n=6)	$41,12 \pm 3,11^c$

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

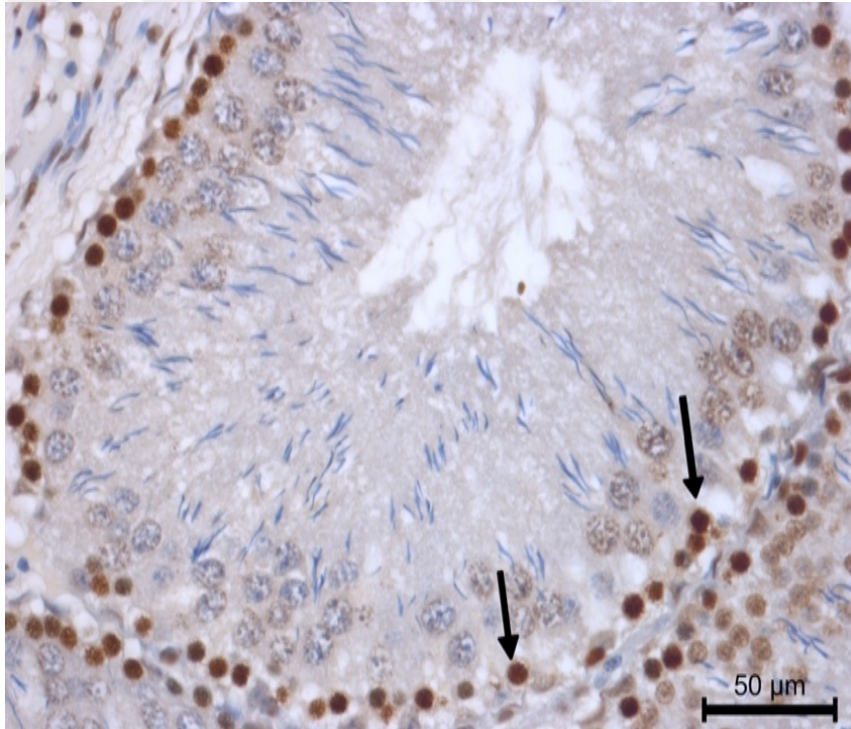


Şekil 4.33. Deney gruplarında ortalama apoptotik hücre sayısı.

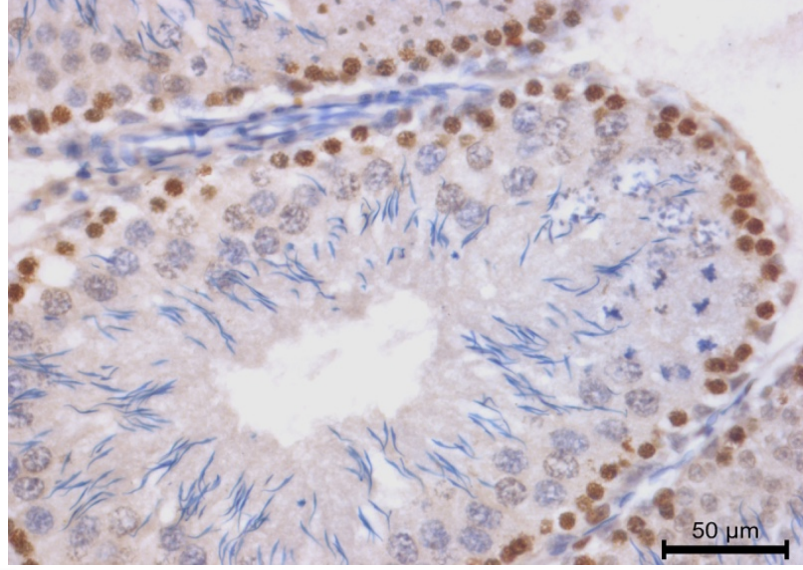
Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



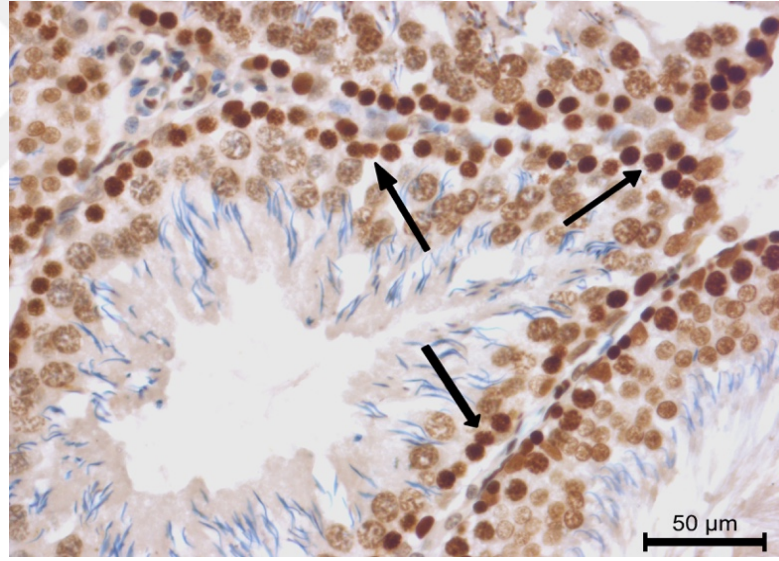
Şekil 4.34. Kontrol grubuna ait seminifer tübül kesitlerinde apoptotik inceleme. TUNEL kit ile pozitif (kahverengi) (ok) boyanan apoptotik hücreler izlenmektedir (X400).



Şekil 4.35. BPA grubuna ait seminifer tübül kesitlerinde apoptotik inceleme. TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir. Kontrol grubuna göre daha çok sayıda spermatogonyumda pozitif işaretlenme gözlenmektedir (X400).



Şekil 4.36. DEHP grubuna ait seminifer tübül kesitlerinde apoptotik inceleme. Kontrol grubuna göre artmış sayıda TUNEL pozitif apoptotik spermatogonyumlar izlenmektedir (X400).



Şekil 4.37. BPA+DEHP grubuna ait seminifer tübül kesitinde apoptotik inceleme. Yoğun TUNEL pozitif apoptotik hücreler gözlenmektedir (X400).

5.TARTIŞMA

Endokrin bozucu kimyasal maddeler, hormonların sentez, salgılama, taşıma, metabolizma, eliminasyon, reseptöre bağlanma ve doğal homeostazını etkileyen, üreme ve gelişimsel sorunlara neden olabilen ekzojen maddeler olarak tanımlanmaktadır ve sentetik olarak endüstriyel alanlarda üretilebileceği gibi çevrede doğal olarak da bulunabilir (1). EDC'lere çok yaygın bir şekilde ve çok farklı kaynaklardan maruz kalmak mümkündür. Endüstriyel alanlarda çevresel kontaminasyona bağlı olarak çok sayıda kimyasal madde karışım halinde toprağı ve yeraltı sularını kontamine edebilmekte ve yakın çevredeki bireylerin doğrudan temasına yol açabilmektedir. Bu kimyasal karışımların yine besin zincirinde birikerek çevreye, hayvanlara ve insanlara ulaşabileceği de bilinmektedir (2, 3). Ayrıca, kozmetik ürünlerin, oyuncakların, kaplama materyallerinin, plastik yemek kaplarının, şişelerin, bebek ürünlerinin ve çeşitli ev kimyasallarının kullanımı EDC'lere bireysel maruziyetin diğer bir önemli bir kaynağını oluşturduğu belirtilmektedir (2). Yaşamın değişik dönemlerinde EDC'lere temas başta üreme sistemi olmak üzere organizmada pek çok sistem üzerinde istenmeyen etkilere yol açabilmektedir. Özellikle prenatal dönem ile çocukluk dönemindeki temasın etkilerinin çok daha önemli olabileceği ve ciddi sonuçlara yol açabileceği belirtilmektedir. Son derece sınırlı sayıda bulunan çalışmaların sonuçları, bu kimyasal maddelere prenatal maruziyetin normal hücre ve doku gelişimini bozarak ve gelişim süresince birçok işlevi etkileyerek sonraki dönemlerde görülebilecek üreme sorunları, metabolik ve hormonal bozukluklara yol açabileceğine işaret etmektedir. Gelişim açısından kritik olan bu dönemlerde değişik kimyasal maddelere özellikle karışım halinde maruz kalınması da son derece önemli bir sorundur ve bir arada temas ile gözlenebilecek ters etkilerin şiddetlenebileceği öngörülmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, yaygın kullanılan çevresel kirleticiler olarak tanımlanan ve endokrin bozucu etkileri bilinen BPA ve DEHP'e prenatal dönem ve erken postnatal (laktasyon) dönemde tek tek veya karışım halinde maruziyetin, sıçanlarda erkek üreme sistemi üzerindeki istenmeyen etkileri (sperm sayısı, motilitesi, morfolojisi, üreme hormon düzeylerindeki değişiklikler, testiküler dokudaki histopatolojik ve apoptotik değişiklikler) ve bu istenmeyen etkilerin altında

yatması olası mekanizmalardan biri olarak oksidatif stres oluşumu incelenmiştir. Elde edilen veriler, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

5.1. Vücut Ağırlığı

Tez kapsamında dozlama yapılan gebe sıçanlardan doğan yavruların cinsiyet ayrımı yapılmaksızın hesaplanan ortalama doğum ağırlıklarında BPA grubunda yer alan yavruların doğum ağırlıklarının kontrol grubuna göre farklı olmadığı; DEHP grubundaki yavruların doğum ağırlıklarının ise gerek kontrol ve BPA gruplarına kıyasla anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, BPA+DEHP grubundaki yavruların doğum ağırlıklarının da kontrol, BPA ve DEHP gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu yavrulara ait laktasyon dönemi ortalama vücut ağırlıklarında DEHP ve BPA+DEHP gruplarında belirlenen erkek yavru ortalama vücut ağırlıklarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde arttığı, BPA grubundaki erkek yavrulara ait ortalama vücut ağırlıklarının ise kontrole kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Erkek yavrular erişkinlik dönemine geldiğinde, ötenazi öncesi 12. haftada kaydedilen vücut ağırlıklarında sadece DEHP grubunda belirlenen ortalama vücut ağırlığının kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde düşük olduğu saptanmış; diğer gruplarda herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde bu kimyasal maddelere maruziyetin yavru vücut ağırlıkları üzerine etkilerinin çok çeşitli şekillerde olduğu görülmektedir. Maternal BPA maruziyetinin doğan yavrularda vücut ağırlığında azalmaya neden olabileceğini gösteren çalışmalar olduğu gibi, artışa neden olabileceğini belirleyen araştırmalar da bulunmaktadır (300, 305, 307). Çeşitli çalışmalarda ise maruziyetin yavru vücut ağırlıklarına etkisi olmadığı ifade edilmiştir (298-300, 304, 337). Benzer şekilde DEHP maruziyetinin de yavru vücut ağırlıklarını etkilemediği, anlamlı olarak arttırdığı ya da azalttığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (320, 323, 327, 330).

Kimyasal maddelere maternal olarak karışımlar halinde maruziyetin incelendiği sınırlı sayıdaki çalışmada ise maruziyetin yavru vücut ağırlığında anlamlı bir değişime neden olmadığı görülmüştür (270, 337, 338, 340). Sunulan tez çalışmasında da bu çalışmalar ile uyumlu olarak, prenatal ve erken postnatal dönemde EDC'lere kombine maruziyetin erkek yavruların vücut ağırlığında anlamlı bir

değişikliğe yol açmadığı belirlenmiştir. Prenatal EDC maruziyetine bağlı olarak vücut ağırlıklarında gözlenen değişimlerin farklı yönde olmasının nedenleri çalışmalarda tam olarak açıklanamamıştır.

5.2. Testis ve Epididimis Ağırlıkları

Çalışma gruplarında yer alan sıçanların dekapitasyonu takiben testis ve epididimis ağırlıkları yönünden gruplar arası anlamlı bir fark saptanamamıştır. Rölatif testis ağırlıkları değerlendirildiğinde, DEHP ve BPA+DEHP gruplarında kontrol grubuna oranla bir artış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Rölatif epididimis ağırlıklarının ise DEHP ve BPA+DEHP gruplarında kontrol grubuna oranla önemli düzeyde arttığı saptanmıştır ($p<0,05$). Tek başına BPA maruziyetinin rölatif testis veya epididimis ağırlıkları üzerine bir etkisi saptanamamıştır.

Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, maternal BPA ve/veya DEHP maruziyetinin testis veya epididimis ağırlıkları üzerindeki etkilerinin de çelişkili olduğu görülmektedir. Anne karnındaki BPA maruziyetinin yaşamın değişik dönemlerinde incelenen organ ağırlıklarını etkilemediğini gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte (297, 298, 300, 302, 304); maternal maruziyetin, neonatal ve pubertal dönemde testis ağırlıklarında azalmaya neden olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (214, 305, 306). Maruziyet yolu, dozu veya süresi, kullanılan deney hayvanı türleri bu farklı etkileri açıklayan etmenler olarak ileri sürülmektedir.

Benzer şekilde çelişkili sonuçların maternal DEHP maruziyetinin yavru testis ve epididimis ağırlıkları üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar ile de elde edildiği saptanmıştır. Prenatal DEHP maruziyetinin organ ağırlıklarında azalmaya neden olduğunu ve bu etkinin sonraki nesillerde de görülebileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (318, 324, 326). Bununla birlikte, farklı çalışmalarda maternal DEHP maruziyetinin organ ağırlıklarına etkisinin olmadığını ifade eden çalışmalara da rastlanmıştır (320, 323). Organ ağırlıklarında gözlenen değişimlerin de farklı yönde olması çalışmalarda ayrıntılı olarak açıklanabilen bir konu değildir. Tarafımızdan yapılan çalışmada, özellikle prenatal DEHP maruziyetinin olduğu gruplarda rölatif epididimis ağırlıklarında kontrol grubuna kıyasla artış eğilimi olduğu gözlenmiştir. Bu

artış epididimisin, maruz kalınan bileşiklerin istenmeyen etkilerini bertaraf etmek için bir adaptif yanıt olarak gelişen hiperplazi şeklinde yorumlanabilir. Ancak bu konuda bir çalışma bulunmamaktadır.

Xi ve ark. BPA ve DEHP'e karışım halinde maternal maruziyetin testis ağırlıklarında anlamlı azalmaya neden olduğunu saptanmıştır (337). Karışımlar halinde kimyasal maddelere maruziyetin değerlendirildiği diğer çalışmalarda ise maruziyetin testis ağırlıklarında anlamlı bir değişme olmadığı görülmüş (340, 341). Tez çalışmasında rölatif testis ağırlığı yönünden elde edilen bulgu, bir arada maruziyetin anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı yönündeki çalışmalar ile uyumludur.

5.3. Histopatolojik Analizler

Tez kapsamında yapılan çalışmada, BPA uygulanan gruba ait örneklerin kesitlerinde seminifer tübüller ve aralarındaki interstisyel dokuda Leydig hücreleri incelenmiştir. Bu grupta bazı seminifer tübüllerde epitelin bütünlüğünün bozulduğu primer spermatositlerin bazı bölgelerde bazalden ayrıldığı gözlenmiştir. Normal yapıda seminifer tübüllerin bazalinde Sertoli hücrelerine hemen komşu olarak bulunan spermatogonyumların tübüllerin bazı alanlarında bulunmadığı görülmüştür. DEHP uygulanan gruba ait örneklerde ise seminifer tübüllerin bazalinde Sertoli hücreleri ile spermatogonyumlar arasında hücreler arası bağlantıların bozulduğunu gösteren belirgin ayrılmalar olduğu saptanmıştır. Seminifer tübül duvarında farklılaşmakta olan spermatogenetik seriye ait hücreler arasında da ayrılmalar gözlenmiştir. Bazı seminifer tübüllerin lümeninde spermiyuma farklılaşmanın erken evresine ait yuvarlak şekilli spermatogenetik hücrelerin lümene dökülerek hücre debrisı oluşturduğu görülmüştür.

Karışım halinde BPA ve DEHP uygulanan gruba ait örneklerin kesitlerinde seminifer tübüller arasında interstisyel dokuda Leydig hücrelerinin normal histolojik yapısını koruyarak varlığını devam ettirdiği izlenmiştir. Bu grupta etkilenen seminifer tübüllerde spermatogenetik seriye ait hücreler arasında geniş boşluklar izlenmiştir. Seminifer tübül epitelinde farklılaşmanın ileri evresine ait hücrelerin kaybı ile epitel kalınlığının azaldığı gözlenmiştir. Spermatogenez ve spermiyogenezin bozulduğu saptanmıştır.

Bu sonuçlara göre seminifer tübüllerde ve Sertoli hücrelerinde meydana gelen histopatolojik değişikliklerin sperm sayısı ve morfolojisinde bozukluklara neden olabileceği görülmüştür. Bu kimyasal maddelere erken dönem maruziyetinin erişkinlik döneminde infertiliteye yol açabileceği yorumu yapılabilir. Leydig hücrelerinde bozulma gözlenmemesi, testosteron düzeylerinde değişiklik olmamasının nedeni olarak gösterilebilir. DEHP maruziyetinin etkilerinin geri dönüşlü olduğunu gösteren bir çalışmada belirtildiği gibi tez çalışmamızda da sonuçlar maruziyetten uzun bir süre sonra elde edilmiştir. Bu nedenle testosteron düzeyleri üzerindeki etkilerin geri dönüşlü olabileceğini düşünülmektedir (321).

Yapılan çeşitli çalışmalar, maternal BPA maruziyetine bağlı olarak erişkinlik döneminde testis dokusunda spermatogenezin bozulduğunu, testis tübül lümeninde olgunlaşmamış spermatik hücreler olduğunu, tübüler lümeninde genişlemeler ve sertoli hücreleri arasında geniş boşluklar oluştuğunu göstermektedir (303, 306). Bu bulgular, tez çalışmasında prenatal BPA maruziyetine bağlı olarak erkek yavrularda yetişkinlik dönemine gelindiğinde gözlenen histopatolojik değişiklikler ile uyumludur. Yenidoğan erkek sıçanlarda yapılan bir diğer çalışmada, subkütan yoldan (0.01, 0.1 and 5 mg/kg) BPA uygulanmış ve maruziyete bağlı olarak spermatogenezin bozulduğu görülmüştür (342). Bunun yanı sıra, literatürde maternal BPA maruziyetinin testis dokusunda histopatolojik değişikliklere neden olmadığı yorumunu yapan çalışmalar da mevcuttur (302, 304).

Maternal DEHP maruziyetinin testis dokusunda histopatolojik değişikliklere ve spermatogenezde bozulmaya neden olduğunu ve bu değişimlerin sonraki nesillere iletilebileceğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (317-319, 322, 325, 327). Bu bulgular, tarafımızdan elde edilen verileri destekler niteliktedir.

Maternal DEHP ve/veya DIP maruziyetinin ve DEHP ve DBP karışım halinde maruziyetinin değerlendirildiği çalışmalarda testis dokusunun histolojik yapısında bozukluklar olduğu görülmüştür (336, 338). Ancak, prenatal DEHP+BPA maruziyetinin testis dokusundaki olası histopatolojik değişikliklerini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

5.4. Hormon Düzeyleri

Tez çalışması kapsamında dozlama yapılan gebelerden doğan yavruların erişkinlik dönemi plazma FSH, LH, testosteron, SHBG düzeylerinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Kombine maruziyet (BPA+DEHP) grubunda plazma estradiol düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Çalışma gruplarında ölçülen DHEAS düzeyleri DEHP ve BPA+DEHP gruplarında kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır ($p < 0,05$).

Maternal BPA maruziyetinin testosteron düzeylerine etkisinin incelendiği çeşitli çalışmalarda; testis testosteron düzeylerinin maruziyetten etkilenmediği (298, 314), plazma testosteron düzeylerinde artışın ya da azalışın (301, 306) gözlenebileceği veya bu düzeylerin maruziyetten etkilenmeyebileceği gibi çok çeşitli sonuçlar ortaya çıkmıştır (299, 302, 305, 307). Benzer şekilde, plazma estradiol, FSH ve LH düzeylerinde de azalma ya da artış olabileceğini bildiren farklı çalışmalar bulunmaktadır (301, 305, 306). Bazı çalışmalarda ise maruziyetin plazma hormon düzeylerini etkilemediği sonucuna varılmıştır (298, 299, 302). Tez çalışmasında da prenatal BPA maruziyetinin yetişkin dönemde incelenen hiçbir hormon parametresinde kontrol grubuna oranla anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır.

Maternal DEHP maruziyetinin Leydig hücre testosteron üretiminde ve plazma testosteron düzeylerinde azalmaya neden olduğunu gösteren çalışmalar olduğu gibi plazma testosteron düzeylerinin maruziyeti ile arttığını ya da değişmediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (317, 321, 322, 324). Gebe sıçanlara BPA ve DEHP'in kombine şekilde uygulandığı bir çalışmada yavruların prepubertal dönemde plazma FSH ve testosteron düzeylerinde kontrole kıyasla anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür (337). Kimyasal maddelere karışımlar halinde maruziyetin sonuçlarının değerlendirildiği diğer çalışmalarda maruziyetin serum hormon (testosteron, LH ve FSH) düzeylerini etkilemediği yönünde bulgular elde edilmiştir (338-341).

DEHP'in Leydig hücre testosteron üretimini azaltmasının iki etmen ile ilişkili olduğu belirtilmektedir: Hipofiz LH sekresyonunda azalma veya androjen

biyosentezinde yer alan steroidojenik enzim aktivitelerinde azalma. Bununla birlikte, prepubertal DEHP maruziyetinde Leydig hücre androjen biyosentetik kapasitesinin arttığı ve artmış LH konsantrasyonları ile ilişkili olarak serum testosteron düzeylerinde artış gözlenen çalışmalar da bulunmaktadır (321). Bu etkilerin muhtemelen kompensatör bir mekanizma nedeniyle olabileceği ileri sürülmüştür. Androjen biyosentezi yeterince azaldığında azalan testosteron konsantrasyonları negatif bir geri besleme mekanizması ile hipofizden LH salımını arttırabilir ve LH Leydig hücrelerinin daha fazla testosteron salımı için uyarabilir. Bu negatif geri besleme mekanizması hipotalamus-hipfiz-gonadal aks için homeostatik bir kontrol sağlayabilir. Bununla birlikte, Leydig hücreleri tarafından testosteron üretiminin kalıcı olarak yüksek düzeylerde olmasının da seminiferöz tübüllerin hasarı gibi Leydig hücre hiperplazisi dahil istenmeyen sonuçları olabilir (321). Diğer taraftan, anne karnında ve laktasyon döneminde DEHP maruziyetinin sadece neonatal ve peripubertal dönemde androjen statüyü azalttığı; bu hayvanların 90 güne ulaştıklarında kontrole benzer düzeyde testosteron seviyelerine sahip oldukları belirtilmektedir. Bu gözlem, Leydig hücrelerinde DEHP'in inhibitör etkisinin geri dönüşlü olduğunu ve/veya DEHP teması sonlandıktan sonra yeni bir Leydig hücre popülasyonunun geliştiğini ve hasarın onarıldığını düşündürmektedir (321). Maternal DEHP maruziyetinin değerlendirildiği çeşitli çalışmalarda, serum LH düzeylerinde azalma ya da artış yönünde bulgular elde edilmiştir (321, 325, 331). Sunulan tez çalışmasında da prenatal ve laktasyon döneminde tek başına veya kombine halde DEHP maruziyeti bulunan 12 haftalık yetişkin erkek sıçan gruplarında testosteron düzeyinin kontrol grubuna göre farklılık göstermemesi yukarıda açıklanan mekanizmalardan biri ile açıklanabilir. LH düzeylerinde de anlamlı bir farklılık gözlenmemesi testosteron konsantrasyonu ile ilişkilendirilebilir.

Prenatal ftalat maruziyetinin DHEAS düzeyleri üzerine etkisinin incelendiği çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Prenatal ftalat maruziyeti olan erkek çocuklarda serum DHEAS düzeylerinin düşebileceğini gösteren bir çalışmaya rastlanmıştır (315). Tez çalışmasında tüm gruplarda DHEAS düzeylerinde bir azalma eğilimi gözlenmiş olmakla birlikte, DEHP ve DEHP+BPA gruplarında bu azalmanın kontrol grubuna oranla anlamlı olduğu saptanmıştır. DHEAS'nin daha sonra testosteron ve androstendiona dönüştüğü bilinmektedir. DHEAS düzeylerindeki azalma bu

dönüşümün de düşük oranda olacağını göstermektedir. Bu durum bu kimyasal maddelere maruziyetin antiandrojenik etkisi şeklinde yorumlanabilir.

Maternal DEHP maruziyetinin estradiol düzeylerine etkisinin incelendiği bir çalışmada maruziyete bağlı olarak plazma estradiol düzeylerinde değişiklik olmadığı görülmüştür (324). Diğer bir çalışmada ise maternal maruziyete bağlı erişkinlik döneminde dozdan bağımsız olarak serum testosteron düzeylerinde azalma, estradiol ve LH düzeylerinde artış olduğu ifade edilmiştir (325). Testosteronun Cyp19a1 (aromataz) ile estradiole dönüştüğü bilinmektedir. Azalan testosteron düzeyleri, estradiol sentezini azaltabilir. Bununla birlikte, DEHP maruziyetinde serum estradiol düzeylerinin arttığını bildiren çalışmalar bu artışı anormal hepatik estrojenik metabolizmaya bağlamışlardır. Ayrıca, DEHP'in karaciğer hiperplazisine ve estrojen metabolizmasının bozulmasına neden olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (325, 343). Tez çalışmasında DEHP+BPA grubunda estradiol düzeylerinde kontrol grubuna oranla gözlenen artış böyle bir mekanizma ile açıklanabilir. Yapılan çeşitli çalışmalarda DEHP'in östrojenik etkileri olabileceği üzerinde de durulmaktadır (316, 344).

5.5. Sperm Parametreleri

Çalışma gruplarına ait incelenen sperm parametrelerinde gruplar arası gözlenen değişiklikler Tablo 5.1'de özetlenmiştir.

Tablo 5.1. Sperm parametrelerinin değerlendirilmesi.

	Sperm Sayısı	Sperm Motilitesi
Kontrol-BPA	↓	↓
Kontrol-DEHP	↓	↓
Kontrol-BPA+DEHP	↓	↓
BPA-BPA+DEHP	↔	↓
DEHP-BPA+DEHP	↓	↔

↑ İstatistiksel açıdan anlamlı artış ($p<0,05$) ↓ İstatistiksel açıdan anlamlı azalma ($p<0,05$) olduğunu ifade etmektedir.

Sperm sayısında kontrol grubuna oranla BPA grubunda %55, DEHP grubunda %35, BPA+DEHP grubunda %61 oranında ve anlamlı düzeyde ($p<0,05$) azalma olduğu belirlenmiştir. BPA grubunda sperm motilitesi %48,65, DEHP grubunda %39,49 ve BPA+DEHP grubunda %36,62 olarak belirlenmiştir. Her üç çalışma grubunda saptanan sperm motilitesinin de kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak, kombine maruziyet grubunda gözlenen sperm motilitesinde azalmanın diğer gruplara oranla daha belirgin düzeyde olduğu saptanmıştır.

Maternal BPA ve DEHP'e ayrı ayrı ve karışım halinde maruziyetin sperm sayısı ve motilitesinde azalmaya neden olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (301, 322, 323, 325, 337, 340, 341). Maternal DEHP maruziyetinin erkek yavrularda erişkinlik döneminde sperm üretiminde, sayısında ve semen kalitesinde azalmaya neden olduğu başka bir çalışmada ise bu etkilerin sonraki nesilleri de etkileyebileceği gösterilmiştir (327). Literatürde maruziyetin sperm sayısını etkilemediği sonucuna varan çalışmalar da bulunmaktadır (299, 304, 307). Sperm sayısında ve motilitesinde gözlenen azalmanın, DEHP ve/veya BPA'nın spermatozoa oluşumunu düzenleyen Sertoli hücreleri veya spermin olgunlaşması ve depolanmasından sorumlu olan epididimis üzerindeki etkilerinin bir sonucu olarak ortaya çıkacağı bildirilmektedir. Tez çalışması kapsamında yapılan histopatolojik incelemelerde, Sertoli hücrelerinde maruziyete bağlı olarak önemli histopatolojik değişiklikler olduğu görülmüştür. Tüm maruziyet gruplarında gözlenen sperm sayısındaki azalma ve özellikle kombine maruziyet grubunda gözlenen belirgin motilite azalmasının DEHP ve/veya BPA'nın yukarıda belirtilen etkilerine bağlı olarak gözlemlendiği düşünülmektedir.

5.6. Sperm Morfolojisi

Çalışma gruplarına ait incelenen sperm morfolojisinde gruplar arası gözlenen değişiklikler Tablo 5.1'de özetlenmiştir. BPA, DEHP, BPA+DEHP uygulanan gruplarda anormal sperm yüzdesinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu belirlenmiş olup sırasıyla % 39, %28 ve %58 olarak saptanmıştır. BPA+DEHP'e birlikte maruz kalan grupta gözlenen anormal sperm morfolojisi gerek kontrole gerekse tek başına uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak önemli

düzeyde yüksektir ($p<0,05$). Baş ve kuyruk anomalileri ayrı ayrı değerlendirildiğinde de benzer bir tablo ile karşılaşmıştır.

Tablo 5.2. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi.

	Normal Sperm Sayısı	Anormal Sperm Sayısı
Kontrol-BPA	↓	↑
Kontrol-DEHP	↓	↑
Kontrol-BPA+DEHP	↓	↑
BPA-BPA+DEHP	↓	↑
DEHP-BPA+DEHP	↓	↑

↑ İstatistiksel açıdan anlamlı artış ($p<0,05$) ↓ İstatistiksel açıdan anlamlı azalma ($p<0,05$) olduğunu ifade etmektedir

Maternal DEHP maruziyetinin erkek yavrularda erişkinlik döneminde anormal sperm sayısında artışa ve semen kalitesinde azalmaya neden olduğu çalışmalar bulunmaktadır (322, 325). Neonatal dönemde DEHP'e hipodermik enjeksiyonla maruz kalan erkek farelerde anormal sperm sayısında kontrole kıyasla artış olduğu görülmüştür (345). Erişkin erkek sıçanlar oral yoldan DEHP uygulandığı diğer bir çalışmada da baş ve kuyruk anomalisi olan sperm sayısında kontrole kıyasla önemli düzeyde artış olduğu görülmüştür (346). Erişkin SD sıçanlarda BPA uygulamasının 100 ve 200mg/kg/gün dozlarında teratospermi sayısında artışa neden olmuştur, ancak bu artış 50mg/kg/gün görülmemiştir (347). Erişkin erkek sıçanlara BPA uygulandığı diğer bir çalışmada da anormal sperm sayısında artış olduğu gösterilmiştir (348). Yaşamlarının erken döneminde oral yoldan BPA uygulanan erkek sıçanların sperm morfolojileri incelendiğinde BPA maruziyetine bağlı olarak anormal sperm sayısında artış olduğu görülmüştür (349).

Yapılan bir insan çalışmasında erişkin erkeklerin idrar ftalat düzeyleri ile morfolojik açıdan normal sperm sayısı arasında ters ilişki olduğu görülmüştür (350). Erişkin erkeklerde BPA ve ftalat maruziyetinin sperm morfolojisine etkisinin incelendiği diğer bazı çalışmalarda maruziyetin sperm morfolojisini etkilemediği sonucuna varılmıştır (351, 352).

Tez çalışması kapsamında, özellikle DEHP+BPA grubunda kuyruk anomalileri daha fazla olmak üzere anormal sperm morfolojisinin çok daha belirgin olarak gözleendiği saptanmıştır. EDC'lere özellikle aynı anda maruziyet durumunda gerek sperm sayısı, sperm motilitesi gerekse sperm morfolojisinde gözlenen istenmeyen durumlar, fertilite olasılığının daha fazla olacağını düşündürür niteliktedir.

5.7. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Tez kapsamında prenatal BPA ve/veya DEHP maruziyetine bağlı olarak gözlenen olası üreme sistemi toksisitesinde oksidatif stresin mekanizmalardan biri olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla testiküler dokuda incelemeler yapılmıştır. Bu doğrultuda elde edilen bulgular özellikle DEHP +BPA grubunda oksidatif stres varlığına işaret eder niteliktedir. Tek başına BPA ve DEHP uygulanan gruplarda, testis total GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmazken, BPA+DEHP grubundaki total GSH düzeylerinin gerek kontrol gerekse diğer gruplara oranla önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur ($p<0,05$). Lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak ölçümü yapılan testis MDA düzeyleri BPA grubunda kontrole kıyasla anlamlı ölçüde değişmezken, DEHP ve BPA+DEHP gruplarında istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirtilmiştir ($p<0,05$). Protein oksidasyonunun göstergesi olarak değerlendirilen testis karbonil düzeyleri ile oksidatif DNA baz hasarının göstergesi olarak ölçümü yapılan testis 8-OHdG düzeylerinin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişmediği saptanmıştır ($p>0,05$).

Bu sonuçlar maruziyete bağlı olarak glutatyon düzeylerinde azalma olduğunu ve lipit peroksidasyonu ile hücre bütünlüğünün bozulabileceğini göstermektedir. Yapılan incelemelerde maruziyetin DNA baz hasarına ve protein oksidasyonuna neden olmadığı gözlenmiştir. Ancak, maruziyetten çok sonra yapılan incelemelerde bu bozuklukların saptanmaması, özellikle DEHP için daha önce de vurgulanmış olan geri dönüşlü etkisi nedeniyle olabileceğini de düşündürmektedir. Aradan geçen bu sürede vücuttaki onarım mekanizmalarının oksidatif stresin ters etkilerini ortadan kaldırmış olabileceği düşünülmektedir.

Prenatal DEHP ve/veya BPA maruziyetinin oksidatif stres üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu doğrultuda yapılan bire

çalışmada, prepubertal sıçanlara (22. gün-33. gün) gavaj yolu ile genistein (50 mg/kg/gün), DEHP (50 mg/kg/gün, 150 mg/kg/gün, 450 mg/kg/gün) ve iki bileşiğin aynı dozlarda karışımlar halinde uygulanmış; erişkinlik döneminde (90. gün) çeşitli incelemeler yapılmış ve 50 mg/kg/gün DEHP uygulanan grupta anogenital açıklığın kontrol grubuna göre azaldığı ve DEHP maruziyetine bağlı olarak görülen testiküler oksidatif stresin oluştuğu (SOD, CAT, GSH, GPx, MDA) ve genistein uygulaması ile bu durumun iyileştirilebileceği görülmüştür ($p<0,05$) (328). Çalışmanın sonuçları DEHP maruziyeti yönünden tez çalışmasını destekler niteliktedir.

Nanjappa ve ark. (2014)'nın Long Evans türü sıçanlarla yaptıkları çalışmalarında, gebeliğin 12. gününden başlayarak laktasyonun sonuna kadar gavajla 2,5 ve 25 µg/kg/gün BPA uyguladıkları gebelerin erkek yavrularını farklı olarak 70-98. günler arası yüksek yağ içerikli (YYD) ya da düşük yağ içerikli (DYD) diyet ile beslenmişlerdir. Yapılan incelemelerde testis ağırlıklarında, serum estradiol düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Serum testosteron düzeylerinin DYD ile beslenen sıçanlarda değişikliğe neden olmadığı gözlenirken, YYD ile beslenen yavrularda prenatal BPA maruziyetinin testosteron düzeyini arttırdığı görülmüştür. Leydig hücre testosteron sekresyonunun ise diyetten bağımsız olarak BPA maruziyeti ile azaldığı saptanmıştır. Bu çalışmada, oksidatif stres parametreleri de değerlendirilmiş, serum TBARs ve GSH düzeylerinde YYD ile beslenen yavrularda, Leydig hücre ROS üretiminde beslenmeden bağımsız olarak 25 µg/kg/gün BPA uygulamasına bağlı artış olduğu görülmüştür. Leydig hücre SOD, CAT, GPx ve GSH düzeylerinde 25 µg/kg/gün BPA maruziyetine bağlı olarak artış olduğu gözlenmiştir (308). Kabuto ve ark. (2004) tarafından yapılan bir diğer çalışmada da embriyonik/fetal dönemde BPA maruziyetinin oluşturabileceği oksidatif hasar incelenmiştir. Dişi gebe fareler gebelik ve laktasyon dönemi boyunca 5 ve 10 µg/ml BPA içeren içme suyu ile BPA'ya maruz bırakılmış ve doğan yavrular 4. haftanın sonunda dekapite edilerek incelemeler yapılmıştır. Sonuçlar embriyonik ve fetal dönemde BPA maruziyetinin yavru dokularında oksidatif stres ve peroksidasyona neden olabileceğini kanıtlar niteliktedir. Yavru vücut ağırlıklarında değişme gözlenmezken, testis ağırlıklarında maruziyete bağlı anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (214). Bu bulgular da prenatal BPA maruziyeti yönünden tez

çalışmasını destekler nitelik taşımaktadır. Kombine EDC maruziyetinin etkilerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Prenatal dönem EDC maruziyeti ile oksidatif stresi ilişkilendiren insan çalışmaları da bulunmaktadır. Bu çalışmalar, tez çalışması kapsamından farklı olarak sadece gebelerdeki durumu değerlendirmekle birlikte, EDC maruziyeti ve oksidatif stres ilişkisi yönünden destekler özelliğindedir. Porto Riko (2014)'da yapılan çalışmada gebelerden 1., 2. ve 3. trimesterde idrar ve kan örnekleri alınmış (n=139) ve ftalat maruziyetinin inflamasyon ve oksidatif stres ile ilişkisi saptanmaya çalışılmıştır. İnflamasyon parametreleri (CRP, IL-1B, IL-6, IL-10, TNFa) ile idrar ftalat metabolit düzeylerinde sadece IL-10-MECP ve IL-6- MCNP arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca idrar oksidatif stres parametrelerinin (8-OHdG, izoprostan) idrar ftalat düzeyleri ile artış gösterdiği saptanmıştır (334). Diğer çalışmada ise 2006-2008 yılları arası Boston (Amerika)'da 482 gebeden, gebeliklerinin farklı haftalarında (10, 18, 26, 35) toplanan idrar ftalat düzeyleri ile idrar oksidatif stres parametre (8-OHdG, ve 8-izoprostan) düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (335).

Yapılan farklı insan çalışmalarında postmenapozal dönemdeki kadınların ve 60 yaş üzeri bireylerin idrar BPA düzeyleri ile MDA düzeyleri arasında ilişki değerlendirilmiş ve pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur (293, 295). Ayrıca postmenapozal dönemdeki kadınlarda BPA maruziyetinin idrar 8-OHdG düzeylerinde artışa neden olabileceği ifade edilmiş ve çocuklarda yapılan benzer bir çalışma da bu sonucu doğrulamıştır (293, 294). Yapılan farklı çalışmalarda gebelerden gebelikleri boyunca farklı dönemlerde alınan idrar ftalat düzeyleri ile idrar oksidatif stres parametreleri (8-OHdG, izoprostan) arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır (334, 335).

5.8. Apoptotik Analizler

Tez çalışması kapsamında yer alan çalışma gruplarına ait incelenen testis dokusu seminifer tübül duvarında daha çok spermatogonyum ve primer spermatositlerin TUNEL ile pozitif işaretlenen hücreler olduğu izlenmiştir. BPA, DEHP ve BPA+DEHP uygulanan gruplarda apoptotik hücre sayısının kontrole göre

istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Ortalama apoptotik hücre sayısı BPA+DEHP grubunda en yüksek olarak saptanmıştır; bu sayı DEHP ve BPA gruplarındaki ortalama apoptotik hücre sayısı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p <0,05$). Çalışma grupları arasında apoptotik hücre sayısı yönünden değişimler Tablo 5.3’de sunulmuştur.

Tablo 5.3. Testis apoptotik hücre sayısı.

	Apoptotik Hücre Sayısı
Kontrol-BPA	↑
Kontrol-DEHP	↑
Kontrol-BPA+DEHP	↑
BPA-BPA+DEHP	↑
DEHP-BPA+DEHP	↑

↑ İstatistiksel açıdan anlamlı artış ($p<0,05$) olduğunu ifade etmektedir.

Maternal BPA maruziyetinin testis dokusunda apoptozu arttırdığını gösteren çalışmalar olduğu gibi etkisiz olduğunu ifade eden çalışmalar da mevcuttur (304, 306). Bir çalışmada maternal BPA, DEHP ve DBP’ye karışım halinde maruziyetin F3 neslinde apoptotik spermatojenik hücre sayısında anlamlı artışa neden olduğu gözlenmiştir (338). Erişkin SD sıçanlarda BPA uygulamasının 100 ve 200mg/kg/gün dozlarında testis dokusunda apoptotik hücre sayısında artışa neden olduğu, 50mg/kg/gün dozunda ise kontrole kıyasla anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür (347). Diğer bir çalışmada yenidoğan erkek sıçanlara subkütan yoldan (0.01, 0.1 and 5 mg/kg) BPA uygulanmış ve testis dokusu germ hücrelerinde apoptozu arttırdığı görülmüştür (342). BPA maruziyetinin *in vitro* çalışmalarda da düşük dozlarda (50, 70uM) Sertoli hücrelerinde apoptozu tetiklediği belirlenmiştir (353). Genç sıçanlara oral yoldan MEHP uygulandığı bir çalışmada, MEHP maruziyetinin Sertoli hücre germ hücrelerinde apoptozu tetiklediği saptanmıştır (354).

5.9. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelerin Etkilerini Değiştirebilen Etmenlerin Değerlendirilmesi

Bu tez çalışması maternal BPA ve DEHP'e tekli ve bir arada maruziyetin erkek üreme sistemi üzerine etkilerinin kapsamlı olarak incelendiği ilk çalışma niteliğindedir. Bu doğrultuda saptanabilen tek çalışma Xi ve ark. tarafından yapılmış olup, bu çalışmada kombine halde DEHP+BPA'nın farklı dozları verilmiştir, ancak kimyasal maddelere tekli maruziyet ile karşılaştırılmalı bir değerlendirme yapılmamıştır (337). Değerlendirilen parametrelerin de anogenital açıklık, hormon düzeyleri ve enzim ekspresyonları ile sınırlı olduğu görülmektedir.

Sunulan çalışma, günümüzde aynı anda birden fazla kimyasal maddeye maruziyetin söz konusu olması ve bu nedenle karışım halinde EDC'lere maruziyetin etkilerinin incelenmesinin gerekli olduğu fikri ile planlamıştır.

Yapılan çalışmalarda maruziyet döneminin ortaya çıkacak etkiler açısından çok farklı sonuçlar doğurabileceği üzerinde durulmuştur. İnsan çalışmalarında gebeliğin farklı dönemlerinde yüksek bulunan gebe kan/idrar, kordon kanı fetal ve BPA düzeylerinin doğan erkek çocuklarında çok farklı sonuçlar doğurduğu görülmüştür. Özellikle ilk trimester maruziyetinin daha ciddi ters etkilere neden olabileceği düşünülmektedir. Bu etkilerin çocukluğun ya da ergenliğin farklı dönemlerinde maruziyete bağlı olarak değişebileceği de bilinmektedir (315, 316, 329, 332, 333, 355). Prenatal ve postnatal maruziyetin etkilerinin kıyaslandığı CD-1 farelerle yapılan bir çalışmada da prenatal maruziyetin daha ciddi sonuçlara neden olduğu görülmüştür (302).

Prenatal ve erken postnatal dönemin hem gelişim açısından kritik bir dönem olması, hem de vücudun savunma sistemlerinin tam gelişmemiş olması nedeniyle çok hassas dönemler olduğu kabul edilmektedir. Bu kimyasal maddelere bu dönemde maternal maruziyetin çok ciddi sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir. Maternal DEHP ve BPA maruziyetinde yavrulara bu kimyasal maddelerin veya metabolitlerinin geçtiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (59-62). Maternal DEHP ve BPA'ya karışım halinde veya tekli maruziyetin erişkinlik dönemine kadar kalıcı olabileceğini ifade eden çalışmalar olduğu gibi (11, 13, 20, 59) maruziyetin etkilerinin

pubertal dönemde görülüp erişkinlik dönemine kadar geçebileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (32). Bu tez çalışması planlanırken erken dönemde maternal maruziyetin, erişkinlik döneminde neden olabileceği ters etkilerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Literatürde bu alanda yapılmış çalışmaların azlığı da göz önünde bulundurulmuştur.

Ortaya çıkabilecek toksikolojik etkiler açısından çok önemli olan diğer bir faktör ise doz kavramıdır. Özellikle EDC'ler çok farklı dozların çok çeşitli etkilere neden olabileceği bilinmektedir. Bu kimyasal maddeler için geleneksel doz cevap eğrilerinin olmadığı bilinmektedir. Çalışmamızda uygulanan dozlar bu kimyasal maddelerin erkek üreme sistemi üzerine ters etki gösterdikleri en düşük doz düzeyleri (LOAEL) olarak belirlenmiştir (2, 164, 166). Literatürde yer alan başka bir çalışmada da araştırmacılar seçilen dozların insanların maruz kalabileceği dozlar olarak seçilmediğini ifade etmişlerdir. Amacın risk değerlendirmesi değil, bu dozlarda karışımlar halinde maruziyetin etkilerinin anlaşılması olduğu belirtilmiştir (338).

Maruziyet yolu da ortaya çıkabilecek toksikolojik sonuçlar açısından oldukça önemli bir parametredir. İntraperitonel ya da subkütan yolla BPA maruziyetinin etkilerinin incelendiği çalışmalarda araştırmacılar, uygulanan dozun oral yolla uygulamaya göre çok daha fazla etki gösterebileceğini ifade etmiştir. Oral yolla uygulamada metabolizmanın etkisini vurgulamışlardır (2, 8). Ancak oral yolla uygulama insan maruziyetini taklit etmesi açısından daha uygundur.

Ayrıca, yapılan hayvan çalışmalarında kullanılan hayvan türünün toksikolojik sonuçları önemli oranda değiştirebileceği de görülmüştür (336, 356-359).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında Sprague Dawley türü gebe sıçanlarda prenatal ve erken postnatal BPA ve/veya DEHP maruziyetinin erişkinlik dönemi erkek üreme sistemi üzerine ters etkileri ve bu etkilerin oksidatif stres ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir:

1. Prenatal ve erken postnatal dönemde DEHP ve/veya BPA maruziyetinin yetişkinlik döneminde testis ve epididimis ağırlıkları yönünden kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı; ancak rölatif epididimis ağırlıklarının DEHP ve BPA+DEHP gruplarında kontrol grubuna oranla önemli düzeyde arttığı saptanmıştır (sırasıyla %18, %32, $p<0,05$).
2. Histopatolojik incelemeler yapıldığında, BPA uygulanan grupta bazı seminifer tübüllerde epitelin bütünlüğünün bozulduğu; primer spermatositlerin bazı bölgelerde bazaldan ayrıldığı gözlenmiştir. Normal yapıda seminifer tübüllerin bazalinde Sertoli hücrelerine hemen komşu olarak bulunan spermatogonyumlar tübüllerin bazı alanlarında gözlenmemiştir. DEHP grubunda seminifer tübüllerin bazalinde Sertoli hücreleri ile spermatogonyumlar arasında hücreler arası bağlantıların bozulduğunu gösteren belirgin ayrılmalar izlenmiş; seminifer tübül duvarında farklılaşmakta olan spermatogenetik seriye ait hücreler arasında da ayrılmalar gözlenmiştir. Bazı seminifer tübüllerin lümeninde spermiyuma farklılaşmanın erken evresine ait yuvarlak şekilli spermatogenetik hücrelerin lümene dökülerek hücre debrisisi oluşturduğu görülmüştür. BPA ve DEHP beraber uygulanan grupta, seminifer tübüller arasında interstisyel dokuda Leydig hücrelerinin normal histolojik yapısını koruyarak varlığını devam ettirdiği izlenmiştir. Bu grupta etkilenen seminifer tübüllerde spermatogenetik seriye ait hücreler arasında geniş boşluklar izlenmiştir. Seminifer tübül epitelinde farklılaşmanın ileri evresine ait hücrelerin kaybı ile epitel kalınlığının azaldığı gözlenmiştir. Spermatogenez ve spermiyogenezin bozulduğu saptanmıştır.

3. Plazma FSH, LH, Testosteron ve SHBG düzeylerinde gruplar arası anlamlı bir değişim olmadığı; estradiol düzeylerinin DEHP ve BPA+DEHP grubunda önemli ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). DEHP ve BPA+DEHP gruplarında plazma DHEAS düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı (sırasıyla %37, %40; $p<0,05$) belirlenmiştir.
4. Tüm çalışma gruplarına ait sperm sayılarında, kontrol grubuna oranla belirgin azalmalar saptanmıştır; DEHP+BPA grubunda en yüksek olmak üzere tüm çalışma gruplarında sperm motilitesinin kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Sperm morfolojisi incelemelerinde BPA, DEHP, BPA+DEHP uygulanan gruplarda anormal sperm yüzdesinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). BPA+DEHP'e birlikte maruz kalan grupta gözlenen anormal sperm morfolojisi gerek kontrole gerekse tek başına uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksektir ($p<0,05$). Bu bulgular, EDC'lere maruziyetin Sertoli hücresi üzerindeki etkisine işaret etmekte ve maruziyete bağlı olarak fertilite olasılığının daha fazla olacağını göstermektedir.
5. Çalışma gruplarında ait testis dokularında oksidatif stres parametreleri değerlendirildiğinde, total GSH düzeylerinin BPA+DEHP gruplarında gerek kontrol (%26) gerekse diğer gruplara oranla (sırasıyla %31, %27) önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur ($p<0,05$). Lipit peroksidasyonun göstergesi olarak ölçülen MDA düzeyleri BPA grubunda kontrole kıyasla anlamlı ölçüde değişmezken, DEHP ve BPA+DEHP gruplarında istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir (sırasıyla %28, %60; $p<0,05$). Bu bulgular EDC'lere özellikle prenatal ve erken postnatal kombine maruziyette oksidatif stres varlığına işaret etmektedir.
6. Protein karbonil düzeyleri ve 8-OHdG düzeylerinde çalışma gruplarında kontrole kıyasla anlamlı bir değişim olmadığı görülmüştür. Oksidatif protein hasarı ve oksidatif DNA baz hasarının oluşmadığını göstermektedir.

7. Testis dokusu apoptotik hücre sayısının BPA, DEHP ve BPA+DEHP uygulanan gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Ortalama apoptotik hücre sayısı BPA+DEHP grubunda en yüksek olarak saptanmıştır; bu sayı DEHP ve BPA gruplarındaki ortalama apoptotik hücre sayısı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Tüm bu sonuçlar yaşamın erken dönemlerinde EDC'lere maruziyetin, yaşamın ileriki dönemlerinde erkek üreme sisteminde ters etkilere neden olabileceğini göstermektedir. Bu ters etkiler hormonal dengenin bozulması, histopatolojik değişimlerin görülmesi, testis dokusu apoptozu, sperm parametrelerinde bozulmalar ve testis dokusu oksidan/antoksidan dengenin bozulması olarak saptanmıştır. Sunulan tez çalışması, özellikle en yaygın kullanıma sahip EDC'ler olan DEHP ve BPA'ya aynı anda prenatal ve erken postnatal dönemde maruziyetin yetişkinlik döneminde erkeklerde neden olabileceği üreme sistemi ile ilgili istenmeyen etkilerin bu kapsamda ve karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği ilk çalışma niteliğindedir. Bu etkilerin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması için gen ekspresyonlarının incelenmesi gibi daha ileri çalışmaların yapılması faydalı olacaktır. Ayrıca türlerarası değişiklikler bu kimyasal maddelerin insanlar üzerindeki etkilerinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle insanlar üzerinde maruziyetin ve ters etkilerin değerlendirildiği çalışmaların artmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Environmental Protection Agency, What is Endocrine Disruption? [Internet]. [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>.
2. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009;30(4):293-342.
3. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;127(3-5):204-15.
4. DiVall SA. The influence of endocrine disruptors on growth and development of children. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2013;20(1):50-5.
5. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998;139(10):4252-63.
6. Dickerson SM, Gore AC. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007;8(2):143-59.
7. David RM. Exposure to phthalate esters. *Environ Health Perspect*. 2000;108(10):A440.
8. Yaghjian L, Ghita GL, Dumont-Driscoll M, Yost RA, Chang SH. Maternal exposure to di-2-ethylhexylphthalate and adverse delivery outcomes: A systematic review. *Reprod Toxicol*. 2016;65:76-86.
9. Tsochatzis ED, Tzimou-Tsitouridou R, Gika HG. Analytical Methodologies for the Assessment of Phthalate Exposure in Humans. *Crit Rev Anal Chem*. 2017;47(4):279-97.
10. Koch HM, Calafat AM. Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364(1526):2063-78.
11. Pereira LC, de Souza AO, Franco Bernardes MF, Pazin M, Tasso MJ, Pereira PH, et al. A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015;22(18):13800-23.
12. Careghini A, Mastorgio AF, Saponaro S, Sezenna E. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015;22(8):5711-41.
13. Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ. Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*. 2010;126(4):760-8.
14. Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;127(1-2):27-34.
15. Rathee M, Malik P, Singh J. Bisphenol A in dental sealants and its estrogen like effect. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16(3):339-42.

16. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*. 2007;24(2):139-77.
17. Mikolajewska K, Stragierowicz J, Gromadzinska J. Bisphenol A - Application, sources of exposure and potential risks in infants, children and pregnant women. *Int J Occup Med Environ Health*. 2015;28(2):209-41.
18. Ganong WF. Ganong tıbbi fizyoloji. 20. baskı. Türk Fizyolojik Bilimler D.: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.
19. Hall JE, and Arthur C. Guyton. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 10th ed. Philadelphia: PA:Saunders Elsevier; 2011.
20. Johnson LR, Byrne JH. *Essential Medical Physiology*. 3rd ed. Elsevier Academic Press; 2003.
21. Kadioğlu A., Çayan S., Semerci B., Orhan İ., Aşçı R., Yaman Ö. ve ark. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi*. İstanbul: Türk Androloji Derneği; 2004.
22. White B, Porterfield S. *Endocrine and Reproductive Physiology E-Book: Mosby Physiology Monograph Series*: Elsevier Health Sciences; 2012.
23. Yener Aytekin SS. Erkek Üreme Sistemi Histolojisi. In: Ateş Kadioğlu SÇ, Bülent Semerci, İrfan Orhan, Ramazan Aşçı, Önder Yaman, Mustafa F. Usta, Muammer Kendirci, editor. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi*. İstanbul: Türk Androloji Derneği; 2004. p. 35-60.
24. Cohen BJ, Hull KL, Taylor JJ. *Memmler's The Human Body in Health and Disease*, 12th ed. Prepu Package: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
25. De Kretser DM. *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. USA: Academic Press; 1993.
26. Steinberger A, Steinberger E. The Sertoli Cells. Johnson, A.D. *Advances in Physiology, Biochemistry, and Function*. USA: Academic Press; 1977.
27. DeGroot LJ, Jameson JL. *Endocrinology*. 6th ed. USA: Elsevier Saunders; 2006.
28. Jones RC. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int J Androl*. 1999;22(2):57-67.
29. Niederberger C. *An Introduction to Male Reproductive Medicine*. USA: Cambridge University Press; 2011.
30. Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, et al. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;29:66-75.
31. O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Abel MH. Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2010;139(1):177-84.
32. Lamb DJ. Semen analysis in 21st century medicine: the need for sperm function testing. *Asian J Androl*. 2010;12(1):64-70.
33. Menkveld R, Holleboom CA, Rhemrev JP. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl*. 2011;13(1):59-68.

34. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. [Internet]. 2010 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789_eng.pdf
35. Lee RK, Hou JW, Ho HY, Hwu YM, Lin MH, Tsai YC, et al. Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination. *Int J Androl*. 2002;25(5):277-80.
36. Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl*. 2010;12(1):47-58.
37. Nieschlag, Eberhard, Behre, Hermann M., Nieschlag, Susan. *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd ed. Berlin: Springer; 2010.
38. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol*. 2005;43(11):963-74.
39. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008;14(3):243-58.
40. Weinbauer GF, Nieschlag E. Hormonal Control of Spermatogenesis. 1993:99-142.
41. O'Donnell L, Stanton P, de Kretser DM. Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
42. Millar RP. GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14(1):35-43.
43. Tanriverdi F, Gonzalez-Martinez D, Silveira LF, Hu Y, Maccoll GS, Travers P, et al. Expression of gonadotropin-releasing hormone type-I (GnRH-I) and type-II (GnRH-II) in human peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) and regulation of B-lymphoblastoid cell proliferation by GnRH-I and GnRH-II. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2004;112(10):587-94.
44. Heindel JJ, Treinen KA. Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicol Pathol*. 1989;17(2):411-45.
45. CGA glycoprotein hormones, alpha polypeptide [Homo sapiens (human)] [Internet]. 2017 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=1081>
46. Follicle-stimulating hormone (FSH) blood test [Internet]. 2015 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://medlineplus.gov/ency/article/003710.htm>
47. de Kretser DM, Buzzard JJ, Okuma Y, O'Connor AE, Hayashi T, Lin SY, et al. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;225(1-2):57-64.
48. Jeelani R, Bluth MH, Abu-Soud HM. *Toxicology in Reproductive Endocrinology. Clinics in Laboratory Medicine*. 2016;36(4):709-20.
49. Davies A, Blakeley AGH, Kidd C, McGeown JG. *Human Physiology*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2001.

50. LHB luteinizing hormone beta polypeptide [Homo sapiens (human)] [İnternet]. 2017 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3972>
51. LHCGR luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor [Homo sapiens (human)] [İnternet]. 2017 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3973>
52. Luteinizing Hormone (LH) Blood Test [İnternet]. 2017 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://www.healthline.com/health/lh-blood-test>
53. Bs D. Androgen Physiology, Pharmacology and Abuse. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
54. Testosterone Levels by Age [İnternet]. 2017 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://www.healthline.com/health/low-testosterone/testosterone-levels-by-age#modal-close>
55. Felig P, Frohman LA. Endocrinology & Metabolism: McGraw-Hill; 2001.
56. Brook CG. Mechanism of puberty. Horm Res. 1999;51 Suppl 3:52-4.
57. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. Endocr Rev. 2002;23(3):279-302.
58. Sinisi AA, Pasquali D, Notaro A, Bellastella A. Sexual differentiation. J Endocrinol Invest. 2003;26(3 Suppl):23-8.
59. Scane AC, Francis RM. Risk factors for osteoporosis in men. Clin Endocrinol (Oxf). 1993;38(1):15-6.
60. Bain J. The many faces of testosterone. Clinical Interventions in Aging. 2007;2(4):567-76.
61. Shahani S, Braga-Basaria M, Maggio M, Basaria S. Androgens and erythropoiesis: past and present. J Endocrinol Invest. 2009;32(8):704-16.
62. Hiort O, Holterhus PM. The molecular basis of male sexual differentiation. Eur J Endocrinol. 2000;142(2):101-10.
63. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. Pharmacol Rev. 2006;58(4):773-81.
64. Findlay JK, Liew SH, Simpson ER, Korach KS. Estrogen signaling in the regulation of female reproductive functions. Handb Exp Pharmacol. 2010(198):29-35.
65. Normal, Low and High Estrogen Levels [İnternet]. 2017 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <http://www.newhealthguide.org/Normal-Estrogen-Levels.html>.
66. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. Mol Aspects Med. 2006;27(4):299-402.
67. Cooke PS, Nanjappa MK, Ko C, Prins GS, Hess RA. Estrogens in Male Physiology. Physiol Rev. 2017;97(3):995-1043.

68. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340(23):1801-11.
69. Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*. 1996;104(Suppl 4):715-40.
70. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors [Internet]. [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/
71. Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC, et al. Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2006;143(3):303-15.
72. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect*. 2008;116(1):39-44.
73. Stahlhut RW, Welshons WV, Swan SH. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environ Health Perspect*. 2009;117(5):784-9.
74. Tabb MM, Blumberg B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol Endocrinol*. 2006;20(3):475-82.
75. Moral R, Wang R, Russo IH, Lamartiniere CA, Pereira J, Russo J. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *J Endocrinol*. 2008;196(1):101-12.
76. Anway MD, Skinner MK. Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. *Reproductive BioMedicine Online*. 2008;16(1):23-5.
77. Toppari J. Environmental Endocrine Disrupters. *Sex Dev* 2008;2(4-5):260-7.
78. Diamanti-Kandarakis E, Palioura E, Kandarakis SA, Koutsilieris M. The impact of endocrine disruptors on endocrine targets. *Horm Metab Res*. 2010;42(8):543-52.
79. Wayne A, Trudeau VL. Neuroendocrine disruption: more than hormones are upset. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2011;14(5-7):270-91.
80. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev*. 2015;36(6):E1-E150.
81. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology*. 2006;147(6 Suppl):S11-7.
82. Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Phillips TM, Jefferson WN. Developmental Exposure to Endocrine Disruptors and the Obesity Epidemic. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY). 2007;23(3):290-6.
83. Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ*. 1990;301(6761):1111-.

84. Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol*. 2003;18(8):733-6.
85. Barker DJ, Clark PM. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod*. 1997;2(2):105-12.
86. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(32):13056-61.
87. Heindelb RNJJ. *Developmental Origins of Health and Disease: The Importance of Environmental Exposures*. Basel, Karger, . 2009:42–51.
88. Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, Fushiki S. Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376(3):563-7.
89. Novikova SI, He F, Bai J, Cutrufello NJ, Lidow MS, Undieh AS. Maternal cocaine administration in mice alters DNA methylation and gene expression in hippocampal neurons of neonatal and prepubertal offspring. *PLoS One*. 2008;3(4):e1919.
90. Perera F, Tang W-y, Herbstman J, Tang D, Levin L, Miller R, et al. Relation of DNA Methylation of 5'-CpG Island of ACSL3 to Transplacental Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Childhood Asthma. *PLoS ONE*. 2009;4(2):e4488.
91. Lewis AJ, Austin E, Knapp R, Vaiano T, Galbally M. Perinatal Maternal Mental Health, Fetal Programming and Child Development. *Healthcare (Basel)*. 2015;3(4):1212-27.
92. Avitsur R, Levy S, Goren N, Grinshpahet R. Early adversity, immunity and infectious disease. *Stress*. 2015;18(3):289-96.
93. Melnick R, Lucier G, Wolfe M, Hall R, Stancel G, Prins G, et al. Summary of the National Toxicology Program's Report of the Endocrine Disruptors Low-Dose Peer Review. *Environ Health Perspect*. 2002;110(4):427-31.
94. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 2006;147(6 Suppl):S56-69.
95. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*. 2012;33(3):378-455.
96. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environmental Health*. 2015;14:13.
97. Conolly RB, Lutz WK. Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicol Sci*. 2004;77(1):151-7.
98. Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. Large Effects from Small Exposures. I. Mechanisms for Endocrine-Disrupting Chemicals with Estrogenic Activity. *Environ Health Perspect*. 2003;111(8):994-1006.

99. Sohoni P, Sumpter JP. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol*. 1998;158(3):327-39.
100. Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(11):5185-90.
101. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1269-304.
102. Modrall JG, Nanamori M, Sadoshima J, Barnhart DC, Stanley JC, Neubig RR. ANG II type 1 receptor downregulation does not require receptor endocytosis or G protein coupling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281(3):C801-9.
103. Kohn MC, Melnick RL. Biochemical origins of the non-monotonic receptor-mediated dose-response. *J Mol Endocrinol*. 2002;29(1):113-23.
104. Lesser B, Bruchovsky N. Effect of duration of the period after castration on the response of the rat ventral prostate to androgens (Short Communication). *Biochem J*. 1974;142(2):429-31.
105. Groten JP, Feron VJ, Suhnel J. Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(6):316-22.
106. Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures disruptors [Internet]. [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recorddisplay.cfm?deid=20533>
107. Silins I, Hogberg J. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int J Environ Res Public Health*. 2011;8(3):629-47.
108. Meek ME, Boobis AR, Crofton KM, Heinemeyer G, Raaij MV, Vickers C. Risk assessment of combined exposure to multiple chemicals: A WHO/IPCS framework. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011.
109. Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to [Internet]. 2008 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/705>
110. Cassee FR, Groten JP, van Bladeren PJ, Feron VJ. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Crit Rev Toxicol*. 1998;28(1):73-101.
111. Assessment of Joint Toxic Action of Chemical Mixtures-May 2004 [Internet]. 2004 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ipga.html>.
112. Lambert JC, Lipscomb JC. Mode of action as a determining factor in additivity models for chemical mixture risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2007;49(3):183-94.
113. Mumtaz MM, Tully DB, El-Masri HA, De Rosa CT. Gene induction studies and toxicity of chemical mixtures. *Environ Health Perspect* 2002;110(Suppl 6):947-56.
114. Viau C. Biological monitoring of exposure to mixtures. *Toxicol Lett*. 2002;134(1-3):9-16.

115. Sexton K, Hattis D. Assessing Cumulative Health Risks from Exposure to Environmental Mixtures—Three Fundamental Questions. *Environ Health Perspect* 2007;115(5):825-32.
116. Spurgeon DJ, Jones OAH, Dorne J-LCM, Svendsen C, Swain S, Stuerzenbaum SR. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Science of the Total Environment*. 2010;408(18):3725-34.
117. Whitelaw NC, Whitelaw E. Transgenerational epigenetic inheritance in health and disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18(3):273-9.
118. Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(4):214-22.
119. Skinner MK. Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational inheritance. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2011;93(1):51-5.
120. Christensen BC, Marsit CJ. Epigenomics in environmental health. *Front Genet*. 2011;2:84.
121. Ho SM, Johnson A, Tarapore P, Janakiram V, Zhang X, Leung YK. Environmental epigenetics and its implication on disease risk and health outcomes. *Ilar j*. 2012;53(3-4):289-305.
122. Newbold RR, Hanson RB, Jefferson WN, Bullock BC, Haseman J, McLachlan JA. Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis*. 2000;21(7):1355-63.
123. Newbold RR. Prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES). *Fertil Steril*. 2008;89(2 Suppl):e55-6.
124. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet*. 2007;8(4):253-62.
125. Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nat Rev Genet*. 2012;13(2):135-45.
126. Petronis A. Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature*. 2010;465(7299):721-7.
127. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet*. 2012;13(2):97-109.
128. Rissman EF, Adli M. Minireview: transgenerational epigenetic inheritance: focus on endocrine disrupting compounds. *Endocrinology*. 2014;155(8):2770-80.
129. Gore AC, Martien KM, Gagnidze K, Pfaff D. Implications of prenatal steroid perturbations for neurodevelopment, behavior, and autism. *Endocr Rev*. 2014;35(6):961-91.
130. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009;462(7271):315-22.

131. Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, et al. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*. 2013;341(6146):1237905.
132. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 2007;447(7143):425-32.
133. Bogdanovic O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 2009;118(5):549-65.
134. Bromer JG, Zhou Y, Taylor MB, Doherty L, Taylor HS. Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *Faseb j*. 2010;24(7):2273-80.
135. Wolstenholme JT, Goldsby JA, Rissman EF. Transgenerational Effects of Prenatal Bisphenol A on Social Recognition. *Horm Behav*. 2013;64(5):833-9.
136. Gehring M, Reik W, Henikoff S. DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet*. 2009;25(2):82-90.
137. Cosgrove MS, Boeke JD, Wolberger C. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11(11):1037-43.
138. Miremadi A, Oestergaard MZ, Pharoah PD, Caldas C. Cancer genetics of epigenetic genes. *Hum Mol Genet*. 2007;16 Spec No 1:R28-49.
139. Margueron R, Reinberg D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet*. 2010;11(4):285-96.
140. Clapier CR, Cairns BR. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:273-304.
141. Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell*. 2010;19(5):698-711.
142. Song C, Kanthasamy A, Anantharam V, Sun F, Kanthasamy AG. Environmental Neurotoxic Pesticide Increases Histone Acetylation to Promote Apoptosis in Dopaminergic Neuronal Cells: Relevance to Epigenetic Mechanisms of Neurodegeneration. *Mol Pharmacol*. 2010;77(4):621-32.
143. Saetrom P, Snove O, Jr., Rossi JJ. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*. 2007;61(5 Pt 2):17R-23R.
144. Costa FF. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene*. 2008;410(1):9-17.
145. Avissar-Whiting M, Veiga K, Uhl K, Maccani M, Gagne L, Moen E, et al. Bisphenol A Exposure Leads to Specific MicroRNA Alterations in Placental Cells. *Reprod Toxicol*. 2010;29(4):401-6.
146. Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *Febs j*. 2011;278(10):1598-609.
147. Hochberg Z, Feil R, Constancia M, Fraga M, Junien C, Carel JC, et al. Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocr Rev*. 2011;32(2):159-224.

148. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol*. 2010;220(2):126-39.
149. Tilghman SL, Bratton MR, Segar HC, Martin EC, Rhodes LV, Li M, et al. Endocrine disruptor regulation of microRNA expression in breast carcinoma cells. *PLoS One*. 2012;7(3):e32754.
150. Crews D, McLachlan JA. Epigenetics, evolution, endocrine disruption, health, and disease. *Endocrinology*. 2006;147(6 Suppl):S4-10.
151. Walker DM, Gore AC. Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(4):197-207.
152. Xin F, Susiarjo M, Bartolomei MS. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? *Semin Cell Dev Biol*. 2015;43:66-75.
153. Hauser R, Calafat AM. Phthalates and human health. *Occup Environ Med*. 2005;62(11):806-18.
154. Ventrice P, Ventrice D, Russo E, De Sarro G. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;36(1):88-96.
155. North ML, Takaro TK, Diamond ML, Ellis AK. Effects of phthalates on the development and expression of allergic disease and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;112(6):496-502.
156. Administration FaD. Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices? [Internet]. [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/.../UCM080457.pdf>.
157. Hauser R, Duty S, Godfrey-Bailey L, Calafat AM. Medications as a source of human exposure to phthalates. *Environ Health Perspect*. 2004;112(6):751-3.
158. Duty SM, Ackerman RM, Calafat AM, Hauser R. Personal care product use predicts urinary concentrations of some phthalate monoesters. *Environ Health Perspect*. 2005;113(11):1530-5.
159. Teuschler LK. Deciding which chemical mixtures risk assessment methods work best for what mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;223(2):139-47.
160. Yen TH, Lin-Tan DT, Lin JL. Food safety involving ingestion of foods and beverages prepared with phthalate-plasticizer-containing clouding agents. *J Formos Med Assoc*. 2011;110(11):671-84.
161. Koch HM, Preuss R, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl*. 2006;29(1):155-65; discussion 81-5.
162. Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL, Jordan S, Matthews HB. Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ Health Perspect*. 1982;45:19-25.
163. Albro PW, Lavenhar SR. Metabolism of DI(2-Ethylhexyl) Phthalate. *Drug Metab Rev*. 1989;21(1):13-34.

164. Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). Ntp cerhr mon. 2006(18):v, vii-7, II-iii-xiii passim.
165. Zarean M, Keikha M, Poursafa P, Khalighinejad P, Amin M, Kelishadi R. A systematic review on the adverse health effects of di-2-ethylhexyl phthalate. Environ Sci Pollut Res Int. 2016;23(24):24642-93.
166. Toxicological Profile for Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) [Internet]. 2002 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=684&tid=65>
167. Gray LE, Jr., Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, et al. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. Int J Androl. 2006;29(1):96-104; discussion 5-8.
168. Talsness CE, Andrade AJ, Kuriyama SN, Taylor JA, vom Saal FS. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009;364(1526):2079-96.
169. Wei Z, Song L, Wei J, Chen T, Chen J, Lin Y, et al. Maternal exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate alters kidney development through the renin-angiotensin system in offspring. Toxicol Lett. 2012;212(2):212-21.
170. Lyche JL, Gutleb AC, Bergman A, Eriksen GS, Murk AJ, Ropstad E, et al. Reproductive and developmental toxicity of phthalates. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2009;12(4):225-49.
171. Rusyn I, Peters JM, Cunningham ML. Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver. Crit Rev Toxicol. 2006;36(5):459-79.
172. Di(2-Ethylhexyl) Phthalate IARC Monographs [Internet]. 2002 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: [Erişim tarihi 15.09.2017]. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/mono101-006.pdf>.
173. Bulus AD, Asci A, Erkekoglu P, Balci A, Andiran N, Kocer-Gumusel B. The evaluation of possible role of endocrine disruptors in central and peripheral precocious puberty. Toxicol Mech Methods. 2016;26(7):493-500.
174. Legler J, Fletcher T, Govarts E, Porta M, Blumberg B, Heindel JJ, et al. Obesity, diabetes, and associated costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(4):1278-88.
175. Carbone S, Szwarcfarb B, Ponzo O, Reynoso R, Cardoso N, Deguiz L, et al. Impact of gestational and lactational phthalate exposure on hypothalamic content of amino acid neurotransmitters and FSH secretion in peripubertal male rats. Neurotoxicology. 2010;31(6):747-51.
176. Saillenfait AM, Roudot AC, Gallissot F, Sabate JP. Prenatal developmental toxicity studies on di-n-heptyl and di-n-octyl phthalates in Sprague-Dawley rats. Reprod Toxicol. 2011;32(3):268-76.
177. Di(2-Ethylhexyl) Phthalate - International Chemical Safety Cards [Internet]. 2015 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0271.html>

178. Kısıtlamaya Tabi Maddeler Kısıtlama Şartları Ve Kapsamdaki Ürünler [İnternet]. 2015 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2015/01/20150114-14-1.docx
179. Bazı Tüketici Ürünlerinin Tehlikeli Kimyasal Madde İçeriğine Yönelik Piyasa Gözetimi Ve Denetimine İlişkin Tebliğ 2011[İnternet]. 2002 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-9.htm>
180. Fu P, Kawamura K. Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environ Pollut*. 2010;158(10):3138-43.
181. Usman A, Ahmad M. From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Chemosphere*. 2016;158:131-42.
182. Fenichel P, Chevalier N, Brucker-Davis F. Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2013;74(3):211-20.
183. Chevalier N, Fenichel P. Bisphenol A: Targeting metabolic tissues. *Rev Endocr Metab Disord*. 2015;16(4):299-309.
184. Brede C, Fjeldal P, Skjevrak I, Herikstad H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam*. 2003;20(7):684-9.
185. Ye X, Pierik FH, Angerer J, Meltzer HM, Jaddoe VW, Tiemeier H, et al. Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Int J Hyg Environ Health*. 2009;212(5):481-91.
186. Pirard C, Sagot C, Deville M, Dubois N, Charlier C. Urinary levels of bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in a general Belgian population. *Environ Int*. 2012;48:78-83.
187. Koch HM, Kolossa-Gehring M, Schroter-Kermani C, Angerer J, Bruning T. Bisphenol A in 24 h urine and plasma samples of the German Environmental Specimen Bank from 1995 to 2009: a retrospective exposure evaluation. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2012;22(6):610-6.
188. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*. 2002;15(10):1281-7.
189. Volkel W, Bittner N, Dekant W. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*. 2005;33(11):1748-57.
190. Ye X, Wong LY, Bishop AM, Calafat AM. Variability of urinary concentrations of bisphenol A in spot samples, first morning voids, and 24-hour collections. *Environ Health Perspect*. 2011;119(7):983-8.
191. Willhite CC, Ball GL, McLellan CJ. Derivation of a bisphenol A oral reference dose (RfD) and drinking-water equivalent concentration. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2008;11(2):69-146.

192. Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol*. 2001;14(2):149-57.
193. Hanioka N, Naito T, Narimatsu S. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere*. 2008;74(1):33-6.
194. Gramec Skledar D, Troberg J, Lavdas J, Peterlin Masic L, Finel M. Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. *Xenobiotica*. 2015;45(6):511-9.
195. Gramec Skledar D, Peterlin Masic L. Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;47:182-99.
196. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997;138(3):863-70.
197. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*. 2007;24(2):178-98.
198. Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci*. 2003;75(1):40-6.
199. Alonso-Magdalena P, Laribi O, Ropero AB, Fuentes E, Ripoll C, Soria B, et al. Low Doses of Bisphenol A and Diethylstilbestrol Impair Ca(2+) Signals in Pancreatic α -Cells through a Nonclassical Membrane Estrogen Receptor within Intact Islets of Langerhans. *Environ Health Perspect*. 2005;113(8):969-77.
200. Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, Shimohigashi Y. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity. *Toxicol Lett*. 2006;167(2):95-105.
201. Watson CS, Bulayeva NN, Wozniak AL, Alyea RA. Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. *Steroids*. 2007;72(2):124-34.
202. Bonefeld-Jørgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM. Endocrine-Disrupting Potential of Bisphenol A, Bisphenol A Dimethacrylate, 4-n-Nonylphenol, and 4-n-Octylphenol in Vitro: New Data and a Brief Review. *Environ Health Perspect*. 2007;115(Suppl 1):69-76.
203. Okada H, Tokunaga T, Liu X, Takayanagi S, Matsushima A, Shimohigashi Y. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect*. 2008;116(1):32-8.
204. Freitas J, Cano P, Craig-Veit C, Goodson ML, David Furlow J, Murk AJ. Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay. *Toxicol in Vitro*. 2011;25(1):257-66.
205. Chevalier N, Bouskine A, Fenichel P. Bisphenol A promotes testicular seminoma cell proliferation through GPER/GPR30. *Int J Cancer*. 2012;130(1):241-2.

206. Gentilcore D, Porreca I, Rizzo F, Ganbaatar E, Carchia E, Mallardo M, et al. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. *Toxicology*. 2013;304:21-31.
207. Rochester JR. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol*. 2013;42:132-55.
208. Cwiek-Ludwicka K, Ludwicki JK. Endocrine disruptors in food contact materials; is there a health threat? *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2014;65(3):169-77.
209. Muhamad MS, Salim MR, Lau WJ, Yusop Z. A review on bisphenol A occurrences, health effects and treatment process via membrane technology for drinking water. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016;23(12):11549-67.
210. Guida M, Troisi J, Ciccone C, Granozio G, Cosimato C, Sardo ADS, et al. Bisphenol A and congenital developmental defects in humans. *Mutat Res*. 2015;774:33-9.
211. Stein TP, Schluter MD, Steer RA, Guo L, Ming X. Bisphenol A Exposure in Children With Autism Spectrum Disorders. *Autism Res*. 2015;8(3):272-83.
212. Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology*. 2003;185(1):119-27.
213. Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*. 2003;188(2):117-24.
214. Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sci*. 2004;74(24):2931-40.
215. Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Urinary Bisphenol A Concentrations in Relation to Serum Thyroid and Reproductive Hormone Levels in Men from an Infertility Clinic. *Environ Sci Technol*. 2010;44(4):1458-63.
216. Melzer D, Harries L, Cipelli R, Henley W, Money C, McCormack P, et al. Bisphenol A exposure is associated with in vivo estrogenic gene expression in adults. *Environ Health Perspect*. 2011;119(12):1788-93.
217. Lassen TH, Frederiksen H, Jensen TK, Petersen JH, Joensen UN, Main KM, et al. Urinary bisphenol A levels in young men: association with reproductive hormones and semen quality. *Environ Health Perspect*. 2014;122(5):478-84.
218. vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, et al. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health*. 1998;14(1-2):239-60.
219. Vandenberg LN, Ehrlich S, Belcher SM, Ben-Jonathan N, Dolinoy DC, Hugo ER, et al. Low dose effects of bisphenol A. *Endocr Disruptors*. 2013;1(1):e26490.
220. Tomza-Marciniak A, Stepkowska P, Kuba J, Pilarczyk B. Effect of bisphenol A on reproductive processes: A review of in vitro, in vivo and epidemiological studies. *J Appl Toxicol*. 2017.
221. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission Related To 2,2-

Bis(4-Hydroxyphenyl)Propane (Bisphenol A) [İnternet]. 2006 [Erişim tarihi 15.09.2017]. Erişim adresi: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/428.pdf

222. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit*. 2004;10(6):Ra141-7.

223. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(3):368-70.

224. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med*. 1991;91(3c):23s-30s.

225. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993;49(3):481-93.

226. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.

227. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014;224(Supplement C):164-75.

228. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2017.

229. Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol*. 2013;528:3-25.

230. Schmitt F-J, Renger G, Friedrich T, Kreslavski VD, Zharmukhamedov SK, Los DA, et al. Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2014;1837(6):835-48.

231. Messner KR, Imlay JA. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem*. 2002;277(45):42563-71.

232. Seaver LC, Imlay JA. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J Biol Chem*. 2004;279(47):48742-50.

233. Dąbrowski JM. Chapter Nine - Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. In: van Eldik R, Hubbard CD, editors. *Advances in Inorganic Chemistry*. 70: Academic Press; 2017. p. 343-94.

234. Nash KM, Ahmed S. Nanomedicine in the ROS-Mediated Pathophysiology: Applications and Clinical Advances. *Nanomedicine* 2015;11(8):2033-40.

235. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*. 1994;97(3a):5S-13S; discussion 22S-8S.

236. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:395-418.

237. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1-40.

238. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89-96.
239. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science.* 1992;257(5074):1220-4.
240. Schweitzer C, Schmidt R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem Rev.* 2003;103(5):1685-757.
241. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(7):995-1014.
242. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis.* 2007;115(2):81-103.
243. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine.* 2007;74(4):324-9.
244. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *Febs j.* 2008;275(15):3959-70.
245. Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(15):2457-78.
246. Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(5):469-84.
247. Djordjevic VB. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol.* 2004;237:57-89.
248. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuroparmacol.* 2009;7(1):65-74.
249. Rahman T, Hosen I, Islam MMT, Shekhar HU. Oxidative stress and human health. *Adv Biosci Biotechnol* 2012;03(07):997-1019.
250. Shaw PX, Werstuck G, Chen Y. Oxidative stress and aging diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:569146.
251. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science.* 1997;275(5306):1649-52.
252. Ogita H, Liao J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium.* 2004;11(2):123-32.
253. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Jr., Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13659.
254. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:936486.
255. Buettner GR, Schafer FQ. Free radicals, oxidants, and antioxidants. *Teratology.* 2000;62(4):234.
256. Ho E, Karimi Galougahi K, Liu C-C, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.* 2013;1(1):483-91.

257. Chang YT, Chang WN, Tsai NW, Huang CC, Kung CT, Su YJ, et al. The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in Alzheimer's disease: a systematic review. *Biomed Res Int*. 2014;2014:182303.
258. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(14):1144-70.
259. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(8):1499-503.
260. Haddad JJ, Harb HL. L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Mol Immunol*. 2005;42(9):987-1014.
261. Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1-2):60-76.
262. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004;134(3):489-92.
263. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci* 38(7):592-607.
264. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* 2012;5(1):9-19.
265. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*. 2009;390(3):191-214.
266. Homma T, Fujii J. Application of Glutathione as Anti-Oxidative and Anti-Aging Drugs. *Curr Drug Metab*. 2015;16(7):560-71.
267. Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors*. 2008;34(2):171-80.
268. Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*. 2012;2012:137289.
269. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
270. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol*. 2016;26(3):165-76.
271. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57(5 Suppl):715S-24S; discussion 24S-25S.
272. Li S, Tan H-Y, Wang N, Zhang Z-J, Lao L, Wong C-W, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26087-124.
273. Shacter E. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol*. 2000;319:428-36.

274. McGill MR, Jaeschke H. Chapter 4 - Oxidant Stress, Antioxidant Defense, and Liver Injury A2 - Kaplowitz, Neil. In: DeLeve LD, editor. *Drug-Induced Liver Disease* (Third Edition). Boston: Academic Press; 2013. p. 71-84.
275. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 2000;32(3-4):307-26.
276. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20313-6.
277. Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, et al. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 1998;106 Suppl 1:289-95.
278. Reeg S, Grune T. Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression? *Antioxid Redox Signal* 2015;23(3):239-55.
279. Karran P, Brem R. Protein oxidation, UVA and human DNA repair. *DNA Repair.* 2016;44:178-85.
280. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res.* 2006;40(12):1250-8.
281. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003;329(1-2):23-38.
282. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 1991;281(1-2):9-19.
283. Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst).* 2004;3(8-9):1109-15.
284. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer.* 1996;32a(1):30-8.
285. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011;711(1-2):193-201.
286. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res.* 2003;531(1-2):5-23.
287. Whiteman M, Jenner A, Halliwell B. Hypochlorous acid-induced base modifications in isolated calf thymus DNA. *Chem Res Toxicol.* 1997;10(11):1240-6.
288. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):361-70.
289. Melis JPM, van Steeg H, Luijten M. Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(18):2409-19.
290. Scott TL, Rangaswamy S, Wicker CA, Izumi T. Repair of Oxidative DNA Damage and Cancer: Recent Progress in DNA Base Excision Repair. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(4):708-26.
291. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(11):1102-15.

292. Olinski R, Zastawny T, Budzbon J, Skokowski J, Zegarski W, Dizdaroglu M. DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett.* 1992;309(2):193-8.
293. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb j.* 2003;17(10):1195-214.
294. Lunec J, Herbert K, Blount S, Griffiths HR, Emery P. 8-Hydroxydeoxyguanosine. A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *FEBS Lett.* 1994;348(2):131-8.
295. Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996;149(1):21-8.
296. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, et al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet.* 1996;347(8999):444-5.
297. Kobayashi K, Miyagawa M, Wang RS, Sekiguchi S, Suda M, Honma T. Effects of in utero and lactational exposure to bisphenol A on somatic growth and anogenital distance in F1 rat offspring. *Ind Health.* 2002;40(4):375-81.
298. Watanabe S, Wang RS, Miyagawa M, Kobayashi K, Suda M, Sekiguchi S, et al. Imbalance of testosterone level in male offspring of rats perinatally exposed to bisphenol A. *Ind Health.* 2003;41(4):338-41.
299. Howdeshell KL, Furr J, Lambright CR, Wilson VS, Ryan BC, Gray LE, Jr. Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicol Sci.* 2008;102(2):371-82.
300. Okada A, Kai O. Effects of estradiol-17beta and bisphenol A administered chronically to mice throughout pregnancy and lactation on the male pups' reproductive system. *Asian J Androl.* 2008;10(2):271-6.
301. Salian S, Doshi T, Vanage G. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci.* 2009;85(21-22):742-52.
302. Xi W, Lee CK, Yeung WS, Giesy JP, Wong MH, Zhang X, et al. Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod Toxicol.* 2011;31(4):409-17.
303. Kass L, Durando M, Altamirano GA, Manfroni-Ghibaudo GE, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. Prenatal Bisphenol A exposure delays the development of the male rat mammary gland. *Reprod Toxicol.* 2015;54(Supplement C):37-46.
304. LaRocca J, Boyajian A, Brown C, Smith SD, Hixon M. Effects of in utero exposure to Bisphenol A or diethylstilbestrol on the adult male reproductive system. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2011;92(6):526-33.
305. Gamez JM, Penalba R, Cardoso N, Ponzo O, Carbone S, Pandolfi M, et al. Low dose of bisphenol A impairs the reproductive axis of prepuberal male rats. *J Physiol Biochem.* 2014;70(1):239-46.

306. Ma S, Shi W, Wang X, Song P, Zhong X. Bisphenol A Exposure during Pregnancy Alters the Mortality and Levels of Reproductive Hormones and Genes in Offspring Mice. *Biomed Res Int*. 2017;2017:3585809.
307. Kobayashi K, Kubota H, Ohtani K, Hojo R, Miyagawa M. Lack of effects for dietary exposure of bisphenol A during in utero and lactational periods on reproductive development in rat offspring. *J Toxicol Sci*. 2012;37(3):565-73.
308. Christiansen S, Axelstad M, Boberg J, Vinggaard AM, Pedersen GA, Hass U. Low-dose effects of bisphenol A on early sexual development in male and female rats. *Reproduction*. 2014;147(4):477-87.
309. Nanjappa MK, Ahuja M, Dhanasekaran M, Coleman ES, Braden TD, Bartol FF, et al. Bisphenol A regulation of testicular endocrine function in male rats is affected by diet. *Toxicol Lett*. 2014;225(3):479-87.
310. Yang YJ, Hong YC, Oh SY, Park MS, Kim H, Leem JH, et al. Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. *Environ Res*. 2009;109(6):797-801.
311. Lv Y, Rui C, Dai Y, Pang Q, Li Y, Fan R, et al. Exposure of children to BPA through dust and the association of urinary BPA and triclosan with oxidative stress in Guangzhou, China. *Environ Sci Process Impacts*. 2016;18(12):1492-9.
312. Kim JH, Hong YC. Increase of urinary malondialdehyde level by bisphenol A exposure: a longitudinal panel study. *Environ Health*. 2017;16(1):8.
313. Miao M, Yuan W, He Y, Zhou Z, Wang J, Gao E, et al. In utero exposure to bisphenol-A and anogenital distance of male offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011;91(10):867-72.
314. Fenichel P, Dechaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, Pacini P, et al. Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum Reprod*. 2012;27(4):983-90.
315. Ferguson KK, Peterson KE, Lee JM, Mercado-Garcia A, Blank-Goldenberg C, Tellez-Rojo MM, et al. Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol A in relation to sex hormones and puberty in boys. *Reprod Toxicol*. 2014;47:70-6.
316. Watkins DJ, Sanchez BN, Tellez-Rojo MM, Lee JM, Mercado-Garcia A, Blank-Goldenberg C, et al. Impact of phthalate and BPA exposure during in utero windows of susceptibility on reproductive hormones and sexual maturation in peripubertal males. *Environ Health*. 2017;16(1):69.
317. Borch J, Metzdorff SB, Vinggaard AM, Brokken L, Dalgaard M. Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology*. 2006;223(1-2):144-55.
318. Christiansen S, Boberg J, Axelstad M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Metzdorff SB, et al. Low-dose perinatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats. *Reprod Toxicol*. 2010;30(2):313-21.
319. Li M, Qiu L, Zhang Y, Hua Y, Tu S, He Y, et al. Dose-related effect by maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate plasticizer on inducing hypospadiac male rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;35(1):55-60.

320. Kobayashi K, Miyagawa M, Wang RS, Suda M, Sekiguchi S, Honma T. Effects of in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate on somatic and physical development in rat offspring. *Ind Health*. 2006;44(4):652-60.
321. Akingbemi BT, Youker RT, Sottas CM, Ge R, Katz E, Klinefelter GR, et al. Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol Reprod*. 2001;65(4):1252-9.
322. Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Grote K, Golombiewski A, Sterner-Kock A, et al. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): effects on androgenic status, developmental landmarks and testicular histology in male offspring rats. *Toxicology*. 2006;225(1):64-74.
323. Dalsenter PR, Santana GM, Grande SW, Andrade AJ, Araujo SL. Phthalate affect the reproductive function and sexual behavior of male Wistar rats. *Hum Exp Toxicol*. 2006;25(6):297-303.
324. Culty M, Thuillier R, Li W, Wang Y, Martinez-Arguelles DB, Benjamin CG, et al. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. *Biol Reprod*. 2008;78(6):1018-28.
325. Barakat R, Lin PP, Rattan S, Brehm E, Canisso IF, Abosalum ME, et al. Prenatal Exposure to DEHP Induces Premature Reproductive Senescence in Male Mice. *Toxicol Sci*. 2017;156(1):96-108.
326. Blystone CR, Kissling GE, Bishop JB, Chapin RE, Wolfe GW, Foster PM. Determination of the di-(2-ethylhexyl) phthalate NOAEL for reproductive development in the rat: importance of the retention of extra animals to adulthood. *Toxicol Sci*. 2010;116(2):640-6.
327. Doyle TJ, Bowman JL, Windell VL, McLean DJ, Kim KH. Transgenerational effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on testicular germ cell associations and spermatogonial stem cells in mice. *Biol Reprod*. 2013;88(5):112.
328. Zhang LD, Li HC, Chong T, Gao M, Yin J, Fu DL, et al. Prepubertal exposure to genistein alleviates di-(2-ethylhexyl) phthalate induced testicular oxidative stress in adult rats. *Biomed Res Int*. 2014;2014:598630.
329. Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Nakajima T, Naito H, Ito S, et al. Association between maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormone levels in fetal blood: the Hokkaido study on environment and children's health. *PLoS One*. 2014;9(10):e109039.
330. Su PH, Chen JY, Lin CY, Chen HY, Liao PC, Ying TH, et al. Sex steroid hormone levels and reproductive development of eight-year-old children following in utero and environmental exposure to phthalates. *PLoS One*. 2014;9(9):e102788.
331. Axelsson J, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Lindh CH, Jonsson BA, Giwercman A. Prenatal phthalate exposure and reproductive function in young men. *Environ Res*. 2015;138:264-70.
332. Swan SH, Sathyanarayana S, Barrett ES, Janssen S, Liu F, Nguyen RH, et al. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. *Hum Reprod*. 2015;30(4):963-72.

333. Martino-Andrade AJ, Liu F, Sathyanarayana S, Barrett ES, Redmon JB, Nguyen RH, et al. Timing of prenatal phthalate exposure in relation to genital endpoints in male newborns. *Andrology*. 2016;4(4):585-93.
334. Ferguson KK, Cantonwine DE, Rivera-Gonzalez LO, Loch-Caruso R, Mukherjee B, Anzalota Del Toro LV, et al. Urinary phthalate metabolite associations with biomarkers of inflammation and oxidative stress across pregnancy in Puerto Rico. *Environ Sci Technol*. 2014;48(12):7018-25.
335. Ferguson KK, McElrath TF, Chen YH, Mukherjee B, Meeker JD. Urinary phthalate metabolites and biomarkers of oxidative stress in pregnant women: a repeated measures analysis. *Environ Health Perspect*. 2015;123(3):210-6.
336. Howdeshell KL, Furr J, Lambright CR, Rider CV, Wilson VS, Gray LE, Jr. Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development: altered fetal steroid hormones and genes. *Toxicol Sci*. 2007;99(1):190-202.
337. Xi W, Wan HT, Zhao YG, Wong MH, Giesy JP, Wong CK. Effects of perinatal exposure to bisphenol A and di(2-ethylhexyl)-phthalate on gonadal development of male mice. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2011;19(7):2515-27.
338. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS One*. 2013;8(1):e55387.
339. Jones S, Boisvert A, Duong TB, Francois S, Thrane P, Culty M. Disruption of rat testis development following combined in utero exposure to the phytoestrogen genistein and antiandrogenic plasticizer di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Biol Reprod*. 2014;91(3):64.
340. Isling LK, Boberg J, Jacobsen PR, Mandrup KR, Axelstad M, Christiansen S, et al. Late-life effects on rat reproductive system after developmental exposure to mixtures of endocrine disrupters. *Reproduction*. 2014;147(4):465-76.
341. Yang YJ, Hong YP, Chae SA. Reduction in semen quality after mixed exposure to bisphenol A and isobutylparaben in utero and during lactation periods. *Hum Exp Toxicol*. 2016;35(8):902-11.
342. Xie M, Bu P, Li F, Lan S, Wu H, Yuan L, et al. Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells. *Oncotarget*. 2016;7(9):10606-15.
343. Eagon PK, Chandar N, Epley MJ, Elm MS, Brady EP, Rao KN. Di(2-ethylhexyl)phthalate-induced changes in liver estrogen metabolism and hyperplasia. *Int J Cancer*. 1994;58(5):736-43.
344. Czernych R, Chraniuk M, Zagodzdon P, Wolska L. Characterization of estrogenic and androgenic activity of phthalates by the XenoScreen YES/YAS in vitro assay. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;53:95-104.
345. Zhang XF, Zhang T, Wang L, Zhang HY, Chen YD, Qin XS, et al. Effects of diethylhexyl phthalate (DEHP) given neonatally on spermatogenesis of mice. *Mol Biol Rep*. 2013;40(11):6509-17.

346. Erkekoglu P, Zeybek ND, Giray B, Asan E, Arnaud J, Hincal F. Reproductive toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate in selenium-supplemented and selenium-deficient rats. *Drug Chem Toxicol*. 2011;34(4):379-89.
347. Wang P, Luo C, Li Q, Chen S, Hu Y. Mitochondrion-mediated apoptosis is involved in reproductive damage caused by BPA in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;38(3):1025-33.
348. Aydogan M, Korkmaz A, Barlas N, Kolankaya D. Pro-oxidant effect of vitamin C coadministration with bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol on the reproductive tract of male rats. *Drug Chem Toxicol*. 2010;33(2):193-203.
349. Li J, Mao R, Zhou Q, Ding L, Tao J, Ran MM, et al. Exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of ERK signal pathway. *Toxicol Mech Methods*. 2016;26(3):180-8.
350. Pan Y, Jing J, Dong F, Yao Q, Zhang W, Zhang H, et al. Association between phthalate metabolites and biomarkers of reproductive function in 1066 Chinese men of reproductive age. *J Hazard Mater*. 2015;300:729-36.
351. Adoamnei E, Mendiola J, Vela-Soria F, Fernandez MF, Olea N, Jorgensen N, et al. Urinary bisphenol A concentrations are associated with reproductive parameters in young men. *Environ Res*. 2017;161:122-8.
352. Huang LP, Lee CC, Fan JP, Kuo PH, Shih TS, Hsu PC. Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate relation to sperm motility, reactive oxygen species generation, and apoptosis in polyvinyl chloride workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 2014;87(6):635-46.
353. Qi S, Fu W, Wang C, Liu C, Quan C, Kourouma A, et al. BPA-induced apoptosis of rat Sertoli cells through Fas/FasL and JNKs/p38 MAPK pathways. *Reprod Toxicol*. 2014;50:108-16.
354. Murphy CJ, Stermer AR, Richburg JH. Age- and species-dependent infiltration of macrophages into the testis of rats and mice exposed to mono-(2-Ethylhexyl) phthalate (MEHP). *Biol Reprod*. 2014;91(1):18.
355. Jensen MS, Anand-Ivell R, Norgaard-Pedersen B, Jonsson BA, Bonde JP, Hougaard DM, et al. Amniotic fluid phthalate levels and male fetal gonad function. *Epidemiology*. 2015;26(1):91-9.
356. Myers JP, Zoeller RT, vom Saal FS. A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. *Environ Health Perspect*. 2009;117(11):1652-5.
357. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev*. 2009;30(1):75-95.
358. Wilson VS, Howdeshell KL, Lambright CS, Furr J, Earl Gray L, Jr. Differential expression of the phthalate syndrome in male Sprague-Dawley and Wistar rats after in utero DEHP exposure. *Toxicol Lett*. 2007;170(3):177-84.
359. Gray LE, Barlow NJ, Howdeshell KL, Ostby JS, Furr JR, Gray CL. Transgenerational Effects of Di (2-Ethylhexyl) Phthalate in the Male CRL:CD(SD)

Rat: Added Value of Assessing Multiple Offspring per Litter. *Toxicol Sci.* 2009;110(2):411-25.



8. EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 06/11/2015-36070

 T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Belma GÜMÜŞEL, Pınar ERKEKOĞLU, N. Dilara ZEYBEK, Nilgün YERSAL, Aylin BALCI, Gizem YILDIZTEKİN ve Özge KÖSE'den oluşan, G.Ü.ET-15.066 kod numaralı ve "Prenatal Bisfenol A ve/veya DI-2-Etil Hekzil Ftalat Maruziyetinin Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" adlı başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-15.066 and entitled "Evaluation of the Effects of Prenatal Exposure to Bisphenol A and / or DI-2-Ethylhexyl Phthalate on the Male Reproductive System " is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards,

e-imzalıdır
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

EK :
1 Liste

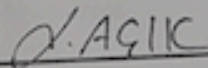
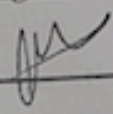
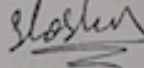
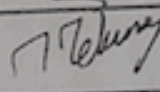
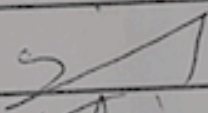
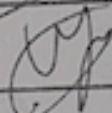
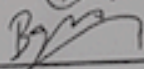
BELGENİN ASLI
ELEKTRONİK İMZALIDIR
09.11.2015
Memur
Leyla AÇIK

Evrakı Doğrulamak İçin: <http://belgedogrulama.gazi.edu.tr>
Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 Faks:0 (312) 202 20 63
e-Posta: hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi: <http://dhk.gazi.edu.tr/>

Pin: 60181
Bilgi için: Şenay Seloğlu
Genel Evrak Sorumlusu

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 04.11.2015		TOPLANTI SAYISI : 10	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Leyla AÇIK (Başkan)			
Uzman Dr.Şeyda DİKER (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Esra AKKOL		KATILAMADI	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU		KATILAMADI	
Prof.Dr.Tuncay PEKER		KATILAMADI	
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER			
Doç.Dr.Turgay TEKİNAY			
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL			
Yrd.Doç.Dr.İhsan YIKILGAN			
Uzm.Dr.Burcu EKİM			
Dr.Kadir BAŞAR		KATILAMADI	
Osman İÇ		KATILAMADI	

EK-2 Tez Çalışması İle İlgili Bildiriler

Tez Çalışması ile İlgili Poster Bildirileri

1. **Balci A.**, Ozkemahli KG., Erkekoglu P., Zeybek N.D., Yersal N., Kocer-Gumusel B.: Effects of Prenatal Exposure to Bisphenol A and/or Di-2-Ethylhexyl Phtalate on Sperm Parameters And Reproductive Hormones. 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), 11-13 October 2017, Ankara, Turkey.
2. **Balci A.**, Zeybek ND, Yersal N, Yıldıztekin KG, Erkekoğlu P, Koçer Gümüşel B.: Testicular effects of prenatal and lactational exposure to Bisphenol A and/or di-2-ethylhexyl phthalate in the rat offsprings. 15th Internatinal Congress of Histochemistry and Cytochemistry “From molecules to diseases” ICHC 2017, 18-21 Mayıs 2017, Antalya, Türkiye,

9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Aylin Balci

Doğum Yeri ve Tarihi: Batman, 26.06.1987

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

İletişim Adresi ve Telefonu: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Sıhhiye/ANKARA, 0505 694 6929

II. Eğitimi

2012- : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı (Doktora)

2006- 2011: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Lisans)

2001- 2005: Batman Anadolu Lisesi

III. Mesleki Deneyimi

2013- : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Araştırma Görevlisi)

IV- Bilimsel Faaliyetleri

Yayınlar

Uluslararası İndekslerde Taranan Dergilerdeki Makaleler:

1. Buluş AD, Aşci A, Erkekoglu P, Balci A, Andiran N, Koçer-Gümüşel B. “The evaluation of possible role of endocrine disruptors in central and peripheral precocious puberty.” Toxicol Mech Methods. 26(7),493-500 (2016).
doi: 10.3109/15376516.2016.1158894
2. Kizilgun M, Takci S, Erkekoglu P, Ascı A, Balci A, Yigit S, Kocer-Gumusel B. “Copper, zinc and iron levels in premature infants following red blood cell

transfusion.” J Trace Elem Med Biol., 38:126-130 (2016).
doi:10.1016/j.jtemb.2016.05.011.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. Zeybek D. N., Oflaz O., Erkekoglu P., Ersayın A., Asci A., Balci A., Yaman U., Kocer Giray B. ‘The Apoptotic Effects of Aroclor 1254 on The Hepatocytes of Selenium Deficient and Selenium Supplemented Rats’ Uluslararası Katılımlı I. Hücre Ölümü Araştırma Kongresi Poster Bildirisi 30 Ekim- 3 Kasım 2013 Kuşadası/ Türkiye (Poster bildirisi)
2. Aşçı A., Balci A., Ersayın A., Yaman Ü., Erkekoğlu P., Zeybek N.D., Oflaz O., Koçer-Gümüşel B. ‘The Effects of Aroclor 1254 on Hepatic Oxidant/Antioxidant Status of Selenium Deficient and Selenium Supplemented Rats’ The 15th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals (TEMA 15) 22-26 Haziran 2014 Orlando, Florida/ Amerika (Poster bildirisi)
3. Zeybek N.D., Balci A., Oflaz O., Erkekoğlu P., Aydın S., Aşçı A., Yaman Ü., Başaran N., Koçer-Gümüşel B. ‘The Testicular and Hepatic Apoptotic Effects of Aroclor 1254 in Selenium Supplemented and Selenium Deficient Rats’ 1st International Congress and Workshop of Forensic Toxicology 29-30 Kasım 2014 Ankara/Türkiye (Poster Bildirisi)
4. Erkekoglu P., Zeybek D., Aydın S., Asci A., Balci A., Yaman U., Aşan E., Başaran N., Kocer Gumusel B. “The Effects Of Aroclor 1254 On Sperm Parameters And Sex Hormones Of Selenium Deficient And Selenium Supplemented Rats” Poster Presentation, the 2015 SOT Annual Meeting and ToxExpo, 22–26 March 2015 San Diego, California, USA
5. Buluş D., Balci A., Asci A., Yaman U., Erkekoglu P., Andiran N., Kocer Gumusel B. “Urinary Bisphenol A Levels In Obese Children: Preliminary Results” Poster Presentation, the 2015 SOT Annual Meeting and ToxExpo, 22–26 March 2015 San Diego, California, USA

6. Balci A., Yaman U., Erkekoglu P., Asci A., Yıldıztekin G., Oral D., Kocer Gumusel B. "Protein Oxidation Levels in Different Organs of Rats Exposed to Aroclor 1254 at Different Selenium Status" Poster Presentation, International Eurasia Pharmacy Congress, 3-7 September 2015 Erzincan, Turkey
7. Asci A., Yildiztekin K.G, Zeybek N.D., Oflaz O., Balci A., Erkekoglu P., Yaman U., Kocer-Gümüsel B. "Protective role of dietary selenium on toxic effects of Aroclor 1254 in brain tissues of rats". 9th Congress of the Turkish Society of Toxicology with the participation of the Hellenic Society of Toxicology, TurkHelTox, Izmir- TURKEY. 21-24 October 2015. P40, syf 44 (Poster Presentation)
8. Balci A., Erkekoglu P., Asci A., Kızılgün M., Yildiztekin K.G, Edebal O.H., Yaman U., Kocer-Gümüsel B. "Thyroidal effects of Aroclor 1254 at different selenium status in rat". 9th Congress of the Turkish Society of Toxicology with the participation of the Hellenic Society of Toxicology, TurkHelTox, Izmir- TURKEY. 21-24 October 2015. P41, syf 44 (Poster Presentation)
9. M. Kizilgun, S. Takci, P. Erkekoglu, A. Asci, A. Balci, S. Yigit, B. Kocer-Gumusel. Copper, Zinc and Iron Levels in Premature Infants After Erythrocyte Transfusion. ISTERH conference, 18-22 October 2015, Dubrovnik, Croatia.
10. Ünzile Yaman, Dilara Zeybek, Pınar Erkekoğlu, Ofcan Oflaz, Aylin Balcı, Kübra Gizem Yıldıztekin, Ali Aşçı, Belma Gümüsel. Farklı Selenyum Statülerine Sahip Sıçanlarda Aroklor 1254'ün RenalHistopatoloji, Oksidan/Antioksidan Durum ve Apoptoz Üzerindeki Etkileri. İVEK (2.Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi)/ IVEK 2nd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul-TÜRKİYE. 27-29 Kasım 2015. P-110 (Poster Sunumu)
11. Aylin Balcı, Ünzile Yaman, Derya Buluş, Kübra Gizem Yıldıztekin, Pınar Erkekoğlu, Nesibe Andıran, Belma Koçer-Gümüsel. Plasma Phthalate Levels of Pubertal Obese Children. International Society of Environmental Epidemiology-Asia Chapter Conference 2016, Sapporo- Japan. June 26-29 2016. (Oral Presentation)
12. Aylin Balcı, Kübra Gizem Yıldıztekin, Ünzile Yaman, Pınar Erkekoğlu, Ali Aşçı, Belma Koçer-Gümüsel. The Effects of Aroclor 1254 and/or Selenium on Oxidant/Antioxidant Status of Rat Heart. 6th International *FESTEM* Symposium

on Trace Elements and Minerals, Catania, Sicily- Italy. 26-28 May 2016. (Poster Presentation)

13. Ünzile Yaman, Aylin Balcı, Dilara Zeybek, Pınar Erkekoğlu, Ofcan Oflaz, Kübra Gizem Yıldıztekin, Ali Aşcı, Belma Koçer-Gümüşel. Renal Toxicity of Aroclor 1254 in Sprague-Dawley Rats with Different Selenium Status. 6th International *FESTEM* Symposium on Trace Elements and Minerals, Catania, Sicily- Italy. 26-28 May 2016. (Poster Presentation)
14. Gülru Gürdemir, Pınar Erkekoğlu, Kübra Gizem Yıldıztekin, Ünzile Yaman, Aylin Balcı, Engin Tutkun, Dinç Yılmaz, Belma Gümüşel. Lipid Peroxidation and DNA Damage in Plastic Workers. 2nd International Congress of Forensic Toxicology, Ankara-Turkey. 26-30 May 2016. (Poster Presentation)
15. Pınar Erkekoğlu, Dilara Zeybek, Aylin Balcı, Kübra Gizem Yıldıztekin, Ünzile Yaman, Ali Aşcı, Sevtap Aydın, Murat Kızılgün, O.H. Edebal, Nurşen Başaran, Belma Gümüşel. Toxic Effects of Aroclor 1254 on Rat Testis and Modulatory Effect of Selenium Status. 52nd Congress of European Societies of Toxicology (EUROTOX), At Seville, Spain. 4-7 September 2016. (Poster Presentation)
16. Belma Kocer Gümüsel, Pınar Erkekoğlu, Aylin Balcı, Kubra Gizem Yıldıztekin. The Effects of Aroclor 1254 and/or Selenium Status on Testicular Caspase 3 and Caspase 8 Activities. İVEK (3.Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi)/ IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul-TÜRKİYE. 26-29 Nisan 2017. P-0454 (Poster Sunumu)
17. Belma Kocer Gümüsel, Gulru Gurdemir, Pınar Erkekoğlu, Aylin Balcı, Unzile Yaman, Kubra Gizem Yıldıztekin, Engin Tutkun, Hinc Yılmaz, Ali Aşcı. Oxidative Stress, Selenium Levels and DNA Damage in Plastic Workers Exposed to Di(2 ethylhexyl) phthalate. İVEK (3.Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi)/ IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul-TÜRKİYE. 26-29 Nisan 2017. P-0457 (Poster Sunumu)
18. Balcı A, Zeybek ND, Yersal N, Yıldıztekin KG, Erkekoğlu P, Koçer Gümüşel B “Testicular effects of prenatal and lactational exposure to Bisphenol A and/or di-2-ethylhexyl phthalate in the rat offsprings” 15th Internatinal Congress of

- Histochemistry and cytochemistry “From molecules to diseases” ICHC 2017 Antalya, Türkiye, 18-21 Mayıs 2017. (poster presentation)
19. Zeybek ND, Oflaz O, Balci A, Yaman U, Erkekoğlu P, Yıldıztekin KG, Aşçı A, Koçer Gümüşel B “Renal histopathological changes, cellular organization alterations and apoptosis caused by Aroclor 1254 in rats with different selenium status” 15th International Congress of Histochemistry and cytochemistry “From molecules to diseases” ICHC 2017 Antalya, Türkiye, 18-21 Mayıs 2017. (poster presentation)
 20. Balci A. , Ozkemahli KG., Erkekoglu P., Zeybek N.D., Yersal N., Kocer-Gumusel B. “Effects Of Prenatal Exposure To Bisphenol A And / Or D1-2-Ethylhexyl Phtalate On Sperm Parameters And Reproductive Hormones” 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017) Ankara/Turkey 11-13 October 2017. (poster presentation)
 21. Balci A., Yıldıztekin G., Sur Ü., Erkekoğlu P., Koçer-Gümüşel B. “The Effects of Aroclor 1254 and/or Selenium Status on Testicular and Hepatic Selenoprotein Activities/Levels” ISEEP-2017 VIII. International Symposium On Ecology And Environmental Problems 4-7 October 2017 Çanakkale/Turkey (Oral presentation).
 22. Yıldıztekin G., Balci A., Sur Ü., Zeybek N.D., Erkekoğlu P., Koçer-Gümüşel B. “The Effects of Aroclor 1254 and/or Selenium Status on Hepatic Caspase 3 And Caspase 8 Activities and Hepatic Apoptosis” ISEEP-2017 VIII. International Symposium On Ecology And Environmental Problems 4-7 October 2017 Çanakkale/Turkey (Poster presentation).

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. Erkekoğlu P., Zeybek N.D., Aydın S., Aşçı A., **Balci A.**, Yaman Ü., Kızılgün M., Aşan E., Başaran N., Koçer-Gümüşel B. ‘Aroclor 1254’e Maruz Kalan ve Farklı Selenyum Statüsüne Sahip Sıçanlarda Sperm Parametrelerinin ve Seks Hormonlarının Değerlendirilmesi’ Türk Toksikoloji Derneği III. Bölgesel Toksikoloji Sempozyumu 12-14 Haziran 2014 İzmir (Poster bildirisi)
2. Koçer-Gümüşel B., Erkekoğlu P., Aşçı A., **Balci A.**, Yaman Ü. ‘Endokrin Bozucu Kimyasal Maddeler ve Obezite Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi: Ftalatlar

ve Bisfenol A' Türk Toksikoloji Derneği III. Bölgesel Toksikoloji Sempozyumu
12-14 Haziran 2014 İzmir (Davetli konuşması)

Projeler

Tamamlanan Projeler:

1. Selenyum Eksikliği olan ve Selenyum Suplementasyonu Yapılan Sıçanlarda Aroklor 1254'ün Testiküler, Oksidan/Antioksidan Statü Değişiklikleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Araştırma Projesi, Proje No: 012 D12 301 003, **Yardımcı Araştırmacı (24.12.2012-13.05.2016) (Bütçe 12.500)**
2. Prenatal Bisfenol A ve Ftalat Maruziyetinin Yenidoğanda Üreme Sistemi ve Tiroid Hormonları Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi, TÜBİTAK 1001, 115S477, **Bursiyer (15.09.2015-15.09.2017) (Bütçe 301142,96 TL)**

Devam Eden Projeler:

1. Çinko oksit ve bakır oksit nanoparçacıklarının sitotoksik etki mekanizmalarının in vitro ortamda araştırılması (Proje Yöneticisi: Prof. Dr. Aylin Gürbay, Proje Ekibi: Ecz. Duygu Paslı), Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Destek Projesi 6080, Proje no: 014 D12 301 001-830 (Başlama Tarihi: 03.05.2017, Bütçe: 29991,78 TL).
2. Erkek Yenidoğanlarda Bisfenol A ve Ftalat Maruziyetinin Genital Sistem Özellikleri ve Hormonlara Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Araştırma Projesi, Yardımcı Araştırmacı (01.08.2014-...) (Bütçe 16.000)
3. Prenatal ve Laktasyon Döneminde Bisfenol A ve/veya Di2etil Hekzil Ftalat Maruziyetinin Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Araştırma Projesi, Proje Yöneticisi: Prof.Dr. Belma Gümüşel Proje Id:12150 Yardımcı Araştırmacı (17.01.2017-...) (Bütçe 21831,80)
4. Adolesan Polikistik Over Sendromlu Vakalarda Bisfenol A Ve Ftalat Düzeylerinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Araştırma Projesi, Proje Id: 13147 Proje Yöneticisi: Prof.Dr. Nuray Kanbur Yardımcı Araştırmacı THD-2017-13147 (Bütçe 20699,84) (23.03.2017-...)
5. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelere Kombine Maruziyetin Toksik Etkilerinin Farklı Hücre Hatlarında Değerlendirilmesi: Endoplazmik Retikulum Stresi Ve

Oksidatif Stres, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Araştırma Projesi, Proje Id: 12882 Proje Yöneticisi: Prof.Dr. Belma Gümüşel Yardımcı Araştırmacı

Kongre, Sempozyum, Kurs Katılımı

1. 20 Aralık 2010 “Türkiye’de Adli Toksikolojinin Bugünü ve Geleceği”
H.Ü/ANKARA
2. 15-18 Kasım 2012 8. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi ANTALYA
3. 15 Mayıs 2013 Eczacılık Eğitiminde Yeni Hedef Akreditasyon Toplantısı
H.Ü/ANKARA
4. 30 Mayıs 2013 I. Sporcu Sağlığı ve Doping Sempozyumu H.Ü/ANKARA
5. 07-09 Haziran 2013 TTD Sürekli Eğitim Kursu 5 “Kozmetik Ürünlerin Güvenlilik Değerlendirmesi Kursu” Katılım Belgesi
6. 06-10.10.2013 EUROTOX Advanced Toxicology Course Volos/Yunanistan (KURS)
7. 11 Haziran 2014 II. Sporcu Sağlığı ve Doping Sempozyumu Katılım Belgesi
8. 19 Haziran 2014 Kozmetik Ürünlerde Teknik Dosya Hazırlanması, Testler ve Değerlendirmeler Konferansı
9. 17-18 Ekim 2014 Laboratuvar Güvenliği Eğitimi Programı katılım belgesi
10. 29-30.11.2014 “I. International Congress and Workshop of Forensic”
ANKARA (Kongre)
11. 4 Aralık 2014 “Kozmetik Analizleri Konferansı” Hacettepe Üniversitesi Kültür Merkezi (Ulusal Konferans)
12. 15-16.10.2015 “Geriatric Bilimler Sempozyumu” Hacettepe Üniversitesi, ANKARA (Ulusal Sempozyum)
13. 21-24.10.2015 “9th Congress of the Turkish Society of Toxicology with the participation of the Hellenic Society of Toxicology, TurkHelTox”
Çeşme/İZMİR (Uluslararası Kongre)
14. 26-28 May 2016 “6th International *FESTEM* Symposium on Trace Elements and Minerals” Catania, Sicily- Italy. (Uluslararası Sempozyum)

15. 06.04.2017 “Her Yönüyle Alkol” H.Ü. Madde ve Alkol Bağımlılığı Araştırma ve Uygulama Merkezi. Hacettepe Üniversitesi Kültür Merkezi R Salonu (Ulusal Sempozyum)

16. 26-29 Nisan 2017. İVEK (3.Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi)/ IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul-TÜRKİYE.

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

1. Türk Toksikoloji Derneği (TTD)
2. European Society of Toxicology (EUROTOX)
3. International Union of Toxicology (IUTOX)