

**ÇEVRESEL ÖSTROJENLERDEN BİSFENOL A VE OKTİLFENOLÜN ERKEK
SIÇANLARDA SUBKRONİK ETKİLERİ**

**SUBCHRONIC EFFECTS OF ENVIRONMENTAL ESTROGENS; BISPHENOL A
AND OCTYLPHENOL ON MALE RATS**

NURÇİN YILDIZ

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :
Prof. Dr. Dürdane KOLANKAYA

Üye (Danışman) :
Prof. Dr. Nurhayat BARLAS

Üye :
Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Üye :
Doç. Dr. Terken BAYDAR

Üye :
Doç. Dr. E. Arzu KOÇKAYA

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erdem YAZGAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÇEVRESEL ÖSTROJENLERDEN BİSFENOL A VE OKTİLFENOLÜN ERKEK SIÇANLARDA SUBKRONİK ETKİLERİ

Nurçin Yıldız

ÖZ

Bu çalışmada, endokrin bozucu bileşiklerden bisfenol A ve oktilfenolün erkek sıçanlarda subkronik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, negatif kontrol grubu, yağ kontrol grubu, pozitif kontrol grubu olmak üzere 3 kontrol ve 125 mg/kg/gün ve 250 mg/kg/gün dozlarında bisfenol A ve oktilfenol uygulaması yapılan 4 uygulama grubu oluşturulmuştur. 90 günlük süre sonunda, kan örnekleri hematolojik ve biyokimyasal parametreler açısından incelenmiş, karaciğer, böbrek ve dalak doku örnekleri ışık mikroskobu altında histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal inceleme ile karaciğerde apoptotik hücre sayıları ve apoptotik indeksler belirlenmiştir. Sitogenetik hasarın tespitinde in vivo mikronükleus testi kullanılmıştır. Alınan kemik iliği örneklerinden hazırlanan yayma preparatlarda mikronükleuslu polikromatik eritrositler sayılarak, mikronükleus sıklığı belirlenmiştir.

Hem 125 mg/kg/gün bisfenol A hem de 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruplardaki sıçanların eritrosit sayılarında ve hematokrit yüzdelerinde anlamlı düşüş saptanmıştır. 250 mg/kg/gün bisfenol A ve oktilfenol uygulanan gruplardaki sıçanların serum total protein seviyeleri kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. 125 ve 250 mg/kg/gün bisfenol A ve 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruplardaki sıçanların serum glikoz seviyelerinin kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır. Yapılan histopatolojik incelemeler, 125 ve 250 mg/kg/gün bisfenol A ve oktilfenol uygulamasının erkek sıçanlarda karaciğer, böbrek ve dalak dokularında anlamlı sıklıkta histopatolojik değişikliklere neden olduğunu ortaya koymuştur. Apoptotik hücre sayıları ve apoptotik indeks açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Sitogenetik incelemeler, subkronik 125 ve 250 mg/kg/gün bisfenol A ve oktilfenol uygulamasının mikronükleus sıklığında artışa neden olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Endokrin bozucular, bisfenol A, oktilfenol, toksisite, genotoksisite

Danışman: Prof. Dr. Nurhayat BARLAS, Hacettepe üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı

SUBCHRONIC EFFECTS OF ENVIRONMENTAL ESTROGENS; BISPHENOL A AND OCTYLPHENOL ON MALE RATS

Nurçin Yıldız

ABSTRACT

In the current study, it was aimed to determine the subchronic effects of bisphenol A and octylphenol, two of endocrine disruptors, on male rats. Within this context, three groups including negative control, oil control and positive control, served as controls, while four groups including rats received either 125 mg/kg per day bisphenol A, 125 mg/kg per day octylphenol, 250 mg/kg per day bisphenol A and 250 mg/kg per day octylphenol, served as treatment groups. At the end of 90-day period, blood samples were examined regarding hematological and biochemical parameters, while tissue samples from liver, kidney and spleen were histopathologically evaluated using light microscopy. Number of apoptotic cells in liver and apoptotic indices were determined by immunohistochemical examination. Micronucleus test was used to measure genotoxicity. Estimation of micronucleus frequency was determined by counting polychromatic erythrocytes containing micronuclei in bone marrow smears.

There was a significant decrease in erythrocyte counts and hematocrit values of rats received 125 mg/kg per day bisphenol A and 125 mg/kg per day octylphenol. Serum total protein levels were significantly lower in rats received 250 mg/kg per day bisphenol A and octylphenol, while blood glucose levels were significantly higher in rats received 125 and 250 mg/kg per day bisphenol A and 125 mg/kg per day octylphenol compared to negative controls. Histopathological examinations revealed significantly higher frequency of histopathological changes in liver, kidney and spleen of rats received 125 and 250 mg/kg per day bisphenol A and octylphenol. There were no significant differences between groups regarding number of apoptotic cells and apoptotic indices. Cytogenetic examinations revealed higher frequency of micronuclei stimulated by subchronic administration of 125 mg/kg per day bisphenol A, 125 mg/kg per day octylphenol, 250 mg/kg per day bisphenol A and 250 mg/kg per day octylphenol.

Keywords: Endocrine disruptors, bisphenol A, octylphenol, toxicity, genotoxicity

Supervisor: Prof. Dr. Nurhayat BARLAS, Hacettepe University, Faculty of Science,
Department of Biology, Zoology Section

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi hazırlarken benimle tüm bilgi ve birikimlerini paylaşan, bana yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nurhayat BARLAS'a,

Çalışma kapsamında yaptığım tüm deneylerde bana yardımcı olan hocam Araő. Gör. Müfide AYDOĞAN'a,

Çalışmanın istatistiksel analizlerinin yapılmasında benden yardımlarını esirgemeyen Dr. Zübeyde ARAT'a

Tüm katkılarından dolayı içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Endokrin bozucular	2
2.1.1. Antiandrojenik bileşikler	4
2.1.1.1. Diğer antiandrojenik bileşikler	5
2.1.2. Östrojenik bileşikler	6
2.1.2.1. Doğal östrojenler	6
2.1.2.2. Sentetik östrojenler	7
2.1.2.3. Fitoöstrojenler	8
2.1.2.4. Çevresel östrojenler	9
2.1.2.4.1. Alkilfenol etoksilatlar ve alkilfenoller	9
2.1.2.4.1.1. Alkilfenol etoksilatların yıkım mekanizmaları	11
2.1.2.4.1.1.1. Mikrobiyal yıkım	11
2.1.2.4.1.1.2. Fotokimyasal yıkım	13
2.1.2.4.1.1.3. Atık su arıtma sırasında yıkım	13
2.1.2.4.1.2. Alkilfenol etoksilat ve alkilfenollerin çevresel durumu	14
2.1.2.4.1.3. Alkilfenol etoksilat ve alkilfenollerin östrojenik etkileri	14
2.1.2.4.1.3.1. Oktilfenol	15
2.1.2.4.1.3.1.1. Oktilfenolün toksisitesi	16
2.1.2.4.1.3.1.1.1. Toksikokinetik	16
2.1.2.4.1.3.1.1.2. Akut toksisite	16
2.1.2.4.1.3.1.1.3. Üreme ve gelişme toksisitesi	17
2.1.2.4.1.3.1.1.4. Hepatorenal toksisite	20
2.1.2.4.1.3.1.1.5. Genotoksisite	22
2.1.2.4.2. Bisfenol A	23
2.1.2.4.2.1. Bisfenol A'nın yıkım mekanizması	25

2.1.2.4.2.2. Bisfenol A'nın toksisitesi.....	25
2.1.2.4.2.2.1. Toksikokinetik.....	25
2.1.2.4.2.2.2. Akut toksisite.....	26
2.1.2.4.2.2.3. Üreme ve gelişme toksisitesi.....	26
2.1.2.4.2.2.4. Hepatorenal toksisite.....	28
2.1.2.4.2.2.5. Genotoksisite.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Gereç.....	32
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	32
3.1.2. Deney hayvanları.....	32
3.1.3. Laboratuvar koşulları.....	32
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. Çalışma tasarımı ve gruplarının oluşturulması.....	34
3.2.2. Vücut ağırlıkları, organ ağırlıkları, su ve yem tüketiminin saptanması.....	34
3.2.3. Hematolojik incelemeler.....	34
3.2.4. Biyokimyasal incelemeler.....	35
3.2.5. Histopatolojik incelemeler.....	35
3.2.6. İmmünohistokimyasal incelemeler.....	35
3.2.7. Sitogenetik incelemeler.....	36
3.2.8. İstatistiksel analiz.....	36
4. SONUÇLAR.....	37
4.1. Vücut ağırlığı değişimleri.....	37
4.2. Su ve yem tüketimleri.....	40
4.3. Absolüt ve relatif organ ağırlıkları.....	46
4.4. Hematolojik inceleme sonuçları.....	50
4.5. Biyokimyasal inceleme sonuçları.....	52
4.6. Histopatolojik inceleme sonuçları.....	54
4.6.1. Karaciğer.....	56
4.6.2. Böbrek.....	61
4.6.3. Dalak.....	66
4.7. İmmünohistokimyasal inceleme sonuçları.....	71
4.8. Sitogenetik inceleme sonuçları.....	77
5. TARTIŞMA.....	81
KAYNAKLAR.....	89
ÖZGEÇMİŞ.....	104

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	Alkaleen fosfataz
ALT	Alanin transaminaz
AMH	Anti-mülleryen hormon
AST	Aspartat transaminaz
BP	Bisfenol
CK-MB	Kreatinin kinaz
DDE	Diklorobisklorofeniletan
DDT	Diklorodifeniltrikloroetan
DES	Dietilstilbestrol
EFSA	European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
EPA	United States Environmental Protection Agency (Amerikan Çevre Koruma Teşkilatı)
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GGT	Gama glutamil transferaz
H&E	Hematoksilen & Eosin boyası
Hb	Hemoglobin
Hct	Hematokrit
INSL3	İnsülin-benzeri büyüme faktörü 3
LC50	Letal konsantrasyon 50
LD50	Letal doz 50
LDH	Laktat dehidrogenaz
LH	Luteinize edici hormon
Lym	Lenfosit
MCH	Mean corpuscular hemoglobin (ortalama eritrosit hemoglobini)
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration (ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu)
MCV	Mean corpuscular volume (ortalama eritrosit volümü)
Mon	Monosit
MPV	Mean platelet volume (ortalama trombosit volümü)
N/Gr	Nötrofil lökosit/Granülosit
NOEL	No observed effect level (hiçbir etki gözlenmeyen doz)
NTP	National Toxicology Program (Ulusal Toksikoloji Programı)
OP	Oktilfenol
PDW	Platelet distribution width (trombosit dağılım genişliği)
PRL	Prolaktin

RBC	Red blood cell (eritrosit)
RDW	Red cell distribution width (eritrosit dağılım genişliği)
TdT	Terminal deoksinükleotidil transferaz
THR	Thrombocyte (trombosit)
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nick end labeling)
WBC	White blood cell (lökosit)
μ -RBC	μ -Red blood cell (μ -Eritrosit)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Alkilfenol etoksilatların mikrobiyal yıkım yolu (Warhurst, 1995'ten alınmıştır).....	12
Şekil 2.2. Oktilfenolün moleküler yapısı.....	15
Şekil 2.3. Bisfenol A'nın moleküler yapısı.....	23
Şekil 4.1. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların çalışma süresi boyunca haftalık vücut ağırlıklarını gösteren grafik.....	37
Şekil 4.2. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların ortalama ağırlık kazançlarını gösteren grafik.	38
Şekil 4.3. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların çalışma süresi boyunca haftalık ortalama su tüketimlerini gösteren grafik.	42
Şekil 4.4. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların haftalık su tüketimlerini gösteren grafik.....	43
Şekil 4.5. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların su tüketimindeki artışı gösteren grafik.....	43
Şekil 4.6. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların çalışma süresi boyunca haftalık ortalama yem tüketimlerini gösteren grafik.	44
Şekil 4.7. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların haftalık yem tüketimlerini gösteren grafik.....	45
Şekil 4.8. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların yem tüketimindeki artışı gösteren grafik.....	45
Şekil 4.9. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların ortalama vücut ağırlıklarını gösteren grafik.....	47
Şekil 4.10. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların ortalama relatif karaciğer ağırlıklarını gösteren grafik.	47
Şekil 4.11. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların ortalama dalak ağırlıklarını gösteren grafik.	48
Şekil 4.12. Kontrol grubu sıçanlarda karaciğer dokusunun histolojik yapısı (H&E, X200).....	56
Şekil 4.13. 125 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda ödem (★), konjesyon (➡) ve dejenerasyon (➡) (H&E, X200).	57
Şekil 4.14. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu (★), konjesyon (➡) ve dejenerasyon (➡) (H&E, X200).	57
Şekil 4.15. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu (★), konjesyon (➡) ve dejenerasyon (➡) (H&E, X200).	58
Şekil 4.16. Kontrol grubu sıçanlarda karaciğer dokusunun histolojik yapısı (H&E, X400).....	58

Şekil 4.17. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda ödem (➡), minimal mononükleer hücre infiltrasyonu (★) ve sitoplazmik erime (➡) (H&E, X400).....	59
Şekil 4.18. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda dejenerasyon (➡) (H&E, X400).....	59
Şekil 4.19. 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda konjesyon (➡) ve sitoplazmik erime (➡) (H&E, X400).....	60
Şekil 4.20. Kontrol grubu sıçanlarda böbrek dokusunun histolojik yapısı (H&E, X200).....	61
Şekil 4.21. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda konjesyon (➡) (H&E, X200).....	62
Şekil 4.22. 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda glomerular atrofi (➡) (H&E, X200).	62
Şekil 4.23. Kontrol grubu sıçanlarda böbrek dokusunun histolojik yapısı (H&E, X400).....	63
Şekil 4.24. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda konjesyon (➡), tübüler dejenerasyon (➡) ve artmış fibröz doku (★) (H&E, X400).....	63
Şekil 4.25. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda glomerular atrofi (➡) ve konjesyon (➡) (H&E, X400).....	64
Şekil 4.26. 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda tübüler dejenerasyon (➡) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (★) (H&E, X400).	64
Şekil 4.27. 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda tübüler dejenerasyon (➡) ve konjesyon (➡) (H&E, X400).....	65
Şekil 4.28. Kontrol grubu sıçanlarda dalak dokusunun histolojik yapısı (H&E, X200).....	66
Şekil 4.29. 125 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda dalak dokusunda konjesyon (➡) (H&E, X200).....	67
Şekil 4.30. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda dalak dokusunda fibröz doku oluşumu (★) ve konjesyon (➡) (H&E, X200).	67
Şekil 4.31. Kontrol grubu sıçanlarda dalak dokusunun histolojik yapısı (H&E, X400).....	68
Şekil 4.32. 125 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda dalak dokusunda megakaryosit sayısında artış (➡) (H&E, X400).....	68
Şekil 4.33. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda dalak dokusunda megakaryosit sayısında artış (➡) (H&E, X400).....	69
Şekil 4.34. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda dalak dokusunda fibröz doku oluşumu (★) (H&E, X400).	69

Şekil 4.35. 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanlarda dalak dokusunda fibröz doku oluşumu (★) (H&E, X400).	70
Şekil 4.36. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların apoptotik hücre sayıları.	71
Şekil 4.37. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların apoptotik indeksleri.	72
Şekil 4.38. Kontrol grubu sıçanlarda karaciğer dokusunun histolojik yapısı (TUNEL, X400).	74
Şekil 4.39. 125 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusundaki apoptotik hücreler (➡) (TUNEL, X400).	74
Şekil 4.40. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusundaki apoptotik hücreler (➡) (TUNEL, X400).	75
Şekil 4.41. 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusundaki apoptotik hücreler (➡) (TUNEL, X400).	75
Şekil 4.42. 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusundaki apoptotik hücreler (➡) (TUNEL, X400).	76
Şekil 4.43. Kontrol, pozitif kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların polikromatik eritrosit sayıları.	77
Şekil 4.44. Kontrol, pozitif kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların mikronükleuslu polikromatik eritrosit sayıları.	78
Şekil 4.45. Kontrol grubu sıçanların kemik iliği yayma preparatında polikromatik (➡) ve normokromatik (➡) eritrositler (Giemsa, X1000).	80
Şekil 4.46. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların kemik iliği yayma preparatında mikronükleuslu polikromatik eritrosit (➡) (Giemsa, X1000).	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Prenatal dönemde DES temasının erkek fare ve insanlarda gelişim üzerindeki etkileri (Newbold, 1995'ten alınmıştır)	8
Çizelge 2.2. 1992 yılında İngiltere'de kullanılan nonilfenol etoksilatların kullanım alanları (Warhurst, 1995'ten alınmıştır)	10
Çizelge 2.3. Akarsularda tespit edilen nonilfenol ve oktilfenol konsantrasyonları (µg/L) (Sharma et al., 2009'dan alınmıştır)	14
Çizelge 2.4. Oktilfenolün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri	15
Çizelge 2.5. Bisfenol A'nın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri	23
Çizelge 2.6. Akarsularda tespit edilen bisfenol A konsantrasyonları (µg/l) (Sharma et al., 2009'dan alınmıştır)	24
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan pelet yemin içeriği	33
Çizelge 4.1. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların çalışma başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları, çalışma süresince kazandıkları ağırlıklar	39
Çizelge 4.2. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların haftalık ortalama su ve yem tüketimleri	41
Çizelge 4.3. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların vücut, absolüt ve relatif organ ağırlıkları	49
Çizelge 4.4. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların hematolojik inceleme sonuçları	51
Çizelge 4.5. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların biyokimyasal inceleme sonuçları	53
Çizelge 4.6. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların karaciğer, böbrek ve dalak dokularına ait histopatolojik inceleme sonuçları	55
Çizelge 4.7. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların immünohistokimyasal inceleme sonuçları	73
Çizelge 4.8. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların sitogenetik inceleme sonuçları	79

1. GİRİŞ

Son 50 yıldır yüksek insidanslarda gözlenmeye başlanan erkek üreme sağlığı problemleri, erkek üreme sağlığının İkinci Dünya Savaşı'ndan bu yana değişen çevre ve yaşam faktörlerinin bir sonucu olarak aşamalı bir şekilde bozulduğuna işaret etmektedir. Altta yatan etioloji tam olarak bilinmemekle birlikte, insandan farklı türlerde de gözlenmeye başlanan bu problemler üreme sağlığındaki bu düşüşün etiolojisine çevresel faktörlerin katkısı olabileceğini düşündürmektedir. Yaygın olarak bulunan çevresel kontaminantların ve bazı doğal faktörlerin hormonal potansiyel teşkil edebileceğini gösteren sayısız çalışma ile birlikte farklı türlerde gözlenen üreme sağlığı problemlerinin fetal ya da çocukluk döneminde bu bileşiklere maruziyet ile ilişkili olabileceği hipotezi güçlenmiş ve araştırmalar bu konu üzerinde yoğunlaşmıştır.

Evsel, tarımsal ve endüstriyel ürünlerde emülsifiyer olarak, doğum kontrolüne yönelik uygulamalarda spermisit olarak, fenol rezinlerin imalatında plastik katkı olarak geniş kullanım alanı bulunan oktilfenol ile polikarbonat rezin, dental dolgu ve plastik imalatında monomer olarak kullanılan bisfenol A, endokrin bozucu etkileri ve östrojenik potansiyelleri hem in vivo hem de in vitro çalışmalarla ortaya çıkarılmış buna rağmen günümüzde hala en yüksek üretim kapasitesine sahip kimyasallar arasında bulunan fenolik bileşiklerdir. Isı ve asidik ya da bazik koşullar bu monomerleri birbirine bağlayan ester bağlarının hidrolizini hızlandırarak monomerlerin birbirinden kopmasına neden olmakta ve çevresel maruziyet için potansiyel oluşturmaktadır. Bu kimyasalların biyolojik parçalanabilirliği düşüktür ve metabolitlerinin sedimentte ve hemen her tip su kaynağında çeşitli konsantrasyonlarda tespit edilebildiği bilinmektedir. Lipofilik özelliklerinden ötürü bu kimyasal maddeler organizmada biyoakümüle olma eğilimindedir. Organizmada biyoakümüle olan bu bileşiklerin endokrin sistem ile üreme sağlığı üzerindeki etkileri ve etki mekanizmaları detaylı olarak çalışılmış olsa da, bu kimyasal maddelerin metabolizma üzerindeki potansiyel etkilerini inceleyen çalışma sınırlı sayıdadır.

Bu çalışmada, erkek sıçanlarda oktilfenol ve bisfenol A'ya subkronik maruziyetin yol açtığı metabolik etkiler, hematolojik, biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal parametreler ile incelenmiş ve bu kimyasal maddelerin genotoksik bir hasara neden olup olmadığı in vivo araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endokrin bozucular

Son yıllarda yapılan birçok çalışma çevredeki kimyasal maddelerin endokrin sistemin normal fonksiyonunu etkileyebileceğini göstermektedir. Bu bileşikler insan üretimi sonucu oluşan organoklorlu pestisitler, poliklorlu bifeniller, bisfenol A, alkilfenoller, fitalatlar gibi bileşikler olabileceği gibi, doğal yolla oluşan bitkisel bileşikler de olabilir. Yapılan çalışmaların birçoğu bu kimyasal maddelerin östrojenin etkilerini taklit etme özellikleri üzerinde yoğunlaşmış olsa da, bugün endokrin bozucuların yalnızca östrojenik sistemi değil, adrenal ve tiroit hormon sistemlerini de etkilediği bilinmektedir (Göktekin and Barlas, 2008). 1996 yılında İngiltere’de yapılan Weybridge konferansında, endokrin bozucu ve potansiyel endokrin bozucu bileşikler şu şekilde tanımlanmıştır: ‘Endokrin bozucu, endokrin fonksiyonda değişikliklere neden olarak organizmada veya organizmanın yavrularında istenmeyen etkilere yol açan ekzojen bir maddedir’, ‘Potansiyel bir endokrin bozucu, organizmada endokrin sistemde bozulmaya yol açması beklenen özellikler sergileyen maddedir’ (European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife, 1996).

Amerikan Çevre Koruma Teşkilatı (United States Environmental Protection Agency, EPA) ise 1997 yılında ‘endokrin bozucu, endokrin sistem fonksiyonlarını değiştirerek organizmada bireysel veya popülasyon seviyesinde istenmeyen etkilere yol açan, ekzojen kaynaklı kimyasal madde veya karışımlardır’ tanımını yapmış; 1998 yılında ‘endokrin bozucu, endokrin sistem yapısını veya fonksiyonunu değiştirerek, organizma, organizmanın yavruları, alt popülasyon veya popülasyon seviyesinde bilimsel prensiplere ve verilere dayanarak istenmeyen etkilere yol açtığı belirlenen, ekzojen kimyasal madde veya karışımlardır’ şeklinde tekrar düzenlemiştir. Günümüzde, endokrin bozucu aktivite gösterdiği bilinen veya şüphelenilen kimyasal maddelerin bir bölümünün kullanımına izin verilmemektedir. Yine de, kalıcı özellik gösterdiği bilinen bir grup kimyasal maddenin, çevrede çeşitli seviyelerde kalıntı halinde bulunduğu bilinmektedir. Özellikle besin zincirinde akümüle olan organoklorlu pestisitler hayvansal kökenli yağ içeren besinlerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu kimyasal maddelere besin yoluyla temas en önemli alım yolu olarak düşünülse de, organizmalar inhalasyon, içme suyu ile oral ve dermal yollarla da önemli ölçüde bu

bileşiklere maruz kalabilmektedir. Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerindeki etkileri ile ilgili endişeler büyük ölçüde, bu kimyasal maddelerin üreme sistemi gelişimi ve fonksiyonları üzerinde toksik etkilere yol açtığını gösteren bir seri gözlemsel ve deneysel çalışmaya dayanmaktadır.

Son yıllarda, gelişen ülkelerde gözlenen düşen sperm kalitesi, artan testiküler kanser insidansı ve artan kriptorşidizm (skrotuma inmemiş testisler) ve hipospadias (idrara deliğinin penisin en uç noktasında olmayıp daha aşağı bir seviyeye açılması) sıklığı altında yatan nedenlerin tümü *testiküler disgenez sendromu* olarak adlandırılmaktadır (Toppari et al., 2001). Çeşitli kaynaklar insan sperm kalitesinde son 60 yılda anlamlı bir düşüş olduğuna işaret etmektedir. Ancak bu çalışmaların çoğu, infertilite kliniklerine başvuran hastalarla veya seçilmiş fertil erkeklerle yapıldığından, gerçek biyolojik fenomeni yansıtmadığı düşünülmektedir. Ancak 14947 normal erkeği kapsayan 61 çalışmanın sistematik meta-analizi, 1938 yılından 1990 yılına kadar uzanan bir periyotta sperm konsantrasyonunda ve sperm volümünde anlamlı bir düşüş olduğunu ortaya koymaktadır (Carlsen et al., 1992). Sperm donorü 1351 sağlıklı erkekle yapılan bir çalışma ise 1973 yılında tespit edilen 89 milyon/mL'lik sperm konsantrasyonunun yıllık ortalama %2,1'lik bir azalmayla 1992 yılında 60 milyon/mL'lik bir konsantrasyona düştüğünü göstermektedir (Auger et al., 1995). Testiküler kanser insidansındaki artış ise İngiltere ve İskoçya'da, İskandinav ve Baltık ülkelerinde, Avustralya'da, Yeni Zelanda'da ve Amerika'da belirgin hale gelmiştir. 50 yaş altı erkeklerde testiküler kanser insidansında yıllık ortalama %2-4'lük bir artış olduğu bildirilmektedir (Toppari et al., 1996). Testiküler disgenez sendromuna yol açan mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte, eksternal endokrin bozucuların ve endokrin bozucuların aktivitelerine genetik yatkınlığın altında yatan iki faktör olduğu üzerinde durulmaktadır (Toppari, 2008).

Testiküler hormonlar testosteron, anti-mülleryen hormon (AMH) ve Leydig hücrelerinden spesifik olarak salınan insülin-benzeri büyüme faktörü 3 (INSL3) erkek üreme organlarının gelişiminde anahtar regülatörlerdir. Bu hormonlardan herhangi birinin fazlalığı dişi üreme sisteminin gelişiminde bozukluklara, eksikliği veya işlevsizliği ise maskulizasyonda problemlere yol açmaktadır. Hormonların sekresyonunda zamanlama normal organ oluşumu için büyük önem taşıdığından, eksternal bozulma kesinlikle zamanlamaya bağlıdır (Toppari, 2008). Androjen

aktivitesi gebeliğin erken dönemlerinde (7. ve 8. Hafta) eksternal genital organların maskulizasyonuna sebep olduğundan, kritik öneme sahiptir. Bu dönemde dişi fetusun androjene maruziyeti maskulizasyona, erkek fetusta ise bozulan androjen aktivitesi maskulizasyonun tamamlanamamasına neden olmaktadır (Hughes, 2001). Bu nedenle androjenik veya antiandrojenik potansiyele sahip endokrin bozucular seksüel farklılaşma için oldukça büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Kemiricilerde östrojenlerin INSL3 üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Nef et al., 2000). Ayrıca bu bileşiklerin androjen reseptör seviyelerini modüle ederek antiandrojenik etki gösterebildikleri de bilinmektedir (Sharpe, 2003). Çoğu durumda, doğal ya da sentetik hormonlarla karşılaştırıldıklarında bu bileşikler oldukça düşük seviyelerde hormonal aktivite gösterebilirler de, beraber bulunmaları durumunda aktivite oldukça yüksek seviyelere ulaşmaktadır (Kortenkamp, 2008).

Endokrin bozucu bileşiklerin birçoğu hormonal aktiviteye sahip olmamalarına karşın, hormon sentezi, metabolizması ve eliminasyonunu modifiye ederek endokrin sistemi etkilemektedir. Bu etkilerin bir veya bir kaçını da bir arada olabilmektedir.

2.1.1. Antiandrojenik bileşikler

Antiandrojenik bileşikler reseptör antagonist aktivitesine sahip olanlar ve androjenlerin sentezini ve/veya metabolizmasını etkileyenler olarak sınıflandırılabilir. Pestisit olarak kullanılan p, p'-DDT (p, p'-diklorodifeniltrikloroetan) ve p, p'-DDE (p, p'-diklorobisklorofeniletan), prosimidon, linüron ve vinklozolin metabolitleri iyi bilinen androjen reseptör antagonistleridir (Toppari, 2008). Difeniletanın bir türevi olan DDT özellikle böceklerle taşınan uyku hastalığı ve malarya gibi hastalıklarla savaşmada yaygın olarak kullanılmış bir insektisittir. 1970'li yıllarda endüstriyel olarak gelişmiş birçok ülkede üretimi ve kullanımı, DDT'nin yumurta kabuklarında incelmeye ve kuş popülasyonlarında olumsuz etkilere neden olduğunun anlaşılması üzerine yasaklanmış olmasına rağmen, malarya ile savaşmada ucuz bir alternatif olması sebebiyle gelişmekte olan ülkelerde kullanımı devam etmektedir.

DDT bileşiklerinin antiandrojenik etkileri 1990'larda ortaya çıkarılmıştır (Kelce et al., 1995). Apopka Gölü'nde (Florida) erkek timsahların penis boylarında kısalma DDT'nin ana metaboliti olan DDE maruziyetinin bir sonucudur (Guillette et al.,

1999). Sıçanlarda fetal dönemde p, p'-DDE maruziyetinin erkek yavrularda antiandrojenik etkilere yol açtığı bildirilmiştir (Gray et al., 1999). Fetal dönemde 100 mg/kg dozda DDE maruziyetinin anogenital mesafede azalmaya, erkek sıçanlarda torasik meme uçlarının varlığının sürmesine neden olduğu ortaya konmuştur. Oral yolla uygulanan 100 mg/kg p, p'-DDE'nin gelişmekte olan sıçanlarda puberteyi geciktirdiği, 200 mg/kg p, p'-DDE'nin ergin erkek sıçanlarda androjen-bağımlı ventral prostat ağırlığını düşürdüğünü gösterilmiştir (Lintelmann et al., 2003).

Güçlü bir androjen reseptör antagonisti potansiyeline sahip, antifungal ajan promisidona fetal ve erken postnatal dönemde maruziyetin erkek sıçanlarda hipospadias, vajinal kese oluşumu, anogenital mesafede azalma, yardımcı eşey bezleri büyüklüklerinde azalma ve meme uçları varlığının devamının indüksiyonu gibi etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Ostby et al., 1999). Yapılan üreme ve gelişme toksisite testleri herbisit olarak kullanılan linüronun anogenital mesafede azalma, erkek yavrularda areola (meme ucunu çevreleyen renkli bölge) insidansında artış, adrojen-bağımlı dokularda yapısal anomalilerle birlikte büyüklükte azalma gibi antiandrojenik etkiler gösterdiği ortaya konmuştur (Gray et al., 1999; Lambright et al., 2000; McIntyre et al., 2000). Fungisit ajan vinklozolinin ise erkek sıçanlarda eşeyssel farklılaşmayı etkilediği bildirilmektedir. Fetal dönemde vinklozoline maruziyet erkek sıçanlarda hipospadias, ektopik testis, vajinal kese oluşumu ve meme uçları varlığının devamına neden olmaktadır (Lintelmann et al., 2003).

2.1.1.1. Diğer antiandrojenik bileşikler

Antiandrojenik bileşiklerden bazıları androjen biyosentezini inhibe ederek androjen aktivitesini etkilemektedir. Dietilhekzil fitalat, di-n-bütil fitalat ve benzibütilfitalat androjen biyosentezini etkileyen fitalat esterleridir. Ne polivinilklorid plastiklerin imalatında plastizer olarak kullanılan dietilhekzil fitalat ne de metaboliti monoetilhekzil fitalat androjen reseptörüne bağlanabilir (Parks et al., 2000). Dietilhekzil fitalat antiandrojenik etkisini fetal Leydig hücresi fonksiyonlarını inhibe ederek göstermektedir (Parks et al., 2000). Ancak bir şekilde diğer antiandrojenlerden ve diğer fitalat esterlerinden farklı etkiler göstermesi, dietilhekzil fitalatın antiandrojenik etkilerinin altında farklı mekanizmaların olduğunu düşündürmektedir (Moore et al., 2001). Di-n-bütil fitalata fetal dönemde maruziyet,

erkek sıçanlarda epididimis ve vas deferens malformasyonları, hipospadias, anogenital mesafede azalma ve ilerleyen dönemlerde testiküler yapılarda organizasyon bozukluğu gibi ciddi antiandrojenik etkilere yol açmaktadır (Foster et al., 2001).

2.1.2. Östrojenik bileşikler

Östrojenler dişilerde ikincil eşeyssel özelliklerin gelişimini, dişi üreme döngüsünü, fertilitiyi ve gebeliğin devamını sağlayan steroidlerdir. Gelişmekte olan erkeklerde ise, östrojenlerin fizyolojik rolü tam olarak ortaya çıkartılmamış olmakla birlikte, östrojen reseptörlerinin testislerde Leydig hücreleri, seminifer tübüllerde Sertoli ve germ hücreleri, efferent duktuslar ve epididimiste yerleşimi ve buralarda yaygın olarak bulunması nedeniyle, östrojenlerin bu hücrelerin farklılaşmasının ve işlevinin düzenlenmesinde rol oynadıkları düşünülmektedir (Sharpe, 1994). Östrojenlerin, birçok hayvan türünde testis ve rete testis sıvılarında ve interstisyel sıvıda yüksek konsantrasyonlarda bulunması bu görüşü desteklemektedir (Hess, 2000). Ancak yüksek dozlarda östrojenlerin, gelişmekte olan fetüste androjen reseptörlerini down-regüle ederek, östrojen-androjen dengesini bozduğu bilinmektedir (Williams et al., 2001).

Östrojenik bileşikler hem erkek hem dişi fetüslerde yapısal ve fonksiyonel anomalilere yol açarken, androjenik bileşikler sadece dişi fetüslerde, antiandrojenik bileşikler ise sadece erkek fetüslerde etkili olmaktadır (Toppari, 2008).

Östrojenlerin erkek üreme ve gelişimi üzerindeki olumsuz etkileri antiandrojenlerin etkilerine benzerlik göstermektedir (Toppari, 2008).

2.1.2.1. Doğal östrojenler

Östrojenlerin dahil olduğu steroid hormonlar grubu, vücutta hızla metabolize edildikten sonra genellikle suda çözünebilen glukuronat veya sülfat konjugatları şeklinde vücuttan atılan moleküllerdir (Lintelmann et al., 2003). Organizmanın yaş, sağlık ve gebelik durumuna göre değişen oranlarda vücuttan atılan östrojen miktarları önemsiz gibi görünse de, yapılan çalışmalar çevreye özellikle tarımsal aktiviteler sonucu giren doğal östrojenlerin, sularda ve sedimentte önemli konsantrasyonlara ulaştığını ortaya koymaktadır. Amerika'da 17 farklı noktada yapılan çalışmalar, östrojenlerin işlenmemiş atık sularda 49-73 ng/L, işlenmiş atık

sularda ise 0,8-4,0 ng/L konsantrasyonlar arasında bulunduğunu göstermektedir (Shore et al., 1995). Almanya'da yüzey sularından, sedimentlerden ve işlenmiş atık sulardan alınan örneklerle yapılan geniş çaplı bir çalışma, 117 yüzey suyu örneğinin 6'sında 0,8-29 ng/L konsantrasyon aralığında 17 β -östradiol bulunduğunu, 14 örneğin en az bir östron ve estriol metaboliti içerdiğini ortaya koymuştur. 12 göl sedimentinin analizi, 3 sedimentte 17 β -östradiol, işlenmiş atık suların analizi ise 52 örneğin 17'sinde en az bir doğal östrojenin varlığını göstermiştir (Lintelmann et al., 2003).

2.1.2.2. Sentetik östrojenler

Bu grup bileşiklerin büyük bir çoğunluğunu doğum kontrol hapları (ovülasyon inhibitörleri) ve menapoz döneminde hormon replasman tedavisi sırasında kullanılan steroidler oluşturmaktadır. Östradiol ve progesteron gibi doğal hormonlar oldukça hızlı metabolize edildiklerinden, bu tip uygulamalarda etilleme veya alkilleme ile metabolizasyonları engellenmiş sentetik steroidlerden faydalanılmaktadır (Lintelmann et al., 2003). Bu grup östrojenik bileşiklerden, ilk kez 1938 yılında Londra'daki laboratuvarlarında Sir Edward Charles Dodds ve ark. tarafından sentezlenen ve 1940-1970 yılları arasında yüksek riskli gebeliklerde düşükleri engelleme amacıyla yaygın olarak kullanılan dietilstilbestrol (DES), 1971 yılında gebeliklerinde DES kullanan annelerin adölesan kız çocuklarında vajinal adenokarsinoma olarak bilinen nadir bir kanser türünün saptanmasıyla başlayan ve birçok farklı çalışmayla bildirilen çeşitli toksisitelerden sonra östrojenik toksisitenin ilk ve en önemli örneklerinden biri haline gelmiştir (Newbold, 1998). Bu toksik etkinin yanı sıra, ovidukt, uterus, serviks ve vajinada DES maruziyetine bağlı yapısal ve fonksiyonel değişiklikler belirlenmiş ve benzer şekilde erkeklerde de prenatal temas sonrası yapısal, fonksiyonel ve hücrel anomaliler bildirilmiştir (Newbold, 1998). Prenatal dönemde DES temasının erkek fare ve insanlarda yol açtığı olumsuz etkiler Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Prenatal dönemde DES temasının erkek fare ve insanlarda gelişim üzerindeki etkileri (Newbold, 1995'ten alınmıştır)

Gelişim üzerindeki etkiler	Fare	İnsan
Subfertilite	+	+
Sperm anomalileri	+	+
Düşük sperm sayısı	+	+
Epididimal kist	+	+
Hipoplastik ve kriptorşik testisler	+	+
Testiküler tümörler		
İnterstitiyal hücre tümörleri	+	?
Seminoma	+	+
Rete tümörleri	+	?
Anatomik feminizasyon	+	+
Mikrofallus (penisin aşırı küçüklüğü)	+	+
Hipospadias	+	+
Müller kanallarının varlığını sürdürmesi	+	+
Varlığını sürdüren müler kanallarında tümörler	+	?
Seminal vezikül tümörleri	+	?
Prostatik inflamasyon	+	+
Prostatik tümörler	+	?
İmmün bozukluklar	+	+

2.1.2.3. Fitoöstrojenler

Fitoöstrojenler bitkilerde östrojenik aktivite sonucu oluşan bileşiklerdir. Bitkilerde fenilpropan ve basit fenollerden sentezlenen fitoöstrojenler, kimyasal olarak çok geniş çeşitlilik gösterirler (Büyüktuncer ve Başaran, 2005). Fitoöstrojenlerin östrojenik aktiviteye sahip olduğunu ilk olarak 1946 yılında Emmens tarafından izoflavonca zengin bir çeşit yonca (*Trifolium subterraneum*) ile beslenen koyunlarda infertilite sendromlarının geliştiğinin fark edilmesi ile anlaşılmıştır. Araştırmacı, 'progöstrojen' olarak adlandırdığı bu bileşiklerin hayvanlar tarafından metabolize edildikten sonra aktif hale geçerek östrojenik etki gösterdiğini bildirmiştir (Lintelmann et al., 2003). Geniş çaplı mera hayvancılığının yapıldığı Avustralya'da, koyunlarda mera ıslah çalışmalarını takiben kısırlık oranlarının artması, araştırmacıların dikkatini bitkilerin östrojenik etkileri üzerine yoğunlaştırmıştır

(Coşkun ve İmir, 1991). Overektomize fare ve sıçanlarla yapılan çalışmalar da bu bileşiklerin östrojenik potansiyelini doğrulamıştır (Medlock et al., 1995). In vitro çalışmalar ise, fitoöstrojenlerin 10^{-3} - 10^{-4} lük 17β -östradiyol potansiyeli ile östrojen reseptörüne bağlandığını göstermektedir (Lintelmann et al., 2003). Ancak bu bileşiklerin metabolizmaları, absorpsiyonları, potansiyel ve bildirilen yararlı etkileri ile ilgili mekanizmalar ve bu etkiler için gerekli optimal ve toksik dozlar ile ilgili veriler yetersizdir (Büyüktuncer ve Başaran, 2005).

2.1.2.4. Çevresel östrojenler

Çevresel östrojenler, östrojenik aktivite göstermelerine rağmen doğal östrojen hormonunun kimyasal yapısından oldukça büyük farklılık göstermektedirler ve bu bileşiklerin çoğu, sitozoldeki östrojen reseptörüne bağlanma ilgisi yönünden doğal östrojenlerden zayıftırlar (White et al., 1994).

2.1.2.4.1. Alkilfenol etoksilatlar ve alkilfenoller

Alkilfenol etoksilatlar, dallanmış zincirli bir alkilfenolün etilen oksitle reaksiyona girmesiyle oluşan ve sürfektan özelliğini yapısına katılan etilen oksit birimlerinden alan non-iyonik bileşiklerdir. Ticari formülasyonları genellikle homologların, oligomerlerin ve izomerlerin kompleks bir karışımıdır. Yapısındaki etoksilat zinciri molekülün kullanım alanına bağlı olarak tekrarlayan 1-100 etoksi birimine sahip olabilir. Bu zincirin uzunluğundaki artış molekülün hidrofilik özelliğinde de artışa neden olmaktadır (Lintelmann et al., 2003). Temizlik ürünlerinde kullanılan alkilfenol etoksilatlar genellikle 9-10 birim uzunluğundadır (Warhurst, 1995). Alkilfenol etoksilatların fenol rezinlerin üretimi sırasında plastik katkı maddeleri olarak, evsel, tarımsal ve endüstriyel ürünlerde emülsifiyer olarak, doğum kontrolüne yönelik uygulamalarda spermisit olarak kullanım alanları bulunmaktadır (Lintelmann et al., 2003). 1940'larda İngiltere'de evsel ve endüstriyel ürünlerde yaygın kullanım alanı bulan alkilfenol etoksilatların, evsel deterjanlarda kullanılması 1976'da sona erdirilmiştir (Warhurst, 1995). 1992 yılında İngiltere'de yaklaşık 17600 ton nonilfenol etoksilat kullanılmış, bu kimyasalların kullanım alanları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir. Bugün endüstriyel sürfektan olarak varlığını sürdüren bu kimyasallar, Amerika'da total sürfektan üretiminin %6'sını, total non-iyonik sürfektan üretiminin ise %25'ini oluşturmaktadır (Nimrod and Benson, 1996). Alkilfenol etoksilatların dünya çapında yıllık üretimlerinin 500 000 tona

ulaştığı bildirilmektedir (Ying et al., 2002). Üretim kapasitesi en yüksek alkilfenol etoksilatların başında, dünya pazarında sahip olduğu %82'lik payla, nonilfenol etoksilat yer almaktadır.

Çizelge 2.2. 1992 yılında İngiltere'de kullanılan nonilfenol etoksilatların kullanım alanları (Warhurst, 1995'ten alınmıştır)

Endüstri	Tüketim (ton)
Endüstriyel ve kurumsal temizlik	7.500-8.500
Boya	2.000-3.000
Tarımsal formülasyonlar	2.000
Emülsiyon polimerleri	1.500
Tekstil	1.000
Metal finisaj (işleme)	1.000
Nonilfenol etoksilat esterleri	600
Diğer	100-1.000
Toplam	14.500-18.500

Alkilfenol etoksilatların atık su işletme merkezlerinde veya çevrede mikrobiyal olarak yıkımı, nonilfenol, oktilfenol ve daha kısa zincirli metabolitlerin oluşumuna yol açmaktadır (Lintelmann et al., 2003). Etoksi gruplarının aşamalı olarak kaybedilmesiyle oluşan bu yıkım ürünleri, ana bileşiklerden daha kalıcı, lipofilik ve çok daha toksiktir (Thiele et al., 1997; Lintelmann et al., 2003). Yüksek hidrofobik ve lipofilik özellikleri nedeniyle bu yıkım ürünleri organizmada biyoakümüle olma eğilimindedirler (Lintelmann et al., 2003). Alkilfenollerin sucul bitkilerde, alglerde, balıklarda ve midyelerde biyoakümüle olduğu bildirilmiştir (Safe and Gaido, 1998; Liber et al., 1999). Bu bileşiklerin sucul toksisitesi alkilfenolün etoksilat birimlerindeki azalma ve hidrofobik zincir uzunluğunun artışıyla yakından ilişkilidir. Örneğin, 48 saat içinde sucul sistemde bulunan nonilfenol 16-etoksilatın balıkların (*Oryzias latipes*) %50'sini öldüren konsantrasyon (LC₅₀) 100 mg/L iken, bu değer nonilfenol 9-etoksilat için 11,2 mg/L'ye, nonilfenol için ise 1,4 mg/L'ye yükselmektedir (Lintelmann et al., 2003).

2.1.2.4.1.1. Alkilfenol etoksilatların yıkım mekanizmaları

2.1.2.4.1.1.1. Mikrobiyal yıkım

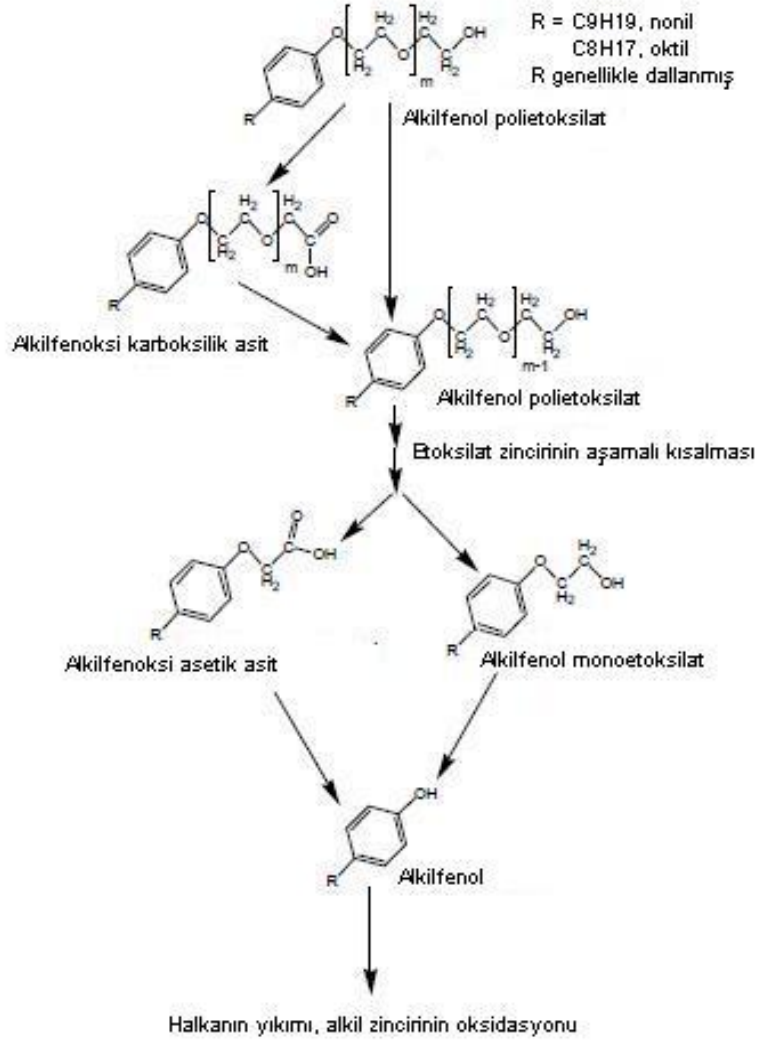
Alkilfenol etoksilatların mikrobiyal yıkım yolu henüz tümüyle açığa çıkarılmamış olmakla birlikte, mikrobiyal metabolizmanın hidrofobik halkadan ziyade etoksilat zincirine saldırısıyla başladığı bilinmektedir (Warhurst, 1995). Etoksilat grupları ya eter grubunun ayrılması ya da terminal alkol oksidasyonunu takiben oluşan karboksilik asitin ayrılmasıyla aşamalı olarak kaybedilir. Ball ve ark. 1989 yılında oktilfenol polietoksilat karışımının bakteriyel kültürlerde biyotransformasyonunu aerobik ve anaerobik koşullarda çalışarak, aerobik koşullar altında daha uzun zincirli oktilfenol etoksilatın (n=4-5) 12 saatten daha kısa bir sürede daha kısa oktilfenol etoksilata (n=1-3) yıkıldığını gözlemlemiştir. Aynı anda, daha yavaş yıkılan ve kalıntıları 127 gün sonra bile bulunabilen oktilfenoksiasetik asit oluşmuştur. Oktilfenoksiasetik asidin geniş bir zaman zarfında (n=3 için >36 gün) oktilfenol etoksilata dönüşebileceği de bulunmuştur (Warhurst, 1995). Anaerobik koşullar altında ise, uzun zincirli oktilfenol etoksilatın kısa zincirli oktilfenol etoksilata (n=1) dönüşümü 10 gün içinde olmaktadır. Oluşan bu kısa zincirli oktilfenol etoksilat daha sonra yavaşça oktilfenole dönüşmektedir. Oktilfenol anaerobik kültürlerde biyoakümüle oluyor görünmektedir. Modifiye oktil gruplarıyla ara basamaklar anlaşılmaya çalışılsa da, kısa zincirli oktilfenol etoksilat ve oktilfenoksiasetik asidin aerobik koşullardaki akibeti belirlenememiştir (Warhurst, 1995).

Benzer sonuçlar 1994 yılında atık su ve akarsulardan izole edilen bakteri kültürlerinde hem oktil hem de nonilfenolün yıkımını araştıran Ahel ve ark. tarafından da elde edilmiştir (Warhurst, 1995).

1994 yılında Maki ve ark. nonilfenol etoksilatı (n=9) karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen *Pseudomonas* sp. suşu TR01'i izole edebilmelerine karşın, bu bakterilerin nonilfenol etoksilatı mineralize etme yeteneğinde olmadığını saptamışlardır (Warhurst, 1995).

Bu çalışmalar bakterilerin alkilfenol etoksilatları daha kısa zincirli alkilfenol etoksilatlara, alkilfenoksiasetik aside ve alkilfenollere etoksilat zincirini aşamalı olarak yıkarak dönüştürebildiklerini göstermiş olsa da, bu kimyasalların

nihai akıbetleri hakkında fikir vermemektedir (Warhurst, 1995). Alkilfenol etoksilatların mikrobiyal yıkım yolu Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Alkilfenol etoksilatların mikrobiyal yıkım yolu (Warhurst, 1995'ten alınmıştır).

2.1.2.4.1.1.2.Fotokimyasal yıkım

Ahel ve ark. 1994 yılında, nonilfenolün mikrobiyal yıkımın yanında fotokimyasal yıkıma da duyarlı olduğunu göstermiştir. Filtre edilmiş göl suyu kullanılan çalışmada, nonilfenolün yaz güneşi altında yüzeyde 10-15 saatte, 20-25 cm derinlikte ise 1.5 kat daha yavaş bir hızda yarılandığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, çevrede bu dönüşümün mikrobiyal yıkımla kıyaslandığında anlamlı olamayacağını göstermektedir (Warhurst, 1995).

2.1.2.4.1.1.3.Atık su arıtma sırasında yıkım

Atık su arıtımı sırasında alkilfenol etoksilatların yıkımını araştıran çeşitli çalışmalar olmasına karşın, bu çalışmaların pek çoğu alkilfenoksipolietoksi asetik asit seviyelerini belirlememiştir. İsviçre’de 1994 yılında Ahel ve ark. tarafından yapılan çalışmada kanalizasyon çamurunda nonilfenolik bileşiklerin %95 ‘lik bir bölümünü nonilfenolün, geriye kalan %5’lik bölümünü ise nonilfenol 1- ve nonilfenol 2-etoksilatın oluşturduğu görülmüştür. Nonilfenolün bu yüksek seviyeleri, kısmen nonilfenolün hidrofobik doğasına, kısmen de anaerobik yıkım sonucu diğer nonilfenolik bileşiklerin nonilfenole dönüşmesine bağlıdır (Warhurst, 1995). 1987 yılında yapılan başka bir çalışmada Giger ve ark. anaerobik yıkımla nonilfenol konsantrasyonunun 15 kat arttığını bildirmiştir (Warhurst, 1995).

Bazı atık su arıtma tesislerinde suyun sterilizasyonu amacıyla yapılan klorlamanın atık suyun mutajenitesini arttırdığı bildirilmiştir (Warhurst, 1995). Yapılan mutajenik fraksiyon analizlerinde, atık suda klorlama sonucu oluşan bromlanmış alkilfenoksipolietoksi asetik asitler tespit edilmiştir. Yapılan başka çalışmalarda da atık sularda asitler 51 µg/L’ye varan oranlarda klorlanmış ve bromlanmış oktilfenol etoksilat ve oktilfenol karboksilik asit varlığı gösterilmiştir (Warhurst, 1995).

2.1.2.4.1.2. Alkilfenol etoksilat ve alkilfenollerin çevresel durumu

Akarsularda tespit edilen alkilfenol konsantrasyonları Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Akarsularda tespit edilen nonilfenol ve oktilfenol konsantrasyonları ($\mu\text{g/L}$) (Sharma et al., 2009'dan alınmıştır)

Ülke	Nonilfenol	Oktilfenol	Referans
Amerika	<0,011-37	<0,002-0,7	Snyder et al., 1999
Kanada	<0,01-0,92	<0,005-0,084	Bennie et al., 1997
Almanya	0,006-0,135	0,0008-0,054	Kuch & Ballschmiter, 2001
	0,013-0,053	<0,0005-0,0033	Stachel et al., 2003
İspanya	15	<0,15-0,3	Petrovic et al., 2002
İngiltere	<1,6-53	<1	Blackburn & Waldoek, 1995
Fransa	0,06-0,550	<0,001-0,077	Fenet et al., 2003
Japonya	0,051-1,08	0,01-0,18	Isobe et al., 2001
Çin	1,9-32,8	0,027-1,44	Wu et al., 2007

Alkilfenol etoksilatların tespit edilen konsantrasyonlarındaki bu çeşitliliğin tarımsal aktiviteler ve endüstriyel atık suların tahliyesinden etkilendiği bilinmektedir. Çevreye salınan nonilfenolün büyük bir bölümünü, fenol halkasına bağlı alkil zincirinin farklı pozisyonlarda bulunduğu ve farklı yapılaraya sahip 100'den fazla izomerin kompleks bir karışımı olan teknik nonilfenol oluşturmaktadır (Sharma et al., 2009).

2.1.2.4.1.3. Alkilfenol etoksilat ve alkilfenollerin östrojenik etkileri

Alkilfenollerin östrojenik etki gösterebilecekleri ilk kez 1938 yılında Dodds ve Lawson overektomize sıçanlara 100 mg/kg propilfenol uyguladıkları çalışmalarının sonuçları yayınladıklarında fark edilmiştir (Warhurst, 1995). Bu kimyasal, östradiyolün etkilerini taklit ederek overektomize sıçanlarda normal bir östrus döngüsünde olduğu gibi vajinal kornifikasyona neden olmuştur. Bu çalışmanın sonuçları ayrıca, alkilfenolün alkil zinciri yalnızca para-pozisyondayken östrojenik aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır.

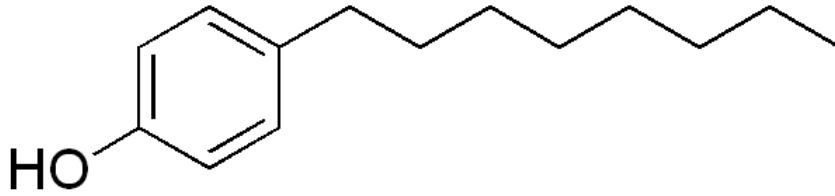
1991 yılında, polisitrenden salınan ve nonilfenol olduğu tespit edilen bir kontaminantın meme kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırma kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Soto et al., 1991). Daha sonra yapılan çalışmalar

alkilfenollerin östrojenik etkilerini detaylı olarak ortaya koymuştur. White ve ark. (1994) yaptıkları çalışma ile alkilfenollerin balık, kuş ve memeli hücrelerinde östrojen reseptörlerine bağlanarak 17 β -östradiyolün etkilerini taklit ettiklerini göstermiştir. Alkilfenoller arasında 10⁻⁴ lük 17 β -östradiyol potansiyeli ile oktilfenolün en yüksek aktiviteyi gösterdiği, nonilfenol, bütilfenol ve pentifenollerin 10⁻⁵ lik bir potansiyelle oktilfenolü takip ettikleri bildirilmiştir (Soto et al., 1995).

Yapılan çalışmalar erkek balıklarda oktilfenole maruziyetin sadece eşeyssel olgunluğa ulaşmış dişi balıklarda bulunan vitellojen proteininin üretimini indüklediğini göstermektedir (Madsen et al., 2003).

2.1.2.4.1.3.1. Oktilfenol

Oktilfenolün moleküler yapısı Şekil 2.2'de, bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Oktilfenolün moleküler yapısı.

Çizelge 2.4. Oktilfenolün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Moleküler formülü	C ₁₄ H ₂₂ O
CAS numarası	140-66-9
Moleküler ağırlığı	206.36
Fiziksel hali ve rengi	Beyaz kristal veya toz
Erime noktası	79-82 °C
Kaynama noktası	280-283 °C
Yoğunluğu	950 kg/m ³
Buhar basıncı	20 °C'de 0.001 kPA
Suda çözünürlüğü	22 °C'de 19 mg/l
pKa	25 °C'de 10.33

Oktilfenol, fenolün diizobütillenle 80-100 °C sıcaklıkta kapalı sistemde katalitik reaksiyona girmesiyle oluşan bir bileşiktir. Üretilen oktilfenolün çoğu rezin, non-

iyonik sürfektan ve kauçuk imalatında, daha az bir kısmı uçak yakıtlarında antioksidan, yakıt stabilizörü, renklendirici, fungusit ve bakterisit imalatında kullanılmaktadır (OECD SIDS, 1995). Amerika'da kullanılan oktilfenolün en az %95-98'lik bir bölümü pazara ulaşmadan kimyasal olarak değişime uğratılmaktadır (OECD SIDS, 1995). Oktilfenolün doğal bir oluşumu yoktur, çevrede bulunmaları sadece insan üretiminin sonucudur.

2.1.2.4.1.3.1.1. Oktilfenolün toksisitesi

2.1.2.4.1.3.1.1.1. Toksikokinetik

Memeli modelinde oktilfenol toksikokinetiğinin ortaya çıkarılması amacıyla Certa ve ark. (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, erkek Wistar sıçanlara tek doz gavaj şeklinde 50 veya 200 mg/kg oktilfenol uygulamasından sadece 10 dk sonra bu bileşik kanda tespit edilmiş ve böylece oktilfenolün sindirim kanalında hızlı bir şekilde emildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, farklı gruplara 50 veya 200 mg/kg dozlarda oral gavaj yoluyla 14 gün oktilfenol uygulanmış, çalışma sonunda 50 mg/kg oktilfenol uygulanan gruplarda yağ ve karaciğer dokusunda düşük konsantrasyonlarda, 200 mg/kg oktilfenol uygulanan gruplarda testis dışında analiz edilen tüm dokularda oktilfenole rastlanmıştır. Karaciğer fraksiyonlarıyla yapılan in vitro analizlerde oktilfenolün düşük dozlarda dokularda birikmediği ve karaciğerde glukuronidasyon ve sülfatasyon yollarıyla elimine olduğu, yalnızca bu detoksifikasyon yolları yüksek dozlarda doygunluğa ulaştığında organizmada biyoakümüülasyonun gerçekleşeceğini bildirmişlerdir (Certa et al., 1996). Bu çalışmayla uyumlu olarak sıçanlarda nonilfenolle yapılan birçok çalışmada alkilfenollerin karaciğerde glukuronit konjugatına metabolize edildiğini göstermektedir (Moffat et al., 2001; Doerge et al., 2002).

2.1.2.4.1.3.1.1.2. Akut toksisite

48 saat içinde oktilfenole maruz kalan balık popülasyonunun (*Pimephales promelas*) %50'sini öldüren madde konsantrasyonu (LC₅₀) 0,25 mg/L, *Daphnia magna*'da ise 0,27 mg/L'dir (OECD SIDS, 1995).

Doğrudan uygulanan oktilfenolün, sıçan popülasyonunun %50'sini öldüren oral dozu (LD₅₀) >2000 mg/kg, farelerde ise 3210 mg/kg'dır (OECD SIDS, 1995).

2.1.2.4.1.3.1.1.3. Üreme ve gelişme toksisitesi

Alkilfenollerin üreme ve gelişme üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Aydoğan ve Barlas (2006) üreme organlarının ve eşeyssel farklılaşmanın meydana geldiği fetal dönemde 100 ve 250 mg/kg dozlarında oktilfenol uyguladıkları erkek sıçanlarda, testis ve epididimiste gözlenen histopatolojik bulgularda artış, anormal sperm morfolojisi yüzdesinde artış, yüksek doz grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında epididimis ağırlığında artış ve yine yüksek doz grubunda düşük doz grubuyla karşılaştırıldığında prostat ağırlığında artış saptamışlardır.

Blake ve ark. (2004) oktilfenolün erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerini araştırma amacıyla yaptıkları çalışmada, 4 aylık süre boyunca içme suyuyla uygulanan oktilfenolün su ve besin tüketimi, vücut ağırlığındaki artış, üreme organ ağırlıkları, ortalama serum LH, FSH veya testosteron konsantrasyonları, relatif testiküler hücre sayıları veya testiküler sperm sayısı üzerinde herhangi bir etki göstermediğini fakat uygulanan tüm dozlarda kuyruk anomalisine sahip epididimal sperm insidansında artış ve epididimal sperm sayısında azalma gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar daha önceki yıllarda yaptıkları çalışmalarında (Blake ve Boockfor, 1997) ise sıçanlara 80 mg/kg dozda subkütan olarak uyguladıkları oktilfenolün ergin erkek sıçanlarda LH, FSH ve testosteron sekresyonunu inhibe ettiğini, buna karşın PRL sekresyonunu arttırdığını, yine aynı yıl yaptıkları başka bir çalışmada testis, epididimis ve erkek üreme sistemini oluşturan diğer bezlerin boyutlarında normal histolojik yapıdaki değişimlerin eşlik ettiği küçülmeler, testiküler ve epididimal sperm sayısında azalma ile baş ve kuyruk anomalilerine sahip sperm yüzdelerinde artış tespit etmişlerdir (Boockfor ve Blake, 1997). Araştırmacılar 1997 yılında yaptıkları bu çalışmalarla enjekte edilen oktilfenolün gözlemledikleri etkilerini oktilfenolün toksik aktivitesinden ziyade östrojenik aktivitesi ile ilişkilendirmişlerdir (Blake et al., 2004).

Nagao ve ark. (2001b) Sprague-Dawley sıçanlarda doğumdan sonraki 1. günden 5. güne kadar gavaj yoluyla 12,5, 25, 50 ve 100 mg/kg oktilfenol uyguladıkları çalışmada, yüksek dozlarda sıçanlarda gelişimin baskılandığını ve pubertenin geciktiğini fakat östrus döngüsü, kopulasyon, fertilité, sperm sayısı ve serum testosteron konsantrasyonlarının etkilenmediğini göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar nonilfenolün potansiyel üreme toksisitesini araştırmak amacıyla yaptıkları

multijenerasyon çalışmasında ise nonilfenolün 2, 20, 50 mg/kg oral konsantrasyonlarının ergin sıçanların üreme performansları üzerinde etki göstermediğini bildirmişlerdir. Dişi F₁ jenerasyonunda ise 50 mg/kg doz uygulanan grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında erken vajinal açılma gözlenirken, erkek F₁ jenerasyonunda prepusyal ayrılma (glansın ve üst derinin birbirinden ayrılması) zamanı açısından gruplar arası bir farklılık tespit edilememiştir. F₂ jenerasyonunda uygulamaya bağlı etki gözlenmemiştir (Nagao et al., 2001a).

Bøgh ve ark. (2001) domuzlarla yaptıkları çalışmada, gebe domuzlara uygulanan oktilfenolün gebelik süresini uzattığını ve parental jenerasyonun servikal epitelyumunda bazal hücre proliferasyonunu indüklediğini, doğan yavrularda puberte başlangıcının öne çekildiğini göstermişlerdir.

Bian ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, 50, 150 ve 450 mg/kg dozlarında oral yolla uygulanan oktilfenolün testis, epididimis ve prostat boyutu ve ağırlığında azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada 450 mg/kg doz uygulanan grupta gözlenen günlük sperm üretimi ve sperm sayısındaki anlamlı düşüş, spermatogenezin yüksek doz oktilfenolden olumsuz etkilendiğini göstermektedir.

Bu çalışmaların aksine, Tyl ve ark. (1999) oktilfenolün potansiyel üreme toksisitesini belirlemek amacıyla diyet yoluyla 0, 0.2, 20, 200 ve 2000 ppm konsantrasyonlarında oktilfenol uyguladıkları CD sıçanlarla yaptıkları bir multijenerasyon çalışmasında, yüksek doz grubunda oktilfenolün erişkin sıçanlardaki etkilerinin yalnızca vücut ağırlığındaki ve besin tüketimindeki minimal azalmalarla sınırlı olduğunu, 3 jenerasyon erkek sıçanlarda (F₀, F₁, F₂) üreme organları ve sperm ölçümleri üzerinde uygulamaya bağlı bir etki gözlenmediğini, yalnızca yüksek doz uygulanan süttten kesilmiş yavrularda vücut ağırlıklarında azalma ve organ ağırlıklarında minör değişikliklerin olduğunu bildirmişlerdir. Aynı jenerasyondaki erişkinlerde ve yavrularda organ ağırlık değişimleri gözlenmediğinden, bu yavrularda gözlenen değişiklikler oktilfenol toksisitesiyle ilişkili kabul edilmemiştir. Araştırmacılar, yüksek doz uyguladıkları grupta erkek yavrularda prepusyal ayrılmanın, dişi yavrularda ise vajinal açılmanın geciktiğini gözlemlemişler ve bu bulguları diğer gelişimsel gecikmelerle ilişkilendirmişlerdir. Bu çalışmada, oktilfenolün testis, prostat veya ovaryum ağırlıkları veya

morfolojisinde, sperm sayısı, morfolojisi, motilitesi, üretimi veya östrus döngüsü olmak üzere üremeyle ilgili herhangi bir parametrede etkili olmadığı belirtilmiştir.

Kim ve ark. (2003) prepubertal erkek sıçanlarla yaptığı bir çalışmada, 40 mg/kg dozda subkutan yolla uygulanan oktilfenolün testis, epididimis ve seminal vezikül boyut ve ağırlıklarında azalmaya neden olduğunu, maruziyet süresine bağlı olarak testisin histolojik yapısında farklılıklar meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Apoptozun genetik regülasyonundan sorumlu Bcl-2 ailesi gen ekspresyonu analizleri ve TUNEL boyama sonuçları oktilfenolün, testiküler germ hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir.

Yalnızca dişi sıçanlarla yapılan bir çalışmada, doğumdan bir gün sonra subkutan yolla uygulanan 500 mg/kg oktilfenolün vajinal açılma zamanı üzerinde etkili olmadığı, doğumdan 3 ay sonra yapılan incelemelerde ise uygulama yapılan 11 sıçandan 9'unun (%81) kalıcı vajinal östrusta olduğu gözlenmiştir (Blake and Ashiru, 1997). Neonatal dişi sıçanlarla yapılan başka bir çalışmada, subkutan yolla uygulanan 100 mg/kg oktilfenolün LH, FSH ve PRL'nin döngüsel salınımını ve ergin dönemde seksüel davranışları (lordosis refleksi) olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Herath et al., 2001).

Sharpe ve ark. (1995) fetal ve neonatal dönemde uyguladığı 100 ve 1000 µg/L oktilfenolün relatif testis ağırlıklarında düşüğe neden olduğunu bildirmiş, fakat bu bulguları 1998 yılında tekrarladığı çalışmasında gösterememiştir (Sharpe et al., 1998).

Oktilfenolle yapılan in vitro hücre kültürü çalışmaları da, bu kimyasalın sıçan Sertoli hücrelerinde apoptoza karşı koruyucu protoonkogen Bcl ekspresyonunu azaltarak ve kaspaz üyelerini aktive edici Bax ekspresyonunu arttırarak apoptoza yol açtığını göstermektedir (Qian et al.,2006).

Raychoudhury ve ark. (1999) yaptıkları hücre kültürü çalışmasında, $\geq 10^{-8}$ M konsantrasyonlarında 24 saatlik oktilfenol uygulamasının ergin CD sıçanlardan izole ettikleri spermatojenik hücrelerde ölüme yol açtığını belirlemişlerdir. Aynı çalışmada kullandıkları 19-21 günlük sıçanlardan elde edilen Sertoli hücre kültürlerinde ise oktilfenolün 10^{-12} M kadar düşük konsantrasyonlarda bile hücrelerin yaşama yeteneğini anlamlı ölçüde azalttığını tespit etmiş ve oktilfenolün spermatogenezi bozucu etkisini bu yolla gösteriyor olabileceğini bildirmişlerdir.

Chitra ve ark. (2002) ise yaptıkları çalışmada oral yolla 1, 10 ve 100 µg/kg nonilfenol uyguladıkları erkek sıçanlarda epididimal spermde antioksidan enzim aktivitelerinde azalma ve lipid peroksidasyonunda artışla karakterize oksidatif hasar tespit etmişlerdir. Reaktif oksijen türevlerinin oluşumu, patolojik durumlar için spermatozoanın kendi ürettiği bir savunma mekanizması olsa da, oksijen türevlerinin aşırı oluşumunun spermatozoada fonksiyon bozukluğuna neden olduğu bilinmektedir (Kessopoulou et al., 1992). Bu çalışma, alkilfenollerin erkek üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkilerini oksidatif hasar üzerinden gösteriyor olabileceğine işaret etmektedir.

2.1.2.4.1.3.1.1.4. Hepatorenal toksisite

Alkilfenollerin karaciğerdeki etkileri henüz uzun süreli çalışmalarla gösterilmemiş olsa da sitokrom P450 gibi karaciğer monooksijenaz enzimlerinin bu kimyasal maddelerin biyotransformasyonunda yer aldıkları (Hanioka et al., 1999) ve alkilfenollerin karaciğerde biyoakümüle oldukları bilinmektedir (Certa et al., 1996). Ayrıca bu kimyasal maddelerin hücresel proliferasyonu indükledikleri, nonilfenol ve oktilfenolün gelişmekte olan erkek sıçanlarda hepatotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada da gösterilmiştir. Bu çalışmada, 60 mg/kg dozunda 1, 5 ve 10 gün intraperitoneal nonilfenol ve oktilfenol uygulanmış, bütün uygulamalarda karaciğerde artmış mitotik aktivite ve anormal mitotik şekiller tespit edilmiştir. Bu sonuçlar alkilfenollerin karaciğerde mitotik aktiviteye yol açan primer mitojenler ve anormal mitozu indükleyen mikrotübül bozucu ajanlar gibi davranabildiğine işaret etmektedir (Zumbado et al., 2002).

Sprague-Dawley sıçanlarla yapılan bir multijenerasyon çalışmasında, içme suyuna nonilfenol ve oktilfenol ilave edilen grupların karaciğerlerinde, lipidik dejenerasyon ve artmış seviyelerde apoptotik hücreler gözlenmiştir. Nonilfenol ve oktilfenol uygulaması relatif karaciğer ağırlığında anlamlı bir artışa neden olmasa da, karaciğerde gözlenen hücre içi glikojen içeriğindeki artış, alkilfenollerin metabolizma bozucu bileşikler olarak davrandıkları ihtimalini güçlendirmektedir (Hernandez-Rodriguez et al., 2007).

Cunney ve ark. (1997) nonilfenolle yaptıkları 90 günlük subkronik toksisite çalışmasında, 150 mg/kg doza karşılık gelen 2000 ppm nonilfenol konsantrasyonunun diyet yoluyla uygulanmasının histopatolojik olarak erkek

sıçanların böbreklerinde hiyalin damlalarında azalmaya ve böbrek ağırlığında artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Ancak böbrek ağırlığındaki artış destekleyen klinik ve histopatolojik bulgular gözlenmediğinden bu değişiklikler toksikolojik olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Yine hiyalinde histopatolojik olarak gözlenen azalma, renal tübüler hiyalin sıçan-spesifik protein α -2u-globülin ile bağlantılı olduğundan insanlar için toksikolojik açıdan geçerli bulunmamıştır.

Chapin ve ark. (1999) diyet yoluyla 200, 650, 2000 ppm konsantrasyonlarında nonilfenol uyguladıkları Sprague-Dawley sıçanlarla yaptıkları bir multijenerasyon çalışmasında, yüksek dozlarda erkek sıçanlarda artmış böbrek ağırlığı ve tüm dozlarda renal medullar tübüler dilatasyon ve kist oluşumu gözlemişlerdir.

29 gün boyunca günde bir kez 15, 150 ve 250 mg/kg dozlarında 7 haftalık dişi ve erkek sıçanlara oral gavaj yoluyla uygulanan 250 mg/kg oktilfenolün her iki eşyede de böbreklerde proksimal tübüllerde mitotik figürlerle birlikte bazofilik epitelyuma ve interstitiyal inflamasyona yol açtığı gösterilmiştir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, yüksek doz uygulanan dişilerde böbrek ağırlığında anlamlı artış tespit edilmiştir. 150 mg/kg dozda erkek sıçanlarda bazofilik epitelyum gözlenmiş, yüksek doz grubunda su tüketimindeki anlamlı artış oktilfenolün böbrek üzerindeki etkilerine bağlanmıştır. Aynı çalışmada, 250 mg/kg oktilfenol uygulanan dişi sıçanlarda artmış karaciğer ağırlığıyla ilişkili olarak minimal sentrilobüler hepatosit hipertrofisi gözlenmiştir (OECD SIDS, 1995). Benzer şekilde gavaj yoluyla 0, 10, 50 ve 250 mg/kg nonilfenol uygulaması yapılan bir çalışmada, 250 mg/kg nonilfenol uygulanan dişi ve erkek gruplarda istatistiksel olarak anlamlı histopatolojik değişiklikler rapor edilmiştir. Bu gruplarda bazofilik tübüller, nötrofil infiltrasyonu ve kortikal tübüler dilatasyon sık gözlenen lezyonlar olarak bildirilmiştir. Bazofilik tübüler değişiklikler hem kortekste hem medulla da gözlenmiştir. Yine yüksek doz gruplarında, karaciğerde yüksek doz oktilfenol bulgularıyla uyumlu sentrilobüler hepatosit hipertrofisi tespit edilmiştir. Bu çalışma nonilfenolün 28 günlük tekrarlı oral dozlarının hepatorenal toksik etkisinin 50 mg/kg dozdan itibaren gözlenmeye başladığını göstermektedir (Woo et al., 2007).

Nonilfenolle yapılan bir multijenerasyon çalışmada, 50 mg/kg nonilfenol uyguladıkları erkek ve dişi sıçanlarda karaciğerde sentrilobüler hepatosit hipertrofisiyle uyumlu histopatolojik değişimler tespit etmişlerdir (Nagao et al., 2001a).

Bu konuda yapılmış en son çalışma fetal dönemde 100 ve 250 mg/kg dozlarında uygulanan oktilfenolün karaciğerde anlamlı düzeyde lipid depozisyonuna, mononükleer hücre infiltrasyonuna ve konjesyona, böbreklerde ise tübüler dejenerasyona ve mononükleer hücre infiltrasyonuna yol açtığını göstermektedir. Ayrıca yüksek doz uygulanan grupta absöüt karaciğer ve böbrek ağırlıklarında anlamlı bir artış gözlenmiştir (Barlas and Aydoğan, 2009).

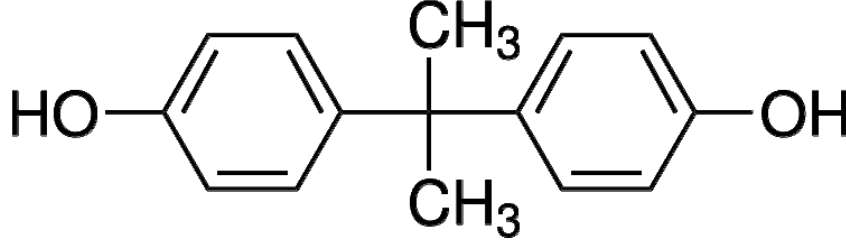
Karaciğer ve böbrek dokularında yapılan çalışmaların yanında, Nair-Menon ve ark.'ın (1999) splenosit kültürüyle yaptıkları bir çalışma, $\geq 10^{-9}$ M oktilfenol konsantrasyonlarının hücrelerin yaşama yeteneğini anlamlı ölçüde azalttığını ortaya koymuştur.

2.1.2.4.1.3.1.1.5. Genotoksisite

Alkilfenol etoksilatlar ve alkilfenollerin üreme ve gelişme toksisitesi ve östrojenik etkilerine ait çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, bu kimyasalların genotoksik etkisi ile ilgili az sayıda kaynakta, yapılan genotoksisite çalışmalar *in vitro* bakteriyel mutasyon testleri ile sınırlıdır. *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 suşları üzerinde mutajenik potansiyeli belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar, oktilfenolün 12500 µg/plate'e kadar test edilen dozlarında mutajenik olarak etkili olamadığını göstermektedir (OECD SIDS, 1995). Buna karşın nonilfenol ve oktilfenolle TA 98 suşu üzerinde yapılan testlerde oktilfenolün 40 µg/L konsantrasyonu, TA 100 suşu üzerinde yapılan testlerde ise 20 µg/L konsantrasyonu mutajenik bulunmuştur. Aynı çalışmada 0.937-4.485 µg/L aralığındaki nonilfenol konsantrasyonlarının tümü toksik etki gözlenmesine karşın, hiçbir konsantrasyonda mutajenik etki gözlenmemiştir (Boyacıoğlu et al., 2007).

2.1.2.4.2. Bisfenol A

Bisfenol A'nın moleküler yapısı Şekil 2.3'te, bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Bisfenol A'nın moleküler yapısı.

Çizelge 2.5. Bisfenol A'nın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Moleküler formülü	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
CAS numarası	80-05-7
Moleküler ağırlığı	228.29
Fiziksel hali ve rengi	Beyaz partikül veya toz
Erime noktası	153 °C
Kaynama noktası	220 °C
Yoğunluğu	1.1-1.2 kg/m ³
Buhar basıncı	25 °C'de 3.91E-07 mm Hg
Suda çözünürlüğü	25 °C'de 120 mg/l
pKa	9.59-11.30

Bisfenol A asetonun eşdeğer iki fenolle yoğunlaştırılması sonucu sentezlenen bir organik bileşiktir. Bisfenol A hem asit hem de alkaline katalizlenebilen bir reaksiyon sonucu oluşsa da, endüstriyel üretimde oluşan yan ürün miktarını ve sayısını minimize etmek için asitle (hidroklorik asit) katalizleme tercih edilmektedir. Reaksiyon sonucu, daha düşük saflıkta ve epoksi rezin imalatında kullanılan bisfenol A ve yüksek saflıkta ve polikarbonat imalatında kullanılan bisfenol A olmak üzere iki farklı kalitede ürün oluşmaktadır.

Bisfenol A yıllık >3.7 milyon ton toplam kapasitesiyle dünyada en yüksek üretim kapasitesi olan kimyasal maddeler arasında yer almaktadır (Chemical Week, 2005). 1996 yılında üretilen bisfenolün %48'inin Amerika'da, %32'sinin doğu

Avrupa'da ve %20'sinin Japonya'da üretildiği bildirilmiştir (Cousins et al., 2002). 2007 yılında Asya ülkelerinin tahmini yıllık 500 000 tonluk katılımıyla, bisfenolün üretim kapasitesinde yıllık %6-7'lik bir artışın söz konusu olması beklenmektedir.

Endüstriyel olarak bisfenol A polimer, epoksi rezin, polikarbonat, fungusit, antioksidan, boya, fenoksi, polisülfon ve kauçuk imalatında bir ara bileşik olarak görev yapmaktadır. Bu amaçla üretilen bisfenolün büyük çoğunluğu (%95) polikarbonat plastiklerin imalatında kullanılmaktadır (Mihaich et al., 2009). Bu alanlar dışında bisfenol A plastik dental dolgulara rezin olarak (bisfenol A monomerleri içeren polikarbonat plastikler), ambalaj endüstrisinde ve konservelerin iç kısımlarında kullanılmaktadır (Lintelmann et al., 2003).

Bisfenol A'nın yüksek üretim kapasitesi ve farklı kullanım alanları göz önünde bulundurulduğunda, çevreye önemli miktarlarda bisfenol A girişi olduğu tahmin edilebilir. Bu kimyasal maddenin kendi üretimi sırasında çevreye giren miktarı, üretim işlemi kapalı sistemlerde gerçekleştiğinden, minimal olarak kabul edilmektedir. Çevrede bulunan bisfenol A büyük ölçüde epoksi, polikarbonat ve polisülfon sertleştirici ve kauçuk imalatı sırasında oluşan büyük hacimlerdeki endüstriyel atık suların bir sonucudur. Akarsularda tespit edilen bisfenol A konsantrasyonları Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Akarsularda tespit edilen bisfenol A konsantrasyonları ($\mu\text{g/l}$) (Sharma et al., 2009'dan alınmıştır)

Ülke	Bisfenol A	Referans
Portekiz	0,07-4,0	Azevedo et al., 2001
Almanya	0,0005-0,014	Kuch & Ballschmiter, 2001
	<0,05-0,272	Bolz et al., 2001
	0,0038-0,030	Stachel et al., 2003

1998'de Japonya'da yapılan bir çalışmada, akarsulardan alınan 109 örneğin %57'sinde, 20 sediment örneğinden 19'unda bisfenol A tespit edilmiştir (Lintelmann et al., 2003). 2001 yılında Almanya'da yapılan bir çalışmada ise 116 yerüstü su kaynağında, 35 sedimentte, 37 kanalizasyon suyunda bisfenol A ölçülmüştür (Fromme et al., 2002).

2.1.2.4.2.1. Bisfenol A'nın yıkım mekanizması

Yapılan çalışmalar, çevreye giren bisfenol A'nın biyolojik olarak yıkıldığını, sedimente adsorbe olduğunu ve muhtemelen fotokimyasal yıkıma uğradığını göstermektedir (Staples et al., 1998).

Atık su arıtma tesislerinden izole edilen ve özel bir Gram (-) bakteri suşu olan MV-1 ile yapılan çalışmalar bisfenol A'nın minör ve majör yıkım yollarını, aynı zamanda ana yıkım metabolitlerini ortaya çıkarılmıştır (Staples et al., 1998). 1992 yılında Lobos ve ark., 1994 yılında ise Spivack ve ark. tarafından yapılan bu çalışmalarda, bisfenol A'nın majör yıkım yolağı sonucu oluşan iki ana metabolit 4-hidroksiasetefenon ve 4-hidroksi benzoik asidin hızlıca CO₂ ve suya yıkılarak bakteriyel hücreye alındığı tespit edilmiştir. Ayrıca Lobos ve ark. karbonun %60'ının CO₂ için, %20'sinin bakteriyel büyüme için ve %20'sinin çeşitli organik bileşikler için kullanıldığını ortaya koymuştur (Staples et al., 1998).

Howard 1989 yılında bisfenol A'nın nötral ve asidik metanol solüsyonlarında 290 nm üzeri dalga boylarında hafif, bazik metanol solüsyonunda ise anlamlı bir absorpsiyon gösterdiği bildirmiştir (Staples et al., 1998). Bu sonuçlar bisfenol A'nın yüzey sularında ve atmosferde fotolize uğrayabileceğine işaret etmektedir (Staples et al., 1998).

2.1.2.4.2.2. Bisfenol A'nın toksisitesi

2.1.2.4.2.2.1. Toksikokinetik

Bisfenol A'nın hayvanlarda ve erişkin insanlardaki toksikokinetik özellikleri iyi tanımlanmıştır. Konjugasyon reaksiyonları ile detoksifiye edilir (EFSA, 2008). Oral yolla alınan bisfenol A insanlarda, karaciğerde ana metaboliti olan bisfenol A-glukuronide metabolize edilir ve hızlı bir şekilde idrarla atılır (Völkel et al., 2002, 2008). Bisfenol A-sülfat insanlarda bisfenolün minör üriner metaboliti olarak bildirilmiştir (Ye et al., 2005, 2006). Bisfenol A'nın bu metabolitlerinin üreme sisteminin hormonal regülasyonunu etkilemediği bildirilmiştir (Snyder et al., 2000).

Bisfenol A sıçanlarda da, glukuronidasyon ve sülfatasyon yollarıyla detoksifiye edilmektedir (Pottenger et al., 2000). Ancak karaciğerden atılan bisfenol A-glukuronit safra yoluyla ulaştığı sindirim kanalında tekrar bisfenol A'ya dönüşmekte ve burada kana geçmektedir. Bisfenol A'nın enterohepatik dolaşıma girmesi,

bisfenol A'nın sıçanlarda daha yavaş elimine olmasına yol açmaktadır. Enterohepatik dolaşım ve azalan ilk geçişte eliminasyon insanlarla karşılaştırıldığında sıçanlarda kanda konjuge olmamış bisfenol A'nın daha yüksek plazma seviyelerinde bulunmasına neden olmaktadır (EFSA, 2008).

2.1.2.4.2.2. Akut toksisite

96 saat içinde bisfenol A'ya maruz kalan balık popülasyonunun (*Pimephales promelas*) %50'sini öldüren madde konsantrasyonu (LC₅₀) 4,7 mg/L, 48 saat içinde bisfenol A'ya maruz kalan *Daphnia magna* popülasyonunun %50'sini öldüren madde konsantrasyonu ise 10 mg/L'dir (Alexander et al., 1988).

Doğrudan uygulanan bisfenol A'nın, sıçan popülasyonunun %50'sini öldüren oral dozu (LD₅₀) 3250 mg/kg, farelerde ise 5280 mg/kg'dır (ChemIDplus, undated; HSDB, 2008).

2.1.2.4.2.3. Üreme ve gelişme toksisitesi

Gupta (2000) fetal dönemde 50 µg/kg bisfenol A'ya maruziyetin erkek farelerde anogenital mesafeyi açtığını, prostat büyüklüğünü arttırdığını buna karşın epididimal ağırlığı azalttığını ortaya koymuştur.

Gelişmekte olan erkek Fischer sıçanlarla yapılan 44 günlük bir çalışmada, diyet yoluyla 235, 466 ve 950 mg/kg dozlara karşılık gelen konsantrasyonlarda bisfenol A uygulamasının, yüksek doz gruplarında vücut, prepusyal bez (bazı memeli türlerinde genital organların önünde bulunan ve feromon üreten ekzokrin bezler) ve karaciğer ağırlığını anlamlı bir şekilde azalttığı belirlenmiştir. Bu etkilerin yanında bütün uygulama gruplarında seminal vezikül atrofisi ve spermatit dejenerasyonu olmak üzere doza bağlı olarak çeşitli seviyelerde histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Fakat bisfenol A'nın serum testosteron seviyeleri üzerinde anlamlı bir etkisi bildirilmemiştir (Takahashi and Oishi, 2001).

Tan ve ark. (2003) tarafından bisfenol A'nın pubertal gelişim üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla erkek sıçanlarda yapılan çalışma, bisfenol A'nın puberteyi geciktirdiğini ve testiküler hasara yol açtığını ortaya koymuştur.

lida ve ark. (2003) 18 günlük sıçanların testislerinden izole edilen Sertoli hücreleriyle yaptıkları hücre kültürü çalışması ile bisfenol A'nın <100 µM dozlarının hücrelerde yalnızca sitotoksik etkilere yol açarken, 150-200 µM dozlarının

hücreleri apoptoza götürdüğünü gözlemlemişlerdir. Sertoli hücrelerinde tespit edilen kaspaz-3 ekspresyonu Sertoli hücre ölümlerinin nekroz ile değil hücredeki apoptotik sinyal yollarının aktivasyonu ile bağlantılı olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde Li ve ark. (2009) yüksek doz bisfenol A uygulamasının Fas-sinyal yoluyla fare testislerinde Leydig ve germ hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir.

Buna karşın, Sprague-Dawley sıçanlarla yapılan bir çalışmada, 11. fetal günden 20. postnatal güne kadar 3,2, 32, 320 mg/kg dozlarında gavaj yoluyla bisfenol A maruziyetinin yeni doğan dişilerde pubertal gelişme ve üreme fonksiyonlarının üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı da bildirilmiştir (Kwon et al., 2000).

Erkek sıçanlara oral yolla 0,2, 2, 20 µg/kg bisfenol A uygulanmasının, hayvanların vücut ağırlıklarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığını, fakat sperm motilitesinde ve sayısında artan doza paralel bir düşüşe yol açtığı bildirilmiştir. Yapılan biyokimyasal incelemelerde epididimal spermde süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinde azalma, buna karşın hidrojen peroksit oluşum ve lipid peroksidasyon seviyelerinde artış belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan dozlar bisfenol A'nın düşük dozlarda sıçanların epididimal spermelerinde oksidatif stresi indükleyip indüklediğini belirlemek amacıyla özellikle hiçbir etki gözlenmeyen seviyenin (No observed effect level, NOEL) altında belirlenmiştir. Bisfenol A uygulaması, tam bir spermatojenik döngünün tamamlanması amacıyla 45 gün boyunca sürdürülmüştür. Araştırmacılar, uygulama yapılan hayvanların vücut ağırlıklarında bir değişimin gözlenmemesini, bisfenol A'nın metabolik aktivite üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı şeklinde yorumlamışlar, epididimal sperm motilitesinde ve sayısındaki düşüşün ise artan lipid peroksidasyonuna bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (Chitra et al., 2003).

Takahashi ve Oishi (2003) bisfenol A'nın testiküler toksikolojisinde uygulamaya bağlı farklılıkları araştırmak üzere yaptıkları çalışmada, oral yolla uygulanan bisfenol A'nın sıçanlarda ve farelerde genel toksisiteye veya üreme toksisitesine yol açmadığını, serum testosteron seviyelerini etkilemediğini bildirmiştir. Buna karşın, subkütan yolla 4 haftalık 200 mg/kg uygulama Wistar sıçanlarda testis, epididimis, prostat ve seminal vezikül ağırlıklarında anlamlı bir düşüşe yol açmıştır. İntraperitoneal yolla 4 hafta uygulanan 20 mg/kg bisfenol A ise prostat ve seminal

vezikül ağırlıklarında düşüşe neden olurken, testis ve epididimis ağırlıklarını etkilememiştir. Bu bulgular, subkütan ya da intraperitoneal yolla uygulanan bisfenol A'nın oral yolla uygulanan bisfenol A'ya göre daha toksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Tyl ve ark. (2002) CD Sprague-Dawley sıçanlarla yaptığı multijenerasyon çalışmasında, 0,001, 0,02, 0,3, 5, 50 ve 500 mg/kg dozlara karşılık gelen konsantrasyonlarda bisfenol A uygulamasının ergin sıçanlarda oluşturduğu sistemik toksisitenin yüksek dozlarda vücut ağırlığı, ağırlık kazancı ve yem tüketimiyle sınırlı kaldığını, uygulamanın F₀, F₁ ve F₂ erkeklerde absöüt ve relatif testis, epididimis, prostat veya seminal vezikül ağırlıkları üzerinde etkili olmadığını bildirmiştir. F₁ jenerasyonunda epididimal sperm konsantrasyonunda bir düşüş saptanmış ancak diğer jenerasyonlarda bisfenol A'nın bu etkisi gözlenmemiştir. Dişilerde parental F₀, F₁, F₂ jenerasyonlarında absöüt ve relatif ovaryum ağırlıklarında düşüş belirlenmiştir. Parental F₀, F₁, F₂ ve ergin F₃ jenerasyonu diş ve erkeklerinde üreme organlarının histopatolojik incelemesinde uygulamaya bağı herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Yüksek doz uygulamada gözlenen vücut ağırlığındaki anlamlı düşüş 3 jenerasyondaki (F₁, F₂, F₃) yavrularda da gözlenmiştir. Bisfenol A uygulamasının absöüt ovaryum ağırlığı hariç tüm absöüt organ ağırlıklarında düşüşe yol açtığı, relatif organ ağırlıklarının ise arttığı veya uygulamadan etkilenmediği görülmüştür. Yüksek doz grubu uygulanan F₁, F₂ ve F₃ yavrularda dişilerde vajinal açılma, erkeklerde ise prepusyal ayrılma ile karakterize pubertenin geciktiği belirlenmiştir. Tüm bu bulgulara rağmen araştırmacılar relatif organ ağırlıklarındaki değişimi ve pubertedeki gecikmeyi vücut ağırlıklarındaki düşüşle ilişkilendirmişler ve biyolojik açıdan anlamlı kabul etmemişlerdir. Tyl ve ark. (2008) sonraki yıllarda fareler üzerinde yaptıkları multijenerasyon çalışmasıyla da bisfenol A'nın üreme fonksiyonlarında toksikolojik etkiye neden olmadığını bildirmiştir.

2.1.2.4.2.2.4. Hepatorenal toksisite

Tyl ve ark. (2002) yaptıkları multijenerasyon çalışmasıyla 500 mg/kg uygulanan grupta parental F₀, F₁, F₂ ve ergin F₃ jenerasyonunda karaciğer ve böbrek ağırlıklarında düşüş tespit etmişlerdir. Yapılan incelemelerde, parental F₀, F₁, F₂ ve ergin F₃ jenerasyonunda uygulamaya veya doza bağı bir değişim gözlenmezken,

yüksek doz uygulanan F₀, F₁ ve F₂ dişilerde renal tübüler dejenerasyon ve kronik hepatik inflamasyon insidansının arttığı gözlenmiştir.

Tan ve ark. (2003) bisfenol A'nın pubertal gelişim üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, oral yolla 100 mg/kg dozda uygulanan bisfenol A'nın karaciğer ve böbrek ağırlığını anlamlı olarak arttırdığını, buna karşın böbrek korteksinin kalınlığını azalttığını bildirmiştir. Yapılan histopatolojik incelemelerde, karaciğerde herhangi bir morfolojik değişikliğe rastlanmamış, böbreklerde ise büyüme ve hidronefrozis tespit edilmiştir.

Bisfenol A'nın karaciğerdeki etki mekanizması tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Ancak 45 günlük erkek Wistar sıçanlara günlük 0,2, 2 ve 20 µg/kg bisfenol uygulaması yapılan bir çalışmada, hayvanların vücut ağırlıklarında anlamlı bir değişim gözlenmemesinin yanında süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinde anlamlı azalma tespit edilmiştir. Ayrıca hidrojen peroksidaz ve lipid peroksidasyon seviyelerinde anlamlı artış belirlenirken, hepatik hasarın önemli bir belirteci olan alanin transaminaz (ALT) aktivitesinde bir değişiklik belirlenememiştir. Bu çalışmanın sonuçları bisfenolün düşük dozlarda bile antioksidan enzim aktivitesini azaltarak ve lipid peroksidasyonunu arttırarak karaciğerde oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir (Bindhumol et al., 2003).

2.1.2.4.2.2.5. Genotoksisite

Asidik koşullar altında fenol halkasının formaldehitle reaksiyona girmesi sonucu oluşan ve en küçük yapısal birimi bisfenol A'ya oldukça benzerlik gösteren epoksi rezin bisfenol F diglisidil eteri prokaryotik ve ökaryotik sistemlerde test eden bir çalışmada, bisfenol F diglisidil eterin 100-5000 µg/plate'e kadar test edilen dozlarının TA 100, TA 1535, WP2uvrA ve IC3327 bakteriyel suşlarında mutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada 12,5-62,5 µg/mL dozlarında uygulanan bisfenol F diglisidil eter kardeş-kromatit değişimi testi ve mikronükleus testi olmak üzere iki farklı ökaryotik sistemde test edilmiş ve bu kimyasalın kardeş kromatit değişimlerinin ve kültüre edilmiş lenfositlerde mikronükleusların frekanslarında artışa yol açtığı tespit edilmiştir (Sueiro et al., 2003).

Diğer taraftan, bisfenol F diglisidil eterin, bisfenol F'nin ve bisfenol F metabolitlerinin sitotoksik ve genotoksik potansiyelini in vitro yöntemler kullanarak

ortaya koymak amacıyla yapılan bir çalışmada, Ames yöntemiyle bakteriyel suşlarda test edilen dozlarda herhangi bir mutajenik potansiyel gözlenmemiştir. Ökaryotik sistemlerde ise, bisfenol F'nin sitotoksik etki gözlenmeyen 78,7 µM konsantrasyonlarından itibaren HepG2 hücrelerinde genotoksik etki göstermeye başladığı tespit edilmiştir. Hücrelerin yaşama yeteneğindeki düşüşle eş zamanlı gözlenen mikronükleus sayısındaki artış ise bileşiklerin sitotoksik etkisiyle ilişkilendirilmiştir (Cabaton et al., 2009).

Bisfenol A'nin mutajenik aktivitesinin farklı *Salmonella typhimurium* suşlarında (TA 97a, TA 98, TA 100, TA 102) ve memeli V79 hücrelerinde test edildiği bir çalışmada, bisfenol A'nin prokaryotik sistemde 0,05-0,50 mg/plate, ökaryotik sistemde ise 0,1 ve 0,2 mM konsantrasyonlarında uygulanan dozlarının mutajenik etki göstermediği bildirilmiştir (Schweikl et al., 1998).

Bisfenol A ve nonilfenol ile indüklenmiş DNA hasarının, bu kimyasalların biyoindikatör türlerde oluşturduğu DNA kırıklarının ölçülerek araştırıldığı bir çalışmada, bisfenol A'nin hem *Daphnia magna*'da hem de *Chironomus riparius*'ta, buna karşın nonilfenolün yalnızca *C.riparius*'ta DNA hasarını indüklediği belirmiştir. Uygulanan dozların bu kimyasalların bu türler için saptanan 24 saatlik letal konsantrasyonlarının (LC50) 1/1000, 1/1000 ve 1/10'u olarak seçildiği bu çalışmada *Daphnia magna*, 0,3, 3 ve 30 µg/L bisfenol A ve nonilfenole, *C.riparius* ise 1, 10 ve 100 µg/L nonilfenole ve 5, 50 ve 500 µg/L bisfenole maruz bırakılmış, DNA hasarı comet yöntemiyle tespit edilmiştir (Park and Choi, 2009).

Asidik koşullar altında bisfenol A'nin nitritle etkileşimi sonucu oluşan 3, 3'-dinitrobisfenol A'nin ve bisfenol A'nin genotoksik etkisinin Japon balıklarında comet yöntemi ve mikronükleus testi kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada, 10 mg/kg bisfenol A ve 3, 3'-dinitrobisfenol A uygulanan gruplarda DNA kırıklarının anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir. 3, 3'-dinitrobisfenol A, periferel eritrositlerde mikronükleus frekansında anlamlı bir artışa yol açmamasına rağmen, solungaçlardaki mikronükleus frekansında anlamlı bir artışa neden olmuştur. Ancak bisfenol A ne solungaçlarda ne de periferel eritrositlerde mikronükleus frekansında artışa yol açmıştır. Bisfenol A DNA kırıkları oluşturmaktaki potansiyelini mikronükleus frekansında artışa neden olmada gösteremediği için bu potansiyelin apoptozla indüklenmiş DNA hasarı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Diğer taraftan, 3, 3'-dinitrobisfenol A'nin tespit edilen DNA hasarı oluşturma ve

mikronükleus frekansını indükleme potansiyeli, 3, 3'-dinitrobisfenol A'nın toksisitesinin bisfenol A toksisitesinden farklı olduğunu göstermektedir (Toyoizumi et al., 2008).

Kromozomal sapma testi, mikronükleus testi ve c-mitotik etki olmak üzere üç farklı sitogenetik parametre kullanarak bisfenol A'nın Swiss albino fare kemik iliklerinde genotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, bisfenol A'nın tek doz 10, 50, 100 mg/kg ve tekrarlı doz 10 mg/kg olmak üzere test edilen dozlarda kromozomal sapmalarda ya da mikronükleus frekansında artışa neden olmadığı, ancak genotoksik potansiyelini c-mitotik etki yoluyla gösterdiği bildirilmiştir (Naik and Vijayalaxmi, 2009).

Bisfenol A'nın karsinojenitesini belirlemek amacıyla yürütülen bir çalışmada 103 hafta boyunca 50 erkek ve 50 dişi Fischer sıçana 0, 1000 ve 2000 ppm konsantrasyonlarında, 50 erkek B6C3F1 fareye 0, 1000 ve 5000 ppm konsantrasyonlarında, 50 dişi B6C3F1 fareye ise 0, 5000 ve 10000 ppm konsantrasyonlarında bisfenol A içeren diyet uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, bisfenol A uygulamasının dişi ve erkek sıçanlarda lösemi insidansında, erkek farelerde ise hem lenfoma hem de lösemi insidansında marjinal artışlara neden olduğunu göstermektedir. Bu bulgular bisfenol A uygulamasının artan hematopoietik sistem kanserleriyle ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır (Huff, 2001). Buna karşın Ulusal Toksikoloji Programı'nın daha önceki yıllarda yayınladığı raporda bisfenol A'nın B6C3F1 fareler ya da F344 sıçanlar için karsinojenik olduğuna dair herhangi bir kesin kanıtın mevcut olmadığı belirtilmiştir (NTP, 1982).

Bisfenolün mutajenitesini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaların birçoğunun bisfenolün mutajenik olmadığına işaret etmesine karşın, bisfenolün nokta mutasyonları, DNA kırıkları ve kanserde yaygın görülen kromozomal bir bozukluk olan anöplodiyi indüklediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Iso ve ark. (2006) bisfenol A'nın meme kanseri hücre dizisinde (MCF-7) DNA kırıklarını indüklediğini ortaya koymuştur. Ancak bu çalışmada uygulanan dozların oldukça yüksek olması, bu sonuçların bisfenol A'nın gerçek potansiyel karsinojenik mekanizmasını yansıtmadığını düşündürmektedir (Keri et al., 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasal maddeler

Çalışmada %97 saflık derecesinde kullanılan 4-tert-oktilfenol [4-(1, 1, 3, 3, tetrametilbütıl)-fenol] ve %99 saflık derecesinde kullanılan bisfenol A (4, 4-dihidroksi-2, 2,-difenilpropan) Aldrich Kimya'dan (Almanya), %99 saflık derecesinde kullanılan metilmetansülfonat Sigma Kimya'dan (Almanya) temin edilmiştir. İmmunohistokimyasal inceleme için Apoptag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon International'dan (Amerika) temin edilmiştir.

3.1.2. Deney hayvanları

Çevresel östrojenlerden bisfenol A ve oktilfenolün erkek sıçanlarda subkronik etkilerini incelemek üzere yapılan bu çalışmada, laboratuvar şartlarına kolay uyum gösterebilme özellikleri nedeniyle, deney hayvanı olarak Wistar albino (*Rattus norvegicus*) sıçanlar kullanılmıştır. 5 haftalık erkek sıçanlar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınan yazılı izin ile Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Ünitesi'nden temin edilmiştir.

3.1.3. Laboratuvar koşulları

90 günlük çalışma süresi boyunca laboratuvar koşulları ortalama sıcaklık 22 ± 2 °C, ortalama nisbi nem 50 ± 5 ve fotoperiyot 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde sabit tutulmuştur. Çalışmada, boyutları 24x45x21 cm olan ızgara kapaklı polikarbon kafesler kullanılmıştır. Tüm sıçanların laboratuvar koşullarından eşit şekilde yararlanmasını sağlamak amacıyla her kafesin yeri haftalık olarak değiştirilmiştir. Çalışma süresince hayvanlara içme suyu olarak çeşme suyu verilmiştir. Çalışmada kullanılan ve içerikleri Çizelge 3.1'de verilen standart sıçan peletleri Korkutelim Yem A.Ş.'den temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan pelet yemin içeriği.

Besleyici maddeler	%
Ham kül	7.61
Ham selüloz	8.81
Ham protein	23.00
Ruminat enerji (kcal)	2700.00
Kalsiyum	1.20
Fosfor	0.80
Lizin	1.50
Metiyonin	0.57
Hammadde oranları	%
Yonca unu	20-30
Bonkalit	20-30
Mısır	15-20
Buğday	10-30
Arpa	10-15
Soya küspesi	25-35
Balık unu	5-10
Balık yağı	10-15
DCP 18	5-15
Tuz	0.5-3
Toksin bağlayıcı	2
Mineraller	1
Vitaminler	2
Antioksidan	1

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışma tasarımı ve gruplarının oluşturulması

Çalışma, hiç bir uygulamanın yapılmadığı negatif kontrol grubu, ağız yoluyla mısır yağı verilen negatif yağ kontrol grubu, hayvanlara diseksiyonundan 24 saat önce intraperitoneal yolla genotoksik bir ajan olan metil metansülfonat enjeksiyonu (60 mg/kg) yapılan pozitif kontrol grubu olmak üzere 3 kontrol ve 125 mg/kg/gün ve 250 mg/kg/gün dozlarında mısır yağında çözülerek ağız yoluyla bisfenol A ve oktilfenol uygulaması yapılan 4 uygulama grubunu kapsamaktadır. Uygulama grupları için belirtilen dozlar, artan dozlarda etki derecelerini göstermek için, daha önce yapılan çalışmalar ve kimyasal maddelerin toksikokinetik özellikleri göz önünde bulundurularak seçilmiştir.

Temin edilen hayvanlar kontrol gruplarında 5, uygulama gruplarında 6 hayvan olacak şekilde rastgele dağıtılmış ve çalışmaya başlamadan önce, sıçanların bir hafta boyunca, laboratuvar ortamına alışmaları beklenmiştir.

3.2.2. Vücut ağırlıkları, organ ağırlıkları, su ve yem tüketiminin saptanması

Çalışma süresi boyunca, kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların vücut ağırlıkları, yem ve su tüketimleri haftalık olarak kaydedilmiştir. 90. gün sonunda, hayvanlar eter ile bayıltılmış ve servikal dislokasyon yöntemi uygulanarak deney sonlandırılmıştır. Çalışmanın amaçları doğrultusunda, sıçanların karaciğer, böbrek ve dalak organları alınmış ve üzerlerindeki kan kurutma kağıdı ile temizlendikten sonra tartılıp yağ ağırlıkları kaydedilmiştir. Relatif organ ağırlıkları vücut ağırlıklarına oranlanarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Hematolojik incelemeler

Hematolojik inceleme için organların çıkarılmasından önce kalpten steril enjektörle alınan kan örneği heparinli tüplere aktarılmıştır. Örnekler, eritrosit, lökosit ve trombosit sayıları, lökosit yüzdeleri, hemogloblin değerleri ve hematokrit yüzdesi, ortalama eritrosit volümü (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH), ortalama eritrosit hemogloblin konsantrasyonu (MCHC), eritrosit dağılım genişliği (RDW), ortalama trombosit volümü, trombosit ve eritrosit dağılım genişlikleri tespiti amacıyla MS59 model kan sayım cihazı ile analiz edilmiştir.

3.2.4. Biyokimyasal incelemeler

Biyokimyasal inceleme için kalpten steril enjektörle alınan kan örneği silikon jelli vakumlu serum ayırma tüplerine konularak 3000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Ayrılan serumlar, alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), alkalen fosfataz (ALP), laktat dehidrogenaz (LDH), gama glutamil transferaz (GGT), kreatinin kinaz (CK-MB), total kolesterol, total protein, glikoz, trigliserit, albumin, bilirubin, üre, kreatinin değerlerinin tespiti amacıyla CL-770 model spektrofotometre ile analiz edilmiştir.

3.2.5. Histopatolojik incelemeler

Alınan karaciğer, böbrek ve dalak doku örnekleri Bouin fiksatifinde 8 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda %70'lik alkole alınan doku örneklerinin, rutin takip işleminden geçirilip parafine gömülmesiyle elde edilen parafin bloklar mikrotomda 4 µm kalınlığında kesilerek preparat haline getirilmiştir. Preparatlar Hematoksilen & Eosin (H&E) boyası ile boyanmış, histopatolojik bulguların değerlendirilmesi amacıyla ışık mikroskobu altında incelenmiş ve kamera ile fotoğraflanmıştır.

3.2.6. İmmunohistokimyasal incelemeler

Karaciğer hücrelerinde meydana gelen apoptotik hasar, TUNEL tekniğiyle, Apoptag®Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (CHEMICON® International, Inc. Amerika) kullanılarak belirlenmiştir. Bu kitlerin çalışması, apoptotik sinyallerin DNA üzerinde oluşturdukları kırıklar sonucu oluşan parçacıkların serbest 3'-OH uçlarının işaretlenmesi esasına dayanmaktadır. Çalışmada, %10 formol fiksatifinde tespit edilen karaciğer doku örnekleri rutin takip işleminden geçirilip parafine gömülmüş, elde edilen parafin bloklar mikrotomda 4 µm kalınlığında kesilerek preparat haline getirilmiştir. Preparatlar deparafinize ve dehidrate edildikten sonra, protein parçalayıcı enzim proteinaz-K ile 15 dk muamele edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulaması ile endojen peroksit inhibe edilmiştir. Açığa çıkan DNA parçacıkların serbest 3'-OH uçlarına in situ terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılığı ile biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş nükleotidler eklenmiştir. Biotin ile işaretlenmiş nükleotidler peroksidaz konjugatı ile tespit edilmiş ve peroksidaz substratı ile DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturulmuştur. Dokular oda sıcaklığında 10 dk %0,5'lik metil yeşili ile zıt boyandıktan sonra işlem sonlandırılmıştır.

Karaciğer dokusundaki tüm gruplara ait işaretlenmiş apoptotik hücre sayımı, ışık mikroskobu altında yapılmıştır. Sayım işlemi, preparatlar üzerinde X40 oküler merceğinde rastgele seçilen 10 farklı birim alan içine düşen tüm hepatositlerin sayılması ile gerçekleştirilmiştir. Apoptotik hücrelerin sayılan hepatositler içindeki insidansı hesaplanarak, her preparat için bir apoptotik indeks elde edilmiştir.

3.2.7. Sitogenetik incelemeler

Sitogenetik hasarın tespitinde, in vivo memeli mikronükleus tekniği kullanılmıştır. Mikronükleuslar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, kromozom fragmanları veya tam kromozomdan köken alan oluşumlardır. Mikronükleus sayısındaki artış, organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Demirel ve Zamani, 2002). Bu amaçla, sıçanların femurlarından alınan kemik iliği örneklerinden yayma preparatlar hazırlanmış, metanolle fiske edilen preparatlar, 20 dk Giemsa ile boyandıktan sonra 200 eritrosit ışık mikroskobu altında sayılarak polikromatik (olgunlaşmamış) eritrositlerin toplam (polikromatik+normokromatik) eritrositlere oranı hesaplanmıştır (Gollapudi and McFadden, 1995). Daha sonra pozitif kontrol, negatif kontrol ve uygulama gruplarında bulunan her hayvan için 1000 polikromatik eritrosit sayılarak, mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin insidansı belirlenmiştir.

3.2.8. İstatistiksel analiz

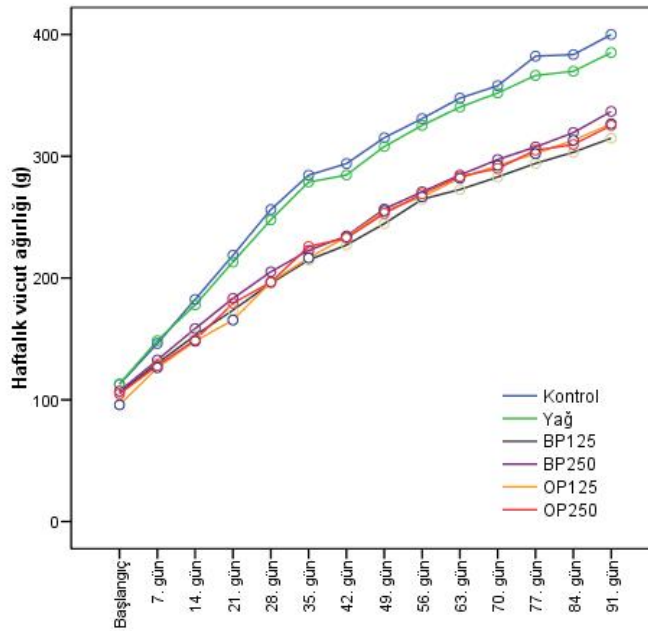
İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı tablolar sayısal değişkenler için ortalama±standart hata, kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Gruplar arası sayısal değişkenler Kruskal Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. Alt grup olarak kontrol ve yağ grubunun diğer gruplarla karşılaştırılmalarında Mann-Whitney U testi kullanılmış ve alfa anlamlılık seviyesine Bonferroni düzeltmesi uygulanarak değerlendirilmiştir. Kategorik değişkenlerin gruplardaki oranlarının karşılaştırmalarında koşullar sağlanamadığı için Ki Kare testi Monte Carlo exact test ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ düzeyi kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR

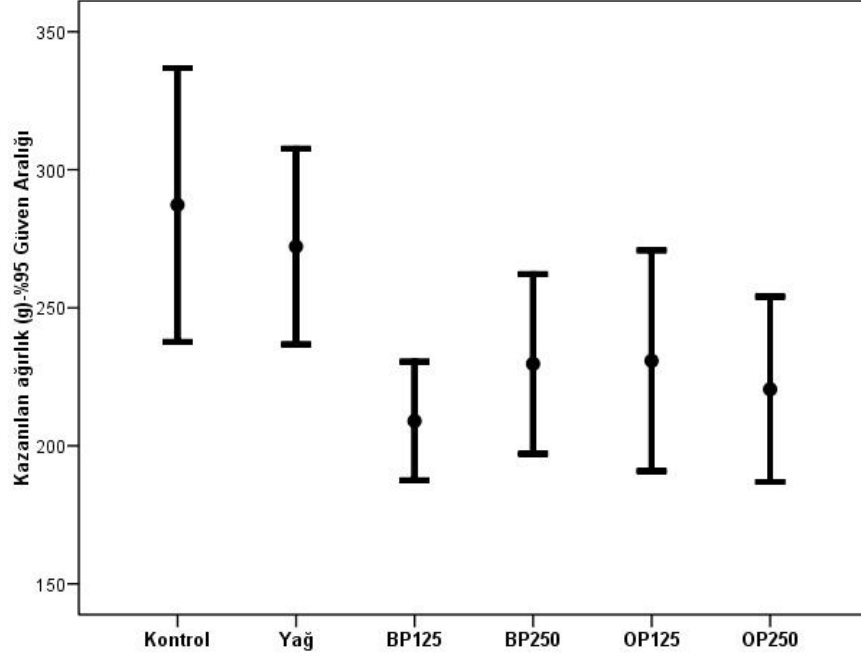
4.1. Vücut ağırlığı değişimleri

Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların çalışma başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları, çalışma süresince kazandıkları ağırlıklar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Başlangıçta yalnızca 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan grubun vücut ağırlığı kontrol ve yağ gruplarıyla karşılaştırıldığında düşükken, uygulama sonunda başlangıçta vücut ağırlığı yönünden kontrol gruplarıyla fark göstermeyen, 125 ve 250 mg/kg/gün bisfenol A ve 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan grupların vücut ağırlıklarında da düşüş gözlenmiştir. Tüm uygulama gruplarında ortalama ağırlık kazancı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunurken, 125 ve 250 mg/kg/gün bisfenol A ve 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruplarda saptanan düşük ağırlık kazancı yağ kontrol grubuna göre de anlamlı olarak farklılık göstermiştir.

Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların çalışma süresi boyunca vücut ağırlıklarını gösteren grafik Şekil 4.1'de, ortalama ağırlık kazançlarını gösteren grafik Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların çalışma süresi boyunca haftalık vücut ağırlıklarını gösteren grafik.



Şekil 4.2. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların ortalama ağırlık kazançlarını gösteren grafik.

Çizelge 4.1. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların çalışma başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları, çalışma süresince kazandıkları ağırlıklar

	Kontrol	Yağ	Bisfenol A (mg/kg/gün)		Oktilfenol (mg/kg/gün)	
			BP125	BP250	OP125	OP250
<i>N</i>	4	5	6	6	6	6
Başlangıç vücut ağırlığı (g)	112,8±1,1	113,0±4,8	105,8±5,4	107,2±3,7	95,8±2,3 ^{a,b}	104,8±4,2
Bitiş vücut ağırlığı (g)	400,0±15,2	385,2±13,0	314,8±6,2 ^{a,b}	336,8±12,7 ^{a,b}	326,7±15,0 ^{a,b}	325,3±12,4 ^{a,b}
Kazanılan ağırlık (g)	287,3±15,6	272,2±12,8	209,0±8,4 ^{a,b}	229,7±12,7 ^{a,b}	230,8±15,6 ^a	220,5±13,1 ^{a,b}
Kazanılan ağırlık (%)	255,0±15,0	243,2±17,5	201,5±17,1	215,9±15,2	242,2±18,7	212,8±16,9

N: Kullanılan sıçan sayısı

^aKontrol grubundan istatistik önem derecesinde farklı

^bYağ kontrol grubundan istatistik önem derecesinde farklı

4.2. Su ve yem tüketimleri

Kontrol ve uygulama gruplarının haftalık su ve yem tüketimleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Tüm uygulama gruplarının haftalık su tüketimleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunurken, 250 mg/kg/gün bisfenol A ve 125 ve 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan grupların haftalık su tüketimleri aynı zamanda yağ grubuyla karşılaştırıldığında da anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Kontrol ve yağ grupları arasında haftalık su tüketimi açısından anlamlı bir fark saptanamamıştır. Kontrol ve yağ grupları su tüketimindeki artış açısından karşılaştırıldıklarında, gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Ancak uygulama gruplarının su tüketimindeki artışın kontrol ve yağ gruplarına göre anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür. Kontrol ve uygulama grupları haftalık yem tüketimleri yönünden karşılaştırıldıklarında, yağ ve uygulama gruplarının haftalık yem tüketimlerinin kontrol grubuna göre düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, 125 mg/kg/gün bisfenol A ve 125 ve 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan grupların haftalık yem tüketimleri yağ grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Kontrol ve yağ grupları yem tüketimindeki artış açısından karşılaştırıldıklarında, 250 mg/kg/gün bisfenol A ve 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık saptanamamıştır. Diğer taraftan, yağ, 125 mg/kg/gün bisfenol A ve 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan grupların yem tüketimindeki artışın anlamlı olarak düşük olduğu tespit edilmiştir. Uygulama grupları yem tüketimindeki artış bakımından yağ grubuyla karşılaştırıldığında ise yalnızca 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan grupta anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların haftalık ortalama su ve yem tüketimleri

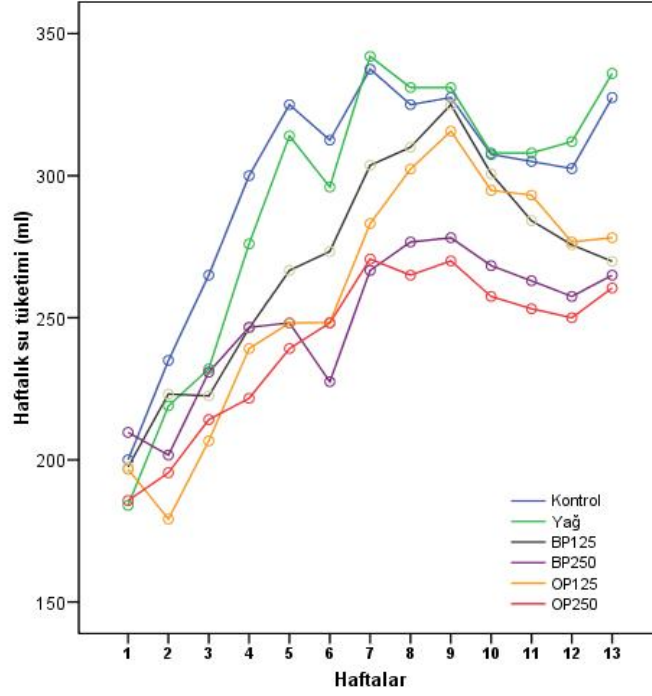
	Kontrol	Yağ	Bisfenol A (mg/kg/gün)		Oktilfenol (mg/kg/gün)	
			BP125	BP250	OP125	OP250
<i>N</i>	4	5	6	6	6	6
Haftalık su tüketimi (ml)	297,5±0,9	291,0±9,8	268,7±6,0 ^a	248,7±9,1 ^{a,b}	258,3±2,7 ^{a,b}	240,5±2,5 ^{a,b}
Haftalık yem tüketimi (g)	169,0±0,0	159,0±0,0 ^a	132,5±1,6 ^{a,b}	140,0±5,4 ^a	137,0±0,4 ^{a,b}	136,5±0,2 ^{a,b}

N: Kullanılan sıçan sayısı

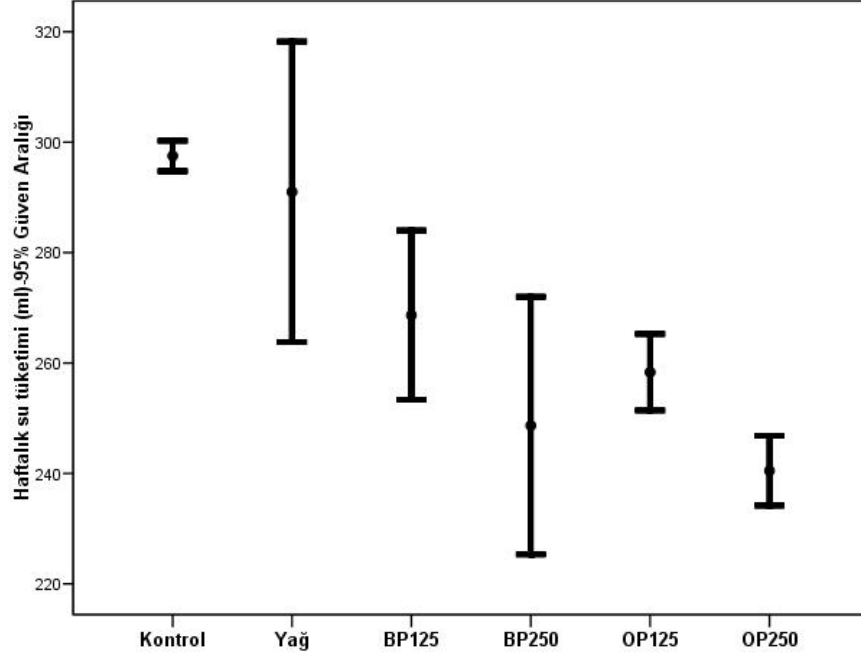
^aKontrol grubundan istatistik önem derecesinde farklı

^bYağ kontrol grubundan istatistik önem derecesinde farklı

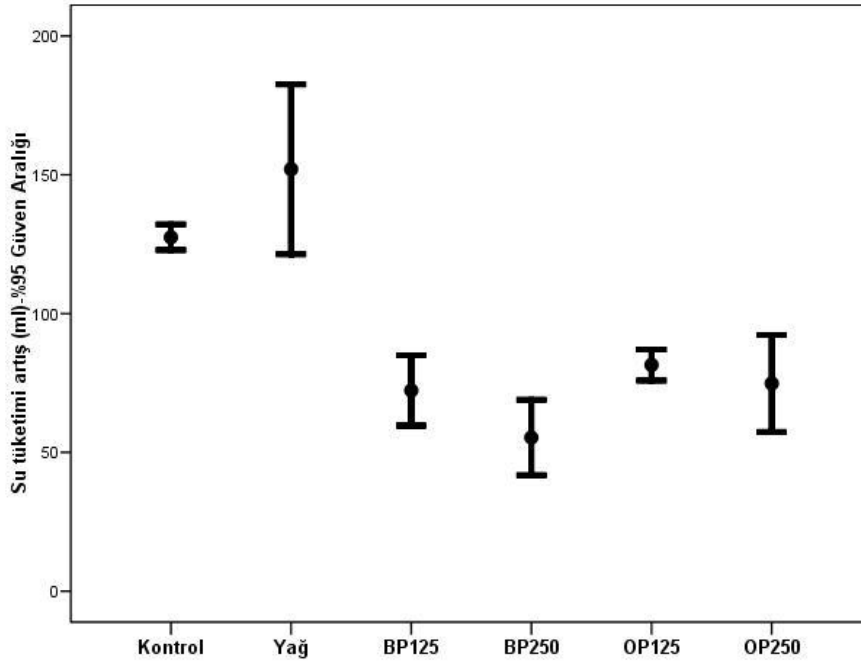
Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların çalışma süresi boyunca ortalama su tüketimlerini gösteren grafik Şekil 4.3'te, ortalama haftalık su tüketimlerini gösteren grafik Şekil 4.4'te, su tüketimindeki artışı gösteren grafik Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların çalışma süresi boyunca haftalık ortalama su tüketimlerini gösteren grafik.

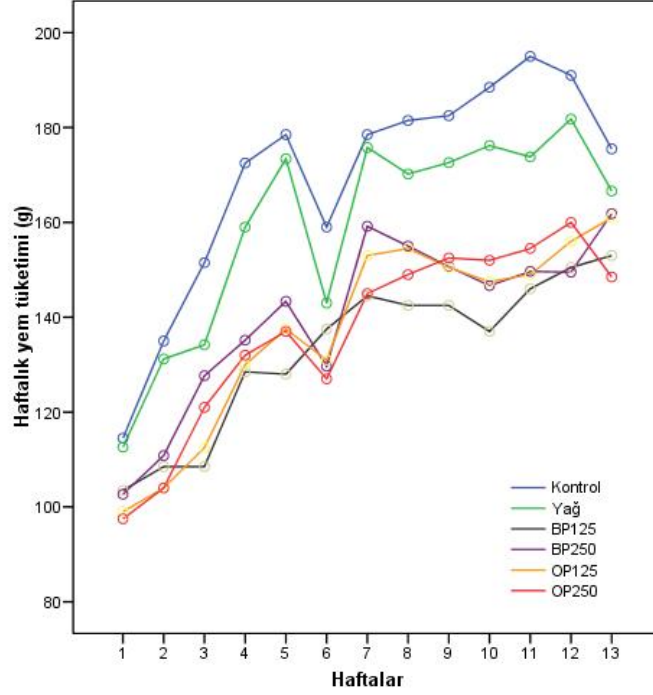


Şekil 4.4. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların haftalık su tüketimlerini gösteren grafik.

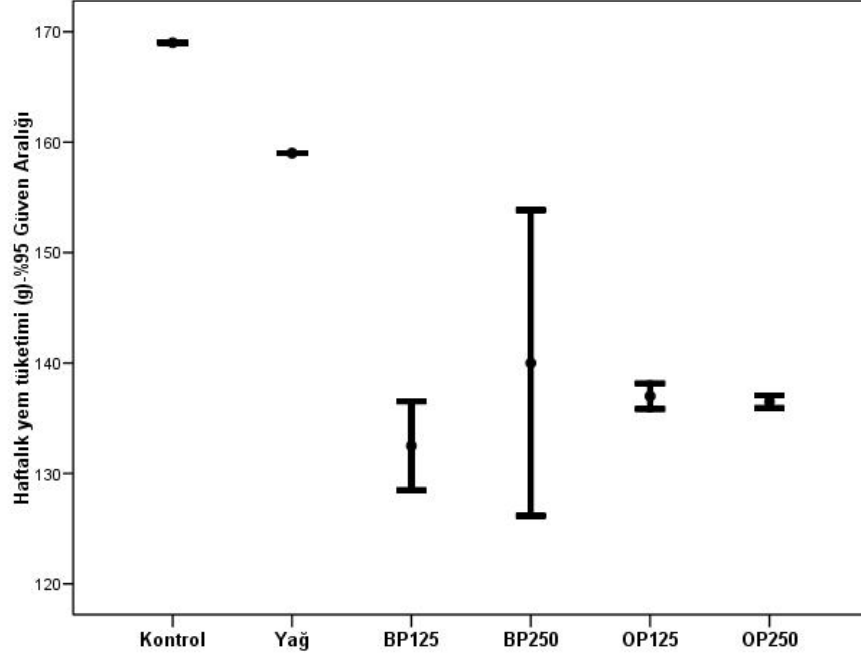


Şekil 4.5. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların su tüketimindeki artışını gösteren grafik.

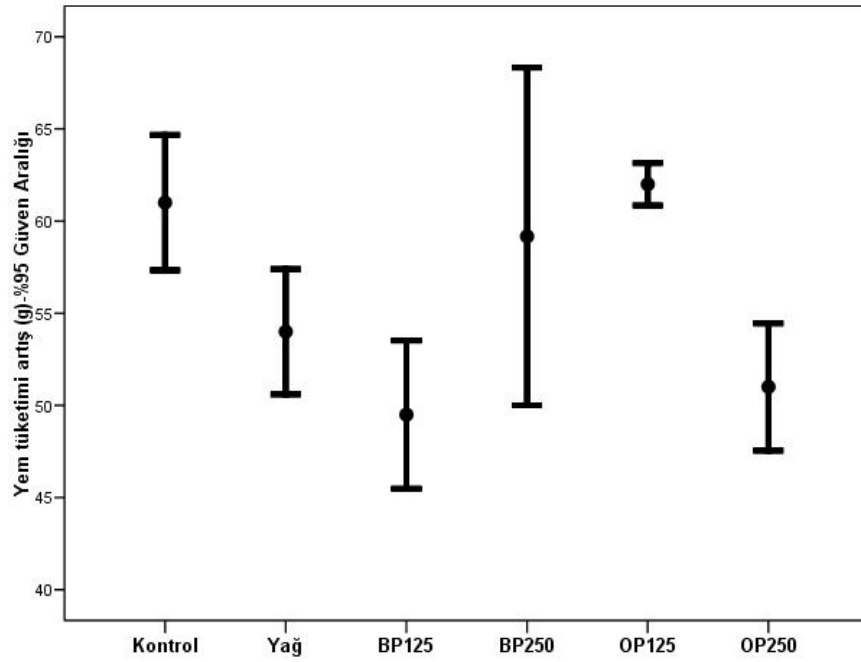
Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların çalışma süresi boyunca ortalama yem tüketimlerini gösteren grafik Şekil 4.6'da, ortalama haftalık yem tüketimlerini gösteren grafik Şekil 4.7'de, yem tüketimindeki artışı gösteren grafik Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların çalışma süresi boyunca haftalık ortalama yem tüketimlerini gösteren grafik.



Şekil 4.7. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların haftalık yem tüketimlerini gösteren grafik.



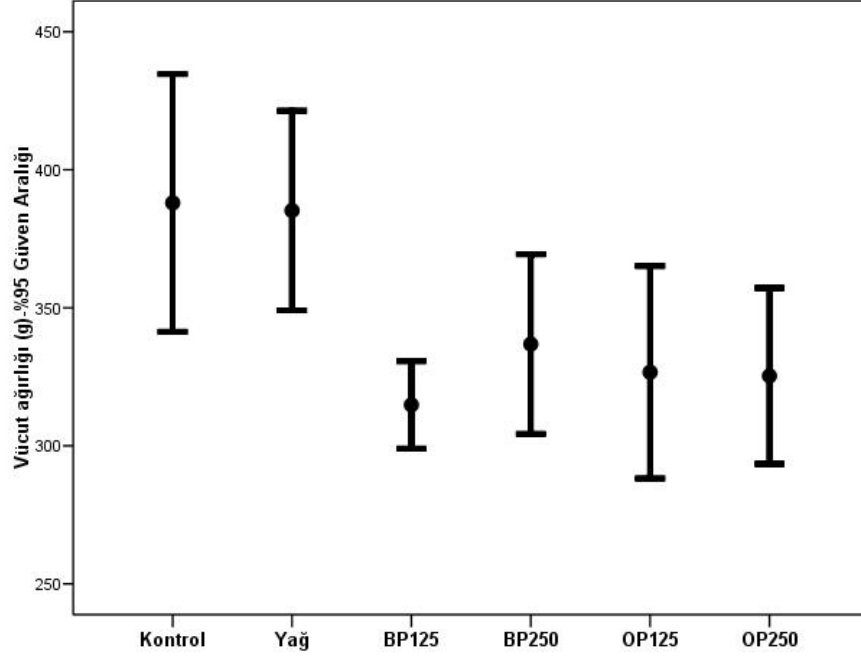
Şekil 4.8. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların yem tüketimindeki artışı gösteren grafik.

4.3. Absolüt ve relatif organ ağırlıkları

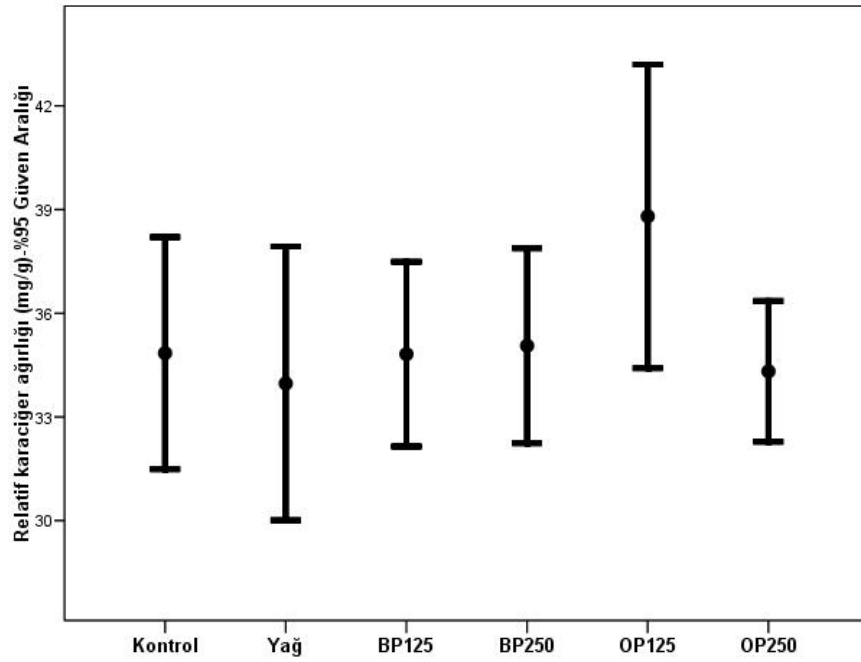
Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların çalışma sonu vücut ağırlıkları, organ ağırlıkları ve relatif organ ağırlıkları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çalışma sonunda, tüm uygulama gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıklarının kontrol ve yağ gruplarıyla karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Gruplar arasında absolüt ve relatif böbrek, absolüt karaciğer ve relatif dalak ağırlıkları açısından istatistiksel anlamlı fark tespit edilemezken, 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan grupta relatif karaciğer ağırlığının yağ grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Uygulama gruplarındaki sıçanların relatif karaciğer ağırlıkları ile kontrol grubundaki sıçanların relatif karaciğer ağırlıkları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan gruptaki sıçanların absolüt dalak ağırlıkları kontrol ve yağ grubundaki sıçanların absolüt dalak ağırlıklarından anlamlı fark göstermezken, 125 mg/kg/gün bisfenol A ve 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruplardaki sıçanların absolüt dalak ağırlıklarında hem kontrol hem yağ grubuna göre anlamlı düşüş tespit edilmiştir. 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruptaki sıçanların absolüt dalak ağırlıkları kontrol grubundaki sıçanların absolüt dalak ağırlıklarından fark göstermezken, yağ grubundaki sıçanların absolüt dalak ağırlıklarından anlamlı derecede düşüş gösterdiği belirlenmiştir.

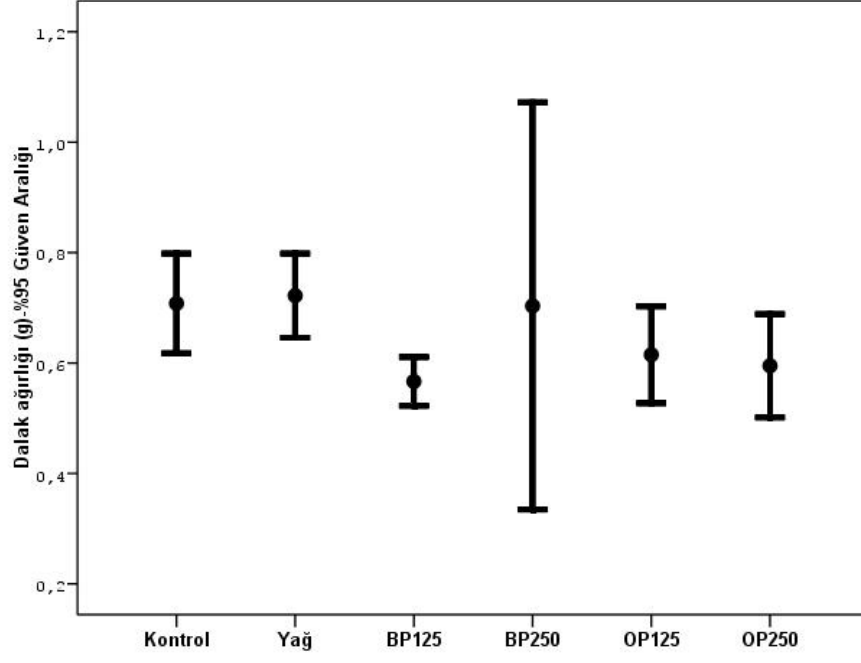
Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların çalışma sonu vücut ağırlıklarını gösteren grafik Şekil 4.9'da, relatif karaciğer ağırlıklarını gösteren grafik Şekil 4.10'da, absolüt dalak ağırlıklarını gösteren grafik ise Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.9. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların ortalama vücut ağırlıklarını gösteren grafik.



Şekil 4.10. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların ortalama relatif karaciğer ağırlıklarını gösteren grafik.



Şekil 4.11. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların ortalama dalak ağırlıklarını gösteren grafik.

Çizelge 4.3. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların vücut, absolüt ve relatif organ ağırlıkları

	Kontrol	Yağ	Bisfenol A (mg/kg/gün)		Oktilfenol (mg/kg/gün)	
			BP125	BP250	OP125	OP250
<i>N</i>	5	5	6	6	6	6
Vücut ağırlığı (g)	388,0±16,8	385,2±13,0	314,8±6,2 ^{a,b}	336,8±12,7 ^{a,b}	326,7±15,0 ^{a,b}	325,3±12,4 ^{a,b}
Böbrek						
Absolüt (g)	1,2±0,1	1,2±0,0	1,0±0,0	1,1±0,1	1,2±0,1	1,1±0,1
Relatif (mg/g)	3,1±0,1	3,2±0,0	3,2±0,1	3,3±0,1	3,6±0,2	3,4±0,1
Karaciğer						
Absolüt (g)	13,6±1,0	13,1±0,8	11,0±0,3	11,9±0,7	12,7±0,9	11,2±0,6
Relatif (mg/g)	34,8±1,2	34,0±1,4	34,8±1,0	35,1±1,1	38,8±1,7 ^b	34,3±0,8
Dalak						
Absolüt (g)	0,7±0,0	0,7±0,0	0,6±0,0 ^{a,b}	0,7±0,1	0,6±0,0 ^b	0,6±0,0 ^{a,b}
Relatif (mg/g)	1,8±0,1	1,9±0,1	1,8±0,0	2,0±0,3	1,9±0,1	1,8±0,1

N: Kullanılan sıçan sayısı

^aKontrol grubundan istatistik önem derecesinde farklı

^bYağ kontrol grubundan istatistik önem derecesinde farklı

4.4. Hematolojik inceleme sonuçları

Yapılan hematolojik incelemeler sonucunda, gruplar arasında incelenen parametrelerden yalnızca lenfosit yüzdesi, N/Gr yüzdesi, eritrosit sayısı, hematokrit yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan grupta kontrol ve yağ gruplarıyla karşılaştırıldığında incelenen hiçbir parametre açısından anlamlı farklılık bulunamamıştır. Buna karşın, 125 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan gruptaki sıçanların eritrosit sayıları ve hematokrit yüzdelerinin anlamlı düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak yağ grubuyla yapılan karşılaştırmalarda, 125 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan grupta yalnızca N/Gr yüzdesinde anlamlı düşüş saptanmıştır. 125 ve 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruplarda incelenen hiçbir parametrede yağ grubuna göre farklılık saptanamazken, 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruptaki sıçanların lenfosit yüzdelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselme, N/Gr yüzdelerinde ise anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir. 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruptaki sıçanların eritrosit sayılarında ve hematokrit yüzdelerinde kontrol grubuna göre anlamlı düşüş saptanmıştır.

Ayrıca, kontrol ve yağ grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda yağ grubunun lenfosit yüzdesinin yüksek, N/Gr yüzdesinin, eritrosit sayısının ve hematokrit yüzdesinin ise düşük olduğu bulunmuştur.

Kontrol ve uygulama gruplarına ait hematolojik inceleme sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların hematolojik inceleme sonuçları

	Kontrol	Yağ	Bisfenol A (mg/kg/gün)		Oktilfenol (mg/kg/gün)	
			BP125	BP250	OP125	OP250
<i>N</i>	5	5	5	5	6	6
WBC (10 ⁹ /L)	6,9±1,9	5,7±0,4	5,2±0,5	6,3±2,1	4,2±0,5	5,6±0,6
Lym (%)	57,5±6,0	68,6±1,1 ^a	62,7±2,3	67,8±2,8	64,7±2,6	70,2±1,5 ^a
Mon (%)	13,9±1,0	13,8±1,6	13,3±0,8	12,2±1,2	13,2±0,9	11,6±0,2
N/Gr (%)	28,7±5,2	17,6±0,7 ^a	24,0±2,3 ^b	20,0±2,2	22,1±2,0	18,2±1,5 ^a
RBC (10 ¹² /L)	9,4±0,4	7,7±0,3 ^a	8,1±0,3 ^a	8,1±0,4	7,7±0,3 ^a	8,4±0,4
MCV (fL)	55,7±0,3	55,8±0,9	55,1±0,8	57,6±0,8	56,1±1,9	55,2±0,4
Hct (%)	52,2±2,3	42,7±1,3 ^a	44,8±1,3 ^a	46,8±3,1	42,9±0,7 ^a	46,5±2,0
MCH (pg)	10,1±2,7	9,1±2,6	10,1±1,9	16,5±6,1	14,0±3,6	11,4±2,7
MCHC (g/dL)	18,1±4,8	16,1±4,4	18,4±3,5	28,4±10,4	24,2±5,2	20,7±4,9
Hb (g/dL)	9,5±2,6	6,9±2,0	8,3±1,7	14,0±5,6	10,3±2,0	9,7±2,5
RDW (%)	20,0±0,4	19,4±0,4	19,4±0,3	19,3±0,2	19,6±0,5	19,8±0,3
µ-RBC (%)	9,0±1,2	7,2±1,6	10,4±2,3	6,5±0,8	10,5±1,9	9,0±1,1
THR (10 ⁹ /L)	474,2±32,3	393,4±75,6	447,6±35,3	484,4±73,5	379,2±77,9	425,7±67,4
MPV (fL)	6,5±0,1	6,4±0,4	6,5±0,3	6,5±0,3	6,9±0,3	6,5±0,2
PDW	9,9±0,3	9,4±0,4	9,8±0,3	9,8±0,2	10,2±0,4	9,8±0,3

N: Kullanılan sıçan sayısı; WBC: Lökosit; Lym; Lenfosit; Mon; Monosit; N/Gr; Nötrofil lökosit/Granülosit; RBC: Eritrosit; MCV: Ortalama eritrosit volümü; Hct: Hematokrit; MCH: Ortalama eritrosit hemoglobini; MCHC: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu; Hb: Hemoglobin; RDW: Eritrosit dağılım genişliği; µ-RBC: µ-Eritrosit; THR: Trombosit; MPV: Ortalama trombosit volümü; PDW: Trombosit dağılım genişliği

^aKontrol grubundan istatistik önem derecesinde farklı

^bYağ kontrol grubundan istatistik önem derecesinde farklı

4.5. Biyokimyasal inceleme sonuçları

Yapılan biyokimyasal incelemeler sonucunda, gruplar arasında incelenen parametrelerden yalnızca serum total protein, glikoz, ALT ve ALP seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Yağ, 250 mg/kg/gün bisfenol A, 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruplardaki sıçanların serum total protein seviyeleri kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Diğer taraftan, 125 mg/kg/gün bisfenol A ve 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruplardaki sıçanların serum total protein seviyeleri yağ grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Yağ, 125 ve 250 mg/kg/gün bisfenol A ve 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruplardaki sıçanların serum glikoz seviyelerinin kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek, 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruptaki sıçanların serum glikoz seviyelerinin yağ grubundan anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır.

250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruptaki sıçanların serum ALT seviyeleri yağ grubundan anlamlı olarak yüksek, ALP seviyeleri ise kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların biyokimyasal inceleme sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların biyokimyasal inceleme sonuçları

	Kontrol	Yağ	Bisfenol A (mg/kg/gün)		Oktilfenol (mg/kg/gün)	
			BP125	BP250	OP125	OP250
<i>N</i>	5	5	6	6	6	6
T.Protein (g/dL)	9,4±0,7	6,7±0,3 ^a	8,7±0,8 ^b	7,1±0,2 ^a	8,2±0,2 ^b	7,4±0,1 ^a
T.Kolesterol (mg/dL)	68,1±6,4	50,9±5,0	66,6±5,6	56,5±4,2	62,9±3,0	61,2±2,9
Glikoz (UL)	98,8±10,7	141,8±12,0 ^a	170,7±21,5 ^a	154,5±22,4 ^a	152,2±14,5 ^a	84,7±6,8 ^b
Trigliserid (mg/dL)	156,9±14,9	146,8±21,8	117,0±7,0	92,9±11,9	109,7±16,6	111,4±14,8
Kalsiyum (mg/dL)	12,8±0,2	11,5±0,6	12,9±0,8	12,0±0,2	13,0±0,4	12,7±0,3
LDH (IU/L)	1068,0±313,2	620,7±42,0	754,8±112,5	1036,8±158,1	659,2±70,1	919,2±187,0
Albümin (g/L)	44,9±1,6	45,0±4,0	52,0±3,3	42,4±1,4	46,8±1,2	42,8±1,1
GGT (IU/L)	4,0±1,4	2,8±0,8	5,7±1,4	4,1±0,5	4,1±1,2	3,5±0,6
AST (UI/L)	140,7±26,7	107,0±5,9	140,1±21,9	153,2±16,5	132,2±12,4	140,7±10,8
CK-MB (IU/L)	2100,8±218,5	1511,4±63,6	1942,0±139,8	2101,2±396,5	2087,9±241,3	2245,5±462,7
ALT (IU/L)	45,6±6,6	33,6±2,2	40,7±2,6	61,7±21,7	41,1±3,6	51,9±3,3 ^b
ALP (IU/L)	490,9±71,3	371,2±62,3	424,5±21,0	352,7±35,3	368,7±38,2	223,6±17,9 ^a
Bilirübin (mg/dL)	1,0±0,1	0,7±0,1	0,6±0,1	0,8±0,3	0,5±0,1	0,6±0,1
Fosfor (mg/dL)	15,4±2,4	9,4±1,8	9,4±0,7	12,7±1,7	14,4±1,8	13,3±1,5
Üre (mg/dL)	77,8±3,2	66,9±5,9	80,9±3,2	72,5±4,2	76,4±4,1	72,2±5,1
Kreatinin (mg/dL)	0,7±0,0	0,6±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0	0,6±0,0	0,7±0,0

N: Kullanılan sıçan sayısı; LDH: Laktat dehidrogenaz; GGT: Gama glutamil transferaz; AST: Aspartat transaminaz; CK-MB: Kreatinin kinaz; ALT: Alanin transaminaz; ALP: Alkalen fosfataz

^aKontrol grubundan istatistik önem derecesinde farklı

^bYağ kontrol grubundan istatistik önem derecesinde farklı

4.6. Histopatolojik inceleme sonuçları

Rutin histolojik yöntemlerle hazırlanan ve H&E ile boyanan karaciğer, böbrek ve dalak dokularına ait preparatlar ışık mikroskobu altında incelenerek, histopatolojik açıdan değerlendirilmiştir. Karaciğer dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu, konjesyon, ödem, dilatasyon ve dejenerasyon, böbrek dokusunda dilatasyon, tübüler dejenerasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve konjesyon, dalak dokusunda ise fibrozis, konjesyon ve megakaryosit sayısında artış histopatolojik değerlendirme kriterleri olarak belirlenmiş ve bu kriterlerin görülme sıklıkları kaydedilmiştir

Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda, bisfenol A ve oktilfenol uygulamasının karaciğer, böbrek ve dalak dokularında doza bağlı olmayan histopatolojik değişikliklere yol açtığı tespit edilmiştir. Karaciğer dokusunda incelenen bütün parametreler açısından gruplar arasında fark gözlenirken, böbrek dokusunda yalnızca dilatasyon görülme sıklığı açısından, dalak dokusunda ise yalnızca megakaryosit sayısındaki artışın görülme sıklığı açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Çizelge 4.6'da kontrol ve uygulama gruplarındaki hayvanlarda karaciğer, böbrek ve dalak dokularında görülen histopatolojik bulguların sıklığı verilmiştir.

Çizelge 4.6. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların karaciğer, böbrek ve dalak dokularına ait histopatolojik inceleme sonuçları

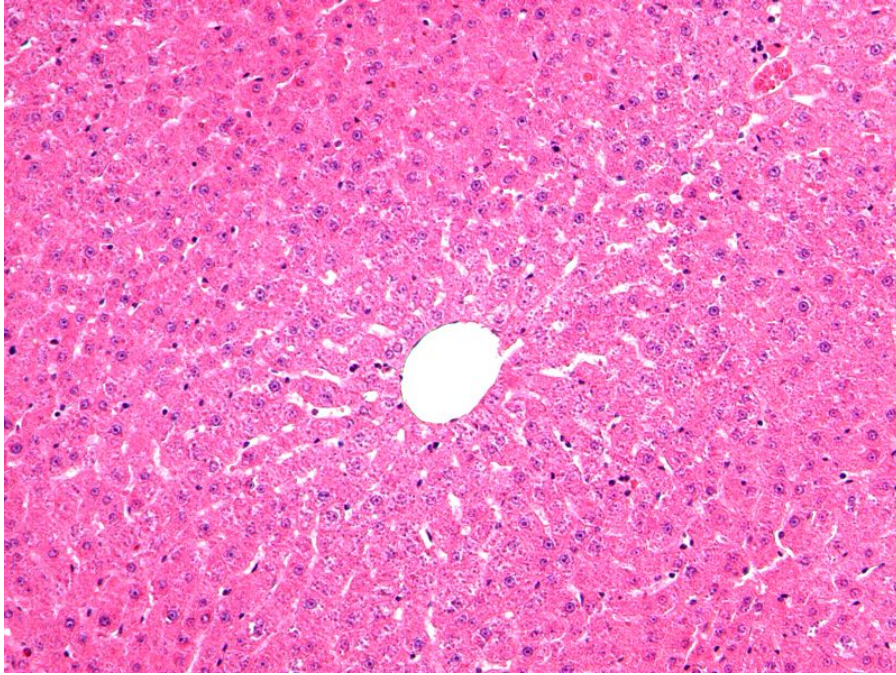
	Kontrol	Yağ	Bisfenol A (mg/kg/gün)		Oktilfenol (mg/kg/gün)	
			BP125	BP250	OP125	OP250
Karaciğer						
Mononükleer hücre infiltrasyonu ^a	1/5*	1/5	6/6	6/6	5/5	6/6
Konjesyon ^a	1/5	0/5	6/6	6/6	5/5	6/6
Ödem ^a	0/5	0/5	2/6	4/6	5/5	6/6
Dilatasyon ^a	0/5	1/5	5/6	4/6	3/5	6/6
Dejenerasyon ^a	0/5	0/5	3/6	3/6	0/5	0/6
Böbrek						
Dilatasyon	0/5	1/5	1/4	3/6	3/5	2/6
Tübüler dejenerasyon ^a	0/5	0/5	0/4	1/6	4/5	3/6
Mononükleer hücre infiltrasyonu ^a	1/5	1/5	3/4	6/6	4/5	5/6
Ödem ^a	0/5	0/5	3/4	5/6	5/5	6/6
Konjesyon ^a	1/5	1/5	3/4	6/6	5/5	6/6
Dalak						
Fibrozis ^a	1/5	1/5	5/6	6/6	5/5	4/5
Konjesyon ^a	1/5	0/5	6/6	5/6	5/5	5/5
Megakaryosit sayısında artış	0/5	0/5	2/6	3/6	0/5	2/5

*Değerler histopatolojik değişiklik gözlenen sıçan sayısı/incelenen sıçan sayısı şeklinde verilmiştir.

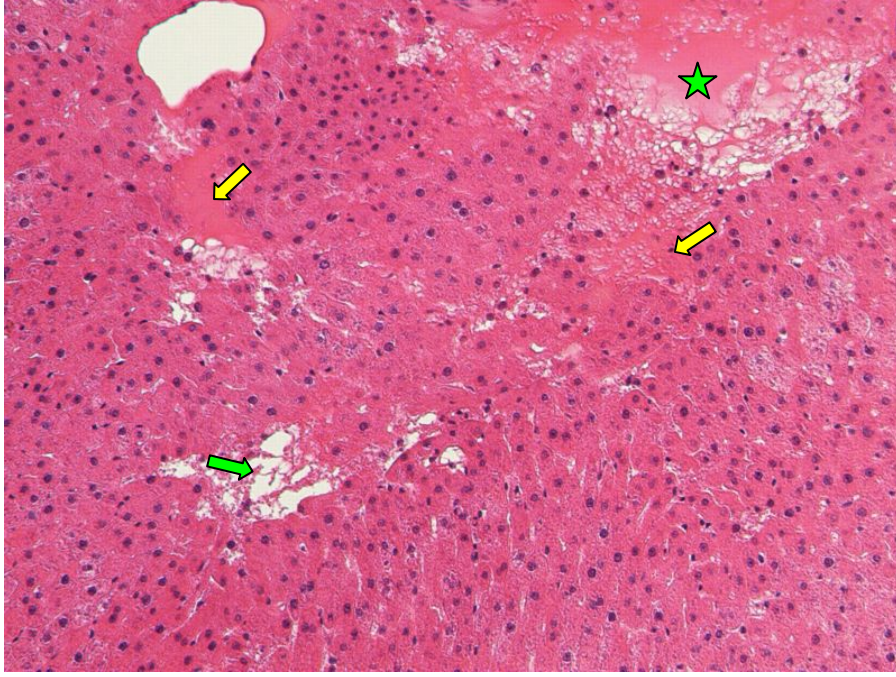
^aGruplar arasında istatistik önem derecesinde fark bulunmaktadır $p \leq 0.05$

4.6.1. Karaciğer

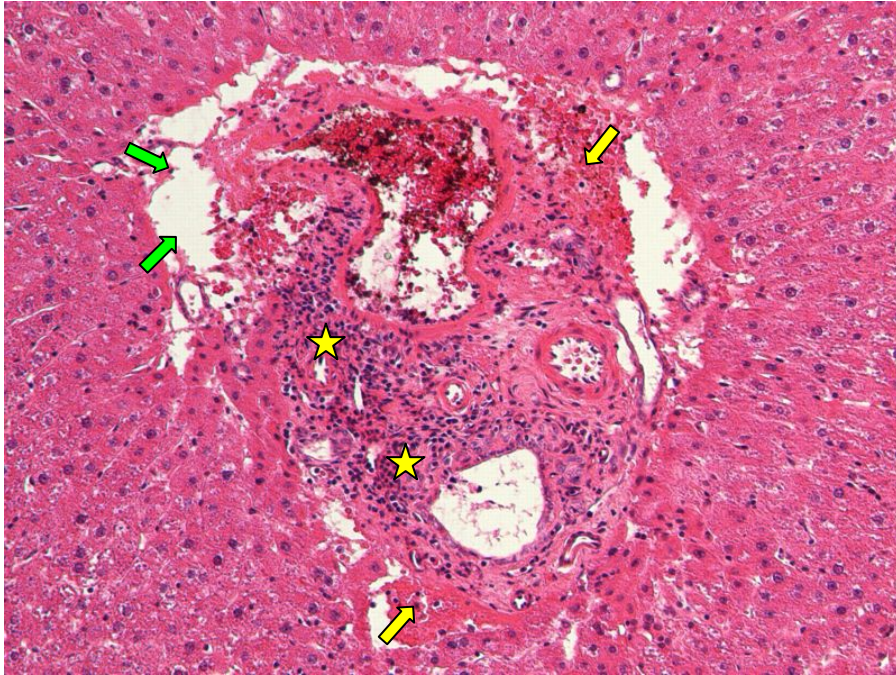
Kontrol grubuna ait sıçanların karaciğer dokusunun histolojik yapısı Şekil 4.12'de ve Şekil 4.16'da verilmiştir. Karaciğer dokusu histopatolojik olarak incelendiğinde, tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna göre önemli patolojik değişiklikler izlenmiştir. Tüm uygulama gruplarında artmış konjesyon (Şekil 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.19), minimal mononükleer hücre infiltrasyonu (Şekil 4.14, 4.15 ve 4.17), ödem (Şekil 4.13 ve 4.17) ve dilatasyon tespit edilmiştir. Ayrıca, 125 ve 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan gruplarda dejenerasyon sıklığında anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.18). 250 mg/kg/gün bisfenol A ve 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulaması yapılan gruplarda sitoplazmik erime gözlenmiş (Şekil 4.17 ve 4.19), ancak bu histopatolojik bulgular istatistiksel analize dahil edilmemiştir.



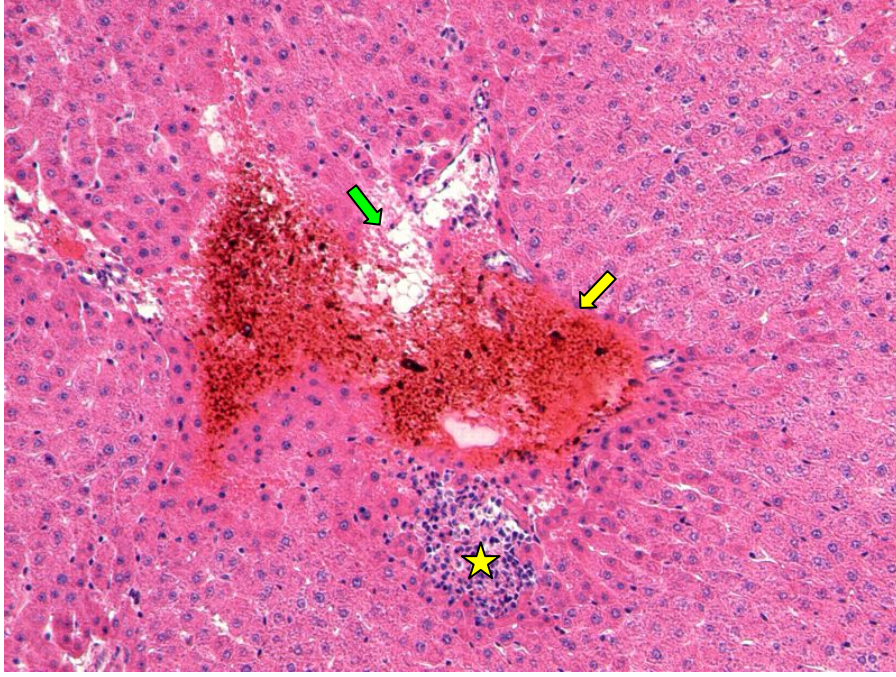
Şekil 4.12. Kontrol grubu sıçanlarda karaciğer dokusunun histolojik yapısı (H&E, X200).



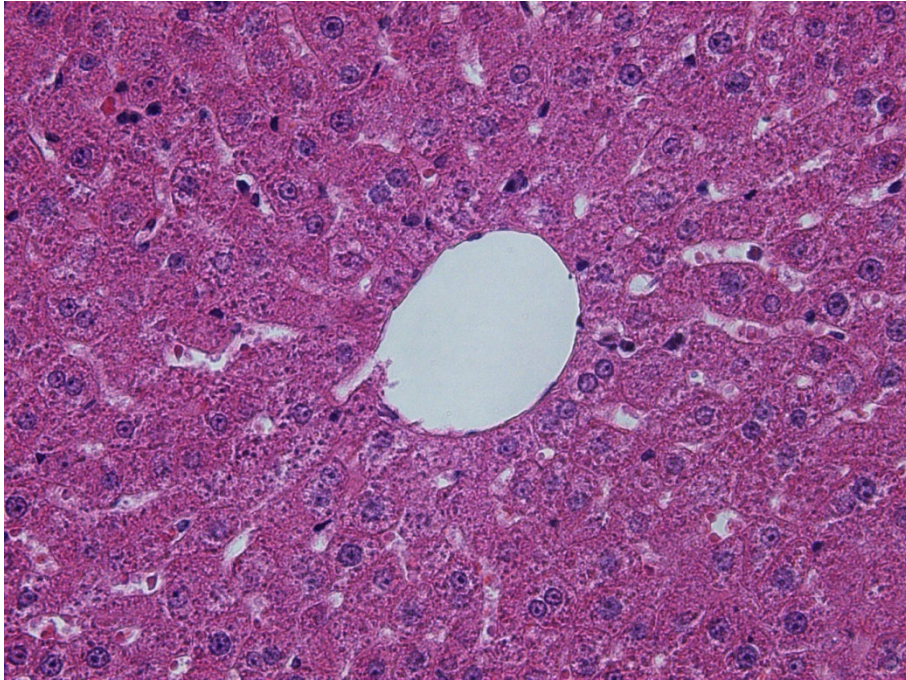
Şekil 4.13. 125 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda ödem (★), konjesyon (→) ve dejenerasyon (→) (H&E, X200).



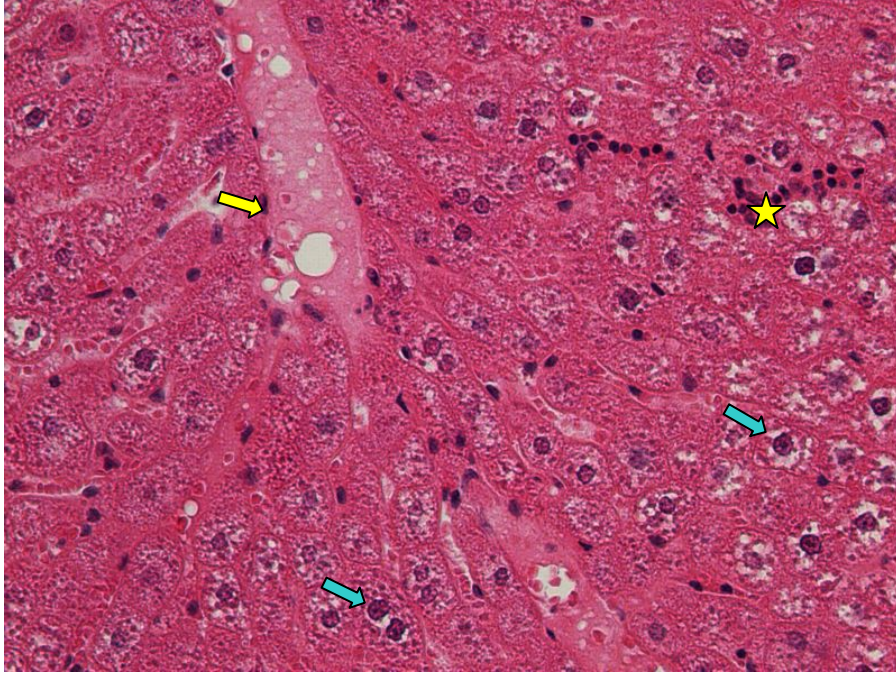
Şekil 4.14. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu (★), konjesyon (→) ve dejenerasyon (→) (H&E, X200).



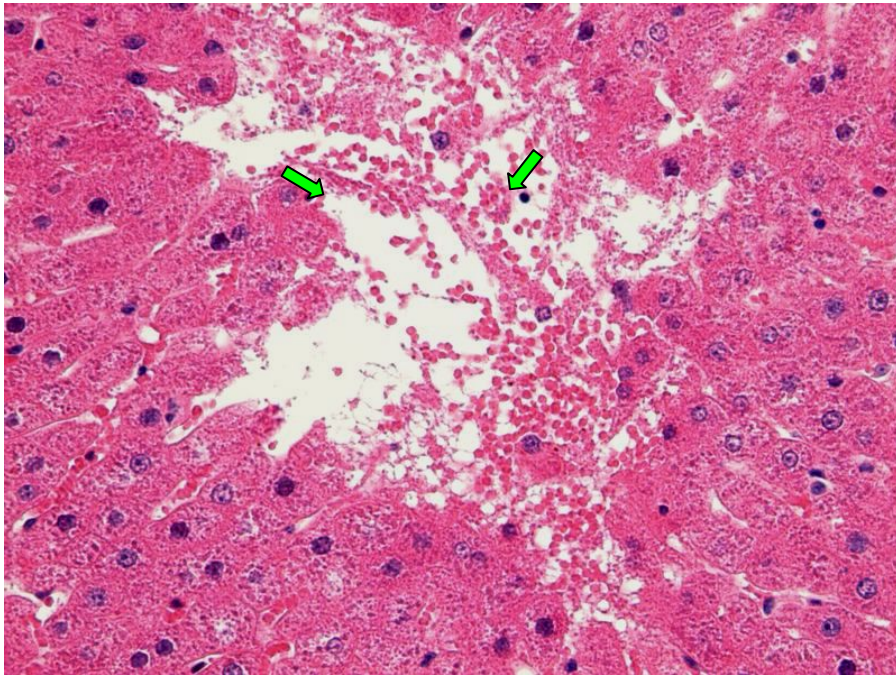
Şekil 4.15. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu (★), konjesyon (⇨) ve dejenerasyon (⇨) (H&E, X200).



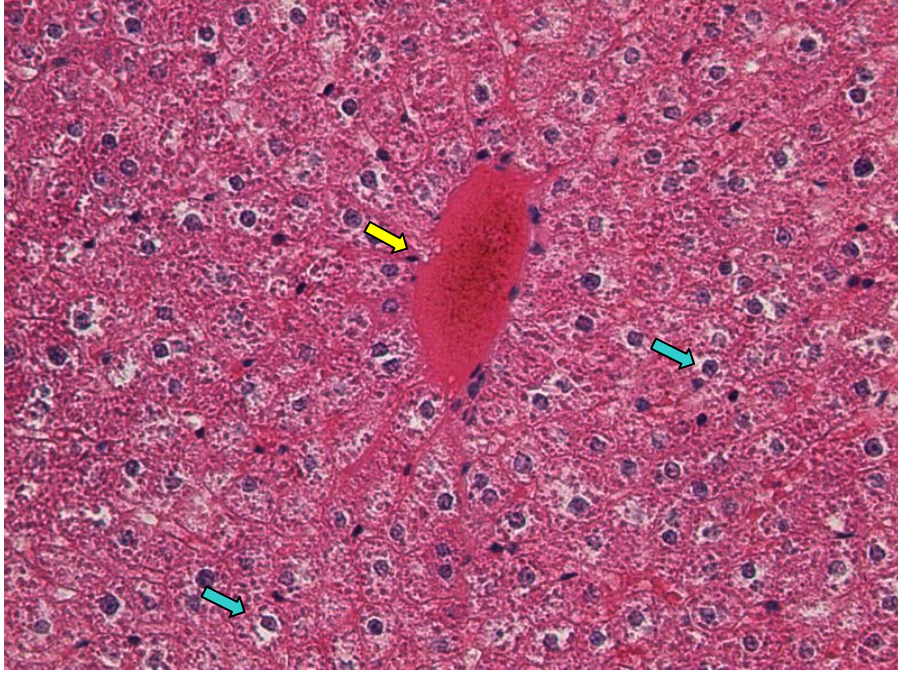
Şekil 4.16. Kontrol grubu sıçanlarda karaciğer dokusunun histolojik yapısı (H&E, X400).



Şekil 4.17. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda ödem (→), minimal mononükleer hücre infiltrasyonu (★) ve sitoplazmik erime (→) (H&E, X400).



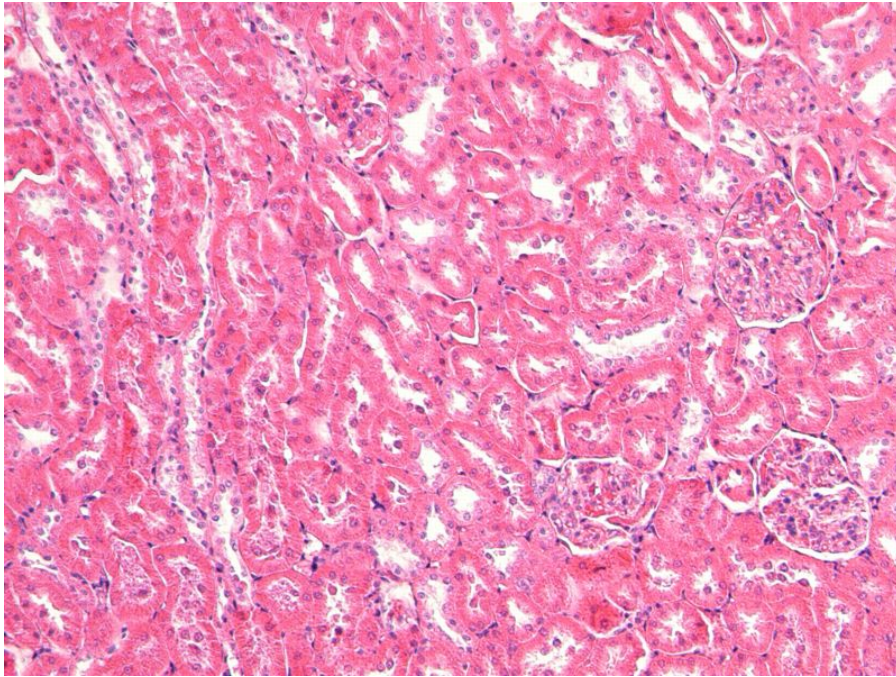
Şekil 4.18. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda dejenerasyon (→) (H&E, X400).



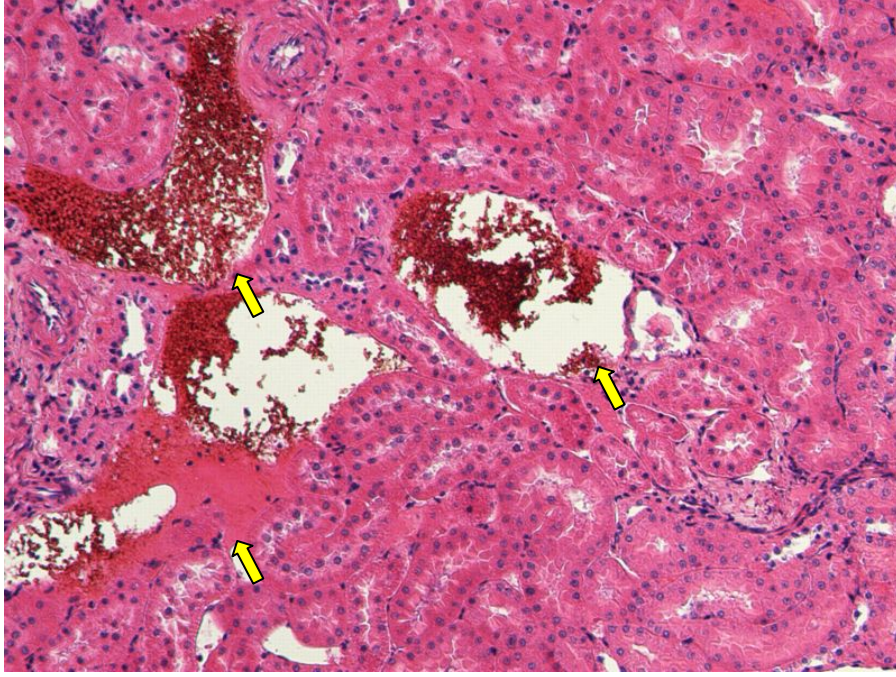
Şekil 4.19. 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda konjesyon (→) ve sitoplazmik erime (→) (H&E, X400).

4.6.2. Böbrek

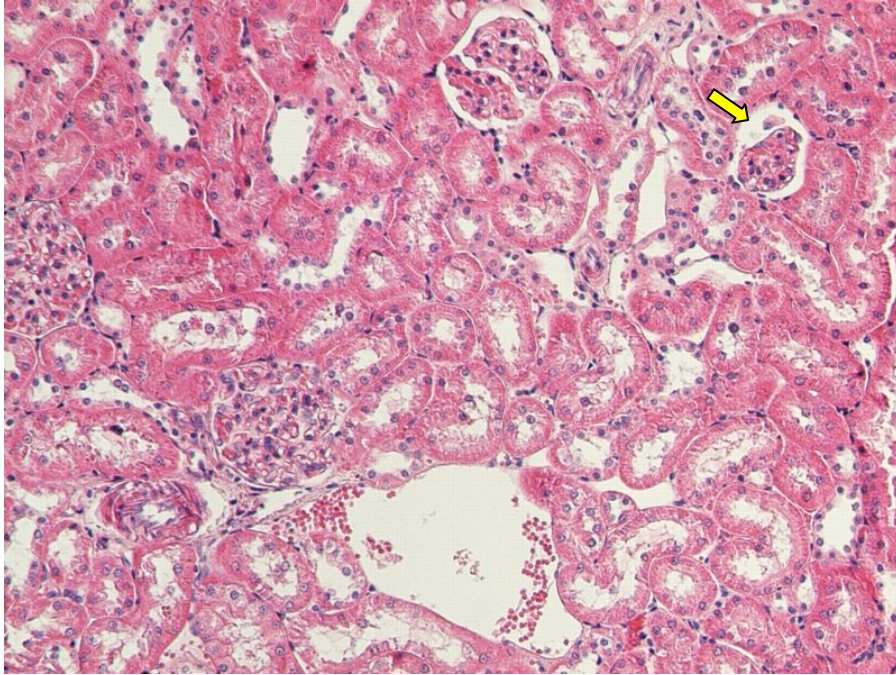
Kontrol grubuna ait sıçanların böbrek dokusunun histolojik yapısı Şekil 4.20'de ve Şekil 4.23'te verilmiştir. Böbrek dokusu histopatolojik olarak incelendiğinde, uygulama gruplarında kontrol grubuna göre önemli patolojik değişiklikler izlenmiştir. Tüm uygulama gruplarında artmış konjesyon (Şekil 4.21, 4.24, 4.25 ve 4.27), minimal mononükleer hücre infiltrasyonu (Şekil 4.26) ve ödem tespit edilmiştir. Bu bulguların yanı sıra, 125 ve 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruplarda tübüler dejenerasyon sıklığında kontrol grubuna göre anlamlı artış saptanmıştır (4.24, 4.26 ve 4.27). Böbrek dokusunda incelenen parametrelerden dilatasyon görülme sıklığı açısından kontrol ve uygulama grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Ayrıca, 250 mg/kg/gün bisfenol A ve 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan grupta atrofik glomeruluslar gözlenmiş (Şekil 4.22 ve 4.25), ancak bu bulgular istatistiksel analize dahil edilmemiştir.



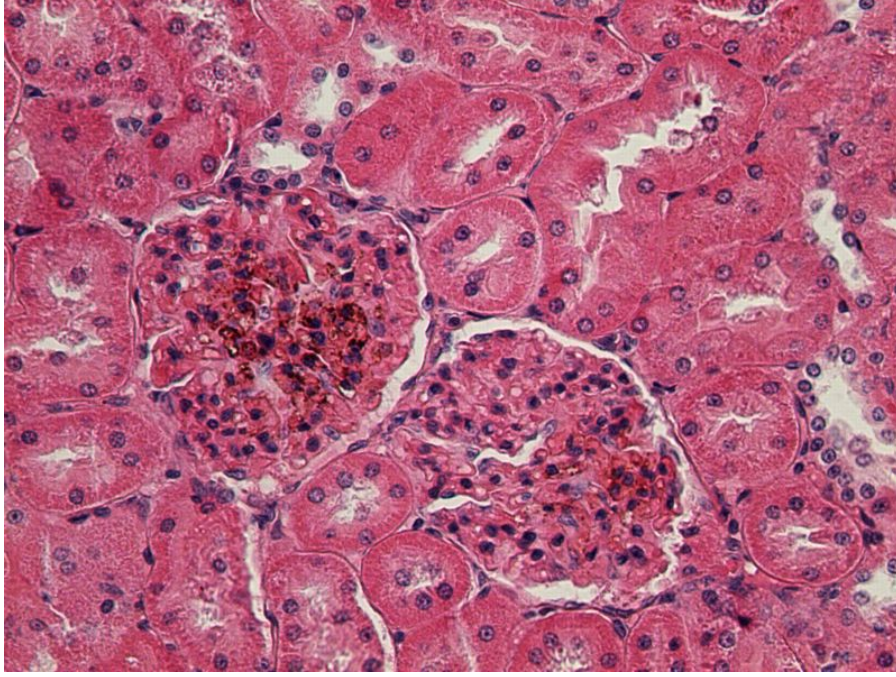
Şekil 4.20. Kontrol grubu sıçanlarda böbrek dokusunun histolojik yapısı (H&E, X200).



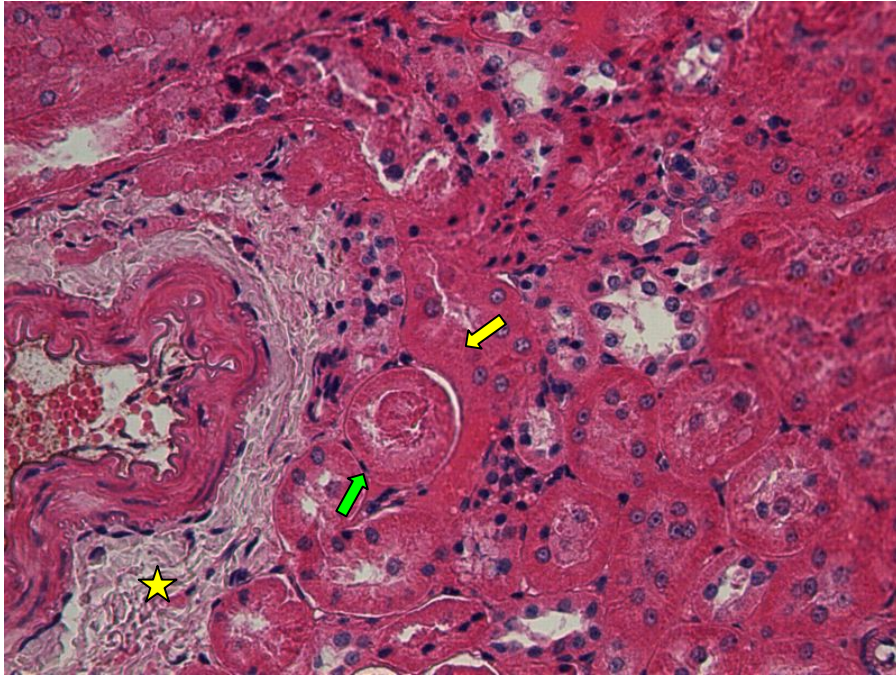
Şekil 4.21. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda konjesyon (→) (H&E, X200).



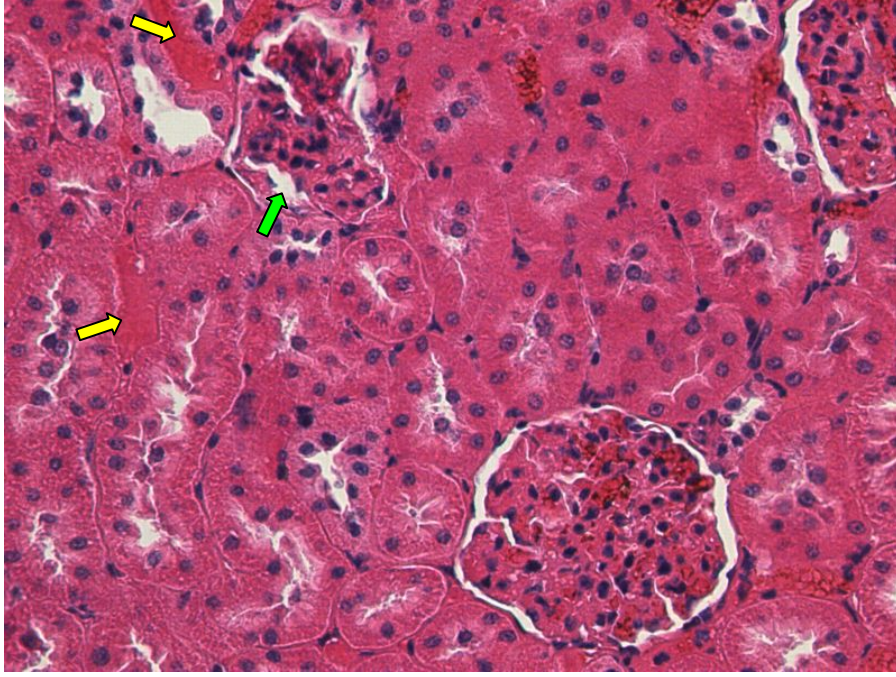
Şekil 4.22. 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda glomerular atrofi (→) (H&E, X200).



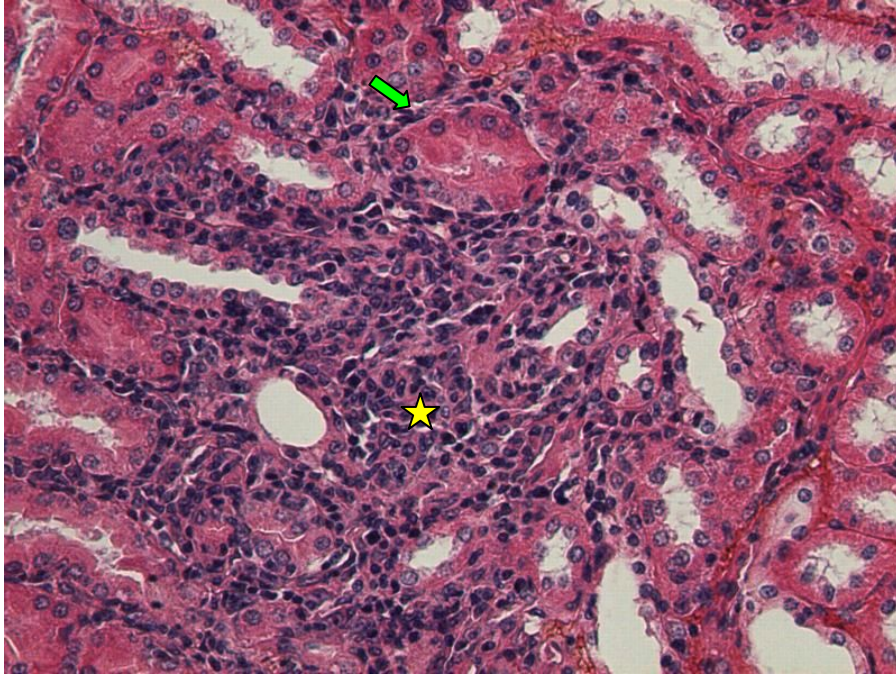
Şekil 4.23. Kontrol grubu sıçanlarda böbrek dokusunun histolojik yapısı (H&E, X400).



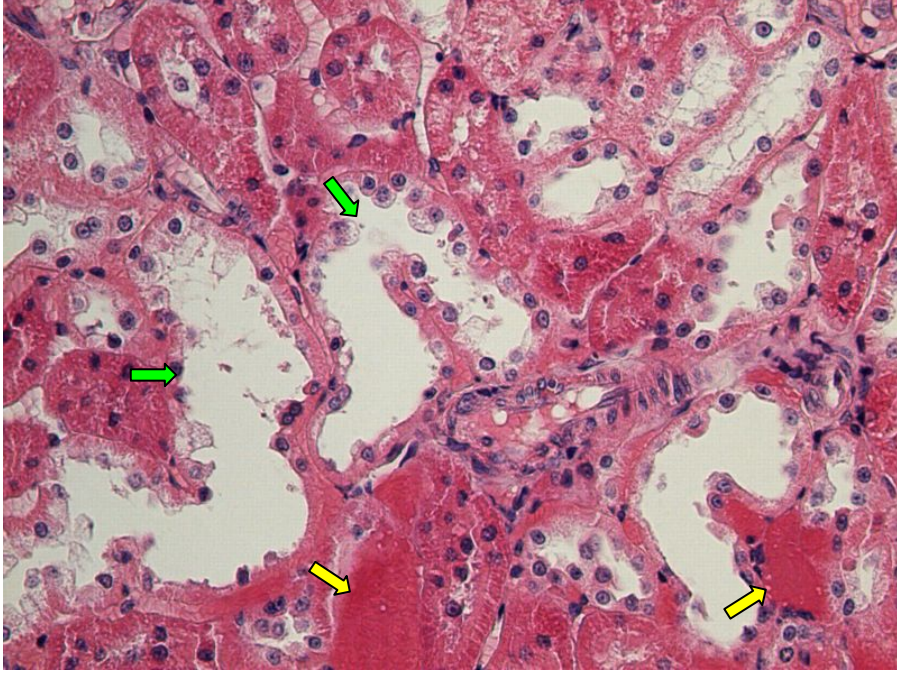
Şekil 4.24. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda konjesyon (→), tübüler dejenerasyon (→) ve artmış fibröz doku (★) (H&E, X400).



Şekil 4.25. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda glomerular atrofi (→) ve konjesyon (→) (H&E, X400).



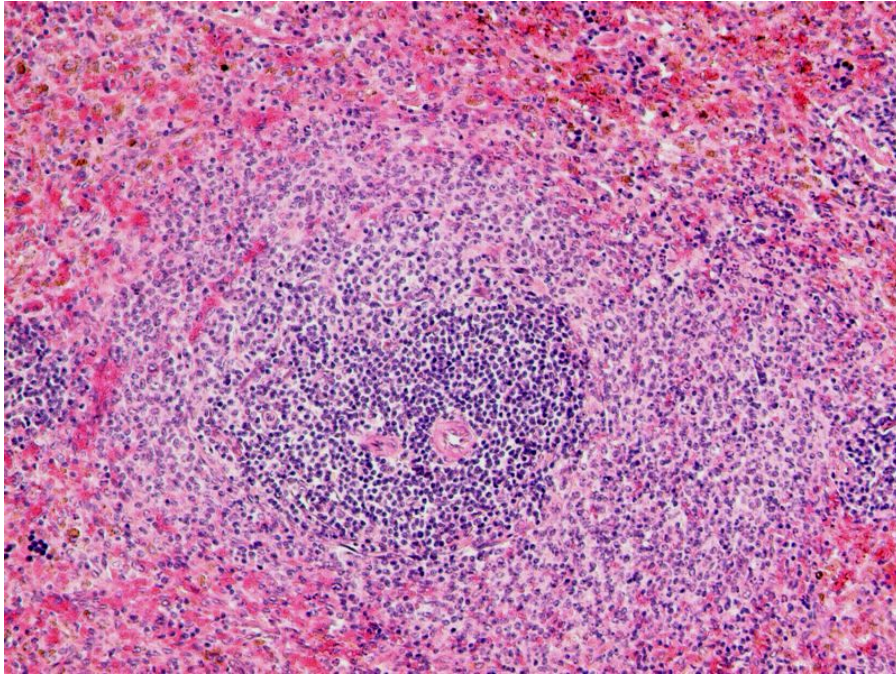
Şekil 4.26. 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda tübüler dejenerasyon (→) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (★) (H&E, X400).



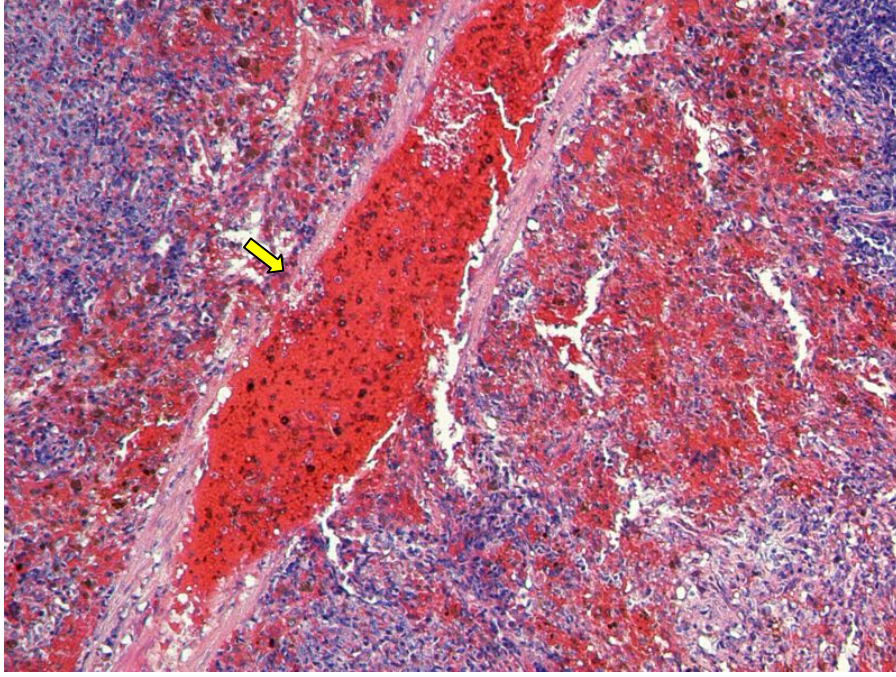
Şekil 4.27. 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda tübüler dejenerasyon (→) ve konjesyon (→) (H&E, X400).

4.6.3. Dalak

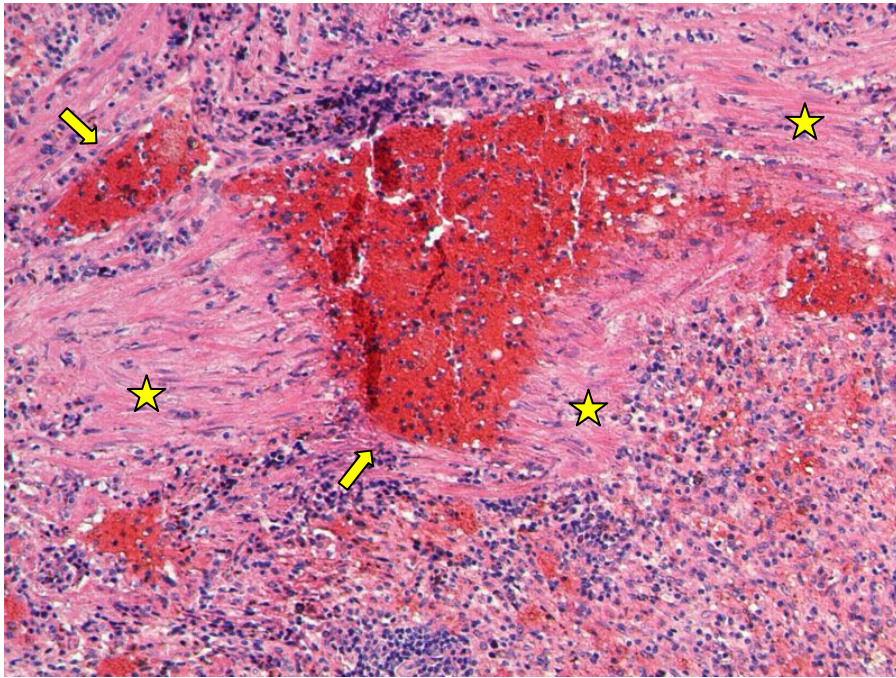
Kontrol grubuna ait sıçanların dalak dokusunun histolojik yapısı Şekil 4.28'de ve Şekil 4.31'de verilmiştir. Dalak dokusu histopatolojik olarak incelendiğinde, uygulama gruplarında kontrol grubuna göre önemli patolojik değişiklikler izlenmiştir. Kontrol ve uygulama grupları arasında konjesyon (Şekil 4.29 ve 4.30) ve fibrozis (Şekil 4.30, 4.34 ve 4.35) görülme sıklıkları açısından anlamlı fark tespit edilmiştir. Bu bulguların yanı sıra, 125 ve 250 mg/kg/gün bisfenol A ve 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan gruplarda dalak dokusunda kontrol grubuna göre megakaryosit sayısında artış gözlenmiş, ancak bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (Şekil 4.32 ve 4.33).



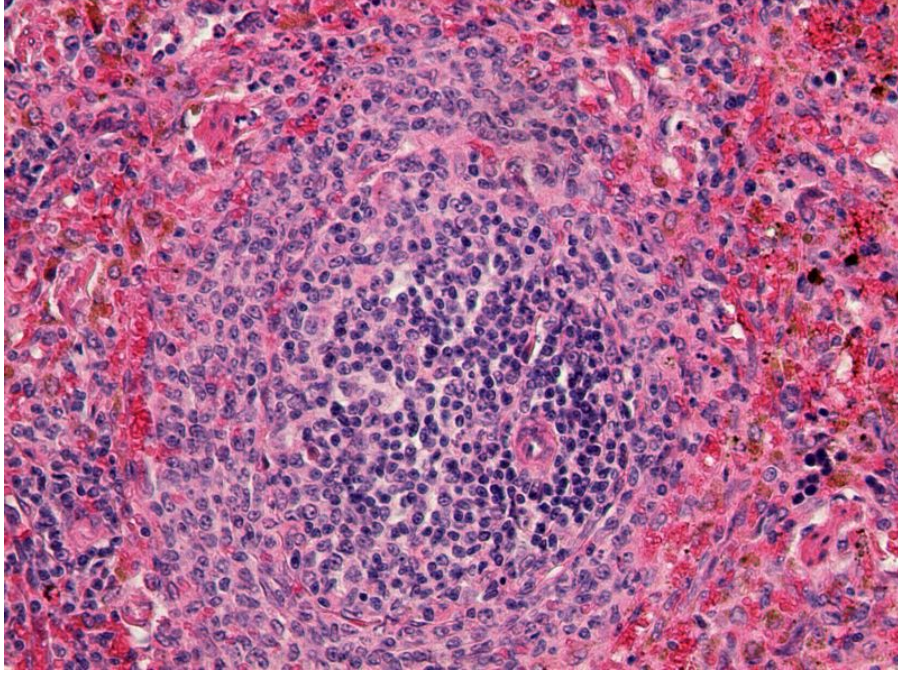
Şekil 4.28. Kontrol grubu sıçanlarda dalak dokusunun histolojik yapısı (H&E, X200).



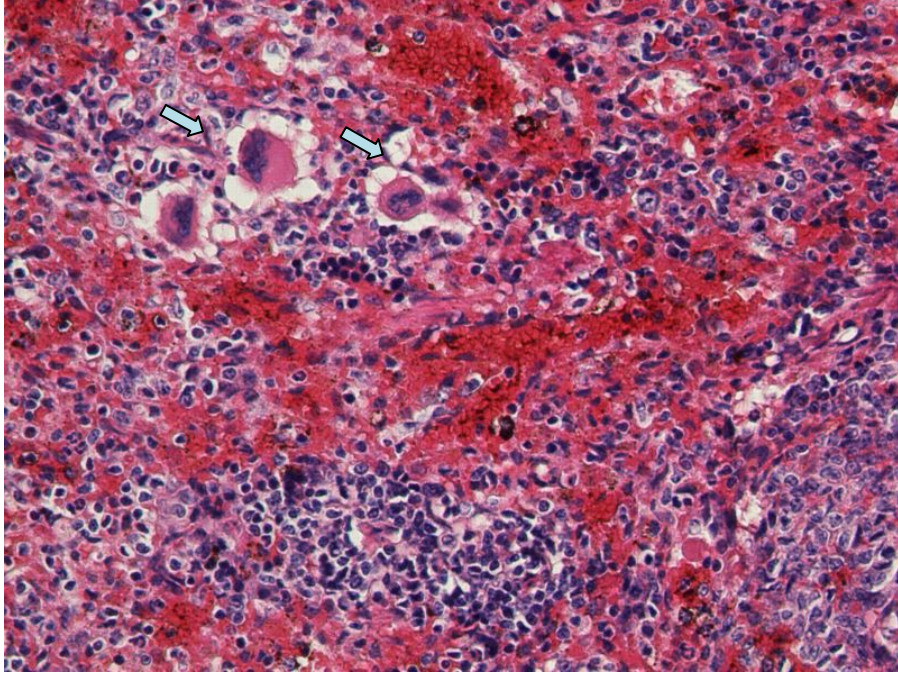
Şekil 4.29. 125 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda dalak dokusunda konjesyon (→) (H&E, X200).



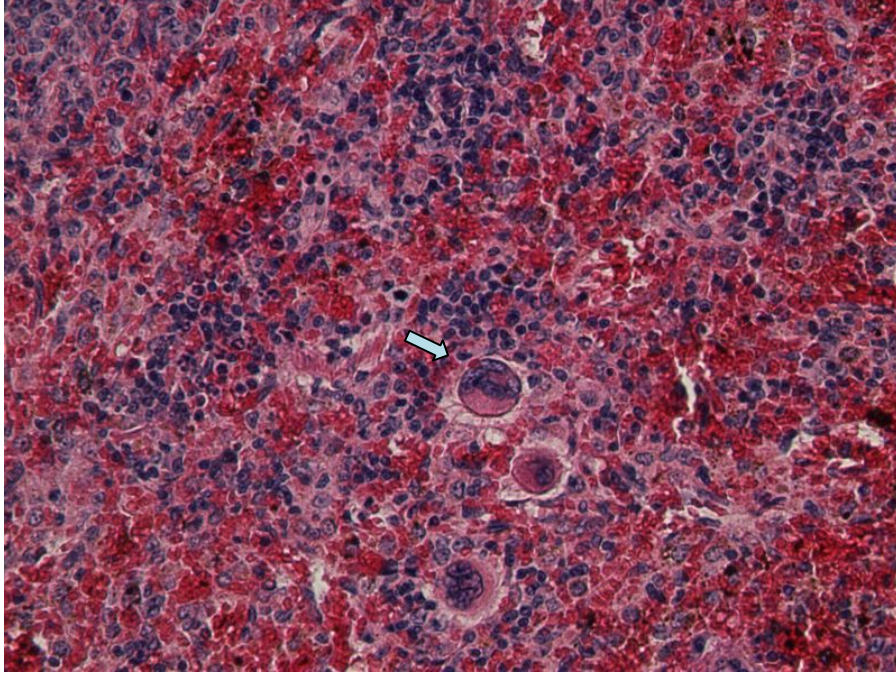
Şekil 4.30. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda dalak dokusunda fibröz doku oluşumu (★) ve konjesyon (→) (H&E, X200).



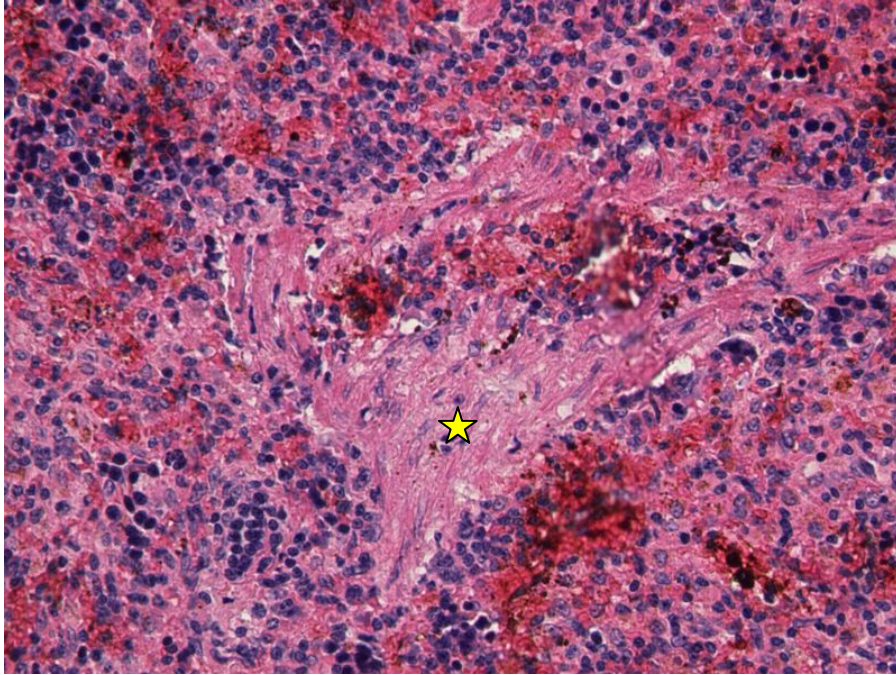
Şekil 4.31. Kontrol grubu sıçanlarda dalak dokusunun histolojik yapısı (H&E, X400).



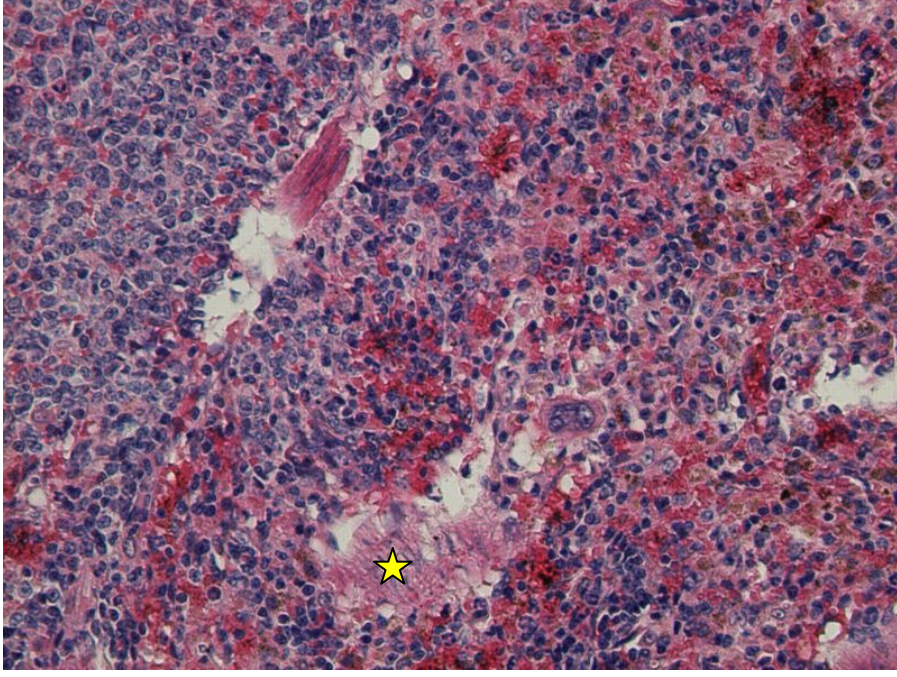
Şekil 4.32. 125 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda dalak dokusunda megakaryosit sayısında artış (⇨) (H&E, X400).



Şekil 4.33. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda dalak dokusunda megakaryosit sayısında artış (⇨) (H&E, X400).



Şekil 4.34. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda dalak dokusunda fibröz doku oluşumu (★) (H&E, X400).



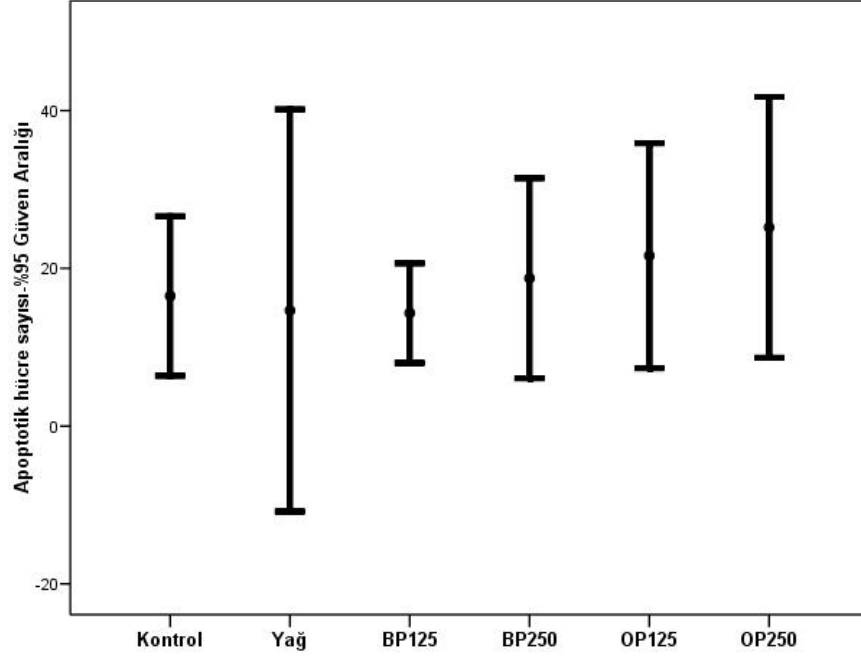
Şekil 4.35. 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanlarda dalak dokusunda fibröz doku oluşumu (★) (H&E, X400).

4.7. İmmünohistokimyasal inceleme sonuçları

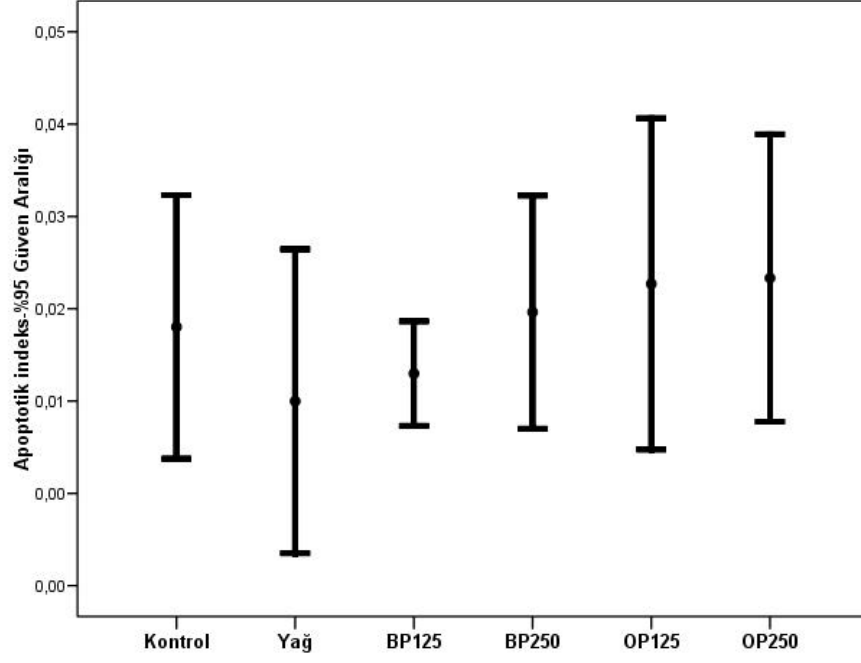
TUNEL yöntemi kullanılarak karaciğerde yapılan immünohistokimyasal incelemelerde, apoptotik hücre sayısı ve apoptotik indeks açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların apoptotik hücre sayıları Şekil 4.36'da, apoptotik indeksleri ise Şekil 4.37'de gösterilmiştir.

Kontrol grubu sıçanlardaki karaciğer dokusunun histolojik yapısı Şekil 4.38'de, uygulama gruplarına ait karaciğer dokularındaki apoptotik hücreler ise Şekil 4.39, 4.40, 4.41 ve 4.42'de gösterilmiştir.

Kontrol ve uygulama gruplarına ait immünohistokimyasal inceleme sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.36. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların apoptotik hücre sayıları.



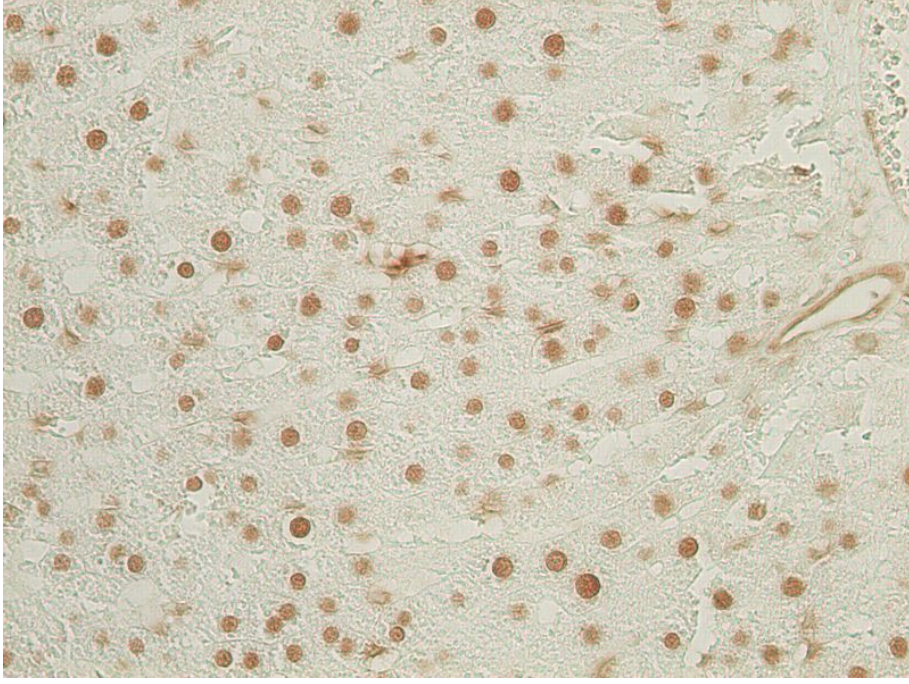
Şekil 4.37. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların apoptotik indeksleri.

Çizelge 4.7. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların immünohistokimyasal inceleme sonuçları

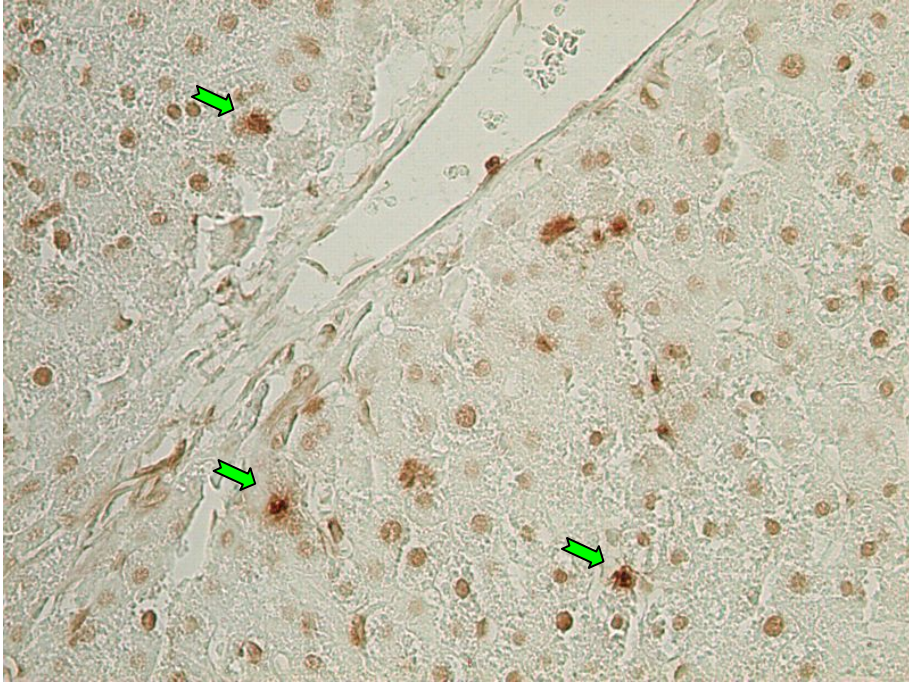
	Kontrol	Yağ	Bisfenol A (mg/kg/gün)		Oktilfenol (mg/kg/gün)	
			BP125	BP250	OP125	OP250
<i>N</i>	4	3	6	4	5	5
Apoptotik hücre sayısı*	16,5±3,2	14,7±5,9	14,3±2,5	18,8±4,0	21,6±5,1	25,2±6,0
Apoptotik indeks	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,0	0,02±0,00	0,02±0,01	0,02±0,01

N: Kullanılan sıçan sayısı

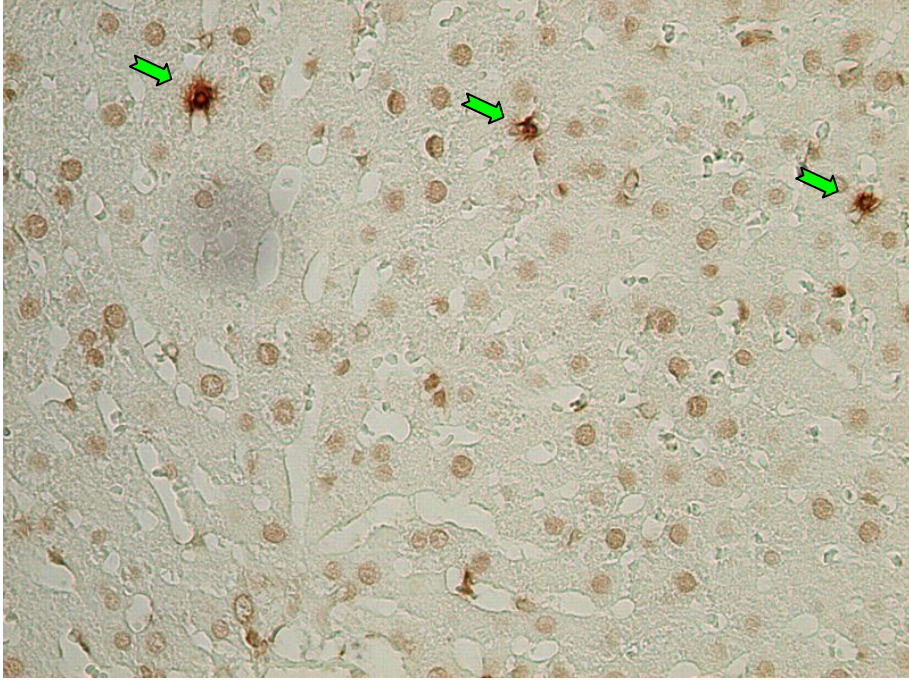
*Karaciğer preparatları üzerinde X40 oküler merceğinde rastgele seçilen 10 farklı birim alan içine düşen apoptotik hücre sayısı



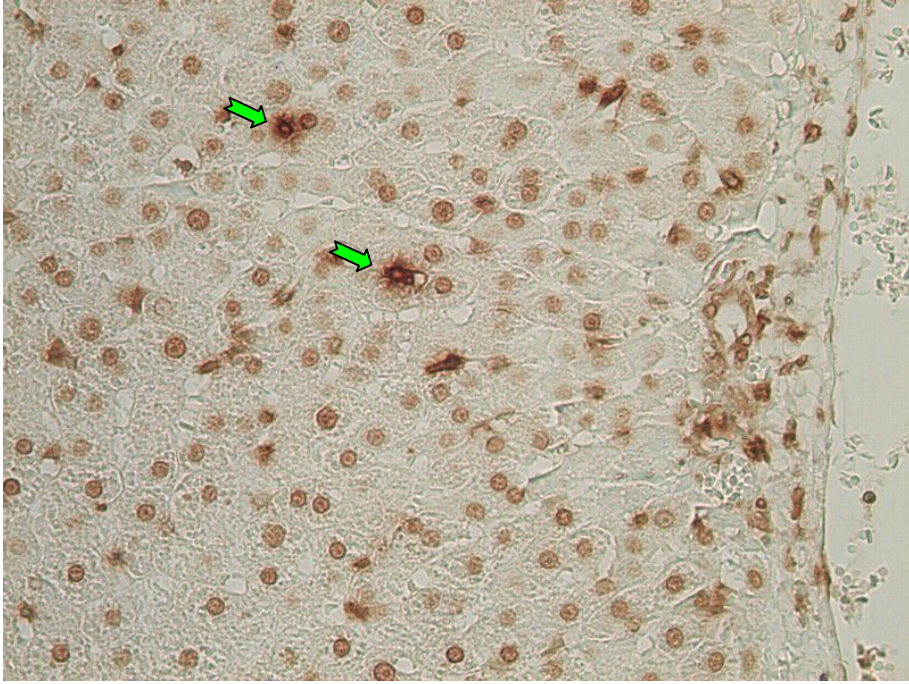
Şekil 4.38. Kontrol grubu sıçanlarda karaciğer dokusunun histolojik yapısı (TUNEL, X400).



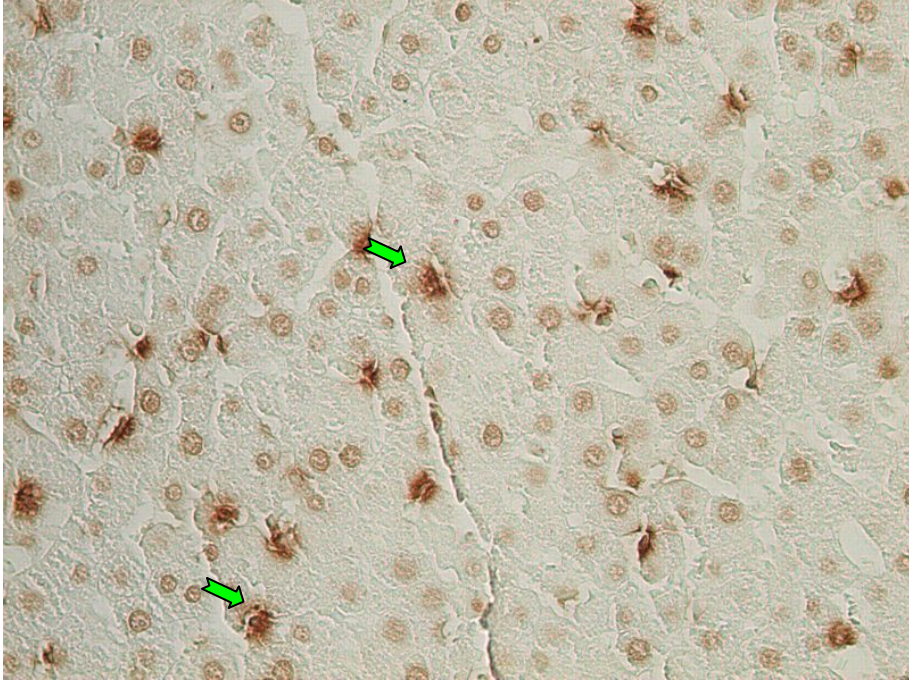
Şekil 4.39. 125 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusundaki apoptotik hücreler (→) (TUNEL, X400).



Şekil 4.40. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusundaki apoptotik hücreler (→) (TUNEL, X400).



Şekil 4.41. 125 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusundaki apoptotik hücreler (→) (TUNEL, X400).



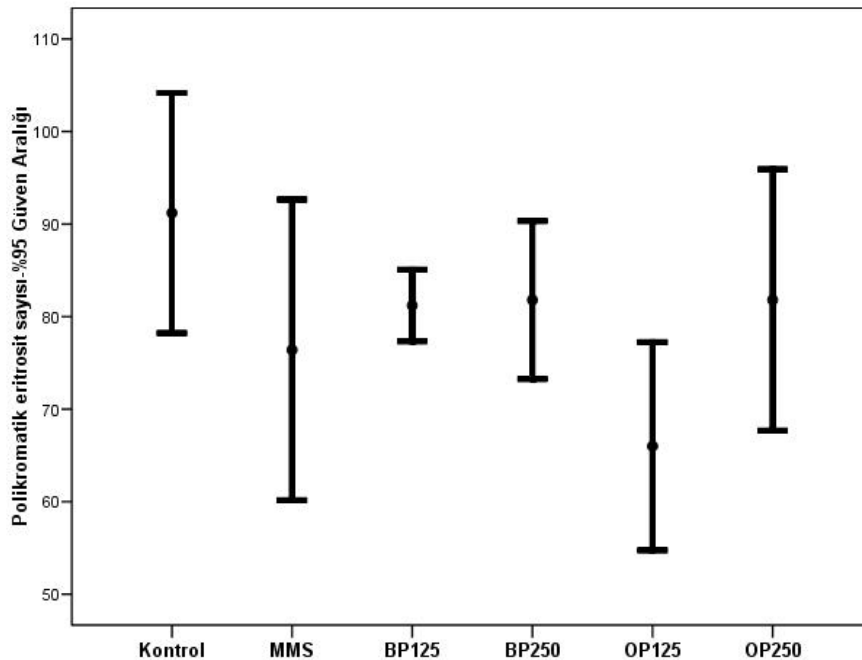
Şekil 4.42. 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusundaki apoptotik hücreler (→) (TUNEL, X400).

4.8. Sitogenetik inceleme sonuçları

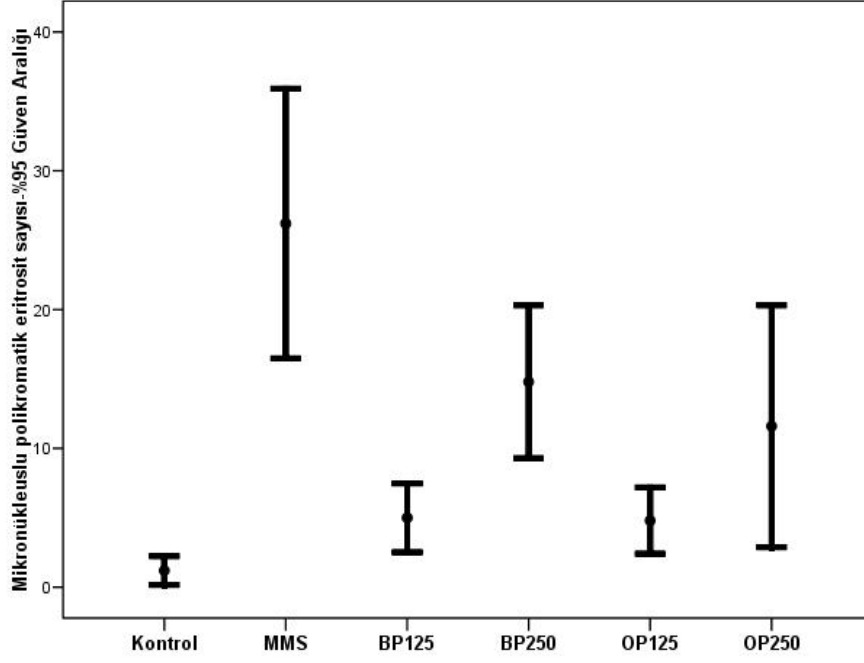
Sitogenetik inceleme sonuçlarına göre kontrol grubu ile 125 mg/kg/gün bisfenol A ve oktilfenol uygulanan gruplar arasında 200 eritrosit içindeki polikromatik eritrosit sayısı açısından anlamlı bir fark saptanırken, kontrol grubu ile 250 mg/kg/gün bisfenol A ve oktilfenol uygulanan gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Gruplar, 1000 polikromatik eritrosit sayılarak belirlenen mikronükleuslu polikromatik eritrosit sayısı açısından karşılaştırıldığında ise, pozitif kontrol ve tüm uygulama grupları için saptanan mikronükleuslu polikromatik eritrosit sayısının kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların polikromatik eritrosit sayıları Şekil 4.43'te, mikronükleuslu polikromatik eritrosit sayıları ise Şekil 4.44'te gösterilmiştir.

Kontrol grubu sıçanların kemik iliği yayma preparatında polikromatik ve normokromatik eritrositler Şekil 4.45'te, 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların kemik iliği yayma preparatında mikronükleuslu polikromatik eritrosit ise Şekil 4.46'da gösterilmiştir.

Kontrol ve uygulama gruplarına ait sitogenetik inceleme sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.43. Kontrol, pozitif kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların polikromatik eritrosit sayıları.



Şekil 4.44. Kontrol, pozitif kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların mikronükleuslu polikromatik eritrosit sayıları.

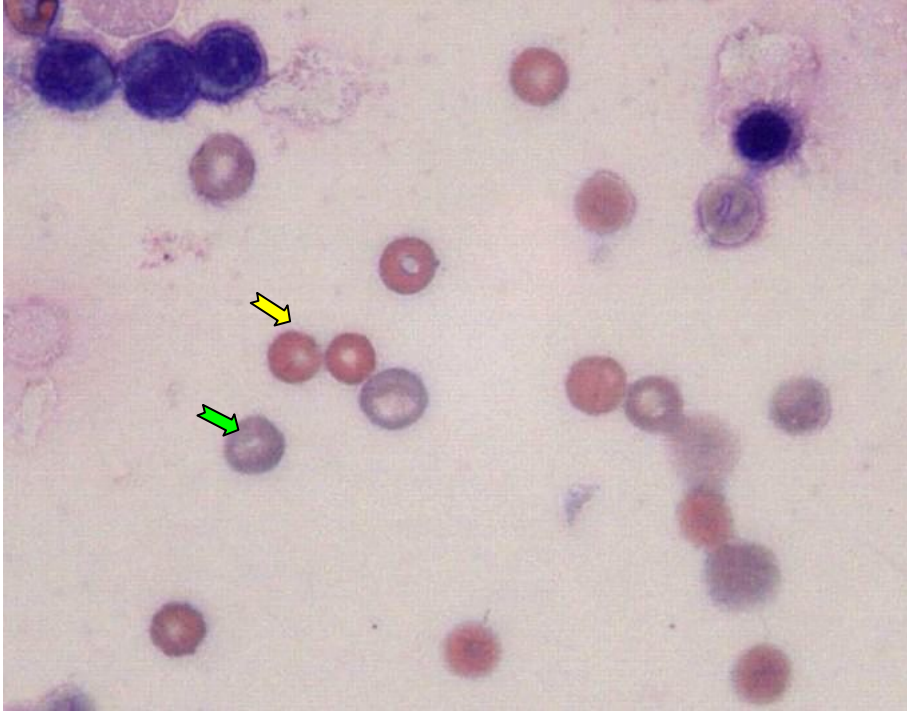
Çizelge 4.8. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların sitogenetik inceleme sonuçları

	Kontrol	MMS	Bisfenol A (mg/kg/gün)		Oktilfenol (mg/kg/gün)	
			BP125	BP250	OP125	OP250
<i>N</i>	5	5	5	5	5	5
PKE/200 TE	91,2±4,7	76,4±5,9	81,2±1,4 ^a	81,8±3,1	66,0±4,1 ^a	81,8±5,1
MNPKE/1000 PKE	1,2±0,4	26,2±3,5 ^a	5,0±0,9 ^{a,b}	14,8±2,0 ^{a,b}	4,8±0,9 ^{a,b}	11,6±3,1 ^{a,b}

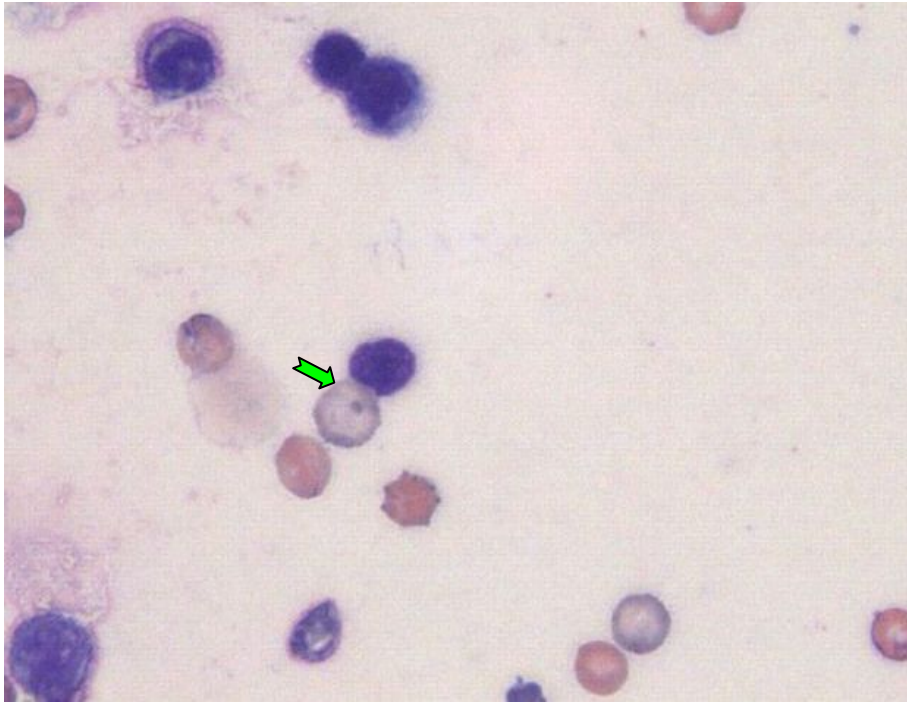
N: Kullanılan sıçan sayısı; PKE: Polikromatik eritrosit; TE: Total eritrosit; MNPKE; Mikronükleuslu polikromatik eritrosit

^aKontrol grubundan istatistik önem derecesinde farklı

^bMMS grubundan istatistik önem derecesinde farklı



Şekil 4.45. Kontrol grubu sıçanların kemik iliği yayma preparatında polikromatik (→) ve normokromatik (→) eritrositler (Giemsa, X1000).



Şekil 4.46. 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan sıçanların kemik iliği yayma preparatında mikronükleuslu polikromatik eritrosit (→) (Giemsa, X1000).

5. TARTIŞMA

Sinir ve immün sistemlerle birlikte endokrin sistem, insan ve hayvan vücudunda yaşamsal fonksiyonları kontrol eden temel regülatör mekanizmayı oluşturmaktadır. Hormonlar, özelleşmiş bezlerden oldukça düşük dozlarda üretildikten ve salgılandıktan sonra, serbest halde ya da taşıyıcı proteinlere bağlanarak kan dolaşımı yoluyla hedef organ veya organlara ulaşan ve hücre yüzeyinde veya içinde bulunan reseptörlere bağlanarak etki gösteren endokrin sistemin haberci molekülleridir. Oluşan hormon-reseptör kompleksi farklı hücre ve organ fonksiyonlarını aktive ederek, üreme, kanda glukoz ve iyonların normal fizyolojik sınırlarda tutulması, kan basıncı, genel metabolizma ile diğer kas ve sinir sistemi fonksiyonları gibi regülatör, gelişimsel ve homeostatik mekanizmaları etkilemektedir. Endokrin sistem, vücudun hormonal durumdaki internal veya eksternal değişimlere rahatlıkla cevap verebilmesine olanak sağlayan birçok geri bildirim mekanizması içermektedir. Bu kompleks sistemin tüm basamaklarının eksternal uyarılara karşı oldukça hassas olduğu bilinmekle beraber, yapılan çalışmalarda gözlenen ve bildirilen endokrin bozucu etkilerin çoğu eşeyssel farklılaşma, ikincil eşey özellikleri ve eşey organlarının fonksiyonunu kontrol eden gonadların işlevleri ile ilişkilidir (Lintelmann et al., 2003).

Evsel, tarımsal ve endüstriyel ürünlerde emülsifiyer, spermisit ve fenol rezinlerin imalatında plastik katkı olarak geniş kullanım alanı bulunan oktilfenol ile polikarbonat rezin, dental dolgu ve plastik imalatında monomer olarak kullanılan bisfenol A, endokrin bozucu etkileri ve östrojenik potansiyelleri iyi bilinen ancak dünyada hala en yüksek üretim kapasitesine sahip kimyasal maddeler arasında yer alan fenolik bileşiklerdir (Lintelmann et al., 2003; Richter et al., 2007). Günümüzde, oktilfenol ve bisfenol A ile beraber endokrin bozucu olarak tabir edilen tüm kimyasal maddelerin yalnızca reseptörlere bağlanarak etki gösteren hormon mimikleri ya da antagonistleri değil, aynı zamanda hormon sentezi ve metabolizmasını etkileyebilen bileşikler olduğu bilinmektedir. Özellikle bisfenol A üzerine yoğunlaşan çalışmalar, bisfenol A'nın çeşitli dokularda enzim aktivitesini ve metabolizmayı etkilediğini, dahası hedef dokularda hormon reseptörlerinin sayısında ve hormon reseptör geni aktivitesinde değişikliklere yol açarak da endokrin sistemi bozduğunu ortaya koymaktadır (Richter et al., 2007).

Bisfenol A ve oktilfenol ile yapılan çalışmalar, gelişmekte olan organizmada bu kimyasal maddelere maruziyetin vücut ve organ ağırlıklarını etkileyebileceğini göstermektedir. Barlas ve Aydoğan 2009 yılında yaptıkları çalışma ile fetal dönemde 250 mg/kg oktilfenol maruziyetinin sıçanlarda vücut, karaciğer, böbrek ve dalak ağırlıklarını anlamlı ölçüde arttırdığını ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde bisfenol A ile yapılan çalışmalar, 2,4-500 µg/kg aralığında bulunan maternal dozların fare ve sıçanlarda postnatal büyümeyi arttırdığına ve östrojenik kimyasal maddelerin postnatal gelişim sırasında adipositlerin farklılaşmasını beklenmedik şekilde etkileyebileceğine işaret etmektedir (Richter et al., 2007). Diğer taraftan, gelişme dönemlerinde bisfenol A maruziyetinin vücut ağırlıklarında düşüşe yol açtığını (Honma et al., 2002) veya vücut ağırlıkları üzerinde herhangi bir etki göstermediğini bildiren (Kabuto et al., 2004) yayınlar da mevcuttur. Ergin dönemde ise östrojenik kimyasalların adiposit sayısı ve lipogenez üzerinde inhibe edici etkileri olduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır. Çalışmalar, overektomi yapılan (östrojenin inhibisyonu) veya genetik mutasyona uğratılan (östrojen reseptörünün inhibisyonu) organizmada yağ artışına ek olarak glukoz toleransının ve insülin direncinin geliştiğini göstermektedir (Heine et al., 2000; Cooke et al., 2001). Ergin sıçanlarla yapılan çalışmalarda, bisfenol A'nın vücut ağırlığını düşürdüğü bildirilmiştir (Nunez et al., 2001). Bu bulgular, bisfenol A ve diğer östrojenik bileşiklerin postnatal gelişim döneminde düşük dozlarda vücut ağırlıklarında artışı stimüle ettiğini gösteren sayısız çalışma ile kontrast oluşturmaktadır (Richter et al., 2007). 5 haftalık erkek sıçanlarla yapılan çalışmamızda ise uygulama gruplarında gözlenen düşük vücut ağırlıkları ve ağırlık kazançları, bu gruplarda belirlenen düşük yem ve su tüketimi ile ilişkili bulunmuştur.

Çalışma kapsamında yapılan 125 ve 250 mg/kg/gün bisfenol A ve oktilfenol uygulamasının erkek sıçanlarda hematolojik parametreler üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla alınan örneklerde tam kan sayımı yapılmıştır. Çalışmamızda, 250 mg/kg/gün bisfenol A uygulanan grupta analizi yapılan hiçbir hematolojik parametrede anlamlı bir fark tespit edilemezken, 125 mg/kg/gün bisfenol A ve oktilfenol uygulanan gruplarda eritrosit sayısı ve hematokrit değerlerinde anemik durumu gösteren, istatistiksel olarak da anlamlı bir düşüş görülmüştür. Eritrosit

sayısındaki azalma kronik karaciğer hasarına bağlı enzim defektlerine, hemoliz artışına veya hematopoiez yetersizliğine bağlı ortaya çıkabilmektedir.

Bilinen östrojenik ve antiandrojenik etkilerinin yanı sıra, östrojenlerin ve ksenoöstrojenlerin pankreatik β hücrelerini etkilediği bilinmektedir (Nadal et al., 2009). Fizyolojik seviyelerde östrojenin normal insülin duyarlılığını korumakta rol oynadığı ve β hücre fonksiyonu için faydalı olduğu düşünülmektedir. Buna karşın fizyolojik sınırların altındaki veya üstündeki değerlerin pankreasın β hücre fonksiyonunda bozulmalara neden olduğu da bilinmektedir. Ergin farelere 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dozunda bisfenol A uygulamasının pankreatik β hücrelerini stimüle ederek, insülin sekresyonunu arttırdığı ileri sürmektedir (Alonso-Magdalena et al., 2006). Oral besleme veya enjeksiyon yoluyla 4 günlük 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bisfenol uygulanan farelerde ise insülin direnci ve postprandial (yemek sonrası) hiperinsülinemi geliştiği saptanmıştır. Uygulama yapılan hayvanların adacık hücrelerinin analizleri, yüksek insülin içeriğinin yanı sıra artan glikoz konsantrasyonlarına cevap olarak ortaya çıkan artmış insülin sekresyonunu da ortaya koymuştur (Alonso-Magdalena et al., 2006). Bu sonuçlar, Nadal ve ark. (2009) tarafından adacık hücrelerinin insülin direncine adaptasyonu ve/veya östrojenin β hücre insülin içeriğine doğrudan etkisi şeklinde yorumlanmıştır.

Göktekin ve Barlas ise 2008 yılında yaptıkları çalışmada, prenatal periyotta oktilfenol uygulamasının pankreasın Langerhans adacıklarında minimal konjesyon ve hücresel dejenerasyona yol açtığını tespit etmişler ve elde ettikleri sonuçların artan β hücresi aktivitesi ve insülin artışı ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında yapılan biyokimyasal incelemeler, bisfenol A uygulanan gruplarda serum glikoz seviyelerinin anlamlı olarak arttığını göstermektedir. Bu sonuçlar Alonso-Magdalena ve ark.'nın (2006) bisfenol uygulanan farelerin adacık hücre analizlerinin ortaya koyduğu artmış glikoz konsantrasyonlarıyla uyumludur. Bu tez çalışmasında, oktilfenol uygulanan gruplardan 125 mg/kg/gün grubunda ise glikoz seviyesi anlamlı olarak artarken, 250 mg/kg/gün oktilfenol uygulanan grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Tez kapsamında, subkronik 125 ve 250 mg/kg/gün bisfenol A ve oktilfenol uygulamasının erkek sıçanlarda karaciğer, böbrek ve dalak dokularında anlamlı sıklıkta histopatolojik değişikliklere neden olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar,

Barlas ve Aydoğan'ın (2009) neonatal oktilfenol maruziyetinin sıçanlarda karaciğer, böbrek ve dalak üzerindeki etkilerini inceleyen ve karaciğer dokusunda artmış dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, konjesyon, parenkimal dejenerasyon insidansları; böbrek dokusunda artmış mononükleer hücre infiltrasyonu ve tübüler dejenerasyon insidansları; dalak dokusunda ise artmış konjesyon ve fibrozis insidanslarının ortaya konduğu çalışmasıyla uyumludur. Bisfenol ve alkilfenollerin bu organlardaki etkilerini hangi mekanizmalar üzerinden gösterdiği tam olarak bilinmemektedir. Nair-Menon ve ark. (1996, 1999) oktilfenolün sıçan ve müren splenositlerinde Ca^{+2} iyonlarına bağlı hücre ölümünü indüklediğini göstermişlerdir. Bindhumol ve ark. (2003) ise bisfenol A'nın karaciğerde antioksidan enzim seviyelerini azaltarak ve hidrojen peroksit ve lipid peroksidasyonu seviyelerini arttırarak oksidatif hasara neden olduğunu ortaya koymuştur. Karaciğer, böbrek ve dalak dokularındaki hasarın mekanizmasıyla ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Üreme toksikolojisi alanında yapılan çalışmalar ise bu kimyasalların çeşitli hücre içi sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile apoptozu indüklediğini göstermiş olsa da, mekanizmaları açıklamakta oldukça yetersizdir.

Tez kapsamında incelenen hematolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki değişimler de göz önüne alınarak bu kimyasal maddelerin uygulanan dozlarının karaciğer, böbrek ve dalak dokularında hem fonksiyonel hem de yapısal değişikliklere neden olduğu söylenebilir.

Alkilfenollerin ve bisfenolün hücre ölümü üzerindeki etkisine ilişkin birçok çalışma bulunmasına rağmen, altta yatan patofizyolojik mekanizmalar tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Iida ve ark. (2003) ve Qian ve ark. (2006) kültüre edilmiş Sertoli hücrelerinde, Kim ve ark. (2006) insan embriyonik kök hücrelerinde, Li ve ark. (2009) ise fare testislerinde bu kimyasal maddelerin apoptotik etkilerini ortaya koymuşlardır. Iida ve ark. (2003) çalışmalarında, kültüre edilen testiküler Sertoli hücrelerinin bisfenol A'ya maruziyetinin hücrelerin yaşama yeteneklerinde doza ve zamana bağlı bir azalma gözlemlemişler ve TUNEL boyama ile pozitif boyanan Sertoli hücrelerinde aktif kaspaz-3 ekspresyonunu tespit etmişlerdir. Kaspazlar hücre ölümü programlarının vazgeçilmez komponentleri ve hücre ölümünün anahtar düzenleyicileridir. Bugüne kadar, apoptotik mekanizmada rol oynayan 11 tanesi insan kaspazı olmak üzere toplam 14 farklı kaspaz ailesi üyesi tanımlanmıştır. Kaspazlar apoptoza giden hücrede aktif forma geçtikten sonra,

apoptotik sinyalin transdüksiyonunda anahtar rol oynamaları nedeniyle büyük öneme sahiptirler. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bisfenol A ile indüklenen Sertoli hücre ölümünün nekroz ile değil apoptotik sinyal mekanizmalarının aktivasyonu ile bağlantılı olduğunu ortaya koysa da mekanizmaları açıklamak için yetersizdir.

İnsan embriyonik kök hücrelerinde Kim ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışma 100 µM konsantrasyonlarında oktilfenol ve nonilfenol maruziyetinin kaspaz-3 ve -8 aktivasyonunu ve Fas ve FasL up-regülasyonunu arttırdığını ortaya koymuştur. Fas ve FasL yolaklarının nonilfenol ile indüklenen apoptozda rol oynadıkları timositlerle ve sıçan testisleriyle yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir (Han et al., 2004; Yao et al., 2004; Yao et al., 2005).

Son dönemde, Li ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada ise, 160, 480 ve 960 mg/kg dozlarında gavaj yoluyla 31-44. postnatal günlerde farelere uygulanan bisfenolün, yüksek dozlarda Leydig ve germ hücrelerinde apoptozu indüklediği ve Fas, FasL ve aktif kaspaz-3 ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, bisfenolün spermatogenez üzerindeki bozucu etkilerini birden çok testiküler hücre tipinde Fas-sinyal yolağının aktivasyonu ile sağladığını ortaya koymaktadır. Ancak bu çalışma da diğerleri gibi, bisfenol A'nın indüklediği apoptozda Fas sisteminin ve diğer moleküler yolakların rolünü ayrıntılı olarak açıklayamamaktadır.

Çalışmamızda ise, 125 ve 250 mg/kg/gün bisfenol A ve oktilfenol uyguladığımız sıçanların karaciğer dokularından elde edilen preparatlarda, TUNEL boyama yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayısında ve indeksinde anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Çalışmamızda uygulanan dozların daha önce yapılan in vivo çalışmalarda kullanılan dozların altında olması, bu kimyasalların karaciğerde muhtemel apoptotik etkisini gösterebilmesi için daha yüksek dozlara ihtiyaç duyduğuna işaret etmektedir. Tez kapsamında elde ettiğimiz immünohistokimyasal sonuçlara dayanarak, 90 günlük süre boyunca 125 ve 250 mg/kg/gün bisfenol A ve oktilfenol uygulamasının gelişmekte olan erkek sıçanların karaciğerinde istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek herhangi bir apoptotik etkiye neden olmadığını söyleyebiliriz.

Kaynaklarda alkilfenollerin ve bisfenol A'nın genotoksik potansiyelleri tartışmalı bir konudur. Yapılan çalışmaların birçoğu bu bileşiklerin mutajenik olmadığına işaret etse de, bisfenol A'nın nokta mutasyonlarını, DNA kırıklarını ve anöplodiyi indüklediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (Keri et al., 2007). Tsutsui ve ark. (1998) Suriye hamsteri embriyo hücreleriyle yaptıkları çalışmada, bisfenolün uygulanan tüm dozlarda (50-200 µM) DNA katımını indüklediğini tespit etmiştir. Bu çalışmada 100-200 µM aralığındaki dozlar hücrelerde toksisiteyi anlamlı bir biçimde artırırken, daha düşük dozlar hücreler tarafından tolere edilmişlerdir. Bu sonuçlar, DNA katımının bisfenolün toksik etkisinden bağımsız olarak da oluşabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak bu çalışmada insan serumunda tespit edilen bisfenol seviyelerinden yaklaşık $(1-10) \times 10^3$ kat fazla dozlarda bisfenol kullanılmıştır.

Haighton ve ark. (2002) bisfenol A'nın karsinojenik potansiyelini tartıştıkları yayınlarında, bisfenol A'nın kemiricilerde karsinojenik olduğuna dair herhangi bir kesin kanıtın mevcut olmadığı belirten ulusal toksikoloji programı raporuna (NTP, 1982), bisfenol A'nın sitotoksik olmayan dozlarının standart in vitro genotoksikite testlerinde etki göstermediğini belirten çalışmalara (Hilliard et al., 1998), in vivo fare mikronükleus testinde etki göstermediğini belirten çalışmalara (Gudi and Krsmanovic, 1999) ve karaciğerde hızla glukronize olduğunu gösteren metabolizma çalışmalarına dayanarak bisfenol A'nın insanlar için karsinojenik bir potansiyel taşımadığı sonucuna varmıştır. Yazarlar bu yayınlarında, Tsutsui ve ark.'nın 1998 yılında yaptığı çalışma da dahil olmak üzere genotoksik etkinin gözlemlendiği ancak standart olmayan yöntemlerle yapılan çalışma sonuçlarını, bu çalışmalarda metabolik aktivasyon sistemlerinin kullanılmamasından, toksik dozların ya da detoksifikasyon yollarını satüre edici dozların kullanılmasından dolayı kuşkulu bulduklarını belirtmişler, ancak Huff (2003) tarafından da eleştirilmiştir.

Östrojen ve bisfenolle yapılan eş zamanlı çalışmalar, bu bileşiklerin karsinojenik potansiyellerinin, katalaz ve glutatyon-S-transferaz gibi detoksifiye edici enzimlerin aktivitesini baskılayarak gösterdikleri genotoksik özelliklerinin ve hücre proliferasyonunu stimüle edici özelliklerinin bir kombinasyonu olduğuna işaret etmektedir (Iso et al., 2006, 2007). Ancak bu çalışmada da, kullanılan yüksek

dozlar çalışma sonuçlarının gerçek genotoksik potansiyeli yansıtmadığını düşündürmektedir.

CHO (Çin hamsteri ovaryum) hücreleri ile yapılan in vitro çalışmalar, bisfenol A'nın kanserde genetik olarak karşılaşılan bir kromozomal bozukluk olan anöplodiyi indüklediğini göstermektedir ancak elde edilen sonuçlar bisfenolün klastojenik aktivitesinin göstermiş olduğu sitotoksik etkiyle bağlantılı olduğuna işaret etmektedir (Hilliard et al., 1998). Ancak sitotoksik etkiye bağlı bu klastojenik etkinin, sitotoksik etkinin doğrudan bir sonucu mu veya tesadüfen eş dozlarda ortaya çıkan birbirinden bağımsız iki etki mi olduğu açıklanamamıştır.

Bu tez kapsamında, bisfenol A'nın ve oktilfenolün genotoksik potansiyelini belirlemek amacıyla in vivo memeli eritrosit mikronükleus testi uygulanmıştır. Bu testin amacı, kromozom fragmanları veya tüm kromozomu içeren mikronükleus oluşumunu indükleyerek sitogenetik hasara neden olan maddeleri belirlemektir. Kemik iliğinde eritroblastın polikromatik eritrosite farklılaşması sırasında çekirdek atılırken, oluşan mikronükleus sitoplazmada kalmaktadır. Mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin frekansında artış, uygulama yapılmış hayvanlarda indüklenmiş kromozomal hasarın bir göstergesidir. Ayrıca bu testte, kimyasal ile indüklenen toksisitenin bir göstergesi olarak polikromatik eritrositlerin sayısı toplam eritrosit sayısına oranlanmaktadır. 125 mg/kg/gün bisfenol A ve oktilfenol uygulanan gruplarda bu oran anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu sonuç, tez çalışmamızda değerlendirilen hematolojik parametrelerle de uyumlu olarak düşük dozlarda uygulanan bisfenol A ve oktilfenolün eritrosit yapımını engelleyebileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, pozitif kontrol grubunda ve tüm uygulama gruplarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında mikronükleus frekansında anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Tespit edilen mikronükleus frekansı, Spencer ve ark. (2007)'in yaptıkları ve farelere intraperitoneal tek doz 0-300 mg/kg bisfenol A uyguladıkları çalışma sonuçlarıyla uyumludur. Ancak bulduğumuz sonuçlardan farklı olarak söz konusu çalışmada, yalnızca yüksek doz bisfenol A uygulanan grupta mikronükleus frekansında anlamlı artış tespit edilmiştir. Genotoksik etkinin olup olmadığının gösterilmeye çalışıldığı bu ve diğer çalışma sonuçları göz önünde bulundurularak ve dietilstilbestrol ve soya fasulyesinde bulunan primer bir izoflavon olan genistein gibi örneklerle bakılarak bisfenol A ve oktilfenol gibi

Östrojenik bileŖiklerin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerini aıĝa ıkarmak iin uzun süreli alıŖmaların yapılması gerektiĝi söylenbilir.

KAYNAKLAR

- Alexander, H.C., Dill, D.C., Smith, L.W., Guiney, P.D., Dorn, P., 1988, Bisphenol A: acute aquatic toxicity, *Environ Toxicol Chem.* 7, 19-26.
- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal A., 2006, The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance, *Environ Health Perspect.* 114, 106-112.
- Auger, J., Kunstmann, J.M., Czyglik, F., Jouannet, P., 1995, Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years, *N Engl J Med.* 332, 281-285.
- Aydoğan, M., Barlas, N., 2006, Effects of maternal 4-tert-octylphenol exposure on the reproductive tract of male rats at adulthood, *Reprod Toxicol.* 22, 455-460.
- Azevedo, D.A., Lacorte, S., Viana, P., Barcelo, D., 2001, Occurrence of nonylphenol and bisphenol-A in surface waters from Portugal, *J Braz Chem Soc.* 12, 532-537.
- Barlas, N., Aydoğan, M., 2009, Histopathologic effects of maternal 4-tert-octylphenol exposure on liver, kidney and spleen of rats at adulthood, *Arch Toxicol.* 83, 341-349.
- Bennie, D.T., Sullivan, C.A., Lee, H.B., Peart, T.E., Maguire, R.J., 1997, Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River, *Sci Total Environ.* 193, 263-275.
- Bian, Q., Qian, J., Xu, L., Chen, J., Song, L., Wang, X., 2006, The toxic effects of 4-tert-octylphenol on the reproductive system of male rats, *Food Chem Toxicol.* 44, 1355-1361.
- Bindhumol, V., Chitra, K.C., Mathur, P.P., 2003, Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats, *Toxicology.* 188, 117-124.
- Blackburn, M.A., Waldock, M.J., 1995, Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales, *Water Res.* 29, 1623-1629.

- Blake, C.A., Ashiru, O.A., 1997, Disruption of rat estrous cyclicity by the environmental estrogen 4-tert-octylphenol, *Proc Soc Exp Biol Med.* 216, 446-451.
- Blake, C.A., Boockfor, F.R., 1997, Chronic administration of the environmental pollutant 4-tert-octylphenol to adult male rats interferes with the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and testosterone, *Biol Reprod.* 57, 255-266.
- Blake, C.A., Boockfor, F.R., Nair-Menon, J.U., Millette, C.F., Raychoudhury, S.S., McCoy, G.L., 2004, Effects of 4-tert-octylphenol given in drinking water for 4 months on the male reproductive system of Fischer 344 rats, *Reprod Toxicol.* 18, 43-51.
- Bøgh, I.B., Christensen, P., Dantzer, V., Groot, M., Thøfner, I.C., Rasmussen, R.K., Schmidt, M., Greve, T., 2001, Endocrine disrupting compounds: effect of octylphenol on reproduction over three generations, *Theriogenology.* 55, 131-150.
- Bolz, U., Hagenmaier, H., Korner, W., 2001, Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Wurttemberg, south-west Germany, *Environ Pollut.* 115, 291-301.
- Boockfor, F.R., Blake, C.A., 1997, Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis, and increases the incidence of sperm deformities, *Biol Reprod.* 57, 267-277.
- Boyacıoğlu, M., Çakal Arslan, Ö., Parlak, H., Karaaslan, M.A., 2007, Mutagenicity of nonylphenol and octylphenol using Salmonella mutation assay, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi.* 24, 299–302.
- Büyüktuncer, Z., Başaran, A., 2005, Fitoöstrojenler ve sağlıklı yaşamdaki önemleri, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi.* 25, 79-94
- Cabaton, N., Dumont, C., Severin, I., Perdu, E., Zalko, D., Cherkaoui-Malki, M., Chagnon, M.C., 2009, Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line, *Toxicology.* 255, 15-24.

- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E., 1992, Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *BMJ*. 305, 609-613.
- Certa, H., Fedtke, N., Wiegand, H.J., Müller, A.M., Bolt, H.M., 1996, Toxicokinetics of p-tert-octylphenol in male Wistar rats, *Arch Toxicol*. 71, 112-122.
- Chapin, R.E., Delaney, J., Wang, Y., Lanning, L., Davis, B., Collins, B., Mintz, N., Wolfe, G., 1999, The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study, *Toxicol Sci*. 52, 80-91.
- ChemIDplus, Undated-b, Bisphenol A, Available at: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/> [searched by Registry Number: 1478-61-1].
- Chemical Week, 2005 Chemical Week, 2005. Product focus. Bisphenol A, Northbrook, IL, USA, October 26, 2005, p. 42.
- Chitra, K.C., Latchoumycandane, C., Mathur, P.P., 2002, Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats, *Arch Toxicol*. 76, 545-551.
- Chitra, K.C., Latchoumycandane, C., Mathur, P.P., 2003, Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats, *Toxicology*. 185, 119-127.
- Cooke, P.S., Heine, P.A., Taylor, J.A., Lubahn, D.B., 2001, The role of estrogen and estrogen receptor-alpha in male adipose tissue, *Mol Cell Endocrinol*. 178, 147-154.
- Coşkun, B., İmir, M., 1991, Yem maddelerindeki östrojenik etkili maddeler ve hayvanlar üzerindeki etkileri, *Türk Veteriner Hekimliği Dergisi*. 11, 21-24.
- Cousins, I.T., Staples, C.A., Klecka, G.M., Mackay, D., 2002, A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A, *Hum Eco Risk Assess*. 8, 1107-1135.
- Cunney, H.C., Mayes, B.A., Rosica, K.A., Trutter, J.A., Van Miller, J.P., 1997, Subchronic toxicity (90-day) study with para-nonylphenol in rats, *Regul Toxicol Pharmacol*. 26, 172-178.

- Demirel, S., Zamani, A.G., 2002, Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları, Genel Tıp Dergisi. 12, 123-127.
- Doerge, D.R., Twaddle, N.C., Churchwell, M.I., Chang, H.C., Newbold, R.R., Delclos, K.B., 2002, Mass spectrometric determination of p-nonylphenol metabolism and disposition following oral administration to Sprague-Dawley rats, *Reprod Toxicol.* 16, 45-56.
- EFSA, 2008, Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission on the toxicokinetics of Bisphenol A, *The EFSA Journal.* 759, 1-10.
- EPA (U.S. Government Environmental Protection Agency), 1998, Endocrine Disruptor Screening Testing Advisory Committee (EDSTAC), final report, Available at: <<http://www.epa.gov/opptintr/opptindo/finalrept/htm>>.
- European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife, 1996, Report of Proceedings, 2–4 December 1996, Weybridge, UK.
- Fenet, H., Gomez, E., Pillon, A., Rosain, D., Nicolas, J.C., Casellas, C., Balaguer, P., 2003, Estrogenic activity in water and sediments of Frenc river: contribution of alkylphenols, *Arch Environ Contam Toxicol.* 44, 1-6.
- Foster, P.M., Mylchreest, E., Gaido, K.W., Sar, M., 2001, Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats, *Hum Reprod Update.* 7, 231-235.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., Wenzel, A., 2002, Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36, 1429-1438.
- Gollapudi, B.B., McFadden, L.G., 1995, Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutat Res.* 347, 97-99.
- Göktekin, E., Barlas, N., 2008, Histopathological effects of 4-tert-octylphenol treatment through the pregnancy period, on the pituitary, adrenal,

- pancreas, thyroid and parathyroid glands of offspring rats at adulthood, *Environ Toxicol Pharmacol.* 26, 199-205.
- Gray, L.E., Wolf, C., Lambright, C., Mann, P., Price, M., Cooper, R.L., Ostby, J., 1999, Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat, *Toxicol Ind Health.* 15, 94-118.
- Gudi, R., Krsmanovic, L., 1999. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, *BioReliance.*
- Guillette, L.J., Woodward, A.R., Crain, D.A., Pickford, D.B., Rooney, A.A., Percival, H.F., 1999, Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven Florida lakes, *Gen Comp Endocrinol.* 116, 356-372.
- Gupta, C., 2000, Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals, *Proc Soc Exp Biol Med.* 224, 61-68.
- Haighton, L.A., Hlywka, J.J., Doull, J., Kroes, R., Lynch, B.S., Munro, I.C., 2002, An evaluation of the possible carcinogenicity of bisphenol A to humans, *Regul Toxicol Pharmacol.* 35, 238-254.
- Han, X., Tu, Z., Wang, X., Shen, S., Hou Y., 2004, Nonylphenol induced apoptosis in rat testis through the Fas/FasL pathway, *Bull Environ Contam Toxicol.* 73, 620-627.
- Hanioka, N., Jinno, H., Chung Y.S., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T., Ando, M., 1999, Inhibition of rat hepatic cytochrome P450 activities by biodegradation products of 4-tert-octylphenol ethoxylate, *Xenobiotica.* 29, 873-883.
- Heine, P.A., Taylor, J.A., Iwamoto, G.A., Lubahn, D.B., Cooke, P.S., 2000, Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 12729-12734.

- Herath, C.B., Watanabe, G., Katsuda, S., Yoshida, M., Suzuki, A.K., Taya, K., 2001, Exposure of neonatal female rats to p-tert-octylphenol disrupts afternoon surges of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin secretion, and interferes with sexual receptive behavior in adulthood, *Biol Reprod.* 64, 1216-1224.
- Hernandez-Rodriguez, G., Zumbado, M., Luzardo, O.P., Monterde, J.G., Blanco, A., Boada, L.D., 2007, Multigenerational study of the hepatic effects exerted by the consumption of nonylphenol- and 4-octylphenol contaminated drinking water in Sprague-Dawley rats, *Environ Toxicol Pharm.* 23, 73-81.
- Hess, R.A., 2000, Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract, *Rev Reprod.* 5, 84-92.
- Hilliard, C.A., Armstrong, M.J., Bradt, C.I., Hill, R.B., Greenwood, S.K., Galloway, S.M., 1998, Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environ Mol Mutagen.* 31, 316-326.
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D.L., Katsu, Y., Watanabe, H., Iguchi, T., 2002, Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction, *Reprod Toxicol.* 16, 117-122.
- HSDB (Hazardous Substances Data Bank), 2008, 4,4'-Bisphenol A. HSDB No. 513, Available at: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+80-05-7>.
- Huff, J., 2001, Carcinogenicity of bisphenol-A in Fischer rats and B6C3F1 mice, *Odontology.* 89, 12-20.
- Huff, J., 2003, Does exposure to bisphenol A represent a human health risk? *Regul Toxicol Pharmacol.* 37, 407-408; author reply 409-410.
- Hughes, I.A., 2001, Minireview: sex differentiation, *Endocrinology.* 142, 3281-3287.
- Iida, H., Maehara, K., Doiguchi, M., Mōri, T., Yamada, F., 2003, Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells, *Reprod Toxicol.* 17, 457-464.

- Iso, T., Watanabe, T., Iwamoto, T., Shimamoto, A., Furuichi, Y., 2006, DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity, *Biol Pharm Bull.* 29, 206-210.
- Iso, T., Futami, K., Iwamoto, T., Furuichi, Y., 2007, Modulation of the expression of bloom helicase by estrogenic agents, *Biol Pharm Bull.* 30, 266-271.
- Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A., Takada, H., 2001, Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: Their association with aquatic particles and sedimentary distributions, *Environ Sci Technol.* 35, 1041-1049.
- Kabuto, H., Amakawa, M., Shishibori, T., 2004, 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.* 74, 2931-2940.
- Kelce, W.R., Stone, C.R., Laws, S.C., Gray, L.E., Kemppainen, J.A., Wilson, E.M., 1995, Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist, *Nature.* 375, 581-585.
- Keri, R.A., Ho, S.M., Hunt, P.A., Knudsen, K.E., Soto, A.M., Prins, G.S., 2007, An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A, *Reprod Toxicol.* 24, 240-252.
- Kessopoulou, E., Tomlinson, M.J., Barratt, C.L., Bolton, A.E., Cooke, I.D., 1992, Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? *J Reprod Fertil.* 94, 463-470.
- Kim, S.K., Kim, J.M., Lee, H.J., Yoon, Y.D., 2003, Effects of 4-tert-octylphenol and bisphenol A on the spermatogenesis in rat testis: induced apoptosis in testicular germ cells, *Biol Reprod.* 68, 187.
- Kim, S.K., Kim, B.K., Shim, J.H., Gil, J.E., Yoon, Y.D., Kim, J.H., 2006, Nonylphenol and octylphenol-induced apoptosis in human embryonic stem cells is related to Fas-Fas ligand pathway, *Toxicol Sci.* 94, 310-321.
- Kortenkamp, A., 2008, Low dose mixture effects of endocrine disrupters: implications for risk assessment and epidemiology, *Int J Androl.* 31, 233-240.

- Kuch, H.M., Ballschmiter, K., 2001, Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range, *Environ Sci Technol.* 35, 3201-3206.
- Kwon, S., Stedman, D.B., Elswick, B.A., Cattley, R.C., Welsch, F., 2000, Pubertal development and reproductive functions of Crl:CD BR Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development, *Toxicol Sci.* 55, 399-406.
- Lambright, C., Ostby, J., Bobseine, K., Wilson, V., Hotchkiss, A.K., Mann, P.C., Gray, L.E., 2000, Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats, *Toxicol Sci.* 56, 389-399.
- Li, Y.J., Song, T.B., Cai, Y.Y., Zhou, J.S., Song, X., Zhao, X., Wu, X.L., 2009, Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice, *Toxicol Sci.* 108, 427-436.
- Liber, K., Knuth, M.L., Stay, F.S., 1999, An integrated evaluation of the persistence and effects of 4-nonylphenol in an experimental littoral ecosystem, *Environ Toxicol Chem.* 18, 357-362.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, A., 2003, Endocrine disrupters in the environment, *Pure Appl Chem.* 75, 631-681.
- Madsen, L.L., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., 2003, Estrogenic effects in flounder *Platichthys flesus* orally exposed to 4-tert-octylphenol, *Aquat Toxicol.* 64, 393-405.
- McIntyre, B.S., Barlow, N.J., Wallace, D.G., Maness, S.C., Gaido, K.W., Foster, P.M., 2000, Effects of in utero exposure to linuron on androgen-dependent reproductive development in the male Crl:CD(SD)BR rat, *Toxicol Appl Pharmacol.* 167, 87-99.
- Medlock, K.L., Branham, W.S., Sheehan, D.M., 1995, The effects of phytoestrogens on neonatal rat uterine growth and development, *Proc Soc Exp Biol Med.* 208, 307-313.
- Mihaich, E.M., Friederich, U., Caspers, N., Hall, A.T., Klecka, G.M., Dimond, S.S., Staples, C.A., Ortego, L.S., Hentges, S.G., 2009, Acute and chronic

- toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants, *Ecotoxicol Environ Safety*. 72, 1392-1399.
- Moffat, G.J., Burns, A., Van Miller, J., Joiner, R., Ashby, J., 2001, Glucuronidation of nonylphenol and octylphenol eliminates their ability to activate transcription via the estrogen receptor, *Regul Toxicol Pharmacol*. 34, 182-187.
- Moore, R.W., Rudy, T.A., Lin, T.M., Ko, K., Peterson, R.E., 2001, Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate, *Environ Health Perspect*. 109, 229-237.
- Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Quesada, I., Ropero, A.B., 2009, The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes, *Mol Cell Endocrinol*. 304, 63-68.
- Nagao, T., Wada, K., Marumo, H., Yoshimura, S., Ono, H., 2001a, Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study, *Reprod Toxicol*. 15, 293-315.
- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., Ono, H., 2001b, Reproductive effects in male and female rats from neonatal exposure to p-octylphenol, *Reprod Toxicol*. 15, 683-692.
- Naik, P., Vijayalaxmi, K.K., 2009, Cytogenetic evaluation for genotoxicity of bisphenol-A in bone marrow cells of Swiss albino mice, *Mutat Res*. 676, 106-112.
- Nair-Menon, J.U., Campbell, G.T., Blake, C.A., 1996, Toxic effects of octylphenol on cultured rat and murine splenocytes, *Toxicol Appl Pharmacol*. 139, 437-444.
- Nair-Menon, J.U., Campbell, G.T., McCoy, G.L., Blake, C.A., 1999, Interactions between estrogen, tamoxifen, octylphenol, and two polychlorinated biphenyls in murine splenocytes, *Life Sci*. 65, 1125-1133.
- Nef, S., Shipman, T., Parada, L.F., 2000, A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism, *Dev Biol*. 224, 354-361.

- Newbold, R., 1995, Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: implications for other environmental estrogens, *Environ Health Perspect.* 103, 83-87.
- Newbold, R.R., 1998. Male reproductive tract development. *Reproductive and developmental toxicology.* Korach, K.S. (ed.), CRC Press, Boca Raton. pp. 531-552.
- Nimrod, A.C., Benson, W.H., 1996, Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates, *Crit Rev Toxicol.* 26, 335-364.
- NTP, 1982, NTP Technical Report on the Carcinogenesis Bioassay of Bisphenol A in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Feed Study). National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health.
- Nunez, A.A., Kannan, K., Giesy, J.P., Fang, J., Clemens, L.G., 2001, Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats, *Chemosphere.* 42, 917-922.
- OECD SIDS, 1995, SIDS Initial Assessment Report For SIAM 3 Williamsburg, Virginia, 13 – 16 February 1995, Available at: www.inchem.org/documents/sids/sids/140669.pdf.
- Ostby, J., Kelce, W.R., Lambright, C., Wolf, C.J., Mann, P., Gray, L.E., 1999, The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro, *Toxicol Ind Health.* 15, 80-93.
- Park, S.Y., Choi, J., 2009, Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol A exposure in aquatic biomonitoring species: freshwater crustacean, *Daphnia magna*, and aquatic midge, *Chironomus riparius*, *Bull Environ Contam Toxicol.* 83, 463-468.
- Parks, L.G., Ostby, J.S., Lambright, C.R., Abbott, B.D., Klinefelter, G.R., Barlow, N.J., Gray, L.E., 2000, The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat, *Toxicol Sci.* 58, 339-349.

- Petrovic, M., Fernandez-Alba, A.R., Borrull, F., Marce, R.M., Mazo, E.G., Barcelo, D., 2002, Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain, *Environ Toxicol Chem.* 21, 37-46.
- Pottenger, L.H., Domoradzki, J.Y., Markham, D.A., Hansen, S.C., Cagen, S.Z., Waechter, J.M., 2000, The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration, *Toxicol Sci.* 54, 3-18.
- Qian, J., Bian, Q., Cui, L., Chen, J., Song, L., Wang, X., 2006, Octylphenol induces apoptosis in cultured rat Sertoli cells, *Toxicol Lett.* 166, 178-186.
- Raychoudhury, S.S., Blake, C.A., Millette, C.F., 1999, Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and Sertoli cells, *Toxicol Appl Pharmacol.* 157, 192-202.
- Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., vom Saal, F.S., 2007, In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies, *Reprod Toxicol.* 24, 199-224.
- Safe, S.H., Gaido, K., 1998, Phytoestrogens and anthropogenic estrogenic compounds, *Environ Toxicol Chem.* 17, 119-126.
- Schweikl, H., Schmalz, G., Rackebrandt, K., 1998, The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells, *Mutat Res.* 415, 119-130.
- Sharma, V.K., Anquandah, G.A., Yngard, R.A., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., Ray, A.K., Golovko, D., 2009, Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: a review on occurrence, fate, and treatment, *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 44, 423-442.
- Sharpe, R.M., 1994, Regulation of spermatogenesis. The physiology of reproduction. Knobil, E. and Neil, J.D. (eds), Raven Press, New York. pp. 1-72.
- Sharpe, R.M., Fisher, J.S., Millar, M.M., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1995, Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in

- reduced testicular size and sperm production, *Environ Health Perspect.* 103, 1136-1143.
- Sharpe, R.M., Turner, K.T., Sumpter, J.P., 1998, Endocrine disrupters and testis development, *Environ Health Perspect.* 105, 220-221.
- Sharpe, R.M., 2003, The oestrogen hypothesis-where do we stand now? *Int J Androl.* 26, 2-15.
- Shore, L.S., Correll, D., Chakroborty, P.K., 1995, *Animal Waste and the Land Water Interface*. Steele, K. (ed.), Lewis, Boca Raton, FL. pp. 49–56.
- Snyder, S.A., Keith, T.L., Verbrugge, D.A., Snyder, E.M., Gross, T.S., Kannan, K., Giesy, J.P., 1999, Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures, *Environ Sci Technol* 33, 2814-2820.
- Snyder, R.W., Maness, S.C., Gaido, K.W., Welsch, F., Sumner, S.C., Fennell, T.R., 2000, Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats, *Toxicol Appl Pharmacol.* 168, 225-234.
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C., 1991, p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene, *Environ Health Perspect.* 92, 167-173.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O., 1995, The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants, *Environ Health Perspect.* 103, 113-122.
- Spencer, P.J., Gollapudi, B.B., Waechter Jr, J.M., 2007, Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, *Toxicol Sci.* 97, 120-127.
- Stachel, B., Ehrhorn, U., Heemken, O.P., Lepom, P., Reincke, H., Sawal, G., Theobald, N., 2003, Xenoestrogens in the River Elbe and its tributies, *Environ Pollut.* 124, 497-507.
- Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T., Harris, L.R., 1998, A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A, *Chemosphere.* 36, 2149-2173.

- Sueiro, R.A., Suárez, S., Araujo, M., Garrido, M.J., 2003, Mutagenic and genotoxic evaluation of bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) in prokaryotic and eukaryotic systems, *Mutat Res.* 536, 39-48.
- Takahashi, O., Oishi, S., 2001, Testicular toxicity of dietary 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) in F344 rats, *Arch Toxicol.* 75, 42-51.
- Takahashi, O., Oishi, S., 2003, Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice, *Food Chem Toxicol.* 41, 1035-1044.
- Tan, B.L., Kassim, N.M., Mohd, M.A., 2003, Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenol A and nonylphenol, *Toxicol Lett.* 143, 261-270.
- Thiele, B., Günther, K., Schwuger, M.J., 1997, Alkylphenol ethoxylates: trace analysis and environmental behavior, *Chem Rev.* 97, 3247-3272.
- Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J., Jégou, B., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Müller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., Skakkebaek, N.E., 1996, Male reproductive health and environmental xenoestrogens, *Environ Health Perspect.* 104, 741-803.
- Toppari, J., Kaleva, M., Virtanen, H.E., 2001, Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data, *Hum Reprod Update.* 7, 282-286.
- Toppari, J., 2008, Environmental endocrine disrupters, *Sex Dev.* 2, 260-267.
- Toyoizumi, T., Deguchi, Y., Masuda, S., Kinae, N., 2008, Genotoxicity and estrogenic activity of 3,3'-dinitrobisphenol A in goldfish, *Biosci Biotechnol Biochem.* 72, 2118-2123.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E., Hasegawa, K., Takahashi, M., Maizumi, N., Yamaguchi, F., Barrett, J.C., 1998, Bisphenol-A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells, *Int J Cancer.* 75, 290-294.

- Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Brine, D.R., Fail, P.A., Seely, J.C., Van Miller, J.P., 1999, Two-generation reproduction study with para-tert-octylphenol in rats, *Regul Toxicol Pharmacol.* 30, 81-95.
- Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Thomas, B.F., Keimowitz, A.R., Brine, D.R., Veselica, M.M., Fail, P.A., Chang, T.Y., Seely, J.C., Joiner, R.L., Butala, J.H., Dimond, S.S., Cagen, S.Z., Shiotsuka, R.N., Stropp, G.D., Waechter, J.M., 2002, Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats, *Toxicol Sci.* 68, 121-146.
- Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Sloan, C.S., Castillo, N.P., Veselica, M.M., Seely, J.C., Dimond, S.S., Van Miller, J.P., Shiotsuka, R.N., Beyer, D., Hentges, S.G., Waechter, J.M., 2008, Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice, *Toxicol Sci.* 104, 362-384.
- Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G.A., Filser, J.G., Dekant, W., 2002, Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration, *Chem Res Toxicol.* 15, 1281-1287.
- Völkel, W., Kiranoglu, M., Fromme, H., 2008, Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment, *Toxicol Lett.* 179, 155-162.
- Warhurst, A.M., 1995, An environmental assessment of alkyphenol ethoxylates and alkylphenols, Available at: www.foe.co.uk/resource/reports/ethoxylates_alkylphenols.pdf.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., Parker, M.G., 1994, Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic, *Endocrinology.* 135, 175-182.
- Williams, K., McKinnell, C., Saunders, P.T., Walker, M., Fisher, J.S., Turner, K.J., Atanassova, N., Sharpe, M., 2001, Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man, *Hum Reprod Update.* 7, 236-247.

- Woo, G.H., Shibutani, M., Ichiki, T., Hamamura, M., Lee, K.Y., Inoue, K., Hirose, M., 2007, A repeated 28-day oral dose toxicity study of nonylphenol in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening of endocrine-disrupting chemicals, *Arch Toxicol.* 81, 77-88.
- Wu, Z., Zhang, Z., Chen, S., He, F., Fu, G., Liang, W., 2007, Nonylphenol and octylphenol in urban eutrophic lakes of the subtropical China, *Fresenius Environ Bull.* 16, 227-234.
- Yao, G., Hou, Y., 2004, Nonylphenol induces apoptosis through Fas/FasL pathway by mimicking estrogen in vivo, *Environ Toxicol Pharmacol.* 17, 19-27.
- Yao, G., Hu, Y., Liang, J., Hou, Y., 2005, Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis related to Fas/FasL pathway, *Life Sci.* 77, 3306-3320.
- Ye, X., Kuklennyik, Z., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2005, Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.* 383, 638-644.
- Ye, X., Kuklennyik, Z., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2006, Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 831, 110-115.
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R., 2002, Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review, *Environ Int.* 28, 215-226.
- Zumbado, M., Boada, L.D., Torres, S., Monterde, J.G., Díaz-Chico, B.N., Afonso, J.L., Cabrera, J.J., Blanco, A., 2002, Evaluation of acute hepatotoxic effects exerted by environmental estrogens nonylphenol and 4-octylphenol in immature male rats, *Toxicology.* 175, 49-62.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Nurçin

Soyadı : Yıldız

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1984

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 1995-2002 Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi

Lisans 2002-2006 Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce