

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NONİLFENOL VE BİSFENOL A'NIN SIĞIRLARDA
GAMET FİZYOLOJİSİNE OLAN ETKİLERİ**

Selcen Süheyla ERGÜN

MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Cevdet UĞUZ

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 11. SAĞ. BİL. 02 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2013 - 001
2013– AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı


çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 10 / 01 / 2013


Prof. Dr. Berrin ZİK
Uludağ Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Cevdet UĞUZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Nakan SAĞIRKAYA
Uludağ Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Sait BULUT
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Metin ERDOĞAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Gülecan ERBİL AVCI
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Yrd. Doç. Dr. Sinan İNCE
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Raportör

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Selcen Süheyla ERGÜN'ün "Nonilfenol ve Bisfenol-A'nın Sığırlarda Gamet Fizyolojisine Olan Etkileri" başlıklı tezi 18.01.2013 günü saat 10.00'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Kağan UÇOK
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez konusunun belirlenmesinde yardımcı olan, çalışmalarım esnasında her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, danışman hocam Prof. Dr. Cevdet UĞUZ'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım da benden ilgi ve desteğini esirgemeyen ikinci tez danışmanım Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA'ya teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım da tecrübeleriyle bana yardımcı olan Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Berrin ZİK'a ve Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zekeriya NUR'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım da ve her alanda göstermiş oldukları yardımlarından ve desteklerinden dolayı Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Burcu ÜSTÜNER ve Araş. Grv. Selim ALÇAY'a teşekkürü bir borç bilirim. Doktora öğrenciliğim boyunca bana destek olan ve malzemelerin temininde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Metin ERDOĞAN'a, Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT'a, Araş. Grv. Dr. Ö. Faruk LENGER'e ve doktora öğrencisi Fahriye ZEMHERİ'ye teşekkürlerimi sunarım. Doktora tez savunma komitesinde bulunan ve tezime katkı sağlayan hocalarım Doç. Dr. Sait BULUT'a, Doç. Dr. Gülcan ERBİL AVCI'ya ve Yrd. Doç. Dr. Sinan İNCE'ye teşekkür ederim. Doktora süresince hep yanımda olan aileme, eşimin ailesine, yardımını ve desteğini esirgemeyen eşim Ertuğrul ERGÜN'e ve bu sürecin bütün zorluklarına benimle birlikte katlanan kızlarım Sude ve Sena ERGÜN'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay	i
Önsöz	ii
İçindekiler.....	iii
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Şekiller	vii
Tablolar	viii
Resimler.....	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Nonilfenol.....	7
1.1.1. Nonilfenol'ün Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	7
1.1.2. NF'nin Üretimi, Kullanım Alanları ve Çevresel Durumu.....	11
1.1.3. Nonilfenol'ün Karsinojenik Etkisi	16
1.1.4. Nonilfenol'ün Embriyonik Etkisi.....	17
1.1.5. Nonilfenol'ün Mutajenik Etkisi	19
1.2. Bisfenol A	20
1.2.1. Bisfenol A' nın Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	20
1.2.2. BFA'nın Üretimi, Kullanım Alanları ve Çevresel Durumu.....	21
1.2.3. Bisfenol A'nın Karsinojenik Etkisi	24
1.2.4. Bisfenol A'nın Embriyonik Etkisi.....	25
1.2.5. Bisfenol A'nın Mutajenik Etkisi	27
1.3. Epigenetik.....	28
1.3.1. Nonilfenol ve Bisfenol A'nın Epigenetiğe Etkisi	29
1.4. Gamet Fizyolojisi	32
1.4.1. Nonilfenol'ün Gamet Fizyolojisine Etkisi	32
1.4.2. Bisfenol A'nın Gamet Fizyolojisine Etkisi	35
1.5. Tez Çalışmasının Konusu.....	38

2. MATERİYAL VE METOT	40
2.1. Materyal	40
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Materyaller ve Solüsyonlar	40
2.1.2. Kullanılan Biyolojik Materyaller	42
2.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Araçlar	42
2.2. Metot	43
2.2.1. NF ve BFA'nın Sığır Spermlerine Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	43
2.2.2. DNA Hasarının Belirlenmesi	45
2.2.3. NF ve BFA'nın Oosit Olgunlaşmasına Etkisi	46
2.2.4. İn vitro maturasyon (IVM).....	46
2.2.5. İstatistik Analiz	47
3. BULGULAR	48
3.1. NF ve BFA'nın Sperm Üzerine Etkileri.....	48
3.1.1. Tunel Kiti Kullanılarak Boyanan Spermilerin Mikroskop Görüntüleri	56
3.2. NF ve BFA'nın Oosit Olgunlaşmasına Etkisi	58
3.2.1. Olgunlaşmış Oosit Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri.....	61
4. TARTIŞMA	63
5. SONUÇ.....	69
ÖZET.....	72
SUMMARY	73
KAYNAKLAR	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

AF	Alkilfenol
AFB	Alkilfenol Etoksilat Bileşikleri
AFEO	Alkilfenol Polietoksilat
BBP	Bütül benzil fitalat
BFA	Bisfenol-A
BKİ	Beden Kütle İndeksi
CAT-D	Catepsin- D
DBP	Di-n-bütül fitalat
DEP	Dietil fitalat
DES	Dietilstilbestrol
DMP	Dimetil fitalat
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNOP	Di (n-öktil) fitalat
ER- α	Östrojen reseptörü alpha
FCS	Fötal buzağı serumu
FSH	Folikül sitümüle edici hormon
g	Gram
g/L	Gram/Litre
h	Saat
IVM	İn vitro maturasyon
İn vitro	Laboratuvar ortamında
İn vivo	Canlı ortamda
kg	Kilogram
KH	Kutup hücresi
LH	Lüteinleştirici hormon
MCF-7	İnsan göğüs kanser hücresi
mg	Miligram
mg/L	Miligram/Litre
ml	Mililitre
MUC1	Mucin gen 1

mRNA	Mesajcı RNA
$\mu\text{g/L}$	Mikrogram/Litre
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
ng/d	Nanogram/Gün
NF	Nonilfenol
NFE	Nonilfenol Etoksilat
OF	Oktifenol
PBB	Polibro bifenil
PBS	Fosfat Buffer Salin
PCB	Poliklorin bifeniller
ppb	Parts per bilion
pS2	Trefoil peptit
PVC	Polivinil klorit
RT- PCR	Reverse transkriptaz PCR
Sg/plak	Salmonella gallinarum/plak
TCM-199	Tissue culture medium-199
TL-HEPES	Yıkama medyumu

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1.1. 17 β -östradiol (a), NF (b) ve BFA'nın (c) kimyasal yapılarının karşılaştırılması.....	4
Şekil 1.2. AFB'nin indirgenerek oluşturduğu bileşiklerin şematik olarak gösterilmesi.....	7
Şekil 1.3. AFB'lerin mikrobiyal metabolizmaları.....	8
Şekil 1.4. NFE'nin kimyasal yapısı	9
Şekil 1.5. Doğrusal konumdaki 4-NF'nin kimyasal yapısı	9
Şekil 1.6. NF'nin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 1.7. NF Türevleri.....	10
Şekil 1.8. NF miktarını içeride ve dışarıda ölçen araştırmaların karşılaştırılması.....	15
Şekil 1.9. BFA'nın Fenol ve Asetondan Kondensasyonu.....	20
Şekil 1.11. Genetik ve Epigenetiğin şematik gösterimi	28
Şekil 1.12. Çevresel Etkenlerin Gen Düzenleme Mekanizmasına Etkisi	29
Şekil 3.1. NF'li deney gruplarında toplam hücre sayıları ve apoptotik hücre sayıları.	51
Şekil 3.2. BFA'lı deney gruplarında toplam hücre sayıları ve apoptotik hücre sayıları.	52
Şekil 3.3. NF ve BFA'lı deney gruplarında apoptotik hücre yüzdeleri.	52
Şekil 3.4. Kontrol, solvent kontrol, NF ve BFA uygulanan çeşitli gruplardaki oosit olgunlaşma yüzdeleri	60

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 1.1. Endokrin bozucuların üreme sistemi üzerindeki etki mekanizmaları.....	2
Tablo 1.2. 4-NF'nin Genel Özellikleri.....	11
Tablo 1.3. NF'nin nehirler, nehir ağızları, sedimentler ve denizlerdeki miktarlarının ülkelere göre dağılımı	13
Tablo 1.4. BFA'nın Genel Özellikleri	21
Tablo 3.1. NF'nin spermier üzerindeki apoptotik hücre yüzdeleri.....	48
Tablo 3.2. BFA'nın spermier üzerindeki apoptotik hücre yüzdeleri.....	49
Tablo 3.3. NF'li deney gruplarında toplam hücre sayısındaki apoptotik hücre yüzdeleri.....	50
Tablo 3.4. BFA'li deney gruplarında toplam hücre sayısındaki apoptotik hücre yüzdeleri.....	50
Tablo 3.5. NF'nin spermier üzerindeki apoptotik hücre yüzdelerinin ortalama (Ort), standart hata (SH) ve minimum-maksimum (Min- Mak) değerleri.....	53
Tablo 3.6. Kontrol grubuyla diğer gruplar arasında geręekleřtirilen t-testi analizi sonuçları.....	54
Tablo 3.7. BFA'nın spermier üzerindeki apoptotik hücre yüzdelerinin ortalama (Ort), standart hata (SH) ve minimum-maksimum (Min- Mak) değerleri.....	55
Tablo 3.8. NF'nin Oositlerin Olgunlaşmasına Etkisi.....	58
Tablo 3.9. BFA'nın Oositlerin Olgunlaşmasına Etkisi.....	59

RESİMLER

	Sayfa
Resim 3.1. 0,1 µg BFA/ml (a), 100 µg BFA/ml (b) konsantrasyonlarındaki ve DNase uygulanmış (c) spermilerin faz kontrast mikroskop (A) ve floresan mikroskop (B) görüntüleri (X 40)	57
Resim 3.2. NF Kontrol (a), 0,01 µg NF/ml (b), 10 µg NF/ml (c), BFA Kontrol (d), 10 µg BFA/ml (e) ve 100 µg BFA/ml (f) gruplarında I. kutup hücresi (KH) oluşmuş oositlerin mikroskop görüntüleri (X 40).....	62

1. GİRİŞ

Dünyada giderek artan nüfusla birlikte gelişen teknoloji ve hızlı sanayileşme çevre kirliliğini de beraberinde getirmektedir. Çeşitli kaynaklardan çıkan radyoaktif, katı, sıvı ve gaz halindeki kirletici maddelerin hava, su ve toprakta yüksek oranda birikmesi çevre kirliliğinin oluşmasına neden olmaktadır. Çevre kirliliğine neden olan kimyasalların arasında fenolikler, alkoller, aldehytler, steroller, poliaromatik hidrokarbonlar, pestisitler, dioksinler, alkilfenolik bileşikler, farmosötik kaynaklı hormonal veya anti-hormonal ilaçlar, deterjanlar, ağır metal bileşikleri, poliklorobifenil (PCB), polibrobifenil (PBB) gibi kimyasallar bulunmaktadır (Toppari ve ark., 1996; Crisp ve ark., 1998).

Çevresel kirleticilerin birçoğu canlıların endokrin sistemini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Endokrin bozucu maddeler; endokrin sistemin gelişimi ve fonksiyonunu değiştiren maddelerdir. Bu maddeler, hormonların üretim, salınım, bağlanma, taşınma, aktivite, yıkım ve vücuttan atılımları üzerine etki etmektedirler (Yeşilkaya, 2008).

Ksenoöstrojen olarak da adlandırılan çevresel kirleticilerin birçoğu hormon benzeri etkilere sahiptir (Soares ve ark., 2008). Bu kimyasallar, vücutta hormon sistemini taklit ederek vücut gelişimini, doğurganlığı ve hücre metabolizmasını bozmaktadır (Jacobsen ve ark., 2010). Ksenoöstrojenler farklı etki mekanizmaları ile endokrin sistemi etkilemektedirler. Ksenoöstrojenlerin bir kısmı hormon reseptörlerine bağlanarak hormon gibi davranmakta, bir kısmı ise doğal hormonun spesifik reseptör bölgesine bağlanmasını engelleme şeklinde anti-hormonal etki göstermektedir. Başka bir deyişle, bu bileşikler organizma içerisinde hormon reseptörlerini taklit etme veya onların etkilerini tersine çevirme kabiliyetine sahiptirler. Ksenoöstrojenik kimyasalların gösterdikleri bu hormonal veya anti-

hormonal aktiviteler endokrin sistemin işleyişini olumsuz yönde etkilemektedir (Carney ve ark., 1997; Cook ve ark., 1997; Bolger ve ark., 1998). Bu kimyasallar hem karada, hem de suda yaşayan canlılar açısından önemli sonuçları bulunan östrojenik etkilere sahiptirler (McLachlan, 1980;1985).

Endokrin sistemi olumsuz etkileyen bu kimyasallar; PCB, dioksin ve benzopren, polivinilkarbon (PVC), bisfenol A (BFA), pestisitler, bitki ilaçları, mantar ilaçları, parazit ilaçları, AF ve ağır metaller olarak özetlenebilir (Tabb, 2006). Bu kimyasalların çoğu yağda eriyebildiğinden, yağ dokusunda birikirler veya yıkılıp zararsız hale getirilmeleri işlemi zor olduğu için vücutta uzun süre kalarak zararlı etkilerde bulunabilirler (Solomon ve Schettler, 2000; Lee, 2007).

Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerine etkileri incelendiğinde özellikle üreme sisteminde değişik mekanizmalarla birçok patolojiye yol açtığı gösterilmiştir (Massart ve ark., 2005; McLachlan ve ark., 2006). Bu maddelere uzun süreli olarak gerek besinler yoluyla ağızdan, gerek deterjan ve kozmetikler gibi evsel kullanım esnasında deri yoluyla; gerekse bu maddelerin üretiminde çalışanlarda solunum ve deri yoluyla maruz kalma sonucunda sağlık ve fertilitate problemleri ortaya çıkmaktadır (Kris-Etherton ve ark., 2002). Tablo 1.1.'de endokrin bozucuların üreme sistemi üzerindeki etki mekanizmaları gösterilmiştir (Yeşilkaya, 2008).

Tablo 1.1. Endokrin bozucuların üreme sistemi üzerindeki etki mekanizmaları (Yeşilkaya, 2008)

Östrojen Reseptörlerini Uyararak Etkileyenler	BFA ve B, Dietilstilbestrol, Metoksiklor, Klordekon, Oksilfenol, Nonilfenol, Genistein, DDT ve metabolitleri
Androjen Reseptörlerini İnhibe Ederek Etkileyenler	Vinklozin, Flutamid, DDT ve metabolitleri, Metoksiklor, Fenitroton, Prosimidon, Linuron
Steroid Hormon Sentezini İnhibe Edenler	Fitalatlar, Trifeniltin, Fenarimol, Fadrozol, Ketokonazol, Finasterid, Endosulfan
Apoptozise Neden Olanlar	Deltametrin, Oksilfenol, 1,2-dibromo-3kloropropan

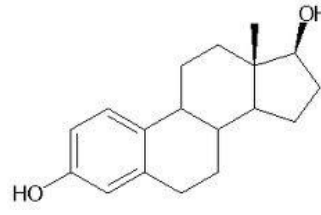
Endokrin bozucuların çoğu, östrojenik etkili olmakla birlikte antiöstrojenik ve antiandrojenik etkili olanlar da bulunmaktadır. Ayrıca östrojenik ya da antiandrojenik endokrin bozucuların, erkeklerde testis ile prostat kanseri ve kadınlarda meme ile endometrium kanseri gelişiminde risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür (Lee, 2007; Hess-Wilson ve Knudsen, 2006).

Endokrin sistemi bozucu maddelerden alkilfenol etoksilat bileşikleri (AFB) çevrede istikrarlı değildirler ve bunlar etoksi birimlere bölünerek AF'lere dönüşebilirler (Lee, 2007). AFB, biyolojik olarak kolay parçalanma özelliğinde olup, sularda biyolojik olarak parçalanarak bütilfenol (BF), oktilfenol (OF) ve nonilfenol (NF) gibi AFB türevlerine dönüşmektedir. Ana bileşenlerine göre AF'ler; özellikle NF ve OF daha hidrofobik ve zehirlidirler. Birçok araştırma bu kimyasalların endokrin bozucu etkilerini göstermiştir. NF, AFB'nin % 82'sini oluştururken, aynı zamanda biyolojik bozunuma en dayanıklı olan kimyasaldır (Nimrod ve Benson, 1996; Shang ve ark., 1999; Ackermann ve ark., 2002; Kwack ve ark., 2002). Hale ve ark. (2000), NF miktarının kanalizasyon atıklarında 14,000 µg/L, çöktülerde ise 70,000 µg/L kadar çıktığını rapor etmişlerdir.

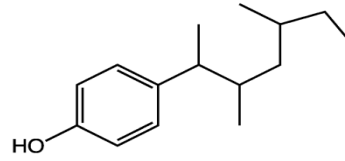
Bir başka endokrin bozucu olan Bisfenol-A (BFA) polikarbonat plastiklerde, epoksi reçinelerde, polyesterde, lastik ve poliamid sanayinde, PVC plastik pencerelerde, kompakt disklerde, iş güvenlik kasklarında, kurşun geçirmez camların yüzeyine kaplanan filmlerde, otomotiv parçalarında, toz boyalarda, su ve süt şişelerinde, bebek biberonu, birçok elektrik ve elektronik parça yapımında kullanılmaktadır. BFA'nın çok geniş kullanım alanının olması günlük hayatta kişilerin BFA ile temas etme risklerini arttırmaktadır (Staples ve ark., 1998; Sheehan, 2000).

NF ve BFA yapısal olarak östradiol (17β-estradiol) hormonu ile benzerlik göstermektedir. Bu sayede NF ve BFA, östrojen hormonunu taklit edebilmektedir. Bilindiği üzere, östradiol (E2 veya 17β-östradiol) kadınlık özelliğini sağlayan ana hormon olan östrojen türevidir. Dişi cinsel organlarının gelişimini ve cinsel

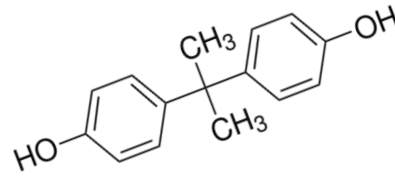
olgunluğa erişimi sağlar. Beyinden gelen uyarıcı hormonlar LH ve FSH aracılığıyla overlerden yani yumurtalıklardan salgılanır. Progesteron hormonuyla birlikte yumurtlama ve adet sikluslarının düzenlenmesini sağlar. Erkeklerde testislerden az miktarda salgılanır ve prostat ile meme dokusunun gelişmesinde rol alır. Şekil 1.1.'de 17β -östradiol (a), NF (b) ve BFA (c) arasındaki yapısal benzerlik gösterilmektedir.



(a) 17β -östradiol



(b) NF



(c) BFA

Şekil 1.1. 17β -östradiol (a), NF (b) ve BFA'nın (c) kimyasal yapılarının karşılaştırılması.

Östrojene yapısal benzerliğinden dolayı östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojeni taklit edebilen ya da östrojen reseptörlerini işgal ederek konsantrasyona bağlı olarak doğal östrojenin etkisini azaltabilen, bu kimyasalların çoğu ksenoöstrojenler olarak da adlandırılır ve bunların parçalanma ürünleri östrojenik, mutajenik, toksik veya karsinojenik olabilmektedir (Toppari ve ark., 1996; Bigsby ve ark, 1999).

NF, günlük yaşamda deterjanlarda, boyalarda, herbisitlerde, pestisitlerde ve kozmetik ürünlerde yaygın olarak bulunmaktadır. Östrojenik etkileri nedeniyle bu maddenin, kemirgenlerde testis ve epididimisi olumsuz yönde etkileyerek üreme fonksiyonunu bozduğu ileri sürülmektedir (De Jager ve ark., 1999a; De Jager ve ark., 1999b).

NF'nin istiridyeler üzerindeki öldürücü ve östrojenik etkilerini belirlemek için yapılan araştırmada, 0,1 mg NF/L'lik konsantrasyonda hiç ölüm olmadığı ve 96 saatlik LC50 değerinin 0,3 mg NF/L olduğu belirlenmiştir. Östrojenik etkiyi ölçmek için yapılan araştırmada yedi gün boyunca 0,1 mg NF/L'ye maruz bırakılan grupta alkali-labil fosfat (ALP)'nin arttığı gözlenmiştir. Ondört günlük deneylerde tüm konsantrasyonlarda (0,0125; 0,025; 0,05 ve 0,1 mg NF/L) ALP artışı gözlenmiştir (Marin ve ark., 2008).

Östrojenin ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişimini sağlamasından dolayı, Tayvan'da ergenlik dönemindeki 786 öğrencinin idrarlarındaki NF konsantrasyonu ve bunun ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişimindeki etkisi araştırılmıştır. İdrar örneklerinin % 30'u pozitif olarak belirlenmiştir. NF konsantrasyonları 178,25 µg/g kreatine kadar değişmektedir. Yaşları dokuz, on ve on buçuk arasında değişen Tayvanlı kızların, % 15'lik bir kısmının adet görmeye başladığı belirlenmiştir. Tayvanlı kızlarda görülen bu oran, beyaz ve siyahi kızlardan daha fazladır. Beden kitle indeksi (BKİ) cinsiyet gelişiminde önemli bir etken olduğu için ikincil cinsiyet karakterlere sahip olup olmama konusunda idrardaki NF seviyelerinin anlamlı bir fark oluşturmadığı belirlenmiştir. Yaşın ve BKİ'nin etkisi düzenlendikten sonra, adet görme yaşının idrardaki NF seviyesinin artışıyla ters korelasyona sahip olduğu görülmüştür. Araştırmacılar sonuç olarak NF'ye maruz kalmanın ergenlik gelişimini etkileyebileceğini belirtmişlerdir (Chen ve ark., 2009).

Bir başka endokrin sistem bozucu olan BFA, polikarbonat plastiklerinin içerisinde ve özellikle de yiyecek, içecek kaplarında ve dış malzemelerinde bulunan ve östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenik etki gösteren bir maddedir (Biggsby

ve ark, 1999). BFA'nın, dişi farelerde endometrium epitel hücrelerinin çoğalmasına, overlerde değişikliklere, yumurta sayısında azalmaya ve uterus ağırlığında artmaya neden olduğu gösterilmiştir. BFA'ya maruz kalan erkek farelerde ise prostatta büyümeye, epididimis ağırlığında azalmaya ve anogenital bozukluklarda artmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Maffini ve ark., 2006).

Çevresel dozlarda BFA'ya maruz kalmanın geniş burunlu Kayman timsahlarının (*Caiman latirostris*) cinsiyetleri üzerindeki etkisi incelendiğinde, yumurta içerisine çeşitli dozlarda uygulanan BFA'nın yumurtalık cinsiyetini ve yumurtalığın histolojik yapısını değiştirerek östrojen benzeri gelişimsel etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Stoker ve ark., 2003).

Seta ve ark. (2005) BFA'ya maruz kalmanın, yetişkin dişi farelerin eşleşmeden, yavruların sütten kesilmesine kadar olan annelik davranışlarını etkileyip etkilemediğini belirlemek üzere bir çalışma yapmışlardır. Sonuçta BFA'ya maruz kalan annelerin annelik davranışlarını oluşturan bazı özel bileşenlerde azalmalar olduğunu gözlemişlerdir.

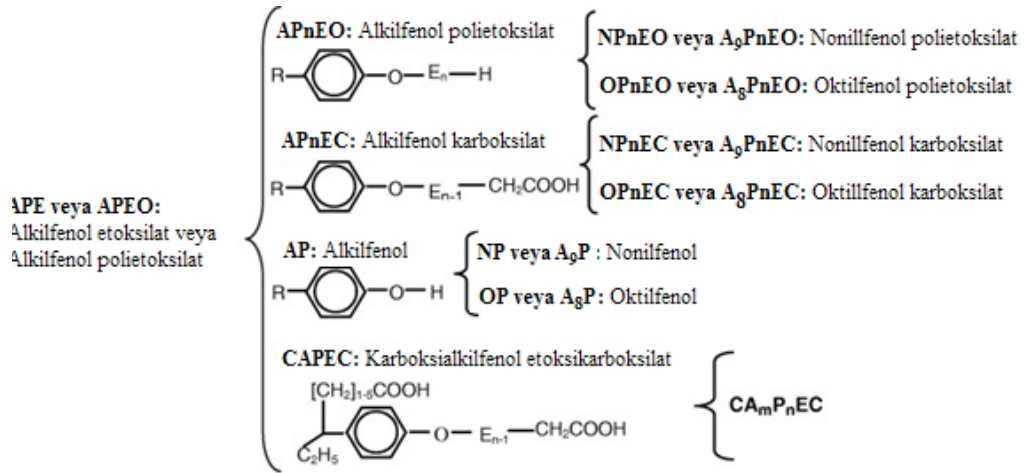
İnsanların maruz kaldıklarına benzer oranlarda BFA ve etinilöstradiyole maruz kalan erkek farelerin prostat gelişimlerinin bozulduğu belirlenmiştir (Taylor ve ark., 2011).

Benachour ve ark. (2007) aralarında BFA ve NF'nin de bulunduğu bazı endokrin yıkıcı maddelerin sitotoksik etkilerini ve aromataz inhibisyonunu araştırmışlardır. Hücresel yaşama yeteneği yirmi dört saat içerisinde tüm ksenobiyotikler tarafından 50 µM eşik değerinde etkilenmiştir ve aromataz ölümcül olmayan dozlarda inhibe edilmiştir. Plasental mikrozoimler içinde, en aktif ksenobiyotikler mikrosomal aromatazı, NADPH metabolizmasından bir şekilde bağımsız olarak inhibe etmişlerdir. Hücrelerde, uzatılmış düşük dozlu maruz bırakılmalarda aromataz inhibasyonunun elli katına yükseldiği gözlenmiştir.

1.1. Nonilfenol

1.1.1. Nonilfenol'ün Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Nonilfenol (NF)'ler, alkil fenollerin geniş bir grubunu oluşturan organik bileşiklerdir. NF, nonilfenol polietoksilatların (NFE) parçalanmasıyla oluşmaktadır (Warhurst, 1995). NF merkezinde aromatik (veya benzen) halka, halkaya bağlı dokuz karbonlu (C) yan zincir ve bu zincirin karşısında hidroksil grubu (OH) bulunduran bileşiklerden en iyi bilinenidir (Cox, 2003). NFE'ler, AFB üretiminin % 80-85'ini oluşturmaktadır (ICIS, 2007). AFB genellikle arıtma tesislerinde, diğer alkilfenolik bileşiklere indirgenerek nehirlere ve denize karışır. NFE üretiminin % 83'ü çevrede, % 37'si su ortamlarında bulunur (CES, 1993). Alkilfenolik bileşikler su ortamlarında, birkaç etoksilat grubu içeren alkilfenol etoksilatlar, alkilfenoksi karboksilik asit ve alkilfenoller olarak üç ana grup şeklinde bulunurlar. Şekil 1.2.'de AFB'nin indirgenerek oluşturduğu bileşikler şematik olarak gösterilmektedir (Tubau ve ark., 2010).



R: dallanmış nonil grup (C₉H₁₉) veya oktil grup (C₈H₁₇); m: Alkil grup sayısı (m=9 nonil grup, m=8 oktil grup)

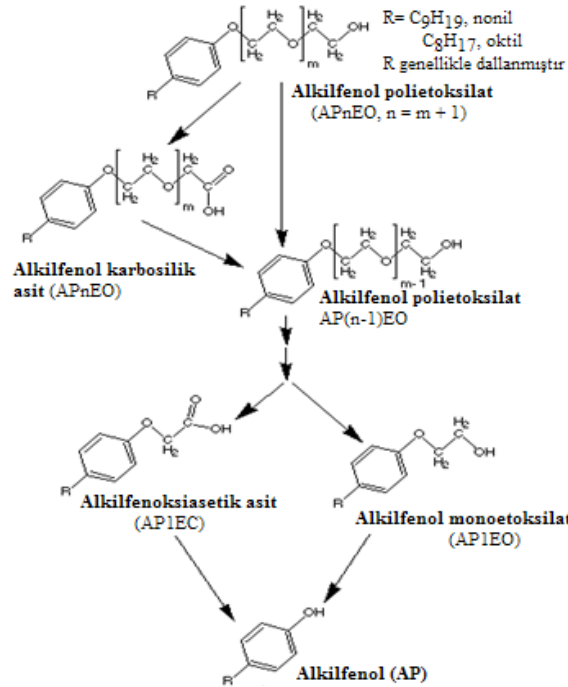
E= [CH₂-CH₂-O] etoksilat grubu;

n: etoksilat grup sayısı (1-20)

Şekil 1.2. AFB'nin indirgenerek oluşturduğu bileşiklerin şematik olarak gösterilmesi (Tubau ve ark., 2010).

Birçok araştırmacı NFE'lerin, kısa zincirli polietoksilat, nonilfenol politoksi karboksilat gibi değişik türevlerinin ve NF'nin nehir suyu ile sedimentlerinde tespit edildiğini belirtmişlerdir. Özellikle sedimentlerde yüzey sularına göre NF konsantrasyonu daha fazla bulunmaktadır (Mao ve ark., 2012). Alkilfenolik bileşikler lipofilik olduklarından dolayı, balık gibi suda yaşayan canlılarda birikerek besin zinciri yoluyla biyolojik birikime uğramaktadır (Maruyama ve ark., 2000; Ahel ve ark., 1994a, b, 1996). NF gibi kısa zincirli polietoksilat türevleri, bozulmamış öncüllerine göre sudaki organizmalar açısından daha toksiktir (Yoshimura, 1986).

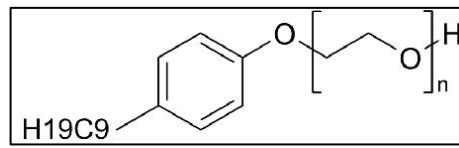
NF çevrede sık rastlanan bir kirleticidir. Yapılan araştırmalarda NF'ye tüm dünya çapında suda, çökeltilerde havada ve toprakta rastlanmıştır. Doğal çevrelerde ve su arıtma tesislerinde aerobik ve anerobik ortamlarda mikroorganizmalar sayesinde biyodegrasyonla azaltılabilir (Mao ve ark., 2012). Şekil 1.3.'de AFB'lerin mikrobiyal metabolizmaları gösterilmektedir (Ball ve ark., 1989; Ahel ve ark., 1994c).



Şekil 1.3. AFB'lerin mikrobiyal metabolizmaları (Ball ve ark., 1989; Ahel ve ark., 1994c)

NFE'lerin hem hidrofobik hem de hidrofilik kısımlarının olması yüzey aktif maddesi olarak kullanılmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Hidrofilik kısımlar suyu çekerken, hidrofobik kısım yağ ve gres gibi az çözünebilir maddeleri kendisine bağlar (John ve ark., 2000; Ghiaci ve ark., 2007).

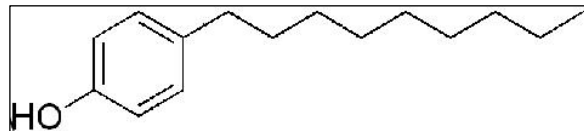
Şekil 1.4.'de NFE'nin kimyasal yapısı gösterilmektedir (Mehtonen ve Munne, 2011).



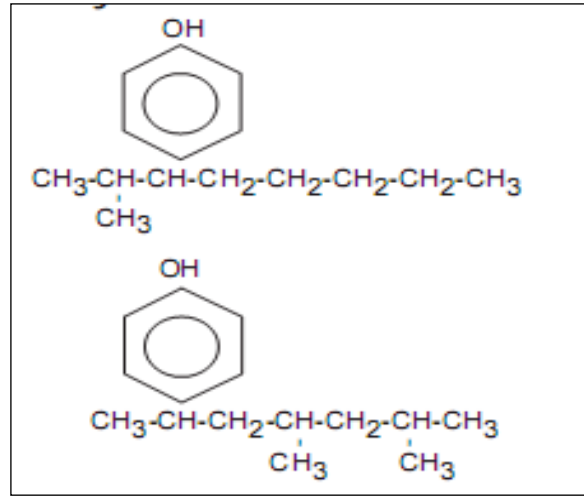
Şekil 1.4. NFE'nin kimyasal yapısı (Mehtonen ve Munne, 2011).

Su ortamında indirgenme sonucunda çıkan ilk ürünler, NF1EO ve NF2EO ürünleridir ve ana bileşik gibi kolayca biyolojik olarak parçalanmamaktadır. Bu ürünler zamanla NF'ye bozunmaktadır (Maguire, 1999). NF, yapısındaki benzen halkasından dolayı biyolojik olarak parçalanmaya (biyodegradasyon) karşı dirençli ve biyobirikime (biyoakümülyasyon) müsait bir bileşiktir (Brunner ve ark., 1988).

NF yapısal olarak doğrusal ve dallı olmak üzere iki farklı şekilde bulunmaktadır. Şekil 1.5.'te doğrusal konumdaki 4-NF'nin kimyasal yapısı gösterilmektedir (Mehtonen ve Munne, 2011).

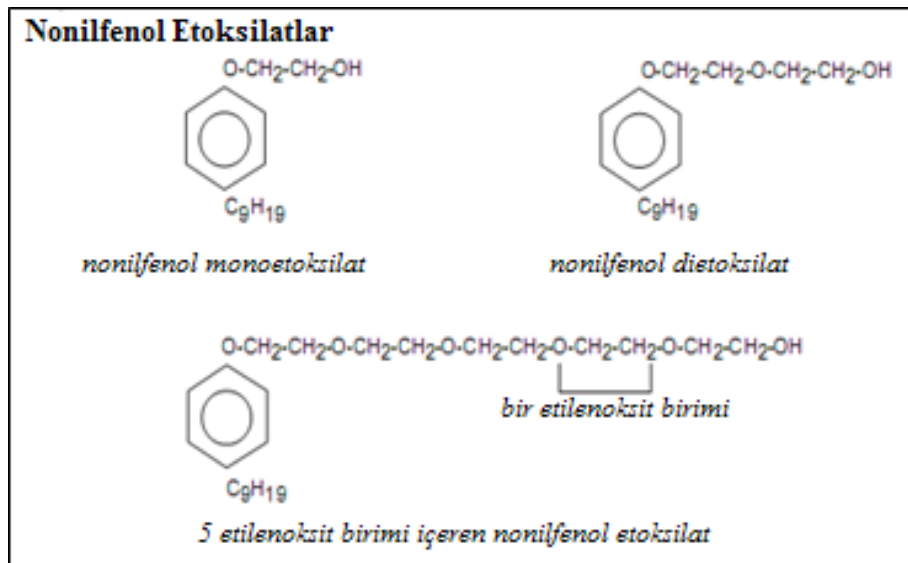


Şekil 1.5. Doğrusal konumdaki 4-NF'nin kimyasal yapısı (Mehtonen ve Munne, 2011)



Şekil 1.6. NF'nin kimyasal yapısı (Cox, 2003).

NF dallanma şekillerine göre farklı isimler almaktadır. Şekil 1.6.'da NF'nin kimyasal yapısı, Şekil 1.7.'te NF'nin farklı türevleri görülmektedir (Cox, 2003).



Şekil 1.7. NF Türevleri(Cox, 2003).

Doğrusal NF (4-NF) beyaz kristal yapıdayken dallı NF oda sıcaklığında sıvıdır ve rengi sarıya kaymaktadır. NF'nin, 25 °C'deki yoğunluğu 0.952 g/ml'dir. Sudaki

çözünürlüğü 4,9 mg/L'dir. Çoğu organik çözücüde çözünebilmektedirler. 4-NF'nin genel özellikleri Tablo 1.2.'de verilmiştir (Soares ve ark., 2008).

Tablo 1.2. 4-NF'nin Genel Özellikleri (Soares ve ark., 2008; IFA, 2011).

Genel Özellikleri	
Genel adı	Nonilfenol
IUPAC adlandırması	4-Nonilfenol
CAS numarası	140-40-5, 25154-52-3, 104-40-5, 84852-15-3,11066-49-2
Kimyasal formülü	C ₁₅ H ₂₄ O
Molekül ağırlığı	220.34 g/mol
Görünüm	Beyaz kristal, vizkoz sıvı hali açık sarı
Erime sıcaklığı	43–45 °C
Kaynama sıcaklığı	180-181 °C
Yoğunluk	0.952 g/ml
Sudaki Çözünürlüğü	6 mg/L (pH 7)

1.1.2. NF'nin Üretimi, Kullanım Alanları ve Çevresel Durumu

Endokrin sistemi bozucu etkiye sahip maddelerden olan alkilfenol etoksilat bileşikleri (AFB); 1940'larda, endüstride kullanılan iyonik olmayan yüzey aktif maddelerinin en geniş ikinci grubu olarak karşımıza çıkmıştır (Renner, 1997). AFB'nin dünyadaki yıllık üretimi yaklaşık olarak 650 000 ton civarında olup (Guenther ve ark, 2002), bu miktarın % 60'dan fazlası dere, nehir, göl ve deniz gibi su ortamlarında bulunmaktadır (Porte ve ark., 2000; Renner, 1997). Batı Avrupa'da AFB'lerin üretimi 2000-2002 yılları arasında 166 000 tondan 83000 tona düşmüştür (Cefic, 2002). ABD'nin 2007 yılındaki yüzey aktif madde ihtiyacı 7,5 milyar pounddur (yaklaşık 3,5 milyon ton). ABD ve Kanada'nın yıllık NFE yüzey aktif madde tüketimi 300-400 milyon pound (136 000-181 000 ton arası) olarak tahmin edilmektedir. ToxEcology tarafından 2002 yılında yapılan bir araştırmada Kanada'daki NFE yüzey aktif madde kullanımı 29 milyon pound (yaklaşık 13000

ton) olarak tahmin edilirken, ABD'deki NFE kullanımının 270-370 milyon pound (123 000- 168 000 ton) arasında değiştiği söylenebilir (ABD evre Koruma Ajansı, 2010). 2006 yılında NFE'lerin Amerika Birleşik Devletlerinde kullanımı 130 600 ton olarak gerçekleşmiştir (ICIS Chemical Business Americas, 2007). Buna rağmen gelişen Asya ekonomilerinde bu bileşiklerin kullanımında artış gözlenmiştir. Hindistan Ticaret Bakanlığının verilerine göre 2000 yılında 818 ton olarak gerçekleşen NF ithalatı, 2006 yılında 23843 tona yükselmiştir. Hindistan'daki NF'nin büyük kısmı NFE üretiminde kullanılmış ve NFE'lerin tüketimi yıllık 40000-44000 ton olarak gerçekleşmiştir (Dutta, 2008). Dünyadaki NF üretimi, Amerika'da 154 200 tona ulaşırken, Japonya'da 16500 ton ve Çin'de 16000 ton civarındadır (Soares ve ark., 2008). Çin'de yıllık AFB üretimi yaklaşık 50000 ton kadardır. NF'nin östrojenik olması ve dünya çapında büyük miktarlarda üretilmesi sebebiyle çevresel davranışı ve geleceği hakkında büyük bir endişe oluşmaktadır (Wang ve ark., 2010). Avrupa Birliği risk değerlendirme raporuna göre, Avrupa'da toplam NF üretimi 1994'de 78000 ton civarındayken, 1997'de 74000 ton civarındadır (EU-RAR 2002).

Çin, Hindistan ve çeşitli Güney Amerika lkeleri gibi birçok lke NF bileşenleri büyük miktarlarda üretmekte ve kullanmaktadır. Bu ülkelerin hiçbirinde bu maddelerin kullanımını azaltacak ve engelleyecek eylemler uygulanmamıştır. Çoğu Avrupa lkeleri, Kanada ve Japonya pazarlarında NFE yerine alkol etoksilatlar kullanılmaya başlanmıştır. Bu yüzey aktifler daha az verimlidir ama evre açısından daha güvenilirdir ve daha hızlı çözünmektedir (Campbell, 2002).

NF'nin değişik çevresel ortamlarda (su, çökelti, yeraltı suyu, toprak ve hava) bulunması, NF'nin fiziksel-kimyasal özellikleri tarafından belirlenir ve bu özellikler çözünme sürecini etkilemektedir. NF hidrofobik bir bileşik olup, suda çok az çözündüğünden, genellikle organik maddeye dönüşmektedir. Yayılımı ise toprağın sulu bölümünde ve keltelerde sınırlı kalmaktadır (Barber ve ark., 1988; John ve ark., 2000; Langford ve Lester, 2002). Sudaki (dereler, ırmaklar, gller ve nehir ağızları), okyanuslardaki ve keltilerdeki NF'nin ana sebebinin su arıtma

tesislerinden gelen akıntılar, endüstrileşmiş/kentsel bölgelere yakınlık ve yağmur suları olduğu düşünülmektedir (Ahel ve ark., 1994a; Hale ve ark., 2000; Corsi ve ark., 2003).

Fabrikalarının yakınlarındaki kanalizasyon atık sularda NF konsantrasyonu temiz sulardaki değerinin 100 katı civarında yüksek oranlarda ölçülmüştür (Ahel ve ark., 1994a). Başka bir çalışmada NF düzeyi İngiltere'deki Aire nehrine dökülen kanalizasyon suyunda temiz suya göre 330 kat fazla çıkmıştır. Bu artışa, nehrin yakınındaki bir tekstil fabrikasından kaynaklanan atık suların neden olduğu saptanmıştır (Blackburn ve Waldock, 1995).

Soares ve ark., (2008)' de yaptıkları bir çalışmada NF miktarının nehirler, nehir ağızları, sedimentler ve denizlerdeki dağılımını ülkelere göre tablo halinde sunmuşlardır. Bu çalışmadaki veriler Tablo 1.3.'de verilmiştir.

Tablo 1.3. NF'nin nehirler, nehir ağızları, sedimentler ve denizlerdeki miktarlarının ülkelere göre dağılımı (Soares ve ark., 2008).

Ülke	Bulunduğu Kaynak ve Yılı	NF Konsantrasyonu
ABD	Nehir suyu- 1992	<1 µg/L
ABD	Nehir sedimenti- 1992	<3000 mg/kg
ABD	Nehir Sedimenti- Hale ve ark., 2000	70 mg
ABD	Nehir sedimenti- 2001	0,01–60 mg/kg
ABD	Nehir suyu- 2003	0,1–0,5 µg/L
ABD	Nehir sedimenti- 2003	0,075–0,340 mg/kg
İsviçre	Nehir suyu- 1994	0,015–2,25 µg/L
İsviçre	Nehir sedimenti- 1994	3520 mg/kg
Kanada	Göl ve nehir suyu- 1997	0,01–0,92 µg/L
Kanada	Nehir sedimenti- 1997	0,17–72 mg/kg
Kanada	Göl sedimenti- 1998	<37 mg/kg
Kanada	Nehir suyu- 2003	<0,092 µg/L
Kanada	Nehir sedimenti- 2003	0,0403–0,293 mg/kg
İtalya	Nehir suyu -1994	158 µg/L
İtalya	Nehir suyu -1996	8,8 µg/L
Portekiz	Nehir ve deniz suyu- 2000	<1240 mg/kg

Tablo 1.3. Devam

Almanya	Nehir suyu- 2001	0,0007–0,0044 µg/L
Almanya	Nehir ağzı suyu- 2001	<0,03 µg/L
Almanya	Okyanus sedimenti- 2001	0,01–0,153 mg/kg
Almanya	Deniz sedimenti- 2001	<0,01–0,055 mg/kg
Almanya	Nehir suyu- 2001	0,5–13,0 µg/L
Almanya	Nehir suyu- 2003	0,028–1,22 µg/L
Japonya	Nehir suyu- 2001	0,051–1,08 µg/L
Japonya	Nehir sedimenti- 2001	0,5–13,0 µg/L
İspanya	Nehir suyu- 2002	15 µg/L
İspanya	Nehir sedimenti- 2002	0,022–0,645 mg/kg
İspanya	Deniz suyu- 2002	0,15–4,1 µg/L
İspanya	Liman suyu- 2002	0,008–1,05 mg/kg
Hollanda	Nehir ağzı suyu- 2003	0,031–0,934 µg/L
Hollanda	Nehir ağzı sedimenti- 2003	0,0004–1,08 mg/kg
Kore	Göl suyu- 2004	0,0232–0,1876 µg/L
Kore	Göl sedimenti- 2004	0,0254–0,932 mg/kg
Çin	Göl suyu- 2007	1,9–32,8 µg/L
Çin	Göl sedimenti- 2007	3,5–32,4 mg/kg

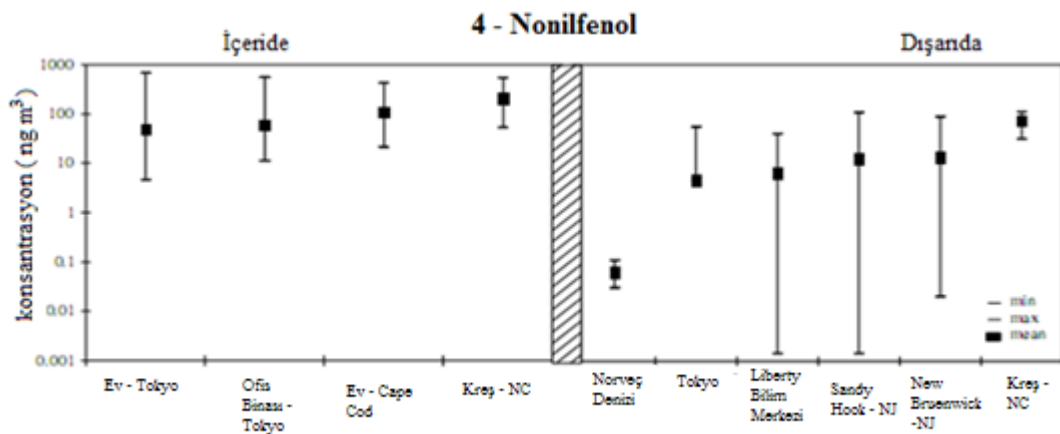
Uğuz ve ark. (2003a), Türkiye’de bulunan Sakarya ve Değirmendere nehirlerinde yaptıkları çalışmada, çökeltilerde NF düzeyinin 3,15 ve 4,46 µg/g arasında olduğunu belirtmişlerdir. Balıklardan alınan doku örneklerinde ise NF düzeyinin 0,1 ve 0,6 µg/g arasında olduğu rapor edilmiştir. Bu iki nehirdeki AF kirliliği Avrupa’daki kirlilik oranları ile pareleldir ama Amerika’nın gerisindedir.

Çin Tianjin’de bulunan Haihe nehrinin yüzey sularında NF, OF ve BFA miktarları araştırılmış, 14 alandan toplanan örnekler incelendiğinde, yalnızca bir tanesinin nispeten yüksek konsantrasyonda BFA (8,30 µg/L) ve NF (0,55µg/L) içerdiği tespit edilmiştir (Jin ve ark., 2004).

Uğuz ve ark. (2003b) yaptıkları çalışmada; öldürücü olmayan dozlardaki NF’nin genç gökkuşağı alabalıklarının vücutlarında biriktiğini ve karaciğerlerinde histopatolojik ve biyokimyasal değişikliklere sebep olduğunu göstermişlerdir.

Fries ve Puttmann (2004)Almanya ve Belçika’da Temmuz 2001, Kasım 2001 ve Ocak 2002’de şehir, kenar mahalle ve köy ortamı gibi değişik ortamlardan alınan kar ve yağmur örneklerinde NF miktarlarını ölçmüşlerdir. Yağmur suyu ve çatı üzerlerinden akan suda ölçülen NF konsantrasyonu ortalaması 0,253 µg/L olarak ölçülmüştür. Bu değer kenar mahallelerde (0,534 µg/L), şehir içi (0,099 µg/L) ve köy (0,062 µg/L) ortamlarında ölçülene göre önemli miktarda yüksek bulunmuştur. NF konsantrasyonu yaz yağmurunda (0,099 µg/L), kış yağmurundan (0,346 µg/L) anlamlı ölçüde düşük tespit edilmiştir. Kar örneklerinde NF konsantrasyonu ortalama olarak 0,242 µg/L olarak belirlenmiştir. Şehir içi kar örneklerinde NF konsantrasyonu 0,478 µg/L olarak ölçülmesine rağmen, kenar mahalle bölgelerinde 0,030 µg/L değerine ulaşarak daha düşük ortalama değer elde edilmiştir. Köy bölgelerindeki kar örneklerinde NF konsantrasyonu sınır değerlerin üstüne çıkmamıştır.

Yapılan çalışmalarda NF sadece sularda değil, havada da belli konsantrasyonlarda bulunmuştur. Rudell ve Perovich (2009), daha önce havada NF miktarını ölçen araştırmaları incelemişler ve içeride yapılan ölçümlerde konsantrasyonlar 100 ng/m³ bulunmuşken, dışarıda yapılan ölçümlerdeki konsantrasyonlar 10 kat daha küçük olarak bulunmuştur (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. NF miktarını içeride ve dışarıda ölçen araştırmaların karşılaştırılması (Rudell ve Perovich, 2009).

NF gıda maddelerinde de bulunmaktadır. Raecker ve ark. (2011), Almanya’da yeni doğan ve yürümeye başlayan çocukların tükettikleri gıda maddelerindeki NF ve OF miktarlarını ölçmüşlerdir. Çalışmada, NF gıda maddelerinde bolca bulunurken, OF % 80 oranında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlarda, günlük NF alımının μg ’lara ulaştığı gözlenmiştir (0,23–0,65 μg NF/kg). Bu sonuç özellikle yeni doğan bebekler için yüksek risk taşımaktadır.

Alkilfenolik bileşikler lipofilik olduklarından dolayı, balık gibi suda yaşayan canlılarda birikerek besin zinciri yoluyla biyolojik birikime uğramaktadır (Maruyama ve ark., 2000; Ahel ve ark., 1994a, b, 1996). İtalya’da yapılan bir çalışmada, haftada en az iki kez balık yediğini belirten kadınlardan alınan süt örneklerinde en yüksek NF düzeyi, haftada bir kez balık yiyen kadınlara göre oldukça yüksek çıkmıştır. Deniz ürünleri tüketimi ile vücuda NF alımı arasında önemli bir ilişki olduğu bu çalışmayla gösterilmiştir (Ademollo ve ark., 2008).

Chen ve ark. (2010) insan sütündeki alkalifenoller ve bunların annenin demografik özellikleri ve beslenme alışkanlıklarıyla ilişkisini incelemiştir. NF konsantrasyonunun balık yağı hapı ($\beta= 0,38$; $p<0,01$) ve işlenmiş deniz ürünleri ($\beta= 0,59$; $p<0,01$) tüketimiyle ilişkili olduğunu belirlemiştir. Ortalamanın üstünde bitkisel yağ kullanan kadınlarda daha yüksek oranda OF konsantrasyonu olması da araştırmanın bir diğer sonucudur.

1.1.3. Nonilfenol’ün Karsinojenik Etkisi

Bazı pestisitler, zirai ilaçlar ve poliklorlu bifeniller östrojeni taklit eden özellikler göstermektedir ve bu maddeler insan meme yağı dokusunda ve insan sütünde ölçülmüştür (Darbre, 2006). Bu maddeler meme dokusuna çeşitli çevresel kirlenmeler sonucu yiyecek, su ve hava aracılığıyla girmekte ve lipofilik özelliklerinden dolayı meme yağında birikmektedirler. Aynı zamanda meme dokusu

kozmetik amaçlı koltukaltı ve meme çevresinde kullanılan birçok östrojenik kimyasala da maruz kalmaktadır. Belirli bölgelerde deri üzerinde kalan bu kozmetikler deri üzerinden emilim yoluyla meme bölgesinin daha direkt olarak östrojenik kimyasallara maruz kalmasına ve bu kimyasalların sistemik metabolizmadan kaçmasına sebep olmaktadır (Darbre, 2006).

NF'nin insanlarda göğüs kanseri hücresi MCF-7'de pS2, ER ve MUC1gen ekspresyonuna östrojenik etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada östrojene duyarlı pS2, ER ve MUC1 genlerinin ekspresyonu kullanılarak östradiol ve NF'nin göğüs kanseri hücresi MCF-7 üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Çalışma boyunca 10 µM NF ve 0,1 µM östradiol uygulanarak RT-PCR tekniği ile mRNA ekspresyonları tespit edilmiştir. Araştırma sonunda NF'nin östradiole göre pS2, MUC1 ve ER ekspresyonunu değişik şekillerde uyarabildiği görülmüştür (Ren ve ark.,1997).

Erkek ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda, ratlara yirmi sekiz hafta boyunca diyet içerisinde 250 ve 25 ppm NF verilmiş, çalışma sonunda akciğerlerde kanser hücrelerinin oluşma sıklığı kontrol gruplarına göre daha fazla çıkmıştır (Seike ve ark., 2003). Jubendradass ve ark. (2012), ratlarda yaptıkları çalışmada NF'nin hem mitokondriye bağlı olarak hem de Fas ve Fas-l yoluyla karaciğere zarar vererek apoptoza sebep olduğunu belirtmişlerdir.

Endokrin yıkıcı maddelerin, hormon etkisinde değişikliğe sebep olarak prostat kanserinin oluşmasında ve gelişmesinde önemli biyolojik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Hess-Wilson ve Knudsen,2006).

1.1.4. Nonilfenol'ün Embriyonik Etkisi

Çakal ve Parlak (2007), denizkestanesi embriyolarında NF miktarını ölçmüşlerdir. Sonuçlar düşük miktarlardaki NF ve OF konsantrasyonlarının iskelet sisteminde

bozukluklara yol açtığını göstermiştir. Yüksek konsantrasyonların ise mitozu engelleyerek erken yaşam dönemlerinde embriyo gelişimini engellediği görülmüştür.

Bir başka denizkestanesi türü olan *Paracentrotus lividus* gametlerinde ve embriyolarında yapılan çalışmada, Arslan ve ark. (2007), denizkestanesi sperm ve yumurtalarını NF (0,937- 18,74 µg/L) ve OF (5-160 µg/L)'ye maruz bırakmışlardır. Bunun sonucunda sperm fertilizasyon başarısı, kalitesi ve mitotik aktivitedeki morfolojik değişim, şekil bozuklukları, gelişim geriliği, embriyonik ve larval ölüm oranları incelenmiştir. Fertilizasyon başarısında % 20'ye yakın bir azalma meydana gelmiş ve kontamine spermilerin oluşturduğu larvaların iskelet yapısındaki şekil bozukluklarında artış görülmüştür. Bu türde NF'nin embriyotoksik ve genotoksik konsantrasyonları 0,937 µg/L, OF için 4,685 µg/L olarak tespit edilmiştir (Arslan ve ark., 2007).

Zebrabalıklarının üreme sistemleri üzerinde, üreme öncesi NF'ye maruz bırakılmanın etkisi incelenmiş, üç hafta boyunca 50 µg/L NF'ye maruz bırakılan dişi ve erkek zebrabalıkları, kontrol grubundaki dişi ve erkek zebrabalıklarıyla dört grup olacak şekilde çiftleştirilmiştir. Dört grup için embriyonik cathepsin D aktivitesi (CAT D), yumurta kabuğu kalınlığı (eggshell thickness), fekundite, kuluçkadan çıkma oranı ve yavrulardaki şekil bozukluğu değerleri ölçülmüştür. NF'ye maruz bırakılan erkek balıklara ait gruplardaki değerler farklılık göstermemesine rağmen, 50 µg/L NF'e maruz bırakılan dişi balıklara ait gruplarda üremede zayıflamalara ve CAT D aktivitesinin yavaşlamasına ($p<0,05$), yumurta kabuğu kalınlığının azalmasına (% 23,6) ve şekil bozukluğu oranının yükselmesine ($p<0,001$) neden olmuştur (Yang ve ark., 2006).

NF'nin, yavaş bir hızda da olsa insan plasentasına geçtiği tespit edilmiştir. NF'nin, plasentayı geçerek, amniyon sıvısında çevrede bulunan miktarlara ulaştığı belirlenmiştir (Balakrishnan ve ark., 2011).

Doğum öncesinde NF miktarını ölçmek ve anne-cenin arasındaki NF geçişi olup olmadığını belirlemek için yapılan araştırmada 174 anneden ve göbek kordonundan alınan kan örnekleri incelenmiş, analiz sonucunda özellikle şehir-büyükşehir bölgelerinde 211 ng/plazma'ya çıkacak oranlarda NF oranı tespit edilmiştir. Anne-bebek çiftlerin % 63,6'sında göbek kordonu toplardamarında, göbek kordonu atardamarına göre daha yüksek NF konsantrasyonuna rastlanmıştır (Chen ve ark., 2008).

1.1.5. Nonilfenol'ün Mutajenik Etkisi

NF'nin mutajenik etkisinin belirlenmesi amacı ile NF 0,937-4,685 µg/L aralıklarında altı farklı konsantrasyonda, OF ise 10-160 µg/L aralıklarında beş farklı konsantrasyonda test sistemi olarak seçilen *Salmonella thyphimirium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde (metabolik aktivasyonsuz) test edilmiştir. Sonuçlar revertant koloni sayılarına göre değerlendirildiğinde, tüm NF konsantrasyonlarının toksik olduğu buna rağmen mutajenik etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Buna ek olarak OF'nin *Salmonella thyphimirium* TA98 suşu ile yapılan testlerde 40 µg/L ve *Salmonella thyphimirium* TA100 suşu ile yapılan testlerde ise 20 µg/L konsantrasyonları mutajenik bulunmuştur (Boyacıoğlu ve ark., 2007).

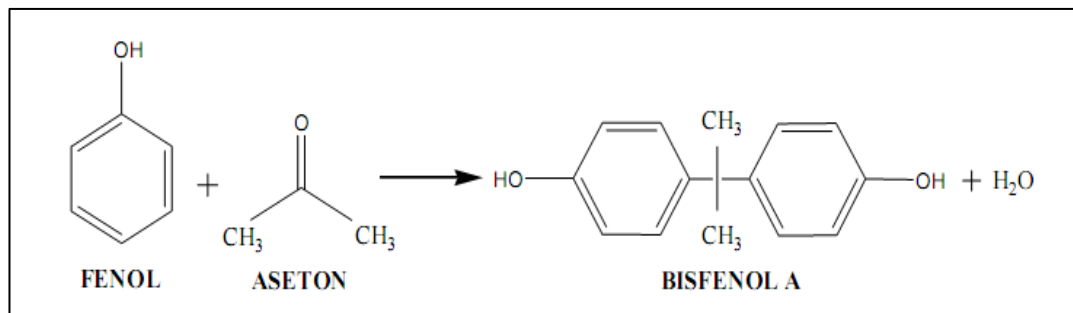
Zemheri (2011), BFA ve NF'nin mutajenik etkisini Ames /Salmonella/Mikrozom test yöntemi ile araştırmıştır. Çesitli dozlarda kullanılan test maddelerinin mutajenik etkisi S9'suz (metabolik aktivasyonsuz) ve S9'lu (metabolik aktivasyonlu) olarak, *Salmonella typhimirium*'un TA98 ve TA100 suşlarında araştırmıştır. Sonuç olarak, her iki madde içinde toksik olmayan 100 Sg/plak; 10 Sg/plak; 1 Sg/plak; 0,1 Sg/plak dozları S9'lu ve S9'suz deneylerde kullanmış ve her iki suş içinde yapılan deneylerde mutajenik etkiye rastlanmamıştır.

İki tür mikroalgin (*Chlorella vulgaris* ve *Selenastrum capricornutum*) büyüme, fotosentez ve andioksidan işlemleri üzerine nonilfenolün etkisi incelemiş, NF uygulandığında iki mikroalgin de fotosentez faaliyetleri, anten uzunlukları, maksimum fotokimya ve absorbe edilen ışık değerlerinde azalma saptanmıştır (Gao ve Tam, 2011).

1.2. Bisfenol A

1.2.1. Bisfenol A' nın Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bisfenol A (BFA) ilk olarak 1891'de Rus kimyacı Aleksandr Dianin tarafından sentezlenmiştir (Dianin, 1891). 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan, genel olarak BFA adı ile bilinmektedir. İki mol fenolün bir mol aseton ile düşük pH'da ve yüksek sıcaklıkta kondensasyonu ile elde edilmektedir. Genelde üretilen BFA % 99-99,8 saflıkta olmaktadır (Prokop ve ark., 2004). Şekil 1.9.'da BFA'nın fenol ve asetonun kondensasyonu gösterilmektedir (Prokop ve ark., 2004).



Şekil 1.9. BFA'nın Fenol ve Asetondan Kondensasyonu (Prokop ve ark., 2004)

BFA kimyasal formülü $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$ olan organik bir bileşiktir. BFA katı, fenolik kokulu, krem-beyaz renkte ve kristal yapıdadır. Sudaki çözünürlüğü

azdır ve 25 °C'deki yoğunluğu 1,1-1,2 g/L'dir. Etanol, aseton ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi organik çözücülerde iyi çözünmektedir. Sudaki çözünürlüğü 25 °C'de 120 mg/L'dir (Harvey ve Johnson, 2002). Tablo 1.4.'de BFA'nın genel özellikleri verilmiştir.

Tablo 1.4. BFA'nın Genel Özellikleri (ECB, 2003)

Genel Özellikleri	
Genel adı	Bisfenol A
IUPAC adlandırması	2,2-bis(4-hidroksifenil)propan
CAS numarası	80-05-7
Kimyasal formülü	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Yapısal formülü	(CH ₃) ₂ -C- (C ₆ H ₄ -OH) ₂
Molekül ağırlığı	228.9g/mol
Erime sıcaklığı	153-156 °C
Kaynama sıcaklığı	220 °C (0.5 kPa)
Alevlenme sıcaklığı	270 °C
Uçuculuğu	193 °C (1 atm basınçta)
Log Kow	3.32
Log Pow	3.32
Sudaki çözünürlüğü	(25 °C) 120 mg/L

1.2.2. BFA'nın Üretimi, Kullanım Alanları ve Çevresel Durumu

BFA'nın dünyadaki üretim miktarı 1980'lerde yaklaşık bir milyon ton iken, 2009'da bu miktar 2,2 milyon tonun üzerine çıkmıştır (Reuters, 2010). 2003 yılında, ABD'nin BFA kullanımı 856 000 tonu bulurken, bunun % 72'si polikarbonat plastik üretiminde, % 21'i epoksi reçine üretiminde kullanılmıştır (NTP, 2008). Sadece Avrupa'da 1997-98 yılları arasında 40000 ton BFA kullanılmıştır. BFA'nın en fazla

kullanıldığı alan % 60'lık oranla polikarbonat plastik üretimidir. Bunu % 26'lık oranla epoksi reçine üretimi takip etmektedir (NTP, 2008).

BFA genel olarak polyester üretimi, termal kâğıt üretimi, PVC plastiklerde katkı maddesi olarak kullanımı, lastik ve poliamid sanayinde kullanımı % 0,2–0,3 oranlarında değişmektedir. Günlük hayatımızda kullandığımız PVC plastik pencereler, kompakt disk, iş güvenlik kaskları, kurşungeçirmez camların yüzeyine kaplanan film, otomotiv parçaları, toz boya, su ve süt şişesi, bebek biberonu, birçok elektrik ve elektronik parça yapımında BFA kullanılmaktadır (ECB, 2003).

1930'ların başında İngiliz kimyacı Charles Edward Dodds BFA'nın yapay bir östrojen olduğunu belirtmiştir (Erlar ve Novak, 2010). BFA 1930'ların ortasında kadınlarda yapay östrojen olarak kullanılmıştır. Östradiol ve BFA'nın fenol grupları benzerlik gösterdiği için, BFA östrojen reseptörlerine bağlanabilir ve böylelikle doğal östrojeni taklit edebilir (Kwon ve ark., 2007). BFA ve NFE'ye maruz kalma üreme sistemlerini etkileyerek balıklar, yaban hayvanları, insanlar gibi yüksek seviye yaşam formları ve hatta ekosistemlerin dengesi açısından tehlike oluşturmaktadır. Bu yüzden bu bileşiklerin atık sulardan arıtılması çok önemli bir çevresel problemdir (Zhou ve ark., 2007).

Üretim ve işleme tesislerinin çevresindeki sularda yapılan araştırmada, BFA oranını belirlemek üzere ölçümler yapılmıştır. Araştırma sonucunda 2-8 µg/L arasında ölçülen BFA seviyesinin, 64 µg/L olan tahmini etki etmeyen konsantrasyon (Predicted No-Effect Concentration – PNEC) değerinden düşük olduğu tespit edilmiştir (Staples ve ark., 2000).

Deniz ve tatlı su balıklarındaki BFA değerlerinin insanlar açısından oluşturduğu riski belirlemek için yapılan araştırmada, 20 cins balıktan 19'unda 0,5 ile 2,0 ng/g arasında değişen BFA değerleri ölçülmüştür. Kişi başına günlük BFA

alımını ise deniz balıklarında $1,1 \times 10^2$ ng/d ve tatlı su balıklarında $2,2 \times 10^2$ ng/d olarak belirlenmiştir (Wei ve ark., 2011).

Tüketiciler tarafından kullanılan polikarbonat şişelerdeki sulara BFA geçişi ölçüldüğünde, 0,20 ng/h'den 0,79 ng/h'ye kadar geçişler olduğu görülmüştür (Le ve ark., 2008).

Şişelenmiş sulardaki BFA, NF, dimetil fitalat (DMP), dietil fitalat (DEP), di-n-bütül fitalat (DBP), bütül benzil fitalat (BBP), di (2-etilheksil) fitalat ve di (n-öktil) fitalat (DNOP) gibi alkalifenol ve fitalatların miktarları incelenmiş, bu bileşiklerin çoğunun değişik markalardaki şişelenmiş sulara bulunduğu saptanmıştır. Özellikle dışarıda bırakılan polikarbonat şişelerde BFA'nın daha yüksek konsantrasyonlarda olduğu belirlenmiştir (Diana ve Dimitra, 2011).

Tekrar kullanılabilen plastik, aliminyum ve paslanmaz çelik su şişelerinden yayılan BFA oranını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, oda sıcaklığında plastik şişelerden yayılan BFA değeri 0,2 ile 0,3 mg/L arasında bulunmuştur. Bu değer aliminyum şişelerde üreticisine göre 0,08 ile 1,9 mg/L arasındadır. Paslanmaz çelik, Tritan™ copolyesterplastik ve EcoCare™ kaplamalı aliminyum şişelerde ise BFA oranı ölçülmemiştir (Cooper ve ark., 2011).

Tekrar tekrar kullanılan polikarbonat biberonlardan BFA geçişi araştırıldığında, ilk kez kullanılan biberondan suya 40 °C'de 0,03 ppb, 95 °C'de 0,13 ppb konsantrasyonlarında geçiş ölçülmüştür. Altı ay boyunca kullanılan biberondan suya 40 °C'de 0,18 ppb, 95 °C'de 18,47 ppb konsantrasyonlarında geçiş ölçülmüştür. 80 °C üstü sıcaklıklarda ve üç aylık kullanımdan sonra suya geçen BFA miktarının arttığı belirtilmiştir (Nam ve ark., 2010).

Deterjan kullanımının polikarbonat biberonlardan BFA salınımını nasıl etkilediği araştırılmıştır. Beş deterjan çeşidinden sadece biri BFA salınımını etkilememiştir. En kötü durumda ise kontrol grubuna göre BFA salınımı beşyüz kata

kadar artmıştır. Çamaşır suyu kullanımının BFA salınımına bir etkisi olmadığı da tespit edilmiştir (Maia ve ark., 2009).

Çin'deki çocuk ve öğrencilerin idrarlarındaki NF, BFA ve triklosan seviyeleri ölçülmüş, öğrencilerin % 100'nde rastlanan NF ve BFA'nın geometrik ortalamaları sırasıyla 15,92 µg/g kreatin (17,40 µg/L) ve 2,75 µg/g kreatin (3,00 µg/L) değerlerinde bulunmuştur. Plastik bardak yerine seramik bardak tercih eden deneklerin BFA değerleri istatistiksel olarak daha düşük belirlenmiştir. Ayrıca günlük hayatta polikarbonat şişeleri kullanmanın ve şişelenmiş su içmenin BFA alımını ve dolayısıyla idrardaki BFA oranını arttırdığı belirlenmiştir (Li ve ark., 2011).

Östrojenik bir endokrin sistem bozucusu olan BFA'nın kolostrumdaki (anne ağız sütündeki) miktarını tespit etmek amacıyla Japonya Shizuoka'da 101 sağlıklı kadın üzerinde çalışma yapılmıştır. Annelerden alınan örnekler incelendiğinde, BFA konsantrasyonunun 1-7 ng/ml aralıklarında olduğu belirlenmiştir. BFA konsantrasyonu 3,41±0,13 ng/ml değerlerinde anlamlı bulunmuştur (Kuruto-Niwa ve ark., 2007).

1.2.3. Bisfenol A'nın Karsinojenik Etkisi

BFA erkek ve dişi üreme hücreleri ile süt bezlerinde morfolojik ve fonksiyonel hasarlara yol açmaktadır. Bu hasarlar dölllenme oranını azaltırken, meme ve prostat kanserlerine de neden olabilmektedir (Maffini ve ark., 2006).

BFA ve NF'nin iyonik olmayan yüzey aktif maddesi ürünlerine parçalanarak östrojen reseptörü alpha (ER-α)'yi aktive ederek östrojen bağımlı gen ekspresyonuna

sebepler oldukları ve östrojene duyarlı meme kanseri hücreleri MCF7'nin büyümesini uyardıkları belirlenmiştir (Vivacqua ve ark., 2003).

Hormonal olarak aktif olan östrojenlere, özellikle BFA'ya, çevredeki oranlarına eşdeğer miktarlarda düşük dozlarda maruz kalmanın ratlarda, prostat kanserine yol açabilen kanser öncesi lezyon ve hormonal karsinogenezlerde artışa sebep olduğu gözlenmiştir (Ho ve ark., 2006).

Farelerde, karaciğer ve meme doku DNA'larında yapılan bir çalışmada, BFA uygulanan farelerin karaciğer dokusunda oluşan karsinojenik katımlar, kontrol grubuna göre 3,4 kat; meme dokusunda oluşan karsinojenik katımlar ise kontrol grubuna göre 4,7 kat daha fazla oluşmuştur. Karsinojenik DNA katımlarının hepsi tümöre veya diğer kronik dejeneratif hastalıklara dönüşmesine de, meme hücrelerindeki bu moleküler lezyonların göğüs karsinogenezine dönüşme potansiyeli taşımaktadır (Izzotti ve ark., 2009).

1.2.4. Bisfenol A'nın Embriyonik Etkisi

BFA'nın erken embriyonik gelişme ve üreme olgunluğuna etkilerini incelemek amacıyla medeka balığı (*Oryzias latipes*) üzerinde yapılan bir çalışmada, düşük seviyede BFA'ya yirmidört saat maruz kalmakla, erken embriyonik gelişmenin hızlandığı, buna karşılık yetişkin bireylerde vücut gelişiminin azaldığı, yumurtlama zamanının ve üreme olgunluğunun geciktiği ortaya çıkarılmıştır (Ramakrishnan ve Wayne, 2008).

Denizkestanesi embriyolarında ve gametlerinde BFA'nın 300 µg/L konsantrasyonunun spermiyotoksik ve embriyotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Çakal ve Parlak, 2007).

BFA'nın istiridyelerin embriyonik gelişimi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, döllenmiş yumurtalara dört ayrı konsantrasyonda BFA uygulanmış ve BFA'nın yumurtadan çıkışı azalttığı, gelişimsel bozuklukları arttırdığı ve larvanın metamorfoz davranışını baskıladığı görülmüştür (Zhou ve ark., 2011).

Mita ve ark. (2012), hamileyken BFA'ya maruz bırakılan Balb-C farelerinin yavrularının çeşitli dokularındaki BFA birikimini araştırmışlardır. Sonuç olarak dokulardaki BFA birikiminin, uygulanan BFA ile doğru orantılı olarak arttığını, cinsiyete göre birikim miktarının farklılaştığını, dişi yavruların ciğer ve kaslardaki BFA konsantrasyonunun erkek yavrulara göre daha fazla olduğunu, erkek yavruların merkezi sinir sistemindeki BFA konsantrasyonunun dişi yavrulara göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Yetişkin, yenidoğan ve cenin halindeki Sprague-Dawley farelerin çeşitli dokularındaki BFA dağılımı araştırıldığında, cenin dokularındaki aglikon BFA konsantrasyonlarının annedeki ve yenidoğandakilerle benzer olduğu ve ceninin BFA'ya maruz kalmasının risklerini azaltma açısından cenin döneminin kritik olduğu belirlenmiştir (Doerge ve ark., 2011).

Uterus içerisinde BFA'ya maruz kalmanın yavruların doğum ağırlıklarına olan etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak çalışma alanlarında ebeveynlerin BFA'ya maruz kalması durumunda doğum ağırlıklarının azaldığı belirlenirken, hamilelik döneminde maruz kalmanın doğum ağırlıklarıyla ilişkisi daha kuvvetli olarak belirtilmiştir. Hamilelik döneminde daha yüksek dozlarda BFA'ya maruz kalma durumunda bebeklerin doğum ağırlıklarında daha büyük azalmalar olduğu da tespit edilmiştir (Miao ve ark., 2011).

Ergenlik döneminde BFA'ya maruz bırakılan farelerdeki davranışlar incelendiğinde, kontrol grubundakilere göre, BFA'ya maruz bırakılan dişi farelerdeki araştırma ve kaygı davranışlarının değiştiği gözlenmiştir. Sonuç olarak ergenlik döneminde BFA'ya maruz kalmanın dişilerde erkeksileşmiş sosyal ve duygusal davranışlar oluşturabileceği ifade edilmiştir (Yu ve ark., 2011).

BFA potansiyel olarak plasental ve fetal gelişimi olumsuz yönde etkileyecek şekilde plasental olarak taşınabilmektedir (Mørck ve ark., 2010).

Lee ve ark. (2008), hamile kadınlardaki ve fetüslerdeki BFA miktarlarını tespit etmişlerdir. Hamile kadınlarda kandaki BFA konsantrasyonu 66,48 µg/L'ye, göbek kordonunda ise 8,86µg/L'ye kadar değişen oranlarda bulunmuştur.

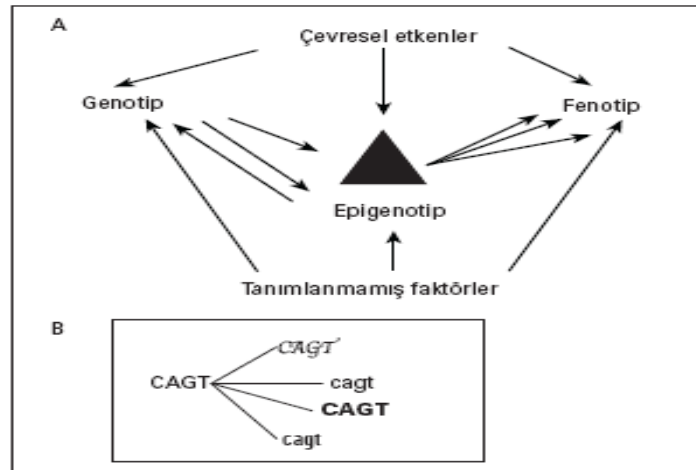
1.2.5. Bisfenol A'nın Mutajenik Etkisi

BFA'nın ratlar üzerindeki mutajenik etkileri araştırılmış ve BFA'ya maruz kalmanın polikromatik eritrositlerin mikroçekirdek sayısında bir artışa, kemik kıkırdak hücrelerinde yapısal kromozom farklılıklarına ve kan lenfositlerinde DNA hasarına yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca plazma içindeki 8- hidroksi deoksiguanozin seviyesinde bir artış ve rat karaciğerlerindeki glutatyon aktivitesinde de bir azalma saptamışlardır. Sonuçta BFA'nın mutajenik olmadığını ama genotoksik aktivite gösterdiğini ifade etmişlerdir (Tiwaria ve ark., 2012).

Endokrin yıkıcı maddelerin, hormon etkisinde değişikliğe sebep olarak prostat kanserinin oluşmasında ve gelişmesinde önemli biyolojik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Hess-Wilson ve Knudsen, 2006).

1.3. Epigenetik

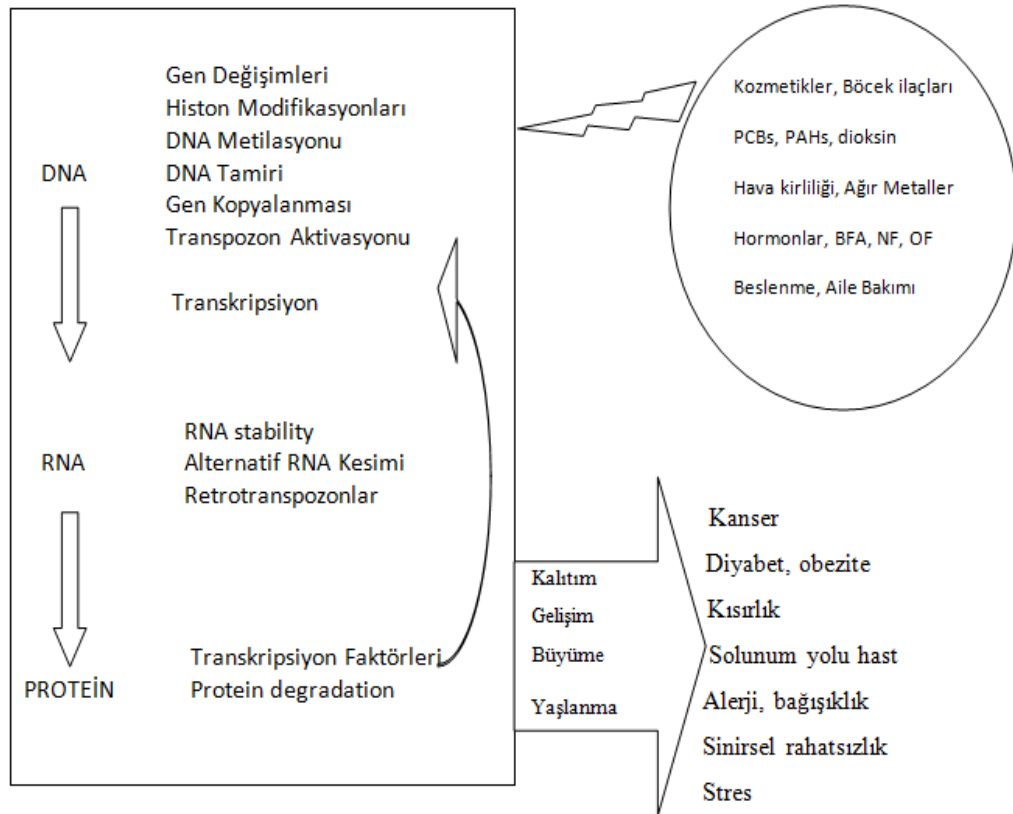
DNA dizilerinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen anlatımında oluşan istikrarlı ve kalıtsal değişimler epigenetik olarak tanımlanır. Diğer bir deyişle, genetik yapısı değişmeden, gen ifadesinde değişiklik olan fenotipik varyasyonları incelemektedir. Şekil 1.11’de genetik ve epigenetiğin şematik gösterimi görölmektedir (Bora ve Erdem, 2007). Bu değişiklikler hücreyi ya da organizmayı doğrudan etkilemektedir ancak DNA dizisinde hiç bir değişiklik gerçekleşmemektedir (Bird, 2007).



Şekil 1.10. Genetik ve Epigenetiğin şematik gösterimi (Bora ve Erdem, 2007).

Sağlıklı ya da hastalıklı tüm bireyler genleriyle ve çevrenin etkisiyle şekil alır. Şekil 1.12.’de şematize edildiği gibi, tıbbi ürünler, böcek ilaçları, hava kirliliğine sebep olan maddeler, endüstriyel kimyasallar, ağır metaller, hormonlar, beslenme ve davranış gen ekspresyonunu, daha geniş olarak gen düzenleme mekanizmalarını değiştirebilirler. Gen düzenleme mekanizmaları gen translokasyonunu, histon modifikasyonlarını, DNA metilasyonunu, DNA onarımını, transkripsiyonu, RNA nın istikrarını, alternatif RNA eklenmesini, protein bozunmasını, gen kopyalanmasını ve transpozon aktivitelerini içermektedir. Ayrıca gen düzenlemesinde kimyasal olarak meydana gelen değişimler insanlarda kanser, şeker hastalığı, obezlik, kısırlık,

solunum yolu hastalıkları, alerji, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif ciddi hastalıklarla ilişkilendirilir. Gen düzenlemesinin en iyi çalışılmış alanlarından biri de epigenetiktir, özellikle de DNA metilasyonudur (Edwards ve Myers, 2007).



Şekil 1.11. Çevresel Etkenlerin Gen Düzenleme Mekanizmasına Etkisi (Edwards ve Myers, 2007).

1.3.1. Nonilfenol ve Bisfenol A'nın Epigenetiğe Etkisi

Günümüzde, epigenetik, DNA dizilimini değiştirmeyen ama mitotik ve nesiller arası kalıtılan gen yapısındaki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik, organizma genotipinin fenotipini oluşturmak için çevreyle ilişkiye

girmesi ve birebir genetik bilgilere rağmen bireysel varyasyonlara ve hücrelerdeki, dokulardaki ve organlardaki farklılıklara bir çerçeve oluşturması demektir. Temel epigenetik mekanizmalar histon modifikasyonu, DNA metilasyonu ve RNA'ların kodlanmaması(sessizleştirilmesi)dır. Sentetik kimyasalların kullanımının, tıptaki müdahalelerin, çevresel kirleticilerinin ve yaşam tercihlerinin hızla artması erken gelişim dönemindeki programlanmış adaptif değişikliklerin uygulanmasında karışıklığa yol açabilir ve bazı hastalıkların artışını açıklayabilir (Tang ve Ho, 2007).

Antijenle uyarılmış fare T-hücreleri üzerinde; BFA, NF ve OF'nin T hücrelerinin allerjik duyarlılığını arttırdığı, interleukin-4 (IL-4)'te mRNA seviyelerinde bir artış şeklinde ölçülerek gösterilmiştir (Lee ve ark., 2003,2004). Fare ve insanlardaki IL-4 promoter düzenleyici geni, aktive edilmiş T-hücrelerin nükleer faktörü adı verilen transkripsiyon faktörü için çok sayıda bağlanma bölgesi içermektedir (Lee ve ark. 2004). BFA, OF ve NF'nin, kalsiyum bağımlı kalsinerin sinyal yolunu uyararak IL-4 üretimini arttırdığı görülmüştür. Bu olay sitoplazmik NF-AT'nin, transkripsiyon faktörünün çekirdeğe translokasyonu ile defosforilasyonuna sebep olmaktadır. Lee ve ark. (2003, 2004) çekirdekteki NF-AT konsantrasyonunun artmasının; BFA, NF ve OF'ye maruz kaldığı gözlenen T-hücrelerinin allerjik cevabına sebep olan, IL-4 transkripsiyonunu arttırdığını akla getirdiğini belirtmiştir.

Avcı ve ark. (2010), NF'nin Japon bıldırcınlarında BW ve EP gibi büyüme parametreleri üzerinde ve lipid peroksidasyonu ve vitamin seviyeleri gibi antioksidan sistem parametreleri üzerinde anormal etkileri olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca NF, C vitamini sentezlemesini tetiklediği için ve C vitamini NF'nin oksidatif etkilerini arttırdığı için, NP'ye maruz kalma kuşlar için oldukça zararlıdır.

Endokrin bozucuların çevreyle ilişkili bağışıklık sistemi düzenleyici hücre tipi olan insan dendritik hücrelerinin fonksiyonlarını düzenlediği hipotezi test edilmiş, araştırma sonuçlarına göre NF ve OF'nin miyeloid dendritik hücrelerdeki östrojen reseptörlerinde, MKK3/6-p38 MAPK sinyal yollarında ve histon

modifikasyonlarında, t-hücrelerindeki sitokin cevapları üzerinde fonksiyonel etkileri olduğu belirtilmiştir (Hung ve ark., 2009).

BFA'ya maruz kalan insan endometriyal endotel hücrelerinin gen ifadesi analizi üzerinde çalışılmış, BFA'nın bu tip hücrelerin çoğalmasını azalttığı ve bazı genleri (SPBC25, SGOL2 ve CDCA8) değiştirdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak BFA'nın hücre çoğalmasını azalttığı ve hücre ölümlerini arttırdığı belirtilmiştir (Bredhult ve ark., 2009).

NF'nin bağışıklık sistemi üzerine etkileri incelendiğinde, NF'nin hücre sel niteliği azalttığı, apoptotik ölümleri tetiklediği ve Fas ve FasL mRNA ifadelerini geliştirdiği rapor edilmiştir (Yao ve ark., 2005).

BFA'nın kendi kendini dölleyen balıklarda (*Kryptolebias marmoratus*) cinsiyet değişikliği genleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, BFA'nın cinsiyet farklılaşma sürecini ve steroid oluşturma genlerini etkilediği belirlenmiştir (Rhee ve ark., 2011).

Sinir büyüme faktörü üzerine yapılan araştırma sonucunda BFA'nın morfolojik değişiklikler yaparak hücre farklılaşmasını tetiklediği belirtilmiştir (Seki ve ark., 2011).

Huang ve Leung (2009) yaptıkları çalışmada BFA'nın plasental hücrelerdeki CYP'yi baskılayarak östrojen sentezlenmesini azalttığını belirlemişlerdir.

Zama ve Uzumcu (2010) yaptıkları çalışmada oosit içerisindeki epigenetik mekanizmayı doğrudan etkileyebilen endokrin bozucu kimyasalların nesiller arası aktarılan epigenetik etkileri olabileceğini rapor etmişlerdir.

Bu araştırmalar çevresel faktörlerin moleküler mekanizmadaki çeşitli dizileri nasıl etkilediğini ve hastalık riskini nasıl arttırdığını göstermektedir. Bu alışmalar genomik reaksiyon ve çevresel uyarıcılara cevap adaptasyonları konusunda bilgi vererek, genomun esnekliği ve düzenlenmesini incelemektedir. Ayrıca, insan aktiviteleri sonucunda doğaya yerleştirilen kimyasallar hakkında ve bunların gen ekspresyonunu değiştirerek hastalık oluşturabileceği konusunda doğrudan kanıtlar sunmaktadır. Özeldeki epigenetik çalışmalar yetişkin hastalıklarının fetal kökenlerinin anlaşılması konusunda daha ileri öngörüler sunarken, aynı zamanda kazanılan ve potansiyel olarak kalıtılabilen genetik varyasyon ve hastalık yatkınlıklarını inceleyerek yeni çalışma alanları oluşturmaktadır (Edwards ve Myers, 2007).

1.4. Gamet Fizyolojisi

1.4.1. Nonilfenol'ün Gamet Fizyolojisine Etkisi

Han ve ark. (2004), NF'nin erkek ratların üreme sistemleri üzerinde toksik etkisini araştırmış ve 250 mg/kg/gün NF uygulanan ratlarda epididimis ağırlığının azaldığını, böbrek ve karaciğer ağırlıklarının arttığını tespit etmişlerdir. Hossaini ve ark. (2001) erkek ratlarda doza bağlı NF'ye maruz kalmanın epididimisin mutlak ağırlığını azalttığını belirtmişlerdir. NF'nin aynı zamanda sperm yoğunluğunda ve testosteron seviyelerinde azalmalara neden olduğu da tespit edilmiştir. NF'ye maruz kalan tüm gruplarda lüteinleştirici hormon (LH) ve follikül uyarıcı hormon (FSH) seviyelerinde artışlar görülmüştür. Ayrıca, NF uygulanan gruplardaki ratların testislerindeki apoptotik hücre sayılarında doza bağlı oranlarda artışlar tespit edilmiştir (Han ve ark., 2004).

Tanaka ve Grizzle (2002) hermafrodit balıklardaki (*Rivulus marmoratus*) gonadal değişimler üzerinde NF'nin etkisini inceledikleri araştırma sonucunda NF uygulanan balıklarda testis ile ilgili dokuların oluşmadığını ve oogenezin anlamlı bir şekilde engellendiğini belirlemişlerdir.

Somon balıkları üzerinde yapılan araştırmada, NF'nin gonadal steroid oluşturma yapısında değişiklikler oluşturduğu belirtilmiştir (Kortner ve ark., 2009).

1.4.1.1. Nonilfenol'ün Spermatazoa Üzerine Etkisi

Uğuz ve ark. (2009), NF'nin epididimal rat spermi üzerine etkisini inceleyen çalışmalarında, akrozomal bütünlüğü etkileyerek, NF'ye bağlı sperm hareketliliğinde azalma, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma ve sperm fonksiyonlarının yok olmasında önemli bir role sahip olduğunu belirtmişlerdir.

AF'lerin TM4 Sertoli hücrelerinde (sperm olgunlaştırma hücreleri) Ca^{+2} intrasellüler seviyesinde normal olmayan yükselmelere ve mitokondrileri depolarize ederek hücre ölümüne neden oldukları tespit edilmiştir (Michelangeli ve ark., 2008).

OF'nin farelerde testis ve seminal keselere olan etkilerini araştırılmış, yetişkin erkeklere uzun ve kısa ışık periotlarında tutularak otuz veya altmış gün boyunca 200 mg/kg OF oral yolla verilmiştir. Otuz gün boyunca verilenlerde ayırt edilebilir fark gözlenmemiştir. Altmış günlük uygulamalarda testislerin ve seminal keselerin ağırlılığında ve dokusunda farklılıklar gözlenmiştir. Bu dokularda 3β -hidroksisteroid dehidrogenaz, androjen reseptör ve testesteron seviyeleri azalırken, aromataz ve östrojen reseptör α seviyeleri artmıştır. Bu değişiklikler uzun ışık periodunda tutulan farelerde daha belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Bununla birlikte uzun süreli OF'ye

maruz kalmanın androjen ve östrojen sentezini ve faaliyetlerini bozduğunu göstermişlerdir (Hejmej ve ark., 2011).

Prenatal dönemde OF'ye maruz kalan erkek ratların testis, epididimis ve sperm kesesi endekslerinde kontrol grubuna göre azalmalar belirlenmiştir. Aynı zamanda epididimal sperm sayısı, canlı sperm ve hareketli sperm sayıları da kontrol grubundaki ratlara göre daha düşük bulunmuştur (Sainath ve ark., 2011).

NF'nin rat leydig hücrelerinde testesteron salgılanmasına etkisi araştırılmıştır. Rat plazmasına NF (100 µg/kg) enjekte edildikten sonra, belli aralıklarla plazmadaki testesteron konsantrasyonu ölçülmüştür. Rat leydig hücrelerinin testesteron yapımına etkisini değerlendirmek için değişik NF konsantrasyonlarının (4,25–127,5 µM) etkisi incelenmiştir. NF'nin hCG ile uyarılmış plazma testesteronunda azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. In vitro çalışmalar 127,5 µM NF'nin testesteron salınımını uyarırken, StAR ve P450 SCC proteinlerinin seviyesini ve aktivitelerini arttırdığını göstermiştir (Wu ve ark., 2010).

NF Japon yılan balıklarında spermatogenezi engelleyerek, Sertoli hücrelerini etkilemektedir (Miura ve ark., 2005). Gong ve Han (2006) yaptıkları çalışmada düşük mikromolar konsantrasyonlardaki NF'nin rat sertoli hücreleri üzerinde ters oksidatif strese neden olabileceğini belirlemişlerdir. NF'nin sertoli hücreleri üzerinde morfolojik değişikliklere sebep olabileceği ve hücre ömrünü azalttığı belirlenmiştir. Aynı zamanda NF'nin sertoli hücreleri üzerinde, apoptozisde önemli rol oynayan ER stresi oluşturabileceği de belirtilmiştir (Gong ve ark., 2009).

NF, erkek ratlarda spermatogeneze zarar verirken, epididimal sperm üzerinde de toksik etki göstermektedir (Aly ve ark., 2012).

1.4.1.2. Nonilfenol'ün Oosit Üzerine Etkisi

NF uygulanan ratlarda ovaryum ağırlığının, ovaryum ve korteks hacminin, antral ve graff follikül sayılarının azaldığı; atretik follikül sayısının ise arttığı belirlenmiştir (Mehranjani ve ark., 2010).

Mohamed ve ark. (2011) domuz spermi üzerine yaptıkları araştırmada OF'nin (genisteine göre daha az olsa da) spermin dölleme yeteneğini ve akrozom reaksiyonunu olumsuz yönde etkilediğini belirlemişlerdir.

Kortner ve Arukwe (2007), Atlantik morina balıkları üzerinde yaptıkları araştırma sonucunda NF'nin teleostlarda maturasyon ve oosit büyümesi üzerine, steroid oluşumunu bozmak ve hormonal dengesizlik yaratmak gibi alışılmışın dışında etkileri olduğunu belirlemişlerdir.

1.4.2. Bisfenol A'nın Gamet Fizyolojisine Etkisi

İnsan üreme sisteminde çeşitli endokrin bozucu kimyasalların etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmada folliküler sıvının yanında fetal serumda ve amniyotik sıvıda da BFA'ya rastlanmıştır. Bu sebeple BFA'nın plasenta üzerinden geçiş yaptığı belirtilmiştir (Tsutsumi, 2005).

Salian ve ark. (2009) perinatal dönemde BFA'ya maruz kalan yavru erkek ratların üreme sistemleri üzerine yaptıkları araştırmada, BFA'nın sadece 1.kuşak yavrularda değil; 2. ve 3. kuşak yavrularda bile üremeyi engelleyebilecek şekilde üreme sisteminde bozulmalara yol açabileceğini belirlemişlerdir.

BFA'nın sperm kalitesini azalttığı ve sperm oluşumunu yavaşlattığı belirlenmiştir. Aynı şekilde dişilerde BFA'nın yumurtlama zamanını geciktirdiği hatta yüksek dozlarda yumurtlamayı engellediği gözlemlenmiştir (Lahnsteiner ve ark., 2005).

1.4.2.1. Bisfenol A'nın Spermatazoa Üzerine Etkisi

Chitra ve ark (2003) BFA'nın ratların üreme sistemi üzerine etkilerini inceledikleri araştırmada, BFA'ya maruz kalan ratların testis ve epididimlerinin ağırlığının azaldığını ve epididimal sperm motilitesinde ve sperm sayısında doza bağlı olarak azalmalar olduğunu belirlemişlerdir. Sonuçta BFA'nın antioksidan savunma sisteminin tükenmesine yol açabileceğini ve ratların epididimal spermlerinde oksidatif stres oluşturabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Hatef ve ark. (2012) çevredeki ile aynı oranda dozlardaki BFA'nın erkek japon balıklarının üreme psikolojisi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta BFA'nın sperm maturasyonunu etkileyen, testislerdeki steroid oluşumu yapısını değiştirerek sperm motilitesi ve velositesi (hızı) üzerine ters etkiler oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Nakamura ve ark. (2010) BFA ve estradiyolün erkek ratlardaki üreme sistemleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Her iki madde de plazma ve testislerdeki testesteron seviyesi ve plazma LH seviyesi üzerinde azaltıcı etki göstermiştir. Aynı zamanda steroidojenik enzimler ve Leydig hücrelerindeki kolesterol taşıyan proteinlerde de azalmalar gözlenmiştir.

Tan ve ark (2003), NF ve BFA'nın erkek ratlardaki ergenlik gelişimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. İki maddenin de başlangıçtaki ergenlik gelişiminde gecikmelere ve testislerle ilgili yapılarda bozulmalara yol açtığı gözlenmiştir. Bununla birlikte ratların çoğunda sperm oluşumu etkilenmemiştir. BFA aynı zamanda böbreklerde büyümeye ve hidronefroza yol açmıştır. NF ve BFA'nın karışım olarak uygulandığı grupta ters etkiler daha az gözlenmiştir.

1.4.2.2. Bisfenol A'nın Oosit Üzerine Etkisi

Lenie ve ark. (2008) BFA'nın in vitro follikül gelişim üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında, in vitro ortamda 3µM den 30 µM'a kadar BFA'ya maruz kalan fare oositlerinde follikül gelişimi ve olgunlaşması kontrol edilmiştir. 30 µM'a maruz kalan oositlerde belli belirsiz bir granuloza hücre oluşumu ve düşük düzeyde östrojen üretimi görülmüştür.

Peretz ve ark. (2011) otuziki günlük farelerde yaptıkları çalışmada postnatal dönemde BFA'ya maruz kalmanın antral follikül büyüklüğü ve steroid oluşumu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda BFA'nın follikül büyüklüğünü ve progesteron, dehidroepiandrosteron, androstenediyon, estrone, testosteron, estradiol gibi hormonların oluşturulmasını kısıtladığını belirlemişlerdir. Aynı zamanda BFA'nın ovaryumdaki estradiyol biosentezleme işlemini etkilediğini de ileri sürmüşlerdir.

Baek ve ark. (2007) BFA'nın kaya balıklarındaki oosit maturasyonu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda 0,82–0,86 mm çapındaki oositlerin BFA'ya karşı daha duyarlı olduklarını, 0,86–0,90 mm çapındaki oositlerde BFA'nın görülebilir bir etkisi olmadığını belirlemişlerdir.

Mlynarcikova ve ark. (2009) çeşitli endokrin bozucu maddelerin mayotik maturasyona, hücre yığını genişlemesine, progesteron ve hyaluronan sentezlenmesine olan etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonunda BFA'nın oositlerdeki mayotik maturasyonu etkilediğini belirtmişlerdir. Kontrol grubuna göre BFA uygulanan metafaz II seviyesine geçen oosit sayısında azalmalar olduğu görülmüştür. BFA'nın oosit-hücre yığını (cumulus) kompleks yapısı tarafından üretilen progesteronu da etkilediği belirtilmiştir.

1.5. Tez Çalışmasının Konusu

Çevre kirliliği günümüzün en önemli sorunları arasındadır. Çevrede bulunan toksik maddelerin birçoğunun kanserojen olduğu ortaya konmuştur (Nimrod ve Benson, 1996). Hormon etkisi gösteren çevre kirleticilerinin, son elli yılda erkeklerde sperm sayısı ve kalitesini düşürdüğü literatürde rapor edilen bulgular arasındadır. Ayrıca hem erkekte hem dişide infertilite yaptığı da rapor edilmiştir. Ancak sperm ve oosit gibi gamet hücrelerine bu maddelerin etki mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. NF'nin balık, rat ve sığır spermleri üzerine etkileri hakkında sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Ancak, NF'nin oosit olgunlaşması üzerine etkisi hakkında hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca BFA'nın da sığırlarda sperm ve oosit üzerine etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, NF ve BFA'nın sığırlarda sperm DNA'sı ve oosit olgunlaşması üzerine olan etkileri in vitro olarak araştırılmıştır. NF ve BFA'nın sığır spermlerinde DNA kırılmalarına neden olarak spermisidal etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla "Terminaldeoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling" (Tunel) Assay uygulanmıştır.

NF ve BFA'nın sığır spermelerine etkisi Tunel boyama uygulandıktan sonra apoptotik hücre sayısı ve apoptotik hücre yüzdesi ile tespit edilmiştir.

NF ve BFA'nın sığırlarda oosit olgunlaşmasına etkisi ise 18-22 saatlik inkübasyon sonucunda oluşan kutup hücresi takip edilerek belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Materyaller ve Solüsyonlar

Çalışmada kullanılan 4-Nonilfenol ve Bisfenol A, Aldrich (Southampton, UK); DMSO (dimethyl sulfoxide) (C₂H₆OS) ve hidrojen peroksit (H₂O₂), Merck (Merck & Co., Inc., Darmstadt, Germany); Triton –X 100, PBS tabletleri, salin imidazol, polilizin ve formaldehit (% 10'luk), Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); Proteinaz –K, Zymed (Zymed, San Francisco, California, USA); TUNEL enzim, TUNEL Label ve TUNEL Dilution Buffer, Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ve Mounting medium, Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) firmalarından satın alınmıştır.

2.1.1.1. Sulandırma Solüsyonları

Sperm sulandırıcı;

Triss (Sigma, Cas no: 77-86-1)	27,1 g
Sitrik asit	14 g
Fruktoz	10 g
Penisilin	0,3 g
Streptomisin	0,4 g

üzeri 100 ml distile suyla tamamlanarak karıştırılmıştır. Daha sonra % 20'si atılıp üzerine yumuta sarısı eklenerek karıştırılmıştır.

2.1.1.2. Fizyolojik Tuz Çözeltisi

Mezbahalardan et üretimi için kesilen dişi sığırların ovaryumları 30 ± 2 °C'deki fizyolojik tuz çözeltisi (% 0,9 NaCl) içeren termoslarla laboratuara taşınmıştır.

2.1.1.3. TL-HEPES Solüsyonu (Yıkama Medyumu)

Oositler 10-15 ml TL-Hepes içeren 50 ml'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Oositleri içeren TL-HEPES solüsyonu petri kutuları içerisine alınarak, oositler steromikroskoplar altında incelenmiş ve kumulus hücreleri bozulmamış olan oositler deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir. TL-HEPES solüsyonu; stok solüsyona 3 mg / ml BSA (Bovine Serum Albumin), 10 µl / ml piruvat ve 0,5 µl / ml gentamisin eklenerek hazırlanmıştır.

2.1.1.4. Oosit Olgunlaştırma Solüsyonu (Maturasyon Medyum)

Maturasyon Medyum

TCM-199 (Tissue Culture Medium-199; Sigma Cas no: M5017)	4,5 ml
FCS (Fötal Buzağı Serumu; Sigma Cas no: F9665) (30 dk 60 °C)	0,5 ml
0,2 mM piruvat solüsyonu	50 µl
5 µg / ml LH (0,023 birim,)	10 µl
0,5 µg / ml FSH (0,02 birim)	2,5µl
Gentamisin (50 mg / ml) 25µg / ml final	2,5µl

Seçilen oositler TCM-199 içeren olgunlaştırma solüsyonu içerisine konulmuş; 39°C'de, % 5 CO₂ içeren karbondioksitli etüvde 18-22 saat inkübe edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Biyolojik Materyaller

2.1.2.1. Sığır Spermisi

Yapılan bir çalışmada, en az üç değişik boğadan alınan spermle yapılan deneylerin istatistiksel olarak anlamlı sonuç verdiği bildirilmektedir. Bu nedenle, üç farklı boğadan alınan taze sperma kullanılmıştır (Parrish ve ark., 1994).

2.1.2.2. Sığır Oositi

Çalışmada, mezbahalarda kesilen dişi sığırların ovaryumlarından laboratuvar ortamında elde edilen oositler kullanılmıştır.

2.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Araçlar

2.1.3.1. Karbondioksitli Etüv

İn vitro koşullarda 50x10⁶ /ml konsantrasyondaki sığır spermi farklı konsantrasyonda NF ve BFA ihtiva eden Sperm-TL solüsyonları içerisinde, 39°C'de , % 5 CO₂ içeren karbondioksitli ortamda dört saat inkübe edilmiştir.

Ayrıca, farklı konsantrasyonlarda NF ve BFA ilave edilmiş TCM-199 içeren olgunlaştırma solüsyonu damlası içerisine konan oositler 39 °C'de, % 5 CO₂ içeren karbondioksitli etüvde 18-22 saat inkübe edilmiştir.

2.1.3.2. Floresan Mikroskop

Tunel boyama tekniği ile boyanan spermlerin, fotoğraf çekme ve sayım işlemleri, floresan ataçmanlı ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop (Olympus, BX51) altında yapılmıştır.

2.1.3.3. Stereo mikroskop

TL-HEPES solüsyonu bulunan petri kutuları içindeki oositler, stereo mikroskop altında incelenmiş ve kumulus hücreleri bozulmamış olan oositler deneyde kullanılmak üzere seçilmiştir. İnkübasyondan sonra kutup hücreleri görülen oositler stereo mikroskopta belirlenip kamera ile fotoğraflanmıştır.

2.2. Metot

2.2.1. NF ve BFA'nın Sığır Spermlerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

İn vitro koşullarda 50×10^6 /ml konsantrasyondaki sığır spermi, kontrol; solvent kontrol (DMSO; % 0,01); 0,01; 0,1; 1; 10 ve 100 µg NF /ml ve kontrol; solvent kontrol (DMSO; % 0,01); 0,01; 0,1; 1; 10 ve 100 µg BFA/ml konsantrasyonları

ihtiva eden solüsyonların içerisinde, 39 °C'de, % 5 CO₂ içeren etüvde dört saat inkübe edilmiştir.

2.2.1.1. NF ve BFA içeren konsantrasyon gruplarının hazırlanması

DMSO ile 1 g NF/10 ml ve 1 g BFA/10 ml konsantrasyonunda karıştırılarak stok solüsyon elde edilmiştir. Stok solüsyonundan da 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg NF/ml ve 0,01; 0,1; 1; 10 ve 100 µg BFA/ml konsantrasyonlarda solüsyonlar hazırlanmıştır. Solüsyona eklenen DMSO miktarı toplam hacimin % 0,01'i kadardır. NF ve BFA içermeyen solvent kontrol grubuna da aynı oranda DMSO eklenmiştir.

2.2.1.2. Spermilerin Hazırlanması

Taze toplanan sperma ml'de 50×10^6 olacak şekilde sulandırılmıştır. Her konsantrasyon grubu için bir tüp hazırlanıp, içine 50×10^6 /ml konsantrasyondaki sıgır sperminden 0,5 ml konulmuştur. Üzerlerine her konsantrasyondan 5'er µl NF ve BFA solüsyonu eklenmiştir. Daha sonra tüpler 39°C'de, % 5 CO₂ içeren etüvde dört saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası sperma 1'e 2 oranında PBS ile sulandırılmıştır. Sonra 5000 devirde 5 dk santrifüj edilerek yıkanmıştır ve üstte kalan kısım atılarak sperma ilk hacmine (0,5 ml.) getirilmiştir. Daha sonra üzerine 1,5 ml PBS eklenmiş ve 5000 devirde 5 dk santrifüj edildikten sonra, üstteki kısım atılıp, altta kalan kısım 0,5 ml'ye kadar salin imidazol (cat no:10125) ile tamamlanmıştır. Polilizin kaplı lamaların alt kısmında daire çizilerek inceleme yapılacak alan tespit edilmiştir. Bu alana 5-10 µl sperm örneği, üzerine de 2-3 damla PBS damlatılmıştır. Bir gece buzdolabında bekletildikten sonra ertesi gün fazla sıvı dökülerek preparatların üzerine % 10'luk formaldehit konarak 20 dakika (dk) bekletilmiştir. Daha sonra PBS ile üç sefer yıkanmış ve kurutularak incelenmek üzere buzdolabına kaldırılmıştır.

2.2.2. DNA Hasarının Belirlenmesi

2.2.2.1. Tunel Boyama Tekniği

Tunel boyama, DNA hasarını hücre içersinde belirlemek için kullanılan, en bilinen yöntemlerden biridir (Gavrieli ve ark., 1992). DNA kırılmaları apoptozisin karakteristik bir özelliğidir. Tunel boyama, DNA kırılmalarını saptamada uygulanan bir metottur (Arends ve ark., 1990). Bu metotta, TdT enziminin katalize ettiği bir reaksiyonla tek veya çift zincir DNA kırıklarına dUTP birleştirilir ve bu DNA kırıkları işaretlenir. İşaretlenen bu kırıklar ışık mikroskopisi, floresan mikroskopi ya da akım sitometrisi ile ölçölür (Gorczyca ve ark., 1993). Sonrasında boyanan spermler toplam sperm miktarına oranlanır.

Çalışmada üç ayrı boğadan alınan taze sperma ve farklı konsantrasyonlardaki NF ve BFA ile hazırlanan preparatlar üç defa PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra yuvarlakları kapatacak şekilde proteinaz K ilave edilerek 10 dk beklenmiştir. Proteinaz K dökölüp üç defa PBS ile yıkandıktan sonra içinde H₂O₂ (64 ml distile su ile 6 ml H₂O₂) bulunan dik şalede 10 dk bekletilmiştir. şaleden çıkarılan preparatlar tekrar PBS ile yıkanarak küvetin üstüne alınmıştır. 2 ml'lik eppendorf tüpte, 1000 µl distile suya 1 µl triton-X 100 eklenip vortekslenerek hazır hale getirilmiştir. Küvetin üzerindeki preparatların yuvarlakların dışındaki alan peçete ile kurulanıp buz kalıpların üzerine alınmış, üzerine yuvarlakları kapatacak şekilde % 0,1'lik triton-X 100 solüsyonu eklenerek 5 dk beklenmiştir. Sonra üç kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra pozitif kontrol için spermlere DNase (1 mg/ml) uygulanarak, dışı aliminyum folyo ile sarılmış preparat kutusu içinde etüvde 10 dk bekletilmiştir. DNAz pozitif olan preparat etüvden çıkartılıp üç kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra hepsinin fazla suyu yuvarlağın içine değmeden alınarak, 20 µl dilüsyon çözeltilisi, 10 µl tunel enzimi ve 90 µl.tunel label içeren tunel karışımı yuvarlakları kapatacak şekilde eklenmiştir.

Sonra hepsini folyoyla sarılı preparat kutularına koyup (pozitif kontrol ayrı petri kutusunda) 37 °C de bir saat bekletilmiştir. Bu işlemi takiben karanlık ortamda üç kez PBS ile yıkanmıştır. Yuvarlaklar kalacak şekilde kurularak üzerine bir damla mounting medyum damlatılıp lamel ile kapatılmış ve floresan mikroskofta sperm hücreleri sayılmıştır.

2.2.3. NF ve BFA'nın Oosit Olgunlaşmasına Etkisi

NF ve BFA'nın oositlerin olgunlaşmasına etkisinin belirlenmesi amacıyla kontrol; solvent kontrol; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg NF /ml ve kontrol; solvent kontrol; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg BFA /ml final konsantrasyonları hazırlanmıştır. Maturasyon damlalarına aktarılan oositler 39 °C'de % 5 CO₂'li ortamda 18-22 saat boyunca inkübe edilmiştir.

2.2.4. İn vitro maturasyon (IVM)

Ovaryumlar mezbahadan ve 30±2°C'de % 0,9 NaCl içeren termoslarda laboratuvara taşınmıştır. Daha sonra 30 °C'de musluk suyuyla yıkanmış ve oositler 2-8 mm'lik follüküllerden 18 gauge'luk iğnelerle vakum sistemi kullanılarak toplanmıştır. Toplanan follüküler sıvı 100 mm'lik petri kaplarında stereomikroskop altında oda ısısında incelenmiştir. Oositlerden en az üç sıra kumulus hücre katmanına ve homojen stoplazmaya sahip olanlar seçilerek üç kez TL-HEPES'te yıkanmış, mature edilmek üzere her on oosit mineral yağ ile kaplanmış 50 µl'lik tissue culture medium-199 (TCM-199) damlalarına aktarılmıştır. Maturasyon damlalarına aktarılan oositler 39 °C'de % 5 CO₂'li ortamda 18-22 saat boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda kutup hücresi gözlemlenerek mature olan oositlerin oranı belirlenmiştir.

2.2.5. İstatistik Analiz

Bu araştırmada, elde edilen veriler tek yölü varyans analizi ile (one-way ANOVA), SPSS (versiyon 17.0) paket programında karşılaştırılmıştır. Gruplar arası farkı belirlemek amacıyla Tukey Testi uygulanmıştır. İki grup arasındaki farkları belirlemek amacıyla t testi analizi gerçekleştirilmiştir. Örneklem sayısının az olması sebebiyle Anova yerine Kruskal-Wallis H, t testi yerine de Mann-Whitney U analizleri uygulanmıştır. Sonuçların birbirine yakın olması ve ortalamaların gösterilerek, karşılaştırma yapılabilmesi için çalışmada ANOVA ve t testi sonuçlarına yer verilmiştir. Oosit deneylerinde bunlara ek olarak, uygulanan NF ve BFA miktarının olgunlaşma yüzdesini etkileme derecesini belirlemek amacıyla Spearman korelasyon analizi, SPSS (versiyon 17.0) paket programında yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. NF ve BFA'nın Sperm Üzerine Etkileri

NF ve BFA'ya bağlı meydana gelebilecek DNA hasarları TUNEL assay kiti kullanılarak tespit edilmiş ve sonuçlar floresan mikroskop altında incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1. NF'nin spermler üzerindeki apoptotik hücre yüzdeleri.

Boğa no	Konsantrasyon	Hücre sayısı	Apoptotik hücre sayısı	Apoptotik hücre yüzdesi (%)
1	Kontrol	101	6	5,94
1	Solvent Kontrol	104	8	7,70
1	0.01µg NF /ml	98	9	9,18
1	0.1µg NF /ml	99	9	9,09
1	1µg NF /ml	101	8	7,92
1	10µg NF /ml	101	11	10,89
1	100µg NF /ml	99	10	10,10
2	Kontrol	99	6	6,06
2	Solvent Kontrol	107	7	6,54
2	0.01µg NF /ml	98	6	6,12
2	0.1µg NF /ml	106	7	6,60
2	1µg NF /ml	101	7	6,93
2	10µg NF /ml	96	7	7,29
2	100µg NF /ml	101	8	7,92
3	Kontrol	148	10	6,75
3	Solvent Kontrol	127	11	8,66
3	0.01µg NF /ml	103	11	10,67
3	0.1µg NF /ml	108	14	12,96
3	1µg NF /ml	109	10	9,17
3	10µg NF /ml	115	14	12,17
3	100µg NF /ml	95	12	12,60

Tablo 3.1. incelendiğinde en küçük apoptotik hücre yüzdesinin % 5,94, en büyük apoptotik hücre yüzdesinin % 12,96 olduğu görülmektedir.

Tablo 3.2. BFA'nın spermiler üzerindeki apoptotik hücre yüzdeleri.

Boğa no	Konsantrasyon	Hücre sayısı	Apoptotik hücre sayısı	Apoptotik hücre yüzdesi (%)
1	Kontrol	105	0	0
1	Solvent Kontrol	128	1	0,78
1	0.01µg BFA /ml	109	10	9,25
1	0.1µg BFA /ml	103	7	6,79
1	1µg BFA /ml	94	9	9,57
1	10µg BFA /ml	95	8	8,42
1	100µg BFA /ml	101	8	7,92
2	Kontrol	119	3	2,52
2	Solvent Kontrol	111	3	2,70
2	0.01µg BFA /ml	108	4	3,70
2	0.1µg BFA /ml	106	8	7,54
2	1µg BFA /ml	107	11	10,28
2	10µg BFA /ml	95	8	8,42
2	100µg BFA /ml	110	13	11,81
3	Kontrol	141	8	5,67
3	Solvent Kontrol	105	10	9,52
3	0.01µg BFA /ml	91	9	9,89
3	0.1µg BFA /ml	114	13	11,40
3	1µg BFA /ml	131	17	12,97
3	10µg BFA /ml	94	10	10,63
3	100µg BFA /ml	109	14	12,80

Tablo 3.2. incelendiğinde, en küçük apoptotik hücre yüzdesinin sıfır, en büyük apoptotik hücre yüzdesinin % 12,97 olduğu görülmektedir.

Deney gruplarındaki toplam hücre sayıları, apoptotik hücre sayıları ve apoptotik hücre yüzdeleri Tablo 3.3. (NF) ve Tablo 3.4'de (BFA) verilmiştir.

Tablo 3.3. NF'li deney gruplarında toplam hücre sayısındaki apoptotik hücre yüzdeleri.

Madde-Konsantrasyon	Apoptotik hücre sayısı	Hücre sayısı	Apoptotik hücre yüzdesi (%)
Kontrol	22	348	6,32
Solvent Kontrol	26	338	7,69
0,01 µg NF /ml	26	299	8,7
0,1 µg NF /ml	30	313	9,6
1 µg NF /ml	25	311	8,04
10 µg NF /ml	32	312	10,3
100 µg NF /ml	30	295	10,17

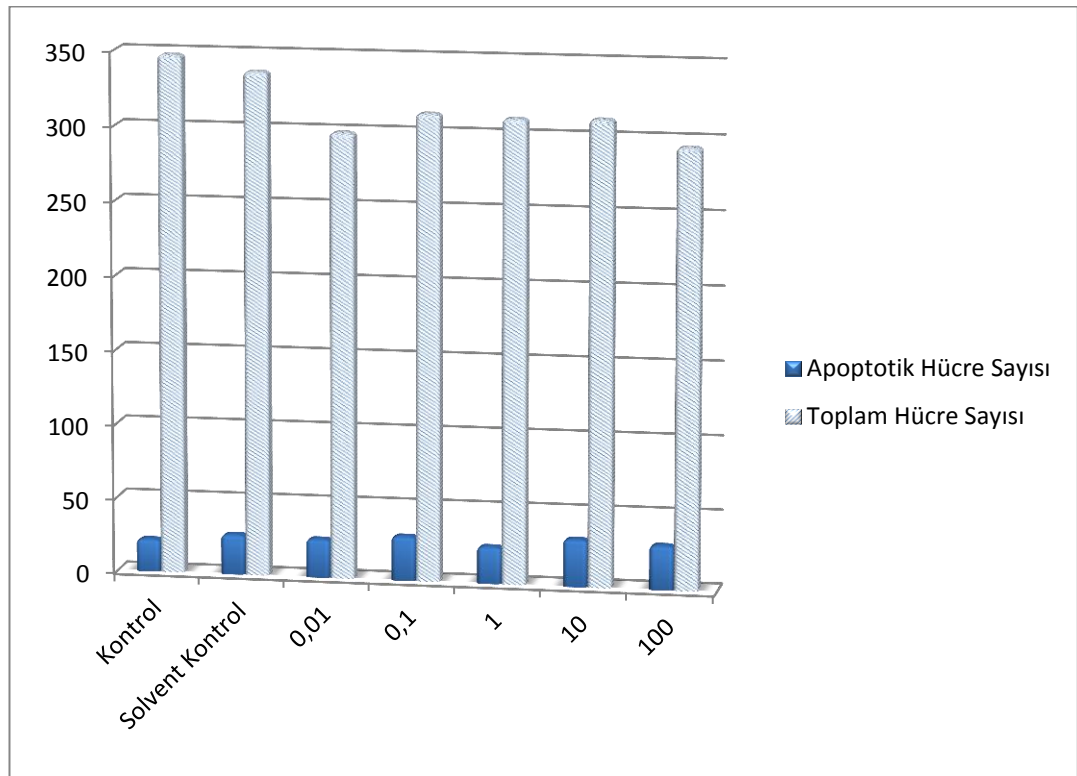
Tablo 3.3. incelendiğinde, NF'nin tüm gruplarda toplam hücre sayıları, apoptotik hücre sayıları ve apoptotik hücre yüzdeleri görülmektedir. Bu verilere göre en düşük apoptotik hücre yüzdesi % 6,32 olarak kontrol grubunda, en yüksek apoptotik hücre yüzdesi % 10,17 olarak 100 µg NF/ml grubunda görülmektedir.

Tablo 3.4. BFA'li deney gruplarında toplam hücre sayısındaki apoptotik hücre yüzdeleri.

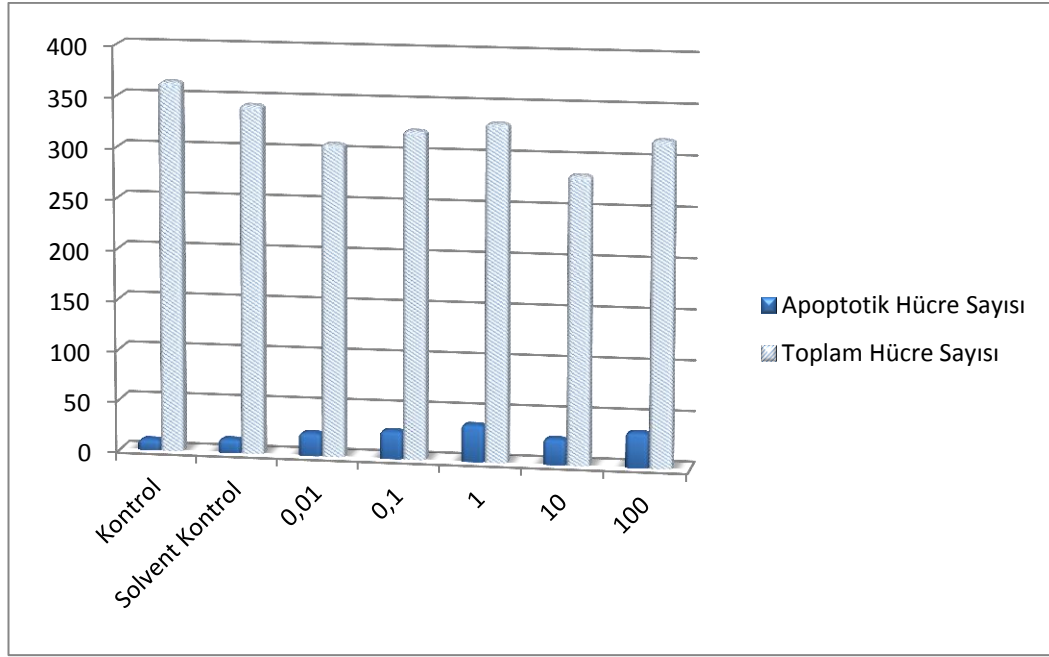
Madde-Konsantrasyon	Apoptotik hücre sayısı	Hücre sayısı	Apoptotik hücre yüzdesi (%)
Kontrol	11	365	3,02
Solvent Kontrol	14	344	4,07
0,01 µg BFA /ml	23	308	7,5
0,1 µg BFA /ml	28	323	8,67
1 µg BFA /ml	37	332	11,15
10 µg BFA /ml	26	284	9,15
100 µg BFA /ml	35	320	10,94

Tablo 3.4. incelendiğinde, BFA'nın tüm gruplarda toplam hücre sayıları, apoptotik hücre sayıları ve apoptotik hücre yüzdeleri görülmektedir. Bu verilere göre en düşük apoptotik hücre yüzdesi % 3,02 olarak kontrol grubunda, en apoptotik hücre yüzdesi % 10,94 olarak 100 µg BFA/ml grubunda görülmektedir

NF'nin ve BFA'nın sperm üzerindeki etkilerini belirlemek için yapılan Tunel analiz sonuçları Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de grafik olarak verilmiştir.

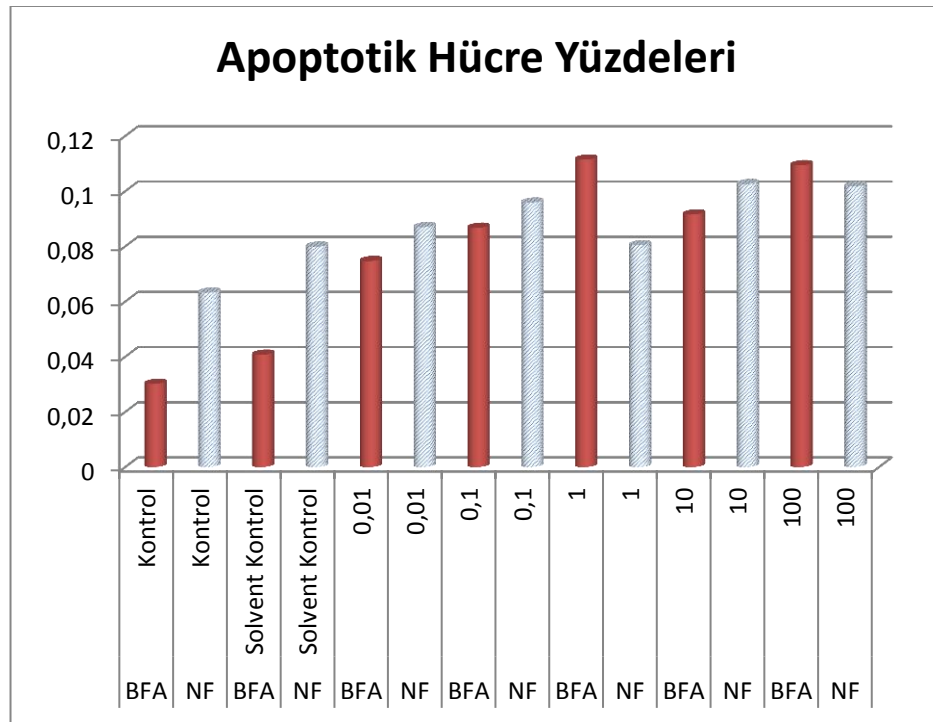


Şekil 3.1. NF'li deney gruplarında toplam hücre sayıları ve apoptotik hücre sayıları.



Şekil 3.2. BFA'lı deney gruplarında toplam hücre sayıları ve apoptotik hücre sayıları.

Tunel analizi ile NF ve BFA'nın sperm üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak grafikte verilmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. NF ve BFA'lı deney gruplarında apoptotik hücre yüzdeleri.

NF'nin üç ayrı boğa spermasındaki apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması, standart hata ve minimum-maksimum değerleri Tablo 3.5.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçların önemli olup/olmadığı varyans analizi ile kontrol edilmiştir.

Tablo 3.5. NF'nin sperm üzerindeki apoptotik hücre yüzdelerinin ortalama (Ort), standart hata (SH) ve minimum-maksimum (Min- Mak) değerleri.

NF	Min	Mak	Ort±SH
kontrol	5,94	6,75	6,25±0,252
solvent	6,54	8,66	7,63±0,613
0,01	6,12	10,67	8,66±1,340
0,1	6,60	12,96	9,55±1,850
1	6,93	9,17	8,01±0,648
10	7,29	12,17	10,12±1,460
100	7,92	12,60	10,21±1,352
ANOVA: F (1,463)=0,260			

Tablo 3.5. incelendiğinde kontrol gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması 6,25±0,252 olarak hesaplanmıştır. Kontrol gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin minimum değeri 5,94 bulunurken, maksimum değeri 6,75 olarak tespit edilmiştir. Solvent kontrol gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması 7,63±0,613 olarak bulunmuştur. Solvent kontrol gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin minimum değeri 6,54 iken, maksimum değeri 8,66'dır. En düşük doz NF içeren 0,01 µg NF/ml gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması 8,66±1,340 iken minimum değeri 6,12; maksimum değeri 10,67 olarak tespit edilmiştir. 0,1 µg NF/ml gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması 9,55±1,850'dir. Minimum değeri 6,60; maksimum değeri ise 12,96 olarak bulunmuştur. 1 µg NF/ml gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması 8,01±0,648 iken, minimum değeri 6,93, maksimum değeri 9,17 olarak gözlenmiştir. 10 µg NF/ml gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması 10,12±1,460 olarak bulunurken, apoptotik hücre yüzdelerinin minimum değeri 7,29, maksimum değeri 12,17 olarak tespit edilmiştir. En yüksek doz NF içeren 100 µg NF/ml

gruplarında apoptotik hücre yüzdelерinin ortalaması $10,21 \pm 1,352$ iken, minimum değeri 7,92; maksimum değeri 12,60 olarak gözlenmiştir.

Gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemek için yapılan ANOVA analizi sonucunda gruplar arasındaki ortalama farkının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($F(1,463)=0,260$; $p>0,05$). Ama özellikle kontrol ve solvent gruplarının ortalamaları ile $10 \mu\text{g NF/ml}$ ve $100 \mu\text{g NF/ml}$ gruplarının ortalamaları arasında görülen fark sonucu, yüksek dozlarda maruz kalınan NF'ün apoptotik hücre yüzdesini arttırdığı söylenebilir.

Kontrol grubuyla diğer gruplar arasındaki ortalamaların farklı olup olmadığını belirlemek amacıyla kontrol grubuyla diğer gruplar arasında gerçekleştirilen t-testi analizi sonuçları Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. Kontrol grubuyla diğer gruplar arasında gerçekleştirilen t-testi analizi sonuçları

NF	Grup	Ort±SH	p
kontrol	solvent	$7,63 \pm 0,613$	0,105
	0,01	$8,66 \pm 1,340$	0,152
	0,1	$9,55 \pm 1,850$	0,152
	1	$8,01 \pm 0,648$	0,065
	10	$10,12 \pm 1,460$	0,060
	100	$10,21 \pm 1,352$	0,045

Tablo 3.6 incelendiğinde sadece kontrol grubuyla, $100 \mu\text{g NF/ml}$ grubu arasındaki ortalamaların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($t=-2,877$; $p<0,05$).

BFA'nın üç ayrı boğa spermasındaki apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması, standart hata ve minimum-maksimum değerleri Tablo 3.7.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçların önemli olup/olmadığı varyans analizi ile kontrol edilmiştir.

Tablo 3.7. BFA'nın spermiler üzerindeki apoptotik hücre yüzdelerinin ortalama (Ort), standart hata (SH) ve minimum-maksimum (Min- Mak) değerleri.

BFA	Min	Mak	Ort±SH
kontrol	0,00	5,67	2,73±1,640 ^a
solvent	0,78	9,52	4,33±2,652 ^{a, b}
0,01	3,70	9,89	7,61±1,965 ^{a, b}
0,1	6,79	11,40	8,58±1,428 ^{a, b}
1	9,57	12,97	10,94±1,035 ^b
10	8,42	10,63	9,16±0,737 ^{a, b}
100	7,92	12,80	10,84±1,489 ^b
ANOVA: F (3,555)=0,024; p<0,05			

Sütunlardaki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

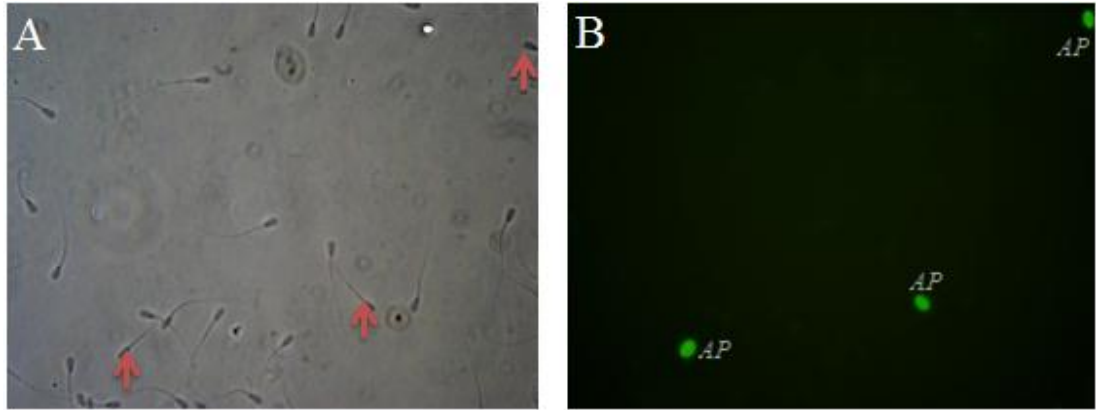
Tablo 3.7. incelendiğinde, kontrol gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması 2,73±1,640 olarak tespit edilmiştir. Kontrol gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin minimum değeri sıfır bulunurken, maksimum değeri 5,67 olarak tespit edilmiştir. Solvent kontrol gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması 4,33±2,652 olarak bulunmuştur. Solvent kontrol gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin minimum değeri 0,78 iken, maksimum değeri 9,52'dir. En düşük doz BFA içeren 0,01 µg BFA /ml gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması 7,61±1,965 iken minimum değeri 3,70, maksimum değeri 9,89 olarak tespit edilmiştir. 0,1 µg BFA /ml gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması 8,58±1,428'dir. Minimum değeri 6,79, maksimum değeri ise 11,40 olarak bulunmuştur. 1 µg BFA /ml gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması 10,94±1,035 iken, minimum değeri 9,57, maksimum değeri 12,97 olarak gözlenmiştir. 10 µg BFA /ml gruplarında apoptotik hücre yüzdelerinin ortalaması 9,16±0,737 olarak bulunurken, apoptotik hücre yüzdelerinin minimum değeri 8,42,

maksimum değeri 10,63 olarak tespit edilmiştir. En yüksek doz BFA içeren 100 µg BFA /ml gruplarında apoptotik hücre yüzdelерinin ortalaması 10,84±1,489 iken, minimum değeri 7,92, maksimum değeri 12,80 olarak gözlenmiştir.

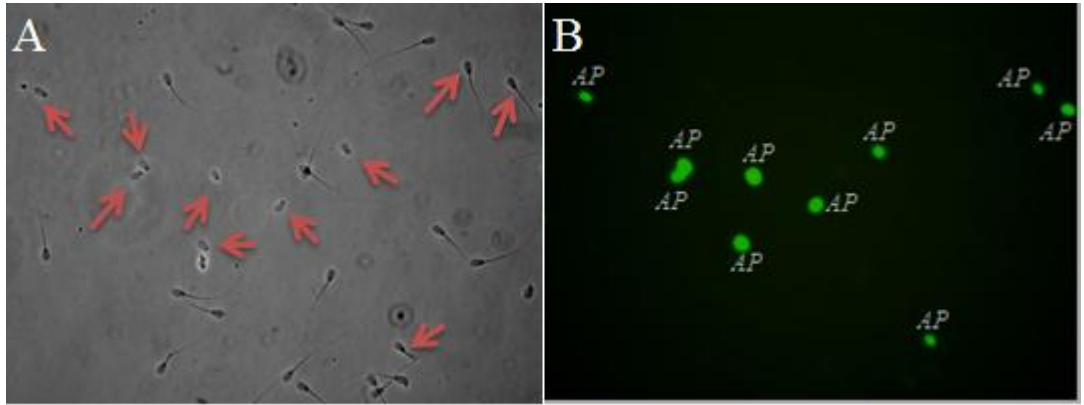
Yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir. ($F(3,555)=0,024$; $p<0,05$). Gruplar arasında farkın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Tukey analizi sonucunda, 1 µg BFA /ml konsantrasyonu (10,94±1,80, $p<0,05$) ve 100 µg BFA /ml konsantrasyonu (10,84±2,58, $p<0,05$) gruplarının apoptotik hücre oranlarının, kontrol grubuna (2,73±2,8) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir.

3.1.1. Tunel Kiti Kullanılarak Boyanan Spermlerin Mikroskop Görüntüleri

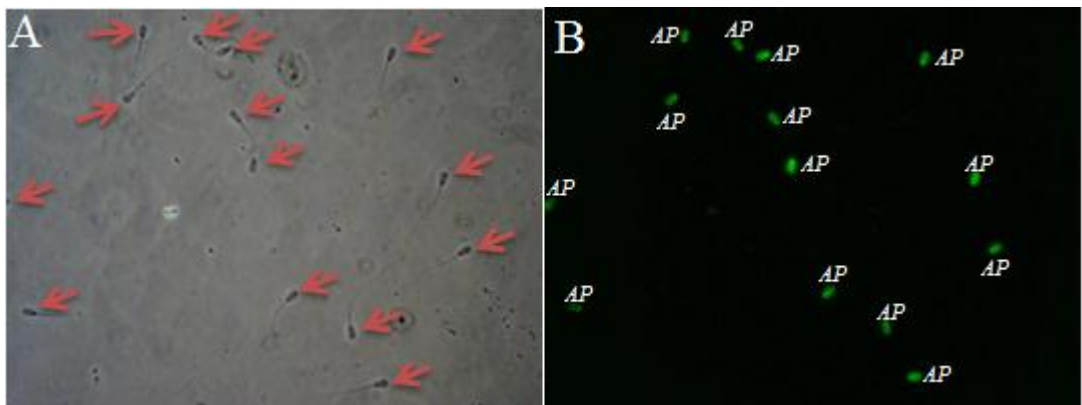
Çalışmada, NF ve BFA'nın sıgır spermlerinde DNA kırılmalarına neden olarak spermisidal etki edip etmediğini belirlemek amacıyla Tunel Testi uygulanmıştır. Uygulama sonunda boyanan sperm görüntüleri resimlerde verilmiştir. Resim 3.1.'de 0,1 µg BFA/ml (a), 100 µg BFA/ml (b) konsantrasyonlarındaki ve DNase uygulanmış (c) spermlerin faz kontrast mikroskop (A) ve floresan mikroskop (B) görüntüleri yer almaktadır. 0,1 µg BFA/ml konsantrasyonundaki spermlerin Tunel boyama oranı % 7,54 olarak bulunmuştur. 100 µg BFA /ml konsantrasyonundaki spermlerin Tunel boyama oranı % 11,81 olarak bulunmuştur. Pozitif kontrol için spermlere DNase uygulandığında spermlerin tamamı apoptoza uğramıştır.



(a)



(b)



(c)

Resim 3.1. 0,1 μg BFA/ml (a), 100 μg BFA/ml (b) konsantrasyonlarındaki ve DNase uygulanmış (c) spermilerin faz kontrast mikroskop (A) ve floresan mikroskop (B) görüntüleri (X 40)

3.2. NF ve BFA'nın Oosit Olgunlaşmasına Etkisi

39 °C'de % 5 CO₂'li ortamda 18-22 saat boyunca inkübasyon sonunda kutup hücresi gözlemlenerek olgunlaşan oositlerin oranı belirlenmiştir. İnkübasyon sonunda gruptaki olgunlaşmış hücre sayıları ve yüzde oranları Tablo 3.8.'de verilmiştir.

Tablo 3.8. NF'nin Oositlerin Olgunlaşmasına Etkisi. Farklı harfler (a,b) gruplar arası farkı göstermektedir.

Konsantrasyon	Hücre sayısı	Olgunlaşmış hücre sayısı	Olgunlaşma yüzdesi (%)
Kontrol	30	21	70,00 ^a
Solvent Kontrol	30	20	66,66 ^a
0.01	32	23	71,88 ^a
0.1	31	21	67,74 ^a
1	36	22	61,11 ^a
10	30	18	60,00 ^a
100	31	2	6,45 ^b
ANOVA: F (9,477)=0,000 ; p<0,05			

Sütunlardaki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

Tablo incelendiğinde en düşük olgunlaşma oranının 100 µg NF/ml uygulanan grupta (% 6,45) olduğu görülmektedir. Diğer gruplarda olgunlaşma oranı % 60-70 arasında değişmektedir.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir. (F(9,477)=0,000 ; p<0,05). Gruplar arasındaki farkı belirlemek amacıyla yapılan Tukey analizi sonucunda, 100 µg NF/ml konsantrasyonu grubunun olgunlaşma oranının (0,0645±0,24, p=0,00) diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir.

Uygulanan NF miktarının olgunlaşma yüzdesini etkileme derecesini belirlemek amacıyla yapılan korelasyon analizi sonucunda Spearman katsayısı $-0,793$ ($p<0,05$) olarak belirlenmiştir. Uygulanan NF miktarı ile olgunlaşma yüzdesi arasında çok güçlü negatif doğrusal bir ilişki olduğu söylenebilir.

Tablo 3.9. BFA'nın Oositlerin Olgunlaşmasına Etkisi. Farklı harfler (a,b) gruplar arası farkı göstermektedir.

Konsantrasyon	Hücre sayısı	Olgunlaşmış hücre sayısı	Olgunlaşma yüzdesi (%)
Kontrol	30	21	70,00 ^a
Solvent Kontrol	30	20	66,66 ^a
0.01	33	7	21,21 ^b
0.1	31	5	16,13 ^b
1	31	7	22,58 ^b
10	32	6	18,75 ^b
100	35	3	8,57 ^b
ANOVA: $F(9,540)=0,000$; $p<0,05$			

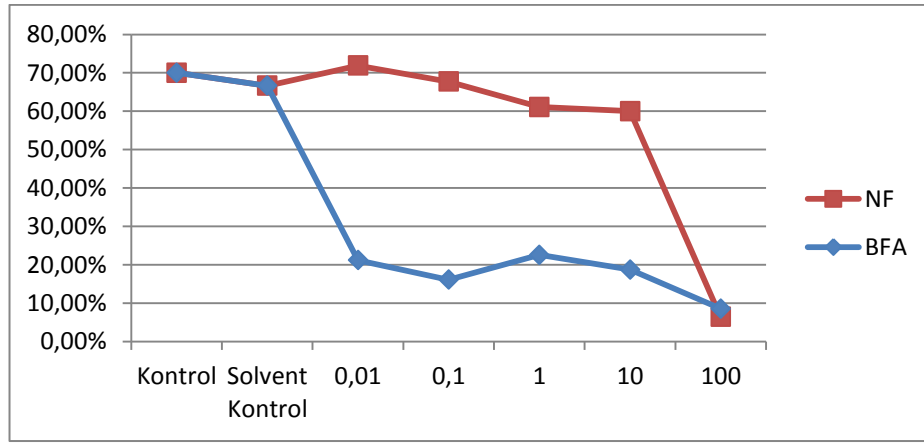
Sütunlardaki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

Farklı konsantrasyondaki BFA'nın oositler üzerindeki olgunlaşmaya etkileri Tablo 3.9.'da verilmiştir. Tablo incelendiğinde en düşük olgunlaşma oranının $100 \mu\text{g}$ BFA/ml uygulanan grupta (% 8,57) olduğu görülmektedir. En yüksek olgunlaşma oranı ise kontrol grubunda (% 70) gözlenmiştir. BFA uygulanan diğer gruplarda olgunlaşma oranı % 18-21 arasında değişmektedir.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($F(9,540)=0,000$; $p<0,05$). Yani BFA miktarının olgunlaşma oranını ve yüzdesini etkilediği söylenebilir. Gruplar arasındaki farkı belirlemek amacıyla yapılan Tukey analizi sonucunda, kontrol ve solvent kontrol grubunun olgunlaşma oranının ($0,700\pm 0,46$, $p<0,05$) diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuca göre düşük

miktarlardaki BFA'nın bile olgunlaşma oranını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı söylenebilir.

Uygulanan BFA miktarının olgunlaşma yüzdesini etkileme derecesini belirlemek amacıyla yapılan korrelasyon analizi sonucunda Spearman katsayısı $-0,811$ ($p < 0,05$) olarak belirlenmiştir. Uygulanan BFA miktarı ile olgunlaşma yüzdesi arasında çok güçlü negatif doğrusal bir ilişki olduğu söylenebilir.

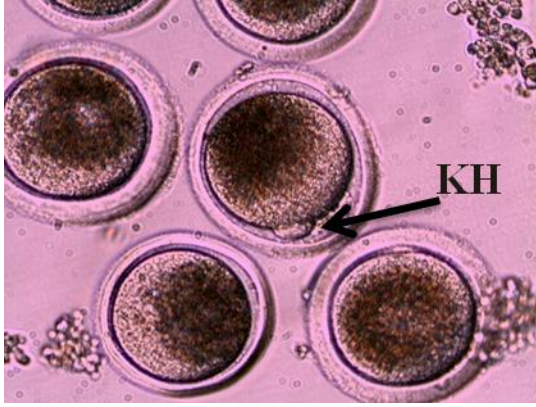


Şekil 3.4. Kontrol, solvent kontrol, NF ve BFA uygulanan çeşitli gruptaki oosit olgunlaşma yüzdeleri

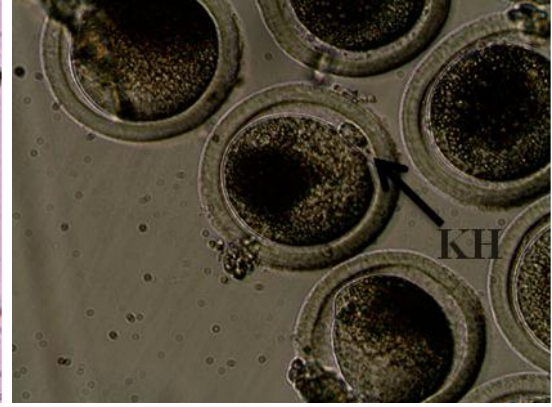
Şekil 3.4.'de, kontrol, solvent kontrol, NF ve BFA uygulanan farklı gruptaki oosit olgunlaşma yüzdeleri görülmektedir. $100 \mu\text{g}$ NF/ml dışındaki NF konsantrasyonları olgunlaşma oranını az etkilerken, $100 \mu\text{g}$ NF/ml grubu olgunlaşma yüzdesini oldukça fazla etkilemiş ve olgunlaşma oranını düşürmüştür. BFA konsantrasyonları düşük dozda bile olgunlaşma oranını etkilemektedir. $0,01 \mu\text{g}$ BFA/ml grubundan itibaren oosit olgunlaşmasını oldukça fazla oranda düşürmüştür.

3.2.1. Olgunlaşmış Oosit Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri

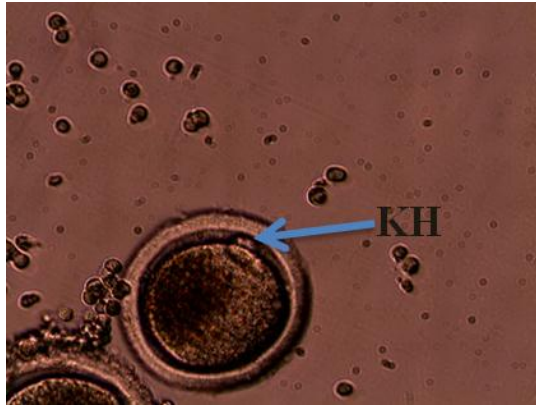
İnkübasyon sonunda kutup hücresi gözlemlenerek olgunlaşmış oositlerin oranı belirlenmiştir. Resim 3.6.'da NF Kontrol (a), 0,01 µg NF/ml (b), 10 µg NF/ml (c), BFA Kontrol (d) ve 10 µg BFA/ml (f) gruplarında olgunlaşmış (I. kutup hücresi oluşmuş) oositlerin mikroskop görüntüsü yer almaktadır.



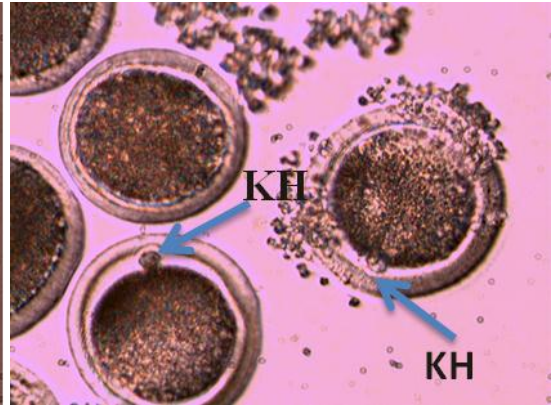
(a)



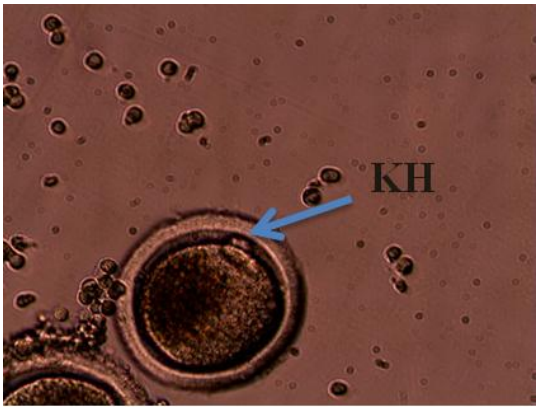
(b)



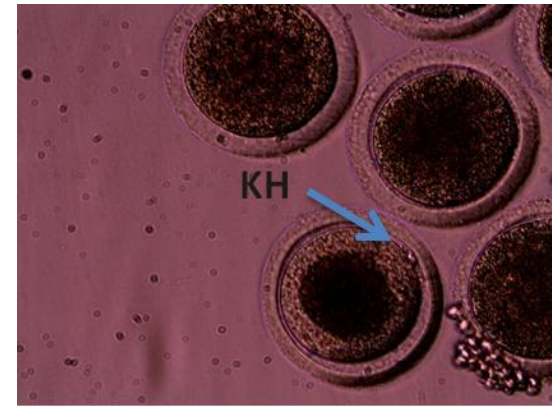
(c)



(d)



(e)



(f)

Resim 3.2. NF Kontrol (a), 0,01 µg NF/ml (b), 10 µg NF/ml (c), BFA Kontrol (d), 10 µg BFA/ml (e) ve 100 µg BFA/ml (f) gruplarında I. kutup hücresi (KH) oluşmuş oositlerin mikroskop görüntüleri (X 40).

4. TARTIŞMA

Yirminci yüzyıl boyunca, çevreye zarar veren kimyasalların üretimi ve kullanımı oldukça artmıştır. Bu kimyasallardan bazıları endokrin sisteme zarar vermektedir. Çevresel endokrin sistem bozucuları olarak da adlandırılan bu kimyasalların üreme sisteminde de olumsuz etkileri görülmektedir. Fetüs üzerinde doğrudan toksik etkilerinin yanında, hipotalamus, hipofiz veya gonadlar üzerinde birçok mekanizmalarla erkekte ve dişide üremeyi etkileyebilmektedir (Petro ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında, endokrin sistem bozuculardan olan NF ve BFA'nın sığırlarda üreme hücrelerine olan etkileri araştırılmıştır. NF'nin spermler üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla üç ayrı boğadan alınan taze sperma ile yapılan deneylerde elde edilen veriler incelendiğinde; en küçük apoptotik hücre yüzdesinin % 5,94, en büyük apoptotik hücre yüzdesinin % 12,96 olduğu görülmektedir (Tablo 3.1). NF yoğunluğu arttıkça, sığır spermlerinde DNA kırılmalarına neden olarak apoptoz oranında artışa yol açtığı görülmüştür (Tablo 3.3.). NF'nin doza bağlı apoptotik hücre yüzdesini arttırmasına rağmen, tüm gruplar değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Ama özellikle kontrol ve solvent gruplarının ortalamaları ile 10 µg NF/ml ve 100 µg NF/ml gruplarının ortalamaları arasında görülen fark sonucu, yüksek dozlarda maruz kalınan NF'ün apoptotik hücre yüzdesini arttırdığı söylenebilir. Kontrol grubuyla diğer gruplar arasındaki ortalamaların farklı olup olmadığını belirlemek amacıyla kontrol grubuyla diğer gruplar arasında gerçekleştirilen t-testi analizi sonucunda sadece kontrol grubuyla, 100 µg NF/ml grubu arasındaki ortalamanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

NF ile yapılan çalışmalarda; Han ve ark. (2004), Sprague–Dawley ratlarının erkeklerinde 50 gün boyunca 0, 125 ve 250 mg/kg/gün NF uygulamış ve Tunel sonucuna göre, testis hücrelerinde NF'nin doza bağlı apoptozu arttırdığını

belirtmiştir. Diğer bazı çalışmalarda da NF'nin testis hücrelerinde apoptoza neden olduğu belirtilmiştir (Weber ve ark., 2002; Gong ve Han, 2006). Wang ve ark. (2003) erkek ratlarda, NF'ye maruz kalan Sertoli hücrelerinde NF konsantrasyonu arttıkça apoptozun arttığını rapor etmişlerdir. Gong ve ark. (2009) NF'nin Sertoli hücreleri üzerinde, apoptosizde önemli bir rol oynayan ER stresi oluşturabileceğini de belirtmişlerdir. Bennetts ve ark. (2008)'de, NF'nin insan spermlerinde DNA bütünlüğüne zarar verdiğini ve bunun da düşüklere neden olma ihtimalinin bulunduğunu rapor etmişlerdir. Uğuz ve ark. (2008), rat spermleriyle yaptıkları çalışmada, NF'nin >250 µg/ml konsantrasyonunun sperm hareketliliğine olumsuz etkileri olduğunu tespit etmişlerdir. Bian ve ark. (2006) NF gibi östrojeni taklit ederek östrojen resöptörlerine bağlanabilen OF ile erkek rat spermlerinde yaptıkları çalışmada, günlük 150 mg/kg oranında OF'nin sperm hücrelerinin hareketliliğini azalttığını ve 450 mg/kg/günlük dozun testislerdeki sperm sayısını ve günlük sperm üretimini düşürdüğünü belirtmiştir. Östrojenik NF'nin 100 ppb konsantrasyonunda olgun erkek (*Oryzias latipes*) spermatositlerinde, sertoli hücrelerinde ve leydig-homolog hücrelerinde apoptozu altı kat arttırdığı tespit edilmiştir (Weber ve ark., 2002). Michelangeli ve ark. (2008) AF'lerin TM4 Sertoli hücrelerinde (sperm olgunlaştırma hücreleri) Ca⁺² intrasellüler seviyesinde normal olmayan yükselmelere ve mitokondrileri depolarize ederek hücre ölümüne neden olduklarını tespit etmişlerdir. Arslan ve ark. (2007), denizkestanesi sperm ve yumurtalarını NF (0,937-18,74 µg/L) ve OF (5-160 µg/L)'ye maruz bırakmışlar ve sonuç olarak fertilizasyon başarısında % 20'ye yakın bir azalma meydana gelmiş ve kontamine spermlerin oluşturduğu larvaların iskelet yapısındaki şekil bozukluklarında artış görülmüştür. Yang ve ark. (2006) Zebrabalıklarının üreme sistemleri üzerinde, üreme öncesi NF'ye maruz bırakılmanın etkisi incelenmiş, 50 µg/L NF'e maruz bırakılan dişi balıklara ait gruplarda üremede zayıflamalara ve CAT D aktivitesinin yavaşlamasına, yumurta kabuğu kalınlığının azalmasına (% 23,6) ve şekil bozukluğu oranının yükselmesine neden olduğunu görmüştür. Karadeniz ve ark. (2010) NF'nin elektrokimyasal tespiti ve NF ile DNA arasındaki etkileşimin izlenmesini tek kullanımlık grafitte algılayıcı teknolojileri ve DPV tekniğini kullanarak gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak NF'ye bağlı DNA hasarının, NF'ye bağlı DNA oksidasyonu ile özellikle de guanin oksidasyonu ile gerçekleştiği belirtilmiştir.

Benachour ve ark., (2007) aralarında NF ve BFA’ında bulunduğu bazı endokrin bozucuların hücre yaşlarında etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Lukacova ve ark. (2012) büyük baş hayvan sperm hücrelerinin hareketliliği üzerine yaptıkları çalışmada, NF’nin doza ve zamana bağlı etkisini araştırmışlardır. Sonuçlar yüksek dozlardaki (100 µg/ml’den büyük) NF’nin, sperm hücrelerinin hareketliliğini negatif olarak etkilediği iddiasını desteklemektedir. Muhtemelen bu konsantrasyonlar üreme fizyolojisi üzerine toksik etki oluşturmaktadır. Çalışmamızda >100 µg NF/ml dozunun apoptotik etki gösterdiği sonucu literatürdeki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

BFA’nın sperm üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla üç ayrı boğadan alınan taze sperma ile yapılan deneylerden elde edilen veriler incelendiğinde; en küçük apoptotik hücre yüzdesinin sıfır, en büyük apoptotik hücre yüzdesinin % 12,97 olduğu görülmektedir (Tablo 3.2.). BFA yoğunluğu arttıkça, sığır spermlerinde DNA kırılmalarına neden olarak apoptoz oranında artışa yol açtığı görülmüştür (Tablo 3.4.). Bu veriler doğrultusunda, BFA’nın doza bağlı apoptotik hücre yüzdesini arttırdığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Gruplar arasında farkın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Tukey analizi sonucunda, 1 µg BFA /ml konsantrasyonu ve 100 µg BFA /ml konsantrasyonu gruplarının apoptotik hücre oranlarının, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir. Dolayısıyla, BFA’nın 1 ve 100 µg BFA/ml konsantrasyonlarda sığır sperm hücrelerinde DNA kırılmalarına neden olarak apoptotik etki gösterdiği söylenebilir. Bulduğumuz bu sonuç, bu alanda yapılan çalışmalarla da paralellik göstermektedir.

Meeker ve ark. (2010)’da 190 erkekte yaptıkları çalışmada; semen kalitesi ve sperm DNA’sını Comet assay kullanarak incelemiş, sonuç olarak BFA’nın semen kalitesini azalttığı ve sperm DNA’sına zarar verdiğini rapor etmiştir. El Ghazzawy ve ark. (2011) BFA’nın erkek ratlarda epididimisin işlevlerine zarar veren yapısal değişikliklere ve kısırlığa neden olduğunu belirtmişlerdir. Iida ve ark. (2003),

BFA'nın 150–200 μM miktarlarında, ratlarda apoptozu tetikleyerek Sertoli hücrelerinde ölümlere sebep olduğunu, BFA'nın $<100 \mu\text{M}$ miktarlarında ise hücrelerde sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ji ve ark. (2011) da 240 erkekte, idrarda bulunan BFA miktarı ile sperm DNA kırılmaları arasındaki ilişkiyi araştırmış ve sonuç olarak aralarında pozitif korelasyon ($\beta=0,27$; 95% CI: 0,15-0,39; $p<0,001$) bulmuştur. Çakal ve Parlak, (2007) denizkestanesi embriyolarında ve gametlerinde BFA'nın 300 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonunun spermiyotoksik ve embriyotoksik etki gösterdiği belirlemiştir.

NF'nin sığır oositlerinin olgunlaşmasına etkisini araştırmak amacıyla yaptığımız deneylerden elde edilen veriler incelendiğinde, en düşük olgunlaşma oranının 100 μg NF/ml uygulanan grupta (% 6,45) olduğu görülmektedir. Diğer gruplarda olgunlaşma oranı % 60-70 arasında değişmektedir (Tablo 3.8.). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Gruplar arasındaki farkı belirlemek amacıyla yapılan Tukey analizi sonucunda, 100 μg NF/ml konsantrasyonu grubunun olgunlaşma oranının diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan NF miktarının olgunlaşma yüzdesini etkileme derecesini belirlemek amacıyla yapılan korelasyon analizi sonucunda Spearman katsayısı “-0,793” ($p<0,05$) olarak belirlenmiştir. Buradan da uygulanan NF miktarı ile olgunlaşma yüzdesi arasında çok güçlü negatif doğrusal bir ilişki olduğu söylenebilir.

Brevini ve ark. (2004), bir başka endokrin sistem bozucu olan PCB'nin domuz oositlerinde in vitro olgunlaşmaya olan etkisini inceledikleri araştırmada, bu maddenin oositin gelişim yeteneğini azalttığını ve domuz organizmasında PCB birikiminin bu türün üreme verimliliği üzerinde zararlı bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Hwang ve ark. (2010), NF ve DES'in *T. Obscurus*'un oosit maturasyonu üzerinde östrojenik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, NF ve DES'in oositin

gelişimsel basamaklarına göre farklı duyarlılıkları olduğunu ve DES'in östrojenik etkisinin NF'ye göre daha büyük olduğunu tespit etmişlerdir.

Pocar ve ark. (2003) OF'nin in vitro kültür edilmiş büyük baş oositlerindeki maturasyonu ve takip eden gelişimsel yeterliliklerini etkilediğini belirlemişlerdir. Aynı zamanda bu etkilerin doza bağlı olduğunu ve OF'nin yüksek konsantrasyonlarında (1 ve 0,1 mg/ml) oosit maturasyonunun engellendiğini tespit etmişlerdir. Bu konsantrasyonlarda nükleer maturasyon bozukluklarında artış gözlenmiş ve oositlerin yüzde olarak çok az bir kısmı ilk mayotik bölünmeyi gerçekleştirebilmiştir.

Kortner ve Arukwe (2007) Atlantik morina balıkları üzerine yaptıkları araştırma sonucunda NF'nin teleostlarda maturasyon ve oosit büyümesi üzerine olumsuz etkilediğini, steroid oluşumunu bozmak ve hormonal dengesizlik yaratmak gibi alışılmıştın dışında etkileri olduğunu belirlemişlerdir.

BFA'nın sığır oositlerinin olgunlaşmasına etkisini araştırmak amacıyla yaptığımız deneylerden elde edilen veriler incelendiğinde, en düşük olgunlaşma oranının 100 µg NF/ml uygulanan grupta (% 8,57) olduğu görülmektedir. Kontrol grubunda da en yüksek olgunlaşma oranı (% 70) gözlenmiştir. BFA uygulanan diğer gruplarda olgunlaşma oranı % 18-21 arasında değişmektedir (Tablo 3.9.). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Yani BFA miktarının olgunlaşma oranını ve yüzdesini etkilediği söylenebilir. Gruplar arasındaki farkı belirlemek amacıyla yapılan Tukey analizi sonucunda, kontrol ve solvent kontrol grubunun olgunlaşma oranının diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuca göre düşük miktarlardaki BFA'nın bile olgunlaşma oranını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı söylenebilir.

Uygulanan BFA miktarının olgunlaşma yüzdesini etkileme derecesini belirlemek amacıyla yapılan korelasyon analizi sonucunda Spearman katsayısı -0,811 ($p=0,27$) olarak belirlenmiştir. Uygulanan BFA miktarı ile olgunlaşma yüzdesi arasında çok güçlü negatif doğrusal bir ilişki olduğu söylenebilir.

Lenie ve ark. (2008) BFA'nın in vitro follikül gelişimindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında, in vitro ortamda $3\mu\text{M}$ dan $30\mu\text{M}$ 'a kadar BFA'ya maruz kalan fare oositlerinde follikül gelişimi ve olgunlaşmasına olan etkilerine bakılmıştır. $30\mu\text{M}$ 'a maruz kalan oositlerde belli belirsiz bir granuloza hücre oluşumu ve düşük düzeyde östrojen üretimi görülmüştür. Peretz ve ark. (2011), otuziki günlük FVB farelerinde yaptıkları çalışmada postnatal dönemde BFA'ya maruz kalmanın antral follikül büyüklüğü ve steroid oluşumu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda BFA'nın follikül büyüklüğünü ve progesteron, dehidroepiandesteron, androstenediyon, estrone, testosteron, estradiol gibi hormonların oluşturulmasını kısıtladığını belirlemişlerdir. Aynı zamanda BFA'nın ovaryumdaki estradiyol biosentezleme işlemini etkilediğini ileri sürmüşlerdir. Baek ve ark. (2007) BFA'nın kayabalıklarındaki oosit maturasyonu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda $0,82-0,86$ mm çapındaki oositlerin BFA'ya karşı daha duyarlı olduklarını, $0,86-0,90$ mm çapındaki oositlerde BFA'nın görülebilir bir etkisi olmadığını belirlemişlerdir. Mlynarcikova ve ark. (2009) çeşitli endokrin bozucu maddelerin mayotik maturasyona, hücre yığını genişlemesine, progesteron ve hyaluronan sentezlenmesine olan etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonunda BFA'nın oositlerdeki mayotik maturasyonu etkilediğini belirtmişlerdir. Kontrol grubuna göre BFA uygulanan metafaz II seviyesine geçen oosit sayısında azalmalar olduğu görülmüştür. BFA'nın oosit-hücre yığını (cumulus) kompleks yapısı tarafından üretilen progesteronu da etkilediğini belirtmişlerdir. Susijaro ve ark. (2007) BFA'nın dişi farelerde oogenezi inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, Lahnsteiner ve ark. (2005) BFA'nın kırmızı benekli dişi alabalıkların (Brown trout) yumurtalarının olgunlaşmasına olumsuz etki ettiği ve erkeklerinde ise sperm kalitesini düşürdüğünü ortaya çıkarmışlardır.

5. SONUÇ

İnsan yapısı çevre kirleticilerinin değişik amaçlarla, değişik alanlarda kullanılması pek çok sağlık sorunlarını da beraberinde getirmektedir. İnsanların yaşamlarını kolaylaştırmak için üretilen ve çok yaygın bir şekilde kullanılan kimyasalların zararlı etkileri açığa çıktıkça, sağlığa zararlı olmayan kimyasal üretimi arayışlarına gidilmektedir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarla etkileri belirlenmeye çalışılan NF ve BFA, günlük yaşamımızın vazgeçilmez ihtiyaçları arasında bulunan deterjanlarda, ot ve böcek ilaçlarında, kozmetiklerde, boyalarda, doğum kontrol ilaçlarında, bebek biberonlarında ve plastik eşyalarda bulunmaktadır.

Greenpeace (2011), yaptığı bir incelemede 141 parça kıyafetten 89'unda NFE tespit etmiştir. Hayatımızın bu kadar içinde bulunan bu kimyasallar çevre kirliliğine sebep olmalarının yanında sağlığımızı da tehdit etmektedir. Bu çevre kirleticilerinin etkileri östrojenik etkiden karsinojenik ve hatta toksik etkiye varıncaya kadar değişik etkilere sahiptir ve dünyada pek çok araştırmacı bu konu üzerinde çalışmaktadır. Yapılan çalışmalarla bu kimyasalların olumsuz etkileri her geçen gün biraz daha aydınlığa çıkarılmakta ve bu maddelerin üretilmesi ve kullanımları konusunda önlemler alınması yoluna gidilmesi için yöneticilere baskılar artmaktadır.

Hormon etkisi gösteren çevre kirleticilerinin erkeklerde sperm sayısı ve kalitesini düşürdüğü literatürde rapor edilen bulgular arasındadır. Ayrıca hem erkek hem de dişide infertiliteye neden olduğu da rapor edilmiştir. Ancak, sperm ve oosit gibi gamet hücrelerine bu maddelerin etki mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. NF'nin balık, rat, fare ve sığır spermleri üzerine yapılan çalışmalar

mevcuttur ancak, NF'nin oosit olgunlaşması üzerine etkisi hakkında hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Türkiye'de de NF ve BFA'nın sığırlarda gamet fizyolojine etkileri üzerine hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada NF'nin sığır spermelerinde etkisini görmek amacıyla yapılan deneylerde, 100 µg NF /ml konsantrasyonu grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. 100 µg NF/ml konsantrasyonu grubunun sığır sperm hücrelerinde DNA kırılmalarına neden olarak apoptoza neden olduğu söylenebilir.

Bu tez çalışmasında BFA'nın sığır spermelerinde etkisini görmek amacıyla yapılan deneylerde, 1 µg BFA /ml konsantrasyonu ve 100 µg BFA /ml konsantrasyonu gruplarının apoptotik hücre oranlarının, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda, BFA'nın sığır spermelerinde doza bağlı apoptotik etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

Bu çalışmada, NF'nin sığır oositlerinin olgunlaşmasına etkisini görmek amacıyla yapılan deneylerde, 100 µg NF/ml konsantrasyonu grubunun olgunlaşma oranının diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca uygulanan NF miktarı ile olgunlaşma yüzdesi arasında çok güçlü negatif doğrusal bir ilişki olduğu söylenebilir.

Bu tez çalışmasında, BFA'nın sığır oositlerinin olgunlaşmasına etkisini görmek amacıyla yapılan deneylerde, kontrol grubunun olgunlaşma oranının diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan BFA miktarı ile olgunlaşma yüzdesi arasında çok güçlü negatif doğrusal bir ilişki olduğu söylenebilir.

Bu çalışmada NF ve BFA kıyaslandığında, elde edilen veriler doğrultusunda BFA'nın NF'ye göre daha toksik olduğu söylenebilir.

Bu tez çalışmasından elde edilen veriler döl verimi düşüklüğü hakkında önemli bilgilerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Ayrıca bir memeli üreme sisteminde çalışılıp elde edilen bilgiler, insanlarda da çocuk sahibi olamayan anne babaların neden çocuk sahibi olamadıkları sorusuna cevap bulmaya yardımcı bilgiler ortaya çıkararak yapılacak tüp bebek çalışmalarında, uygulanabilecek tedaviler hakkında yararlı bilgiler ortaya çıkaracaktır.

ÖZET

Nonilfenol ve Bisfenol-A'nın Sığırlarda Gamet Fizyolojisine Olan Etkileri

Alkilfenoletoksilar (AFEO), iyonik olmayan yüzey aktif maddeleri olarak böcek ilacı, deterjan, boyalar ve kozmetik eşyalar gibi çeşitli endüstriyel, tarımsal ve evsel tüketim ürünlerinde bulunmaktadır. Bisfenol A (BFA) gıdaların tüketime sunulduğu kaplarda, bebek biberonlarında, polikarbonat plastik ve epoksi reçinelerin üretimde; dişçilikte kullanılan karışımlarda ve dolgu macunlarında kullanılmaktadır. Endokrin sistemi bozucu bu maddeler suda yaşayan ve karasal organizmalarda birikirler. Bu yüzden bu bileşikler besin zinciri yoluyla insanlara kadar ulaşabilirler. Ksenoöstrojenler olarak da adlandırılan bu kimyasalların çoğu östrojenik, karsinojenik veya toksik olabilmektedir. NF ve BFA, östrojen reseptörlere bağlanarak östrojenik etki göstermektedir. BFA erkek ve dişi üreme hücreleri ile süt bezlerinde morfolojik ve fonksiyonel hasarlara yol açmaktadır. Bu hasarlar döllenmeyi azaltırken, meme ve prostat kanserlerine neden olabilmektedir. Bütün bu özelliklerinden dolayı, bu çalışmanın ana konusu, NF ve BFA'nın sperm ve oositler üzerindeki olumsuz etkilerinin belirlenmesidir. Bu tez çalışmasında NF ve BFA'nın çevresel dozlardaki (0,01; 0,1; 1; 10 ve 100 µg NF/ml ile 0,01; 0,1; 1; 10 ve 100 µg BFA/ml) konsantrasyonları seçilmiştir. NF ve BFA'dan kaynaklanan, sperm DNA'sındaki anormallikler ve oosit olgunlaşmasına etkiler araştırılmıştır. NF ve BFA'nın sperm DNA'sına olan etkilerini belirlemek amacıyla Tunel assay kullanılmış ve NF ve BFA'nın oosit olgunlaşmasına etkisi TC-199 ile test edilmiştir. Bu tez çalışması; 100 µg NF /ml, 1 µg BFA/ml ve 100 µg BFA/ml konsantrasyon gruplarının sığır sperm hücrelerinde DNA kırılmalarına neden olarak apoptoza neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca 100 µg NF/ml ve 0,01; 0,1; 1; 10 ve 100 µg BFA/ml konsantrasyon grupları, sığır oositlerinde olgunlaşma oranını azaltmıştır. Sonuç olarak NF ve BFA'nın sperm DNA'sının bütünlüğü ve oosit maturasyonu üzerinde olumsuz etkileri olduğu söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Nonilfenol, Bisfenol A, Tunel boyama, endokrin sistem bozucular

SUMMARY

The Effects of Nonylphenol and Bisphenol A on Gamete Physiology on Bovine

Alkylphenol ethoxylates (APEOs) are used as non-ionic surfactants in variety of industrial, agricultural and domestic products such as pesticides, detergents, paints and cosmetics. Bisphenol A (BPA) is used in production of food containers, baby bottles, polycarbonated plastics and epoxy resins and also used in composites and sealants in dentistry. These endocrine disrupters are bioaccumulated in both aquatic and terrestrial organisms. Therefore, these compounds can reach to human being through food chains. These endocrine disrupters also called Xenoestrogen have estrogenic, carcinogenic and toxic effects. NP and BPA exert their estrogenic effects by binding to estrogen receptors. BPA causes morphological and functional alterations in male and female genital tract and mammary glands. These alterations may reduce fertility, mammary and prostate cancer. Therefore, the main purpose of this study is to determine the adverse effects of NP and BPA on sperm and oocytes. The effects environmentally relevant NP and BPA concentrations such as 0,01; 0,1; 1; 10 and 100 μg NP/ml or 0,01; 0,1; 1; 10 and 100 μg BPA/ml) were chosen. NP and BPA mediated abnormalities in sperm DNA and oocyte maturation were investigated. TUNEL assay was employed to determine the adverse effects of NP and BPA on sperm DNA, whereas the effects of NP and BPA on oocyte maturation in TC-199 were tested. The present study demonstrated that 100 μg NP/ml and 1 as well as 100 μg BPA/ml concentrations induced apoptosis by causing DNA breaks in bovine sperm cells. This study also showed that 100 μg NP/ml and 0,01; 0,1; 1; 10 and 100 μg BPA/ml concentration inhibits oocyte maturation. It is concluded that NP and BPA have adverse effects on the integrity of sperm DNA and oocyte maturation.

Keywords: Nonylphenol, Bisphenol A, TUNEL Assay, endocrine disruptors

KAYNAKLAR

- ABD ÇEVRE KORUMA AJANSI (U.S Environmental Protection Agency), (2010). Nonylphenol (NP) and Nonylphenol Ethoxylates (NPEs) Action Plan[RIN 2070-ZA09].
- ACKERMANN, G.E., SCHWAIGER, J., NEGELE, R.D., FENT, K. (2002). Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **60**, 203–221.
- ADEMOLLO, N., FERRARA, F., DELISE, M., FABIETTI, F., FUNARI, E.(2008). Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environment International*, **34**: 984-987.
- AHEL, M., GIGER, W., KOCH, M. (1994a). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment I: Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* **28**, 1131–1142.
- AHEL, M., GIGER, W., SCHAFFNER, C. (1994b). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Res.* **28**: 1143-1152.
- AHEL, M., HRSAK, D. AND GIGER, W. (1994c). Aerobic transformation of short-chain alkylphenol polyethoxylates by mixed bacterial cultures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **26**: 540-548.
- AHEL, M., SCHAFFNER, C., GIGER, W. (1996). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment 3. occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Res.* **30**: 37-46.
- ALY, H. A. A., DOMÈNECH, Ò., BANJAR, Z. M. (2012). Effect of nonylphenol on male reproduction: Analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **261**: 134–141.
- ARENDS, M.J., MORRIS, R.G., WYLLIE, A.H. (1990). Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.*, **136**: 593–608.
- ARSLAN, O.C., PARLAK, H., ORAL, R., KATALAY, S. (2007). The effects of nonylphenol and octylphenol on embryonic development of Sea Urchin (*Paracentrotus lividus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **53**: 214–219.
- AVCI, G., UĞUZ, C., BAYRAM, İ., ERDOĞAN, M., KÜÇÜKKURT, İ., AKBULUT, M.D., LENGER, Ö.F., İŞCAN, M., TOGAN, İ. (2010). Effects of Nonylphenol on Growth Parameters and Antioxidant Defense System in Japanese Quails (*Coturnix japonica*). *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **16 (4)**: 537-546
- BAEK, H.J., HWANG, I.J., KIM, K.S., LEE, Y.D., KIM, H.B., YOO, M.S. (2007). Effects of BFA and DES on longchingoby (*Chasmichthys dolichognathus*) in vitro during the oocyte maturation. *Marine Environmental Research*, **64**: 79–86.

- BALAKRISHNAN, B., THORSTENSEN, E., PONNAMPALAM, A., MITCHELL, M.D. (2011). Passage of 4-nonylphenol across the human placenta. *Placenta*, **32**: 788-792.
- BALL, H. A., REINHARD, M. AND MCCARTY, P. L. (1989). Biotransformation of halogenated and nonhalogenated octylphenol polyethoxylate residues under aerobic and anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* **23**: 951-961
- BARBER, L.B., THURMAN, E.M., SCHROEDER, M.P., LEBLANC, D.R..(1988). Long-term fate of organic micropollutants in sewage-contaminated groundwater. *Environ Sci Technol*, **22**: 205–11.
- BENACHOUR, N., MOSLEMI, S., SIPAHUTAR, H., SERALINI, G.E.(2007). Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrinedisrupters alone and in combination. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **222**: 129–140.
- BENNETTS, L. E., DE IULIIS, G. N., NIXON, B., KIME, M., ZELSKI, K., MCVICAR, C. M., LEWIS, S. E., AITKEN, R. J. (2008). Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: Evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutation Research*, **641**: 1–11.
- 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. In Food and chemical toxicology. *British Industrial Biological Research Association*, **44**: 1355-1361.
- BIGSBY, R., CHAPIN, R.E., DASTON, G.P. (1999). Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environmental Health Perspect*, **107**: 613-618.
- BIRD, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, **447**: 396–398.
- BLACKBURN, M.A., WALDOCK, M.J. (1995). Concentration of alkylphenol in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research*, **29**: 1623-1629.
- BOLGER, R., WIESE, T.E., ERVIN, K., NESTICH, S., CHECOVICH, W.(1998). Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ. Health Perspect.*, **106(9)**: 551-557.
- BORA, G., ERDEM, H. (2007). Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **38**: 48-54.
- BOYACIOĞLU, M., ÇAKAL ARSLAN, Ö., PARLAK, H., KARAASLAN M.A.(2007). Mutagenicity of nonylphenol and octylphenol using salmonella mutation assay. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, **24 (3-4)**: 299-302.
- BREDHULT, C., SAHLIN, L., OLOVSSON, M. (2009). Gene expression analysis of human endometrial endothelial cells exposed to Bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, **28**: 18–25.
- BREVINI, T.A.L., VASSENA, R., PAFFONI, A., FRANCISCI, C., FASCIO, U., GANDOLFI, U. (2004). Exposure of pig oocytes to PCBs during in vitro maturation: effects on developmental competence, cytoplasmic remodelling and communications with cumulus cells. *European Journal of Histochemistry.*, **48 (4)**:347-356

- BRUNNER, P.H., CAPLI, S., MARCOMINI, A., GIGER, W. (1988). Occurrence and behavior of linear alkylbenzene sulphonates, nonylphenol, nonylphenol mono- and nonylphenol diethoxylates in sewage and sewage sludge treatment. *Water Res.*, **22**:1465-1472.
- CAMPBELL P. (2002). Alternatives to nonylphenol ethoxylates. Review of toxicity, biodegradation & technical-economic aspects. *ToxEcology Environmental Consulting, Vancouver, B.C., Canada. Report for Environment Canada.*
- CARNEY, E.W., HOBERMAN, A.M., FARMER, D.R., KAPP, R.W., NIKIFOROV, A.I., BERNSTEIN, M., HURTT, M.E., BRESLIN, W.J., CAAGEN, S.Z., DASTON, G.P.(1997). Estrogen modulation: Tiered testing for hazard evaluation. American Industrial Health Council. *Reprod. Toxicol.*, **11(6)**: 879-92.
- CEFIC. (2002). Chemistry sectors: Detergents. CESIO surfactants statistics for Western Europe. Brussels: Author.
- CES (1993). Uses, Fate and Entry to the Environment of Nonylphenol Ethoxylates. Consultants in Environmental Sciences Ltd (for the Department of the Environment), Beckenham, Kent.
- CHEN, M., CHANG, C.C., SHEN, Y.J., HUNG, J.H., GUO, B.R., CHUANG, H.Y., MAO, I.F. (2008). Quantification of prenatal exposure and maternal-fetal transfer of nonylphenol. *Chemosphere*, **73**: 239–245.
- CHEN, M.L., LEE, H.Y., CHUANG, H.Y., GUO, B.R., MAO, I.F.(2009). Association between nonylphenol exposure and development of secondary sexual characteristics. *Chemosphere*, **76**: 927-931.
- CHEN, G.W., DING, W.H., KU, H.Y., CHAO, H.R., CHEN, H.Y., HUANG, M.C., WANG, S.L.(2010). Alkylphenols in human milk and their relations to dietary habits in central Taiwan. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 1939–1944.
- CHITRA, K.C., LATCHOUMY CANDANE, C., MATHUR, P.P. (2003). Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology*, **185**: 119-/127.
- COOK, J.C., KAPLAN, A.M., DAVIS, L.G., OCONNOR, J.C.(1997). Development of a tier 1 screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs). *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **26**: 60-68.
- COOPER, J.E., KENDIG, E.L., BELCHER, S.M.(2011). Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles. *Chemosphere*, **85**: 943–947.
- CORSI, S.R., ZITOMER, D.H., FIELD, J.A., CANCELLA, D.A. (2003). Nonylphenol ethoxylates and other additives in aircraft de-icers, anti-icers, and waters receiving airport runoff. *Environ Sci Technol*, **37**: 4031–4037.
- COX, C.(2003). Nonylphenol and related chemicals. *Journal Of Pesticide Reform*, **16(1)** (corrected 4/2003).
- CRISP, T. M., CLEGG, E. D., COOPER, R. L., WOOD, W. R., ANDERSON, D. G., BAETCKE, K. R., HOFFMANN, J. L., MORROW, M. S., RODIER, D. J., SCHAEFFER, J. E., TOUART, L. W., ZEEMAN, M. G., PATEL, Y. M. (1998). Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. *Environ Health Perspect*, **106(1)**: 11-56.

- ÇAKAL ARSLAN, Ö., PARLAK, H.(2007). Embryotoxic effects of nonylphenol and octylphenol in sea urchin *Arbacialixula*. *Ecotoxicology*, **16**: 439-444.
- DARBRE, P.D. (2006). Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Oncology*, Vol. 20, No. 1: 121–143.
- DE JAGER, C., BORNMAN, M.S., OOSTHUIZEN, J.M. (1999a). The effect of p-nonylphenol on the fertility potential of male rats after gestational, lactational and direct exposure. *Andrologia*, **31**: 107-13.
- DE JAGER, C., BORNMAN, M.S., VAN DER HORST, G. (1999b). The effect of p-nonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. *Andrologia*, **31**: 99-106.
- DIANA, A., DIMITRA, V. (2011). Alkylphenols and phthalates in bottled waters. *Journal of Hazardous Materials*, **185**: 281–286.
- DIANIN, (1891). Zhurnal russkogo fiziko-khimicheskogo obshchestva, **23**: 492
- DOERGE, D.R., TWADDLE, N.C., VANLANDINGHAM, M., BROWN, R.P., FISHER, J.W. (2011). Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague–Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **255**: 261–270.
- DUTTA, A. P. (2008, January 15). Authorities clueless: Carcinogen NP in a large number of products in India. *Down To Earth magazine*.
- ECB, (2003). European Chemicals Bureau, European Union Risk Assessment.
- EDWARDS, T.M., MYERS, J.M. (2007). Environmental Exposures and Gene Regulation in Disease Etiology. *Environmental Health Perspectives*, **115(9)**: 1265.
- EL GHAZZAWY, I. F., MELEIS, A. E., FARGHALY, E. F., SOLAIMAN, A. (2011). Histological study of the possible protective effect of pomegranate juice on bisphenol-A induced changes of the caput epididymal epithelium and sperms of adult albino rats. *Alexandria Journal of Medicine*, **47**: 125–137.
- ERLER, C., NOVAK, J. (2010). Bisphenol a exposure: human risk and health policy. *J. Pediatr. Nurs.*, **25(5)**: 400–407.
- EU-RAR, (2002). European Union Risk assessment on 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol. Final report. *European Union Risk assessment report*, **10**: 227. European Chemicals Bureau.
- FRIES, E., PUTTMANN, W. (2004). Occurrence of 4-Nonylphenol in rain and snow. *Atmospheric Environment*, **38**: 2013-2016.
- GAO, Q.T., TAM, N.F.Y. (2011). Growth, photosynthesis and antioxidant responses of two microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*, to nonylphenol stress. *Chemosphere*, **82**: 346–354.
- GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, **119(3)**: 493–501.

- GHIACI, M., KALBASI, R.J., ABBASPOUR, A. (2007). Adsorption isotherms of non-ionic surfactants on Na-bentonite (Iran) and evaluation of thermodynamic parameters. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **29**: 105-113.
- GONG, Y., HAN, X.D. (2006). Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reproductive Toxicology*, **22**: 623–630.
- GONG, Y., WU, J., HUANG, Y., SHEN, S., HAN, X. (2009). Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress *Toxicology Letters*, **186**: 84–95.
- GORCZYCA, W., GONG, J., DARZYNKIEWICZ, Z. (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*, **53**: 1945-1951.
- GREENPEACE (2011). Zehirli Giysiler.
- GUENTHER, K., HEINKE, V., THIELE, B., KLEIST, E., PRAST, H., RAECKER, T. (2002). Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ. Sci. Technol.*, **36**: 1676–1680.
- HALE, R.C., SMITH, C.L., DE FUR, P.O, HARVEY, E., BUSH, E.O. (2000). Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls. *Environ Toxicol Chem.*, **19**: 946–52.
- HAN, X.D., TU, Z.G., GONG, Y., SHEN, S.N., WANG, X.Y., KANG, L.N., HOU, Y.Y., CHEN, J.X. (2004). The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reprod Toxicol.*, **19(2)**: 215-221.
- HARVEY, P.W., JOHNSON, I. (2002). Approaches to the assessment of toxicity data with endpoints related to endocrine disruption. *Journal of Applied Toxicology*, **22**: 241-247.
- HATEF, A., ALAVI, S.M., ABDULFATAH, A., FONTAINE, P., RODINA, M., LINHART, O. (2012). Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations. *Ecotoxicol Environ Safety*, **76(2)**: 56-62.
- HEJMEJ, A., KOTULA-BALAK, M., GALAS, J., BILINSKA, B. (2011) Effects of 4-tert-octylphenol on the testes and seminal vesicles in adult male bank voles. *Reproductive Toxicology*, **31(1)**: 95-105.
- HESS-WILSON, J.K., KNUDSEN, K.E., (2006). Endocrine disrupting compounds and prostate cancer. *Cancer Letters*, **241**: 1–12.
- HO, S.M., TANG, W.Y., FRAUSTO, J.B., PRINS, G.S. (2006). Developmental prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 3 variant 3. *Cancer Research*. **66**: 5624-5632.
- HOSSAINI, A., DALGAARD, M., VINGGAARD, A.M., FRANDBSEN, H., LARSEN, J.J. (2001). In utero reproductive study in rats exposed to nonylphenol. *Reproductive Toxicology*, **15**: 537–543
- HUANG, H., LEUNG, L.K. (2009). Bisphenol A downregulates CYP19 transcription in JEG-3 cells. *Toxicology Letters*, **189**: 248–252.

- HUNG, C.H., YANG, S.N., KUO, P.L., CHU, Y.T., CHANG, H.W., WEI, W.J., HUANG, S.K., JONG, Y.J. (2010). Modulation of cytokine expression in human myeloid dendritic cells by environmental endocrine disrupting chemicals involves epigenetic regulation. *Environmental Health Perspectives*, **118**(1): 67-72.
- HWANG, I.J., KIMA, H.W., KIMA, J.K., LEEB, Y.D., BAEKA, H.J. (2010). Estrogenicity of 4-nonylphenol and diethylstilbestrol on in vitro oocyte maturation of the dusky tripletooth goby, *Tridentiger obscurus*. *Animal Cells and Systems*, **14** (3): 161-167.
- ICIS Chemical Business Americas. (2007). Overview of the U.S. nonylphenol sector, *Focus on Surfactants*, 4.
- IFA, (2011). GESTIS Substance Database.
- IIDA, H., MAEHARA, K., DOIGUCHI, M., MORI, T., YAMADA, F. (2003). Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells. *Reproductive Toxicology*, **17**: 457-464.
- IZZOTTI, A., KANITZ, S., D'AGOSTINI, F., CAMOIRANO, A., DE FLORA, S. (2009). Formation of adducts by bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA in vitro and in liver and mammary tissue of mice. *Mutation Research*, **679**: 28-32.
- JACOBSEN, P.R., CHRISTIANSEN, S., BOBERG, J., NELLEMAN, C., HASS, U. (2010). Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats. *International Journal of Andrology*, **33**: 434-442.
- JI, G., XIA, Y., GU, A., SHI, X., LONG, Y., SONG, L., WANG, S., WANG, X. (2011). Effects of non-occupational environmental exposure to pyrethroids on semen quality and sperm DNA integrity in Chinese men. *Reproductive Toxicology*, **31**: 171-176.
- JIN, X., JIANG, G., HUANG, G., LIU, J., ZHOU, Q. (2004). Determination of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in surface waters from the Haihe River in Tianjin by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. *Chemosphere*, **56**: 1113-1119.
- JOHN, D.M., HOUSE, W.A., WHITE, G.F. (2000). Environmental fate of nonylphenol ethoxylates: Differential adsorption of homologs to components of river sediment. *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**: 293-300.
- JUBENDRADASS, R., D'CRUZ, S. C., RANI, S. J. A., MATHUR, P. P. (2012). Nonylphenol induces apoptosis via mitochondria- and Fas-L-mediated pathways in the liver of adult male rat. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **62**: 405-411.
- KARADENIZ, H., ÇALISKAN, A., UGUZ, C. (2010). Electrochemical Monitoring of the Interaction between 4-Nonylphenol and DNA by Graphite and Carbon Nanotube Modified Graphite Electrodes. *Analytical Sciences*, **26**: 1065-1069
- KORTNER, T.M., ARUKWE, A. (2007). The xenoestrogen, 4-nonylphenol, impaired previtellogenic oocyte culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by targeting the StAR protein and P450scc expressions. *General and Comparative Endocrinology*, **150**: 419-429.

- KORTNER, T.M., VANG, S.H., ARUKWE, A. (2009). Modulation of salmon ovarian steroidogenesis and growth factor responses by the xenoestrogen, 4-nonylphenol. *Chemosphere*, **77**: 989–998.
- KRIS-ETHERTON, P.M., HECKER, K.D., BONANOME, A., COVAL, S.M., BINKOSKI, A.E., HILPERT, K.F.A., GRIEL E., ETHERTON, T.D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American J. Med.*, **113(9)**: 71-88.
- KURUTO-NIWA, R., TATEOKA, Y., USUKI, Y., NOZAWA, R. (2007). Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere*, **66**: 1160-1164.
- KWACK, S.J., KWON, O.K., HYUNG, S., KIM, S.S., KIM, S.H., SOHN, K.H., LEE, R.D., PARK, C.H., JEUNG, E.B., AN, B.S., PARK, K.L. (2002). Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity in vitro and in vivo. *J. Toxicol. Environ. Health, A* **65**: 419–431.
- KWON, J.H., KATZ, L. E., LILJESTRAND, H. M. (2007). Modeling binding equilibrium in a competitive estrogen receptor binding assay. *Chemosphere*, **9**: 1025-1031.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., KLETZL, M., WEISMANN, T. (2005). Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. Fario*. *Aquatic Toxicology*, **75**: 213–224.
- LANGFORD, K.H., LESTER, J. N. (2002). Fate and behaviour of endocrine disrupters in wastewater treatment processes. In: Brikett JW, Lester JN, editors. Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes. Boca Raton, USA: CRC Press Inc.
- LEE, M.H., CHUNG, S.W., KANG, B.Y., PARK, J., LEE, C.H., HWANG, S.Y. (2003). Enhanced interleukin-4 production in CD4+ T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: involvement of nuclear factor-AT and Ca²⁺. *Immunology*, **109(1)**:76-86.
- LEE, M.H., KIM, E., KIM, T.S., (2004). Exposure to 4- tert-octylphenol, an environmentally persistent alkylphenol, enhances inter-leukin-4 production in T cells via NF-AT activation. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **197(1)**: 19-28.
- LE, H.H., CARLSON, E.M., CHUA, J.P., BELCHER, S.M. (2008). Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters*, **176**: 149-156.
- LEE, M.M. (2007). Endocrine Disrupters. *A Current Review of Pediatric Endocrinology*, 109-18.
- LEE, Y.J., RYU, H.Y., KIM, H.K., MIN, C.S., LEE, J.H., KIM, E., NAM, B.H., PARK, J.H., JUNG, J.Y., JANG, D.D., LEE, K.H., MA, J.Y., WON, H.S., IM, M.W., LEEM, J.H., HONG, Y.C., YOON, H.S. (2008). Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reproductive Toxicology*, **25**: 413-419.
- LENIE, S., CORTVRINDT, R., EICHENLAUB-RITTER, U., SMITZ, J. (2008). Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutation Research*, **651**: 71–81.

- LI, X., YING, G., ZHAO, J., CHEN, Z., LAI, H., SU, H., (2011). 4-Nonylphenol, bisphenol-A and triclosan levels in human urine of children and students in China, and the effects of drinking these bottled materials on the levels. *Environment International*, baskıda.
- LUKÁČOVÁ, J., KŇAŽICKÁ, Z., TVRDÁ, E., GREŇ, A., LUKÁČ, N., MASSÁNYI, P. (2012). The impact of nonylphenol (np) on the spermatozoa motility in vitro. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, **6**: 1551-1560.
- MAFFINI, M.V., RUBIN, B.S., SONNENSCHNEIN, C., SOTO, A.M. (2006). Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A *Molecular and Cellular Endocrinology*, **254–255**: 179–186.
- MAGUIRE, R.J. (1999). Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenoethoxylates. *Water Quality Research Journal of Canada*, **34**: 37-78.
- MAIA, J., CRUZ, J.M., SENDÓN, R., BUSTOS, J., SANCHEZ, J.J., PASEIRO, P. (2009). Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Research International*, **42**: 1410–1414.
- MAO, Z., ZHENG, X. F., ZHANG, Y. Q., TAO, X. X., LI, Y., WANG, W. (2012). Occurrence and biodegradation of nonylphenol in the environment. *Int. J. Mol. Sci.*, **13**: 491-505.
- MARIN, M.G., RIGATO, S., RICCIARDI, F., MATOZZO, V. (2008). Lethal and estrogenic effects of 4-nonylphenol in the cockle, *Cerastoderma glaucum*. *Marine Pollution Bulletin*, **57**: 552–558.
- MARUYAMA, K., YUAN, M., OTSUKI, A. (2000). Seasonal Changes in Ethylen Oxide Chain Length of Poly(oxyethylene)alkylphenol Ether Nonionic Surfactants in Three Main Rivers in Tokyo. *Environ. Sci. Technol.*, **34**: 343-348.
- MASSART, F., HARRELL, J.C., FEDERICO, G. (2005). Human breast milk and xenoestrogen exposure: A possible impact on human health. *J. Perinat.*, **25**: 282-288.
- MCLACHLAN, J.A. (1980). Estrogens in the Environment. Elsevier, North Holland.
- MCLACHLAN, J.A. (1985). Estrogens in the environment II. Elsevier, New York.
- MCLACHLAN, J.A., SIMPSON, E., MARTIN, M. (2006). Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Practice Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **20**: 46-63.
- MEEKER, J. D., EHRLICH, S., TOTH, T. L., WRIGHT, D. L., CALAFAT, A. M., TRISINI, A. T., YE, X., HAUSER, R. (2010). Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reproductive Toxicology*, **30**: 532–539.
- MEHRANJANI, M.S., NOORAFSHAN, A., HAMTA, A., MOMENI, H.R., ABNOSI, M.H., MAHMOODI, M., ANVARI, M., HAZAVEH, M. (2010). Effects of vitamin E on ovarian tissue of rats following treatment with p-nonylphenol: A stereological study. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, **8(1)**: 1-9.
- MEHTONEN, J., MUNNE, P. (2011). Measures for emission reduction of nonylphenol (NP) and nonylphenol ethoxylates (NPE) in the Baltic sea area. *Cohiba Guidance Document*, **6**: 5-7.

- MIAO, M., YUAN, W., ZHU, G., HE, X., LI, D. (2011). In utero exposure to bisphenol-A and its effect on birth weight of offspring. *Reproductive Toxicology*, **32**: 64–68.
- MICHELANGELI, F., OGUNBAYO, O.A., WOOTTON, L.L., LAI, P.F., AL-MOUSA, F., HARIS, R.M., WARING, R.H., KIRK, C.J. (2008). Endocrine Disrupting alkylphenols: Structural requirements for their adverse effects on Ca²⁺ pumps, Ca²⁺ homeostasis&Sertoli TM4 Cell viability. *Chemico-Biological Interactions*, **176**: 220-226.
- MITA, L., BALDI, A., DIANO, N., VIGGIANO, E., PORTACCIO, M., NICOLUCCI, C., GRUMIRO, L., MENALE, C., MITA, D.G., SPUGNINI, E.P., VICECONTE, R., CITRO, G., PIERANTONI, R., SICA, V., MARINO, M., SIGNORILE, P.G., BIANCO, M. (2012). Differential accumulation of BFA in some tissues of offspring of Balb-C mice exposed to different BFA doses. *Environmental toxicology and pharmacology*, **33**: 9–15.
- MIURA, C., TAKAHASHI, N., MICHINO, F., MIURA, T. (2005). The effect of para-nonylphenol on Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatogenesis in vitro. *Aquatic Toxicology*, **71**: 133–141.
- MLYNARCÍKOVÁ, A., NAGYOVÁ, E., FICKOVÁ, M., SCSUKOVÁ, S. (2009). Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte–cumulus complexes. *Toxicology in Vitro*, **23**: 371–377.
- MOHAMED, E.S.A., PARK, Y.J., SONG, W.H., SHIN, D.H., YOU, Y.A., RYU, B.Y., PANG, M.G. (2011). Xenoestrogenic compounds promote capacitation and acrosome reaction in porcine sperm. *Theriogenology*, **75**: 1161–1169.
- MØRCK, T.J., SORDA, G., BECHI, N., RASMUSSEN, B.S., NIELSEN, J.B., IETTA, F., RYTTING, E., MATHIESEN, L., PAULESU, L., KNUDSEN, L.E. (2010). Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, **30**: 131–137.
- NAKAMURA, D., YANAGIBA, Y., DUAN, Z., ITO, Y., OKAMURA, A., ASAEDA, N., TAGAWA, Y., LI, C., TAYA, K., ZHANG, S.Y., NAITO, H., RAMDHAN, D.H., KAMIJIMA, M., NAKAJIMA, T. (2010). Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicology Letters*, **194**: 16–25.
- NAM, S., SEO, Y., KIM, M. (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*, **79**: 949–952.
- NIMROD, A.C., BENSON, W.H. (1996). Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Crit. Rev. Toxicol.*, **26(3)**: 335-364.
- NTP (National Toxicology Program). (2008). U.S. Department of Health and Human Services. CERHR Expert Panel Report for Bisphenol A.
- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., UGUZ, C., FIRST, N.L. (1994). Differences in the role of Camp during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Bol. Reproduct.*, **51**: 1099-1108.
- PERETZ, J., GUPTA, R.K., SINGH, J., HERNÁNDEZ-OCHOA, I., FLAWS, J.A. (2011). Bisphenol A impairs follicle growth, inhibits steroidogenesis, and downregulates rate-

limiting enzymes in the estradiol biosynthesis pathway. *Toxicological Sciences*, **119**: 209-217.

- PETRO, E.M.L., LEROY, J.L.M.R., VAN CRUCHTEN, S.J.M., JORSSEN, E.P.A., BOLLS, P.E.J. (2011). Endocrine disruptors and female fertility: Focus on ovarian follicular physiology. *Reproductive Toxicology*, **32**: 150–153
- PETROVIC, M., LACORTE, S., VIANA, P., BARCELO, D. (2002). Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment. *J. Chromatogr. A* **959**: 15–23.
- POCAR, P., AUGUSTIN, R., GANDOLFI, F., FISCHER, B. (2003). Toxic effects of in vitro exposure to p-tert-octylphenol on bovine oocyte maturation and developmental competence. *Biology Of Reproduction*, **69**: 462–468.
- PORTE, C., BIOSCA, X., PASTOR, D., SOLE, M., ALBAIGES, J.(2000). The Aegean Sea oil spill. 2.Temporal study of the hydrocarbons accumulation in bivalves. *Environ. Sci.Technol.*,**34**: 5067–5075.
- PROKOP, Z., HANKOVA, L., JERABEK, K. (2004). Bisphenol A synthesis–modeling of industrial reactor and catalyst deactivation. *Reactive & Functional Polymers*, **60**: 77–83.
- RAECKER, T., BJOERN, T., BOEHME, R. M., GUENTHER, K. (2011). Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: Considerable daily intake of nonylphenol for babies. *Chemosphere*, **82**: 1533–1540.
- RAMAKRISHNAN, S., WAYNE, N.L. (2008). Impact of Bisphenol A on early embryonic development and reproductive maturation. *Reproductive Toxicology*, **25**: 177–183.
- REN, L., MELISSA, A.M., LECH, J.J. (1997). Estrogenic effects of nonylphenol on pS2, ER and MUC1 gene expression in human breast cancer cells-MCF-7. *Chemico-Biological Interactions*, **104**: 55-64.
- RENNER, R. (1997). European bans on surfactants trigger Transatlantic debate. *Environmental Science and Technology*, **31**:316A-320A.
- REUTERS. (22.06.2010). Experts demand European action on plastics chemical. Erişim: <http://www.reuters.com/article/2010/06/22/us-chemical-bpa-health-idUSTRE65L6JN20100622>. Erişim tarihi: 10.10.2012.
- RHEE, J.S., KIM, B.M., LEE, C.J., YOON, Y.D., LEE, Y.M., LEE, J.S. (2011). Bisphenol A modulates expression of sex differentiation genes in the self-fertilizing fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Aquatic Toxicology*, **104**: 218– 229.
- RUDELL,R.A., PEROVICH, L.J. (2009). Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. *Atmospheric Environment*, **43**: 170-181.
- SAINATH, S.B., MEENA, R., VENKAT, C.H., KUMAR, S., KALAPANA, P., SWETHA, K.N., DEVI, N.S., REDDY, P.S. (2011). Embryonic exposure to octylphenol induces changes in testosterone levels and disrupts reproductive efficiency in rats at their adulthood.*Food and Chemical Toxicology*, **49 (4)**: 983-990.

- SALIAN, S., DOSHI, T., VANAGE, G. (2009). Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sciences*, **85**: 742–752.
- SEIKE, N., WANIBUCHI, H., MORIMURA, K., WEI, M., NISHIKAWA, T., HIRATA, K., YOSHIKAWA, J., FUKUSHIMA, S. (2003). Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model. *Cancer Letters*, **192**: 25–36.
- SEKI, S., AOKI, M., HOSOKAWA, T., SAITO, T., MASUMA, R., KOMORI, M., KURASAKI, M. (2011). Bisphenol-A suppresses neurite extension due to inhibition of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in PC12 cells. *Chemico-Biological Interactions*, **194**: 23–30.
- SETA, D.D., MINDER, I., DESSI-FULGHERI, F., FARABOLLINI, F. (2005). Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. *Brain Research Bulletin*, **65** (3): 255-260.
- SHANG, D.Y., MACDONALD, R.W., IKONOMOU, M.G. (1999). Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of Georgia, British Columbia. *Environ. Sci. Technol.*, **33**: 1366-1372.
- SHEEHAN, D.M. (2000). Activity of environmentally relevant low doses of endocrine disruptors and the bisphenol a controversy: initial results confirmed. *proc. soc. Exp. Biol. Med.*, **224**: 57-60.
- SOARES, A., GUIEYSSE, B., JEFFERSON, B., CARTMELL, E., LESTER, J.N. (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, **34**: 1033–1049.
- SOLOMON, G.M., SCHETTLER, T. (2000). Environment and health. 6. Endocrine disruption and potential human health implications. *Canadian Medical Association Journal*, **1116**: 1467-74.
- 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*, **6**: 2149-2173.
- STAPLES, C., DORN, P.B., KLECKA, G.M., O'BLOCK, S.T., BRANSON, D.R., HARRIS, L.R. (2000). Bisphenol A concentrations in receiving waters near US manufacturing and processing facilities. *Chemosphere*, **40**: 521-525.
- STOKER, C., REY, F., RODRIGUEZ, H., RAMOS, J.G., SIROSKY, P., LARRIERA, A., LUQUE, E.H., MUÑOZ-DE-TOROA, M. (2003). Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *General and Comparative Endocrinology*, **133**: 287–296.
- SUSIJARO, M., HASSOLD, J., FREEMAN, E., HUNT, P. (2007). Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genetics*, 63-70.
- TABB, M.M., BLUMBERG, B. (2006). New models of action for endocrine disrupting chemicals. *Mol. Endocrinol.*, **20**: 475-482.

- TAN, B.L.L., KASSIM, N.M., MOHD, M.A. (2003). Assessment of pubertal development in juvenile male rats aftersub-acute exposure to bisphenol A and nonylphenol. *Toxicology Letters*, **143**: 261-270.
- TANAKA, J.N., GRIZZLE, J.M. (2002). Effects of nonylphenol on the gonadal differentiation of thehermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus*. *Aquatic Toxicology*, **57**: 117–125.
- TANG, W.Y., HO, S.M. (2007). Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease.*Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, **8(2)**: 173-182
- TAYLOR, J.A., RICHTER, C.A., RUHLEN, R.L., VOM SAAL, F.S. (2011). Estrogenic environmental chemicals and drugs: Mechanisms for effects on thedeveloping male urogenital system. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **127**: 83– 95.
- TIWARIA, D.,KAMBLEA, J., CHILGUNDEA, S., PATIL, P., MARU, G., KAWLE, D., BHARTIYA, U., JOSEPH, L., VANAGEA, G. (2012). Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: An endocrine disruptor. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **743 (1-2)**: 83-90.
- TOPPARI, J., LARSEN, J., CHRISTIANSEN, P., GIWERCMAN, A., GRANDJEAN, P., GUILLETTE JR, L., JEGOU, B., JENSEN, T., JOUANNET, P., KEIDING, N., LEFFERS, H., MCLACHLAN, Z., MEYER, O., MULLER, J., RAJPERT-DE-MEYTS, E., SCHEIKE, T., SHARPE, R., SUMPTER, J., SKAKKEBAEK, N.(1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspec.*, **104(4)**: 741-803.
- TSUTSUMI, O. (2005). Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disruptingchemicals and their risk for human reproduction. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **93**: 325–330.
- TUBAU, I., VÁZQUEZ-SUÑÉ, E., CARRERA, J., GONZÁLEZ, S., PETROVIC, M., LÓPEZ DE ALDA, M. J., BARCELÓ, D. (2010). Occurrence and fate of alkylphenol polyethoxylate degradation products and linear alkylbenzene sulfonate surfactants in urban ground water: Barcelona case study. *Journal of Hydrology*, **383**: 102–110.
- UGUZ, C., TOGAN, I., EROGLU, Y., TABAK, I., ZENGİN, M., ISCAN, M.(2003a). Alkylphenol concentrations in two rivers of Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **14**: 87-88.
- UGUZ, C., ISCAN, M., ERGUVEN, A., ISGOR, B., TOGAN, I. (2003b). The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Environmental Research*, **92(3)**: 262-270.
- UGUZ, C., VARISLI, O., AGCA, C., AGCA, Y. (2008). Effects of nonylphenol on motility, acrosomal integrity and mitochondrial membrane potential of epididymal rat sperm. *Reproduction, Fertility and Development*, **20**: 194-194.
- UĞUZ, C.,VARISLI, O., AGCA, C., AGCA, Y. (2009).Effects of nonylphenol on motility and subcellular elements of epididymal rat sperm. *Reproductive Toxicology*, **28**: 542–549.
- VIVACQUA, A., RECCHIA, A.G., FASANELLA, G., GABRIELE, S., CARPINO, A., RAGO, V.(2003). The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine*, **22 (3)**: 275-284.

- WANG, J., SHIM, W. J., YIM, U. H., KANNAN, N., LI, D. (2010). Nonylphenol in bivalves and sediments in the northeast coast of China. *Journal of Environmental Sciences*, **22** (11): 1735–1740.
- WANG, X., HAN, X., HOU, Y., YAO, G. (2003). Effect of Nonylphenol on Apoptosis of Sertoli Cells in Vitro. *Environmental Contamination and Toxicology*, **70** (5): 898-904.
- WARHURST, A.M. (1995). An environmental assessment of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols. Friends of the Earth, London, UK.
- WEBER, L.P., KIPARISSIS, Y., HWANG, G.S., NIIMI, A.J., JANZ, D.M., METCALFE, C.D. (2002). Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **131**: 51-59.
- WEI, X., HUANG, Y., WONG, M.H., GIESY, J.P., WONG, C.K. (2011). Assessment of risk to humans of bisphenol A in marine and freshwater fish from Pearl River Delta, China. *Chemosphere*, **85**: 122–128.
- WU, J.J., WANG, K.L., WANG, S.W., HWANG, G.S., MAO, I.F., CHEN, M.L., WANG, P.S. (2010). Differential effects of nonylphenol on testosterone secretion in rat Leydig cells. *Toxicology*, **268**(1-2): 1-7
- YANG, F., XU, Y., HUI, Y. (2006). Reproductive effects of prenatal exposure to nonylphenol on zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **142**: 77–84.
- YAO, G., HU, Y., LIANG, J., HOU, Y. (2005). Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis is related to Fas/FasL pathway. *Life Sciences*, **77**: 3306–3320.
- YEŞİLKAYA, E. (2008). Endokrin Bozucular. *Güncel Pediatri Dergisi*, **6**: 76-82.
- YOSHIMURA, K. (1986). Biodegradation and Fish Toxicity of Nonionic Surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **63**: 1590-1596.
- YU, C., TAI, F., SONG, Z., WU, R., ZHANG, X., HE, F. (2011). Pubertal exposure to bisphenol A disrupts behavior in adult C57BL/6J mice. *Environmental toxicology and pharmacology*, **31**: 88–99.
- ZAMA, A.M., UZUMCU, M. (2010). Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: An ovarian perspective. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **31**: 420–439.
- ZEMHERİ, F. (2011). Nonylphenol ve bisfenol A'nın Ames/Salmonella/mikrozom test yöntemi kullanılarak mutajenik etkisinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ZHOU, J., LIU, R., WILDING, A., HIBBERD, A. (2007). Sorption of selected endocrine disrupting chemicals to different aquatic colloids. *Environ Sci Technol*, **41**: 206-213.
- ZHOU, J., ZHU, X., CAI, Z. (2011). The impacts of bisphenol A (BFA) on abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) embryonic development. *Chemosphere*, **82**: 443–450.

ÖZGEÇMİŞ

Selcen Süheyla Ergün, 1977'de Evciler'de doğdu. İlköğrenimini Evciler'de, orta ve lise öğrenimini Uşak'ta tamamladı. Uşak Anadolu Lisesi'nden 1994'te mezun oldu. Lisans eğitimini 1998'de, Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği'nde tamamladı. 1999-2000 Eğitim-Öğretim yılında Bildem Dershanesi'nde Biyoloji Öğretmeni olarak görev yaptı. 2001 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamladı. 2003 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Evli ve iki çocuk annesidir.