

**GÜNLÜK HAYATTA SIKLIKLA KULLANILAN  
FİTALATLARIN METABOLİTLERİ MONO ETİL  
HEKZİL FİTALAT (MEHP) VE MONO BÜTİL  
FİTALATIN (MBP) OLASI ETKİLERİNİN IN VIVO VE IN  
VITRO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION WITH IN VIVO AND IN VITRO  
METHODS FOR POSSIBLE EFFECTS OF MONO  
ETHYL HEXYL PHTHALATE AND MONO BUTYL  
PHTHALATE THAT ARE PHTHALATE METABOLITES  
FREQUENTLY USED IN DAILY LIFE**

**GÖZDE KARABULUT**

**Prof. Dr. NURHAYAT BARLAS**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

*Canım Aileme...*

## ÖZET

# GÜNLÜK HAYATTA SIKLIKLA KULLANILAN FİTALATLARIN METABOLİTLERİ MONO ETİL HEKZİL FİTALAT (MEHP) VE MONO BÜTİL FİTALATIN (MBP) OLASI ETKİLERİNİN IN VIVO VE IN VITRO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

**Gözde KARABULUT**

**Doktora, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nurhayat Barlas**

**Eylül 2020, 169 sayfa**

Endokrin bozucular, endokrin sistem tarafından sentezlenen hormonların etkilerini değiştirerek, engelleyerek ya da taklit ederek, canlı organizma üzerinde önemli etkiler oluşturan kimyasallardır. Fitalatlar, endokrin bozucu kimyasalların başında gelmektedir. Geçtiğimiz 10 yıl içinde diyabet görülme oranı artarak 3 katına yaklaşmıştır. Önümüzdeki 20 yılda ise diyabetli hasta sayısının 300 milyondan fazla olacağı öngörülmektedir. Endokrin bozucuların metabolizma, üreme ve yağ dokusu ile olan ilişkileri göz önüne alındığında diyabetle ilişkili olmaları olası görünmektedir. Di bütil fitalat (DBP) ve Di-etilhekzil fitalat (DEHP) en çok kullanılan fitalatların başında gelmektedir. Fitalatların emilimi ve metabolizması memelilerde oldukça hızlıdır ve yapılan çalışmalarda açığa çıkan metabolitlerin birçoğunun ana maddeye kıyasla daha toksik olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden bu çalışmada en çok maruz kalınan

fitalatların (DEHP ve DBP) metabolitleri mono 2-etil hekzil fitalat (MEHP) ve monobütül fitalat (MBP)'ın in vivo ve in vitro etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla, INS-1  $\beta$  hücreleri, 5 farklı konsantrasyonda (0,001  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M or 10  $\mu$ M olacak şekilde) MEHP ve MBP metabolitlerine maruz bırakılmış ve 24, 48 ve 72. saat sonundaki etkileri MTT sitotoksosite testi ile gösterilmiştir. Ayrıca total oksidan ve antioksidan seviyeleri ölçülmüştür. Beta hücre proliferasyonu ile ilişkili olarak FOXO-1 ve PDX-1 genleri, beta hücre fonksiyonları ile ilgili olarak SIRT-1, İnsulin-1 ve İnsulin-2 genleri, apoptoz ile ilgili olarak da p53, Bcl-2 ve Bcl-XL genlerinin mRNA ifade düzeyleri analiz edilmiştir. INS-1 hücrelerinden insülin salınımı ölçülmüştür. Sonuçlarda MEHP ve MBP için doz artışına bağlı olarak hücre canlılığında istatistiksel olarak azalma görülmüştür. Hücrelerden salgılanan insülin miktarında da, MEHP ve MBP uygulamalarından sonra kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir. Total oksidan seviyelerinde, zamana bağlı olarak hem MEHP hem MBP uygulaması sonucunda artış görülmüştür. Total antioksidan seviyelerinde ise azalmanın olduğu tespit edilmiştir.

İn vivo çalışmada her grupta 6 sıçan olacak şekilde 1 adet yağ kontrol, 5 adet MEHP (mono 2-etilhekzil fitalat) doz uygulama grubu ve 5 adet MBP (mono bütül fitalat) doz uygulama grubu olmak üzere 11 grup yer almıştır. Çalışmada 6 haftalık erkek sıçanlardan oluşan toplam 66 hayvan kullanılmıştır.

MEHP uygulama gruplarından 1. gruba 25 mg/kg/gün, 2. gruba 50 mg/kg/gün, 3. gruba 100 mg/kg/gün, 4. gruba 200 mg/kg/gün ve 5. gruba 400 mg/kg/gün 28 gün boyunca her sabah oral gavaj yoluyla uygulanmıştır. MBP uygulama gruplarından 1. gruba 25 mg/kg/gün, 2. gruba 50 mg/kg/gün, 3. gruba 100 mg/kg/gün, 4. gruba 200 mg/kg/gün ve 5. gruba 400 mg/kg/gün oral gavaj yoluyla 28 gün boyunca her sabah uygulanmıştır. Deney süresince sıçanlarda yem ve su tüketimlerinin yanı sıra vücut ağırlıkları da ölçülmüştür. Deney bitiminde sıçanlardan alınan serum örneklerinde biyokimyasal analizler için aspartat transaminaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), trigliserit, üre, glikoz, kreatinin, total protein miktarları ölçülmüştür. Deney sonunda alınan kanda insülin hormonu ölçülmüş ve hematolojik analizler yapılmıştır. Ayrıca pankreas,

karaciğer ve böbrek dokularında histopatolojik incelemeler yapılmıştır. İnsülin hormonu, 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP doz grubunda, yağ kontrol, 25 ve 50 mg/kg/gün gruplarına göre azalma göstermiştir. MBP doz gruplarında da yağ kontrol grubuna göre insülin miktarında azalma olmuştur. ALT ve AST enzimleri, trigliserit ile glikoz ölçümleri 100, 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP ve MBP doz gruplarında artış göstermiştir. 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP doz grubunda karaciğerde sinüzoidal dejenerasyon, böbrekte glomerulus dejenerasyonu, pankreasta langerhans adacıklarında dejenerasyon görülmüştür. 400 mg/kg/gün MBP doz grubunda karaciğerde sinüzoidal dejenerasyon görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre MEHP ve MBP, pankreatik  $\beta$  hücreleri ve pankreas üzerinde negatif etkiye sebep olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Mono (2-etilhekzil) Fitalat, Mono Bütil Fitalat, diyabet, sıçan, INS-1 hücreleri, histopatoloji, biyokimya.

## **ABSTRACT**

# **INVESTIGATION WITH IN VIVO AND IN VITRO METHODS FOR POSSIBLE EFFECTS OF MONO ETHYL HEXYL PHTHALATE AND MONO BUTYL PHTHALATE THAT ARE PHTHALATE METABOLITES FREQUENTLY USED IN DAILY LIFE**

**Gözde KARABULUT**

**Doctor of Philosophy, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Nurhayat Barlas**

**September 2020, 169 pages**

Endocrine disruptors are chemicals that have significant effects on the living organism by altering, inhibiting, or mimicking the effects of hormones synthesized by the endocrine system. Phthalates are one of the main endocrine disrupting chemicals. The incidence of diabetes has almost tripled in the past 10 years. In the following 20 years, the number of patients with diabetes diagnosis is thought to exceed 300 million. It seems likely that endocrine disruptors are associated with diabetes, given their relationship to reproduction, metabolism, and adipose tissue. Di butyl phthalate (DBP) and Di-Ethylhexyl phthalate (DEHP) are the most widely used phthalates. In mammals, the absorption and metabolism of phthalates are quite rapid and conducted studies showed that most of the metabolites formed have been more toxic than the main chemical. Therefore, in vivo and in vitro effects of mono 2-ethyl hexyl phthalate (MEHP)

and monobutyl phthalate (MBP), metabolites of the most exposed phthalates (DEHP and DBP) were examined in this study.

For this reason, INS-1  $\beta$  cells were exposed to MEHP and MBP metabolites at 5 different concentrations (such as 0.001  $\mu$ M, 0.01  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M or 10  $\mu$ M) and 3 different times like 24h, 48h and 72h. their effect at the end of the hour was demonstrated by the MTT cytotoxicity test. Total oxidant and antioxidant levels were also measured. The mRNA expression levels of FOXO-1 and PDX-1 genes in relation to beta cell proliferation, SIRT-1, Insulin-1 and Insulin-2 genes in relation to Beta cell functions, and p53, Bcl-2 and Bcl-xL genes in relation to apoptosis were analyzed. Insulin released from INS-1 cells was measured. In the results, A statistical decrease in cell viability was observed due to increased dose for MEHP and MBP. The amount of insulin secreted from the cells decreased after MEHP and MBP applications compared to the control group. Total oxidant levels increased as a result of both MEHP and MBP administration depending on time. Total antioxidant levels have been reduced.

In the study, there were 11 groups, including 1 oil control group, 5 MEHP (mono 2-Ethylhexyl phthalate) dose administration groups and 5 MBP (mono butyl phthalate) dose administration groups with 6 rats in each group. A total of 66 animals, consisting of 6-week-old male rats, were used.

As for the MEHP application groups; the first group was received 25 mg/kg/day of MEHP, second group was received 50 mg/kg/day of MEHP, the third group was received 100 mg/kg/day of MEHP, the fourth group was received 200 mg/kg/day of MEHP and the fifth group was received 400 mg/kg/day of MEHP through oral gavage every morning for 28 days. As for the MBP application groups; the first group was received 25 mg/kg/day of MBP each morning, second group was received 50 mg/kg/day of MBP each morning, third group was received 100 mg/kg/day of MBP each morning, the fourth group was received 200 mg/kg/day of MBP each morning and the fifth group was received 400 mg/kg/day of MBP each morning through oral gavage for 28 days. During the experiment, body weights were measured in addition to feed and water consumption in rats. For biochemical analyses, Alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), urea, triglycerides, glucose, creatinine,

total protein were measured in serum samples taken from rats at the end of the experiment.

Insulin hormone measurement and hematologic analyses were performed in the blood at the end of the experiment. In addition, histopathological examinations were carried out on pancreatic, liver and kidney tissues. Insulin hormone was decreased in 200 and 400 mg/kg/day of MEHP dose groups compared to oil control groups of 25 and 50 mg/kg/day of MEHP. There was also a decrease in the amount of insulin in the MBP dose groups compared to the fat control group. ALT and AST enzymes, triglycerides and glucose measurements increased in the 100, 200 and 400 mg / kg / day MEHP and MBP dose groups. In the 200 and 400 mg / kg / day MEHP dose group, sinusoidal degeneration in the liver, glomerulus degeneration in the kidney, degeneration in the islets of langerhans in the pancreas were observed. Sinusoidal degeneration was observed in the liver in the 400 mg / kg / day MBP dose group. According to the results, MEHP and MBP caused a negative effect on pancreatic  $\beta$  cells and pancreas.

**Keywords:** Mono (2-ethylhexyl) Phthalate, Mono Butyl Phthalate, Diabetes Mellitus, Rat, INS-1 cells, histopathology, biochemistry.



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca yanımda olup beni yönlendiren, bilgisini, tecrübesini ve desteğini benimle paylaşıp her konuda yol gösteren çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Nurhayat BARLAS'a,

Tezimin son halini almasında önerileri ile beni yönlendiren çok değerli jüri üyelerine,

Tezimin deneysel aşamalarında bana yardımcı olup yol gösteren, laboratuvarlarında çalışmama izin verip tezimin oluşmasında katkıda bulunan sayın Prof.Dr. Ayşe ÖZER'e,

Tezimin deneysel aşamalarında yanımda olup, yeni metot ve uygulamaları öğrenmemde destek olan sayın Araş. Gör. Dr. Bircan Sevgioğlu'na,

Akademik hayata beraber başladığım, birlikte zorlukları aşarak bu günlere geldiğim, deneylerimde bana sürekli yardım edip destek olan, kötü zamanlarımı atlatmamı sağlayan çok değerli dostum Sevcan ALDEMİR'e,

Tez çalışmalarım boyunca benden manevi etkisini hiçbir zaman eksik etmeyen çok değerli ablam Zeynep AYTEN'e,

Tanıştığımız günden beri iyi ve kötü günlerimde yanımda olan, her türlü desteğini benden esirgemeyen, bana güç verip moralimin yükselmesini sağlayan çok değerli dostum Elif Pınar BAŞARIR'a,

Hayatımın her anında yanımda olup beni destekleyen, beni büyütüp bu günlere getiren, güvenlerini hep arkamda hissettiğim, onlarsız bir hayat düşünemediğim canım babam Sermet KARABULUT'a, dünyanın en fedakar annesi olan canım annem Nuran KARABULUT'a, yol arkadaşım, canım kardeşim Aslı KARABULUT'a sonsuz teşekkür ederim.

Gözde KARABULUT

Ankara, Eylül 2020

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER.....	xi
ÇİZELGELER.....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Endokrin Bozucular.....	3
2.1.1 Fitalatlar.....	6
2.1.2 Fitalatların Biyotransformasyonu .....	9
2.1.3 Di-2-etil Hekzil Fitalat (DEHP) ve Metaboliti Mono Etil Hekzil Fitalat (MEHP).....	10
2.1.4 Di Bütil Fitalat (DBP) ve Metaboliti Mono Bütil Fitalat (MBP) .....	13
2.2. Endokrin Sistem.....	15
2.2.1 Pankreas .....	17
2.2.2. İnsülin .....	19
2.2.3. İnsülin Salınımının Kontrolü .....	21
2.2.4 Diabetes Mellitus .....	22
2.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller.....	24
2.4. Diyabette Oksidatif Değişiklikler ve Antioksidan Savunma .....	26
2.5. Diyabette Otoimmünite .....	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	30
3.1. Gereç.....	30
3.1.1. Kimyasal maddeler .....	30
3.1.2. Deney Hayvanlarının Temini .....	30
3.1.3. Laboratuvar Koşulları.....	31
3.2. Yöntem .....	31

3.2.1. Hücre Kültürü.....	31
3.2.2. Hücre Pasajı .....	31
3.2.3. MEHP ve MBP Uygulamaları.....	32
3.2.4. Total Antioksidan Statü (TAS) ve Total Oksidan Statü (TOS) Analizleri .....	33
3.2.5. MTT Hücre Canlılık Ölçüm Testi.....	33
3.2.6. İnsülin Sekresyon Ölçümü .....	34
3.2.7. RNA İzolasyonu, Komplementer DNA (cDNA) Sentezi ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri .....	35
3.2.8. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması .....	36
3.2.9. Biyokimyasal analizler .....	38
3.2.10. Hematolojik analizler.....	38
3.2.11. Hormon ve Antikor Analizi İçin İmmünolojik Testler .....	38
3.2.12. Histopatolojik İncelemeler .....	39
3.3. İstatistiksel Analizler.....	40
4. SONUÇLAR .....	41
4.1 Hücre Kültüründe MTT Sonuçları.....	41
4.1.1 MEHP Uygulaması Sonuçları .....	41
4.1.2. MBP uygulaması sonuçları .....	42
4.2 Total Antioksidan Statü (TAS) ve Total Oksidan Statü (TOS) Sonuçları	43
4.2.1 MEHP Uygulaması TAS Sonuçları .....	43
4.2.2 MBP Uygulaması TAS sonuçları .....	44
4.2.3 MEHP uygulaması TOS sonuçları .....	45
4.2.4 MBP Uygulaması TOS Sonuçları .....	46
4.3 İnsülin Sekresyon Ölçümü Sonuçları .....	47
4.3.1 MEHP Uygulaması Sonuçları .....	47
4.3.2 MBP Uygulaması Sonuçları.....	49
4.4.Real Time PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi Sonuçları .....	51
4.4.1 MEHP Uygulaması Sonucunda mRNA Ekspresyonu Seviyeleri.....	51
4.4.2. MBP Uygulaması Sonucunda mRNA Ekspresyonu Seviyeleri .....	51
4.5 Besin ve Su Tüketim Sonuçları .....	58
4.5.1 MEHP Uygulaması Sonucunda Sıçanların Yem ve Su Tüketimleri ..	58
4.5.2 MBP Uygulaması Sonucunda Sıçanların Yem ve Su tüketimleri .....	58
4.6. Vücut Ağırlık Değişimleri.....	63

4.6.1 MEHP Uygulaması Sonucunda Sıçanların Vücut Ağırlık Değişimleri	63
4.6.2 MBP Uygulaması Sonucunda Sıçanların Vücut Ağırlık Değişimleri..	63
4.7 Organ Ağırlık Değerleri .....	66
4.7.1. MEHP Uygulaması Sonucunda Sıçanların Organ Ağırlık Değişimleri .....	66
4.7.2. MBP Uygulaması Sonucunda Sıçanların Organ Ağırlık Değişimleri	66
4.8. Hematolojik İncelemeler.....	72
4.8.1 MEHP Uygulaması Sonucu Hematolojik Analizler .....	72
4.8.2 MBP Uygulaması Sonucu Hematolojik Analizler .....	72
4.9. İnsülin Hormonu Ölçüm Sonuçları .....	75
4.9.1 MEHP Uygulama Gruplarında İnsülin Hormonu Ölçüm Sonuçları ....	75
4.9.2 MBP Uygulama Gruplarında İnsülin Hormonu Ölçüm Sonuçları .....	75
4.10. Antikor Analizi Sonuçları .....	79
4.10.1. MEHP Uygulama Gruplarına Ait Antikor Ölçüm Sonuçları.....	79
4.10.2. MBP Uygulama Gruplarına Ait Antikor Ölçüm Sonuçları .....	79
4.11. Biyokimyasal Analiz Sonuçları .....	82
4.11.1. MEHP Uygulama Gruplarına Ait Biyokimya Analiz Sonuçları .....	82
4.11.2. MBP Uygulama Gruplarına Ait Biyokimya Analiz Sonuçları.....	82
4.12 Histopatolojik İncelemeler.....	93
4.12.1 Karaciğer Dokusuna Ait Bulgular .....	93
4.12.1 Böbrek Dokusuna Ait Bulgular.....	101
4.12.3 Pankreas Dokusuna Ait Bulgular .....	107
5. TARTIŞMA.....	114
6. SONUÇ .....	129
7.KAYNAKLAR.....	131
EKLER .....	165
EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi .....	165
EK 2 - Tezden Türetilmiş Bildiriler.....	167
EK 3 – Tez Çalışması Orijinallik Raporu .....	168
ÖZGEÇMİŞ .....	169

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 2.1.</b> Fitalatların genel kimyasal yapısı.....	7
<b>Şekil 2.2.</b> Çeşitli fitalat türleri.....	8
<b>Şekil 2.3.</b> DBP, BBP ve DEHP metabolizması sonucu MEHP ve MBP oluşması.....	11
<b>Şekil 2.4.</b> İnsandaki başlıca endokrin bezler.....	17
<b>Şekil 2.5.</b> İnsülin hormonunun sentezi.....	21
<b>Şekil 2.6.</b> İnsülin salınımının kontrolü.....	23
<b>Şekil 2.7.</b> Farklı diyabet türlerinde insülin hormonu mekanizması.....	25
<b>Şekil 3.1.</b> Oligonükleotid primer dizileri ve PCR programları.....	37
<b>Şekil 4.1.</b> INS-1 hücrelerinde MEHP uygulaması sonrası bulunan hücre canlılık yüzdeleri.....	42
<b>Şekil 4.2.</b> INS-1 hücrelerinde MBP uygulaması sonrası bulunan hücre canlılık yüzdeleri.....	43
<b>Şekil 4.3.</b> INS-1 hücrelerinde MEHP uygulaması sonunda total antioksidan statü (TAS) ölçüm sonuçları.....	44
<b>Şekil 4.4.</b> INS-1 hücrelerinde MBP uygulaması sonunda total antioksidan statü (TAS) ölçüm sonuçları.....	45
<b>Şekil 4.5.</b> INS-1 hücrelerinde MEHP uygulaması sonunda total oksidan statü (TOS) ölçüm sonuçları.....	46
<b>Şekil 4.6.</b> INS-1 hücrelerinde MBP uygulaması sonunda total oksidan statü (TOS) ölçüm sonuçları.....	47
<b>Şekil 4.7.</b> INS-1 hücrelerinde MEHP uygulaması sonunda 5,5 mmol/L glikoz içeren ortamda insülin sekresyon ölçüm sonuçları.....	48
<b>Şekil 4.8.</b> INS-1 hücrelerinde MEHP uygulaması sonunda 16,7 mmol/L glikoz içeren ortamda insülin sekresyon ölçüm sonuçları.....	49
<b>Şekil 4.9.</b> INS-1 hücrelerinde MBP uygulaması sonunda 5,5 mmol/L glikoz içeren ortamda insülin sekresyon ölçüm sonuçları.....	50
<b>Şekil 4.10.</b> INS-1 hücrelerinde MBP uygulaması sonunda 16,7 mmol/L glikoz içeren ortamda insülin sekresyon ölçüm sonuçları.....	51
<b>Şekil 4.11.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin miktarı.....	61
<b>Şekil 4.12.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri su miktarı.....	61
<b>Şekil 4.13.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin miktarı.....	63
<b>Şekil 4.14.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri su miktarı.....	63
<b>Şekil 4.15.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların karaciğer ağırlıkları.....	70
<b>Şekil 4.16.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların	

böbrek ağırlıkları.....	70
<b>Şekil 4.17.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların pankreas ağırlıkları.....	71
<b>Şekil 4.18.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların karaciğer ağırlıkları.....	71
<b>Şekil 4.19.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların böbrek ağırlıkları.....	72
<b>Şekil 4.20.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların pankreas ağırlıkları.....	72
<b>Şekil 4.21.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların insülin analiz sonuçları.....	79
<b>Şekil 4.22.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların insülin analiz sonuçları.....	79
<b>Şekil 4.23.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların ALT analiz sonuçları.....	85
<b>Şekil 4.24.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların AST analiz sonuçları.....	85
<b>Şekil 4.25.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların trigliserit analiz sonuçları.....	86
<b>Şekil 4.26.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların glikoz analiz sonuçları.....	86
<b>Şekil 4.27.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların total protein analiz sonuçları.....	87
<b>Şekil 4.28.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların albumin analiz sonuçları.....	87
<b>Şekil 4.29.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların kreatinin analiz sonuçları.....	88
<b>Şekil 4.30.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların üre analiz sonuçları.....	88
<b>Şekil 4.31.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların ALT analiz sonuçları.....	90
<b>Şekil 4.32.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların AST analiz sonuçları.....	90
<b>Şekil 4.33.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların trigliserit analiz sonuçları.....	91
<b>Şekil 4.34.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların glikoz analiz sonuçları.....	91
<b>Şekil 4.35.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların total protein analiz sonuçları.....	92
<b>Şekil 4.36.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların albumin analiz sonuçları.....	92
<b>Şekil 4.37.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların kreatinin analiz sonuçları.....	93

<b>Şekil 4.38.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların üre analiz sonuçları.....	93
<b>Şekil 4.39</b> Kontrol grubu sıçanda karaciğerin histolojik görüntüsü.....	95
<b>Şekil 4.40</b> 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubunda karaciğerde minimal derecede mononükleer hücre infiltrasyonu ve konjesyon.....	95
<b>Şekil 4.40</b> 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubunda karaciğerde sinüzoidal dejenerasyon.....	96
<b>Şekil 4.41</b> 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubunda sitoplazmik erime.....	96
<b>Şekil 4.42</b> 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubunda mononükleer hücre infiltrasyonu.....	97
<b>Şekil 4.43</b> 400 mg/kg/gün MEHP uygulama grubunda karaciğerde sinüzoidal dejenerasyon, konjesyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu.....	97
<b>Şekil 4.44</b> 100 mg/kg/gün MBP uygulama grubunda karaciğerde ödem ve hücresel dejenerasyon.....	98
<b>Şekil 4.45</b> 200 mg/kg/gün MBP uygulama grubunda karaciğerde mononükleer hücre infiltrasyonu.....	98
<b>Şekil 4.46</b> 400 mg/kg/gün MBP uygulama grubunda karaciğerde nekroz oluşumu.....	99
<b>Şekil 4.47</b> Kontrol grubu sıçanda böbreğin histolojik görüntüsü.....	103
<b>Şekil 4.48</b> 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu erkek sıçanda böbrek dokusunda parietal ve visseral yapraklarda ayrılma ve konjesyo...	103
<b>Şekil 4.49</b> 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu böbrek dokusunda glomerulus dejenerasyonu ve konjesyon.....	104
<b>Şekil 4.50</b> 200 mg/kg/gün MBP uygulama grubu böbrek dokusunda tübüler dejenerasyon ve atrofik glomerulus.....	104
<b>Şekil 4.51</b> 400 mg/kg/gün MBP uygulama grubu böbrek dokusunda glomerulus dejenerasyonu ve konjesyon.....	105
<b>Şekil 4.52</b> Kontrol grubuna ait pankreasın histolojik görüntüsü.....	109
<b>Şekil 4.53</b> 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında konjesyon.....	109
<b>Şekil 4.54</b> 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu sıçanda pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında dejenerasyon ve vakuoler sitoplazmalı hücreler.....	110
<b>Şekil 4.55</b> 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında konjesyon.....	110
<b>Şekil 4.56</b> 400 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında dejenerasyon.....	111
<b>Şekil 4.57</b> 200 mg/kg/gün MBP uygulama grubu pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında dejenerasyon.....	111
<b>Şekil 4.58</b> 400 mg/kg/gün MBP uygulama grubu sıçanda pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında dejenerasyon ve konjesyon.....	112

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 2.1:</b> Başlıca Endokrin Bozucular.....	4
<b>Çizelge 4.1.</b> MEHP uygulaması sonrası ilgili genlerin 24 saat sonundaki mRNA ekspresyon düzeyleri.....	53
<b>Çizelge 4.2.</b> MBP uygulaması sonrası ilgili genlerin 24. saat sonundaki mRNA ekspresyon düzeyleri.....	54
<b>Çizelge 4.3.</b> MEHP uygulaması sonrası ilgili genlerin 48. saat sonundaki mRNA ekspresyon düzeyleri.....	55
<b>Çizelge 4.4.</b> MBP uygulaması sonrası ilgili genlerin 48. saat sonundaki mRNA ekspresyon düzeyleri.....	56
<b>Çizelge 4.5.</b> MEHP uygulaması sonrası ilgili genlerin 72. saat sonundaki mRNA ekspresyon düzeyleri.....	57
<b>Çizelge 4.6.</b> MBP uygulaması sonrası ilgili genlerin 72. saat sonundaki mRNA ekspresyon düzeyleri.....	58
<b>Çizelge 4. 7.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin ve su miktarları.....	60
<b>Çizelge 4. 8.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin ve su miktarları.....	62
<b>Çizelge 4.9.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulanan gruplara ait sıçanların deney başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları ve % artış değerleri.....	65
<b>Çizelge 4.10.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulanan gruplara ait sıçanların deney başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları ve % artış değerleri.....	66
<b>Çizelge 4. 11.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulanan gruplara ait pankreas, karaciğer ve böbrek ağırlıkları ve rölatif organ ağırlıkları.....	68
<b>Çizelge 4.12.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulanan gruplara ait pankreas, karaciğer ve böbrek ağırlıkları ve rölatif organ ağırlıkları.....	69
<b>Çizelge 4.13.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların kan analiz sonuçları.....	74
<b>Çizelge 4.14.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların kan analiz sonuçları.....	75
<b>Çizelge 4.15.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların insülin hormonu ölçüm sonuçları.....	77
<b>Çizelge 4.16</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların insülin hormonu ölçüm sonuçları.....	78
<b>Çizelge 4. 17.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların antikor ölçüm sonuçları.....	81
<b>Çizelge 4. 18.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların antikor ölçüm sonuçları.....	82
<b>Çizelge 4.19.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların biyokimya analiz sonuçları.....	84



<b>Çizelge 4.20.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların biyokimya analiz sonuçları.....	89
<b>Çizelge 4.21.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların karaciğer dokularına ait histolojik bulguların insidansı.....	100
<b>Çizelge 4.22.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların karaciğer dokularına ait histopatolojik bulguların insidansı.....	101
<b>Çizelge 4.23.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların böbrek dokularına ait histopatolojik bulguların insidans değerleri.....	106
<b>Çizelge 4.24.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların böbrek dokularına ait histopatolojik bulguların insidans değerleri.....	107
<b>Çizelge 4.25.</b> Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların pankreas dokularına ait histopatolojik bulguların insidans değerleri.....	113
<b>Çizelge 4.26.</b> Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların pankreas dokularına ait histopatolojik bulguların insidans değerleri.....	114

# 1. GİRİŞ

21. yüzyılda, dünyada oluşan ekonomik ve sosyal koşullar, diyabet hastalığının artmasında etkili olmuş ve 2012 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından diyabetin ciddi bir halk sağlığı sorununa dönüştüğü belirtilmiştir. Endokrin bozucular, hormonal sistemler üzerinde etkileri olan kimyasallardır ve bu kimyasalların gittikçe artan miktarda kullanılmaya başlanması, bu maddelerin diyabetle ilişkisinin araştırılmasını ve ortaya çıkacak sonuçlara göre hareket edilmesi zorunluluğunu da beraberinde getirmiştir. [1]. Bu kapsamda endokrin bozucular grubuna dahil olan ftalatlar ise genel olarak diester yapıda olup, farklı oksidasyon reaksiyonları tarafından hidrolik monoesterlerine dönüştürülürler. Monoesterler ise, glukuronik asit ile konjuge olup idrar yoluyla vücuttan atılırlar. Biyolojik yarı ömrü ve idrardaki konsantrasyonu, ftalatların yapısal farklılığına ve zincir uzunluğuna bağlıdır. Örneğin di bütil ftalatın (DBP) yaklaşık %70'i birincil metabolit mono-n-butyl ftalat (MBP) olarak idrarla atılırken, di etil heksil ftalatın (DEHP) yaklaşık %60'ı birincil metabolit mono etil heksil ftalat (MEHP) olarak idrarla atılır [2]. Sindirim yoluyla maruz kalınan ftalatlar en yüksekten düşüğe; di bütil ftalat (DBP), di etilheksil ftalat (DEHP) ve bütil benzil ftalat (BBP) olarak gösterilmiştir [3].

Yapılan çalışmalarda MEHP uygulanan deneklerin idrarında ve anne sütünde bu metabolitin varlığı gösterilmiştir [4,5,6]. Ftalatların genel olarak en fazla üreme sistemindeki etkileri incelenmiş, karaciğer ve böbrekteki yan etkileri açığa çıkarılmıştır [7]. Buna karşın, Tip 1 ve Tip 2 diyabet açısından incelendiği çalışmalar oldukça azdır. Yapılan az sayıda çalışmadan bazılarında, idrardaki ftalat miktarının, diyabet hastalarında sağlıklı insanlara göre arttığı gösterilmiştir [8,9]. Ayrıca insülin hormonu miktarında azalma olduğu da başka bir çalışma ile gösterilmiştir [10].glikoz

Bu tez çalışmasında, en çok maruz kalınan ftalatların DEHP ve DBP'in metabolitleri sırasıyla MEHP ve MBP'nin vivo olarak erkek sıçanlardaki ergenlik öncesi etkileri 28 günlük uygulama sonunda incelenmiştir. Kan ve doku örneklerinde biyokimyasal, hematolojik ve hormonal analizler ile histolojik incelemeler yapılmıştır. Serumda diyabet belirteci olan antikorlar ölçülmüştür. In

vitro deneylerde, INS-1 pankreatik beta hücrelerinde bu metabolitlerin, apoptoz ve beta hücrelerin aktivitesini düzenleyen genlerin üzerindeki etkisi PCR ile gösterilmiştir. Canlılık oranları da MTT testi ile ölçülmüştür. Ayrıca total oksidan ve antioksidan ölçümleri yapılmış, insülin sekresyon miktarları hesaplanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Endokrin Bozucular

Endokrin bozucular “homeostaz, üreme ve gelişim süreçlerinden sorumlu, vücutta doğal olarak bulunan hormonların sentez, salınım, taşınma, metabolizma, bağlanma ve eliminasyonuna katılan ekzojen maddeler” olarak tanımlanmaktadır [11]. Bilimsel çalışmalar, endokrin bozucu kimyasalların geniş etki mekanizmalarına sahip olduklarını ortaya çıkarmıştır ve nükleer reseptörler ile nükleer olmayan steroid reseptörler, steroid biyosentez ve metabolizmasındaki birçok enzimsel yolak üzerinden etki gösterdikleri belirlenmiştir [12].

Endokrin bozucu kimyasallar, doğal ya da sentetik olarak organizma ile çevre arasındaki ilişkiyi düzenleyen, hormonal sistemleri değiştiren kimyasallar olarak tanımlanır [13]. Endokrin bozucular heterojen özellik gösteren bileşimleri içerirler. Endüstriyel çözücüler, yağlar ve yan ürünlerinden olan poliklorlu bifeniller (PKB), polibromlu bifeniller (PBB), dioksinler, plastikler (BPA), fitalatlar, pestisitler [metoksiklor, diklorodifeniltrikloroetan (DDT)], fungusidler (vinklozolin) ve farmasötikler [dietilstilbestrol (DES)] başlıca endokrin bozucu kimyasallar arasında sayılır. Endokrin bozucular yağ dokusunda birikme eğilimi gösterirler [14].

Endokrin bozucu kimyasalların bir kısmı, uzun yarı ömürlü olacak şekilde üretilmiştir. Bu yüzden, doğada ve organizmada uzun süre kalabilmektedir. Uzun ömürlü olmalarından dolayı hemen yıkıma uğramamaktadır. Metabolize edildikleri zaman daha toksik olabildikleri için, yıllar öncesinde üretimi ve kullanımı yasaklanan maddelerin etkileri günümüzde de görülebilmektedir [15].

Endokrin bozucuların etkileri maruziyet yaşına, süresine, alınan miktara, tek başına veya karışım halinde alınma şekline göre değişebilmektedir. En hassas dönemlerin ise gebelik dönemi, süt çocuğu dönemi ve puberte dönemi olduğu bilinmektedir [16]. Bu kimyasal maddelerin birçoğunun plasentada etkisiz hale getirilemediği ve miktarlarının artmasıyla etkisinin de arttığı gösterilmiştir [17]. Buna karşın endokrin bozucularda durum değişebilmekte ve düşük dozlarda da yüksek oranda etki gözlenebilmektedir. Gebelik döneminde karşılaşıldığında,

doğum boyunu, doğum ağırlığını ve endokrin bezlerin çalışmasıyla ilişkili eşik değerleri değiştirebilmektedir. Bu kimyasallar, ayrıca puberte döneminde hormonal değişikliklere yol açarak erken ergenliğe neden olabilmektedirler [12,18]. Çevrede doğal olarak bulunabildikleri gibi farklı endüstriyel ve sentetik ürünlerin içerisinde de bulunmaktadır (Çizelge 2.1) [13,19].

<b>Çizelge 2.1: Başlıca Endokrin Bozucular [13,19]</b>	
Fitoöstrojenler	Genistein, Daidzein, Formononetin, Biokanin-A, Pratensein, Prunetin, Glisetein, Enterodiol
Organohalojenler	Furanlar, Dioksinler, Poliklorine Bifeniller, Pentaklorofenol, Hekzaklorobenzen,
Pestisitler	Alaklor, Aldikarb, Amitrol, Atrazin, Benomil, Karbaril, Klordan, Heptaklor, Metoksiklor, Endosülfan, Etilparation, Kepon, Ketokonazol, Malation, Vinklozolin, Trifluralin
Fitalatlar	Di (2-etilhekzil) fitalat, Di-hekzil-fitalat, Butil benzil fitalat, Di-n-butil fitalat, Diklorohekzil fitalat Di-n-fetil fitalat, Di-etil fitalat, Di-propil fitalat
Ağır Metaller	Arsenik, Uranyum, Kadmiyum, Kurşun, Civa
İlaçlar	Doğum Kontrol Hapları, Simetidin, Dietilstilbestrol
Diğerleri	Bisfenol A,B ve F, Etan dimetan, Sulfonat, Benzofenol Metanol

Doğal endokrin bozucular; yarılanma sürelerinin uzun olmaması ve dokularda birikim yapmadan vücuttan atılabildikleri için genel olarak kalıcı yan etkiler göstermeyen maddelerdir. Aralarında en çok bilineni fitoöstrojenlerdir. Bunlar, vücutta üretilen östrojenlere kıyasla daha zayıf etki gösterip, gündelik hayatta sıklıkla tüketilen besinlerde (patates, maydanoz, havuç, çilek, elma v.b) bulunurlar. Fitoöstrojenler, özellikle sentetik olarak üretilenlerin yoğun miktarlarda tüketilmeleriyle zararlı etkiye neden olabilirler [20].

Sentetik endokrin bozucular; evde, endüstride ve tarımda kullanılan farklı birçok ürünün içinde bulunurlar [21]. “Dietilstilbestrol” (DES) en iyi bilinenlerinden biridir. DES, ilk olarak Avrupa ve ABD’de 1938 yılında üretilmiş ve zehirlenme,

erken doğum tehtidi ile fetal ölümlerin önlenmesinde kullanılmıştır. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda, DES'e maruz kalan kadınlarda meme kanseri riskinin 2 katına çıktığı ve DES'e intrauterin maruz kalan kadınlarda serviks kanseri ile serviko-vajinal displazi, intrauterin maruz kalan erkeklerde ise minör ürogenital anomalisi ile testis kanseri riskinin arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle DES piyasadan kaldırılmıştır [22, 23].

Temizlik malzemeleri, pestisitler (tarım ilaçları), herbisitler (yabani otları yok eden ilaçlar) ile boyalar, bazı fungusitler (mantar ilaçları), plastikler ve çözücüler gibi kimyasalların endokrin bozucu özelliği gösterme potansiyeli vardır. Bu maddelerin birçoğunun yağda eriyerek yağ dokusunda biriktiği ve vücutta uzun süre kalarak zararlı etkilere neden olduğu gösterilmiştir [21]. Endokrin bozucu kimyasalların insan sağlığı üzerine etkileri incelendiğinde, özellikle üreme sistemi ve tiroid fonksiyonlarını etkilediği, aynı zamanda diğer birçok doku ve hücre üzerinde de zararlı etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir [18,19].

EBK'lar; hormonların yapımı, taşınması, atılımı ve yıkımını değiştirebilmelerinin yanında hedef hücrelerdeki olağan etkilerini de değiştirebilmektedirler. Bu etkiler tek tek veya bir arada gerçekleşebilir [24] ve canlılar üzerinde farklı mekanizmalar aracılığı ile birçok hastalığa neden olabilirler [25].

Endokrin bozucular etkilerini beş farklı mekanizma üzerinden gösterir:

1. Herhangi bir hormonun yaptığı etkiyi taklit edebilirler,
2. Steroid ve peptit yapıdaki hormonlara blokaj yaparak etkisini minimuma indirebilirler,
3. Hormon etkileşimi sonucunda hormonal mesajları değiştirebilirler,
4. Peptit, protein ve steroid hormonların sentezini arttırabilirler,
5. Hormonların metabolizmalarını değiştirebilirler [26].

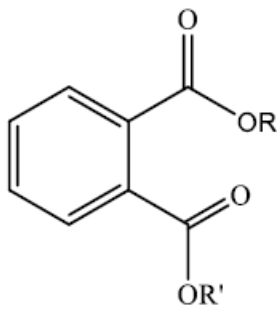
Sentetik endokrin bozucu kimyasalların bazılarının dokularda oksidatif stres üretimiyle apoptotik etkiye neden olduğu gösterilmiştir [27]. Özellikle üreme hücrelerinde oluşan apoptotik hücre ölümünün en önemli sebeplerinden birinin oksidatif stres olduğu ileri sürülmüştür. Güçlü anti-androjenik kimyasallardır.

Endokrin bozucuların farklı mekanizmalar ile antioksidan enzimleri inhibe etmesi ve bununla birlikte ortamdaki reaktif oksijen radikallerinin artması sonucu apoptotik hücre ölümüne yol açtıkları düşünülmektedir [28]. Nitrik oksidin (NO), DNA'da pürin ve pirimidinin bazlarının deaminasyonuna neden olduğu, sonucunda da DNA zincirinde kırılma ve mutasyonlarda artış yaptığı saptanmıştır [29]. Nitrik oksidin oluşturduğu DNA hasarıyla apoptoz sürecinin başladığı öne sürülmektedir [29]. İlaveten nitrik oksitin oksidatif DNA hasarına neden olmakla birlikte DNA onarım mekanizmalarını da inhibe ederek apoptoza sebep olduğu gösterilmiştir [30]. Apoptotik hücre ölümünde meydana gelen kalsiyum bağımlı endonükleaz, kalsiyum–kalmodulin bağımlı protein kinaz - fosfataz sistemi veya membran lipid peroksidasyonunun uyarılmasının, DNA kırılmasına neden olabileceği araştırılmış ve deltametrine maruz kalan sıçanlarda, DNA hasarı ve testiküler apoptoz gösterilmiştir [31].

### 2.1.1 Fitalatlar

Endokrin bozucu kimyasallar; sağlıklı bir organizmada veya gelecekteki kuşaklarında endokrin sistemin çalışmasını değiştirerek, sağlık sorunlarına neden olan, dışarıdan alınan madde ya da madde karışımlarıdır [32]. Bunlar hormonların üretilmeleri, salınımları, bağlanmaları, taşınmaları, yıkımı ve vücuttan atılmalarına etki ederler. Çevrede doğal ya da yapay ve endüstriyel ürünlerin içerisinde yer alırlar [33].

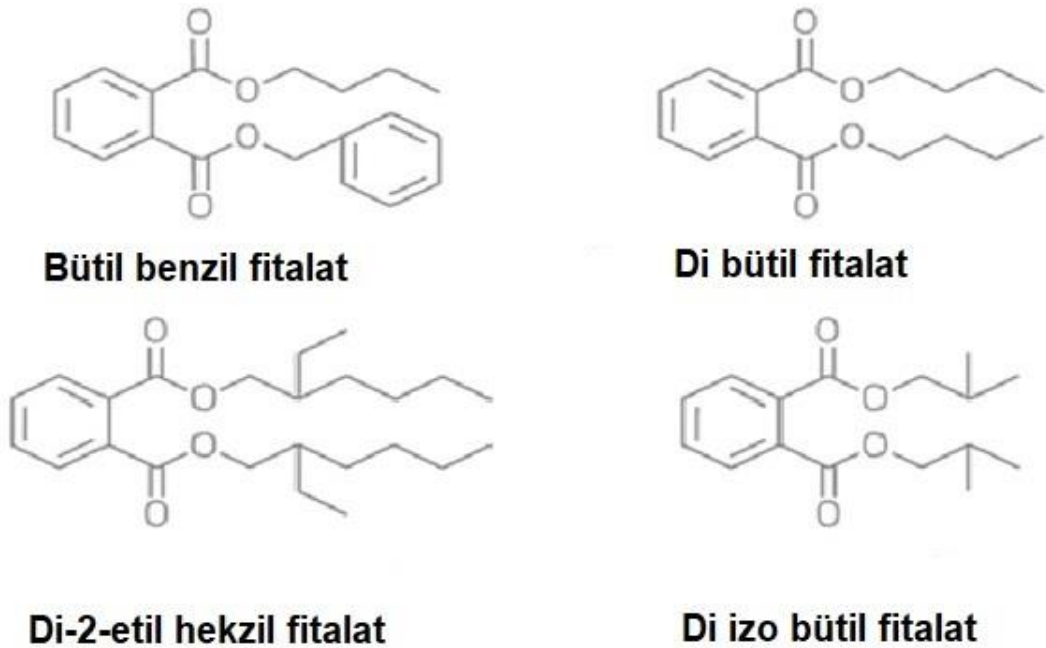
Fitalik anhidrid ve bir alkolün (6-13 karbonlu) reaksiyona girmesiyle elde edilirler. Oda sıcaklığında sıvı halde bulunup, renksiz olurlar [33,34]. Genel kimyasal yapıları Şekil 2. 1'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.1.** Fitalatların genel kimyasal yapısı [34]

Esneklik özelliğini arttırmak amacıyla endüstride kullanılan fitalatların 60'dan fazla çeşidi bulunmaktadır. Endüstrilerde yüksek molekül ağırlıklı fitalatlar %80 oranında kullanılmaktadır. Selülozikler, akrilikler ve üretanlar gibi vinil olmayan düşük molekül ağırlıklı fitalatlardan, reçinelerde plastikleştirici olarak yararlanılmaktadır [35]. Ayrıca bu düşük molekül ağırlıklı fitalatlar; sabun, kağıt, otomotiv, inşaat ve yapı malzemeleri, karton, deterjan, kozmetik, şampuan, boya, tüpler ve tıbbi torba üretiminde hammadde veya yardımcı kimyasal olarak kullanılmaktadır [36].

Kullanımları genel olarak molekül ağırlığına bağlıdır. Di-etilhekzil fitalat (DEHP), di-izonoyl fitalat (DiNP) ve di- izodesilfitalat (DiDP) gibi yüksek molekül ağırlıklı fitalat esterleri, vinil plastikleştirici olarak ve malzemenin esnekliğini, işlenebilirliğini arttıran bileşenler olarak endüstride en yaygın kullanılan fitalatlardandır [37]. Ayrıca inşaat malzemelerinde, tıbbi cihazlarda ve gıda ambalajlarında da kullanılırlar. Dimetilfitalat (DMP), dietilfitalat (DEP) ve di-n-bütül fitalat (DBP) gibi düşük molekül ağırlıklı fitalatların ise çok daha geniş bir kullanım alanları bulunmaktadır [38]. Bunlar kozmetik, deterjan, sabun, şampuan, parfüm gibi kişisel bakım ürünlerinde, gıda ambalajlarında, emzik ve biberon gibi çocuk bakım ürünlerinde kullanılmaktadırlar [39]. Fitalat türlerinin kimyasal yapıları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Çeşitli fitalat türleri [40]



Endokrin bozucu kimyasallar, endokrin sistem tarafından sentezlenen hormonların aktivitelerini taklit ettikleri, blokladıkları ya da değiştirdikleri için araştırmalara konu olmuşlardır [41]. Fitalatlar başlıca endokrin bozucu kimyasallardandır. Yılda 3 milyon ton fitalat, çok sayıda ürünün yapımında kullanılmaktadır. Bu durum, fitalatların ne kadar geniş kullanım alanlarının olduğunu ve bu toksik kimyasalın çevreyi ne ölçüde kirletebileceğini göstermektedir [36,42].

Fitalik asit esterleri olan fitalatlar, plastiklere eklenerek, uzun polivinil moleküllerin birbirleri üzerinde kaymasına olanak sağlarlar. [43].

Fitalatlar, toksik özelliği olan ve endokrin bozucu potansiyele sahip kimyasallardır. Sağlık açısından önemli özelliklerinden biri, içerisinde kullanıldıkları maddelerle kovalent bağlar oluşturmadıklarından dolayı kolay bir şekilde doğaya salınmalarıdır [36].Toplum içerisinde fitalatlara maruz kalmanın başlıca kaynaklarından biri üretim, işleme ve paketleme sırasında fitalat bulaşmış yiyeceklerin tüketilmesidir. Diğer önemli kaynaklar ise havadan ve kullanılan kozmetik malzemeler aracılığıyla [44]. Bunun yanında hemodiyaliz ve kan transfüzyonu gibi işlemler sırasında da tıbbi cihazlar tarafından fitalatlara maruz kalılabilmektedir. Yapılan çalışmalarda fitalatlar, kapalı ortamlarda, insan idrarında, tüketim ürünlerinde, insan sütünde ve amniyotik sıvıda bulunmuştur [45,46].

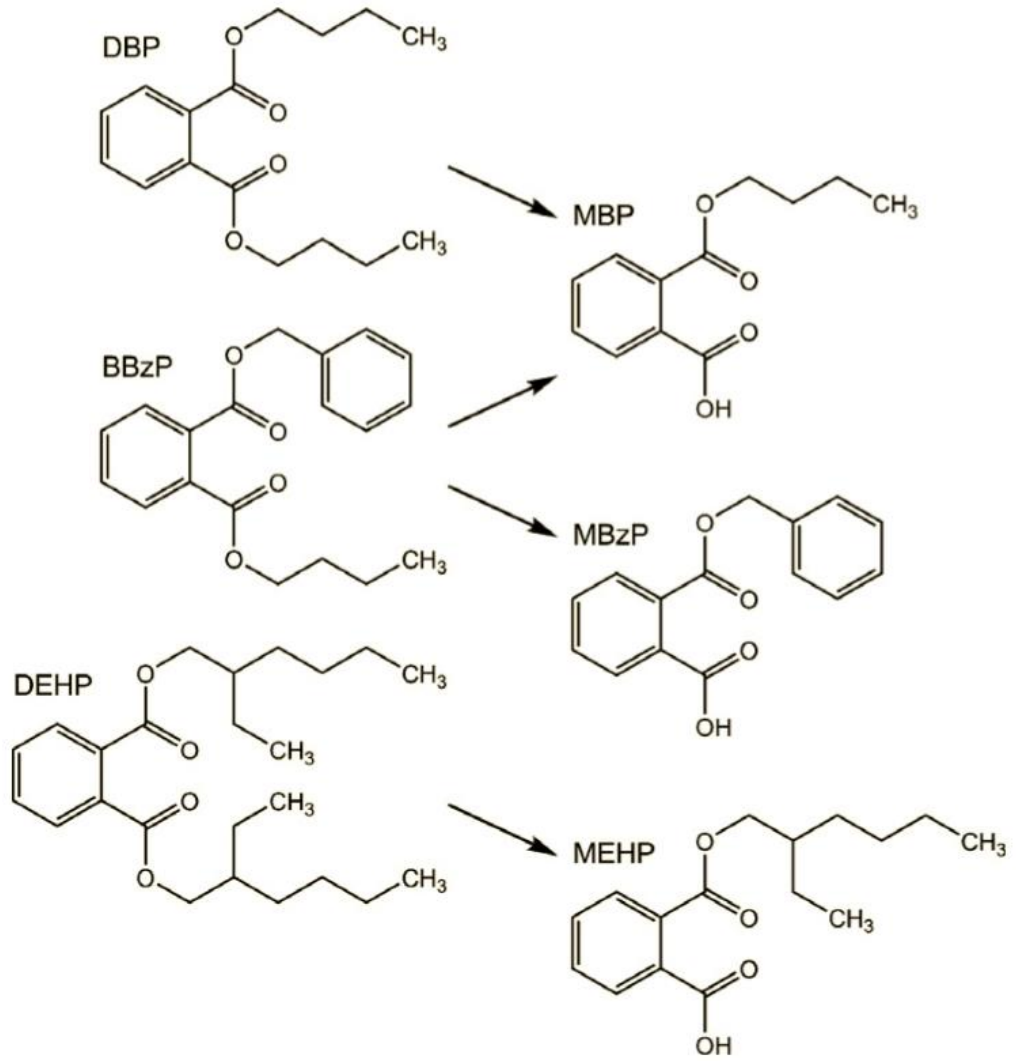
Fitalatların çevrede yaygın bulunması ve yoğun kullanım alanı, çalışmaların bu kimyasalların toksik etkileri üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur. Güçlü endokrin bozucu olmaları nedeniyle, maruz kalınması durumunda ilk etkilenecek sistemin hormonal sistem ve onunla yakın ilişkide olan organlar olarak düşünölmektedir. Fitalatların çocuklarda astım ve alerjik hastalıklara, yetişkinlerde ise cilt sorunlarına yol açtığı saptanmıştır. Bunlara ilaveten fitalatların organlarda ve üreme sisteminde de çok sayıda hasarlara neden olduğu bildirilmiştir [47,48]. DBP ve DEHP oranı Çin'de polimerlerde kullanılmasının yanı sıra toprakta ve diğer çökeltelerde yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir [49,50].

Fitalat metabolizması; metabolik kapasite farkları ve yaş, ırk, cins ve demografik koşullardan dolayı kişiler arası farklılık göstermektedir. Örneğin;

çocuklarda oksidasyona uğramış metabolitlerin idrardaki oranı erişkinlerden daha yüksektir [51, 52, 53, 53, 55]. Fitalat esterlerinin toksisite profilleri birbirinden farklıdır. Tür farklarının olması, temas yolu ve yaşının değişmesi, toksisite bakımından farklılıklar göstermektedir [56]. İn vitro ortamda fitalatların karaciğer Kupffer hücrelerinde reaktif oksijen türleri oluşumunu, NADPH oksidaz üretimini ve mitojen sitokin salınımını arttırdıkları, nükleer faktör kappa (NF-kB)'yi aktive ettikleri gösterilmiştir [57]. Fitalatların PPARs ile etkileşime geçtiği bilindiği için glikoz metabolizmasındaki etkisinin de bununla bağlantılı olduğu düşünülmektedir [58, 59, 60]. Ayrıca, fitalat metabolitlerinin PPAR geni dışında direk beta hücresi üzerinde etkisi olmayıp, bunu dolaylı yollar ile yaptığı düşünülmektedir [61]. Tip 1 diyabetin otoimmün bir hastalık olmasından dolayı, inflamatuvar ajanların beta hücrelerindeki etkisiyle buna yol açtığı öngörülmektedir [62]. Fitalatların yüksek dozlarının fetal ölüm, kanser, malformasyonlar, karaciğer ve böbrek hasarı ve üreme toksisitesi oluşturduğu gösterilmiştir [36]. Ayrıca insan ve hayvanlarda anne kanından gelişmekte olan fütüse geçtiği ve fötüsün hormonal dengesini bozduğu ayrıca bu sistemle ilintili organları çok ağır etkilediği bildirilmiştir [63, 64].

### **2.1.2 Fitalatların Biyotransformasyonu**

Fitalatların biyotransformasyonu fitalat diesterlerinin lipaz ve esterazlar ile fitalat monoesterlerine dönüşümü ile başlamaktadır. Sitokrom P450 enzimiyle yan zincir oksidasyonuna uğramakta olan fitalat monoesterlerinden, okside monoester metabolitler oluşmaktadır. Fitalatlardan bazılarının diesterleri monoesterlerinden biyolojik olarak daha pasiftirler. Oluşan metabolitler, glukroniltransferaz ve sülfotransferaz enzimleri vasıtasıyla glukuronat veya sülfat konjugatlarına dönüştürülür. İdrar ve feçesle elimine edilmekte olan fitalatların metabolitleri serbest veya konjugatları halindedir. Uzun zincirli fitalatların yarılanma süresi kısa olup, vücuttan 24 saat içinde atılmaktadırlar [65, 66]. Fitalatların metabolizması sonucu metabolit oluşması Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.3.** DBP, BBP ve DEHP metabolizması sonucu MEHP ve MBP oluşması [65]

### 2.1.3 Di-2-etil Hekzil Fitalat (DEHP) ve Metaboliti Mono Etil Hekzil Fitalat (MEHP)

DEHP, plastikleştirici olarak kullanılan fitalat türevlerinin en başında gelmektedir. 2-etilhekzanolün fitalik anhidrid ile reaksiyonu sonucu oluşur [55, 67]. Bağırsak lümeninde yer alan pankreatik lipazlar ve diğer enzimlerle hızlı bir şekilde toksik metabolit MEHP'e dönüştürüldüğü bilinmektedir [68].

Di etilhekzil fitalat (DEHP), %40 oranında PVC'lerin içinde bulunmakta ve yaygın olarak kullanılmaktadır [69]. Bu malzemenin yaygın kullanılmasından dolayı oyuncaklar, tıbbi cihazlar, yapı malzemesi, gıda ambalaj, vb. gibi çok

sayıda üründe bulunmaktadır [70]. DEHP, plastik malzemeye gevşek olarak bağlanmakta ve zamanla çevreye yayılmaktadır [38].

DEHP yıllardır PVC'lerin içinde plastikleştirici olarak kullanılan en önemli madde olmuştur. Gönüllülerle yapılan çalışmada, idrar örneklerinde beş metabolit tespit edilmiştir [54, 66]. Bunların içinden en yüksek oranda bulunan monoester MEHP olmuştur. Ulusal sağlık ve Beslenme denetleme merkezinin ABD'de yaptığı araştırmaya göre, 1999-2006 yılları arasında toplanan idrar örneklerinde % 70 MEHP'e rastlanmıştır. Buradan da DEHP'in hızlı bir şekilde metabolize olduğu ve asıl etkinin metaboliti olan MEHP üzerinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır [71]. Otake [72], Tokyo'da 27 evde fitalat seviyesinin tespitine yönelik yaptığı çalışmada DEP, DBP, BBzP, DSHP ve DEHP miktarlarını sırasıyla 0,10, 0,39, 0,01, 0,07 ve 0,11  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  miktarlarında tespit etmiştir. Green yaptığı çalışmada [73], yoğun bakım tedavisinde olan 6 prematüre bebeğin idrarında DEHP metabolitlerinin ölçümü sonrasında genel populasyondaki ortalamadan (2,7 ng/ml) daha yüksek oranda MEHP metabolitinin (129 ng/ml) olduğunu raporlamıştır. Green [73], yeni doğan yoğun bakım ünitesinde, yeni doğmuş 54 bebeğin idrar örneklerinde DEHP metabolitlerini ölçmüş ve sonuç olarak DEHP içeren cihazların sık kullanımı ile DEHP'in idrardaki metabolitlerinin daha yüksek seviyede olduğunu göstermiştir.

İnsanlarda yapılan yeni çalışmalarda, serum MBP ve MEHP'in serumda fazla olarak bulunması, üreme fonksiyonları, hormonal denge, diyabet, koroner arter riski, hipertansiyon, astım ve diğer solunum problemleriyle arasında olası bir ilişki olup olmadığını düşündürmüştür [53].

PVC ürünlerinden ortaya çıkan fitalatlar hava yolu enflamasyonuna, artmış bronşial duyarlılığa ve sonuçta obstrüksiyon ve astıma yol açabilirler. Yapılan bir çalışmada, ana metabolit MEHP'in sıçanlarda bronşiyal duyarlılığı artırdığı belirtilmiştir [74]. Başka bir çalışmada ise MEHP' in prostaglandinler ve diğer bazı enflamatuvar mediyatörlere benzer etkilerinin olduğu gösterilmiştir [75].

2004 yılında Bornehag ve arkadaşları tarafından 1-6 yaşları arasında toplam 10.852 çocuk üzerinde yapılan bir çalışmada, alerjik belirtiler ile ev tozlarındaki fitalat düzeyleri arasında ilişkinin olduğu belirtilmiştir [75].

Fitalatların metabolizmaları yaşa bağılı olarak değişmektedir. Bu metabolizma sonucu oluşan monoesterler çocuklar için daha fazla toksisite göstermekte ve çocukları daha savunmasız hale getirmektedir [76].

MEHP ile yapılan bir çalışmada obez insanlardaki miktarı, sağlıklı insanlara göre yüksek bulunmuştur [77]. Başka bir çalışmada insülin dirençli hastalarda MBP miktarı sağlıklı olanlara göre yüksek çıkmıştır [78]. MEHP'in, adiposit farklılaşmasında hasarlara yol açıp obeziteye yol açtığı dşnlmektedir [79].

DEHP'in sıçanlarda karaciğer glikojen içeriği ve glikoz intoleransında değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir [80]. İnsülin direncinin, metabolik sendrom ve tip 2 diyabetin altında yatan bir mekanizma olduğu dşnlmektedir. Çalışmalarda fitalatların insülin direnci yaptığının gösterilmesi önemlidir. Çünkü diyabet gibi bir metabolik hastalığın oluşmasında önemli bir risktir. Ayrıca, ftal dönemdeki sıçanların maruziyetinde, insülin seviyesinin düştüğü görülmüştür [81]. Ftal dönemde olan bu düşüklüğün, ergenlikte insülin direncine yol açabileceği ileri sürülmektedir [82].

MEHP, lipoliz ve glikoz alımı üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir ve depolanmasını yağ hücrelerinin enerji metabolizmasını bozmaktadır [83].

Düşük dozlarda DEHP maruziyetinin insülin seviyesini düşürdüğünün gösterilmesi DEHP'in primer metaboliti olan MEHP'in düşük dozlarda bile yüksek biyoaktif etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür [84]. Karaciğerde ise insülin reseptör konsantrasyonunda ve glikoz oksidasyonunda azalma olmuştur [85].

Oksidatif stres ve apoptoz, MEHP'in de için de olduğu birçok çevresel kirleticinin toksisite mekanizmalarında ortakdır [77]. İn vitro olarak MEHP uygulanan nötrofil, Kupffer ve Leydig hücrelerinin reaktif oksijen türleri oluşturduğu gösterilmiştir [86,87]. Ayrıca, MEHP, Leydig hücrelerine uygulandığında GSH ile askorbik asit seviyelerini düşürdüğü, DNA hasarı ve apoptoz oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir [88].

Yapılan çalışmalarda, fitalatların oksidatif strese neden olduğunu, bunun da insülin direnci oluşumuna zemin hazırladığı gösterilmiştir [89]. DEHP ile yapılan alışmalar, DEHP maruziyeti ve insülin direnci arasındaki ilişkinin oksidatif stres

ile ilişkili olduğunu göstermiştir [90, 91 92, 93]. Ayrıca DEHP'e maruz kalan sıçanlarda insülin hormonunda azalma ve beta hücre kaybı yaptığı bulunmuştur [94]. Ayrıca SOD aktivitesinde de azalma meydana getirdiği gösterilmiştir [95].

DEHP VE DBP'nin karaciğer ve testiste oksidatif stresi arttırdığı gösterilmiştir [57, 79, 96]. Yüksek dozda DEHP uygulanması sonucu yüksek oranda MEHP metaboliti oluşmakta ve buna bağlı olarak toksisite artmaktadır. Diğer bir çalışmada ise DEHP'i metabolize eden enzimlerde eksiklik olduğunda oksidatif stresin daha az olduğu görülmüştür [97,98]. Mukozal ve lökosit hücre kültürlerle yapılan çalışmalar, bu fitalatların genotoksik özelliğe sahip olduğunu gösteren sonuçlar ortaya koymuştur [99,100].

İnfertil erkeklerle yapılan bir çalışmada, spermde ölçülen DNA hasarının idrardaki fitalat düzeyleri ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Sonuçta, DEHP metaboliti olan monoetil hekzil fitalat (MEHP) ile DNA hasarı arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir [79].

2014 yılında Albert ve Jegou tarafından yapılan bir çalışmada erkek üreme sisteminde, DEHP ve DBP'nin zararlı etkilerinin esas olarak monoesterleri olan MEHP ve MBP'ye bağlı olduğu görülmüştür [101]. Bu da organizmadaki diğer sistemlerde de oluşan bozuklukların bundan dolayı olabileceğini düşündürmektedir [102].

#### **2.1.4 Di Bütil Fitalat (DBP) ve Metaboliti Mono Bütil Fitalat (MBP)**

Di-n-bütil fitalat (DBP) bir kimyasal ailesi olan fitalik asit esterleri arasında bulunan ve polivinil klorid ürünlerine esneklik kazandıran düşük molekül ağırlıklı bir fitalattır. Endüstride geniş kullanım alanına sahip olan DBP; yapıştırıcı, cila, vernik, boya ve baskı mürekkeplerinde kullanılmaktadır, aynı zamanda bir yumuşatıcı ve çözücüdür. DBP tüketici ürünleri arasında en yaygın olarak kozmetik ürünlerde bulunmaktadır. Kozmetikte parfümlerde (parfüm çözücüsü), her tür spreyde, kremlerde ve ojelerde yoğun olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte içme suyundan çocuk oyuncaklarına kadar birçok ortamda bulunan bir maddedir [63, 64].

DBP'de diğer fitalatlar gibi kullanıldıkları ürünlerde kimyasal olarak kovalent bağlar oluşturmadığından basit bir şekilde bulunduğu çevreye yayılmakta,

insanlar ve doğal yaşam bu toksik kimyasala maruz kalmaktadır. İnsanlar genel olarak gıda maddeleri, gıda maddesi ambalajları açık hava, kozmetik ve medikal aletler ile bu kimyasala maruz kalırlar [103,104]. DBP, DEHP'ten sonra olumsuz sağlık etkileri olan ikinci fitalat olarak gösterilmiş ve araştırmalarda daha çok öncelik verilmesi istenmiştir [105].

DBP'nin insanlardaki dermal emilimine bakıldığında insan derisine uygulanan DBP'nin  $0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  /saat oranında emildiği saptanmıştır. DBP içeren plastik ambalajlı besinlerle beslenen insanların kanında DBP belirlenmiştir [106,107]. DBP'nin vücuttaki tüm toksik etkilerini DBP hidroliz ürünü olan MBP ile gerçekleştirdiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [108].

DBP uygulanan gebe sıçanlarda bağırsak kanalından emilen DBP'nin MBP ve MBP glukronitlerine çevrildiği, bu ikincil metabolitlerin %65 oranında embriyoya geçtiği saptanmıştır [109]. Aynı şekilde DBP uygulanan gebe sıçanlarda, DBP'nin toksik formu olan mono bütıl fitalata (MBP) çevrildiği ve en yüksekte en düşüğe maternal plazma, plasenta ve embriyoda bulunduğu saptanmıştır [110]. DBP ve MBP'nin androjen üretimindeki rolü farklılıklar göstermektedir. MBP'nin, DBP'ye göre testosteron üretimi üzerine etkisinde 1000 kat daha güçlü olduğu görülmüştür [111].

In utero DBP maruziyetinde, testosteron seviyesinde düşme, Leydig hücrelerinde agregat oluşumu ve çok çekirdekli gonositler gözlenmiştir [112]. DBP, esteraz enzimi ile MBP'ye parçalanmaktadır [113]. DBP ve MBP'nin primatlarda ve kemirgenlerde yapılan çalışmalarda, Leydig hücrelerinde steroid hormon oluşmasını baskıladığı gösterilmiştir [114]. Ayrıca, DBP'nin gen ekspresyonunda değişiklikler yaptığı ortaya çıkarılmıştır. DBP maruziyetinden sonra 391 genin ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı seviyede değiştiği saptanmıştır [115].

DBP ve MBP, süperoksit dismutaz enzim aktivitesinde azalmaya yol açmıştır [116]. MBP ile sıçanlarda yapılan 3 günlük bir çalışmada ise testiste oksidatif DNA hasarına yol açtığı ileri sürülmüştür [117].

Yapılan in vitro çalışmalarla, DBP'nin sıçan karaciğer mikrozom esterazlarıyla MBP'ye hidroliz edildiği ve DBP'nin sıçan karaciğer süksinat dehidrogenaz için

güçlü bir inhibitör olduğu gösterilmiştir [113]. Ayrıca, in vivo çalışmalar, DBP'nin temel olarak karaciğer homojenatlarında, ince bağırsakta, izole edilmiş karaciğer mitokondrilerinde, karaciğer mikrozoamlarında, böbrek, pankreas ve kan homojenatlarında bulunan esterazlar ve lipazlar tarafından, mono butil fitalata dönüştürüldüğünü göstermektedir. MBP, ikinci ester grubunun hidrolizine karşı dirençlidir ve glukoronid konjugatları şeklinde üreyle birlikte vücuttan atılır [118]. Monobütül fitalat pankreas tarafından salınan enzimlerin bulunduğu ince bağırsak lümeninde yoğun olarak bulunmaktadır[119].

## 2.2. Endokrin Sistem

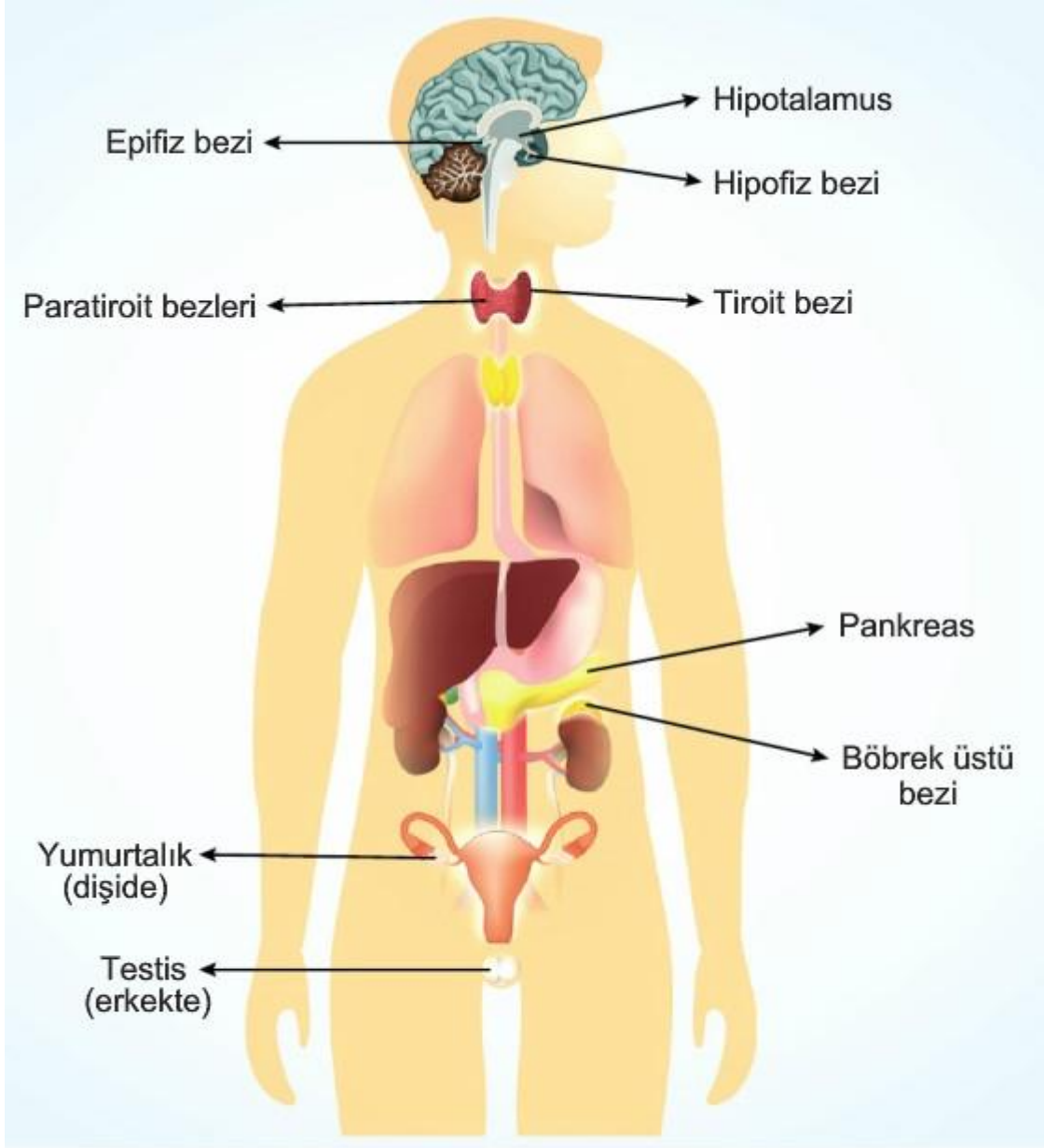
Üretimi iç salgı bezleri tarafından yapılan, dolaşım sistemi içine salgılanan ve yalnızca hedef hücrelere karşı etki gösteren bileşiklere “hormon” adı verilmektedir. Endokrin sistemini, hormonları salgılayıp kan dolaşımına veren bez veya beze şeklindeki doku ve organların tümü oluşturmaktadır. Endokrin sistemi oluşturan yapılar Şekil 2.4'de gösterilmiştir.

Endokrin sistem, hormonları kullanarak canlıların farklı metabolik fonksiyonlarını, hücre içi biyokimyasal tepkimelerin hızını, hücre zarından madde alışverişini, hücrelerin gelişme ve salgılama fonksiyonlarını kontrol eder. İnsan endokrin sistemi, hipotalamus, hipofiz, tiroid ve yumurtalıklar, testisler ve pankreas gibi organları içeren hormon üreten geniş bir salgı bezi ağından oluşmaktadır. Bu endokrin bezler ve organlar, farklı işlevleri yerine getiren farklı hormonları üretip salgılamaktadır [120,121]. Hormonların salgılanması sırasında oluşan eksiklikler veya fazlalıklar endokrin sistem hastalıklarına neden olabilmektedir. Bu gibi durumlarda nelerin ortaya çıkabileceği, hormonun fizyolojik etkisinin bilinmesiyle bulunabilir. Eğer bir hormon vücutta eksikse bu hormona ilişkin fizyolojik etkiler gözlenemezken, fazlalığında ise etkileri olması gerekenden fazla şekilde gözlemlenebilmektedir [121].

Her bir hormona ait hedef hücreler, üzerlerinde bulunan protein yapıdaki reseptörlere hormonların bağlanmasını sağlayarak moleküllerin yapısını tanımlar. Hormon ile reseptörü arasındaki etkileşim, hedef hücrenin işlevini veya aktivitesinin değişmesini sağlayacak olan hücre içi bir dizi biyokimyasal tepkimeyi başlatır [122]. Hormonlar, dolaşım sistemi içerisinde az miktarda bulunurlar ve belirli doku ve organlar üzerindeki özellikli etkileri ile tanımlanırlar.



Vücutun üreme, gelişme ve canlı davranışlarını kontrol etme ve düzenleme yeteneğini korumak için hormonların düzenlenmesi ve taşınması hassas bir şekilde düzenlenmiştir. İnsan sağlığı, metabolizma, büyüme ve gelişme, uyku ve ruh hali gibi işlevler için gerekli olan bazı hormonların salınmasını düzenleyen iyi işleyen bir endokrin sisteme bağlıdır. Endokrin sistem eksojen olarak alınan bu kimyasallardan önemli ölçüde etkilenebilmektedir [121,122].



**İnsandaki başlıca endokrin bezler**

**Şekil 2.4.** İnsandaki başlıca endokrin bezler [123].

### 2.2.1 Pankreas

Pankreas karın boşluğu içerisinde yer alan, sindirim enzimleri ve hormonlar üreten ekzokrin ve endokrin doku kısımlarından oluşmuş, 70-90 g ağırlığında karışık bir bezdir [124]. Ergin memeli pankreasında baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölge ayırt edilmektedir. Buna göre sindirim kanalının duodenal kıvrımının iç kısmında yer alan bölüm baş; omurga ile onun önünde yerleşik bulunan, kan damarlarının üstünde uzunlamasına yer alan bölüm gövde; dalağa kadar uzanan bölüm ise kuyruk bölgesi olmak üzere adlandırılmıştır [125].

Pankreas ince, gevşek bir bağ dokusu kılıfı ile sarılmıştır. Bağ dokusunun dış tabakası bezin içine girerek bezi lob ve lobüllere ayırır. Lobüller arasında büyük kanallar, kan damarları ve sinir lifleri yer almaktadır. Birleşik tubulo-asiner bir bez olan pankreasın ekzokrin bölümü saf seröz asinüslerden oluşmuştur. Seröz asinüsler küçük merkezi bir lümen çevresinde yer alan piramidal hücrelerden oluşmuştur. Sitoplazmanın apikal bölümleri zimojen granül içerdiklerinden dolayı asidofil boyanırken, bazal sitoplazma bazofil boyanmaktadır [126].

Pankreasın iç salgı yapan endokrin bölümü ise ekzokrin parenkimada düzensiz olarak dağılmış hücre toplulukları olan Langerhans adacıklarından oluşmaktadır. Bu adacıklar büyüklüğü değişebilen genellikle küremsi, soluk renkli görümlü epiteliyal hücre kordonlarıdır. Kordonlar arasında bulunan zengin kapiler ağ adeta adacıklara özgü bir dolaşım oluşturur. Adacıkların etrafını ince bağ doku lifleri çevirmektedir [127].

Pankreatik adacıklar pankreas dokusunun %1-2 sini oluştururlar. Kuyruk bölgesindeki adacıkların sayıları gövde ve baş bölgesindeki adacıkların sayısından daha fazladır [128].

Langerhans adacıkları hematoksilen eozin ile boyandıklarında asinüs hücrelerinden daha soluk renkte boyanmaları nedeniyle kolayca ayırt edilebilirler. Ancak bu boyamalar ile Langerhans adacıklarında bulunan tüm hücre tiplerini ayırt etmek olası değildir. Langerhans adacıklarındaki hücre tipleri her hücre için özel boyama teknikleri, özgün antikolar kullanarak immunohistokimyasal olarak, salgı granüllerinin yapı ve büyüklüklerini belirlemek için elektron mikroskopunun kullanılmasıyla belirlenebilir. Bu yöntemlerle adacıkta 4 farklı hücre tipi (A, B, D ve F) bulunmuştur [128].

1) Alfa (A) hücreleri: Memeli pankreasının adacık hücre popülasyonunun %15-20'sini oluşturan A hücreleri Langerhans adacığının periferine yerleşmişlerdir. A hücreleri hiperglisemik etkisi olan glukagon hormonunu salgırlar. Salgı granülleri yaklaşık 250 nm çapında olup oldukça elektron yoğun belirgin bir sentrik merkez içerir. A hücre granülleri gümüş ile reaksiyona girer ve bu nedenle gümüş seven (argirofil) özelliktedir. Elektron mikroskopunda karakteristik salgı granülleri içermelerinden dolayı B hücre granüllerinden ayırt edilebilirler [129].

2) Beta (B) hücreleri: Langerhans adacık hücrelerinin %60-70'ini oluşturan bu hücreler genellikle adacığın merkezine yerleşmişlerdir. Çeşitli türlerde morfolojik farklılık gösteren salgı granülleri ortalama 300 nm çapında olup kristalin yapıda bir merkez ile bunu çevreleyen bir membran içermektedir. Granül membranı ve merkez arasındaki alan çok geniş olduğundan, B hücreleri bu özellikleri ile adacıktaki diğer hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebilir [129].

B hücrelerinin görevleri insülin sentezi, depolanması ve vücudun ihtiyacına göre depo edilmiş insülinin salgılanması ve düzenlenmesidir. Bu hücrelerin sayıca azalması sonucunda insülin üretiminde yetmezlik meydana gelmekte ve bunun sonucunda esas belirtileri hiperglisemi, glikozüri ve poliüri olan şeker hastalığı (diabetes mellitus) gelişmektedir [129].

3) Delta (D) hücreleri: Adacık hücre popülasyonunun %5-10'unu oluşturan bu hücreler genellikle adacık periferinde bazen de adacık içinde dağınık halde bulunurlar. Salgısı olan somatostatin insülin ve glukagon salgılanmasını parakrin olarak inhibe eder. Salgı granülleri ortalama 325 nm çapında olup diğer adacık hücrelerinden daha az elektron yoğun bir merkez içermektedir [130].

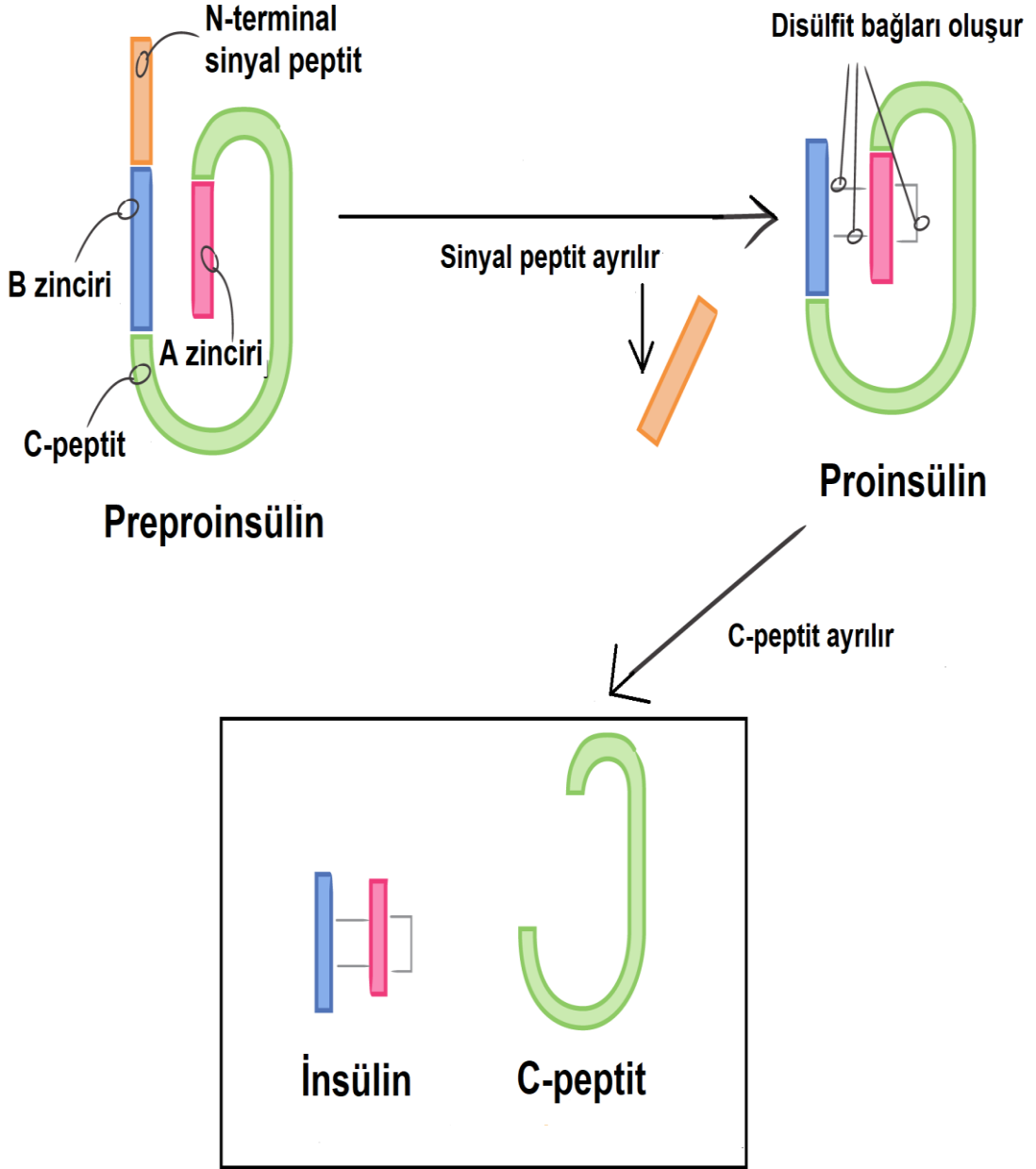
4) F hücresi: Genellikle pankreasın baş bölgesindeki adacıklarda bulunurlar. Salgısı olan pankreatik polipeptit somatostatin ve pankreas enzimlerinin salgısını inhibe eder. Salgı granülleri ortalama 200 nm çapında olup granül ile membran arasında çok parlak ve dar bir alan bulunmaktadır [130].

### 2.2.2. İnsülin

Langerhans adacıklarında bulunan beta hücreleri tarafından salgılanan insülin hormonu, polipeptit yapıdadır. İnsülin, glikozun dokular tarafından kullanımını sağlayan ve enerji dengesini devam ettiren önemli hormonlardan bir tanesidir. Triaçilgliserol, glikojen ve protein sentezinin yapılmasını da uyarabilmektedir. İnsülin bir peptit hormon olup iki polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Bu polipeptit zincirleri kovalent disülfid bağlarıyla birbirlerine bağlıdır [131].

İnsülinin sentezi birkaç aşamada meydana gelmektedir. Pankreas beta hücresinin nükleusunda, insülini kodlamakla görevli olan genden transkripsiyon ile oluşan mRNA, sitoplazmada granüllü endoplazmik retikuluma giderek translasyon başlatır. Bunun sonucu, N-terminal sinyal polipeptit oluşmasıyla başlayan süreç, A zinciri, B zinciri ve C-peptidin oluşup uzun zincir haline gelmesiyle preproinsülinin oluşmasıyla devam eder. Daha sonra sinyal peptit ayrılır. A ve B zincirleri arasında disülfid bağları oluşarak proinsülin meydana gelir. Proinsülin, granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılıp golgi cisimciğine gider. Burada C-peptitten ayrılarak ekzositozla hücreden dışarı salınır [132]. İnsülin hormonunun sentezi Şekil 2.5'de gösterilmiştir.

## İnsülin Sentezi



**Şekil 2.5.** İnsülin hormonunun sentezi [133].

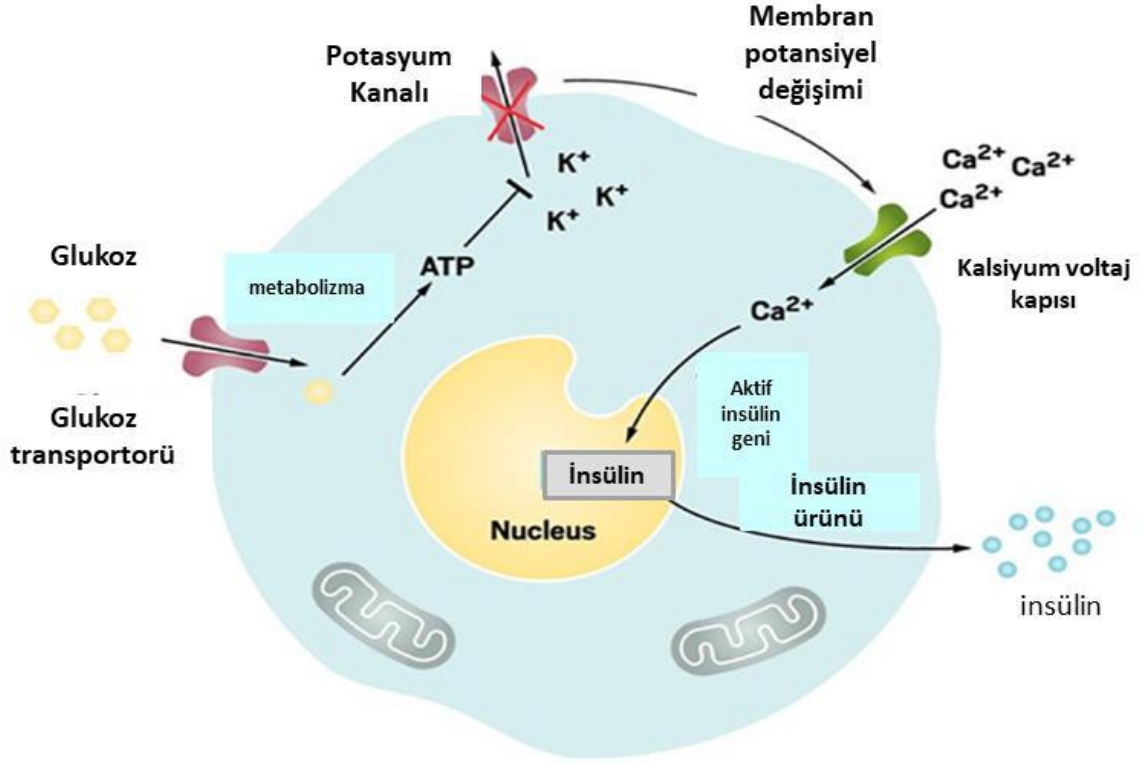
İnsülin sentezinde etkili olan maddeler glikoz, aminoasitler, glukagon, gastrointestinal hormonları, büyüme hormonu, prolaktin, glikokortikoidler, plasental laktojen hormon ve cinsiyet hormonları olmaktadır. İnsülin sentezlenmesini epinefrin ve somatostain baskılamaktadır. İnsülinin etkileri yağ doku, kaslar ve karaciğerde görülmektedir [134].

### 2.2.3. İnsülin Salınımının Kontrolü

1. Kan dolaşımında artan glikoz miktarı pankreatik  $\beta$  hücrelerini uyarır.
2. Glikoz, hücre zarında bulunan GLUT-2 ile hücre içine alınır ve glikoliz ile pirivata parçalanır.
3. Bunun sonucunda ATP ortaya çıkar ve ATP bağımlı potasyum kanalları kapanır ve hücre dışına potasyum çıkışı durur.
4. Hücre membranındaki zar polarizasyonunun değişmesiyle voltaja bağlı olarak çalışan kalsiyum kanalları açılır, sitoplazmadaki kalsiyum artışı olur.
5. İnsülin salınımını uyaran kalsiyum bir haberci olarak görev yapar ve insülinin bulunduğu veziküller membrana bağlanarak insülin kana salınır [135].

İnsülin hormonu etkisini hedef hücrelerin membranında yer alan insülin reseptörüne bağlanarak göstermektedir [136]. İnsülin reseptörleri, iki alfa ve iki beta alt bölümünü içeren, tirozin kinaz ailesine ait olan tetramerik yapıda bir proteindir [137].

$\beta$  hücrelerinin damar sistemine yakınlığı, insülin salgılanmasının ve hızlı hedeflenmenin yanıtlanma zamanını ve verimliliğini büyük ölçüde artırmaktadır. İnsülin, periferel hücrelerin duvarındaki insülin reseptörüne bağlanmaktadır. İnsülinin hücre membranlarında yer alan reseptörün alfa subünitesine bağlanması ile beta subünitesinde bulunan üç adet tirozin molekülünü fosforilize olması tirozin kinaz aktivitesi artırır [138]. İnsülinin reseptöre bağlanmasından hemen sonra, glikoz taşıyıcılarının hücre zarına translokasyonu sağlanmaktadır [139].



**Şekil 2.6.** İnsülin salınımının kontrolü [135].

## 2.2.4 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM), hiperglisemi ile başlayan, pankreastan salınan insülin hormonunun tamamen veya kısmi noksanlığına bağlı olarak gelişen bir metabolik hastalıktır. İnsülin eksikliği ile insüline karşı gösterilen direnç hastalığın gelişiminde rol oynamaktadır. Hastalıkta lipid, karbonhidrat ve protein metabolizmaları etkilenmektedir [140]. Sonuç olarak bu hastalık, insülin salgılanmasında azalma, insüline direnç veya her iki durumun birlikte olmasıyla oluşur [141].

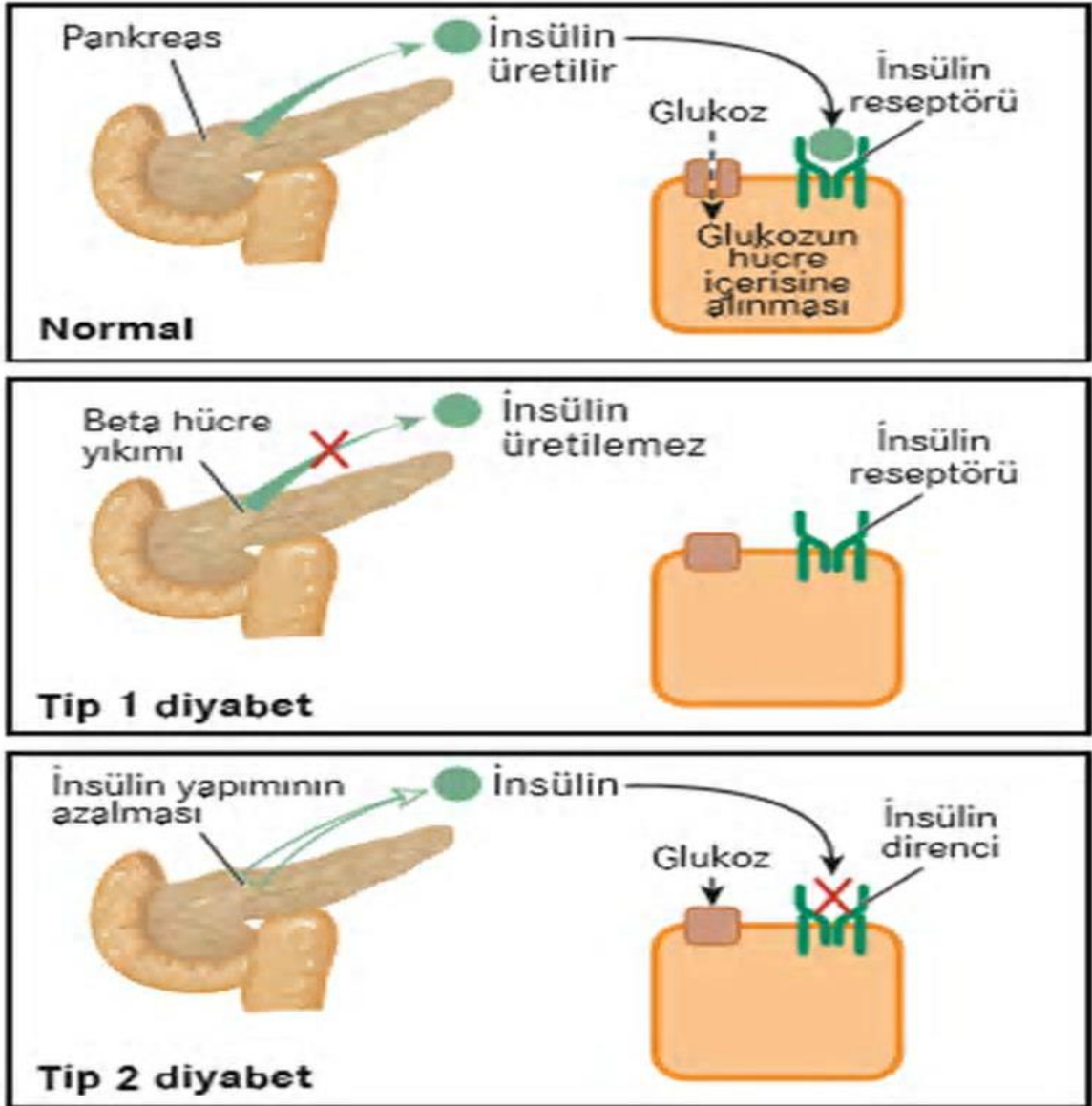
Farklı diyabet türlerinde insülin hormonu mekanizması Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

Başlıca iki tip diyabet bulunmaktadır:

1. Tip-1 diyabet: İnsülin bağımlı olan diyabet türüdür. Otoimmün sistemde olan bozulma sonucu, pankreas beta hücrelerinin tümünü yok etmekte ve insülin sentezini durdurmaktadır. Bu hastalar insülin alarak hayatlarına devam ederler [142].

2. Tip-2 diyabet: Diyabetin bu tipi insülin etkisinin azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir metabolizma hastalığıdır. Tip-2 diyabet, hücre zarındaki insülin reseptörlerinin duyarsızlığı sebebiyle glikozun hücreye alınamaması sonucu oluşmaktadır. İnsülinin yetersizliğine ve insülinin bağlandığı reseptörlerdeki hasara bağlı oluşmaktadır. Tip 2 diyabetin asıl nedeni insülin miktarındaki yetersizlikten çok periferik dokuların insüline karşı oluşturdukları insülin direncidir [143].





Şekil 2.7. Farklı diyabet türlerinde insülin hormonu mekanizması [144].

### 2.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Moleküler ya da atomik yörüngelerinde çok sayıda reaktif çiftleşmemiş elektron bulunduran kimyasal ürünler serbest radikal olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller pozitif veya negatif yüklüya da nötr olabilir. Canlı organizmalarda elektron transferi ile oluşan serbest radikaller hücre bileşenlerine etki ederek onların yapılarını bozarlar [145].

Süperoksit anyonu ( $O^{\bullet-2}$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ) gibi serbest radikaller oksidatif stresi oluştururlar [146].

Oksidatif stres lipit peroksidasyonunda artma ve/veya enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlerdeki değişme ile karakterize edilir [147].

Hiperglisemi gibi stres durumlarında yüksek glikoz fazla miktarda serbest radikal oluşumuna ve oksidatif strese neden olmaktadır [148]. Glikoz miktarının artması ve diyabetik komplikasyonların gelişmesi ile diğer metabolik anormalliklerin oluşmasında ROS'un önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir [149].

Reaktif oksijen türleri normal hücre metabolizması boyunca üretilir. Buna rağmen, stres altında serbest radikal üretimindeki artış antioksidan savunmayı etkileyebilir ve bu durum oksidatif stres ile sonuçlanır [149].

Diyabet oluşumunda ROS çeşitli dokularda artmakta ve diyabetik komplikasyonların gelişmesine yol açmaktadır [150]. Yeterli korunma olmadığında ya da antioksidan savunma sistemi yetersiz olduğunda ROS hücre organellerinin lipit, protein, karbonhidrat ve DNA'sına zarar vererek bozulmasına sebep olabilmektedir [146]. Diyabet sonucu oluşan bu serbest radikaller dokularda var olan savunma mekanizmasını yok ederek bazı patolojik durumların oluşmasına ve dokuda "oksidatif stres" olarak ifade edilen zarara neden olmaktadır [151]. Oksidatif stres lipit peroksidasyonu, DNA hasarı, hücre büyümesinin inhibisyonu ve hücre ölümü gibi negatif cevaplara yol açtığı gibi, hücre çoğalması ya da aktivasyonu gibi pozitif cevaplara da yol açabilir. Yani ROS'un hem yararlı hem de zararlı rol oynadığı gösterilmiştir [152]. Reaktif oksijen türleri çok düşük konsantrasyonda ise bazı sinyal iletim yollarında ikinci haberci olarak rol oynayabilir. Ancak fazla üretildiği zaman hücrenin birçok bileşenlerinde oksidatif zarara neden olabilmektedir. Bu yarar-zarar durumu hücredeki ROS üretimi ve antioksidan kapasite arasındaki ilişkiye bağlıdır. Oksidatif stres hücre içerisinde redoks dengesi değiştiği zaman meydana gelmektedir.

Reaktif oksijen türleri (özellikle, hidroksil radikalleri) lipitler, proteinler, nukleik asitler ve karbonhidratlar gibi bütün biyolojik makromoleküller ile reaksiyona girebilir [153]. Mitokondrilerde elektron transport zincirinde oksijenin tamamlanmayan reaksiyonu oksidatif strese neden olabilir [154]. Dolayısıyla mitokondriyal  $O\bullet^{-2}$  oluşumu ROS'un oluşumunu başlatabilir.

Mitokondriyal enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistem ROS ile etkilendiği zaman oksidatif hasar ve hücre ölümü meydana gelmektedir. Mitokondriyal oksidatif stres ve mitokondriyal oksidatif hasar karaciğer hastalıkları, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalığa neden olmaktadır [155].

Radikallerin fazla üretilmesi ile meydana gelen oksidatif stresin nekroza neden olabileceği uzun zamandır bilinmektedir. Örneğin, yüksek miktarda reaktif  $OH\bullet$  nekrotik hücre ölümünde oksidatif zararın önemli sebeplerinden biridir. Apoptozda, radikaller hücrel redoks durumunun belirlenmesinde büyük bir rol oynar ve apoptozun birçok formu reaktif oksijen ve nitrojen türlerini içerir. Ayrıca birçok sistemde antioksidanlar apoptozu azaltmak için kullanılmaktadır [156].

#### **2.4. Diyabette Oksidatif Değişiklikler ve Antioksidan Savunma**

Birçok hastalığın oluşumunda lipid peroksidasyonu ile artmış serbest oksijen radikallerinin rol oynadığı, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Diyabetli hastalarda ve diyabet oluşturulmuş sıçanlarda lipid peroksidasyonun ve serbest oksijen radikallerinin ciddi oranda arttığı görülmüş, diyabetin oluşmasında ve ilerlemesinde oksidatif stresin rol aldığı bildirilmiştir [157]. Buna ilave olarak uzun süreli oksidatif strese maruziyetin ve antioksidan düzeyde görülen değişikliklerin, diyabet bulgularının ortaya çıkması ile bağlantısı olma ihtimali bilim insanları tarafından belirtilmiştir [158].

Diyabetin serbest radikaller ile olan ilişkisini göstermek amacıyla yapılan çalışmalarda, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, hipoksi sonucu oluşan doku hasarının, serbest radikal üretiminde artışa neden olduğu ve antioksidan sistemde değişiklik yaptığı söylenmiştir [159]. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi antioksidan enzim

ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin pankreas adacık hücrelerinde, karaciğer, iskelet kası, böbrek ve adipoz doku gibi diğer dokulara göre daha az olduğu bilinmektedir.

Beta hücrelerinde görülen hasarın, hipergliseminin bir sonucu olduğu gösterilmiştir [160]. Ayrıca insülin gen ekspresyonunun düştüğü oksidatif strese maruz kalan beta hücrelerinde belirtilmektedir. Bunun sebebi ise oluşan oksidatif stres sonucu insülin ve glikokinaz gibi karbonhidrat metabolizması için önemli olan enzim ve hormonların gen ekspresyonlarını uyaran transkripsiyon faktörü PDX-1'in DNA'ya bağlanma potansiyelindeki azalma olarak bulunmuştur [161].

PDX-1 (pankreas ve duodenal homeobox-1) pankreatik beta hücresinin fonksiyon ve çoğalmasında rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca PDX-1, beta hücrelerinin replikasyonunda rol oynar [162]. PDX-1'in düşük ekspresyonu beta hücrelerinin apoptozunda artma, hücre iskeletinde bozulma ve beta hücrelerinin kütlelerinde azalmaya neden olmaktadır [163].

Lin ve ark [163], DEHP'in gelişimsel maruziyetinde, PDX-1 gen ekspresyonunda azalma olduğunu göstermiştir. Ayrıca, fitatlar peroksizom proliferatör aktivasyon reseptörlerinden (PPAR) alfa ve gamma'ya bağlanarak adipogenez ve glikoz metabolizmasında bozulmalara neden olmaktadır [164,165]. PPAR, nükleer reseptör ailesidir ve yağ asidi metabolizmasında, immun sistem üzerinde görev alıp anti-tümörük etkileri vardır [166,167]. PPAR ligandlarının anti diyabetik ilaçlarda hipolipidemik olarak kullanılması, onların diyabet ve fitatlar arasında olan bağlantıyı desteklediğine kanıttır [168].

PPAR gama, pankreasta ifade edilen nükleer bir protein olup, PPAR- $\gamma$  aktivasyonu, insülin gen ekspresyonuyla yakın ilişkilidir ve PDX-1 ekspresyonunu INS-1 hücrelerinde düzenlediği gösterilmiştir [169,170]. PDX-1, insülin promotoruna bağlanarak beta hücrelerinin olgunlaşması ve glikoz uyarılı insülin sentezinde rol oynamaktadır [171]. Gupta ve arkadaşlarının [172], yaptığı çalışmada, PPAR $\gamma$ 'nın PDX-1 geninde yaptığı düzenlemede bir aksaklık olunca, DNA hasarının oluştuğu, bunun p53 genini etkileyip DNA

onarımını teşvik ettiği gösterilmiştir. Eğer onarım olmazsa, p53'ün, Bax genini aktive edip apoptozu başlattığı bildirilmiştir [173].

Diyabette süperoksit ( $O_2^-$ ) radikali, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksit radikali ( $HO^-$ ) ve gibi reaktif oksijen türlerinin fazla üretimi ve antioksidan savunmanın yetersiz gelmesiyle oksidatif stres oluşabilir [174]. Bu radikallerin üretimindeki artış, glikozun oto-oksidasyonu ile bağdaştırılmakta ve bu radikallerin etkisiz hale getirilmesindeki bozulmanın sebebi, enzimatik ve enzimatik olmayan radikal yakalayıcıların azlığı ile ilişkili olduğu belirtilmektedir [175].

Diyabette, süperoksit dismutaz ve katalaz'ın mRNA ifade düzeyleri ve aktivasyonları artmaktadır. Bunun nedeni olarak glikolizasyon olaylarının sonucunda serbest radikal artmasının rol oynadığı düşünülmektedir [176]. Plazma glutatyon (GSH) serbest radikal yakalayıcısı olarak görev alır ve radikallerin yaptığı hücre hasarını onarma kabiliyetine sahiptir [177]. Diyabette GSH seviyelerinde önemli düşmeler meydana gelmektedir [178].

## **2.5. Diyabette Otoimmunité**

Çevresel ve genetik faktörler, pankreastaki adacık hücrelerine karşı otoimmün cevabın başlamasında uyarıcı olarak rol oynarlar [179, 180, 181]. Otoimmün süreçte pankreasın adacık hücrelerinde olan bozulma ile birlikte insülin sentezi azalmaktadır [181]. Pankreastaki adacık hücrelerinin zarar görmesi durumunda diyabetin bulguları görülmektedir [182]. Çocuk diyabet hastalarında hiperglisemi semptomlarının görülmesinden sonra, 3 yılda pankreatik beta hücre yıkımı tamamlanırken, daha ileri yaş grubundaki hastalarda bu sürecin 10 yılda tamamlandığı belirtilmiştir [183].

Perinatal enfeksiyonlara maruziyetin diyabetin sıklığını artırdığı belirtilmektedir [184,185]. Otoimmün kaynaklı tip 1 DM'de insülin salgılanmasındaki azalma iki şekilde olmaktadır. İlki pankreasın beta hücrelerinin zarar görmesi iken diğeri antikorların pankreasın beta hücrelerinden insülin salgılanmasını azaltmaları ile oluşmaktadır [186].

Tip 1 diyabet geliştiren hastalarda otoimmün yıkım sürecinin bireysel farklılıklara göre değişmesi nedeniyle başlangıç zamanları da bireysel farklılıklar gösterebilmektedir [187,188]. Tek antikor pozitif çıkan hastalarda, diyabetin gelişimi daha yavaş iken birden fazla antikor pozitifliği olanlarda bu yıkım sürecinin daha hızlı gerçekteştiği saptanmıştır [189]. Tip 1 DM hastalarda otoimmün süreç dört aşamada gerçekteşmektedir:

- 1-Çevresel faktörlere maruz kalma,
- 2- T hücrelerinin uyarılması,
- 3- T hücrelerinin farklılaşması,
- 4- Beta hücrelerinin fonksiyonunu kaybetmesi [179].

Tip 1 DM tanısı alan hastaların büyük kısmında beta hücre antijenlerine karşı gelişen antikorların pozitif olduğu bildirilmektedir [190,191]. Diyabet gelişiminde ilk tanımlanan antikor adacık hücre antikor (ICAs=Islet Cell Antibodies) olup, daha sonra yapılan araştırmalarda insülin (IAA=insuline autoantibodies) antikor tanımlanmıştır [192,193]. Bu antikorların immün kaynaklı tip 1 DM tanısında önemli rolü olduğu saptanmıştır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan mono (2-etilhekzil) fitalat (%97) Cas:4376-20-9 numarasıyla, mono bütül fitalat (%97) ise Cas:131-70-4 numarasıyla Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Hematolojik analizler, DYMIND DH36 VET 19 Parametre Hematoloji Cihazı kullanılarak yapılmıştır. Biyokimyasal analizlerde, Sigma-Aldrich'den temin edilen MAK052 katalog numarasıyla ALT (Alanin aminotransferaz), MAK055 katalog numarasıyla AST (Aspartat aminotransferaz), MAK266 katalog numarasıyla Üre, MAK006 katalog numarasıyla Trigliserit, MAK125 katalog numarasıyla Albumin, MAK080 katalog numarasıyla Kreatinin, TP0100 katalog numarasıyla Total Protein ve CBA086 katalog numarasıyla Glikoz kitleri kullanılarak yapılmıştır. İnsülin hormonu ölçümü için ERINS katalog numaralı Thermo-Fischer kiti kullanılmıştır. The Rel Assay Total Antioksidan kit (#RL0024) kullanılarak total antioksidan seviyeleri, The Rel Assay Total Oksidan kit (#RL0017) kullanılarak total oksidan seviyeleri ölçülmüştür. INS-1 hücre hattı C0018007 katalog numarasıyla AddaxBio'dan temin edilmiştir. FOXO-1 (NM\_019739), PDX-1 (RDP-338), SIRT-1 (HP210213), INS-1 (MR200402), INS-2 (RP301250), p53 (MP200526), BCL-2 (B9179), BCL-XL (HP100024) genlerinin primerleri Santa-Cruz Biotechnology'den temin edilmiştir. Adacık hücre antikoru ve insülin antikoru Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Deney Hayvanlarının Temini

Bu çalışmada, mono(2-etilhekzil) fitalat ve mono bütül fitalata maruz kalma sonucunda meydana gelebilecek etkilerin incelenmesi amacıyla altı haftalık, ortalama 150-200 g ağırlığındaki Wistar albino (*Rattus norvegicus*) sıçanlar kullanılmıştır. Pubertal dönemdeki sıçanlar, Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş'den temin edilmiştir. Çalışmaların yapılması için gerekli olan

izin, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu"ndan 2020/06-04 sayı numarasıyla alınmıştır Tez kapsamında 66 adet erkek sıçan ile çalışılmış olup, sıçanlar rastgele seçilerek gruplar oluşturulmuştur.

### **3.1.3. Laboratuvar Koşulları**

Deney boyunca laboratuvar sıcaklığı ortalama  $22,5\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ , nisbi nemi  $47,1\pm 1$  olarak ayarlanmıştır. 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde zaman ayarlayıcı ile fotoperiyot ayarlanmıştır. Çalışmada, boyutları 20x40x22 cm olan polikarbonat kafesler kullanılmıştır. Hayvanlara içme suyu olarak çeşme suyu ve standart sıçan yemi verilmiştir. Uygulamalar her gün aynı saatte olacak şekilde (sabahları saat 10) yapılmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Hücre Kültürü**

Pankreas beta hücreleri ile ilgili in vitro çalışmalarda değişik mutant hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında MIN6 (fare), INS-1 (sıçan), HIT-T15 (hamster), BRIN-BD11 (sıçan) gibi beta hücre hatları sayılabilir. Bu çalışmada sıçan INS-1 beta hücre kültürü kullanılmıştır. In vitro deneyler, in vivo da sıçanlarla yapılacak deneylerle destekleneceğinden hücre hattı olarak sıçan kaynaklı hat seçilmiştir.

### **3.2.2. Hücre Pasajı**

Hücreler ısı ile inaktive edilmiş %10 fetal buzağı serumu (Gibco, USA) ve 5 mM glutamin (Gibco, USA), 100 U/ml penisilin (Gibco, USA), 100 µg/ml streptomisin (Gibco, USA), 1 mM sodyum piruvat (Sigma, USA) 50 µM 2-merkaptoetanol (Biorad, Hercules, California, USA) ve 10 mM HEPES (Sigma, St Louis, Missouri, USA) içeren RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) besi yerinde  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  ve %95 hava içeren bir atmosferde inkübe edilmiştir. Yeterli doygunluğa ulaşan hücreler, zemine tutunarak tüm kültür ortamını



kapladıklarında 2-3 kez 5 mL 37°C'lik PBS ile yıkanmıştır. Kültür kaplarındaki hücrelerin üzerine 3 mL Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 3-5 dakika süreyle inkübatörde bekletilmiş, hücrelerin tutundukları kültür kabının zemininden uzaklaşmaları sağlandıktan sonra ortama 5-6 mL besiyeri ilave edilip hücre süspansiyonu steril bir tüpe aktarılmıştır. Hücre süspansiyonu 25°C'de 1200 devir/dakika hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmış ve tüpün dibinde toplanan hücre peleti 1 veya 2 mL (hücre miktarına göre) besiyeri ile süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonundan 90 µL alınarak steril bir ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 10 µL tripan mavisini çözeltisi (%0,4) eklenerek süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu (10 µL) Neubauer hücre sayım lamı (hemasitometre) üzerinde ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Neubauer sayım lamını oluşturan dört karenin kenar çizgileri hariç üzerlerindeki parlak ve beyaz olarak görülen canlı hücreler soldan sağa ve yukarıdan aşağıya doğru sayılmıştır. Canlı hücrelerin derişimini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{mL'deki canlı hücre sayısı} = \text{Toplam hücre sayısı} / 4 \times 10^4 \times 10$$

Sayımı yapılan hücrelerden yapılacak pasajlamalarda yeni kültür kaplarına  $10^5$  hücre/ml olacak şekilde hücreler dağıtılmış ve yeterli miktarda besiyeri eklenerek inkübasyona kaldırılmıştır.

### **3.2.3. MEHP ve MBP Uygulamaları**

Birinci grup kontrol grubu (KONT), ikinci grup mono etil hekzil fitalat (MEHP) verilen grup, üçüncü grup mono bütül fitalat (MBP) verilen grup olarak düzenlenmiştir. Bu aşamadan sonra hücre serisinde mL'de  $3 \times 10^4$  hücre olacak şekilde medium ile birlikte hücreler hazırlanmıştır. Her bir fitalat için ayrı bir 96 kuyucuklu kültür plağının her bir kuyucuğuna 3'er mL hücre süspansiyonu konulmuştur. Tüm plaklar CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası INS-1 hücre serilerinden oluşan 12 kuyucuklu plaklara eklediğimiz hücre konsantrasyonlarının üzerine 1. kuyucuğa medium, 2.kuyucuğa DMSO içeren çözücünün kontrol olarak belirlenmesi ile diğer kalan 10 kuyucuğa çift kontrol olacak şekilde sırasıyla 5 farklı konsantrasyonda (0,001 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1

$\mu\text{M}$  ve  $10 \mu\text{M}$  olacak şekilde) fitalatlar ilave edilmiştir. Plaklar tekrar  $\text{CO}_2$  inkübatöründe 24, 48 ve 72 saat olmak üzere aynı işlemler tekrarlanarak inkübasyona bırakılıp, 3 ayrı zaman dilimindeki değişiklikler gözlenmiştir. DMSO'nun besiyerindeki son konsantrasyonu %0,1'i geçmeyecek şekildedir. Lizat oluşturmak için, MEHP ve MBP'a 24, 48 ve 72 saat maruz kalan INS-1 hücrelerine tripsin uygulanmış ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası oluşan peletin yoğunluğuna göre PBS ile pipetaj yapıp iyice yıkanması sağlanarak 2 ml'lik ependorfa alınarak  $+4^\circ\text{C}$ 'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılarak peletin yoğunluğuna göre lizis tamponu (İnvitrogen) eklenmiş ve dikkatlice pipetaj yapılmıştır. Daha sonra  $+4^\circ\text{C}$ 'de 13000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatant 0,2 ml'lik ependorf tüplere alınarak mRNA ölçümü ve TAS ile TOS ölçümleri için kullanılmıştır.

#### **3.2.4. Total Antioksidan Statü (TAS) ve Total Oksidan Statü (TOS) Analizleri**

Bir ortamdaki antioksidan kapasiteyi ölçmeye yönelik olan metotlar genelde, bir vitamin E analogu olan ve Trolox Equivalent olarak adlandırılan standart antioksidan solüsyonu kullanılarak kalibre edilmekte, ölçülen TAS düzeyleri mmol Trolox Equivalent/L olarak okunmaktadır. TAS ölçümleri Erel'in geliştirdiği metoda göre, The Rel Assay kit (#RL0024) kullanılarak yapılmış ve ELISA okuyucusu Bio-Tek  $\mu\text{Quant}$  Mikroplate spektrometre cihazında 660 nm'de kinetik okuma yapılarak gerçekleştirilmiştir. TOS ölçümleri de yine Erel'in geliştirdiği metoda göre, The Rel Assay kit (#RL0017) kullanılarak yapılmış ve ELISA okuyucusu Allsheng AMR-100 Mikroplate okuyucu spektrometre cihazında end-point 530 nm'de kinetik okuma yapılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equiv/mg prot olarak ifade edilmiştir.

#### **3.2.5. MTT Hücre Canlılık Ölçüm Testi**

24, 48 ve 72 saat sonunda INS-1 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her kuyucuğa 100  $\mu\text{L}$  hücre süspansiyonu olacak şekilde aktarılmış ve her bir kuyucuğa 10  $\mu\text{L}$  MTT solüsyonu eklenip, 4 saat süre ile inkübe edilmiştir. MTT solüsyonu 5

mg/mL olacak şekilde PBS içinde çözülüp steril filtrasyon ile bir şişeye transfer edilerek hazırlanmıştır. Daha sonra kuyucuklara 100'er µL DMSO eklenmiş, MTT ile oluşan formazon kristallerini çözmek için 10 dakika 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe bekletilmiştir. Allsheng AMR-100 Mikroplate okuyucu ile her bir kuyucuk 570 nm dalga boyunda okutulmuş ve okunan absorbans değerine göre sitotoksite düzeyi belirlenmiştir. Sitotoksite düzeyleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Sitotoksisite} = (\text{Test kuyucuğunun adsorbansı} / \text{Kontrol kuyucuğunun adsorbansı}) \times 100$$

### 3.2.6. İnsülin Sekresyon Ölçümü

Uygun koşullarda inkubasyonla çoğaltılan ve MEHP ile MBP' ye maruz bırakılan hücreler, maruziyet sürelerinin sona ermesinden sonra içerisinde buldukları besiyeri uzaklaştırılmış ve bunun yerine steril KREBS solüsyonu (115 mM NaCl, 5,9 mM KCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4) eklenmiştir. Hücrenin yaşam ortamını oluşturan DMEM çözeltisi içerisindeki glikozun hücrelerin insülin sekresyonunu tetiklememesi için hücreler ekstrelerle muamele edilmeden önce glikoz içermeyen Krebs çözeltisi içerisine alınmıştır ve 1 saat inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda KREBS solüsyonu kuyucuklardan atıldı ve yerine bazal insülin salıverilmesi için 5,5 mmol/L glikoz içeren, indüklenmiş insülin salıverilmesini sağlamak için ise 16,7 mmol/L glikoz içeren KREBS solüyonları kuyucuklara eklenmiş ve 2 saat boyunca etüvde inkübe edilmiştir. Inkubasyon daha sonra flaskın buz üzerine konması ile durdurulmuştur. Santrifüj yapılarak süpernatant elde edilmiş ve insülin düzeyinin ölçümü için toplanmıştır. İnsülin ölçümleri, insülin kiti (Cisbio-62INSPEB) kullanılarak Allsheng AMR-100 Mikroplate okuyucu kullanılarak fotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.7. RNA İzolasyonu, Komplementer DNA (cDNA) Sentezi ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri

Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile yapılacak olan gen ekspresyonu analizlerinde kullanılacak olan total RNA, hazır ticari kit kullanılarak hücrelerden izole edilmiştir. RNA izolasyonu sırasında kullanılacak bütün malzemeler RNAaz olmayan bir ortam oluşturabilmek adına uygun çözeltilerle (RNA away) önceden temizlenerek hazır hale getirilmiştir. İzole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı mikroplyet spektrofotometre ile ölçülerek elde edilen optik dansitelerinden hareketle (OD 260/280) belirlenmiştir. OD 260/280 oranı 1,7-2,1 aralığında olan RNA'lar cDNA sentezinde kullanılmıştır. RNA izolasyonu işleminin tüm aşamaları buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her bir örnekten total RNA izolasyonu spin kolon yöntemi ile yapılmıştır (Norgen Biotek Corp., Ontario, Kanada). PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere her bir örneğe ait total RNA'dan 0,1-5 µg alınarak önce reverz transkriptaz (RT) ile komplementeri DNA (cDNA) sentezi yapılmıştır. Bunun için ticari cDNA sentez kiti kullanılmıştır (Thermo Scientific, Lithuania). Elde edilen her bir numuneye ait cDNA'dan 1,5 µl kullanılarak üzerine 12,5 µl Sybr Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Lithuania) ve primer çifti (oligonükleotid) protokollere uygun miktarlarda eklenmiştir. Primerler, her bir transkripsiyon analizi için özel olup, literatürdeki çalışmalar referans alınarak elde edilmiş ve reaksiyonda yaklaşık 100 ng düzeyinde kullanılmıştır (Şekil 3.1). Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin değişimleri  $2^{-\Delta\Delta CT}$  analiz yöntemine göre hesaplandı (Ct=döngü eşiği). Endojen kontrol olarak glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) geni kullanılmıştır.

$$\Delta\Delta CT = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{denek grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{kontrol grubu}}$$

PCR analizleri ile;

-Beta hücre proliferasyonu ile ilişki FOXO-1 ve PDX-1,

-Beta hücre fonksiyonları ile ilgili olarak SIRT-1, İnsulin-1 ve İnsulin-2,  
 -Apoptoz ile ilgili olarak p53, Bcl-2 ve Bcl-XL'in mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir.

Gen	Primer Dizisi	PCR Programı	Döngü
p53	F-5'CGGAGGTCGTGAGACGCTG'3 R-5'CACATGTA CT TGTAGTGGATGGTGG'3	94°-1 dk/59°- 1dk/72°-1dk	40
Bcl-2	F-5'CAGCTGCACCTGACGCCCTT'3 R-5'CCCAGCCTCCGTTATTCTGGA'3	94°-1 dk/58°-1 dk/72°-1 dk	40
Fox01	F-5'GTGAACACCATGCCTCACAC'3 R-5'CACAGTCCAAGCGCTCAATA'3	95°-15 s/60°-1 dk/72°-1 dk	40
PDX-1	F-5'GGCTTAACCTAAACGCCACA'3 R-5'GGGACCGCTCAAGTTTGTA A'3	94°-1dk/59°-1 dk/72°-1 dk	30
Bcl-xL	F-5'GAACTCTTTCGGGATGGGGTA'3 R-5'CAGAACTACACCAGCCACAGTC'3	95°-30 s/58°-1 dk/72°-1 dk	35
İnsulin-1	F-5'CCTGCTCGTCCTCTGGGAGCCCAAG'3 R-5'CTCCAGTGCCAAGGTCTGAAGATCC'3	94°-1dk/68°- 1dk/72°-1dk	35
İnsulin-2	F-5' CCTGCTCATCCTCTGGGAGCCCCGC'3 R-5'CTCCAGTGCCAAGGTCTGAAGGTCA'3	94°-1dk/70°- 1dk/72°-1dk	40
SIRT-1	F-5'AGGGAACCTCTGCCTCATCTAC'3 R-5'GGCATACTCGCCACCTAACCT'3	94°-1dk/60°- 1dk/72°-1dk	35
GAPDH	F-5'GTCGTGGAGTCTACTGGCGTC'3 R-5'GATGACCCTTTTGGCACCACC'3	94°-1dk/54°- 1dk/72°-1dk	35

**Şekil 3.1.** Oligonükleotid primer dizileri ve PCR programları

### 3.2.8. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması

Çalışmada her grupta 6 sıçan olacak şekilde 1 adet yağ kontrol, 5 adet MEHP (mono 2-etilhekzil fitalat) doz uygulama grubu ve 5 adet MBP (mono bütül fitalat) doz uygulama grubu olmak üzere 11 grup bulunmaktadır. 6 haftalık erkek sıçanlardan oluşan toplam 66 hayvan kullanılmıştır. Çalışma öncesinde laboratuvara getirilen sıçanların 7 gün boyunca laboratuvar ortamına alışmaları için uygun koşullarda bekletilmiştir. Negatif kontrol grubuna her sabah 1 ml mısır yağı oral gavaj yoluyla 28 gün boyunca uygulanmıştır. Mısır yağı,

kullanacağımız fitalat metabolitlerinin içinde çözüdüğü ve sıçana fitalat ile birlikte verilip bir taşıyıcı rolü üstlenmesinden dolayı negatif kontrol olarak seçilmiştir.

Doz seçimi yapılırken, toksikolojide doz belirlemede kullanılan, gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz (NOAEL-No Observed Adverse Effect Level) ile gözlenebilen en düşük yan etki gösteren doz (LOAEL- Lowest Observed Adverse Effect Level) değerleri göz önüne alınarak karar verilmiştir. Di-etilhekzil fitalat (DEHP)'ın NOAEL değeri 5,8 mg/kg/gün ve LOAEL değeri 29 mg/kg/gün olarak literatürde gösterilmiştir [194]. Deneyde kullanılacak olan metaboliti mono 2-etilhekzil fitalat (MEHP) ile ilgili literatürde böyle bir doz belirlemesi olmadığından, DEHP'in değerleri göz önüne alınarak, dozlar NOAEL ve LOAEL değerleri arasında olacak şekilde 25 mg/kg/gün dozu, deney protokolünde en düşük doz olarak seçilmiştir. Sonrasında, 25 ve 50 mg/kg/gün MEHP dozları düşük doz, 100 mg/kg/gün MEHP orta doz, 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP dozları ise yüksek doz olarak, 5 dozdan oluşan deney protokolü oluşturulmuştur.

Mono bütül fitalat uygulaması için doz seçimi yapılırken, literatürde bununla ilgili bir doz belirlemesi olmadığından Di bütül fitalat (DBP)'ın NOAEL ve LOAEL değerleri göz önüne alınarak doz seçimi yapılmıştır. DBP'in NOAEL değeri 19,9 mg/kg/gün ve LOAEL değeri 52 mg/kg/gün olarak literatürde gösterilmiştir [195]. Kullanılacak olan dozlar, en düşük doz NOAEL ve LOAEL değerleri arasında olacak şekilde 25 mg/kg/gün olarak seçilmiştir. Devamında, 25 ve 50 mg/kg/gün MBP dozları düşük doz, 100 mg/kg/gün dozu orta doz ve 200 ve 400 mg/kg/gün MBP dozları ise yüksek doz olarak belirlenip, 5 dozdan oluşan deney protokolü oluşturulmuştur.

MEHP uygulama gruplarından 1. gruba 25 mg/kg/gün, 2. gruba 50 mg/kg/gün, 3. gruba 100 mg/kg/gün, 4. gruba 200 mg/kg/gün ve 5. gruba 400 mg/kg/gün oral gavaj yoluyla 28 gün boyunca her sabah olacak şekilde uygulanmıştır. Aynı şekilde MBP uygulama gruplarından 1. gruba 25 mg/kg/gün, 2. gruba 50 mg/kg/gün, 3. gruba 100 mg/kg/gün, 4. gruba 200 mg/kg/gün ve 5. gruba 400

mg/kg/gün oral gavaj yoluyla uygulanmıştır. MEHP ve MBP uygulamaları 28. günün sonunda sona ermiştir.

Ayrıca, uygulamalardan önce her sabah sıçanların yem ve su tüketimi ile birlikte ağırlık ölçümü yapılmıştır.

### **3.2.9. Biyokimyasal analizler**

Sıçanların kalbinden steril enjektör ile alınan kan jelli, vakumlu tüplere alınmıştır. Alınan kan örneklerinden serum eldesi için tüpler 3000 rpm'de 25 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda jelin üzerinde kalan serum alınarak serumda ALT, AST enzimleri, üre, total protein, glikoz, albümin ve kreatinin miktarları ölçülmüştür. Analizler Seamaty SMT-120V marka biyokimya cihazında gerçekleştirilmiş ve Sigma-Aldrich marka ticari ölçüm kitleri kullanılmıştır.

### **3.2.10. Hematolojik analizler**

Deney gruplarındaki sıçanların kalplerinden deney sonunda steril enjektör ile alınan kanın 1 ml'si, heparinli tüplere konularak pıhtılaşması önlenmiştir. Örnekler aynı gün, DYMIND DH36 VET 19 Parametre Hematoloji otomatik kan sayım cihazında analiz edilerek lökosit, % nötrofil, % lenfosit, % monosit, eritrosit, hemoglobin, hematokrit, MCH (ortalama eritrosit hemoglobini), MCHC (ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu), MCV (ortama eritrosit hacmi), trombosit ve trombosit hacmi parametrelerinin analizi yapılmıştır.

### **3.2.11. Hormon ve Antikor Analizi İçin İmmünolojik Testler**

Hormon ve antikor analizleri için yapılacak olan immünolojik testlerde uygulama gruplarına ait serum kullanılmıştır. Hormon olarak insülin, ticari kit ile ölçülmüş, bunun için ELISA okuyucusu SHIMADZU UV-1800 UV-VIS spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Tip 1 diyabetin belirlenmesi ile Tip 1 ve Tip 2 diyabetin ayırıcı teşhisinde kullanılan testlerde serumda antikor miktarına bakılmaktadır [196,197]. Bu antikorlardan başlıcaları şunlardır:

- Adacık hücre antikor (Islet cell antibodies, ICA): Langerhans adacıklarında bulunan beta hücrelerine karşı gelişmiş IgG yapısındaki antikorlardır. Yeni tanı konmuş Tip 1 diyabetlilerin % 80'inde pozitif çıkmaktadır ve Tip 1 diyabet için tarama testi olarak kullanılmaktadır.

- İnsülin otoantikor (Insulin antibodies, IAA): Tip 1 diyabette ICA ile birlikte gösterilmesi güçlü bir tanı aracı olup, ELISA yöntemiyle bakılır. Tarama testi olarak kullanılır.

Adacık hücre ve insülin antikor, serumda ticari kitler kullanılarak SHIMADZU UV-1800 UV-VIS spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür.

### **3.2.12. Histopatolojik İncelemeler**

28. günün sonunda sıçanlara servikal dislokasyon yapılmış, nekroskopi ile pankreas, karaciğer ve böbrek dokuları alınmıştır. Ağırlıkları ölçülüp bir kısmı Bouin fiksatifinde 8 saat tespit edilip, %70'lik alkole konulmuştur. Diğer kısmı ise formalin (%10) fiksatifinde 24 saat süre tespit edildikten sonra sırayla %70'lik, %80'lik, %95'lik, %100'lük alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek, parafine gömülmüş ve blok haline getirilmiştir. Bloklar mikrotomda (Accu-Cut SRM 200) 5 µm kalınlığında kesitler alınarak preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar, Hematoksilen & Eosin boyasıyla boyanıp Zeiss Axio Scope A1 marka mikroskopta incelenmiş ve ZEN görüntüleme programı kullanılarak incelenmiş, görülen histopatolojik bulguların fotoğrafı çekilmiştir.



### 3.3. İstatistiksel Analizler

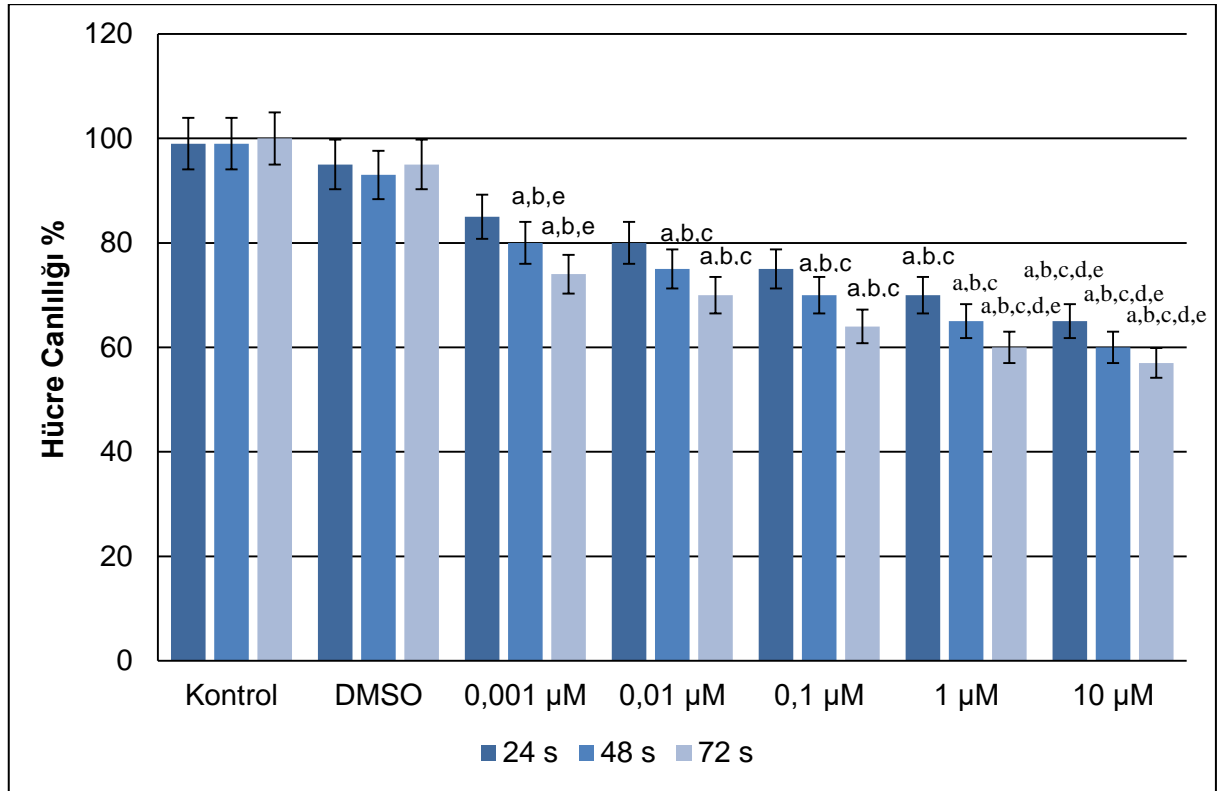
Araştırmadan elde edilen sonuçların İstatistiksel analizleri MedCalc (MedCalc Software, Belgium) programı ile yapılmıştır. Normal dağılıma uygunluğunun kontrol edilmesi Kolmogorov-Smirnov testi ile araştırılmıştır. Dağılımı normal olan değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA), post-hoc karşılaştırmalarında Tukey testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis H testi, post-hoc karşılaştırmalarında ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Ayrıca histopatolojik verilerin istatistiksel açıdan anlamlılığının değerlendirilmesi için elde edilen veriler üzerinde Fisher Exact Testi uygulanarak deney grupları yağ kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir. Farklılıklar  $p < 0,05$  önem kontrolü düzeyinde tespit edilmiş, veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1 Hücre Kültüründe MTT Sonuçları

#### 4.1.1 MEHP Uygulaması Sonuçları

MEHP'in hücre canlılığı üzerine etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. MTT sonucuna göre, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,01 ve 0,001  $\mu$ M doz gruplarında 48 ve 72. Saatin sonunda hücre canlılığı istatistiksel olarak azalış göstermiştir. (Şekil 4.1). 0,1, 1 ve 10  $\mu$ M doz gruplarında 24 saatin sonunda hücre canlılığı azalmıştır.



**Şekil 4.1.** INS-1 hücrelerinde MEHP uygulaması sonrası bulunan hücre canlılık yüzdeleri.

<sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>b</sup>DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

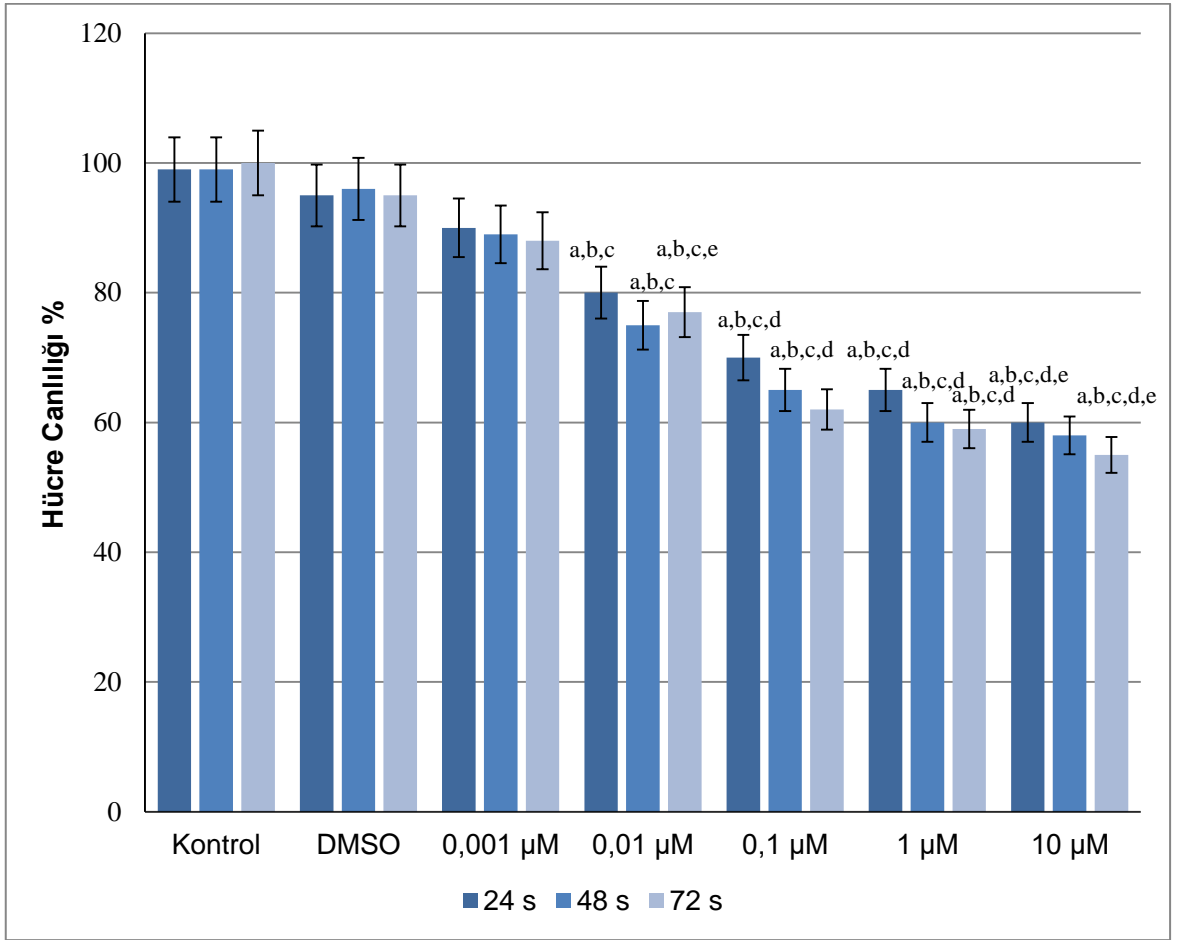
<sup>c</sup>0,001  $\mu$ M grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>d</sup>0,01  $\mu$ M grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>e</sup>0,1  $\mu$ M grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

#### 4.1.2. MBP uygulaması sonuçları

MBP'in hücre canlılığı üzerine etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. MTT sonucuna göre, uygulanan MBP dozu ve süresi arttıkça hücre canlılığı istatistiksel olarak azalmıştır (Şekil 4.2). Bu azalış 10 µM, 1µM, 0,1 µM ve 0,01 µM doz gruplarında kontrol grup ve 0,001 µM doz grubuna göre anlamlı bulunmuştur.



**Şekil 4.2.** INS-1 hücrelerinde MBP uygulaması sonrası bulunan hücre canlılık yüzdeleri.

<sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>b</sup> DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>c</sup> 0,001 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

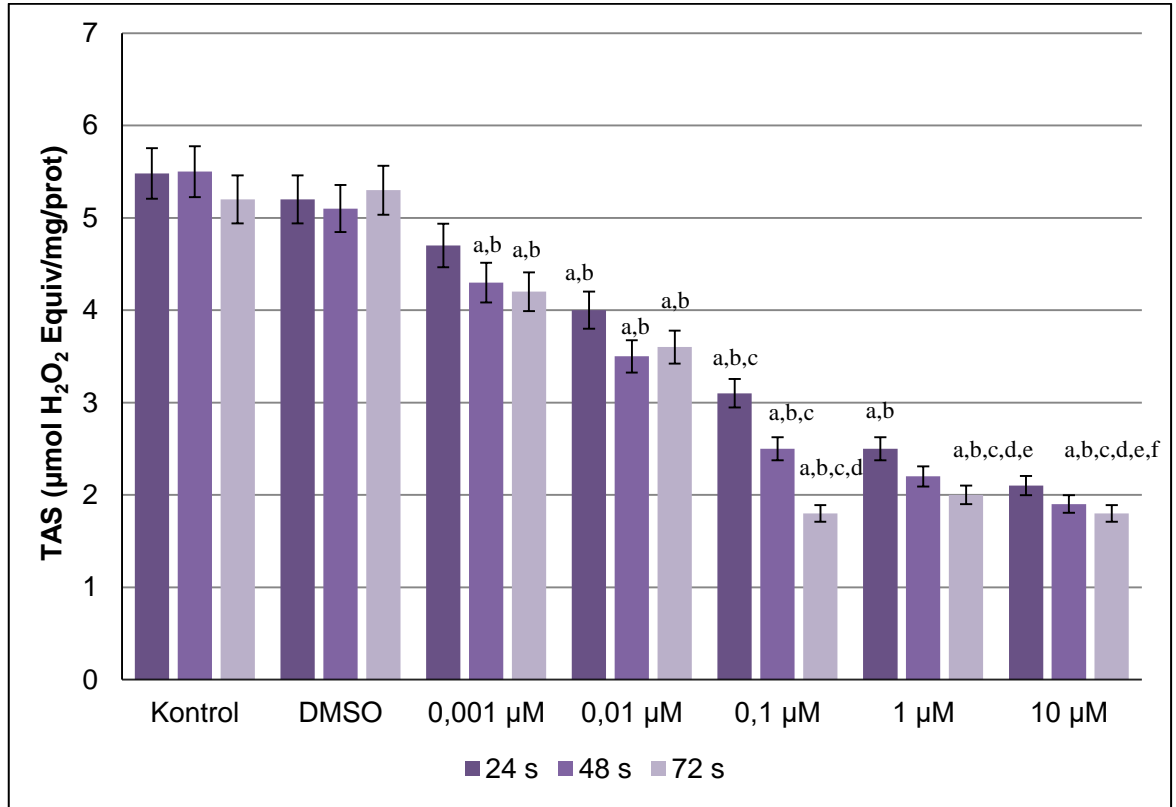
<sup>d</sup> 0,01 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>e</sup> 0,1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

## 4.2 Total Antioksidan Statü (TAS) ve Total Oksidan Statü (TOS) Sonuçları

### 4.2.1 MEHP Uygulaması TAS Sonuçları

MEHP uygulaması sonrasında gruplarda total antioksidan statüsü ölçülmüştür. Ölçüm sonuçlarına göre, 10 µM, 1 µM MEHP, 0,1 µM MEHP ve 0,01 µM MEHP doz gruplarında TAS seviyesi, diğer gruplara göre, ölçülen zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 4.3). 0,001 µM MEHP grubunda, 48 ve 72. Saatin sonunda total antioksidan miktarı kontrol ve DMSO grubuna göre azalış göstermiştir.



**Şekil 4.3.** INS-1 hücrelerinde MEHP uygulaması sonunda total antioksidan statü (TAS) ölçüm sonuçları. .

<sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>b</sup> DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>c</sup> 0,001 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

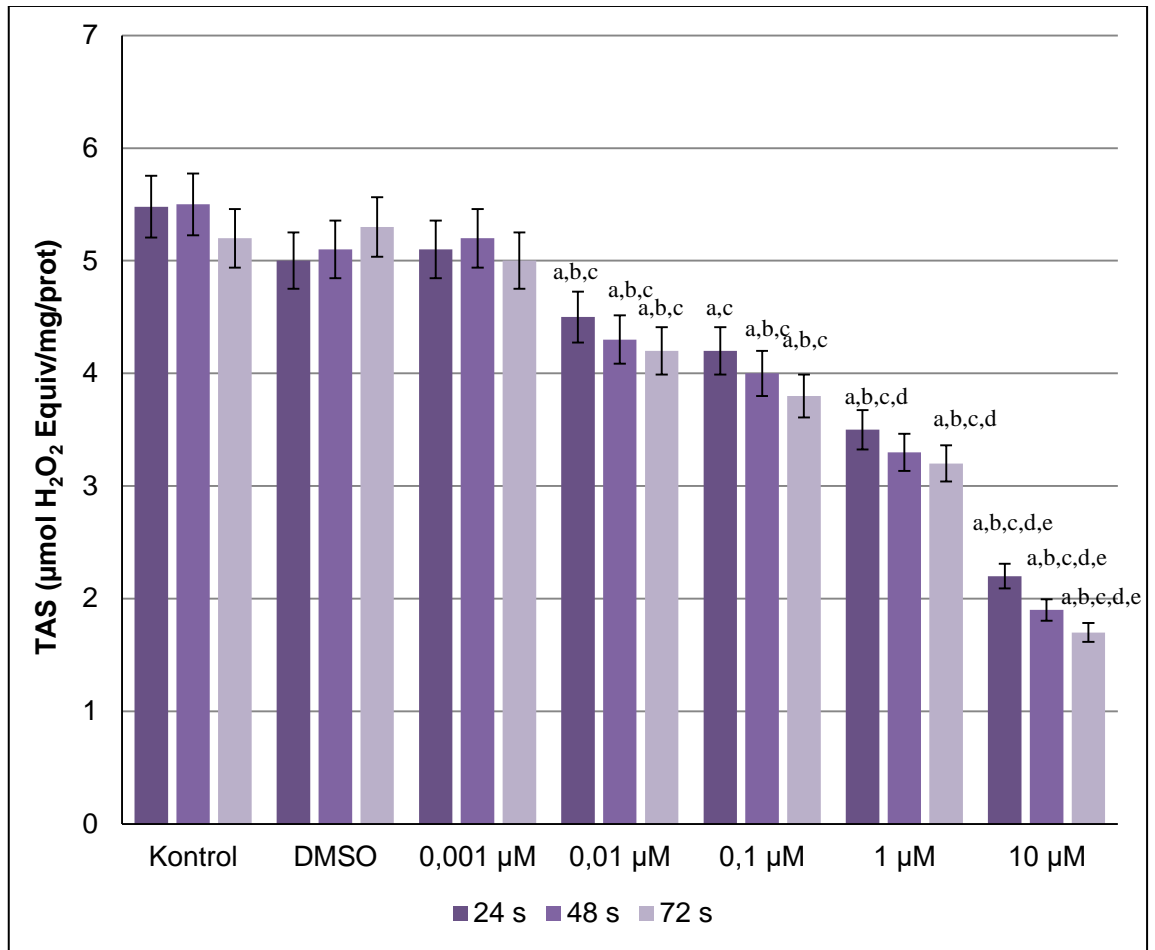
<sup>d</sup> 0,01 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>e</sup> 0,1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>f</sup> 1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.2 MBP Uygulamasında TAS sonuçları

MBP uygulaması sonrasında gruplarda total antioksidan statüsü ölçülmüştür. Ölçüm sonuçlarına göre, 10 µM, 1 µM, 0,1 µM doz gruplarında TAS seviyesi, diğer gruplara göre, ölçülen zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 4.4). 0,01 µM doz grubunda kontrol, DMSO ve 0,001 MBP doz grubuna göre anlamlı bir azalma görülmüştür.



**Şekil 4.4.** INS-1 hücrelerinde MBP uygulaması sonunda total antioksidan statü (TAS) ölçüm sonuçları.

<sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>b</sup> DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

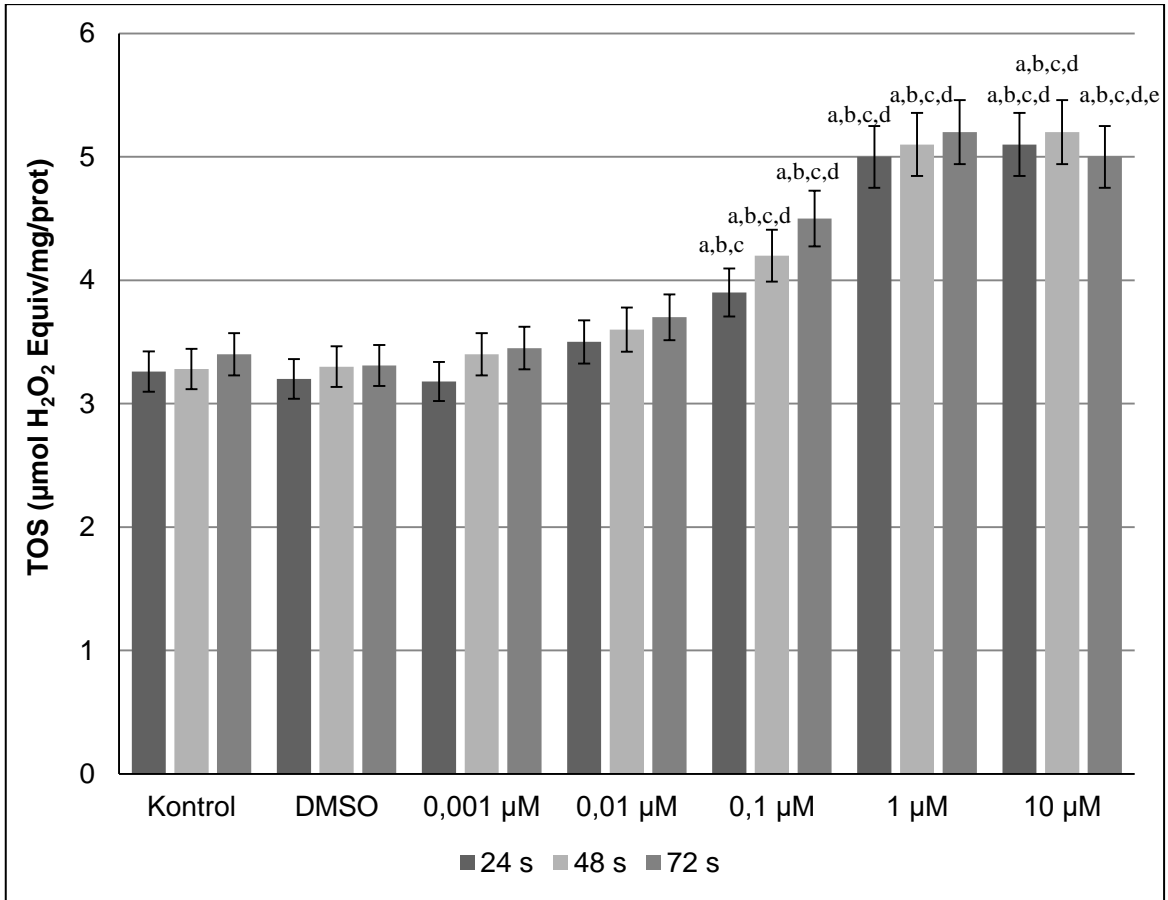
<sup>c</sup> 0,001 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>d</sup> 0,01 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>e</sup> 0,1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

### 4.2.3 MEHP uygulaması TOS sonuçları

MEHP uygulaması sonrasında total oksidan statüsü ölçülmüştür. Ölçüm sonuçlarına göre, 10, 1 ve 0,1  $\mu\text{M}$  MEHP doz gruplarında TOS seviyesi, diğer gruplara göre, ölçülen zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı olarak artış göstermiştir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** INS-1 hücrelerinde MEHP uygulaması sonunda total oksidan statüsü (TOS) ölçüm sonuçları.

<sup>a</sup>Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>b</sup>DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

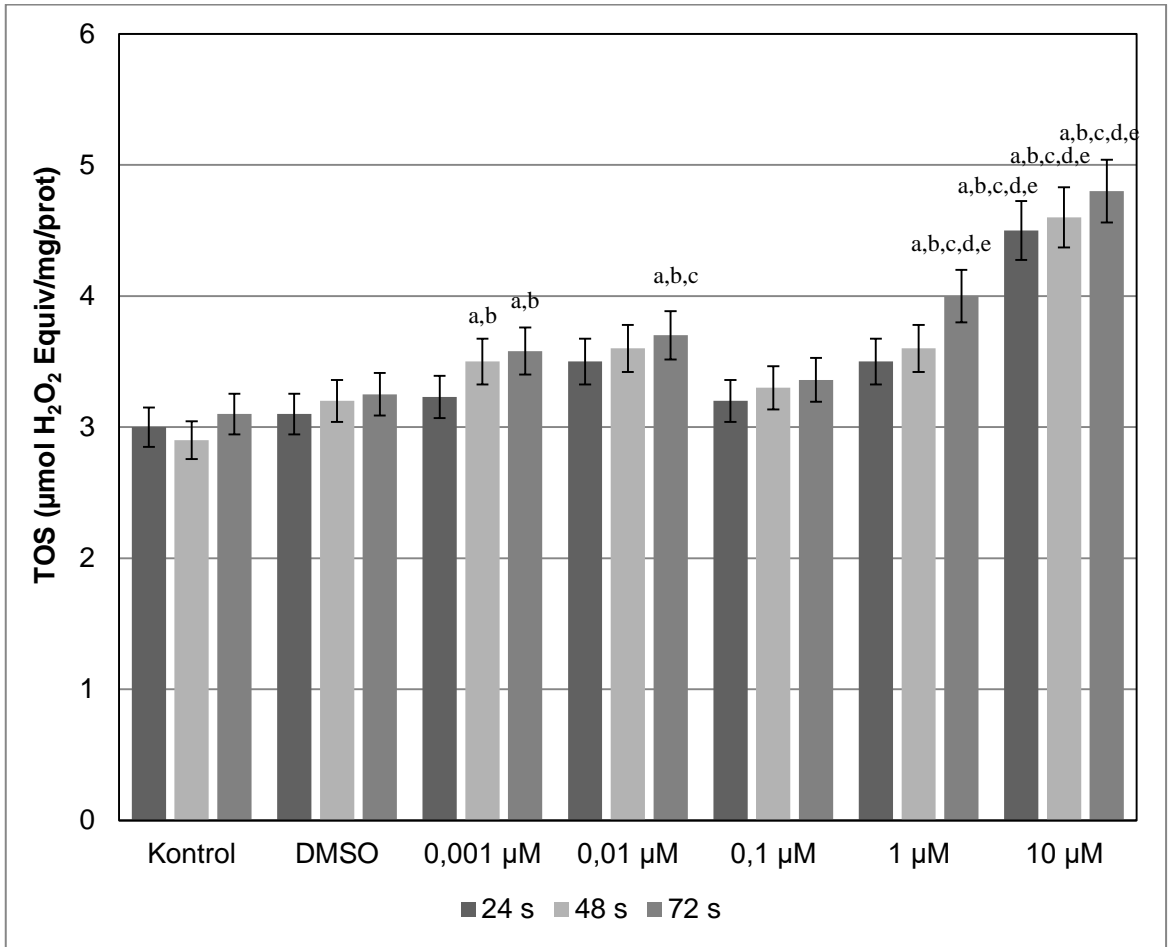
<sup>c</sup>0,001  $\mu\text{M}$  grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>d</sup>0,01  $\mu\text{M}$  grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>e</sup>0,1  $\mu\text{M}$  grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

#### 4.2.4 MBP Uygulamasında TOS Sonuçları

MBP uygulaması sonrasında total oksidan statüsü ölçülmüştür. Buna göre 10, 1 ve 0,001  $\mu\text{M}$  doz gruplarında, doz ve süre artışıyla birlikte total oksidan seviyesinde bir artış görülmüştür (Şekil 4.6). 0,01  $\mu\text{M}$  doz grubunda 72. Saatin sonunda total oksidan miktarı artmış ve kontrole göre anlamlı bulunmuştur.



**Şekil 4.6.** INS-1 hücrelerinde MBP uygulaması sonunda total oksidan statüsü (TOS) ölçüm sonuçları.

<sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>b</sup> DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>c</sup> 0,001  $\mu\text{M}$  grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

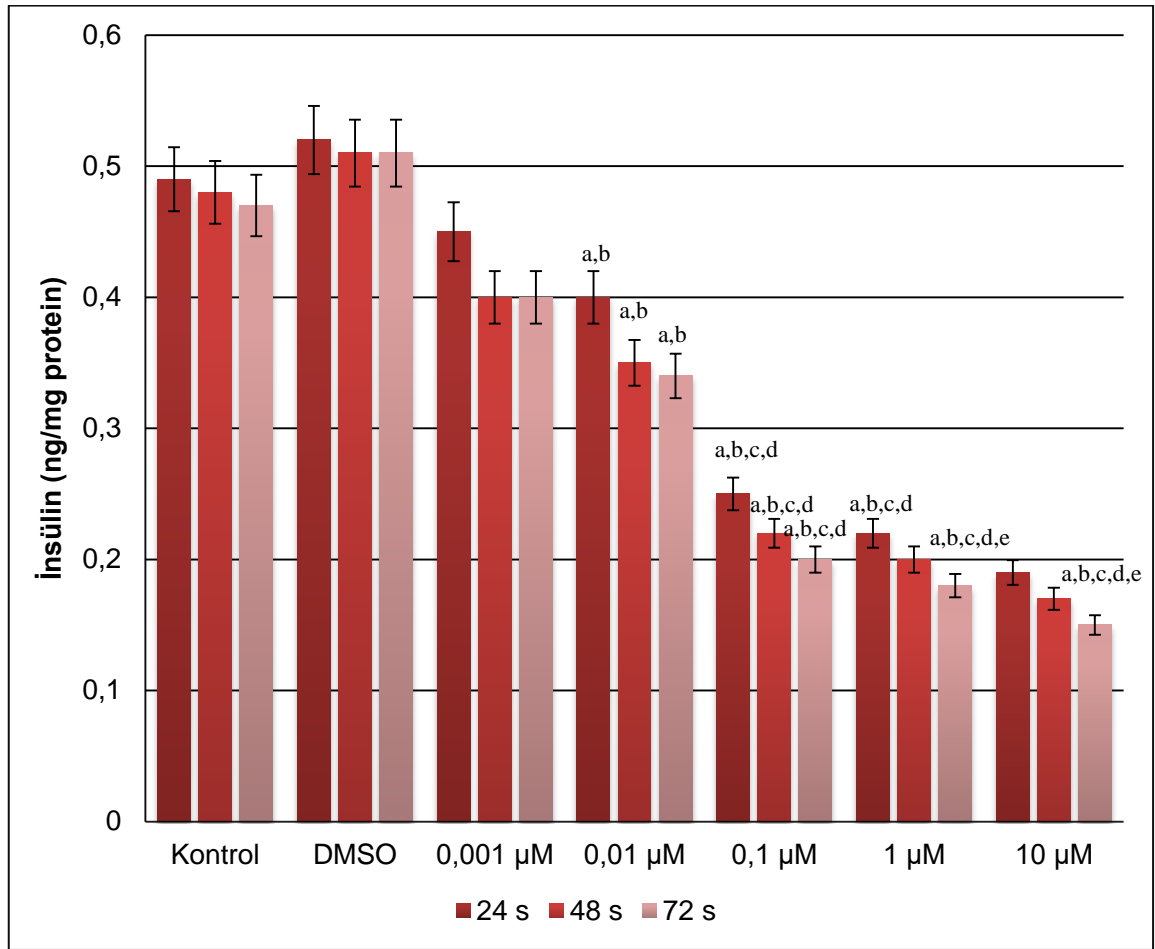
<sup>d</sup> 0,01  $\mu\text{M}$  grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>e</sup> 0,1  $\mu\text{M}$  grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

### 4.3 İnsülin Sekresyon Ölçümü Sonuçları

#### 4.3.1 MEHP Uygulaması Sonuçları

MEHP'in INS-1 hücrelerine uygulanmasından sonra hücrelerin ürettiği insülin miktarı ölçülmüş, doz miktarı arttıkça salınan insülin miktarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8). 10µM, 1µM, 0,1 µM ve 0,01 µM doz gruplarında 5,5 mmol/L glikoz uygulamasından sonra her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür.



**Şekil 4.7.** INS-1 hücrelerinde MEHP uygulaması sonunda 5,5 mmol/L glikoz içeren ortamda insülin sekresyon ölçüm sonuçları.

<sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>b</sup>DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

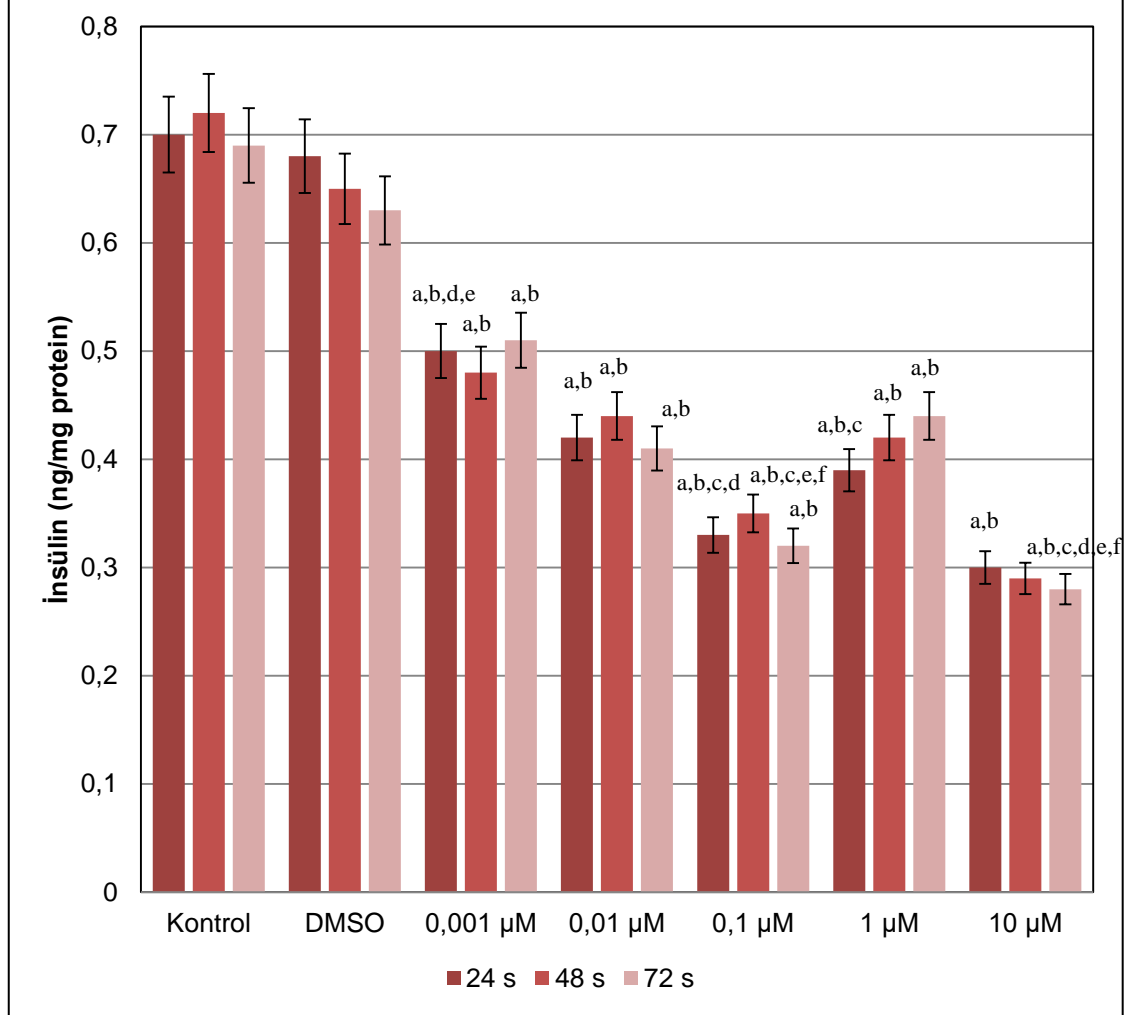
<sup>c</sup>0,001 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>d</sup>0,01 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>e</sup>0,1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ).



16,7 mmol/L glikoz içeren ortamda, INS-1 hücrelerinin salgıladığı insülin miktarı, 24, 48 ve 72. saatin sonunda bütün uygulama gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalma göstermiştir.



**Şekil 4.8.** INS-1 hücrelerinde MEHP uygulaması sonunda 16,7 mmol/L glikoz içeren ortamda insülin sekresyon ölçüm sonuçları.

<sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>b</sup> DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>c</sup> 0,001 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

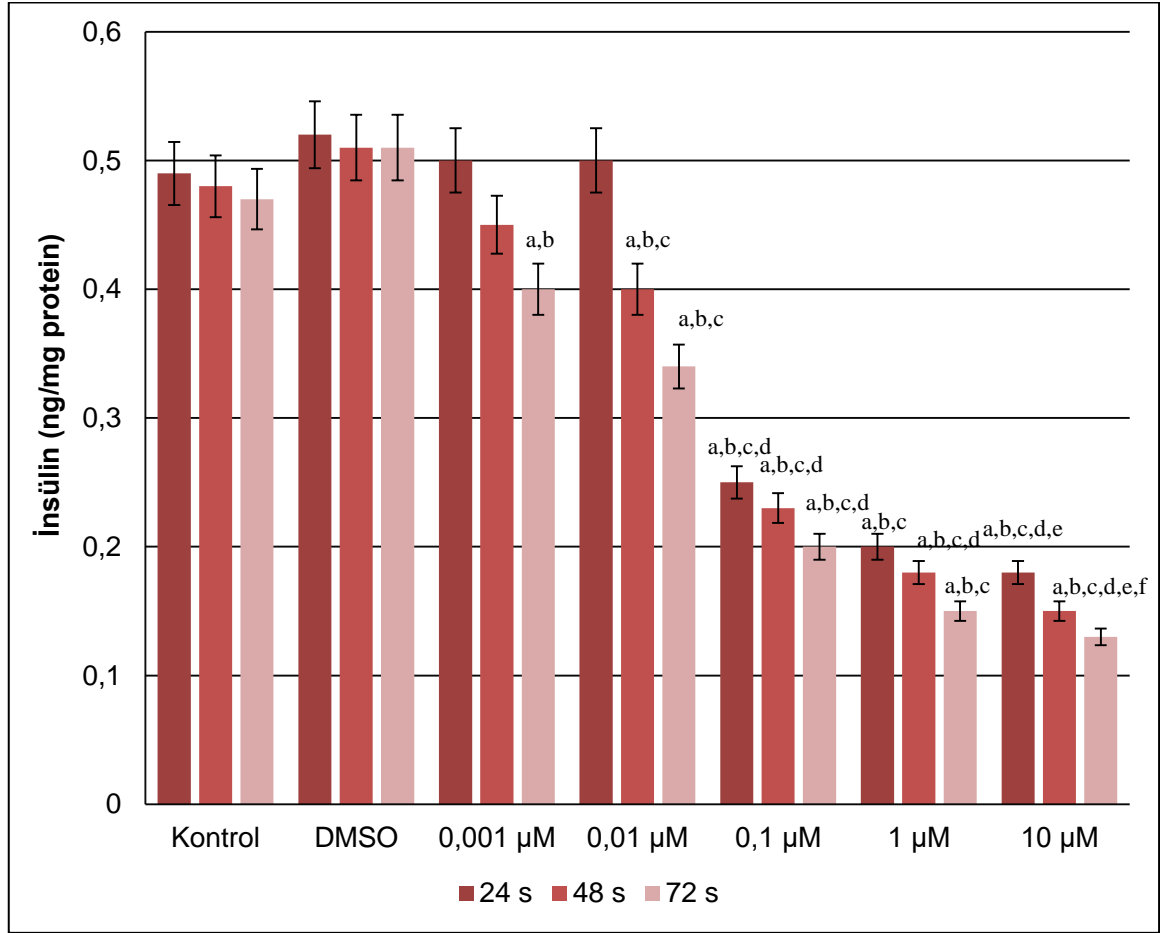
<sup>d</sup> 0,01 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>e</sup> 0,1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>f</sup> 1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ).

### 4.3.2 MBP Uygulamasý Sonuçları

MBP'in uygulandığı INS-1 hücrelerinde, uygulanan doz miktarı arttıkça insülin hormonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olmuştur. (şekil 4.8). Buna göre 72. Saatin sonunda bütün doz gruplarında istatistiksel olarak bir azalma görülmüştür. 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1 $\mu$ M ve 10  $\mu$ M doz gruplarında 48 saat sonunda anlamlı bir azalma görülürken, 0,1  $\mu$ m, 1 $\mu$ M ve 10  $\mu$ M doz gruplarında 24 saatin sonunda da anlamlı bir azalma olmuştur.



**řekil 4.9.** INS-1 hücrelerinde MBP uygulamasý sonunda 5,5 mmol/L glikoz içeren ortamda insülin sekresyon ölçüm sonuçları.

<sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>b</sup>DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

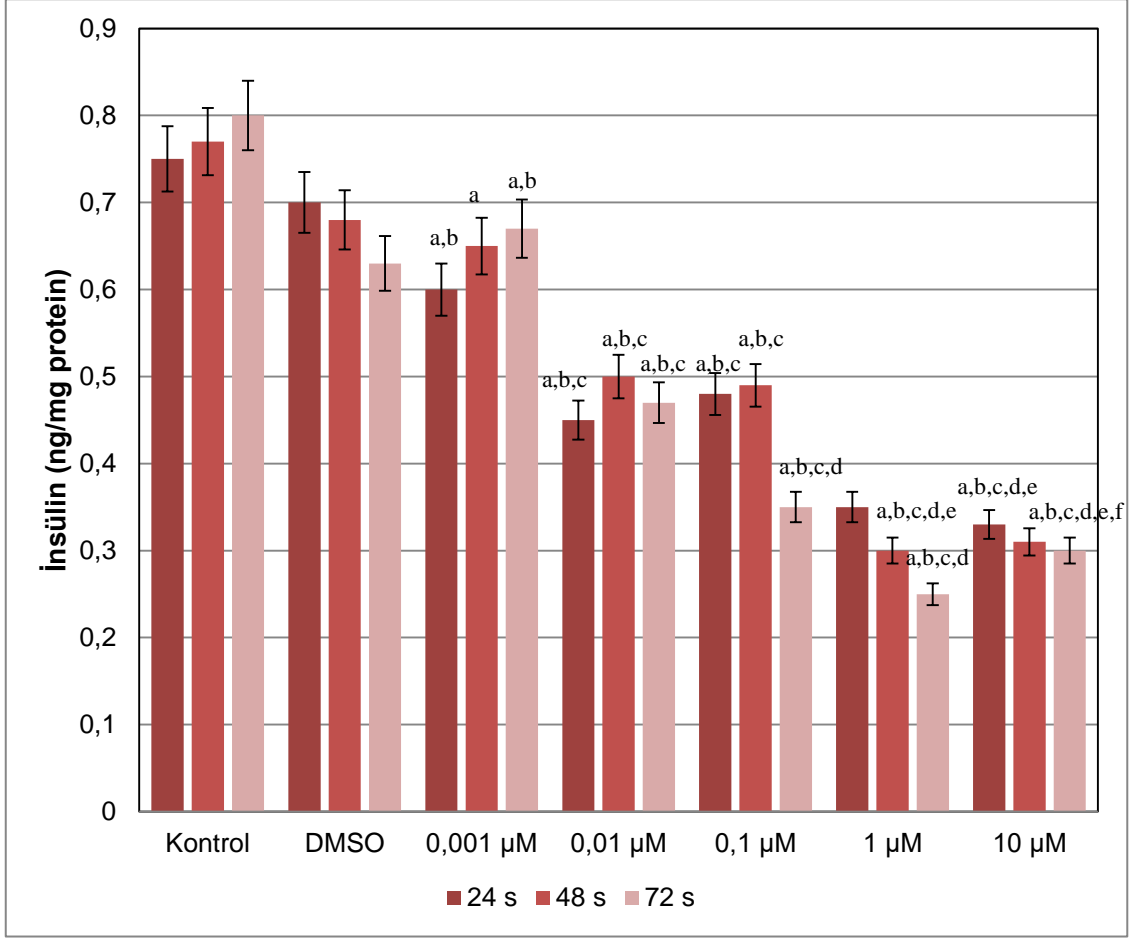
<sup>c</sup>0,001  $\mu$ M grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>d</sup>0,01  $\mu$ M grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>e</sup>0,1  $\mu$ M grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),

<sup>f</sup>1  $\mu$ M grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ).

INS-1 hücrelerine uygulanan MBP doz gruplarından, 10  $\mu$ M, 1 $\mu$ M ve 0,1  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M doz gruplarında 24,48 ve 72 saatin sonunda insülin hormonunda istatistiksel olarak azalma görülmüştür. 0, 001  $\mu$ M doz grubunda kontrol grubuna göre insülin hormonunda anlamlı bir azalma görülmüştür.



**Şekil 4.10.** INS-1 hücrelerinde MBP uygulaması sonunda 16,7 mmol/L glikoz içeren ortamda insülin sekresyon ölçüm sonuçları.

- <sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),
- <sup>b</sup> DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),
- <sup>c</sup> 0,001  $\mu$ M grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),
- <sup>d</sup> 0,01  $\mu$ M grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),
- <sup>e</sup> 0,1  $\mu$ M grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ),
- <sup>f</sup> 1  $\mu$ M grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ).

#### **4.4.Real Time PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi Sonuçları**

##### **4.4.1 MEHP Uygulaması Sonucunda mRNA Ekspresyonu Seviyeleri**

MEHP uygulaması yapılan hücrelerde gen ekspresyonu analizi 24. saatin sonunda Real time PCR ile ölçülmüştür. Buna göre beta hücre proliferasyonunda rol oynayan genlerin ekspresyonu doz artışı ile birlikte kontrol grubuna göre istatistiksel olarak baskılanmıştır (Çizelge 4.1). 48. saatin sonunda ölçümü yapılan genlerin ekspresyon ölçümleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. 72. saatin sonunda ölçümü yapılan genlerin ekspresyon ölçümlerinin sonuçları ise Çizelge 4.3'de verilmiştir. Buna göre hem 48 hem de 72. saatin sonunda, p53 geni dışındaki diğer genlerin ekspresyon seviyeleri kontrol ve DMSO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde baskılanmıştır.

##### **4.4.2. MBP Uygulaması Sonucunda mRNA Ekspresyonu Seviyeleri**

MBP uygulaması yapılan hücrelerde 24. saatin sonunda doz artışına bağlı olarak p53 hariç diğer genlerin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Çizelge 4.4). 48. saatin sonunda ölçümü yapılan genlerin ekspresyon ölçümleri Çizelge 4.5'de, 72. saatin sonunda ölçümü yapılan genlerin ekspresyon ölçümlerinin sonuçları ise Çizelge 4.6'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1.** MEHP uygulaması sonrası ilgili genlerin 24 saat sonundaki mRNA ekspresyon düzeyleri

	<b>Kontrol</b>	<b>DMSO</b>	<b>0,001 µM</b>	<b>0,01 µM</b>	<b>0,1 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>10 µM</b>
<b>FOXO-1</b>	+0,10	+0,01	-0,16	-0,29	-0,43	-1,21	-1,25 <sup>a,b,c,d</sup>
<b>PDX-1</b>	+0,21	+0,19	-0,17	-0,32	-0,98	-1,19	-1,52 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>SIRT-1</b>	+0,11	+0,12	-0,54	-0,77	-1,14 <sup>a,b,c,f,g</sup>	-1,65 <sup>a,b,c,g</sup>	-1,90 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>İNS-1</b>	+0,50	+0,48	-0,20 <sup>a,b</sup>	-0,70	-1,10	-1,50	-2,10 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>İNS-2</b>	+0,49	+0,47	-0,10	-0,48	-1,52	-1,73 <sup>a,b,c</sup>	-2,01
<b>P53</b>	+0,10	+0,18	+0,56	+0,76	+0,98	+0,99	+1,56 <sup>a,b,c</sup>
<b>BCL-2</b>	+0,43	+0,39	-0,16	-0,17	-0,32	-1,32	-1,33 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>BCL-XL</b>	+0,21	+0,24	-0,26	-0,38	-0,59	-0,94 <sup>a,b,c,d,g</sup>	-1,55

<sup>a</sup>Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ), <sup>b</sup>DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ), <sup>c</sup>0,001 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ), <sup>d</sup>0,01 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ), <sup>e</sup>0,1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ), <sup>f</sup>1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ). <sup>g</sup>10 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0.05$ ). (+ gen ekspresyonu misli artışı, - gen ekspresyonu misli baskılanması).

**Çizelge 4.2.** MBP uygulaması sonrası ilgili genlerin 24. saat sonundaki mRNA ekspresyon düzeyleri

	<b>Kontrol</b>	<b>DMSO</b>	<b>0,001 µM</b>	<b>0,01 µM</b>	<b>0,1 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>10 µM</b>
<b>FOXO-1</b>	+0,11	+0,05	-0,12 <sup>a,b,e,f,g</sup>	-0,19	-0,33	-0,87	-0,99 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>PDX-1</b>	+0,12	+0,17	-0,35	-0,54	-0,78	-1,99 <sup>a,b,c,d,e</sup>	-2,50
<b>SIRT-1</b>	+0,11	+0,12	-0,34	-0,67	-0,54 <sup>a,b,c,d,f,g</sup>	-0,80	-1,01
<b>İNS-1</b>	+0,29	+0,28	-1,22	-1,56	-1,78	-2,59	-3,20 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>
<b>İNS-2</b>	+0,21	+0,32	-1,01	-1,38 <sup>a,b,g</sup>	-1,52	-1,63	-2,20
<b>P53</b>	+0,18	+0,17	+0,26	+0,56 <sup>a,b,f,g</sup>	+0,99	+1,57	+1,98
<b>BCL-2</b>	+0,23	+0,39	-0,69	-0,68	-0,92	-1,52	-2,34 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>
<b>BCL-XL</b>	+0,21	+0,25	-0,79 <sup>a,b,f,g</sup>	-0,89	-0,99	-1,50	-2,75

<sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>b</sup>DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>c</sup>0,001 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>d</sup>0,01 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>e</sup>0,1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>f</sup>1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ). <sup>g</sup>10 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ). (+gen ekspresyonu artışı, - gen ekspresyonu baskılanması).

**Çizelge 4.3.** MEHP uygulaması sonrası ilgili genlerin 48. saat sonundaki mRNA ekspresyon düzeyleri

	<b>Kontrol</b>	<b>DMSO</b>	<b>0,001 µM</b>	<b>0,01 µM</b>	<b>0,1 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>10 µM</b>
<b>FOXO-1</b>	+0,10	+0,01	-0,11	-0,21	-0,63	-1,03	-1,25 <sup>a,b,c,d</sup>
<b>PDX-1</b>	+0,21	+0,22	-0,17	-0,22	-0,58	-0,79	-1,62 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>SIRT-1</b>	+0,12	+0,14	-0,43	-0,67	-1,10 <sup>a,b,c,f,g</sup>	-1,21 <sup>a,b,c,g</sup>	-1,80 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>İNS-1</b>	+0,50	+0,51	-0,20 <sup>a,b</sup>	-0,87	-1,15	-1,40	-1,10 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>İNS-2</b>	+0,39	+0,45	-0,15	-0,42	-1,13	-1,33 <sup>a,b,c</sup>	-1,55
<b>P53</b>	+0,10	+0,17	+0,66	+0,65	+0,70	+1,33	+2,56 <sup>a,b,c</sup>
<b>BCL-2</b>	+0,53	+0,59	-0,36	-0,44	-0,78	-1,36	-1,89 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>BCL-XL</b>	+0,31	+0,34	-0,21	-0,55	-0, 57	-0,84 <sup>a,b,c,d,g</sup>	-1,87

<sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>b</sup>DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>c</sup>0,001 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>d</sup>0,01 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>e</sup>0,1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>f</sup>1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ). <sup>g</sup>10 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ). (+ gen ekspresyonu misli artışı, - gen ekspresyonu misli baskılanması).

**Çizelge 4.4.** MBP uygulaması sonrası ilgili genlerin 48. saat sonundaki mRNA ekspresyon düzeyleri

	<b>Kontrol</b>	<b>DMSO</b>	<b>0,001 µM</b>	<b>0,01 µM</b>	<b>0,1 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>10 µM</b>
<b>FOXO-1</b>	+0,10	+0,01	-0,26	-0,29	-0,55	-1,11	-1,25 <sup>a,b,c,d</sup>
<b>PDX-1</b>	+0,11	+0,10	-0,20	-0,31	-0,39	-0,67	-0,52, <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>SIRT-1</b>	+0,11	+0,11	-0,68	-0,55	-1,04 <sup>a,b,c,f,g</sup>	-1,88 <sup>a,b,c,g</sup>	-2,01 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>İNS-1</b>	+0,42	+0,24	-0,24 <sup>a,b</sup>	-0,52	-1,22	-1,18	-1,10 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>İNS-2</b>	+0,22	+0,27	-0,43	-0,44	-1,34	-1,31 <sup>a,b,c</sup>	-1,89
<b>P53</b>	+0,09	+0,11	+0,16	+0,27	+0,65	+0,76	+1,44 <sup>a,b,c</sup>
<b>BCL-2</b>	+0,43	+0,39	-0,16	-0,17	-0,32	-1,32	-1,33 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>BCL-XL</b>	+0,21	+0,24	-0,26	-0,38	-0,59	-0,94 <sup>a,b,c,d,g</sup>	-1,55

<sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>b</sup>DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>c</sup>0,001 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>d</sup>0,01 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>e</sup>0,1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>f</sup>1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>g</sup>10 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ). (+ gen ekspresyonu misli artışı, - gen ekspresyonu misli baskılanması).



**Çizelge 4.5.** MEHP uygulaması sonrası ilgili genlerin 72. saat sonundaki mRNA ekspresyon düzeyleri

	<b>Kontrol</b>	<b>DMSO</b>	<b>0,001 µM</b>	<b>0,01 µM</b>	<b>0,1 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>10 µM</b>
<b>FOXO-1</b>	+0,10	+0,11	-0,19	-0,71	-1,24	-1,49	-2,15 <sup>a,b,c,d</sup>
<b>PDX-1</b>	+0,11	+0,15	-0,27	-0,67	-1,12	-1,99	-2,52 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>SIRT-1</b>	+0,14	+0,13	-0,59	-0,98	-1,65 <sup>a,b,c,f,g</sup>	-2,10 <sup>a,b,c,g</sup>	-2,87 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>İNS-1</b>	+0,40	+0,38	-0,28 <sup>a,b</sup>	-0,90	-1,55	-1,98	-2,54 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>İNS-2</b>	+0,48	+0,45	-0,15	-0,66	-1,66	-1,84 <sup>a,b,c</sup>	-2,05
<b>P53</b>	+0,12	+0,15	+0,87	+0,97	+1,04	+1,92	+2,56 <sup>a,b,c</sup>
<b>BCL-2</b>	+0,39	+0,37	-0,16	-0,17	-0,32	-1,32	-1,33 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>BCL-XL</b>	+0,23	+0,28	-0,37	-0,45	-0,88	-1,67 <sup>a,b,c,d,g</sup>	-2,22

<sup>a</sup>Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>b</sup>DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>c</sup>0,001 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>d</sup>0,01 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>e</sup>0,1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>f</sup>1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>g</sup>10 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ). (+ gen ekspresyonu misli artışı, - gen ekspresyonu misli baskılanması).

**Çizelge 4.6.** MBP uygulaması sonrası ilgili genlerin 72. saat sonundaki mRNA ekspresyon düzeyleri

	Kontrol	DMSO	0,001 µM	0,01 µM	0,1 µM	1 µM	10 µM
<b>FOXO-1</b>	+0,15	+0,11	-0,24	-0,51	-0,89	-1,56	-1,99 <sup>a,b,c,d</sup>
<b>PDX-1</b>	+0,20	+0,18	-0,25	-0,46	-0,56	-0,89	-1,45 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>SIRT-1</b>	+0,11	+0,13	-0,66	-0,78	-1,08 <sup>a,b,c,f,g</sup>	-1,45 <sup>a,b,c,g</sup>	-2,10 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>İNS-1</b>	+0,49	+0,47	-0,19 <sup>a,b</sup>	-0,45	-0,98	-1,12	-2,56 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>İNS-2</b>	+0,47	+0,45	-0,21	-0,76	-1,67	-2,23 <sup>a,b,c</sup>	-2,98
<b>P53</b>	+0,14	+0,17	+0,87	+0,99	+1,98	+2,46	+3,56 <sup>a,b,c</sup>
<b>BCL-2</b>	+0,33	+0,35	-0,46	-0,67	-1,232	-1,87	-2,45 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>BCL-XL</b>	+0,20	+0,26	-0,34	-0,42	-1,33	-1,94 <sup>a,b,c,d,g</sup>	-2,61

<sup>a</sup> Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>b</sup>DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>c</sup>0,001 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>d</sup>0,01 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>e</sup>0,1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>f</sup>1 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ), <sup>g</sup>10 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ( $p \leq 0,05$ ). (+ gen ekspresyonu misli artışı, - gen ekspresyonu misli baskılanması).

## **4.5 Besin ve Su Tüketim Sonuçları**

### **4.5.1 MEHP Uygulaması Sonucunda Sıçanların Yem ve Su Tüketimleri**

Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin ve su miktarları Çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Deney sonunda uygulama gruplarının su tüketimleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında artış görülmesine rağmen anlamlı olarak bir farklılık bulunamamıştır. Ancak uygulama gruplarının yem tüketimleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP doz gruplarında oluşan artış, yağ kontrol ile 25 ve 50 mg/kg/gün MEHP doz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

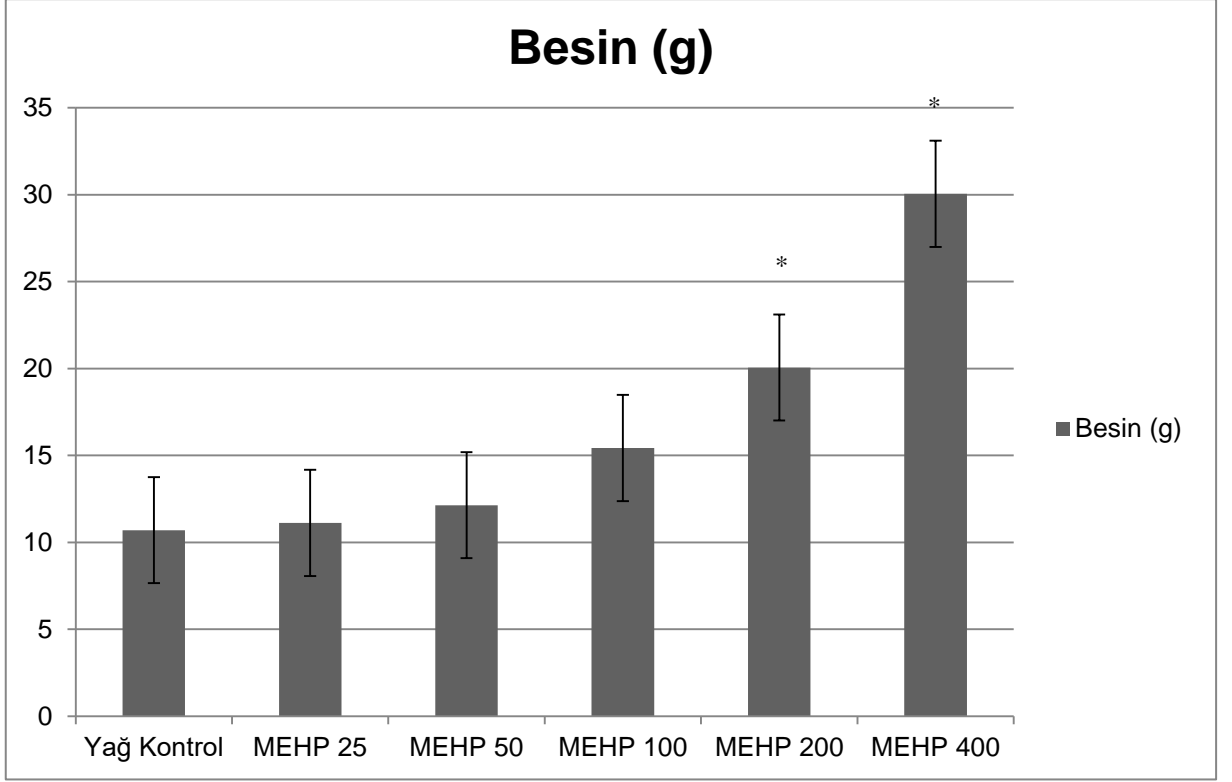
### **4.5.2 MBP Uygulaması Sonucunda Sıçanların Yem ve Su tüketimleri**

Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin ve su miktarları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Deney sonunda uygulama gruplarının su tüketimleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak bir farklılık bulunamamıştır. 200 ve 400 mg/kg/gün MBP doz gruplarında oluşan artış ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

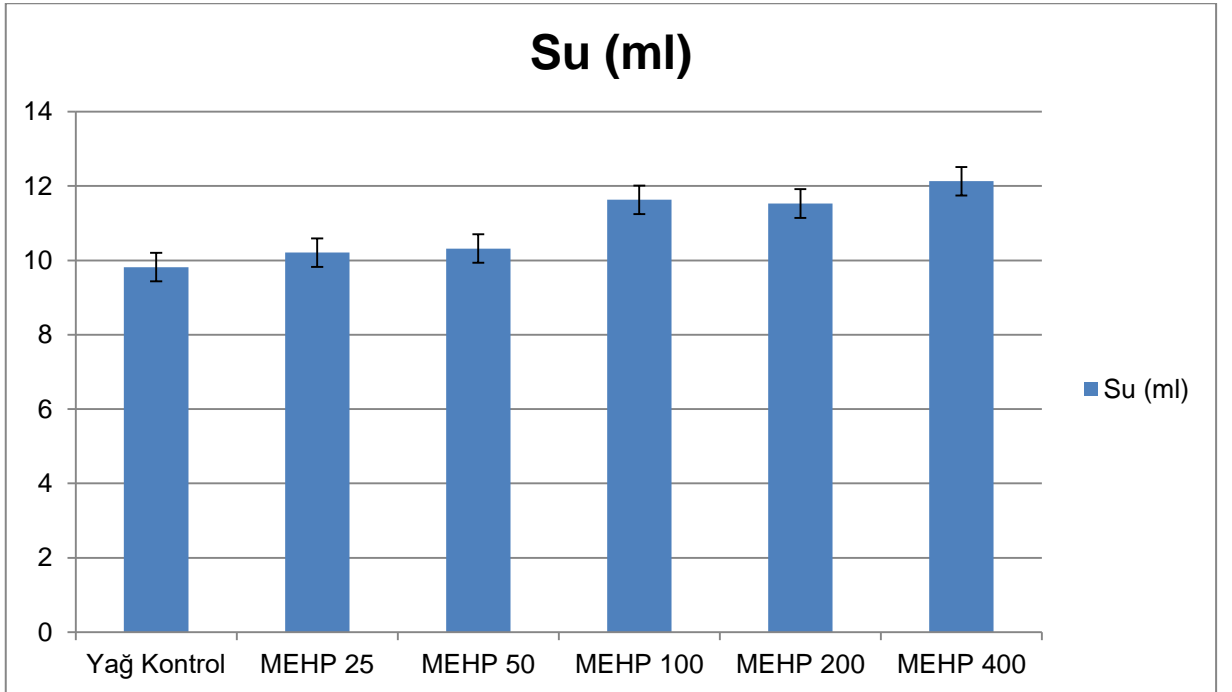
**Çizelge 4. 7.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin ve su miktarları

	<b>Yağ Kontrol (1 ml)</b>	<b>MEHP (25 mg/kg/gün)</b>	<b>MEHP (50 mg/kg/gün)</b>	<b>MEHP (100 mg/kg/gün)</b>	<b>MEHP (200 mg/kg/gün)</b>	<b>MEHP (400 mg/kg/gün)</b>
<b>Besin(g)</b>	10,70±3,60	11,12±1,01	12,14±2,29	15,43±4,37	20,06±6,51 <sup>a,b,c,f</sup>	30,05±5,72 <sup>a,b,c,de</sup>
<b>Su(ml)</b>	9,82±2,76	10,21±0,12	10,32±0,78	11,63±2,95	11,53±1,39	12,13±3,81

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 25 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 50 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>e</sup> 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>f</sup> 400 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (p≤0,05).



**Şekil 4.11.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin miktarı (\* Yağ kontrol grubundan farklı)



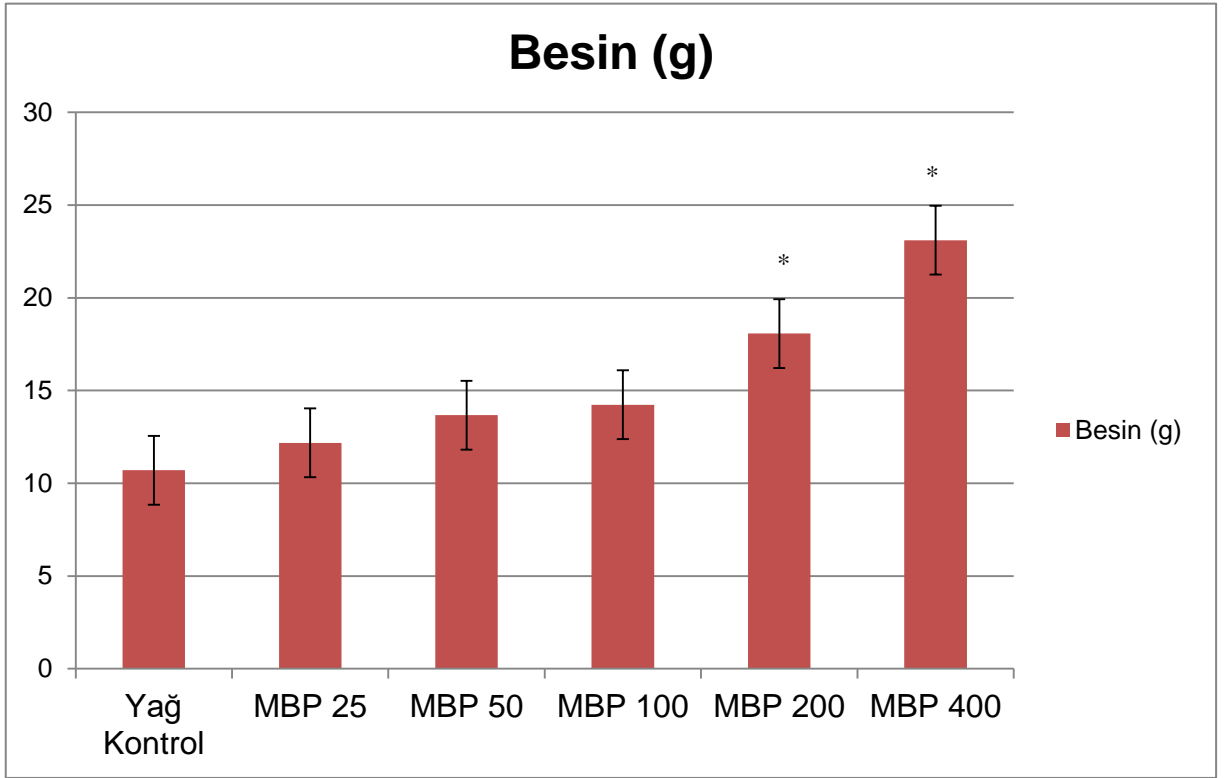
**Şekil 4.12.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri su miktarı

**Çizelge 4. 8.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin ve su miktarları

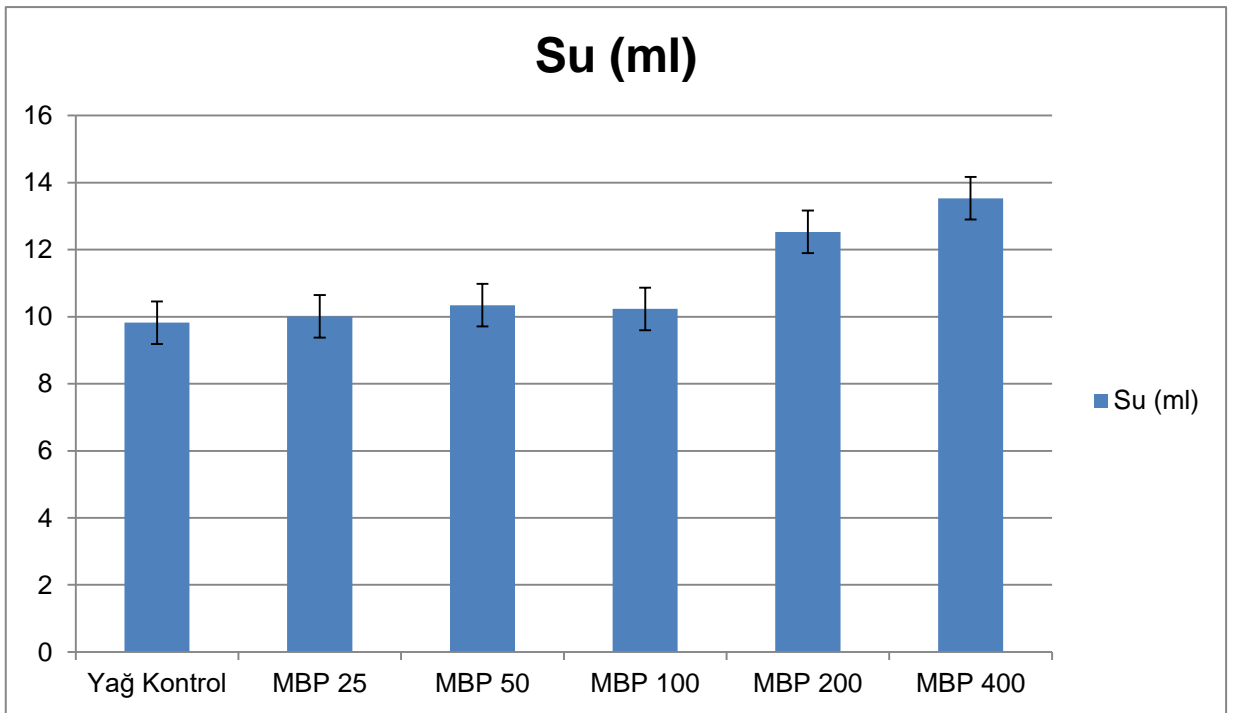
	<b>Yağ Kontrol (1 ml)</b>	<b>MBP (25 mg/kg/gün)</b>	<b>MBP (50 mg/kg/gün)</b>	<b>MBP (100 mg/kg/gün)</b>	<b>MBP (200 mg/kg/gün)</b>	<b>MBP (400 mg/kg/gün)</b>
<b>Besin(g)</b>	10,70±3,60	12,18±1,03	13,67±2,32	14,23±4,37	18,07±6,51 <sup>a</sup>	23,10±5,72 <sup>a,b,c,d</sup>
<b>Su (ml)</b>	9,82±2,76	10,01±0,54	10,34±0,33	10,23±2,95	12,53±1,39	13,53±3,81

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 25 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 50 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı,

<sup>d</sup> 100 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (p≤0,05).



**Şekil 4.13.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin miktarı (\* Yağ kontrol grubundan farklı)



**Şekil 4.14.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri su miktarları

## **4.6. Vücut Ağırlık Değişimleri**

### **4.6.1 MEHP Uygulaması Sonucunda Sıçanların Vücut Ağırlık Değişimleri**

Yağ kontrol ve MEHP uygulanan gruplara ait sıçanların deney başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları ve % artış değerleri Çizelge 4.9'da gösterilmiştir. Uygulama gruplarının ağırlıkları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında vücut ağırlıklarında olan artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

### **4.6.2 MBP Uygulaması Sonucunda Sıçanların Vücut Ağırlık Değişimleri**

Yağ kontrol ve MBP uygulanan gruplara ait sıçanların deney başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları ve % artış değerleri Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Deney sonunda yağ kontrol ve uygulama grupları arasında, vücut ağırlıkları bakımından istatistiksel bir fark görülmemiştir.



**Çizelge 4.9.** Yağ kontrol ve MEHP uygulanan gruplara ait sıçanların deney başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları ve % artış değerleri

<b>Gruplar</b>	<b>Doz</b>	<b>Başlangıç Ağırlığı (g)</b>	<b>Bitiş Ağırlığı (g)</b>	<b>% Artış</b>
<b>Yağ Kontrol</b>	1ml	220,8±1,0	330,9±1,2	50,02±0,2
<b>MEHP</b>	25 mg/kg/gün	219,5±0,2	340,4±0,3	52,03±0,5
<b>MEHP</b>	50 mg/kg/gün	221,1±0,1	340,3±0,5	51,02±0,1
<b>MEHP</b>	100 mg/kg/gün	222,3±0,9	333,2±0,7	51,09±0,8
<b>MEHP</b>	200 mg/kg/gün	217,8±0,1	340,5±0,4	55,01±0,3
<b>MEHP</b>	400 mg/kg/gün	218,9±0,1	348,7±1,1	54,06±0,4

Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir ( $p \leq 0,05$ )

**Çizelge 4.10.** Yağ kontrol ve MBP uygulanan gruplara ait sıçanların deney başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları ve % artış değerleri

<b>Gruplar</b>	<b>Doz</b>	<b>Başlangıç Ağırlığı (g)</b>	<b>Bitiş Ağırlığı (g)</b>	<b>% Artış</b>
<b>Yağ Kontrol</b>	1ml	220,8±1,0	330,9±1,2	50,02±0,2
<b>MBP</b>	25 mg/kg/gün	220,4±0,1	331,02±0,8	50,09±0,7
<b>MBP</b>	50 mg/kg/gün	221,3±0,2	332,01±0,3	51,07±0,8
<b>MBP</b>	100mg/kg/gün	224,4±0,8	323,2±0,1	50,09±0,8
<b>MBP</b>	200mg/kg/gün	219,7±0,1	330,4±0,4	54,01±0,2
<b>MBP</b>	400mg/kg/gün	217,9±0,1	350,7±0,1	55,06±0,3

Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. ( $p \leq 0,05$ ).

## **4.7 Organ Ağırlık Değerleri**

### **4.7.1. MEHP Uygulaması Sonucunda Sıçanların Organ Ağırlık Değişimleri**

Deney sonunda karaciğer ağırlıkları, MEHP uygulama gruplarının tümünde, yağ kontrol grubuna göre artış göstermiştir (Çizelge 4.11). Böbrek ağırlıklarına bakıldığında yağ kontrol ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Pankreas ağırlığı 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP doz gruplarında yağ kontrol ve 25, 50, 100 mg/kg/gün MEHP gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermiştir.

### **4.7.2. MBP Uygulaması Sonucunda Sıçanların Organ Ağırlık Değişimleri**

Deney sonunda MBP uygulaması yapılan grupların tümünde, karaciğer ağırlıkları yağ kontrol grubuna göre artış göstermiştir (Çizelge 4.12.) Böbrek ağırlıkları için yağ kontrol ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Pankreas ağırlığı, 400 mg/kg/gün MBP doz grubunda yağ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir.

**Çizelge 4. 11.** Yağ kontrol ve MEHP uygulanan gruplara ait pankreas, karaciğer ve böbrek ağırlıkları ile rölatif organ ağırlıkları.

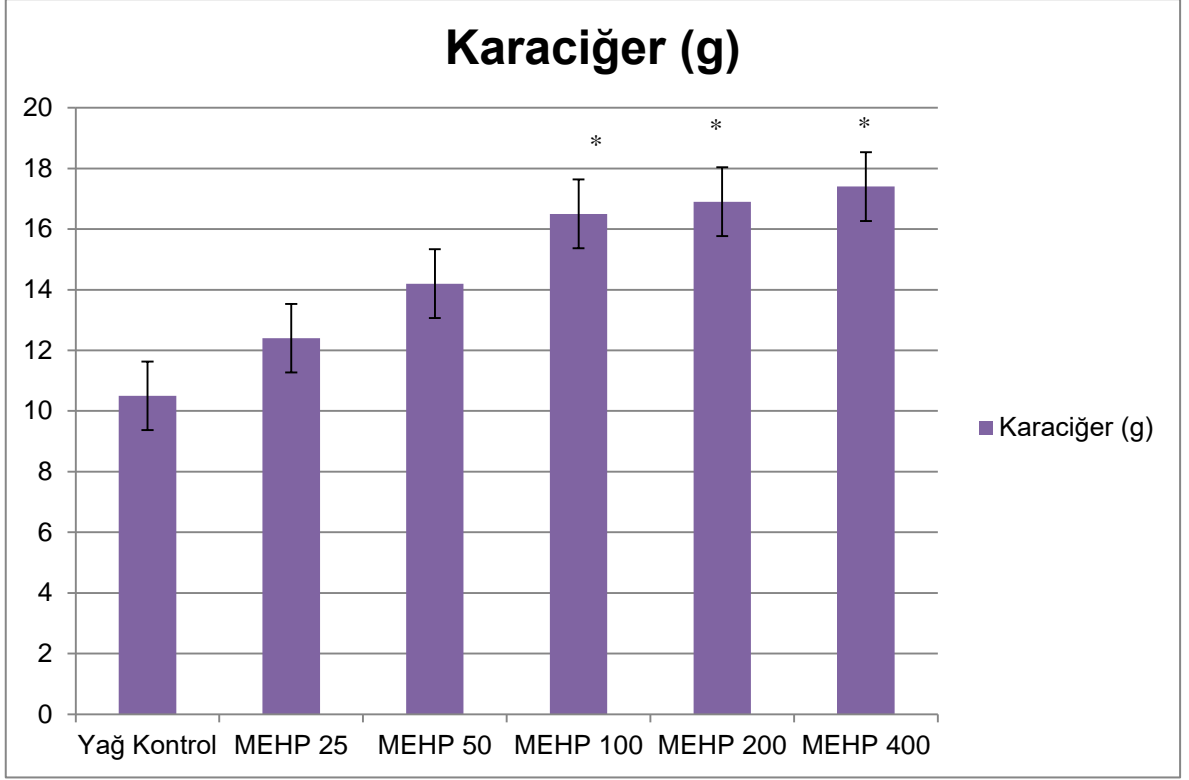
Gruplar	Doz	Karaciğer		Böbrek		Pankreas	
		Gerçek Ağırlık (g)	Rölatif Ağırlık( $10^{-3}$ )	Gerçek Ağırlık(g)	Rölatif Ağırlık( $10^{-3}$ )	Gerçek Ağırlık(g)	Rölatif Ağırlık( $10^{-3}$ )
<b>Yağ Kontrol</b>	1ml	10,5±1,0	34,8±1,2	1,07±0,1	3,2±0,1	0,253±0,1	0,74±0,1
<b>MEHP</b>	25 mg/kg/gün	12,4±1,2	32,1±0,2	1,07±0,1	3,1±0,1	0,240±0,2	0,73±0,2
<b>MEHP</b>	50 mg/kg/gün	14,2±0,1	33,1±0,4	1,09±0,2	3,2±0,2	0,242±0,4	0,72±0,1
<b>MEHP</b>	100mg/kg/gün	16,5±0,9 <sup>a</sup>	32,7±0,7	1,09±0,9	3,1±0,2	0,212±0,2	0,71±0,2
<b>MEHP</b>	200mg/kg/gün	16,9±0,1 <sup>a</sup>	32,9±0,4	1,09±0,2	3,1±0,1	0,198±0,3 <sup>a,b,c</sup>	0,68±0,3
<b>MEHP</b>	400mg/kg/gün	17,48±0,1 <sup>a</sup>	33,1±1,1	1,10±0,1	3,0±0,2	0,160±0,4 <sup>a,b,c,d</sup>	0,59±0,5

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 25 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 50 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. ( $p \leq 0,05$ ).

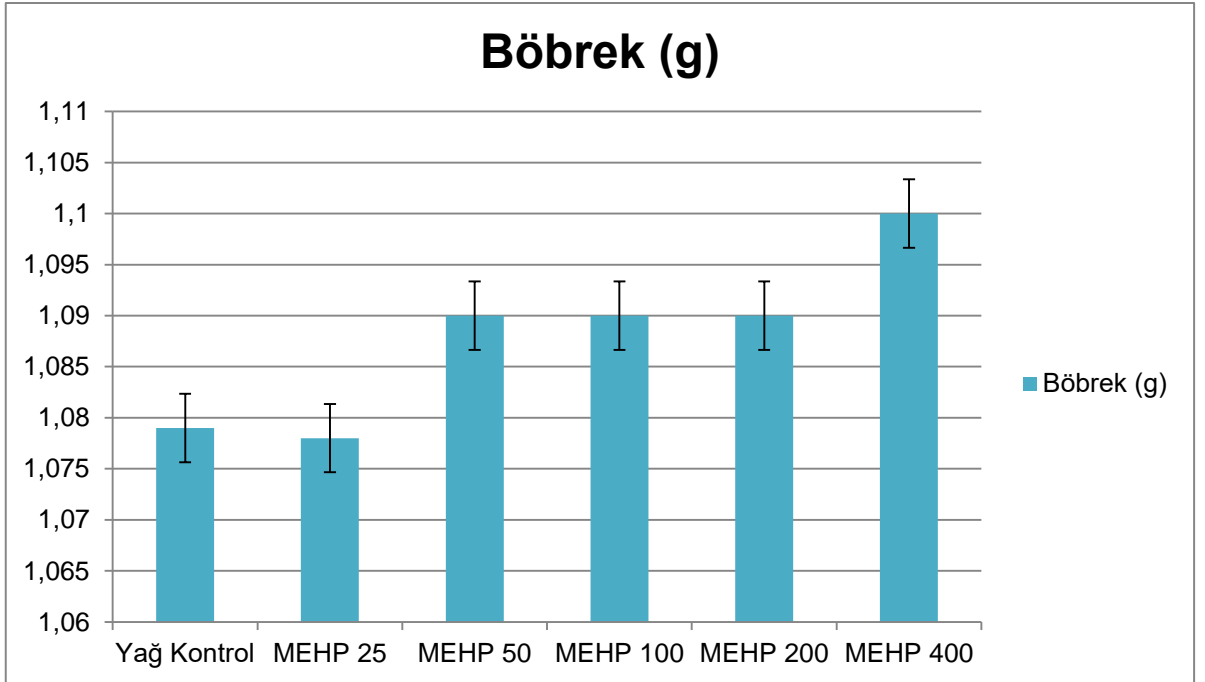
**Çizelge 4.12.** Yağ kontrol ve MBP uygulanan gruplara ait pankreas, karaciğer ve böbrek ağırlıkları ile rölatif organ ağırlıkları

Gruplar	Doz	Karaciğer		Böbrek		Pankreas	
		Gerçek Ağırlık (g)	Rölatif Ağırlık( $10^{-3}$ )	Gerçek Ağırlık(g)	Rölatif Ağırlık( $10^{-3}$ )	Gerçek Ağırlık(g)	Rölatif Ağırlık( $10^{-3}$ )
<b>Yağ Kontrol</b>	1ml	10,5±1,1	34,8±1,2	1,07±0,1	3,2±0,1	0,253±0,1	0,74±0,1
<b>MBP</b>	25 mg/kg/gün	11,5±0,1	33,3±1,3	1,09±1,1	3,1±0,1	0,245±0,4	0,73±0,1
<b>MBP</b>	50 mg/kg/gün	12,4±0,3	33,1±1,2	1,10±1,2	3,2±0,3	0,240±0,3	0,72±0,3
<b>MBP</b>	100mg/kg/gün	17,4±0,9 <sup>a,b</sup>	32,8±0,7	1,09±0,9	3,1±0,2	0,220±0,2	0,71±0,2
<b>MBP</b>	200mg/kg/gün	17,9±0,1 <sup>a,b</sup>	33,9±0,4	1,10±0,1	3,1±0,1	0,210±0,3	0,68±0,3
<b>MBP</b>	400mg/kg/gün	18,44±0,1 <sup>a,b,c</sup>	34,1±1,1	1,11±0,1	3,1±0,2	0,201±0,1 <sup>a,b</sup>	0,66±0,5

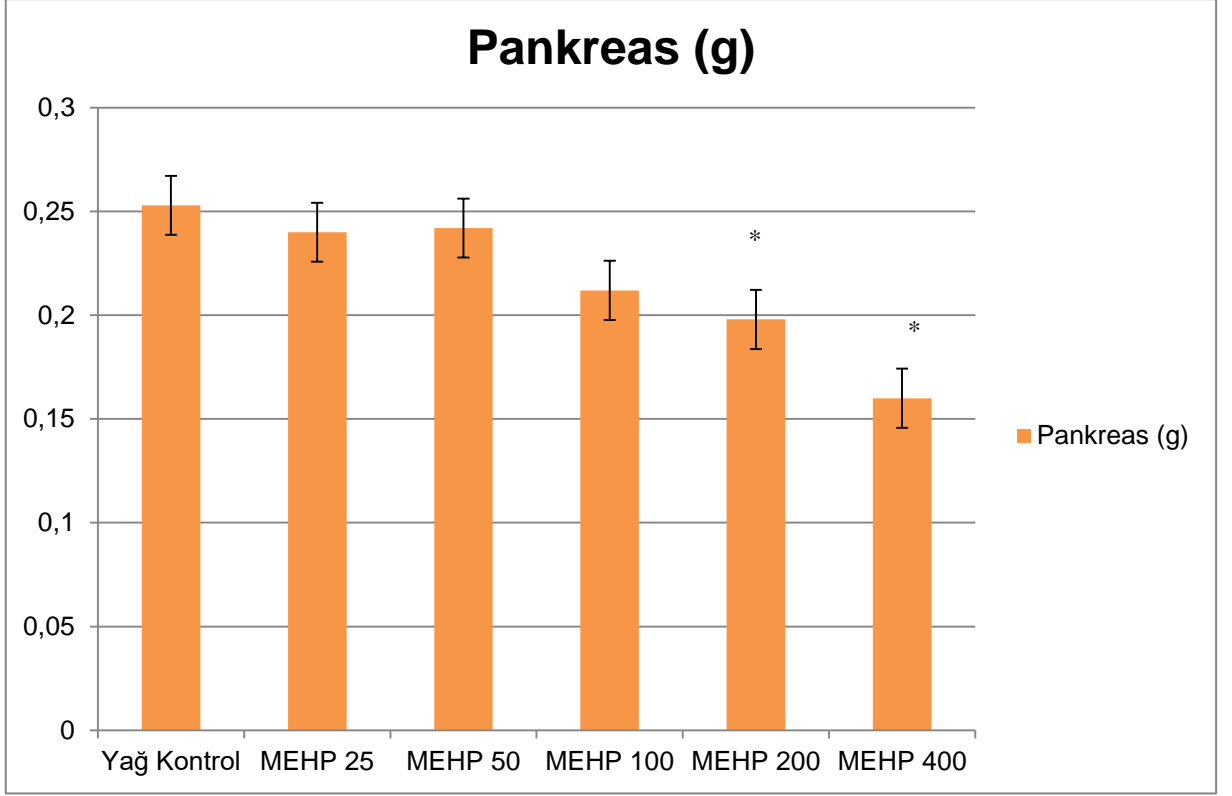
<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 25 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 50 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir ( $p \leq 0,05$ ).



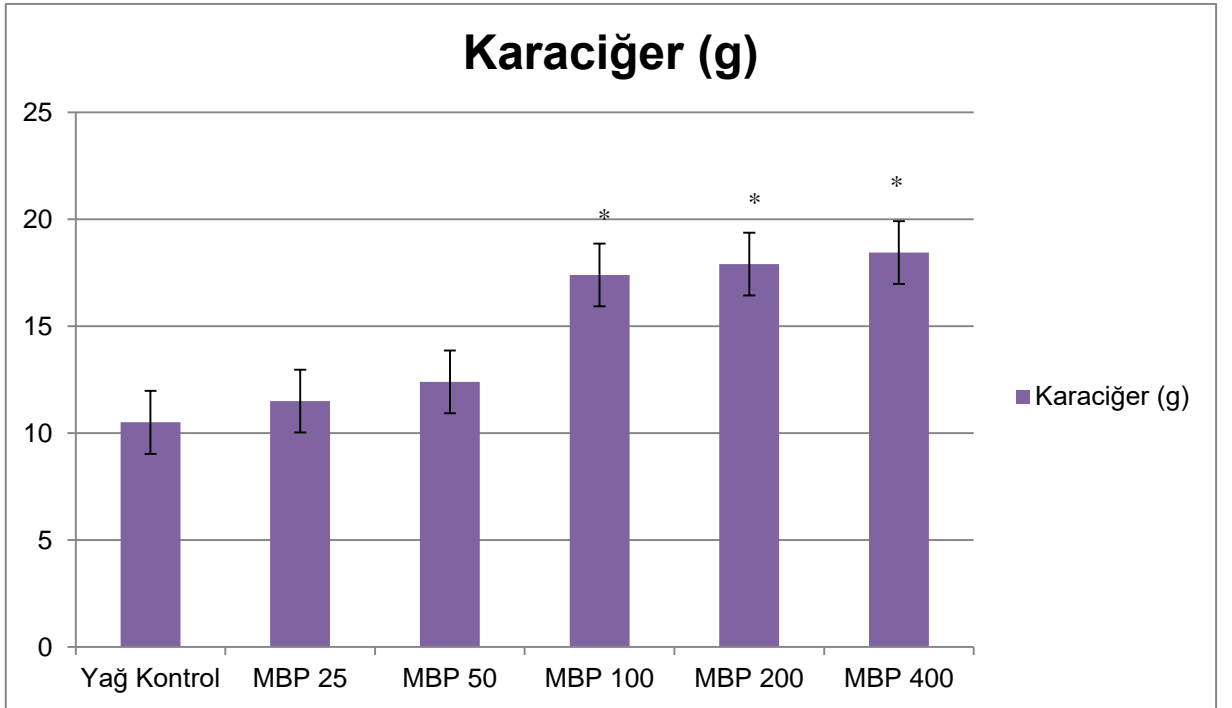
**Şekil 4.15.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların karaciğer ağırlıkları (\* Yağ kontrol grubundan farklı)



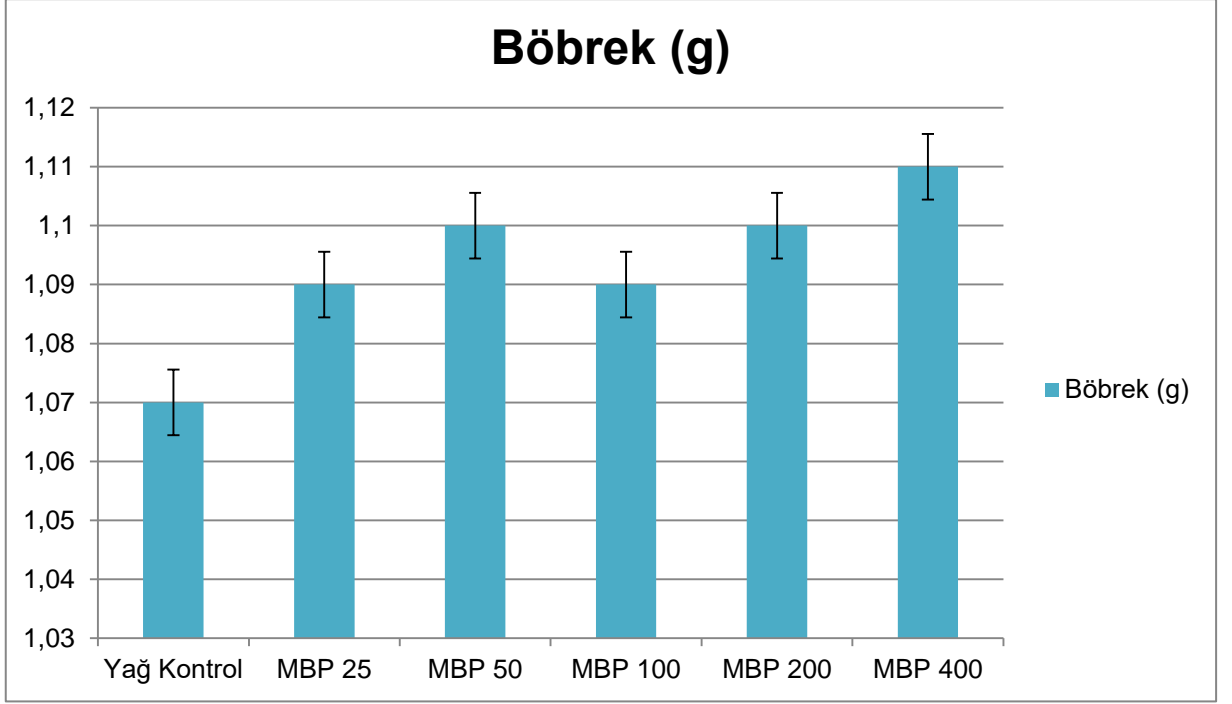
**Şekil 4.16.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların böbrek ağırlıkları



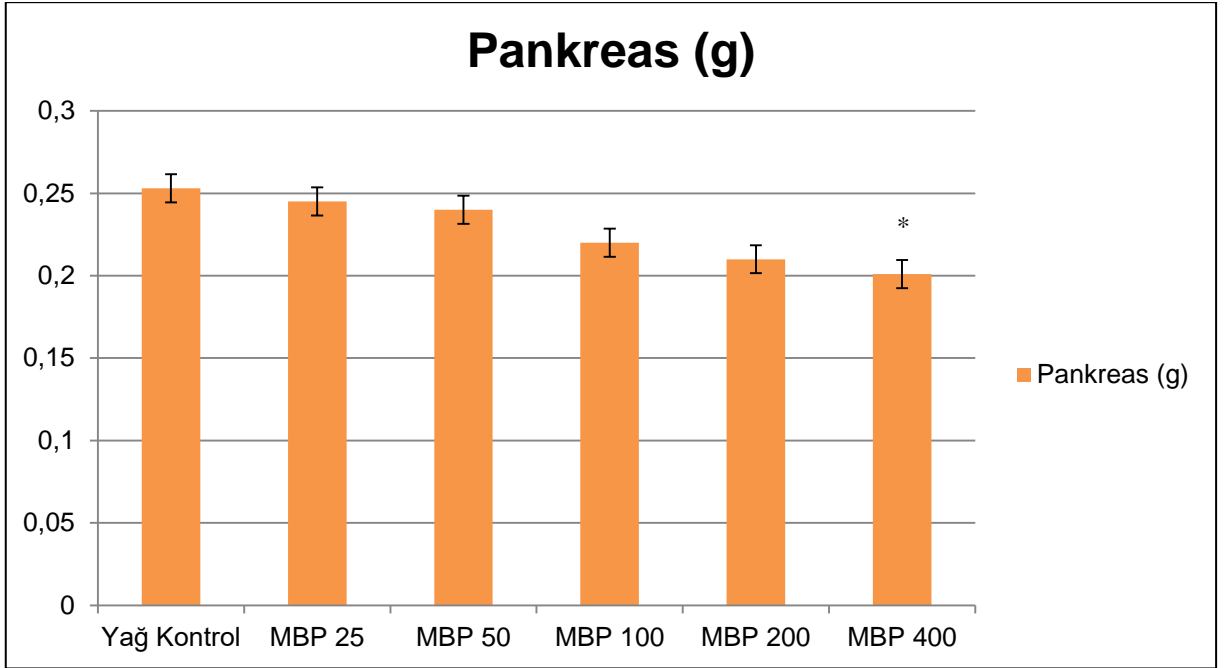
**Şekil 4.17.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların pankreas ağırlıkları (\* Yağ kontrol grubundan farklı)



**Şekil 4.18.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların karaciğer ağırlıkları (\* Yağ kontrol grubundan farklı)



**Şekil 4.19.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların böbrek ağırlıkları



**Şekil 4.20.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarındaki erkek sıçanların pankreas ağırlıkları (\* Yağ kontrol grubundan farklı)



## **4.8. Hematolojik İncelemeler**

### **4.8.1 MEHP Uygulaması Sonucu Hematolojik Analizler**

Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların kan analiz sonuçları Çizelge 4.13'de gösterilmiştir. Analiz sonuçlarına göre; 400 mg/kg/gün MEHP doz grubundaki MCV değeri, yağ kontrol ve diğer doz gruplarından istatistiksel olarak artan şekilde farklı, hemoglobin, lökosit ve monosit değerleri azalan şekilde farklılık göstermiştir. Diğer kan parametreleri incelendiğinde kontrol grupları ve uygulama grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır.

### **4.8.2 MBP Uygulaması Sonucu Hematolojik Analizler**

Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların kan analiz sonuçları Çizelge 4.14'de gösterilmiştir. 400 mg/kg/gün MBP doz grubunda, MCV değeri diğer gruplara göre istatistiksel artış göstermiştir. Hemoglobin değeri ise azalış göstermiştir. Diğer parametreler açısından, yağ kontrol ile uygulama grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

**Çizelge 4.13.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların kan analiz sonuçları

Parametreler	Yağ Kontrol (1 ml)	MEHP (25 mg/kg/gün)	MEHP (50 mg/kg/gün)	MEHP(100mg/kg/ gün)	MEHP (200mg/kg/gün)	MEHP (400 mg/kg/gün)
<b>Lökosit (mm<sup>3</sup>)</b>	2,35±1,54	2,50±0,22	2,53±0,11	2,98±2,34	2,63±1,11	1,19±0,17 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>Lenfosit (%)</b>	69,60±16,17	68,50±15,12	69,45±22,12	70,83±21,34	65,42±8,39	78,41±16,90
<b>Monosit (%)</b>	11,17±5,40	10,27±5,43	9,12±3,54	11,40±8,42	10,30±1,97	4,40±0,11 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>Nötrofil/ (%)</b>	19,27±11,06	18,27±13,07	20,17±0,6	17,73±13,12	24,28±6,89	17,48±12,79
<b>Eritrosit (mm<sup>3</sup>)</b>	13,22±3,53	14,23±2,34	14,22±3,34	11,6±2,68	13,3±1,76	8,26±0,68
<b>MCV (fl)</b>	27,8±5,34	29,8±4,44	28,8±1,14	29,41±1,13	25,78±3,89	53,12±2,89 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>Hematokrit (%)</b>	35,27±8,18	33,17±8,91	34,56±6,45	33,6±6,06	27,1±6,29	39,27±1,62
<b>MCH (pg)</b>	7,87±4,52	8,77±4,12	9,01±2,44	8,83±3,38	11,6±11,24	14,9±1,24
<b>MCHC (g/dl)</b>	26,75±8,78	25,15±11,22	28,65±7,55	29,8±9,16	23,05±6,05	28,07±1,06
<b>Hemoglobin (g/dl)</b>	8,92±1,26	8,92±0,1	8,44±1,77	8,50±1,16	8,05±0,5	6,33±0,22 <sup>a,b,c,d,e</sup>
<b>Trombosit (mm<sup>3</sup>)</b>	3287,83±1277,3	3367,83±1131,02	3266,83±1144,03	3299,33±2483,02	2265±1567,18	2764,17±1876,21
<b>Pct (%)</b>	3,92±1,45	4,62±1,76	4,12±1,22	4,5±2,31	3,96±1,72	4,01±1,42

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 25 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 50 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>e</sup> 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (p≤0,05).

**Çizelge 4.14.**Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların kan analiz sonuçları

Parametreler	Yağ Kontrol (1 ml)	MBP (25 mg/kg/gün)	MBP (50 mg/kg/gün)	MBP (100mg/kg/gün)	MBP (200mg/kg/gün)	MBP (400 mg/kg/gün)
Lökosit (mm <sup>3</sup> )	2,35±1,54	2,30±2,14	2,55±0,84	2,58±2,34	2,83±1,11	2,19±0,39
Lenfosit (%)	69,60±16,17	67,51±17,17	70,60±26,01	71,83±21,34	72,42±8,39	73,41±16,90
Monosit (%)	11,17±5,40	12,17±4,11	11,21±4,39	12,20±9,41	11,30±1,97	9,33±0,10
Nötrofil/ (%)	19,27±11,06	18,11±9,87	18,44±8,77	18,73±14,22	19,19±6,89	18,48±12,79
Eritrosit (mm <sup>3</sup> )	13,22±3,53	12,12±3,21	13,01±1,21	12,6±2,68	13,3±1,76	12,26±0,68
MCV (fl)	27,8±5,34	28,9±4,53	28,8±1,01	28,42±2,13	29,78±3,89	62,11±1,89 <sup>a,b,c,d,e</sup>
Hematokrit (%)	35,27±8,18	34,10±1,21	35,09±5,23	34,7±6,06	37,1±6,29	38,27±3,65
MCH (pg)	7,87±4,52	8,17±2,33	8,41±1,43	7,93±3,39	9,6±11,24	8,9±1,24
MCHC (g/dl)	26,75±8,78	27,15±5,56	27,31±2,56	27,2±9,16	25,05±6,05	26,07±1,06
Hemoglobin (g/dl)	8,92±1,26	9,02±0,26	9,98±0,26	9,5±1,16	9,02±1,6	6,01±0,93 <sup>a,b,c,d,e</sup>
Trombosit (mm <sup>3</sup> )	3287,83±1277,3	3311,83±1222,01	3317,02±1143,3	3309,33±2483,02	3266±1598,19	3765,17±1659,21
Pct (%)	3,92±1,45	3,81±1,11	4,01±0,22	4,7±3,34	3,87±1,89	3,51±1,42

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 25 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 50 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 100 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı, <sup>e</sup>200 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (p≤0,05).

## **4.9. İnsülin Hormonu Ölçüm Sonuçları**

### **4.9.1 MEHP Uygulama Gruplarında İnsülin Hormonu Ölçüm Sonuçları**

MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların insülin hormonu ölçüm sonuçları çizelge 4.15'de gösterilmiştir. Deney sonunda uygulama gruplarının insülin hormonu ölçümleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azalmanın olduğu görülmüş ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. 100 mg/kg/gün MEHP doz grubundaki insülin miktarındaki azalma, yağ kontrol, 25 ve 50 mg/kg/gün MEHP doz gruplarına göre anlamlı bulunmuştur. 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP doz gruplarında tespit edilen azalma ise yağ kontrol ve 25, 50 ve 100 mg/kg/gün MEHP doz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

### **4.9.2 MBP Uygulama Gruplarında İnsülin Hormonu Ölçüm Sonuçları**

MBP uygulama gruplarına ait sıçanların insülin hormonu ölçüm sonuçları çizelge 4.16'da gösterilmiştir. Deney sonunda uygulama gruplarının insülin hormonu ölçümleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azalma tespit edilmiş ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. 200 ve 400 mg/kg/gün MBP doz gruplarında oluşan azalma, yağ kontrol ve 25, 50, 100 mg/kg/gün MBP doz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

**Çizelge 4.15.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların insülin hormonu ölçüm sonuçları

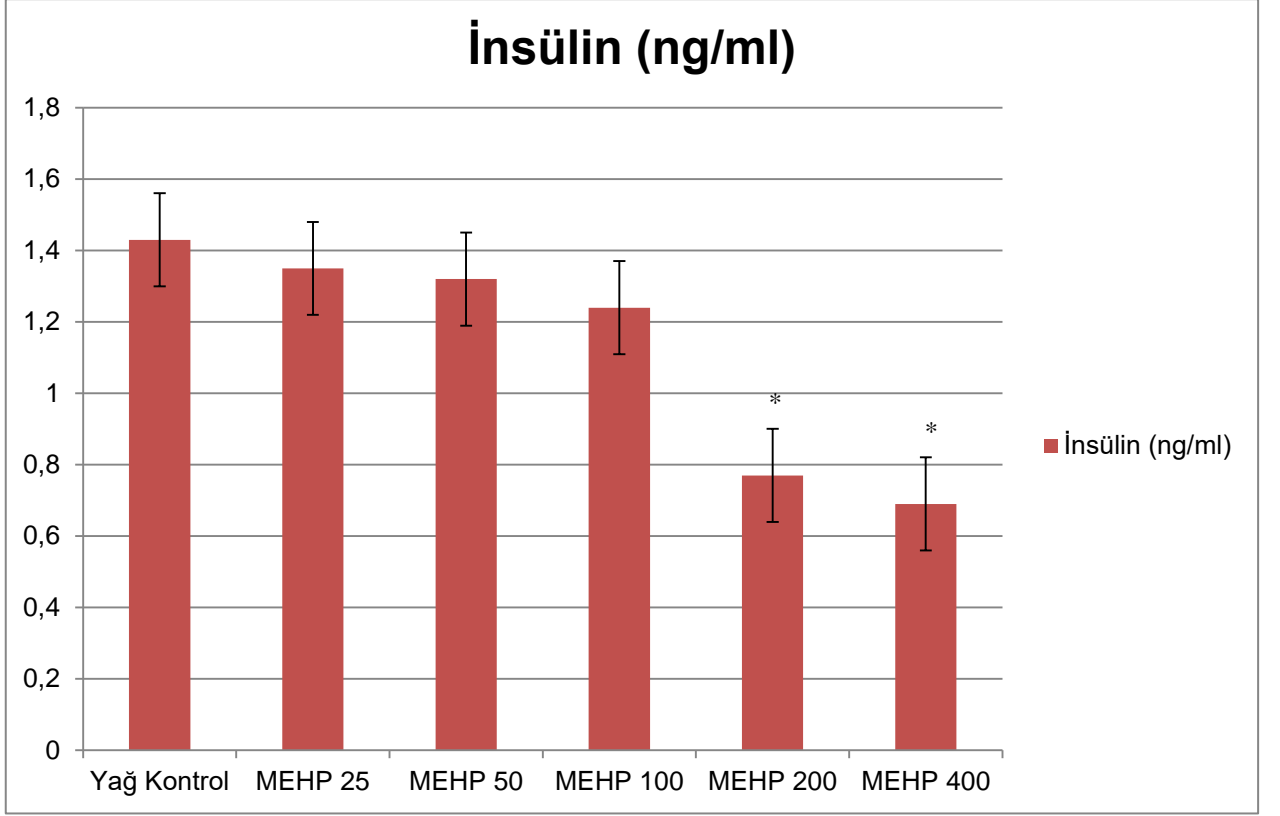
Parametreler	Yağ Kontrol (1ml)	MEHP (25 mg/kg/gün)	MEHP (50 mg/kg/gün)	MEHP (100mg/kg/gün)	MEHP (200 mg/kg/gün)	MEHP (400 mg/kg/gün)
İnsülin (ng/ ml)	1,43±0,48	1,35±0,12	1,32±0,1	1,24±1,03 <sup>a</sup>	0,77±0,82 <sup>a,b,c,d</sup>	0,69±0,61 <sup>a,b,c,d</sup>

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 25 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 50 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (p≤0,05).

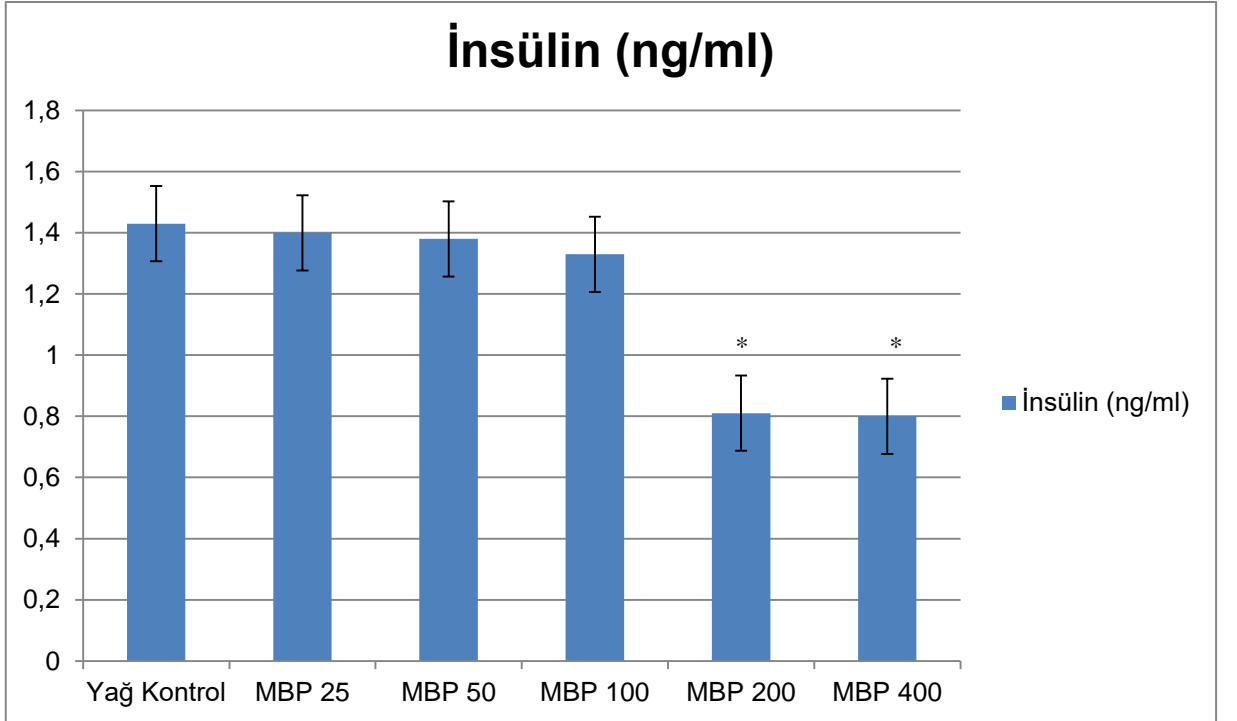
**Çizelge 4.16** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların insülin hormonu ölçüm sonuçları

Parametreler	Yağ Kontrol (1ml)	MBP (25 mg/kg/gün)	MBP (50 mg/kg/gün)	MBP (100 mg/kg/gün)	MBP (200 mg/kg/gün)	MBP (400 mg/kg/gün)
İnsülin (ng/ ml)	1,43±0,48	1,40±0,7	1,38±0,6	1,33±1,01	0,81±0,71 <sup>a,b,c,d</sup>	0,80±0,51 <sup>a,b,c,d</sup>

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 25 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 50 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 100 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (p≤0,05).



**Şekil 4.21.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların insülin analiz sonuçları (\* Yağ kontrol grubundan farklı)



**Şekil 4.22.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların insülin analiz sonuçları (\* Yağ kontrol grubundan farklı)

## **4.10. Antikor Analizi Sonuçları**

### **4.10.1. MEHP Uygulama Gruplarına Ait Antikor Ölçüm Sonuçları**

Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların antikor ölçüm sonuçları Çizelge 4.17'de verilmiştir. Sıçanlardan alınan kanda analizi yapılan adacık hücre antikoru ve insülin antikoru, hem yağ grubu hem de MEHP uygulama gruplarında negatif çıkmıştır.

### **4.10.2. MBP Uygulama Gruplarına Ait Antikor Ölçüm Sonuçları**

Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların antikor ölçüm sonuçları Çizelge 4.18'de verilmiştir. Buna göre, MBP uygulama grupları ve yağ kontrol grubundaki sonuçlarda, adacık hücre antikoru ve insülin antikoru negatif çıkmıştır.



**Çizelge 4. 17.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların antikor ölçüm sonuçları

Parametreler	Yağ Kontrol (1ml)	MEHP (25 mg/kg/gün)	MEHP (50 mg/kg/gün)	MEHP (100 mg/kg/gün)	MEHP (200 mg/kg/gün)	MEHP (400 mg/kg/gün)
Adacık hücre antikoru (ICA)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
İnsülin antikoru (IAA)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(-):Negatif, (+): Pozitif

**Çizelge 4. 18.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların antikor ölçüm sonuçları

<b>Parametreler</b>	<b>Yağ Kontrol (1ml)</b>	<b>MBP (25 mg/kg/gün)</b>	<b>MBP (50 mg/kg/gün)</b>	<b>MBP (100 mg/kg/gün)</b>	<b>MBP (200 mg/kg/gün)</b>	<b>MBP (400 mg/kg/gün)</b>
<b>Adacık hücre antikoru (ICA)</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>İnsülin antikoru (IAA)</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(-):Negatif, (+): Pozitif

## **4.11. Biyokimyasal Analiz Sonuçları**

### **4.11.1. MEHP Uygulama Gruplarına Ait Biyokimya Analiz Sonuçları**

MEHP uygulama gruplarına ait biyokimya analiz sonuçları Çizelge 4.19'da verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre; 100, 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP doz gruplarında ölçülen ALT, AST, trigliserit ve glikoz değerlerinde yağ kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış tespit edilmiştir.

Total protein ve albümin değerleri, 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP uygulama gruplarında yağ kontrol grubuna göre azalma göstermiştir.

200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün MEHP doz gruplarındaki üre analiz sonucu, yağ kontrole göre anlamlı şekilde azalmıştır.

### **4.11.2. MBP Uygulama Gruplarına Ait Biyokimya Analiz Sonuçları**

MBP uygulama gruplarına ait biyokimya analiz sonuçları Çizelge 4.20'de verilmiştir. MBP doz gruplarında, MEHP doz grubuna benzer şekilde ALT, AST ve glikoz değerlerinde artış görülürken, total protein ve albümin değerlerinde azalış tespit edilmiştir.

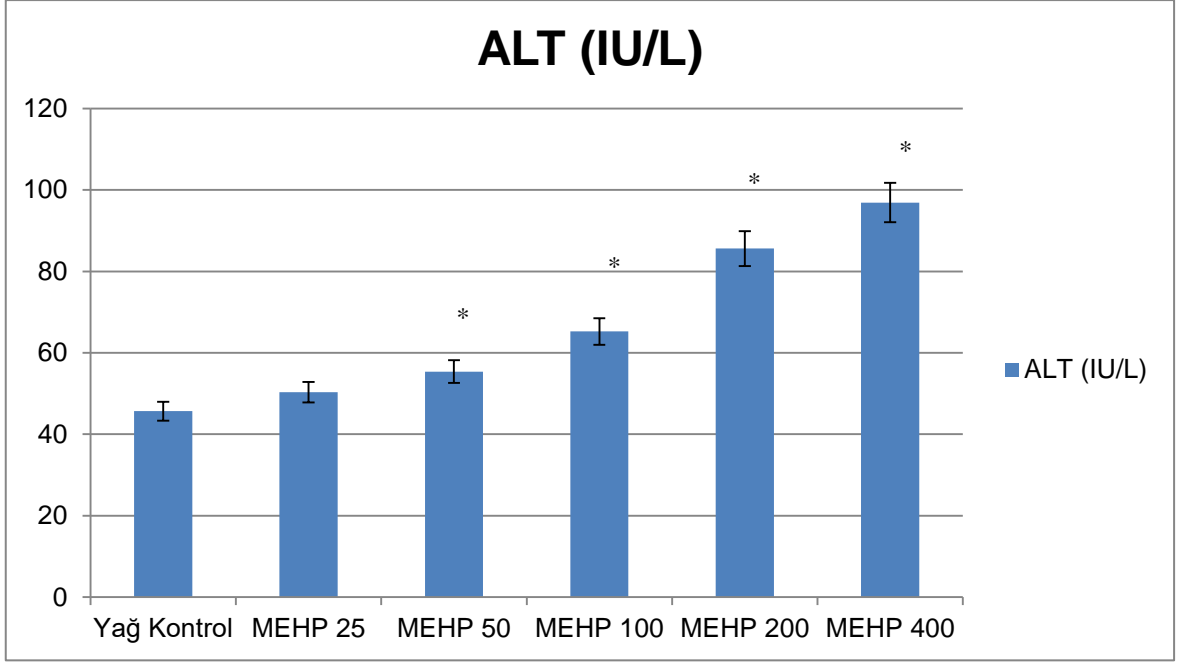
100, 200 ve 400 mg/kg/gün MBP doz gruplarındaki ALT ve AST sonuçları yağ kontrol, 25 ve 50 mg/kg/gün MBP doz gruplarına göre artış göstermiştir.

Glikoz ve trigliserit miktarı, 200 ve 400 mg/kg/gün doz gruplarında, yağ kontrol ve 25 mg/kg/gün doz gruplarına göre artış göstermiştir. Total protein ve albümin değerleri, 200 ve 400 mg/kg/gün MBP doz grubunda kreatinin ise sadece 400 mg/kg/gün MBP doz grubunda yağ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalış göstermiştir.

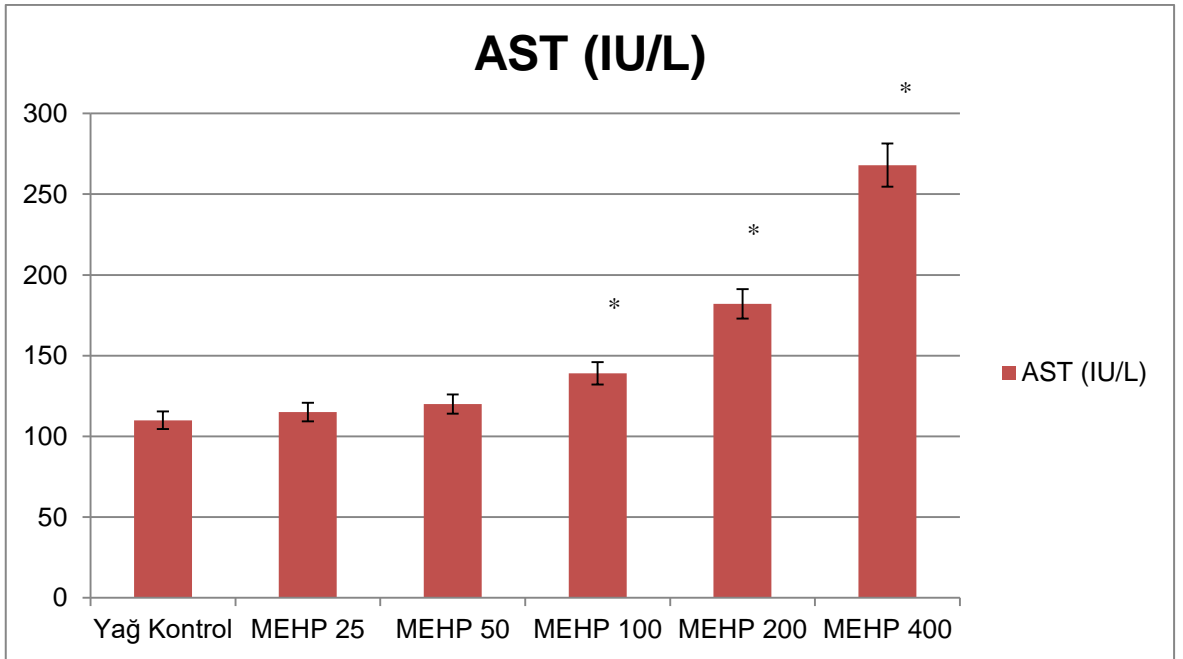
**Çizelge 4.19.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların biyokimya analiz sonuçları

Parametreler	Yağ Kontrol (1 ml)	MEHP (25 mg/kg/gün)	MEHP (50 mg/kg/gün)	MEHP (100mg/kg/gün)	MEHP (200mg/kg/gün)	MEHP (400 mg/kg/gün)
ALT (IU/L)	45,65±17,41	50,3±0,22	55,4±0,11	65,25±15,99 <sup>a,b</sup>	85,63±10,72 <sup>a,b,c</sup>	96,91±7,82 <sup>a,b,c,d</sup>
AST (IU/L)	110,1±101,6	115,2±15,12	120,45±22,12 <sup>d,e,f</sup>	139,8±88,9 <sup>a</sup>	182,6±36,9 <sup>a,b</sup>	268,3±110,6 <sup>a,b,c</sup>
Trigliserit (mg/dl)	945,8±704,6	1050,27±5,43	1210,12±3,54 <sup>a,d</sup>	1450,8±294,5 <sup>a</sup>	1650,3±250 <sup>a,b</sup>	1702,6±266,4 <sup>a,b,c</sup>
Glikoz (IU/L)	191,5±61	201,27±13,07	205,17±0,6	211,1±33,5 <sup>a,e,f</sup>	251,1±19,3 <sup>a,b</sup>	301,6±43,5 <sup>a,b,c</sup>
TotalProtein (g/dl)	8,6± 0,8	8,3±2,34	8,22±3,34	8,5±2,6	6,8±0,3 <sup>a,b,c,d</sup>	6,6±0,4 <sup>a,b,c,d</sup>
Albumin (g/dl)	32,35±2,73	29,8±4,44	29,8±1,14	27,93±1,34	21,03±1,88 <sup>a,b,c,d</sup>	18,66±1,53 <sup>a,b,c,d</sup>
Kreatinin (mg/dl)	0,46±0,22	0,47±8,91	0,46±6,45	0,49±0,25	0,48±0,16	0,45±0,15
Üre (mg/dl)	14,8±3,3	14,7±4,12	13,09±2,44	13,7±1,8	12,3±8,3	11,5±2 <sup>a,b,c</sup>

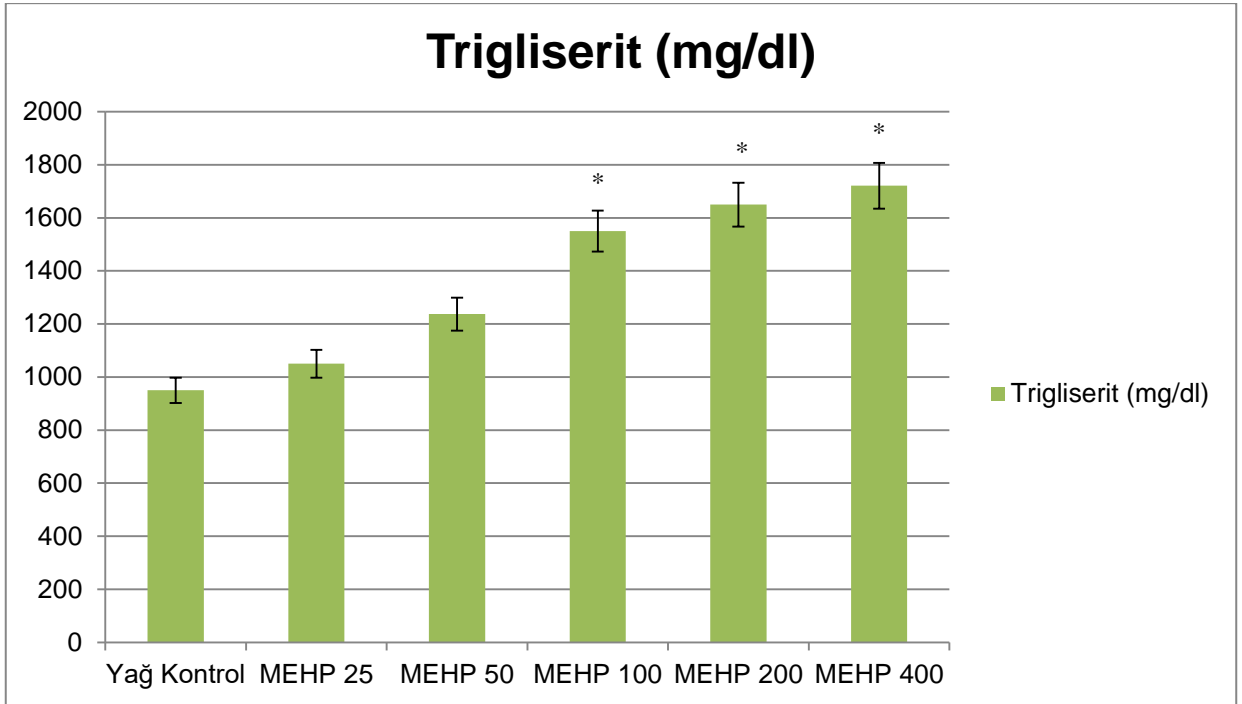
<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 25 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 50 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>e</sup> 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı, <sup>f</sup> 400 mg/kg/gün MEHP uygulama grubundan farklı. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (p≤0,05).



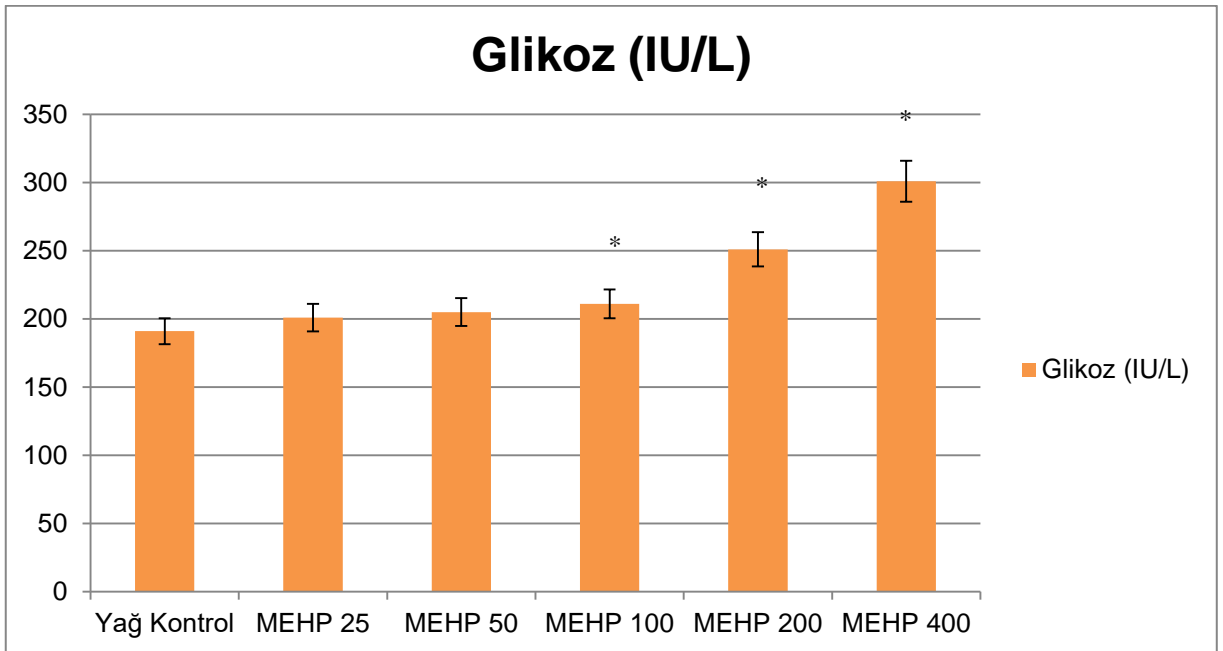
**Şekil 4.23.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların ALT analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



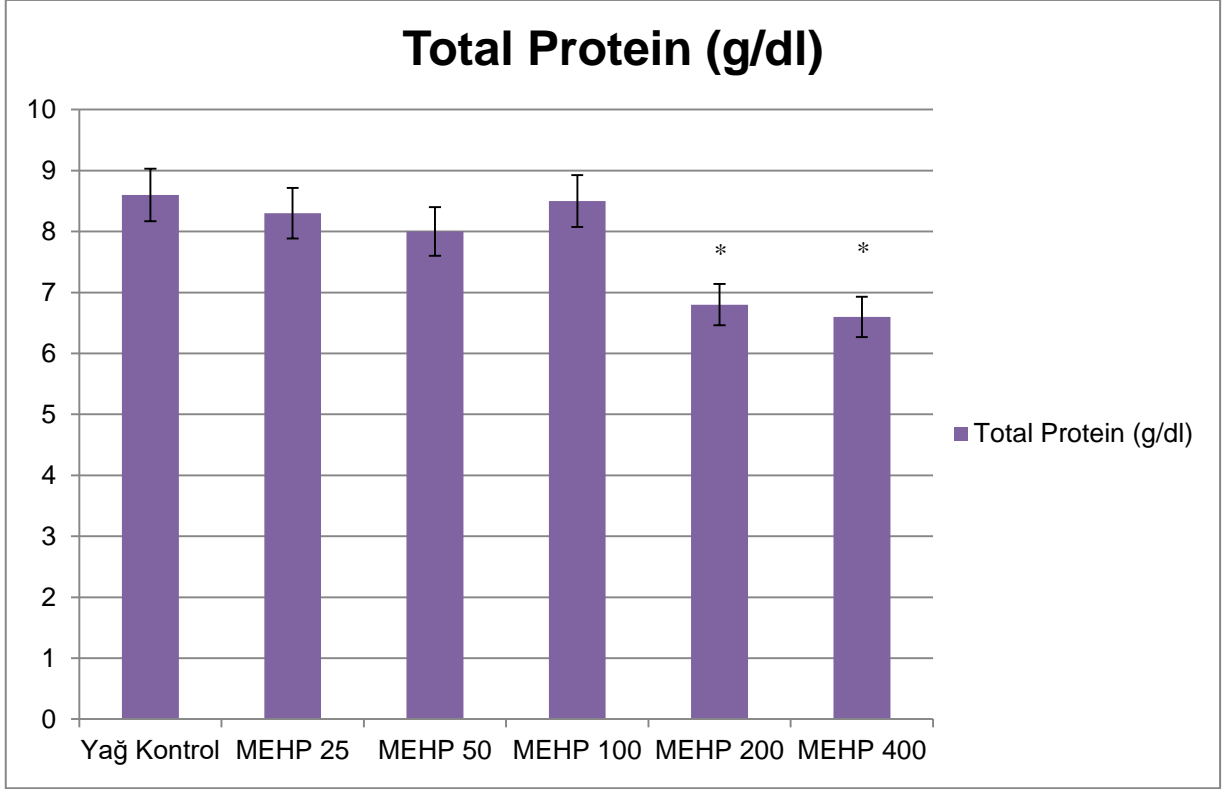
**Şekil 4.24.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların AST analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



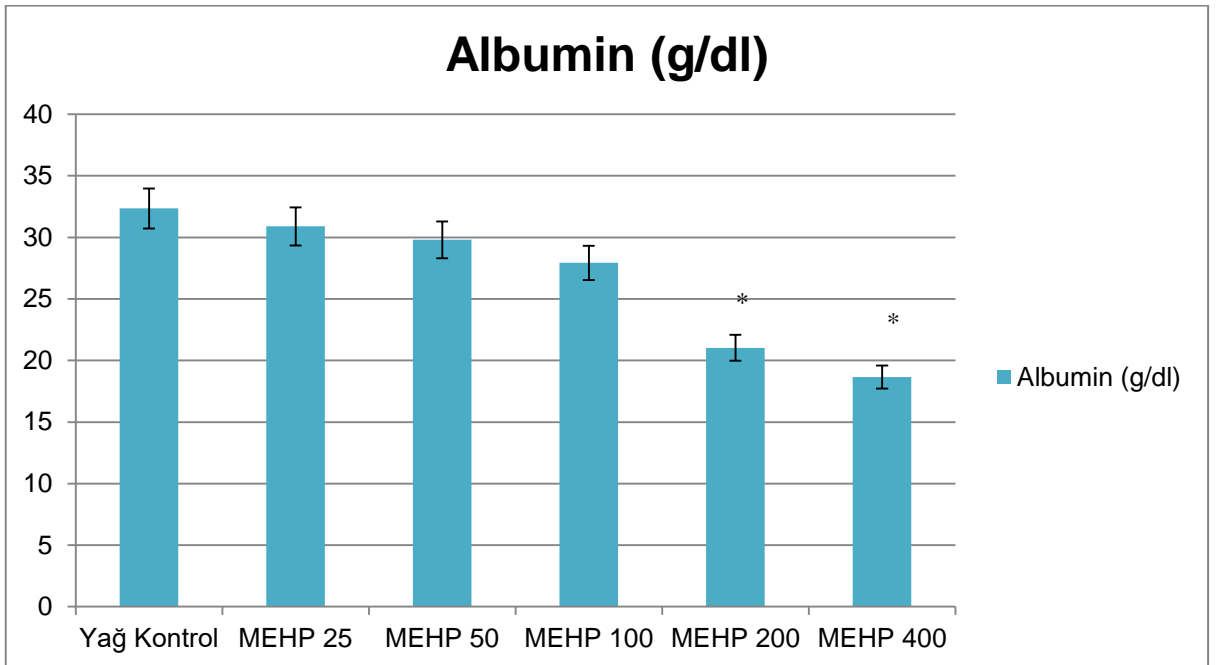
**Şekil 4.25.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların trigliserit analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



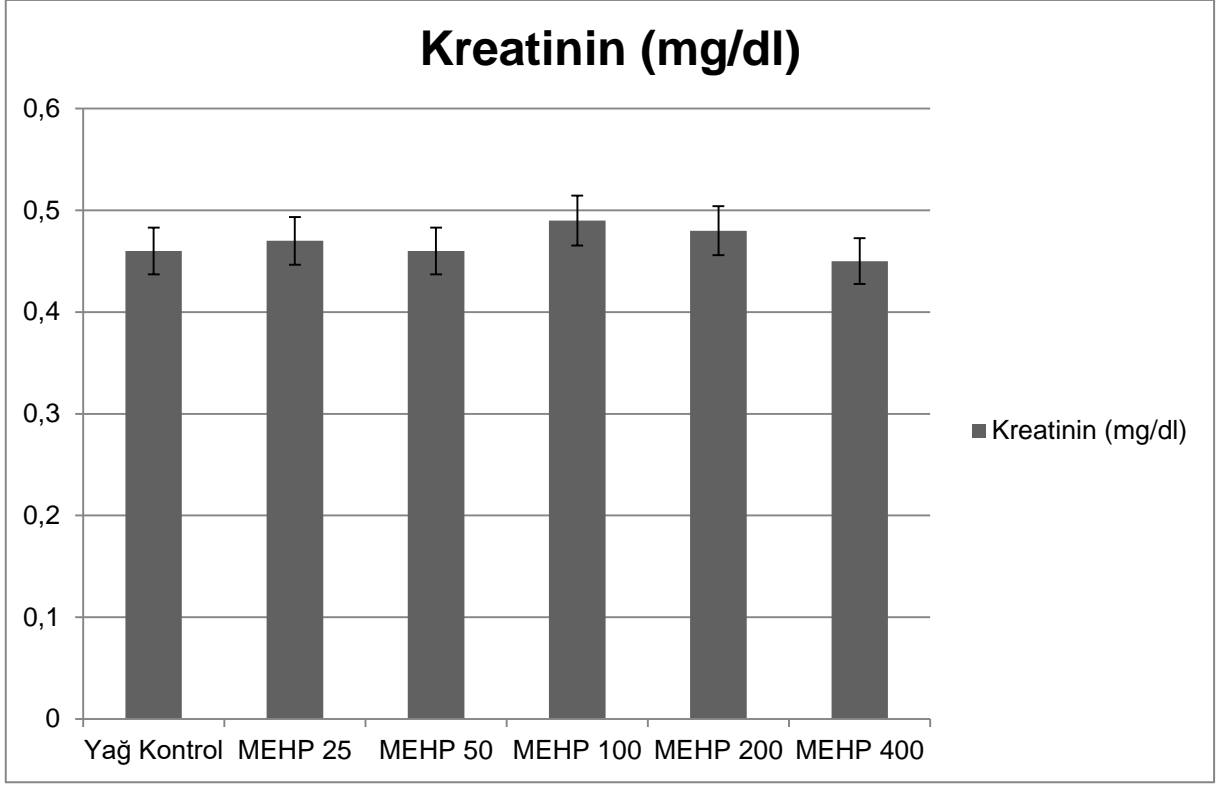
**Şekil 4.26.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların glikoz analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



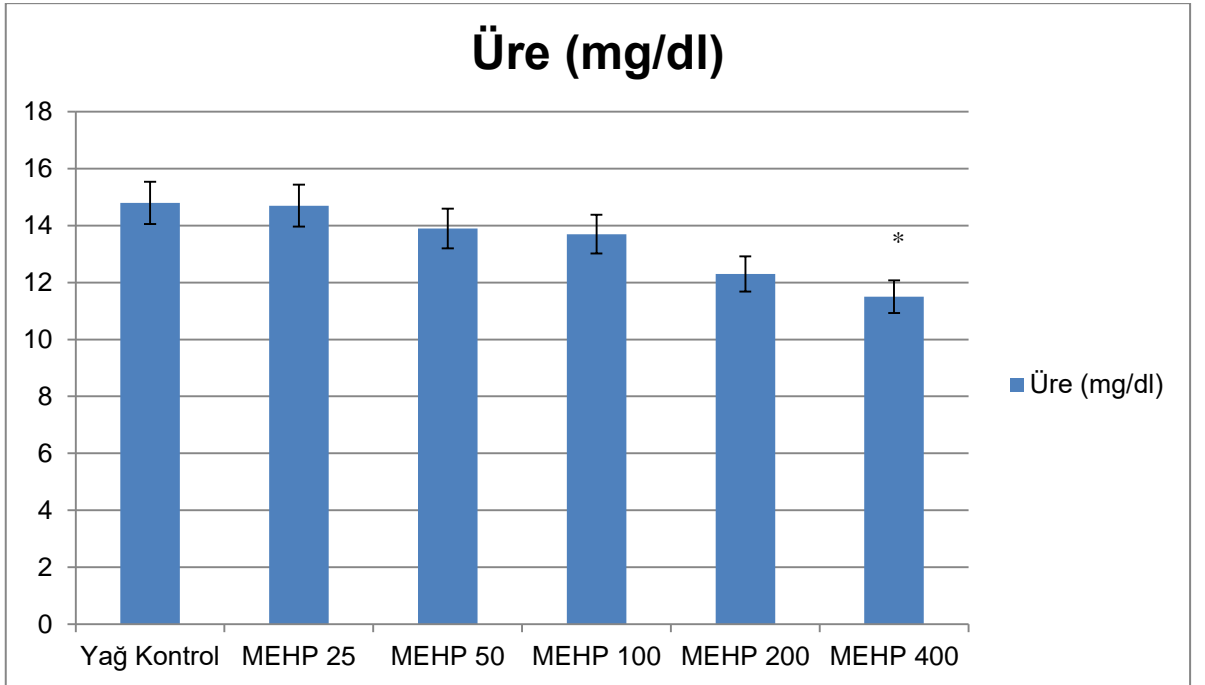
**Şekil 4.27.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların total protein analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



**Şekil 4.28.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların albumin analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



**Şekil 4.29.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların kreatinin analiz sonuçları



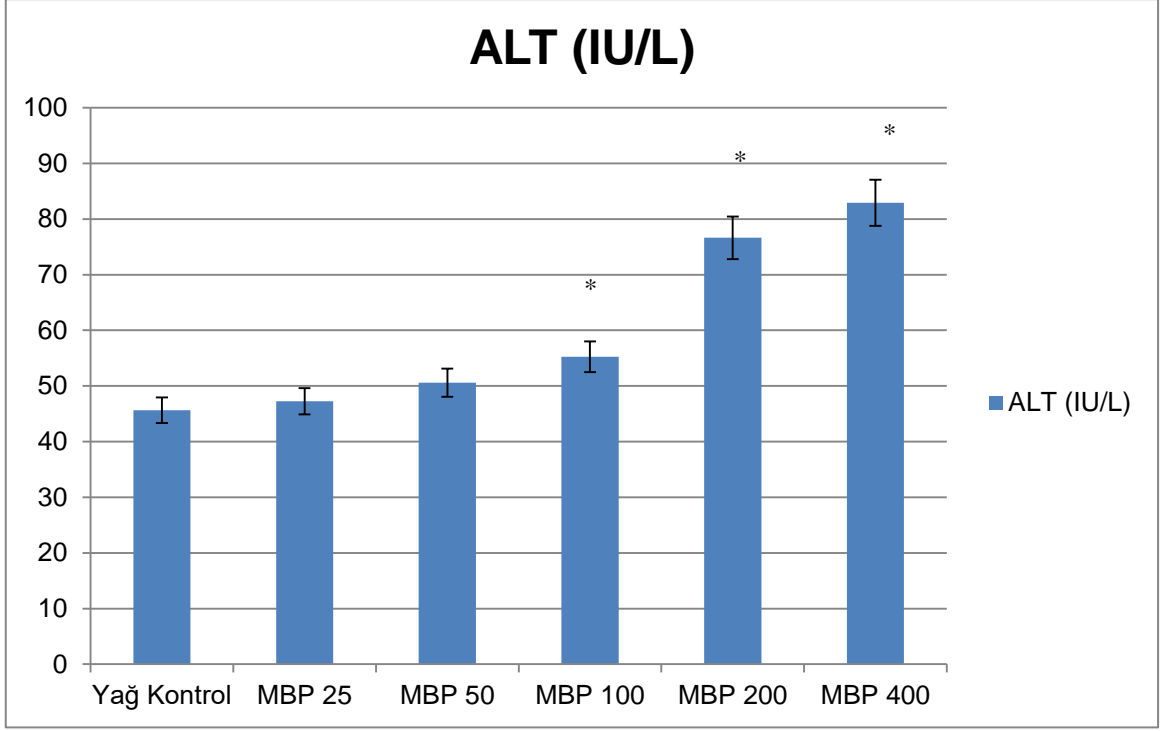
**Şekil 4.30.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların üre analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



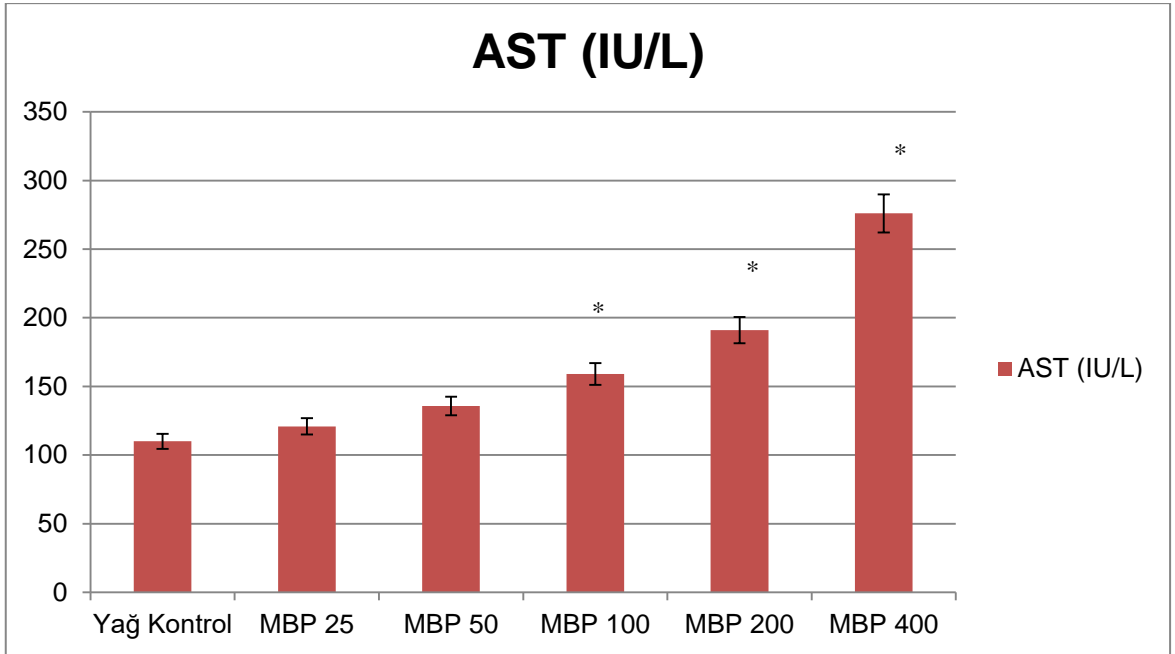
**Çizelge 4.20.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların biyokimya analiz sonuçları

Parametreler	Yağ Kontrol (1 ml)	MBP (25 mg/kg/gün)	MBP (50 mg/kg/gün)	MBP (100mg/kg/gün)	MBP (200mg/kg/gün)	MBP (400 mg/kg/gün)
ALT (IU/L)	45,65±17,41	47,26 ±0,22	50,62 ±0,11	55,25±14,99 <sup>a</sup>	76,63±19,72 <sup>a,b,c</sup>	82,91±6,82 <sup>a,b,c,d</sup>
AST (IU/L)	110,1±101,6	120,9 ±15,12	135,66±22,12	159,8±65,9 <sup>a</sup>	191,6±36,9 <sup>a,b</sup>	276,3±90,6 <sup>a,b,c,d</sup>
Trigliserit (mg/dl)	945,8±704,6	960,8±5,43	1100,9 ±3,54	1550,8±294,5 <sup>a,b</sup>	1850,3±250 <sup>a,b,c</sup>	1820,4±116,4 <sup>a,b,c</sup>
Glikoz (IU/L)	191,5±61	220,27±13,07	251,17±0,6	291,1±22,5 <sup>a</sup>	351,1±18,3 <sup>a,b</sup>	401,6±41,5 <sup>a,b,c</sup>
TotalProtein (g/dl)	8,6± 0,8	8,3±2,34	8,2±3,34	8,1±2,6	7,1±0,3 <sup>a,b</sup>	6,4±0,4 <sup>a,b,c</sup>
Albumin (g/dl)	32,35±2,73	31,9 ±4,44	31,2 ±1,14	29,92±1,32	22,03±1,98 <sup>a,b,c</sup>	21,33±1,43 <sup>a,b,c</sup>
Kreatinin (mg/dl)	0,46±0,22	0,47±8,91	0,48±6,45	0,48±0,15	0,38±0,17	0,35±0,14 <sup>a,b,c</sup>
Üre (mg/dl)	14,8±3,3	14,5±4,12	14,3±2,44	14,8±1,8	13,2±8,3	11,3±2 <sup>a,b,d</sup>

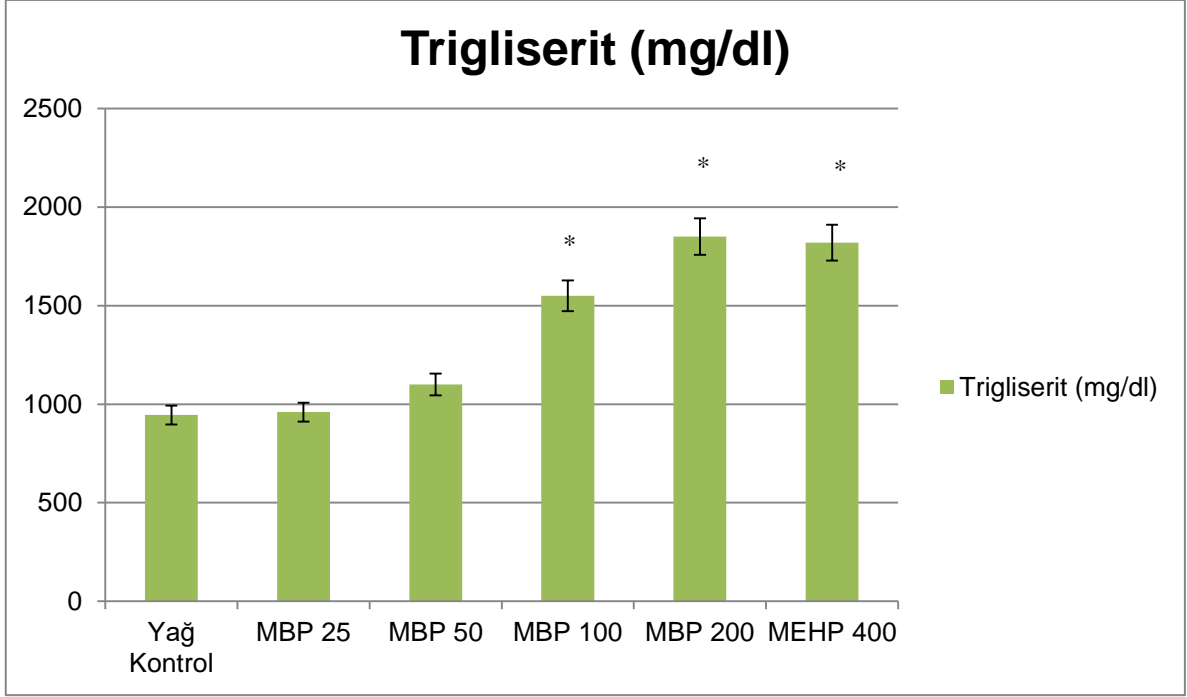
<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 25 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 50 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 100 mg/kg/gün MBP uygulama grubundan farklı. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (p≤0,05).



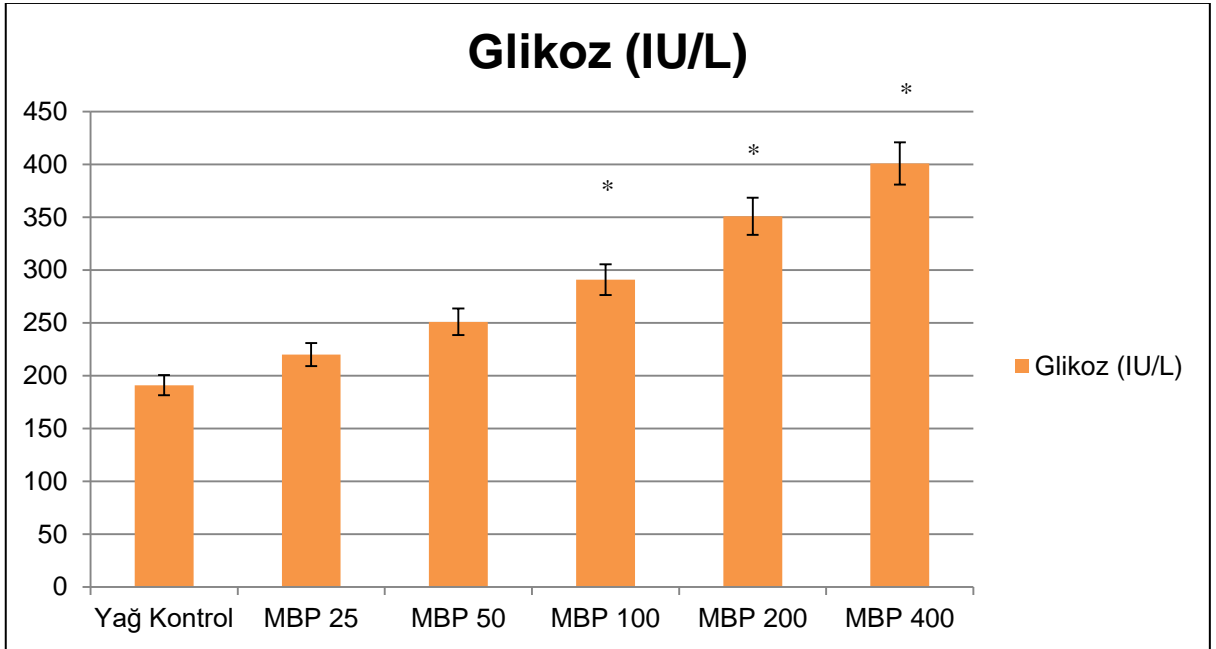
**Şekil 4.31.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların ALT analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



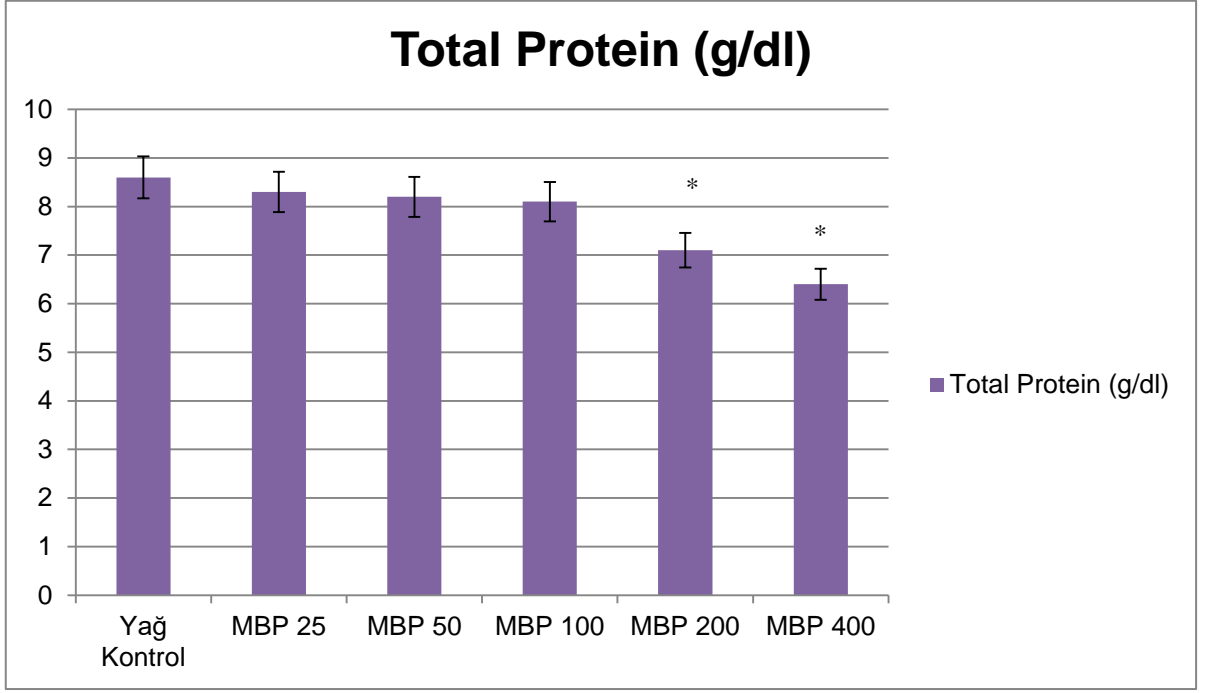
**Şekil 4.32.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların AST analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



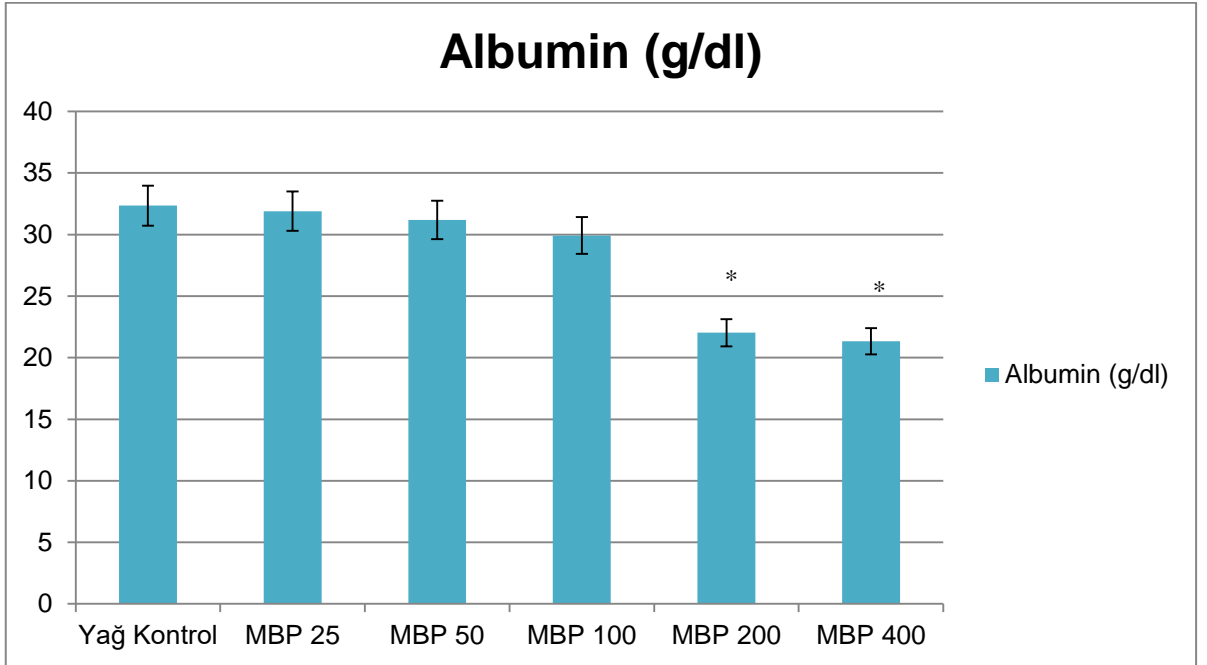
**Şekil 4.33.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların trigliserit analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



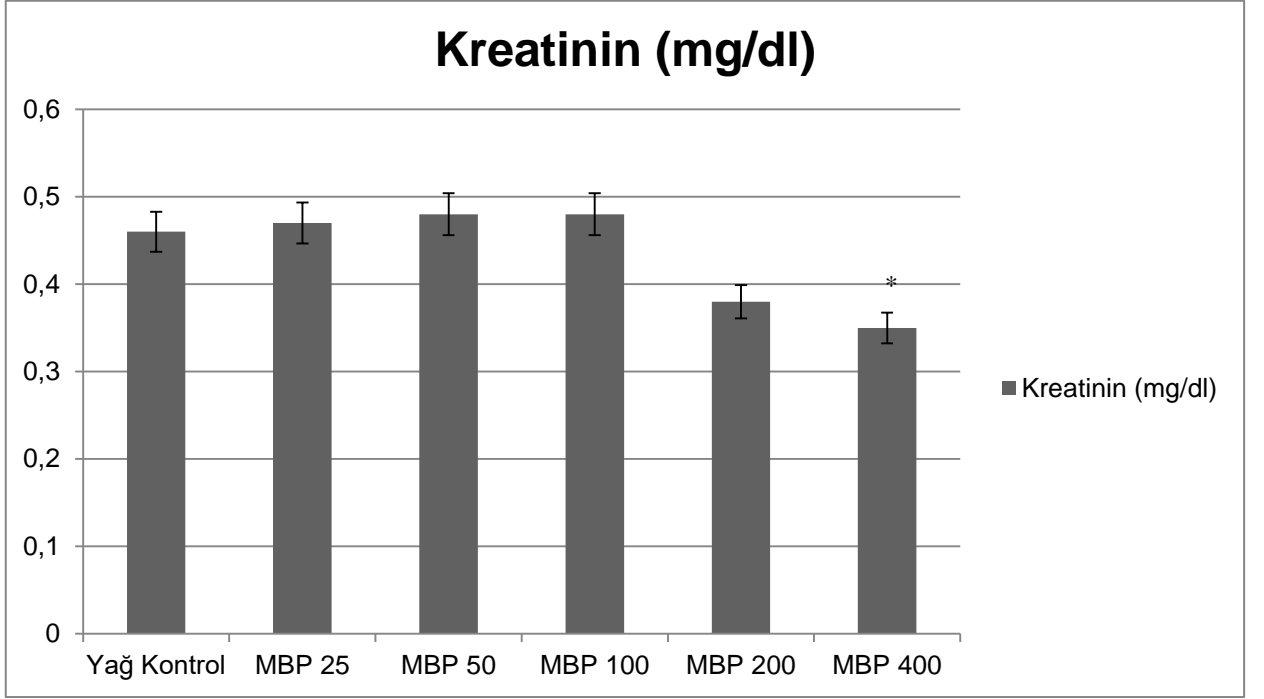
**Şekil 4.34.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların glikoz analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



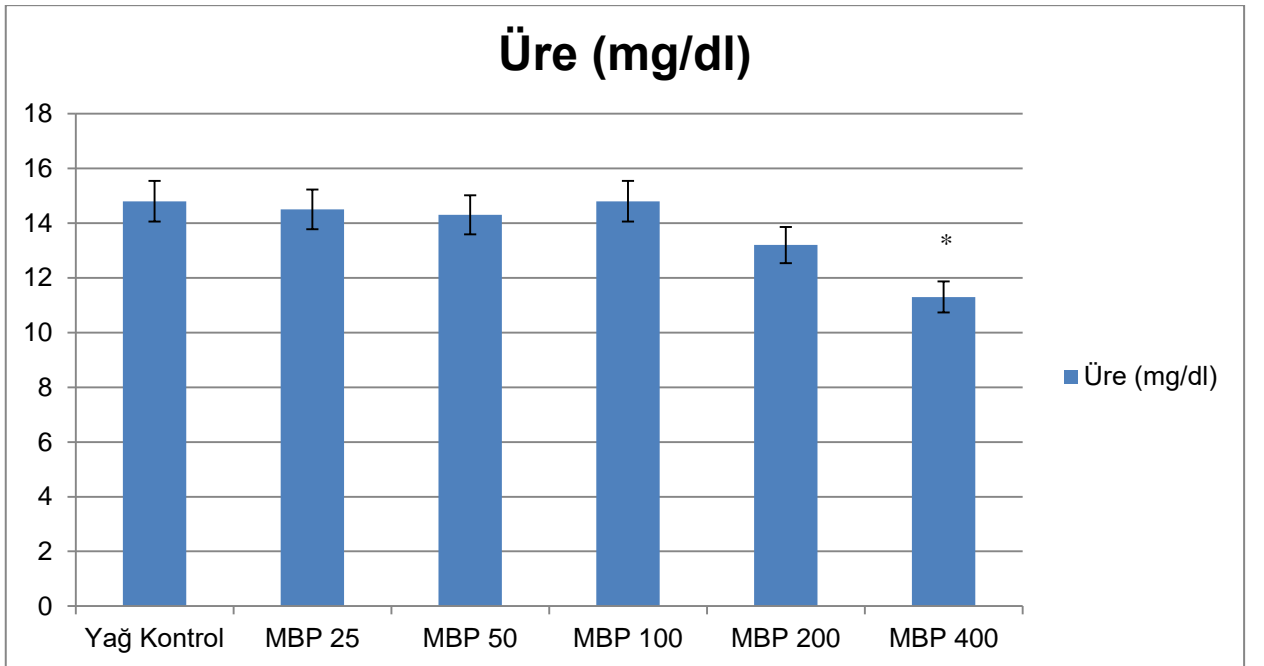
**Şekil 4.35.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların total protein analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



**Şekil 4.36.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların albumin analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



**Şekil 4.37.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların kreatinin analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)



**Şekil 4.38.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların üre analiz sonuçları (\*Yağ kontrol grubundan farklı)

## 4.12 Histopatolojik İncelemeler

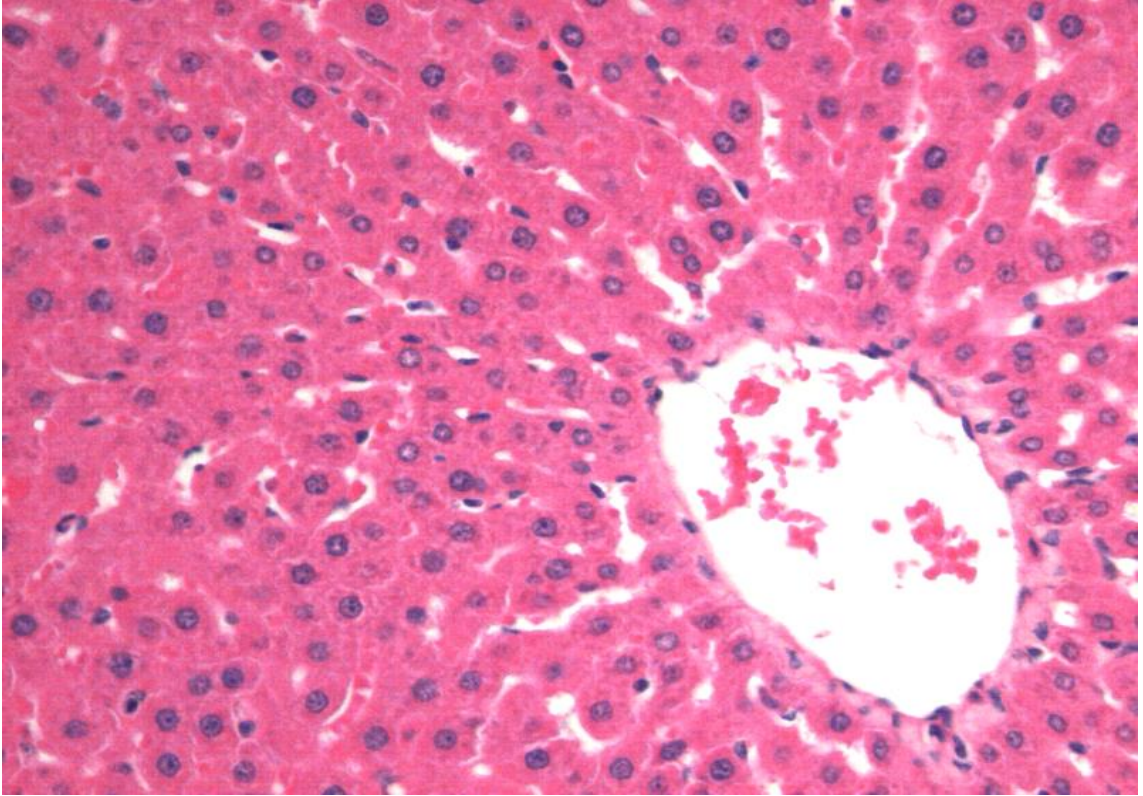
### 4.12.1 Karaciğer Dokusuna Ait Bulgular

Histolojik yöntemlerle hazırlanan ve H&E ile boyanan karaciğer doku preparatları histopatolojik açıdan incelenmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarının histopatolojik olarak incelenmesinden sonra 200X ve 400X büyütmelerde fotoğrafları çekilmiştir. Çizelge 4.21'de yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların karaciğer dokularına ait histopatolojik bulguların görülme sıklığı, Çizelge 4.22'de yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların karaciğer dokularına ait histopatolojik bulguların görülme sıklığı verilmiştir.

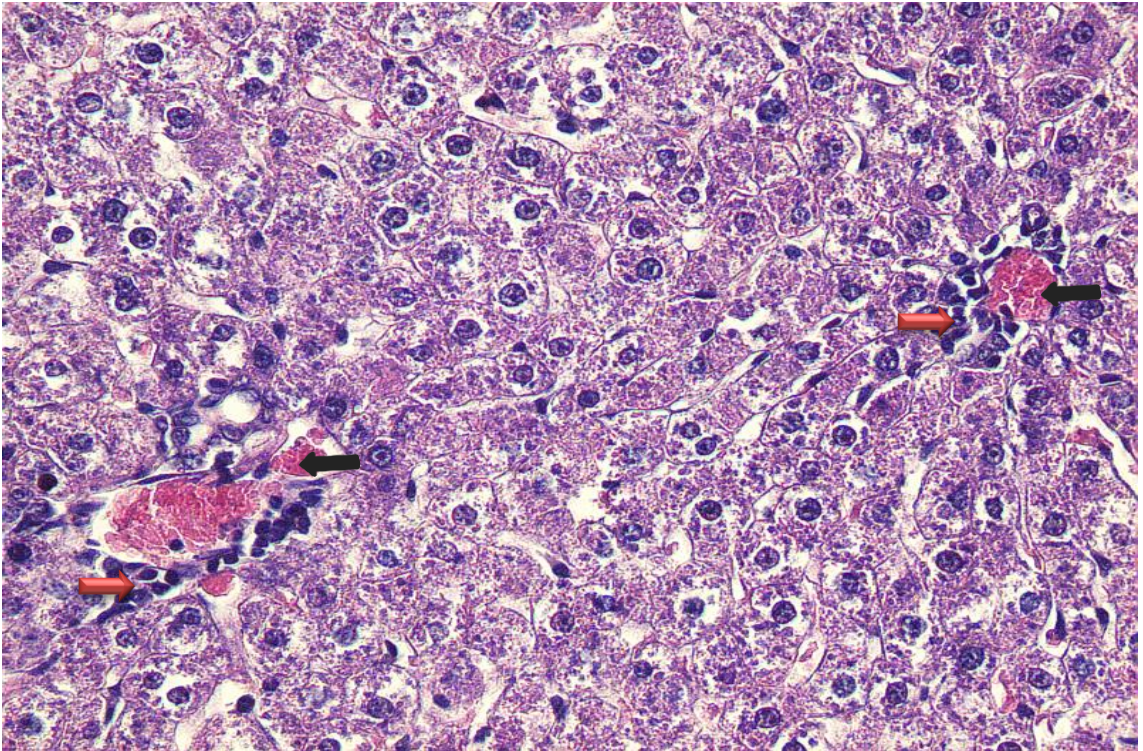
Kontrol grubunda karaciğerin histolojik görüntüsü Şekil 4.39'da gösterilmiştir. Şekil 4.40'de, 100 mg/kg/gün MEHP doz uygulama grubuna ait karaciğerde mononükleer hücre infiltrasyonu ve minimal derecede konjesyon tespit edilmiştir. 200 mg/kg/gün MEHP doz grubuna ait karaciğerde mononükleer hücre infiltrasyonu tespit edilmiş ve şekil 4.42'de gösterilmiştir. 400 mg/kg/gün MEHP doz grubuna ait karaciğerde sinüzoidal dejenerasyon tespit edilmiş ve şekil 4.43'de gösterilmiştir.

100 mg/kg/gün MBP uygulama grubunda karaciğerde konjesyon ve dejenerasyon gözlenmiştir (Şekil 4.44). 200 mg/kg/gün MBP uygulama grubunda karaciğerde mononükleer hücre infiltrasyonu (Şekil 4.45), 400 mg/kg/gün MBP uygulama grubunda ise karaciğerde nekrotik bölgenin meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.46).



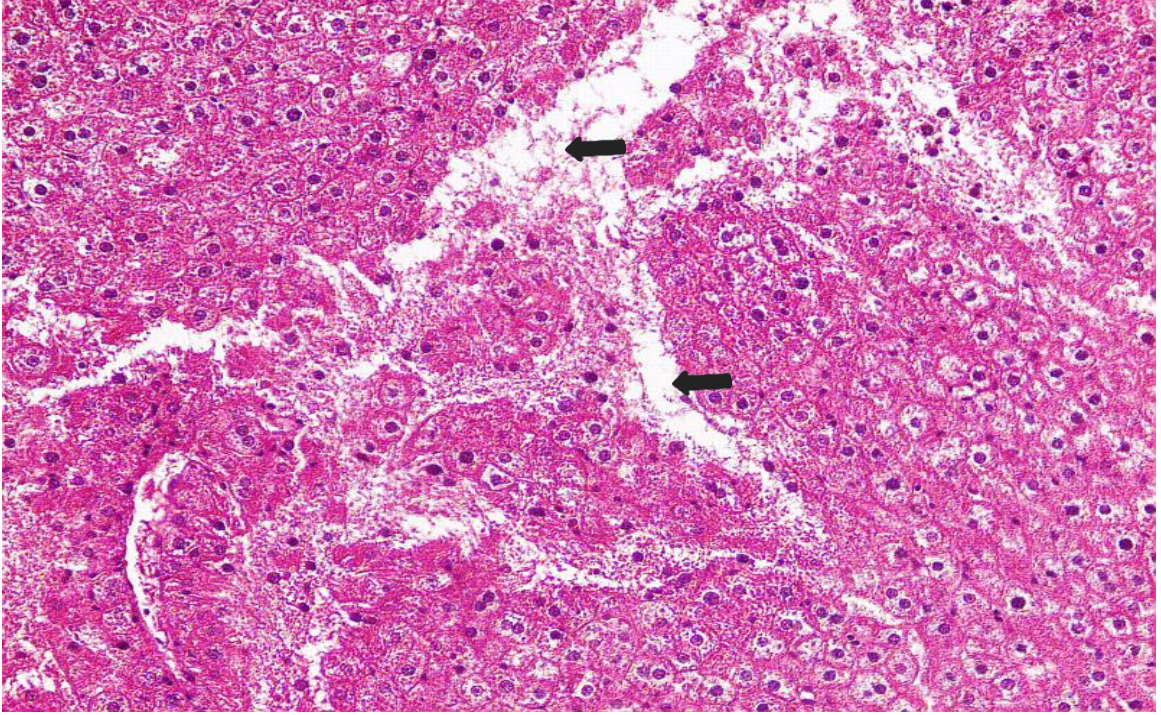


**Şekil 4.39** Kontrol grubu sıçanda karaciğerin histolojik görüntüsü (H&E,X400)

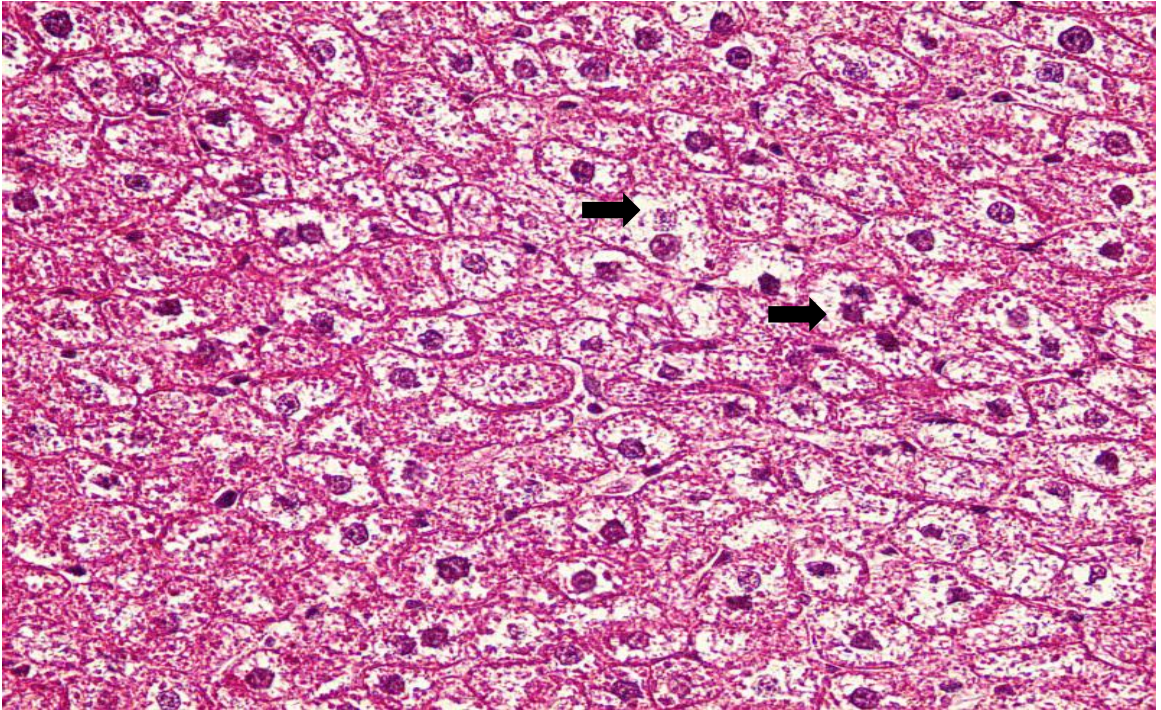


**Şekil 4.40** 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubunda karaciğerde minimal derecede mononükleer hücre infiltrasyonu ( → ) ve konjesyon ( → )(H&E,X400).



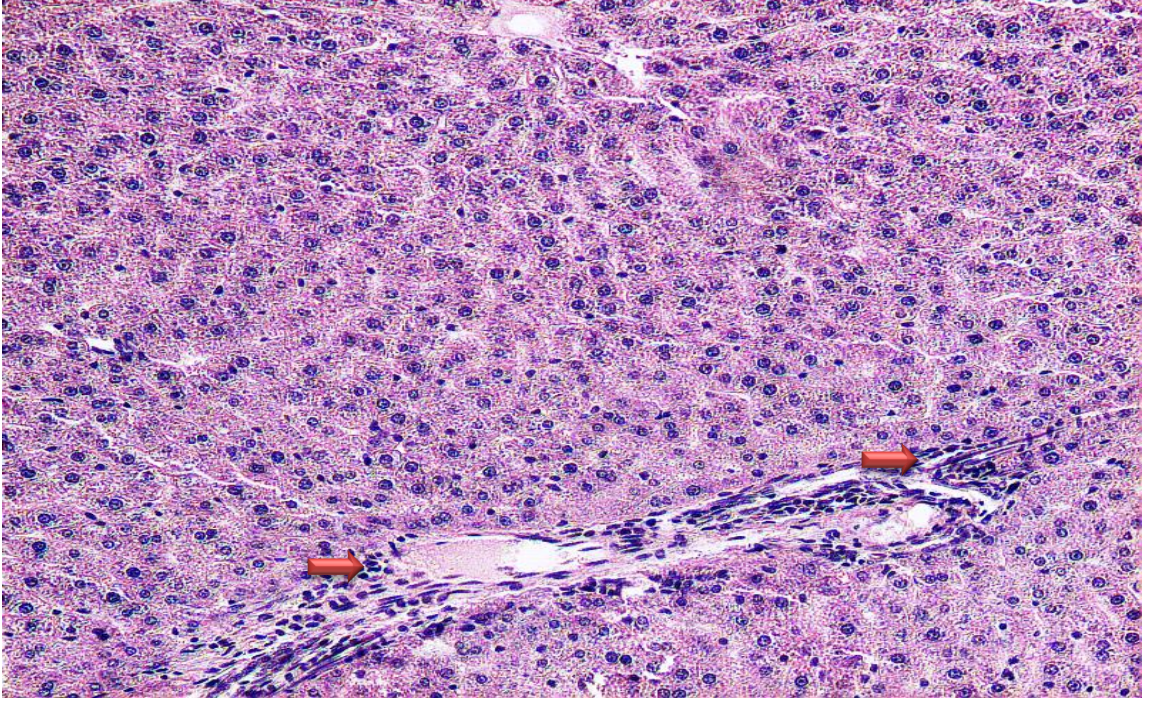



**Şekil 4.40** 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubunda karaciğerde sinüzoidal dejenerasyon ( ➡ ) (H&E, X200).

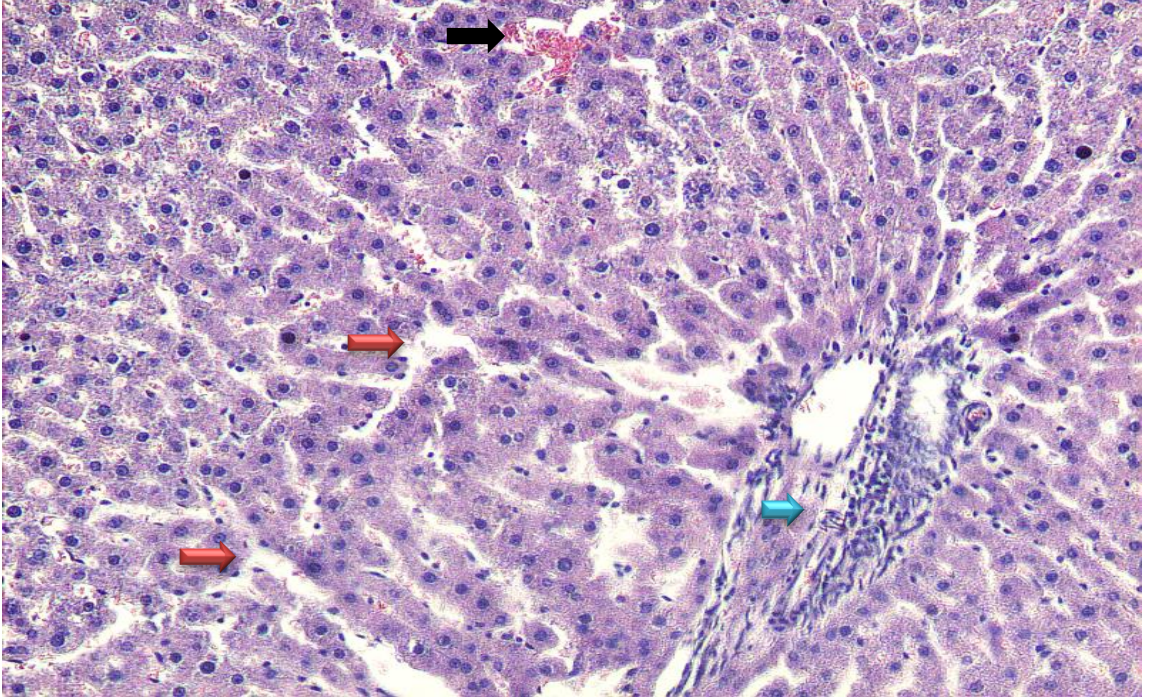





**Şekil 4.41** 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubunda sitoplazmik erime ( ➡ ) (H&E, X200).



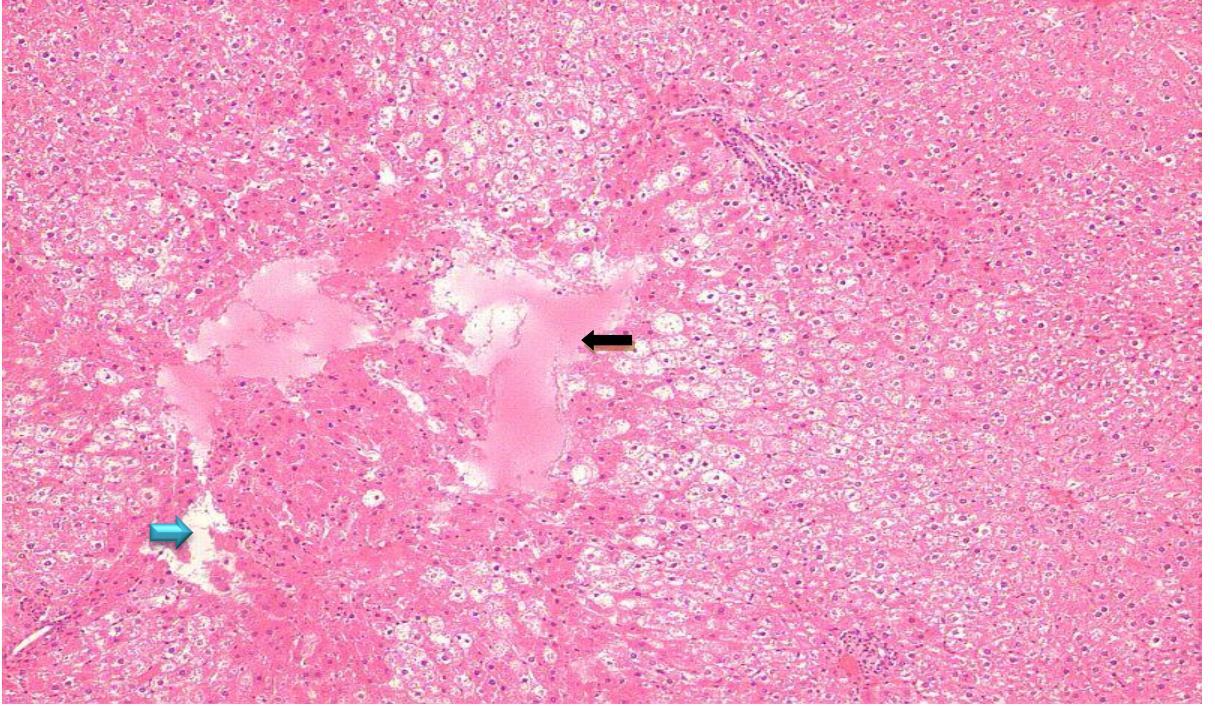


**Şekil 4.42** 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubunda mononükleer hücre infiltrasyonu (  ) (H&E, X200).

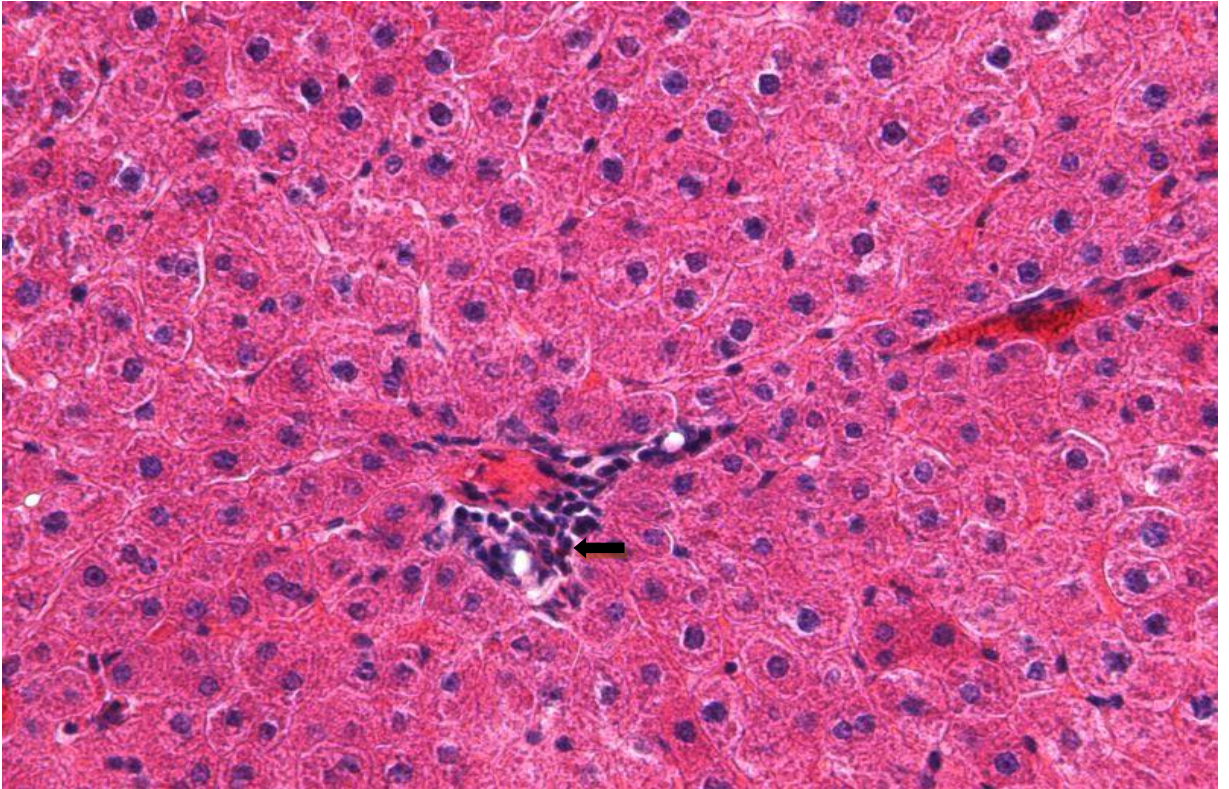


**Şekil 4.43** 400 mg/kg/gün MEHP uygulama grubunda karaciğerde sinüzoidal dejenerasyon (  ), konjesyon (  ) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (  ) (H&E, X200).



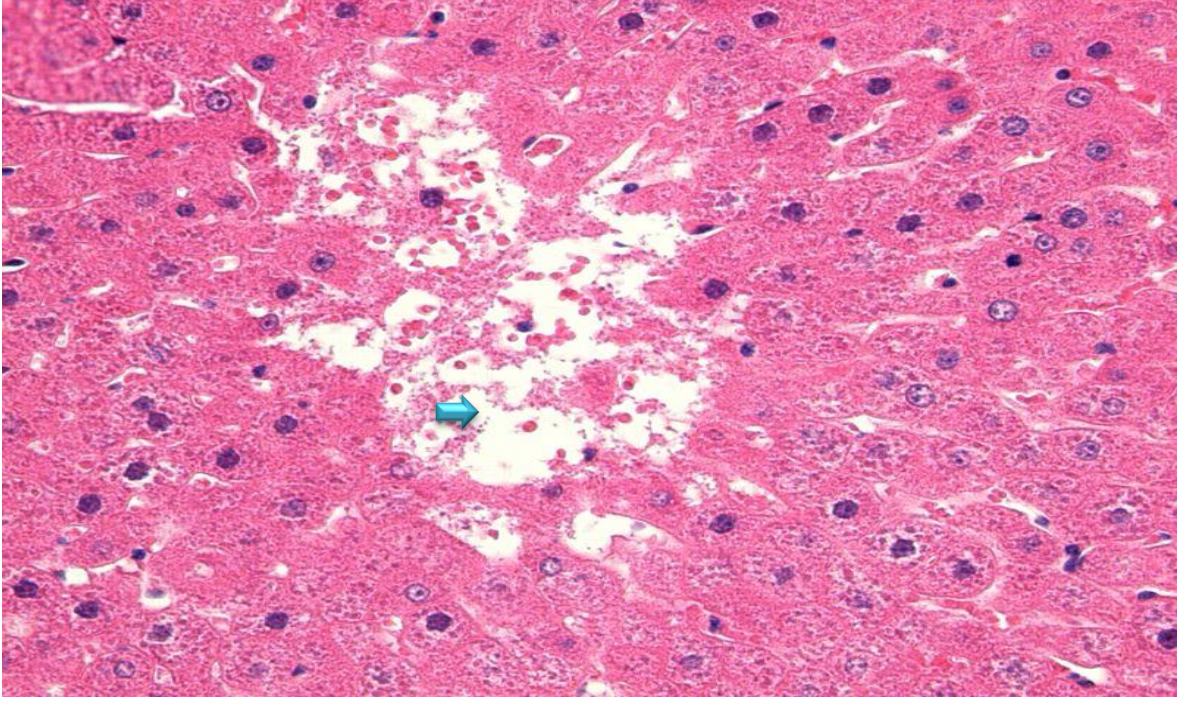



**Şekil 4.44** 100 mg/kg/gün MBP uygulama grubunda karaciğerde ödem (➡) ve hücresel dejenerasyon ( ➡) (H&E, X200).



**Şekil 4.45** 200 mg/kg/gün MBP uygulama grubunda karaciğerde mononükleer hücre infiltrasyonu (➡) (H&E, X400).





**Şekil 4.46** 400 mg/kg/gün MBP uygulama grubunda karaciğerde nekroz oluşumu (  ) (H&E, X400).

**Çizelge 4.21.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların karaciğer dokularına ait histopatolojik bulguların insidansı

Parametreler	Yağ Kontrol (1 ml)	MEHP (25 mg/kg/gün)	MEHP (50 mg/kg/gün)	MEHP (100mg/kg/gün)	MEHP (200mg/kg/gün)	MEHP (400 mg/kg/gün)
Sinüzoidal dejenerasyon	0/6	0/6	1/6	4/6*	5/6*	6/6*
Konjesyon	0/6	1/6	1/6	5/6*	3/6	5/6*
Sitoplazmik erime	0/6	1/6	1/6	1/6	4/6*	2/6
Mononükleer hücre infiltrasyonu	0/6	0/6	1/6	4/6*	5/6*	5/6*

Değerler değişiklik gözlenen hayvan sayısı/grupta yer alan toplam incelenen hayvan sayısı şeklinde verilmiştir. Gruplardaki oranlar karşılaştırılırken Fisher's exact test uygulanmıştır. \*Kontrol grubundan farklı,  $p \leq 0,05$ .

**Çizelge 4.22.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların karaciğer dokularına ait histopatolojik bulguların insidansı

<b>Parametreler</b>	<b>Yağ Kontrol (1 ml)</b>	<b>MBP (25 mg/kg/gün)</b>	<b>MBP (50 mg/kg/gün)</b>	<b>MBP (100mg/kg/gün)</b>	<b>MBP (200mg/kg/gün)</b>	<b>MBP (400 mg/kg/gün)</b>
Sinüzoidal dejenerasyon	0/6	0/6	1/6	4/6*	4/6	6/6*
Konjesyon	1/6	2/6	2/6	4/6*	3/6	5/6*
Sitoplazmik erime	0/6	1/6	1/6	3/6	3/6	3/6
Mononükleer hücre infiltrasyonu	1/6	0/6	2/6	2/6	5/6*	5/6*

Değerler değişiklik gözlenen hayvan sayısı/grupta yer alan toplam incelenen hayvan sayısı şeklinde verilmiştir. Gruplardaki oranlar karşılaştırılırken Fisher's exact test uygulanmıştır. \*Kontrol grubundan farklı,  $p \leq 0,05$ .

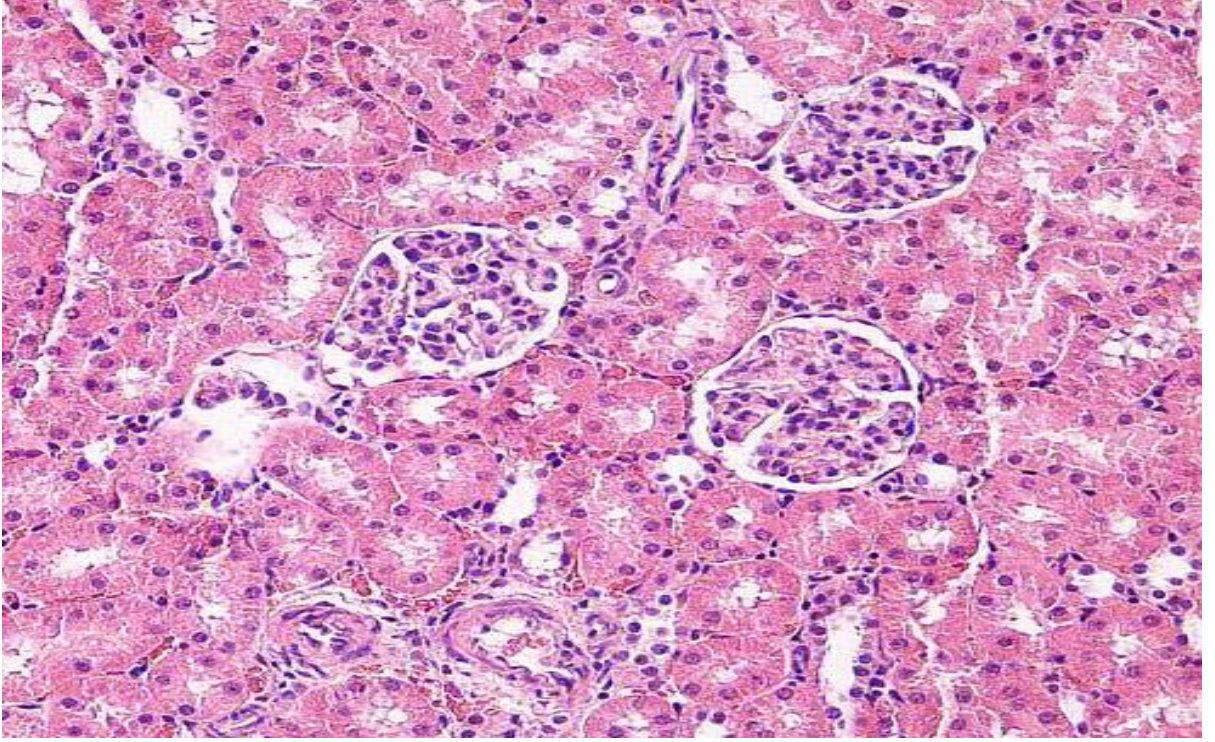
#### 4.12.1 Böbrek Dokusuna Ait Bulgular

Histolojik yöntemlerle hazırlanan ve H&E ile boyanan böbrek doku preparatları histopatolojik açıdan incelenmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarının histopatolojik olarak incelenmesinden sonra 200X ve 400X büyütmelerde fotoğrafları çekilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda Çizelge 4.23'de yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların böbrek dokularına ait histopatolojik bulguların görülme sıklığı, Çizelge 4.24'de ise yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların böbrek dokularına ait histopatolojik bulguların görülme sıklığı verilmiştir.

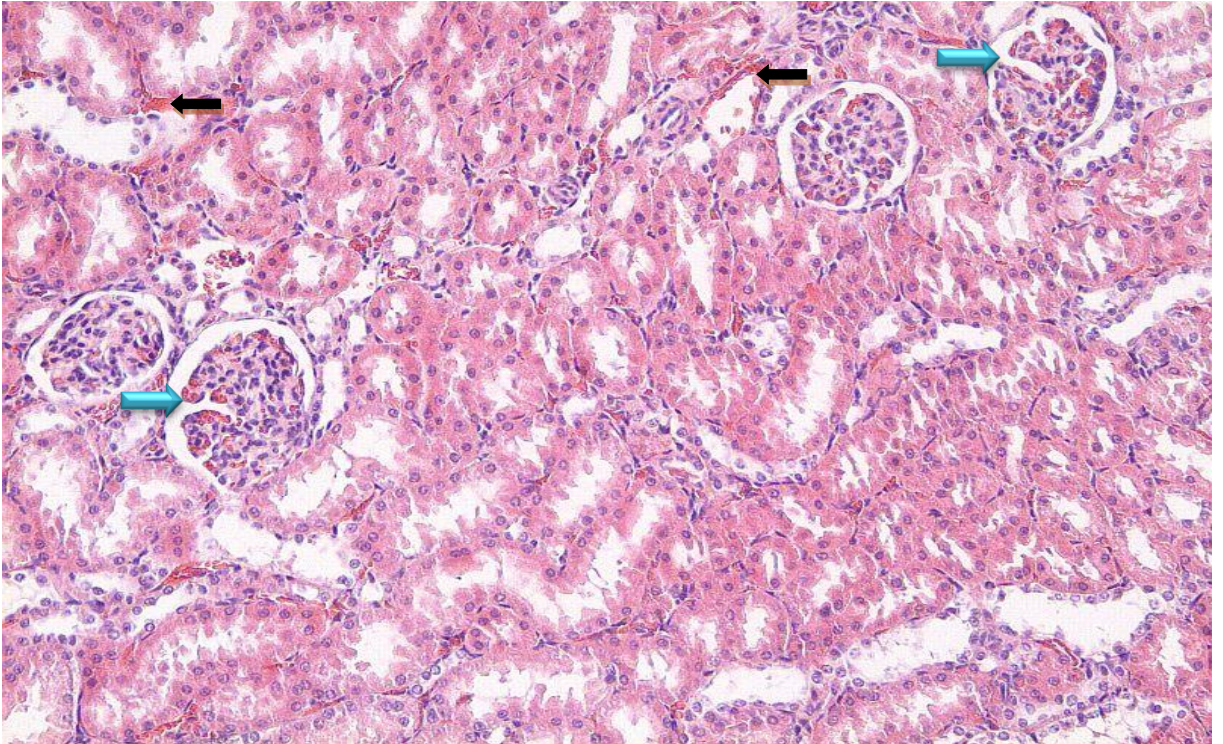
Şekil 4.44'de kontrol grubuna ait böbreğin histolojik görüntüsü verilmiştir. 100 mg/kg/gün MEHP ve 200 mg/kg/gün MBP uygulama grubu erkek sıçanlarda böbrekte glomerulus dejenerasyonu ve konjesyonun varlığı tespit edilmiştir (sırasıyla Şekil 4.48 ve 4.50).



Aynı şekilde 200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün MBP uygulama grubu sıçanlarda böbrekte atrofik yapıda glomerulus ve tübüler dejenerasyon ile birlikte konjesyon tespit edilmiş ve bulgular Şekil 4.50 ve 4.51'de gösterilmiştir.



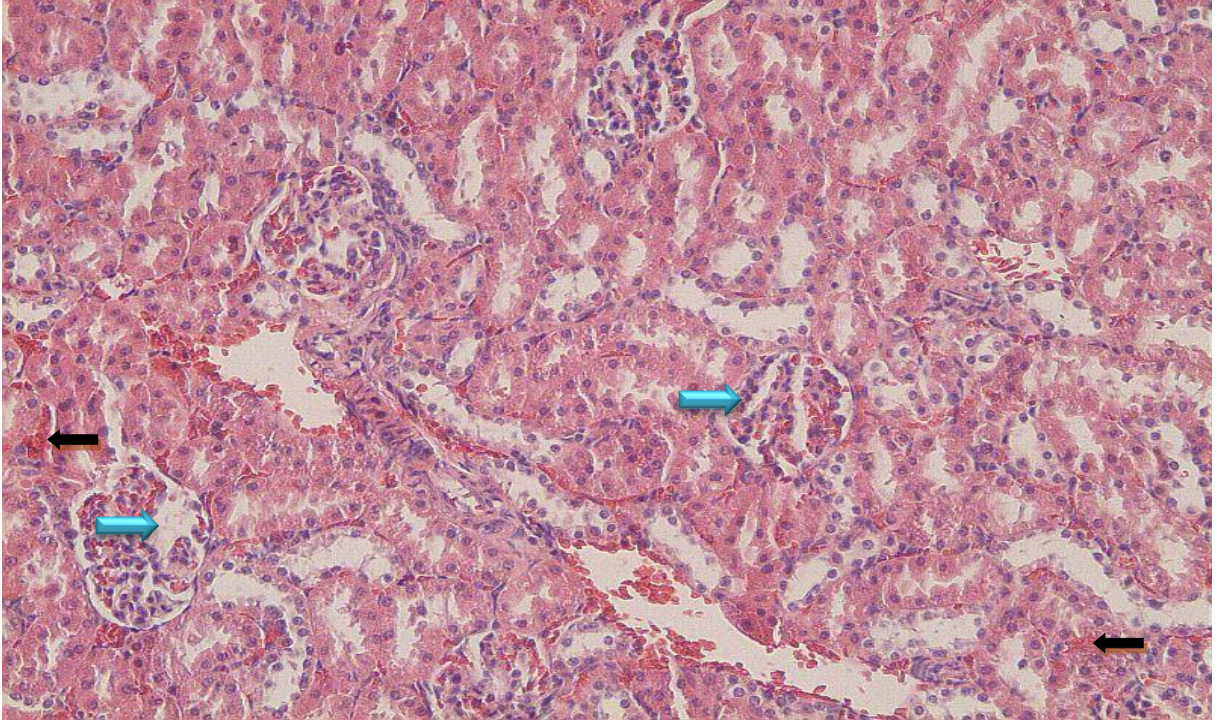




**Şekil 4.47** Kontrol grubu sıçanda böbreğin histolojik görüntüsü (H&E, X400)

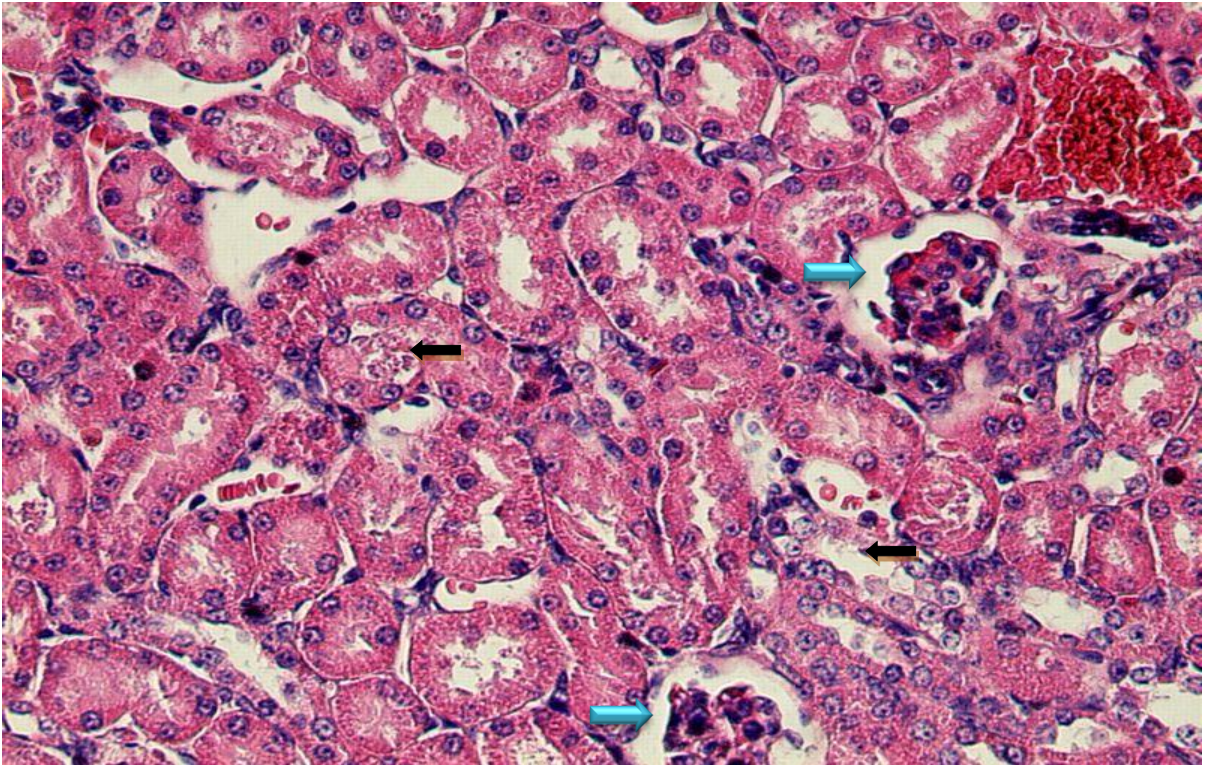




**Şekil 4.48** 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu erkek sıçanda böbrek dokusunda parietal ve visseral yapraklarda ayrılma (  ) ve konjesyon (  ) (H&E, X200).



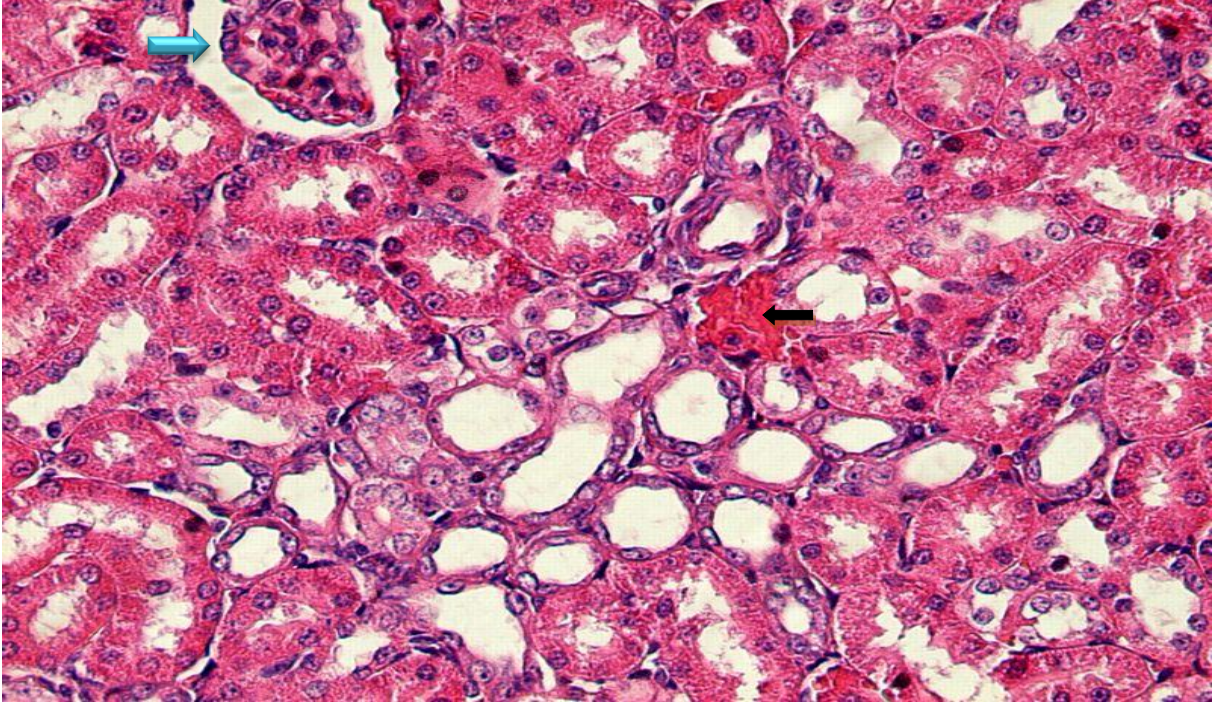




**Şekil 4.49** 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu böbrek dokusunda glomerulus dejenerasyonu (  ) ve konjesyon (  ) (H&E, X200).



**Şekil 4.50** 200 mg/kg/gün MBP uygulama grubu böbrek dokusunda tübüler dejenerasyon (  ) ve atrofik glomerulus (  ) (H&E, X400).





**Şekil 4.51** 400 mg/kg/gün MBP uygulama grubu böbrek dokusunda parietal ve visseral yapraklarda ayrılma (  ) ve konjesyon (  ) (H&E,X400).

**Çizelge 4.23.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların böbrek dokularına ait histopatolojik bulguların insidansı

<b>Parametreler</b>	<b>Yağ Kontrol (1 ml)</b>	<b>MEHP (25 mg/kg/gün)</b>	<b>MEHP (50 mg/kg/gün)</b>	<b>MEHP (100mg/kg/gün)</b>	<b>MEHP (200mg/kg/gün)</b>	<b>MEHP (400 mg/kg/gün)</b>
Glomerulus dejenerasyonu	0/6	0/6	1/6	3/6	4/6	6/6*
Konjesyon	1/6	2/6	2/6	4/6*	3/6	5/6*
Sitoplazmik erime	0/6	1/6	1/6	3/6	3/6	3/6
Mononükleer hücre infiltrasyonu	1/6	0/6	2/6	1/6	2/6	1/6
Parietal ve visseral yapraklarda ayrılma	0/6	0/6	0/6	4/6*	1/6	1/6

Değerler değişiklik gözlenen hayvan sayısı/grupta yer alan toplam incelenen hayvan sayısı şeklinde verilmiştir. Gruplardaki oranlar karşılaştırılırken Fisher's exact test uygulanmıştır. \*Kontrol grubundan farklı,  $p \leq 0,05$ .

**Çizelge 4.24.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların böbrek dokularına ait histopatolojik bulguların insidansı

Parametreler	Yağ Kontrol (1 ml)	MBP (25 mg/kg/gün)	MBP (50 mg/kg/gün)	MBP (100mg/kg/gün)	MBP (200mg/kg/gün)	MBP (400 mg/kg/gün)
Glomerulus dejenerasyonu	0/6	0/6	1/6	3/6	4/6*	5/6*
Konjesyon	1/6	2/6	2/6	4/6*	3/6	6/6*
Sitoplazmik erime	0/6	1/6	1/6	1/6	1/6	2/6
Mononükleer hücre infiltrasyonu	1/6	0/6	2/6	1/6	1/6	1/6
Parietal ve visseral yapraklarda ayrılma	0/6	1/6	1/6	1/6	2/6	4/6*

Değerler değişiklik gözlenen hayvan sayısı/grupta yer alan toplam incelenen hayvan sayısı şeklinde verilmiştir. Gruplardaki oranlar karşılaştırılırken Fisher's exact test uygulanmıştır. \*Kontrol grubundan farklı,  $p \leq 0,05$ .

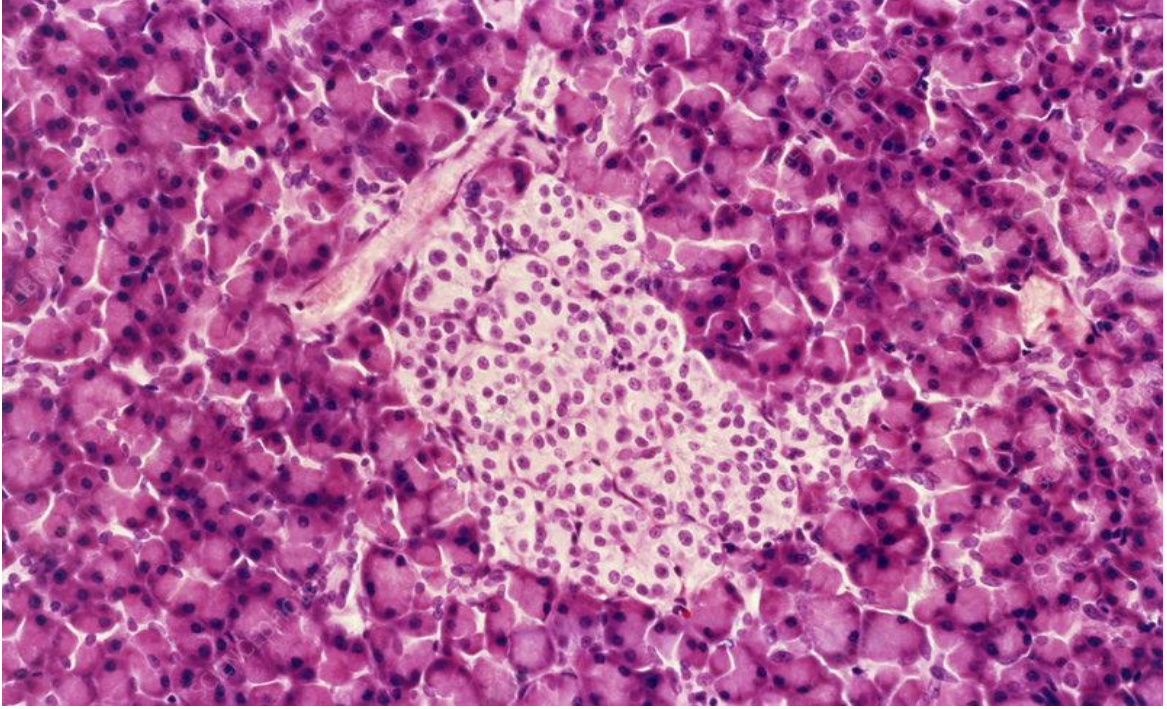
#### 4.12.3 Pankreas Dokusuna Ait Bulgular

Histolojik yöntemlerle hazırlanan ve H&E ile boyanan pankreas doku preparatları histopatolojik açıdan incelenmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarının histopatolojik olarak incelenmesinden sonra 200X ve 400X büyütmelerde fotoğrafları çekilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda Çizelge 4.21’de yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların pankreas dokularına ait histopatolojik bulguların görülme sıklığı verilmiştir. Çizelge 4.22’de yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların pankreas dokularına ait histopatolojik bulguların görülme sıklığı verilmiştir.

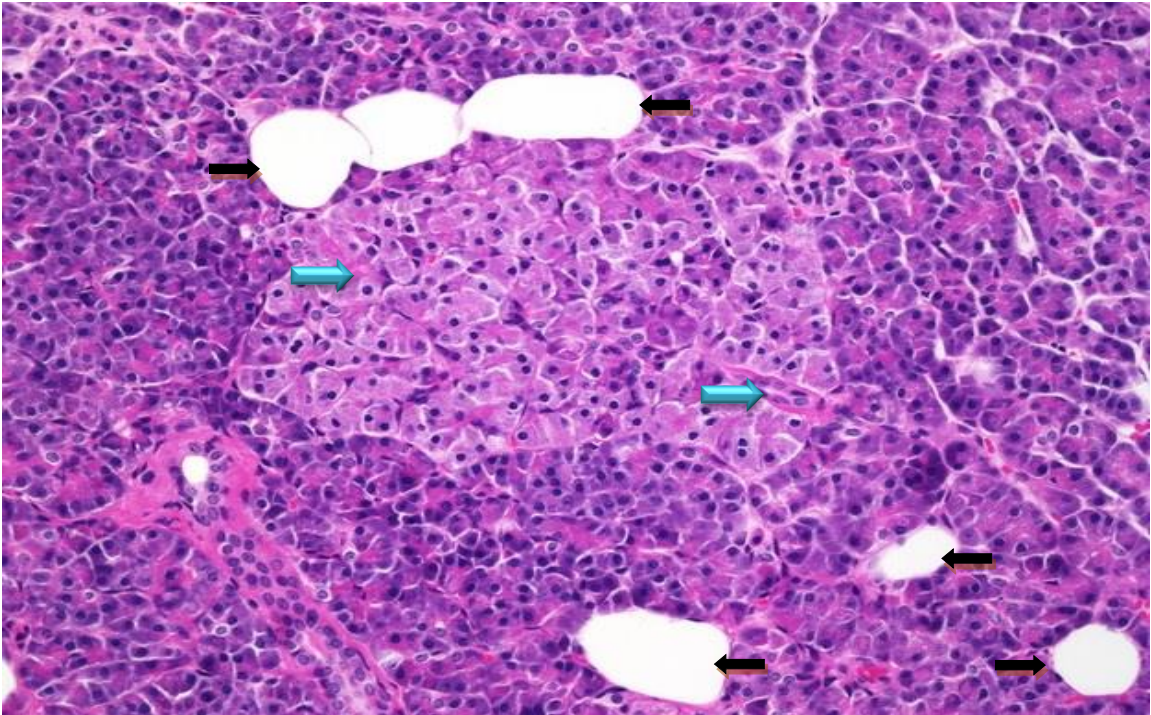
Şekil 4.52’de kontrol grubuna ait pankreasın histolojik görüntüsü verilmiştir. 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu erkek sıçanda pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında konjesyon ve yağlanma bulunmuş ve Şekil 4.53’de gösterilmiştir. 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında dejenerasyon ve vakuoler sitoplazmalı hücreler tespit edilmiş ve Şekil 4.54’de gösterilmiştir.



200 mg/kg/gün MBP uygulama grubu sıçanda pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında dejenerasyon Şekil 4.57’de gösterilmiştir. 400 mg/kg/gün MBP uygulama grubu pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında dejenerasyon bulunmuş ve Şekil 4.58’de gösterilmiştir.



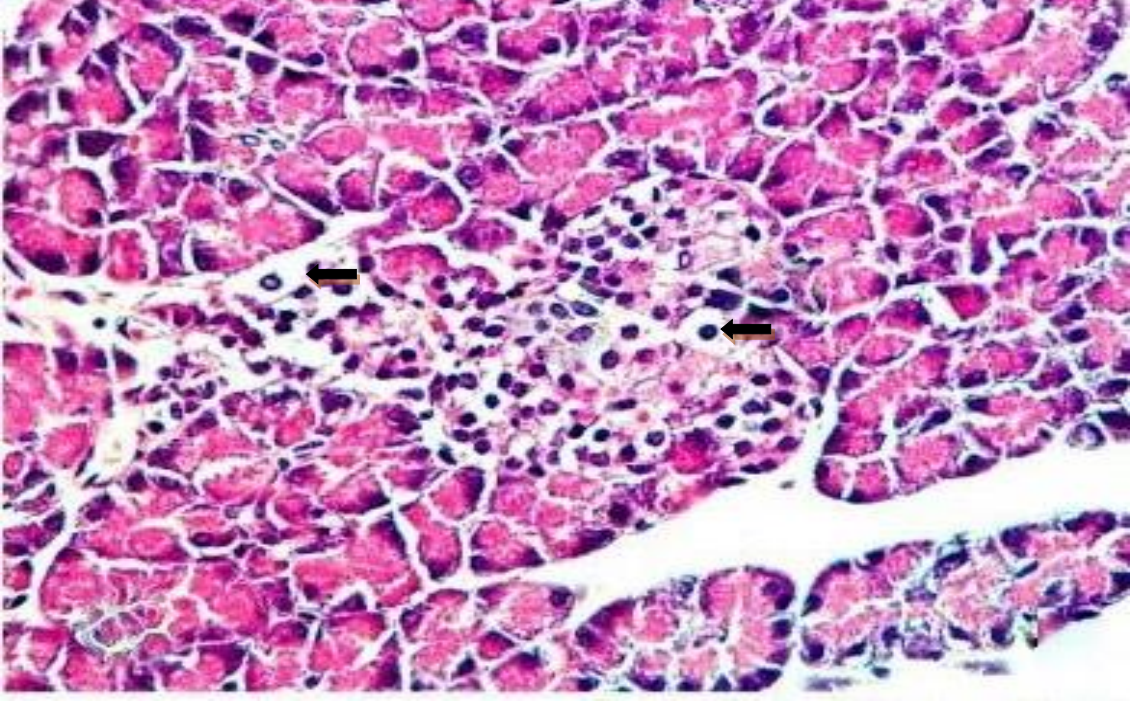


**Şekil 4.52** Kontrol grubuna ait pankreasın histolojik görüntüsü (H&E, 200x).

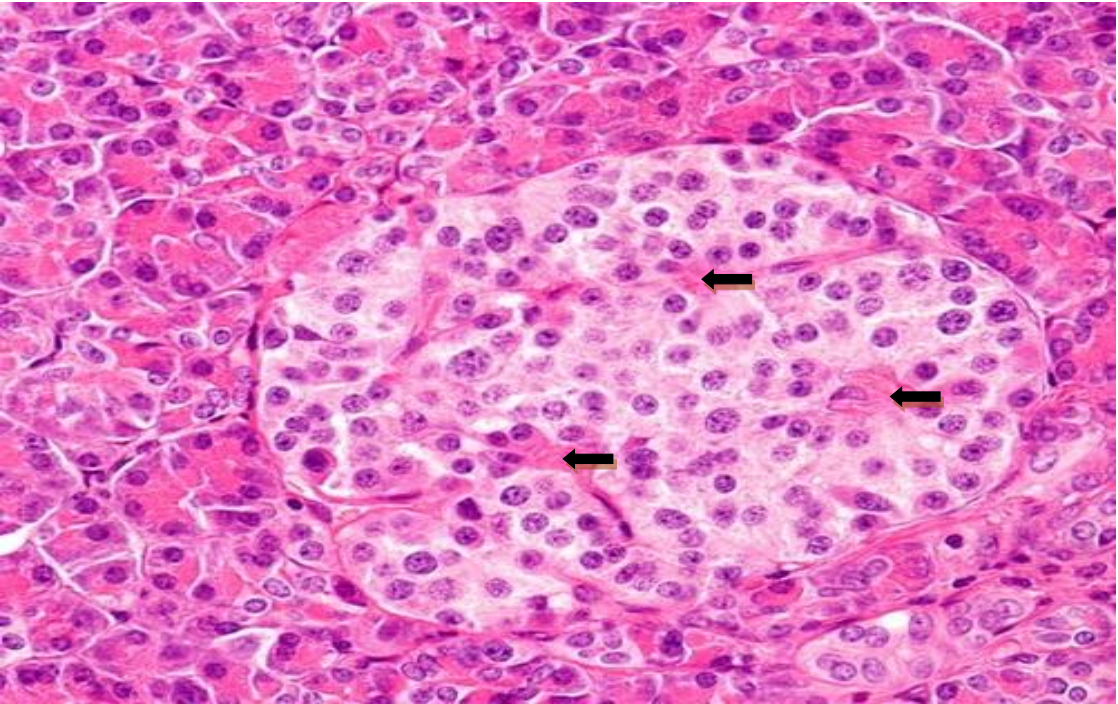


**Şekil 4.53** 100 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında konjesyon (  ) ve yağlanma (  ) (H&E,200x.)



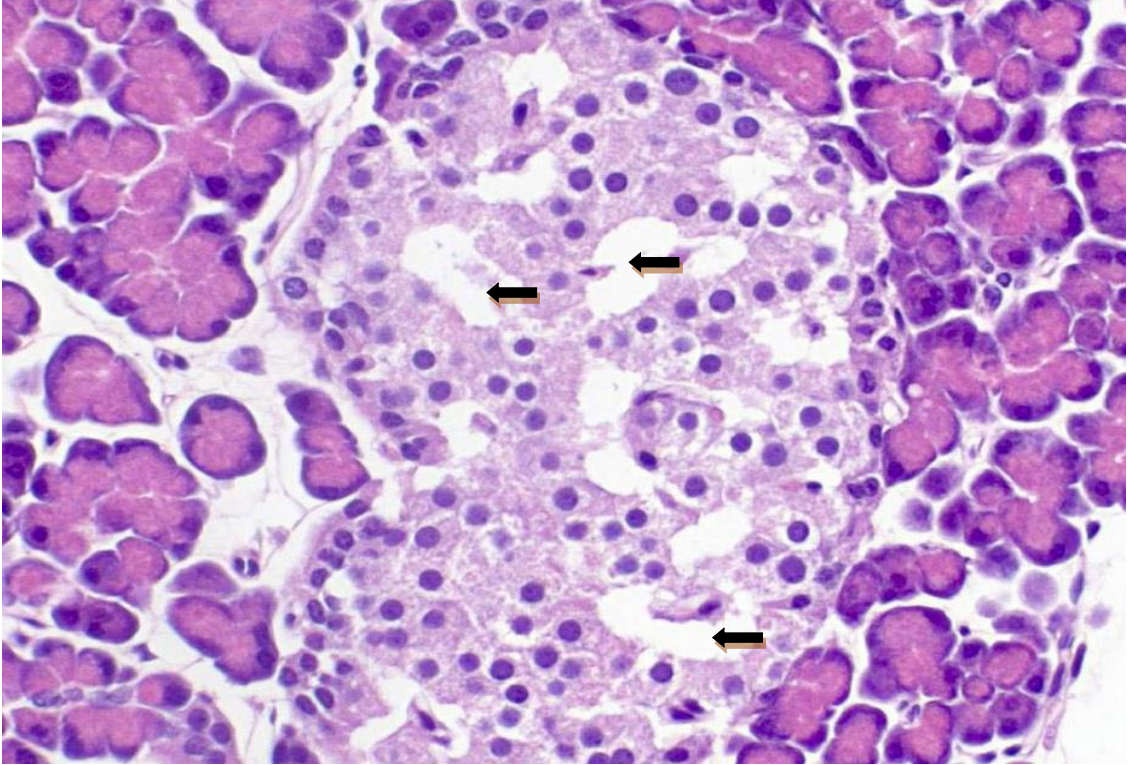


**Şekil 4.54** 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu sıçanda pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında dejenerasyon ve vakuoler sitoplazmalı hücreler (➡) (H&E, 400x)

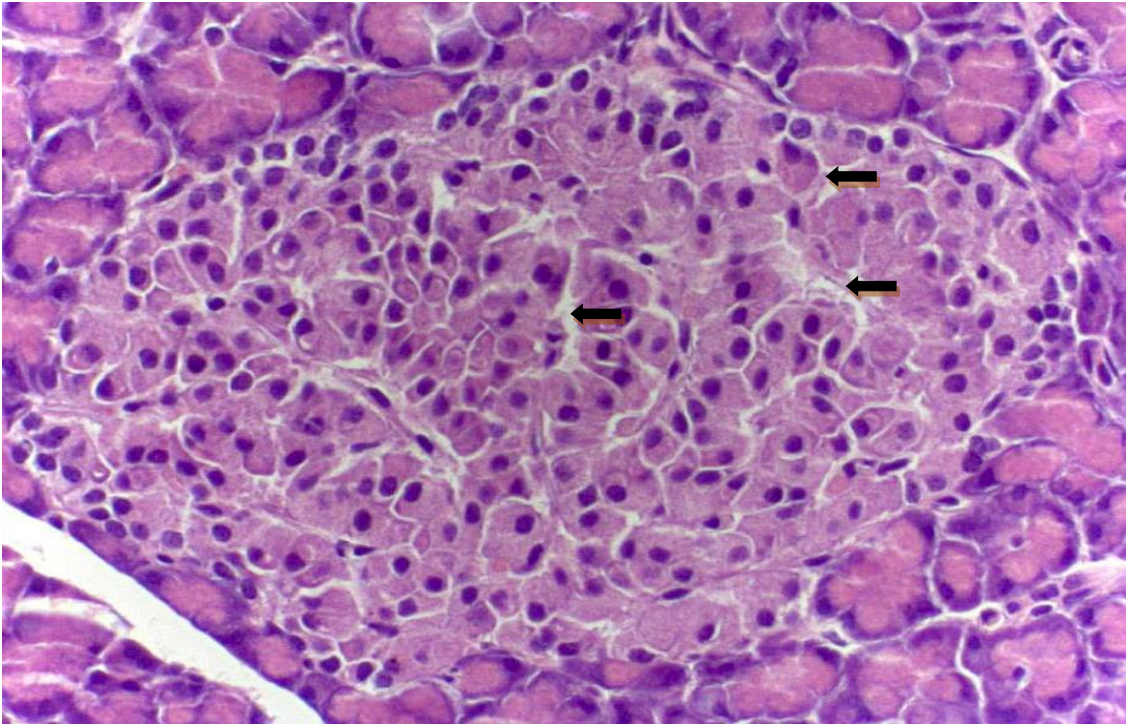


**Şekil 4.55** 200 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında konjesyon (➡) (H&E, 400x)



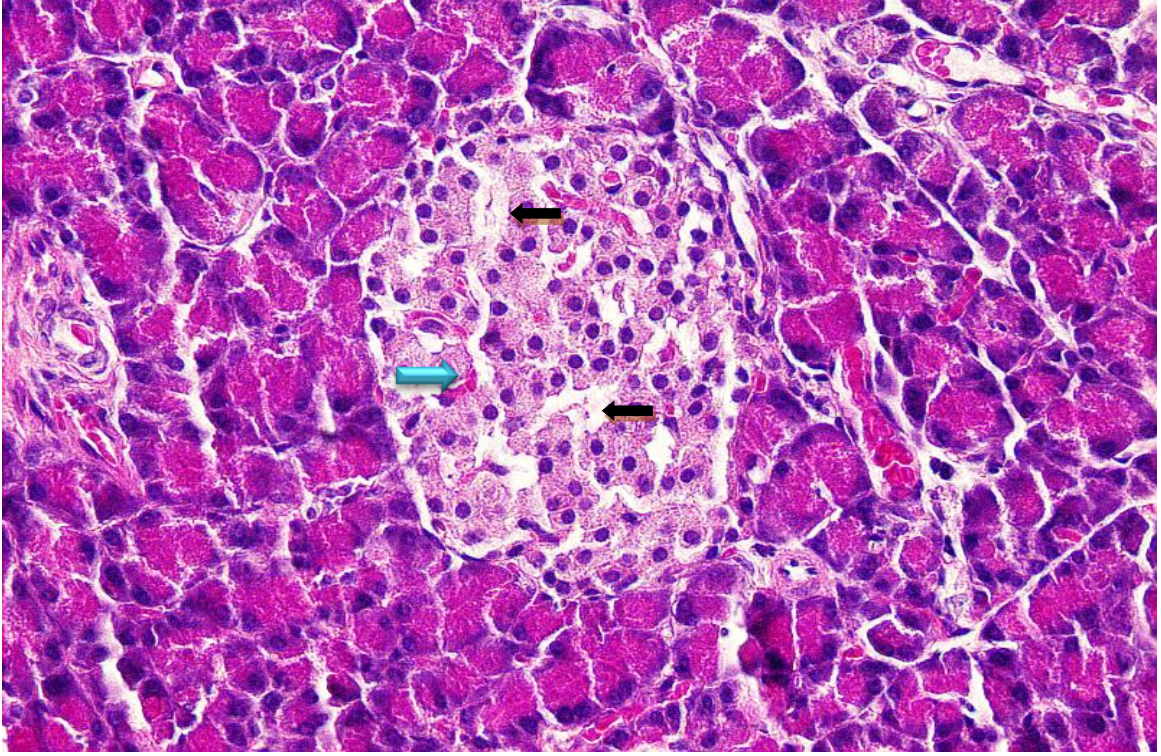


**Şekil 4.56** 400 mg/kg/gün MEHP uygulama grubu pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında dejenerasyon (➡) (H&E, 400x)



**Şekil 4.57** 200 mg/kg/gün MBP uygulama grubu pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında dejenerasyon (➡) (H&E,400x.)





**Şekil 4.58** 400 mg/kg/gün MBP uygulama grubu sıçanda pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarında dejenerasyon (→) ve konjesyon (→) (H&E, 200x.)



**Çizelge 4.25.** Yağ kontrol ve MEHP uygulama gruplarına ait sıçanların pankreas dokularına ait histopatolojik bulguların insidansı

<b>Parametreler</b>	<b>Yağ Kontrol (1 ml)</b>	<b>MEHP (25 mg/kg/gün)</b>	<b>MEHP (50 mg/kg/gün)</b>	<b>MEHP (100mg/kg/gün)</b>	<b>MEHP (200mg/kg/gün)</b>	<b>MEHP (400 mg/kg/gün)</b>
Langerhans adacıklarında dejenerasyon	0/6	0/6	1/6	4/6*	4/6*	6/6*
Konjesyon	1/6	1/6	2/6	4/6*	3/6	5/6*
Yağlanma	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6

Değerler değişiklik gözlenen hayvan sayısı/grupta yer alan toplam incelenen hayvan sayısı şeklinde verilmiştir. Gruplardaki oranlar karşılaştırılırken Fisher's exact test uygulanmıştır. \*Kontrol grubundan farklı,  $p \leq 0,05$ .

**Çizelge 4.26.** Yağ kontrol ve MBP uygulama gruplarına ait sıçanların pankreas dokularına ait histopatolojik bulguların insidansı

Parametreler	Yağ Kontrol (1 ml)	MBP (25 mg/kg/gün)	MBP (50 mg/kg/gün)	MBP (100mg/kg/gün)	MBP (200mg/kg/gün)	MBP (400 mg/kg/gün)
Langerhans adacıklarında dejenerasyon	0/6	0/6	1/6	2/6	5/6 *	6/6*
Konjesyon	1/6	1/6	1/6	2/6	2/6	5/6

Değerler değişiklik gözlenen hayvan sayısı/grupta yer alan toplam incelenen hayvan sayısı şeklinde verilmiştir. Gruplardaki oranlar karşılaştırılırken Fisher's exact test uygulanmıştır. \*Kontrol grubundan farklı,  $p \leq 0,05$ .

## 5. TARTIŞMA

Endokrin bozucu kimyasallar, ekzokrin olarak organizmaya alınan ve organizmaya alındıktan sonra canlıda ve onun gelecek kuşaklarında endokrin sistemin çalışmasını olumsuz şekilde değiştiren madde ya da madde karışımlarıdır. Bunlar vücudumuzdaki hormonların üretimi, salınımı, bağlanması, taşınması, etkinlikleri, yıkımları ve vücuttan atılmaları üzerinde etki gösterirler [198,199,200].

Fitalatlar, endüstride 1920'li yıllardan günümüze kadar birçok alanda kullanılan insan yapımı kimyasal maddelerdir. Kullanıma sunuldukları madde ile güçlü bir kimyasal bağ kuramadıkları için stabil değillerdir. Yüksek ısıda kolayca ayrılıp buharlaşmaktadırlar [201].

Fitalatlar; besin ambalajları, giyim ürünleri, oyuncaklar, emzik ve biberon gibi çocuk ürünleri, IV sıvı torbası, infüzyon seti ve tıbbi malzeme dahil çok sayıda üründe bulunmaktadır. Kullanıldıkları ürünlerde polivinil klorür (PVC) tipi plastik ürünlerin esnekliğini ve dayanıklılığını sağlamak üzere plastikleştirici olarak kullanılan ve bu nedenle çok yaygın olarak karşılaşılan kimyasal maddelerdir. Kozmetikler, parfümler ve sabunlar dahil kişisel bakım ürünlerinde de yaygın olarak kullanılırlar ve fazla miktarlarda üretilip tüketilirler. Tıbbi uygulamalara bağlı olarak maruz kalındığı gibi, toplumun fitalatları vücuda almalarındaki en yaygın yolak genellikle diyet ve kozmetik bakım ürünleri yoluyla olmaktadır.

Molekül sayısında farklı sayıda alkol esteri bulundurması ve dallanma yapması sağlanarak farklı şekilde kullanımları için farklı fitalatlar üretilmiştir. En çok kullanılanları, yüksek molekül ağırlığına sahip olan di-(2-etilhekzil) fitalat (DEHP) ve daha düşük molekül ağırlıklı olan dibütilfitalattır (DBP). Yüksek etkinliği ve düşük maliyeti olması DEHP'in kullanımının diğer fitalatlardan daha çok olmasının temel nedenlerinden birisidir [202].

DEHP, çok yaygın kullanımda olup, örneğin tıbbi malzemelerde %30–40 oranında bulunmaktadır [203, 204]. Endüstride bu maddenin 1950 yıllarından

itibaren polivinil klorürün (PVC) üretilmesi için kullanılması tüketimini daha da artmıştır. Tüm dünyada yıllık DEHP üretimi yaklaşık iki milyon tondur [202]. Gündelik hayatta çok sık maruz kalınan fitalatlardan birinin DEHP olması, bu fitalat türünün etkisinin diğer fitalat türevlerine oranla daha çok oranda araştırılmasını da beraberinde getirmiştir.

Di-bütil fitalat (DBP), dünyada çok çeşitli alanlarda kullanımı olan, plastikleştirici olarak kullanılan bir fitalik asit esteridir. [205]. Su içerisindeki çözünürlüğünün az olduğu, yağda ise yüksek oranda çözüldüğü bilinmektedir. Çevre kirleticisi olarak kabul edilen DBP, içme sularından bebek mamalarına dek oldukça geniş bir alanda görülebilmektedir [206-209].

Son on yılda, diyabet insidansı dünya çapında belirgin bir şekilde artış göstermiştir [210]. Bu artış, endokrin bozulma kapasitesine sahip olduğu bilinen birkaç madde de dahil olmak üzere bir dizi sentetik kimyasal maddeye maruz kalma oranının artmasıyla paralellik göstermiştir [211]. Bu gerçekler, endokrin bozuculara maruz kalma ile diyabet artışı arasında olası bir ilişkinin olmasını da beraberinde getirmiştir [211].

Mono (2-etilhekzil) fitalat (MEHP), DEHP'in biyoaktif monoester metabolitidir ve idrarla atılır [212]. Toksikolojik açıdan, DEHP'in toksisitesine birçok organ sisteminde MEHP'in aracılık ettiği varsayılmaktadır [213]. MEHP, sıçanlarda DEHP'den 20 kat daha toksiktir [214]. MEHP, lipoprotein, glikoz ve amino asit metabolizması, yağ asidi oksidasyonu ve apoptozun düzenlenmesinde rol alan peroksizom proliferatör aktive edici reseptör-alfa (PPAR- $\alpha$ )'ya bağlanarak onu aktive edebilir [215]. PPAR'lar üzerinde zıt etkiye sahip olan farmasötik ilaçlar, insülin direncini azaltarak Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılır [216]. Diyabeti olan yetişkin kadınlarda, mono etil hekzil fitalat seviyesinin diyabetsiz olanlara göre daha yüksek olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [217]. Vücuda girdikten sonra, DBP'nin genellikle toksik metabolit olarak adlandırılan mono-bütil fitalat (MBP) oluşturmak üzere esterazlar tarafından hızla metabolize edildiği bilinmektedir.

Artan diyabet oranıyla paralel olarak artan fitalat kullanımı araştırmaların bu yöne kaymasına neden olmuştur. Ancak, asıl toksik etkinin nedeni olan metabolitlerin etkilerinin araştırıldığı yeterli sayıda kapsamlı bir çalışma

bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, günlük hayatta en çok karşılaşılan fitalatların metabolitleri MEHP ve MBP seçilmiş ve etkileri *in vitro* ve *in vivo* deneylerle araştırılarak, etkileri çok yönlü bir şekilde ortaya çıkartılmaya çalışılmıştır.

İlk olarak, sıçan kaynaklı INS-1  $\beta$  hücreleri, 5 farklı konsantrasyonda (0,001  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M) MEHP ve MBP metabolitlerine maruz bırakılmış ve 24, 48 ve 72 saat sonundaki etkileri MTT sitotoksosite testi ile araştırılmıştır. Metabolitler, DMSO içinde çözülerek hücrelere uygulanmıştır. Buna göre 24. saatin sonunda, 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M MEHP doz gruplarında hücre canlılığı, hem negatif hem de DMSO kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalmıştır. Buna göre, düşük dozdan yüksek doza doğru hücre canlılığında azalma görülmüş ve bu durum, maruz kalma süresinin artmasıyla paralel olarak azalmaya devam etmiştir. Diğer metabolit MBP uygulamasından sonra, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M doz gruplarında 24. saatin sonunda hücre canlılığında azalma görülmüştür. En yüksek doz olan 10  $\mu$ M MBP doz grubunda, 72. saatin sonunda hücre canlılığı diğer gruplara göre oldukça azalmıştır. DEHP'in rat insülinoma INS-1 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerini araştıran Sun ve ark. [218], bu hücreleri DEHP'nin 0, 5, 25, 125 ve 625  $\mu$ M konsantrasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakarak hücre canlılığı, reaktif oksijen türü (ROS) oluşumu, hücre sel antioksidan yanıt,  $Ca^{+2}$  homeostazisi, endoplazmik retikulum stresi ile ilişkili gen ve proteinlerin seviyelerini ölçmüşlerdir. Araştırmacılar DEHP'in INS-1 hücrelerinde insülin salınımını azalttığını ve doza bağımlı bir şekilde apoptozu arttırarak, hücre canlılığında azalma yaptığını belirlemişlerdir. Zhu ve ark. [219] DEHP'in hücre canlılığını dereceli olarak azalttığını ve 100  $\mu$ M konsantrasyonun üzerinde apoptotik hücre ölümünü arttırdığını bildirmişlerdir.

ROS, fizyolojik süreçlerin, metabolik ve diğer biyokimyasal reaksiyonların bir parçası olarak aerobik organizmaların canlı hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır. Bu endojen olarak üretilen ROS ve serbest oksijen radikalleri önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir, fakat reaktif özelliklerinden dolayı hücre sel membranların, proteinlerin ve DNA'nın lipidlerine oksidatif hasar verebilir [220,281].

Diyabetik bireyler ve deneysel hayvan modellerinde meydana gelen yüksek oksidatif stres ve serbest radikallerin artışından kaynaklanan azalan antioksidan savunmanın bu hastalığın patogenezinde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir [220].

INS-1  $\beta$  hücrelerinin 0,001  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M dozlarında MEHP ve MBP'e 24, 48 ve 72 saat maruz bırakılması sonrası total oksidan ve total antioksidan seviyeleri ölçülmüştür. Buna göre hücre canlılığı ölçümünde olduğu gibi doz ve maruz kalma süresi arttıkça total oksidan seviyesi artma, total antioksidan seviyesinde azalma tespit edilmiştir. 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M MEHP doz gruplarında, 48. ve 72. saatin sonunda, total antioksidan seviyesinde, negatif kontrol, DMSO ve 0,001  $\mu$ M gruplarına göre azalma görülmüştür. Total oksidan seviyesi, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M MBP doz gruplarında, 0,001  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, DMSO ve negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış göstermiştir. 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M MBP doz gruplarındaki antioksidan seviyesi ise 24, 48. ve 72. saatin sonunda diğer gruplara göre anlamlı şekilde azalmıştır. Buna göre MEHP ve MBP maruziyeti sonucunda artan oksidan seviyesi ve azalan antioksidan seviyesi, hücre canlılığı sonuçlarındaki doz artışına bağlı canlılığın azalmasının sebebi olabilir. Literatürde artan oksidatif stresin hücreleri apoptoza götürdüğü gösterilmiştir [221].

DEHP'e maruziyet sonrasında INS-1 hücrelerinde ROS oluşumunun yükseldiği, antioksidan savunmanın bozulduğu dolayısıyla oksidatif stresin uyarıldığı ifade edilmiştir [221].

MEHP uygulanan Kupffer hücreleri ve Leydig hücrelerinin serbest radikal ürettiği çalışmalarla gösterilmiştir [222,223]. Buna ilave olarak, Leydig hücrelerinde MEHP uygulaması yapıldıktan sonra, GSH ve askorbik asit seviyelerinde azalma, tioredoksin redüktaz ekspresyonunda azalma, glutatyon peroksidaz aktivitesinde azalma, DNA hasarında ve apoptoz oranında artış görüldüğü belirtilmektedir [224,225,226].

Ayrıca, başka bir in vitro çalışmada, MEHP'in 1  $\mu$ M dozda uygulanması sonrasında, steroid üretiminin azaldığı ve MA-10 Leydig hücrelerinde serbest oksijen radikallerinin oluşumunun arttığı gösterilmiştir [222].

Diğer bir çalışmada, peroksizom proliferatör aktivitesine sahip olan DEHP'in karaciğer hücrelerinde oksidan ve antioksidan arasındaki dengeyi bozarak oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, DEHP'in metaboliti olan MEHP'in, Kupffer hücrelerinde, doza bağımlı tarzda süperoksit anyon üretimini arttırdığı, bu da fitalatların doğrudan Kupffer hücrelerini aktive edebildiğini göstermektedir [227, 282].

Ayrıca, Mono bütül fitalatın (MBP) sıçan embriyonik kök hücrelerinde oksidatif strese neden olduğu öne sürülmüştür [228].

Çalışmamızda INS-1  $\beta$  hücrelerinin 0,001  $\mu\text{M}$ , 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarında MEHP ve MBP'e 24, 48 ve 72 saat maruz bırakılması sonrası bazal (5,5 glikoz mmol/L) ve yüksek (16,7 mmol/L) glikozla uyarılması sonucu insülin sekresyon ölçümleri yapılmıştır. Buna göre 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  MEHP doz uygulaması sonucunda, 3 zaman diliminde de 5,5 mmol/L glikoz içeren ortamda, 16,7 mmol/L glikoz içeren ortamda salgılanan insülin miktarıyla karşılaştırılınca azalma görülmüştür. 16,7 mmol/L glikoz içeren ortamda, 1  $\mu\text{M}$  MEHP uygulaması sonrası 3 saat diliminde de insülin miktarı 5,5 mmol/L glikoz içeren ortamdaki insüline göre artış göstermiştir. 0,001  $\mu\text{M}$  MEHP doz grubunda, 5,5 mmol/L glikoz içeren ortamdaki insülin miktarı kontrol grubuna azalma göstermiştir. 16,7 mmol/L glikoz içeren ortamda ise salgılanan insülin miktarı kontrol ve DMSO grubunda azalma göstermiştir fakat 5,5 mmol/glikoz içeren ortamdaki MEHP uygulamasıyla karşılaştırıldığında artan glikoza bağlı olarak artış göstermiştir. 5,5 mmol/L glikoz içeren ortamda, 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  MBP doz uygulaması yapılan gruplarda, 24, 48 ve 72. saatin sonunda yapılan ölçümlerde insülin miktarında 0,001  $\mu\text{M}$  ve 0,01  $\mu\text{M}$  doz gruplarına göre anlamlı bir azalma görülmüştür. 16,7 glikoz mmol/L glikoz içeren ortamdaki insülin miktarıyla karşılaştırıldığında, artan glikoza bağlı olarak artış görülmüştür. Yan ve ark., [221] MEHP maruziyeti sonucu INS-1 hücrelerinde artan oksidatif stres sonucunda hasar meydana geldiğini ve bu hasarın insülin sentezini azalttığını göstermişlerdir. Oksidatif stres pankreatik hasarla sonuçlanabilir ve özellikle pankreas adacıklarında beta hücrelerinin disfonksiyonuna ve insülin düzeylerinde azalmaya neden olarak, glikoz-insülin etkileşimini olumsuz etkileyebilir [229]. Çalışmamızda bulunan doz gruplarındaki oksidatif stres

parametrelerinin incelenmesi sonucunda, oksidatif stresin arttığı gruplarda, insülin miktarında azalma görülmüştür.

Çalışmamızda, INS-1 beta hücrelerinde, hücrelerin proliferasyonu, fonksiyonu ve apoptozu ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri, MEHP ve MBP uygulamasından sonra ölçülmüştür.

FOXO-1, glikoz-6-fosfataz [230] gibi glikoz metabolizmasında yer alan çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenler [231]. Ek olarak, adiposit farklılaşmasında [232] ve pankreatik  $\beta$  hücre büyümesi ve glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol alır [233]. Hücrelerin protein ve genomik bütünlüğünü bozan ROS birikimini engelleyen FOXO'lar bu fonksiyonları sayesinde hücrelerin korunmasına yardım etmektedir. FOXO transkripsiyon faktörleri birçok hücre tipinde oksidatif stres direnci ile ilişkili çeşitli genleri düzenlemektedir [234]. FOXO transkripsiyon faktörleri beta hücrelerinin devamlılığını sağlar ve oksidatif stresin en aza indirgenmesine yardım eder Morshead ve diğ., [235] Kippin ve diğ., [236]. Zhang ve ark., [237] FOXO-1'in beta hücre fonksiyonunu beta hücre kütlelerini ve antioksidan savunmayı artırarak desteklediğini göstermişlerdir. 0,001  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M MEHP doz uygulamasından sonra 24. saatin sonunda, FOXO-1 geninin, 1  $\mu$ M doz grubunda 1,21 kat, 10  $\mu$ M doz grubunda 1,25 kat oranında ekspresyonu baskılanmıştır. Ekspresyonun baskılanmasındaki bu artış, diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. MBP uygulamasından sonra 24. saatin sonunda 1  $\mu$ M doz grubunda 0,87 kat, 10  $\mu$ M doz grubunda 0,99 kat oranında ekspresyonu baskılanmıştır. 48 ve 72 saat süren maruziyet sonrası sonuçlara bakacak olursak, 48 saatin sonunda, 0,1  $\mu$ M MEHP uygulaması 0,63, 1  $\mu$ M MEHP 1,03 ve 10  $\mu$ M MEHP 1,25 kat gen ekspresyonunda baskılama yapmıştır. 0,1  $\mu$ M MBP uygulaması 0,55, 1  $\mu$ M MBP 1,11 ve 10  $\mu$ M MBP ise 1,25 kat oranında gende baskılama yapmıştır. FOXO-1 geni hücrenin hayatta kalması ve oksidatif stresin azaltılmasında görev aldığından dolayı, uygulamadan sonra ekspresyonunun azalması bu görevini yerine getirmesinde azalmanın ortaya çıkmasına neden olmuştur.

PDX-1 pankreas gelişiminde ve  $\beta$ -hücre fonksiyonunda önemli bir rol oynar. İnsülin gen ekspresyonu üzerinde etkili olmasının yanı sıra beta hücre yaşam



süresini ve endoplazmik retikulum stresine karşı beta hücre direncini belirler [238,239]. 24. saatin sonunda yapılan ölçümlerde 1 µM MEHP 1,19 kat olarak ve 10 µM MEHP 1,52 kat ekspresyon oranında azalmaya neden olmuştur. MBP ise 24 saatin sonunda, 10 µM doz uygulamasında, 2,50 kat azalmaya neden olup diğer dozlara göre önemli bir farklılık göstermiştir. Farelerle yapılan bir çalışmada, PDX-1 geninin β-hücrelerdeki ifadesinin birlikte azalması, diyabet gelişimine yol açmış, insülin sentezi ve GLUT2 ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur [240]. PDX1'in inaktif hale gelmesi beta hücre fonksiyonunda azalma ile sonuçlanmıştır [240]. SIRT-1 geni, hücrede mitokondrinin düzgün çalışması ve yağ asidi oksidasyonunun düzenlenmesinde ve pankreatik insülin salınımının ayarlanmasında önemli rol oynar. Ayrıca deasetilasyon ile p53'ün inaktive edilmesi hücreleri apoptozdan korur [241]. Yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda karaciğerde SIRT1 ekspresyonunun azaltılmasının karaciğerde inflamasyonu ve endoplazmik retikulum stresini arttırdığı, yağlanmaya sebep olarak vücut ağırlığının artışı hızlandırdığı gösterilmiştir [242]. SIRT1 geninin aşırı uyarılmasıyla insülin sekresyonunu artırdığı ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında glikoz toleransını ilerlettiği tespit edilmiştir [243]. Buna karşın Sirt-1<sup>-/-</sup> sıçanlarda insülin sekresyonu bozulmuştur [244]. Çalışmamızda, 0,001 µM MEHP uygulaması 0,54 kat, 0,01 µM MEHP uygulaması 0,77 kat, 0,1 µM MEHP uygulaması 1,14, 1 µM MEHP uygulaması ise 1,65 ve 10 µM MEHP uygulaması ise 1,80 kat oranında SIRT-1 geninin ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur. 48 ve 72 saat sonunda yapılan ölçümlerde de, aynı şekilde yüksek dozlarda ekspresyon oranları daha fazla azalmıştır. MBP uygulaması yapılan INS-β hücrelerinde yapılan mRNA ölçümlerinde, her 3 zaman diliminde de istatistiksel olarak azalma görülmüştür.

Sıçanlarda insülini kodlayan iki gen bulunmaktadır. Kromozom 19'da insülin 1 (INS-1) ve kromozom 7'de insülin 2 (INS-2) bulunmaktadır [245]. MEHP ve MBP uygulaması yapılan INS-1 β hücrelerinde, bu iki gen bölgesinin ekspresyonu ölçülmüş ve kontrol grubuna göre azalma tespit edilmiştir. Hücre kültüründe yaptığımız insülin ölçümlerindeki azalmanın sebebi, bu genlerdeki ifadenin azalmasından kaynaklanıyor olabilir.

P53 geni, hücre siklusunda önemli bir rol oynar ve transkripsiyon faktörü olarak görev almaktadır [246]. DNA hasarı, hipoksi, oksidatif stres, onkogen

aktivasyonu, gibi hücrel stres sinyalleri sonrasında p53 aktive olmaktadır. [247]. Çok hücreli canlılarda gelişim ve doku homeostazisinin korunması açısından apoptos büyük önem taşımaktadır. P53 geni, DNA hasarından sonra aktive olup, mitokondrinin dış membranında bulunan Bax isimli proapoptotik proteinin transkripsiyonunu aktive etmekte, mitokondriden sitokrom-c'nin çıkışına ve apoptotik sürecin başlamasına yol açmaktadır [248]. Aktive olan p53, hücre üzerinde hücre döngüsünün duraklamasına ve apoptoz şeklinde iki farklı etkiye neden olmaktadır. DNA hasarı meydana geldiğinde bu etkilerden hangisinin meydana geleceği hasarın düzeyine bağlı olup hasar hafifse düzeltilmesine zaman tanımak için döngü duraklatılmakta, fazlaysa apoptoza gidilerek olası bir onkogenetik sürecin önüne geçilmektedir. Hasar düzeltilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas ifadesini arttırmakta, Bcl-2 ve Bcl-xL ifadesini baskılayıp ve apoptozu başlatmaktadır [249]. Çalışmamızda, p53 geni MEHP ve MBP uygulamalarından sonra fazla eksprese edilmeye başlanmıştır. Bu sonuçlarla birlikte ölçümünü yaptığımız oksidanların hücrede arttığının görülmesi ve hücre canlılığında bir azalma olması nedeniyle hücrede bir hasarın varlığı düşünülmüş ve apoptoza bir gidiş olup olmadığını anlamak için BCL-2 ve BCL-XL genlerinin de analizi yapılmıştır.

BCL-2 ailesi birbirine zıt 2 gruptan oluşmaktadır. Bad, Bax, Bid, Bcl-Xs, Bak, Bim, Puma ve Noxa proapoptotik üyeler olup, sitozolde yer alırlar. Sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) oranını artırarak apoptozu başlatırlar. Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 ise antiapoptotik üyelerdir ve mitokondriyon dış membranında, endoplazmik retikulumda ve çekirdek zarında yer alırlar. Hücredeki kalsiyum oranını kontrol edip, iyon transportunda görev alırlar. AIF ve sitokrom-c salınımını kaspazların öncü formlarıyla bloke ederek apoptoza engel olurlar [250, 251, 252]. Antiapoptotik üyelerden Bcl-2 ve Bcl-XL geninin ekspresyon düzeylerine bakıldığında kontrol gruplarına göre uygulama gruplarında azaldığı görülmüş ve hücrelerin apoptoza yöneldiği düşünülmüştür. Hücre canlılığında gördüğümüz azalmanın apoptozdan dolayı olduğu düşünülmüş ve bu yüzden insülin miktarında da azalış olduğu kanısına varılmıştır. Oksidatif stres, mitokondriyal zardaki Bcl-2 ailesinin proapoptotik ve antiapoptotik üyeleri arasındaki ilişkiyi değiştirir [253] sitokrom C'nin salınmasına izin verir ve bir kaspaz kaskadının aktivasyonu ile bir hücrenin DNA'sının parçalanmasını

indükler [254]. Sonuçlarımızda görülen antioksidan/oksidan dengesinin bozulması ve oksidan oranının artması da bu genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişikliği açıklamaktadır.

MEHP ile yapılan bir çalışmada, kaspaz-3 mRNA seviyelerinin önemli bir şekilde yükseldiği, öte yandan Bcl-2 mRNA seviyesinin azaldığı ifade edilmiştir [221].

Da Peng ve arkadaşları [255] yaptıkları bir çalışmada Di bütil fitalatın (DBP) metaboliti olan mono bütil fitalatın [MBP] implantasyon öncesi embriyolardaki etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında  $10^{-3}$ M MBP'ye maruz kalan embriyolarda reaktif oksijen türlerinin arttığı, DNA metilasyonunun azaldığı ve sitokrom-c yolağı üzerinden gerçekleşen apoptozun önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir.

MEHP, hem de MBP uygulama gruplarının tümünde vücut ağırlıkları, yem tüketimine bağlı olarak artmıştır fakat artış yüzdesine bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Uygulama sonunda uygulama gruplarında su tüketiminin arttığı görülmüş ama istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Deney sonunda sıçanların gerçek ve relatif organ ağırlıkları arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. 100, 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP ve MBP gruplarında karaciğer ağırlıklarında yağ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olmuştur. Fitalatların karaciğer üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu ortaya koyman çalışmalar bulunmaktadır. MEHP, DEHP'in toksik metaboliti olup bağırsak, karaciğer, böbrekler, akciğerler ve pankreasta hidrolizi ile oluşmaktadır. MEHP'in kemirgen karaciğerinde kanserojen etkiye neden olduğu belirtilmiştir [256].Yapılan diğer çalışmada ise yüksek seviyelerde MEHP maruziyetinin apoptozu arttırdığı ileri sürülmüştür [257]. MEHP'e maruz bırakılan sıçanların karaciğer ağırlıklarının hiç maruz kalmayan gruba göre artış gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca maruz kalan sıçanlarda artan alkalik fosfataz (ALP) ve glutamik piruvik transaminaz (GPT) enzim konsantrasyonları ile karaciğer fonksiyon bozukluğu tespit edilmiştir ([226]. DBP, bir peroksizom arttırıcısı olduğundan hepatosit çoğalmasına bağlı olarak karaciğer büyümesi yaptığı, kanda trigliserit seviyesini düşürdüğü, kilo artışına yol açabildiği, birçok

enzimi ve enzimatik yolların uyarımını gerçekleştirdiği bilinmektedir. Oral yolla 3 ay süresince metaboliti olan MBP uygulanmasının ardından karaciğer ağırlığının arttığı, karaciğer sitokrom P450 enzim sisteminin çalışmasında artışa neden olduğu saptanmıştır [258]. Böbrek ağırlıkları açısından gruplar arasında bir fark bulunamamıştır. Pankreas ağırlıklarına bakıldığında 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP ve 400 mg/kg/gün MBP doz gruplarında yağ kontrole göre istatistiksel olarak azalma olmuştur.

Hematolojik analizler incelendiğinde, lökosit, lenfosit, monosit, nötrofil, eritrosit, MCV, hematokrit, MCH, MCHC, hemoglobin, trombosit ve Pct gibi önemli parametreler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Hematolojik parametrelerde incelenen bütün gruplarda 400 mg/kg/gün MEHP uygulama grubunda lökosit miktarının arttığı görülmüştür. Bu da bize vücuttaki herhangi bir enfeksiyona karşı savunma sistemini oluşturan hücrelerin miktarının arttığını göstermektedir. Düşük lökosit oranı bağışıklık sisteminin zayıfladığına dair bir işarettir ve bunun nedeni bağışıklık sistemini baskılayan hastalıklar veya ilaçlar olabilir.

Monositler vücutta bulunan en büyük beyaz kan hücreleridir. Aynı zamanda kemik iliği tarafından üretilen akyuvarlardır. Monosit miktarının azalması vücut direncinin düşmesi demektir. Kansızlık ve B12 değerlerinin düşmesi, monosit değerlerinde düşmeye neden olabilir. Monosit değeri, 400 mg/kg/gün MEHP doz grubunda istatistiksel olarak yağ kontrol ve diğer doz gruplarına göre azalmıştır.

MCV'nin kandaki değerinin artmış olması, büyük hacimli eritrositlerin varlığını göstermektedir. Diğer sebepler ise, B12 eksikliği, folik asit eksikliği, akciğer rahatsızlıkları, bazı karaciğer hastalıkları ve ağır alkol kullanımınıdır. 400 mg/kg/gün MEHP ve 400 mg/kg/gün MBP doz gruplarında MCV seviyesi yağ kontrol ve diğer doz gruplarına göre artış göstermiştir.

Hemoglobin, alyuvarlarda bulunan ve demir bakımından zengin olan bir proteindir. Oksijen kanda hemoglobine bağlanarak vücuttaki dokulara taşınır. Hemoglobin düşüklüğü nedenleri arasında folik asit, demir ve B12 vitamin eksikliği ile anemi, kan kaybı, böbrek rahatsızlığı yer almaktadır. 400 mg/kg/gün MEHP ve 400 mg/kg/gün MBP doz gruplarında hemoglobin miktarında azalma olmuştur. Diyabet hastalarında kanda Hba1C denilen glikolize hemoglobin

miktarında artma görülmektedir. Kanda glikozun artması sonucu hemoglobin glikozla birleşmekte ve normal hemoglobin miktarında azalma görülmektedir. Bizim çalışmamızdaki sonuçlarda bu bulgularla örtüşmektedir. İnsülin hormonu sonuçlarına göre, MEHP uygulama gruplarından 100, 200 ve 400 mg/kg/gün doz gruplarında, MBP uygulama gruplarında ise 200 ve 400 mg/kg/gün doz gruplarında yağ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalma görülmüştür. Kısa süreli DEHP uygulanan sıçanların kanlarında insülin ve kortizolün azaldığı ve kan şekerinin arttığı görülmüştür [259]. İnsülin eksikliği pankreatik  $\beta$ -hücre disfonksiyonu ve kitlesindeki azalmayla ilişkilidir [260].  $\beta$  hücre disfonksiyonu sırasıyla glukotoksisite ve lipotoksisite olarak adlandırılan kronik hiperglisemi ve/veya hiperlipidemiden kaynaklanmaktadır [261]. Tek başına 50 mg/kg/gün DBP uygulanan bir çalışmada, insülin sekresyonunda belirgin bir azalma görülmüştür [262]. Önceki çalışmalarda da DEHP maruziyetinin farelerde serum insülin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir [263]. Tip 1 diyabet, insülin üreten beta hücrelerine zarar veren otoimmün süreçlere bağlı olarak insülin eksikliğiyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Otoantikor testleri, tip 1 diyabet ile ilişkisi olan otoantikorların varlığını saptayan testler grubudur. Hastaların %70-90'ında, adacık hücrelerine karşı oluşmuş oto antikorlar ve [264,265]. insüline karşı antikorlar bulunmaktadır [266,267]. Buna göre çalışmamızda, insülin antikor ve adacık hücre antikor hem MEHP, hem MBP gruplarında taranmış fakat sonuç bütün gruplarda negatif çıkmıştır. Buna göre insülin miktarında olan azalmanın sebebi, langerhans adacıklarına zarar veren immün sistemin oluşturduğu otoantikorlar değildir. Bu da bize uyguladığımız fitalatların langerhans adacıkları üzerindeki negatif etkisinden dolayı olduğunu düşündürmüştür.

Alanin aminotransferaz (ALT), bir enzim olup esas olarak karaciğerde, az miktarlarda ise böbrek ve diğer organlarda bulunmaktadır. Aynı zamanda serum glutamik piruvik transaminaz (SGPT) olarak da adlandırılırlar. Besinlerle birlikte vücuda alınarak sindirime uğradıktan sonra karaciğere ulaşan besin öğelerinin enerjiye çevrilmesinde görev yaparlar [268]. Normal şartlarda bu enzim karaciğer hücrelerinin içerisinde yer almakta, kan dolaşımında ise ölen karaciğer hücrelerinden kaynaklı olarak eser miktarda bulunmaktadır. Kandaki ALT seviyesinin normalin üzerinde olması, karaciğer hasarının bir göstergesidir, sağlıklı, dengesiz ve aşırı yağlı beslenme, karaciğer yağlanması gibi

durumlardan kaynaklı olarak ortaya çıkabilir. Aspartat transaminaz (AST), hücrenin sitoplazmasında ve kalpte, karaciğerde ve iskelet kas dokusunda bulunmaktadır. AST değerinin yüksekliğinin ana sebebi olarak karaciğerin hasar görmesi veya fazla toksik madde etkisi altında kalmış olması düşünülmektedir [269]. 100, 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP ve 100 mg/kg/gün MBP uygulama gruplarında ALT ve AST seviyeleri yağ kontrol ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak artış göstermiştir. Bu sonuçlar histopatolojik incelemelerde ortaya çıkan sonuçlar ile birbirini desteklemektedir.

Trigliseritler insanda depo yağın en büyük bileşenidir ve büyük oranda karaciğerde sentezlenir. Trigliseridlerin kandaki oranının artması diğer lipoprotein seviyelerinde de anormalliklere ve koroner kalp rahatsızlıkları gibi hastalıklara neden olabilmektedir. Glikoz, hücrelerin normal işlevi için gereklidir. Ölçümleri Tip 1 ve Tip-2 diyabetin tanısında, neonatal hipoglisemi ve pankreatik adacık hücre karsinoma teşhisinde kullanılırlar. Çalışmamızda, 50, 100, 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP ve 100, 200 ve 400 mg/kg/gün MBP doz gruplarında trigliserit miktarında istatistiksel olarak anlamlı artış olmuştur. 50, 100, 200 ve 400 mg/kg/gün MBP doz gruplarında ve 100, 200, 400 mg/kg/gün MEHP doz gruplarında glikoz miktarında artış görülmüştür. Hiperglisemi, serbest radikaller yoluyla proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonu ile aşırı miktarda radikallerin üretimine yol açar, bu şekilde hücre fonksiyonları üzerinde zararlı etkiler yapar ve onları oksidatif strese karşı savunmasız hale getirir. Hiperglisemi aynı zamanda antioksidan enzim savunmasını da bozarak serbest radikallerin hücrelere ve dokulara zarar vermesini tetikler. Oksidatif stres, serbest radikallerin antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilememesi durumunda vücutta biriken hasar ile ilişkili olarak GSH, SOD ve katalaz gibi antioksidan enzim aktivitelerindeki azalma ile şiddeti artmaktadır.

$\beta$  hücre disfonksiyonu, kandaki yüksek glikoz sonucu oluşabilir [261]. Kandaki yüksek glikoz ile artan serbest oksijen radikalleri,  $\beta$ -hücre apoptozunu indükler, hücresel yaşlanmayı hızlandırır ve diyabete öncülük eder [261,270]. Çalışmamızdan elde edilen bulgularımıza göre kandaki glikoz oranı, doza bağlı olarak artış göstermekte, insülin hormonu ise azalmaktadır. Bunun nedenini artan glikoz nedeniyle beta hücrelerinde hasar oluşmasına ve insülin hormonunda azalmanın meydana gelmesini de buna bağlayabiliriz.

İnsülin, trigliseritlerin adipoz ve kas dokularında hücre alımını arttırmak suretiyle plazma yağ asit seviyelerini düşürerek yağ metabolizmasına katılırlar [271]. Plazma serbest yağ asidi miktarının artması insülin direnci patofizyolojisinde önemli bir role üstlenir [272]. Artan serbest yağ asidi miktarı kaspaz 3 aktivasyonuna, DNA fragmantasyonuna ve sitokrom-c salınmasına yol açarak beta hücre apoptozuna neden olmaktadır [273]. Tip 2 diyabet gelişiminde beta hücre fonksiyon kaybının ilk fazında glikoza olan tolerans azalmakta, ikinci fazda ise insülin sekresyonu azalmaktadır [274]. Bizim çalışmamızda trigliserit oranının artması, literatürde gösterildiği gibi insülin seviyesinin düşmesinden kaynaklanıyor olabilir.

DEHP'e maruz kalma, insülin sinyal iletimini azaltıp, iskelet kası ve yağ dokusunun plazma membranında glikoz taşıyıcı 4 (GLUT4) reseptörü sayısını düşürmektedir [275]. Ayrıca, MEHP'in hücre lipit metabolizması üzerinde negatif etki yapmadığı gösterilmiştir [276,277]. Total protein, serum proteinleri özellikle karaciğerde, plazma hücrelerinde, lenf nodlarında, dalakta ve kemik iliğinde sentezlenir. Kan kaybında, nefrotik sendromda ve tuz tutma sendromunda düşük çıkmaktadır. Albümin, insan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasında bulunan en yaygın proteindir. Kanda bulunan proteinlerin % 60'ını oluşturur. Ayrıca, doku sıvılarında, özellikle kas ve deride, az miktarda gözyaşı, ter, mide suları ve safrada da bulunur. Yağ asitleri ve çeşitli başka maddeleri kanda taşımalarının yanı sıra en önemli işlevi, kan ile doku sıvıları arasında suyun dengelenmesini sağlamaktır. Total protein, albümin ile birlikte tanılarda ve tedavilerde kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda, total protein ve albümin, 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP doz gruplarında istatistiksel olarak azalma göstermiştir. Aynı şekilde 200 ve 400 mg/kg/gün MBP doz gruplarında da azalmıştır. Total protein miktarının azalması, karaciğerdeki hasardan kaynaklanıyor olabilir. Moore ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 500 mg/kg/gün DEHP'in 17 hafta boyunca sıçanlara uygulanması sonucu hemoglobin miktarında ve albumin miktarında azalma görülmüştür [278]. Albümin seviyelerindeki artış veya azalış, vücuda protein alımı, yeterli veya yetersiz protein sindirimi veya protein absorpsiyonunda bir bozukluk ya da hastalığın sonucu olabilmektedir. Serum albümin seviyesindeki değişiklikler karaciğer hastalıkları için bir belirteç olarak kullanılmaktadır [279]. Bizim

bulgularımızda da albümin miktarında azalma görülmüştür. Bu da total protein miktarındaki azalmayla birlikte karaciğer hasarını gösteriyor olabilir.

Kreatin, vücutta; böbrekte, karaciğerde ve pankreasta sentezlenir. Biosentezden sonra iskelet kaslarına, kalbe, beyne ve diğer dokulara taşınır. Kreatin bu dokularda en büyük enerji depolayıcı form olan kreatin fosfat halinde metabolize olur ve böbrekler aracılığıyla vücuttan uzaklaştırılır [280]. Kan kreatin düzeyindeki artış, böbrek hasarının göstergesidir. Çalışmamızdaki gruplarda sadece 400 mg/kg/gün MBP fitalat doz grubunda yağ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir azalma olmuştur. Bunun böbrekteki hasardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer doz gruplarında böyle bir anlamlı azalmanın görülmemesinin sebebini, çoğu hayvanda, böbrek fonksiyonunun %50-75'i kaybolana kadar serum kreatinin seviyelerinin referans aralığında kalmasından dolayı olabileceği düşünülebilir.

Üre, idrardaki azotlu bileşiğin çoğunluğunu oluşturmaktadır ve protein metabolizmasının son ürünüdür. Ürenin sentezlendiği yer karaciğer olsa da oluşan atık madde böbrekler tarafından süzülerek idrarla vücuttan atılır. Eğer üre, böbrekler tarafından yeterince süzülemez ve atılamazsa kandaki miktarı artar ve vücut için toksik etki yapar [280]. Çalışmamızda, üre miktarı 400 mg/kg/gün MEHP ve MBP doz gruplarında diğer gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma göstermiştir. Böbrek dokusunda meydana gelen hasar sonucu üre miktarının yükselmesi beklenirken bizim bulgumuzda düşmesi, ürenin üretildiği yer olan karaciğerdeki hasardan kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Histopatolojik incelemelerde, karaciğer dokusunda, 100, 200 ve 400 mg/kg/gün MEHP doz gruplarında sinüzoidal dejenerasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu görülmüş ve bu sonuçlar yağ kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. Ayrıca 100 ve 400 mg/kg/gün MEHP doz gruplarında konjesyon görülmüş ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 200 mg/kg/gün MEHP doz grubunda görülen sitoplazmik erime, diğer gruplara göre artmıştır. 200 ve 400 mg/kg/gün MBP doz gruplarında mononükleer hücre infiltrasyonu görülmüştür. Ayrıca 400 mg/kg/gün MBP doz grubunda görülen sinüzoidal dejenerasyon ve konjesyon, diğer gruplardan farklı olarak artış



göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Fitalatlar peroksizom proliferatör aktivasyonuna sebep olarak lizozomal aktiviteyi arttırdığı ve buna bağlı olarak serumda ALT ve AST enzimlerinin arttığı bilinmektedir. Karaciğerde görülen hasar, bu durumdan kaynaklanıyor olabilir. Böbrek dokusunda ise, 400 mg/kg/gün MEHP grubunda glomerulus dejenerasyonu ve konjesyon görülmüştür. 100, 200 ve 400 mg/kg/gün MBP doz gruplarında ise konjesyon görülmüş ve diğer gruplardan anlamlı bulunmuştur. 200 ve 400 mg/kg/gün MBP doz gruplarında ise glomerulus dejenerasyonu görülmüştür. Pankreas dokusunda ise 100, 200 ve 400 MBP ile 100, 200 ve 400 MEHP doz gruplarında langerhans adacıklarında dejenerasyon görülmüştür. 200 mg/kg/gün MBP doz grubunda ise konjesyon görülmüş ve anlamlı bulunmuştur. Bu durum MEHP ve MBP'a maruziyet sonrası beta hücre kaybını göstermektedir. Yapılan incelemeler sonucu ortaya çıkan bulgular biyokimyasal bulgularımızla ve insülin hormonu ölçüm sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda günlük hayatta yoğun olarak kullanılan ve maruz kalınan fitalatlar olan DEHP ve DBP'nin metabolitleri olan MEHP ve MBP'nin diyabetik etkileri in vitro olarak INS-1 pankreatik  $\beta$  hücrelerinde, in vivo olarak sıçanlarda incelenmiştir. Sonuçlara genel olarak bakıldığında in vitro deneylerde hücre canlılığında azalma, oksidatif strese artış, insülin miktarında azalma tespit edilmiştir. In vivo deneylerin sonuçlarında ise, bu bulgulara paralel olarak insülin hormonu miktarında azalma saptanmıştır. Pankreas, karaciğer ve böbrek dokularında histopatolojik olarak önemli bulgular elde edilmiştir. Bu fitalat metabolitleriyle ilgili bu dozda ve sürede in vitro bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Ayrıca son zamanlarda yapılan çok sayıdaki çalışmanın içinde, pubertal dönemdeki sıçanlarda histopatoloji ile birlikte bu kapsamda, hormonal, biyokimyasal ve hematolojik analizlerin yapıp metabolitlerin etkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu anlamda literatüre büyük bir katkı sağlanmıştır. İlerde başka hücre tipleriyle ve hayvanlarla yapılacak kronik çalışmalarla metabolitlerin farklı etkilerinin olup olmadığı araştırılabilir.

## 6. SONUÇ

1) DEHP ve DBP, gündelik hayatta en çok kullanılan ftalatların başında gelmektedir. Yapılan çalışmalarda metabolitleri MEHP ve MBP'in ana maddeden daha toksik olduğu ileri sürülmüştür. Bu tez çalışması, artan ftalat kullanım miktarı ile toplumda diyabet görülme sıklığı arasında bir ilişkinin olup olmadığını göstermek amacıyla planlanmıştır. Bu nedenle bu metabolitlerin pankreatik beta hücreleri (INS-1) üzerinde in vitro yöntemlerle ve sıçanlar üzerindeki etkisi in vivo yöntemlerle araştırılmıştır. In vitro olarak yapılan deneylerde, hem MEHP, hem de MBP maruziyetin INS-1 hücrelerinin canlılığında azalma, insülin hormonunda azalma, oksidatif stresin artması sonucu apoptozun görülmesi sonuçlarına ulaşılmıştır. In vivo olarak yapılan deneylerde ise in vitro deneylere paralel şekilde insülin hormonunda azalma, pankreas, karaciğer ve böbrek dokularında histopatolojik bulgular görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre DEHP metaboliti olan MEHP'in, DBP metaboliti olan MBP'e göre daha toksik ve diyabetik etkilerinin daha fazla olduğu görülmüştür.

2) Diyabet, pankreasın  $\beta$  hücrelerinden salgılanan insülin hormonunun sekresyonundaki yetersizlikten ya da insülinin perifer dokularda etkisinin azalmasından ileri gelen, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmalarında bozukluklara yol açan, hemen hemen tüm sistemlerde komplikasyonlara neden olan ve kronik hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Diyabetin görülme sıklığı yaş ilerledikçe artmaktadır. Günümüzde de önemli bir metabolizma hastalığı ve sağlık sorunu olarak birçok ülkede ölümlere neden olan ilk beş hastalık içerisinde yer almaktadır. Bu durum iş gücü ve refah kaybı ile sağlık-sosyal giderlerde artışa neden olarak ekonomik ve sosyolojik yönden ülkenin gelişmesinde önleyici rol oynamaktadır. Yapılmış olan bu çalışma ile sıklıkla kullanılan ftalatların toksik etkisine neden olan mekanizmalar çeşitli analizler ile gösterilmiş, ortaya çıkan sonuçlar ile literatüre katkı sağlanmıştır. Bu kapsamda, toplumun günlük hayatında karşılaştığı bu maddelere maruziyeti azaltmak, çalışma sonuçlarının ilgili kurum ve kuruluşlara aktarılarak gerekli önlemlerin alınmasını sağlamak ve aynı zamanda bahse konu kimyasalların kullanımının ilgili otoriteler tarafından denetim altına alınması hedeflenmektedir.

3) Sonuç olarak, diyabetin patogeneğinde görülen beta hücre kaybındaki artışta oksidatif stresin rolünün açık olduğu görülmektedir. Bu bağlamda fitalat maruziyetinin beta hücrelerinde apoptozla hücre kaybında oldukça etkili bir mekanizmaya sahip olduğu görülmüştür. Devamında insülin eksikliğine bağlı hipergliseminin gelişimine etken olabilir. Ayrıca insülin salıverilmesini de azaltarak hipergliseminin devamlılığına katkıda bulunabilir. Çalışmamızın sonuçlarına göre farklı yaklaşımlar göz önüne alınarak beta hücre kaybı engellenip diyabetin seyri olumlu yönde değiştirilebilir. Bununla birlikte, test edilen dozlardaki sonuçlara göre maruz kalınan fitalat seviyesinin güvenli bir aralıkta tutulması sağlanarak, olumsuz sonuçların önüne geçilebilir. Bu şekilde sıkça kullanılan bu plastikleştiricilerin belirli dozlarda gösterdiği etkilerin belirlenmesiyle, çeşitli ürünlerdeki miktarlarının azaltılması veya kaldırılması, ya da yerine kullanılacak alternatif malzemelerin üretilmesi için yol gösterecektir.

## 7.KAYNAKLAR

- [1] S.G. Howard, D.H. Lee, What is the role of human contamination by environmental chemicals in the development of type 1 diabetes?, *Journal of Epidemiology and Community Health*, 66 (2012) 479-481.
- [2] M. Holger, A.M. Calafat, Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364 (2009) 2063-2078.
- [3] M. Wormuth, M. Scheringer, M. Vollenweider, K. Hungerbühler, What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans?, *Risk Analysis*, 26 (2006) 803–824.
- [4] P.M. Lind, B. Zethelius, L. Lind, Circulating levels of phthalate metabolites are associated with prevalent diabetes in the elderly, *Diabetes Care*, 35 (2012) 1519-1524.
- [5] L. Olsén, L. Lind, P.M. Lind, Associations between circulating levels of bisphenol A and phthalate metabolites and coronary risk in the elderly, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80 (2012) 179-183.
- [6] J.D. Meeker, S. Sathyanarayana and S.H. Swan, Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes, *Phil. Trans. R. Soc.* (2009) B3642097–2113.
- [7] U. Heudorf, V. Mersch-Sundermann, J. Angerer, Phthalates: Toxicology and exposure, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210 (2007) 623–634.
- [8] K. Svensson, R.U. Hernandez-Ramirez, A. Burguete-Garcia, M.E. Cebrian, A.M. Calafat, L.L. Needham, L. Claudio, L. Lopez-Carrillo, Phthalate exposure associated with self-reported diabetes among Mexican women, *Environmental Research*, 111, (2011) 792-796.
- [9] C.G. Bornehag, and E. Nanberg, Phthalate exposure and asthma in children, *International Journal of Andrology*, 33 (2010) 333-345.

- [10] T. James-Todd, R. Stahlhut, J.D. Meeker, S.G. Powell, R. Hauser, T. Huang, J. Rich- Edwards, Urinary phthalate metabolite concentrations and diabetes among women in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001-2008, *Environmental Health Perspectives*, 120 (2012) 1307-1313.
- [11] J.A. Mclachlan, Environmental Signaling: What embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals, *Endocrine Reviews*, 22 (2001) 319-341.
- [12] T.E. Stoker, L. G. Parks, L.E. Gray, R.L. Cooper, Endocrine-disrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee, Critical Reviews in Toxicology*, 30 2000 197–252.
- [13] M. M. Lee, Endocrine Disrupters, A Current Review of Pediatric Endocrinology, (2007) 109-118.
- [14] W. R. Kelce, E. M. Wilson, Antiandrogenic Effects of Environmental Endocrine Disruptors. In: Metzler M (ed). *The Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2001) 39-61.
- [15] T. Colborn, F. S. Vom Saal, A. M. Soto, Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environmental Health Perspectives*, 101 (1993) 378-84.
- [16] T. D. Nebesio, O. H. Pescovitz, Part VII: Environmental effects on puberty. The role of endocrine disruptors in pubertal development. In: Walvoord EC, Pescovitz OH, (eds). *When Puberty is Precocious: Scientific and Clinical Aspects*, New Jersey: Humana Press, (2007) 425-442.
- [17] H. Frederiksen, N. E. Skakkebaek, A. M. Andersson, Metabolism of phthalates in humans, *Molecular Nutrition and Food Research*, 51 (2007) 899-911.

- [18] J.M. Goldman, S.C. Laws, S.K. Balchak, R.L. Cooper, R.J. Kavlock, Endocrine-disrupting chemicals: pre-pubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations, *Critical Reviews in Toxicology*, 30 (2000) 135-196.
- [19] R. Bigsby, R. E. Chapin, G. P. Daston, Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development, *Environmental Health Perspectives*, 107 (1999) 613-618.
- [20] J. Dötsch, H.G. Dörr, L. Wildt, Exposure to Endogenous Estrogens During Lifetime. In: Metzler M (ed). *The Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2001) 81-99.
- [21] M. Metzler, E. Pfeiffer, Chemistry of Natural and Anthropogenic Endocrine Active Compounds. In: Metzler M (ed). *The Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2001) 63-80.
- [22] R. M. Giusti, K. Iwamoto, E. E. Hatch, Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects, *Annals of Internal Medicine*, 122 (1995) 778-88.
- [23] G. M. Solomon, T. Schettler, Environment and health and Endocrine disruption and potential human health implications, *Canadian Medical Association Journal*, 1116 (2000) 1467-74.
- [24] G. Teilmann, A. Juul, N.E. Skakkebaek, J. Toppari, Putative Effects of Endocrine Disrupters on Pubertal Development in the Human, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 16 (2002) 105-121.
- [25] J.H. Geyer, G.G. Rimkus, I. Scheunert, A. Kaune, K.W. Schramm, A. Kettrup et al., Bioaccumulation and Occurrence of Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs), Persistent Organic Pollutants (POPs) and Other

Organic Compounds in Fish and Other Organisms Including Humans.  
The Handbook of Environmental Chemistry, 2 1-166.

- [26] A. Arukwe, Cellular and Molecular Responses to Endocrine-Modulators and the Impact on Fish Reproduction, *Marine Pollution Bulletin*, 42 (2001) 643-655.
- [27] T. Nguyen, D. Brunson, C.L. Crespi, B.W. Penman, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89 (1992) 3030-3034.
- [28] M. El-Gohary, W.M. Awara, S. Nassar, S. Hawas, Deltamethrin induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor, *Toxicology*, 132 (1999) 1-8.
- [29] K.D. Kröncke, K. Fehsel, V. Kolb-Bachofen, Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection how, why, when, and where?, *Nitric Oxide*, 1 (1997) 107-120.
- [30] R.H. McKee, The role of gap junctional intercellular communication in rodent liver tumor induction by phthalates: review of data on selected phthalates and the potential relevance to man, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32 (2000) 51-55.
- [31] G. Latini, Monitoring phthalate exposure in humans, *Clinical Chimica Acta*, 361 (2005) 20–29.
- [32] S. Çetinkaya, Endokrin çevre bozucular ve ergenlik üzerine etkileri, *Dicle Tıp Dergisi*, 36 (2009) 59-66.
- [33] I. Rusyn, J. M. Peters, M. L. Cunningham, Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver, *Critical Reviews in Toxicology*, 36 (2006) 459-479.
- [34] R. Hauser, A.M. Calafat, Phthalates and human health, *Occupational and Environmental Medicine*, 62 (2005) 806-818.

- [35] M. Matsumoto, M. Hirata-Koizumi, M. Ema, Adsorptive removal of phthalate ester(Di-ethyl phthalate) from aqueous phase by activated carbon: A kinetic study, *Journal of Hazardous Materials*, 146 (2007) 278-282.
- [36] J.L. Lyche, A.C. Gutleb, A. Bergman, G.S. Eriksen, A.T.J. Murk, E. Ropstad, M. Saunders and J. U. Skaare, Reproductive and developmental toxicity of phthalates, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 12 (2009) 225-249.
- [37] T. Nakajima, N.B. Hopf, P.A. Schulte, Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP), IARC Technical Publication, 42 (2010) 183-195.
- [38] Y. Guo, Q. Wu, K. Kannan, Phthalate Metabolites in Urine From China and Implications for Human Exposures, *Environment International*, 37 (2011) 893-898.
- [39] C.J. Hines, N.B. Hopf, J.A. Deddens, M.J. Silva, A.M. Calafat, Estimated Daily Intake of Phthalates in Occupationally Exposed Groups, *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 21 (2011) 133-141.
- [40] E.J. Hong, K.C. Choi, N. Manabe and E.B. Jeung, Conflict of estrogenic activity by various phthalates between in vitro and in vivo models related to the expression of Calbindin-D9k, *Journal of Reproduction and Development*, 51 (2005) 253-263.
- [41] E. Yeşilkaya, Endokrin bozucular, *Pediatric*, 6 (2008) 76-82.
- [42] S. Bizzari, B. Oppenberg, Y. Isikawa, Plasticizers, *Chemical economics handbook*, Palo Alto. CA, SRI International (2000).
- [43] B. Babu and J.T. Wu, Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria, *Science of The Total Environment*, 408 (2010) 69-497.
- [44] R. Kavlock, D. Barr, K. Boekelheide, W. Breslin, P. Breyse, R. Chapin, K. Gaido, E. Hodgson, M. Marcus, K. Shea, P. Williams, NTP-CERHR



Expert Panel update on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate, *Reproductive Toxicology*, 22 (2006) 291–399.

- [45] C. Dargnat, M. Blanchard, M. Chevreuil, M.J. Teil, Occurrence of Phthalate Esters in the Seine River Estuary (France), *Hydrological Processes*, 23 (2009) 1192–1201.
- [46] J. Sánchez-Avila, R. Tauler, S. Lacorte, Determination and Occurrence of Phthalates. Alkylphenols. BPA, PBDEs, PCBs and PHAs in an Industrial Sewage Grid Discharging to a Municipal Wastewater Treatment Plant, *Science of the Total Environment*, 407 (2009) 4157–4167.
- [47] G. Latini, C. De Felice, A. Verrotti, Plasticizers, infant nutrition and reproductive health, *Reproductive Toxicology*, 19 (2004) 27–33.
- [48] T. Lovekamp-Swan, B.J. Davis, Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system, *Environmental Health Perspectives*, 111 (2003) 139–145.
- [49] D.W. Gao, Z.D. Wen, Phthalate esters in the environment: a critical review of their occurrence, biodegradation and removal during wastewater treatment processes, *Science of the Total Environment*, 541 (2016) 986-1001.
- [50] T.T. Ma, P. Christie, Y. Teng, Y.M. Luo, Rape (*Brassica chinensis* L.) seed germination, seedling growth, and physiology in soil polluted with di-n-butyl phthalate and bis (2-ethylhexyl) phthalate, *Environmental Science and Pollution Research*, 20 (2013) 1-10.
- [51] M. Erna, A. Harazono, E. Miyawaki, Y. Ogawa, Developmental toxicity of mono-n-benzyl phthalate, one of the major metabolites of the plasticizer n-butyl benzyl phthalate in rats, *Toxicology Letters*, 86 (1996) 19-25.
- [52] CDC, Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. NCEH Publ. No. 05-0570. Atlanta, GA:Centers for Disease Control and Prevention (2005).

- [53] J.W. Brock, S.P. Caudill, M.J. Silva, L.L. Needham, E.D. Hilborn, Phthalate monoesters levels in the urine of young children, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68 (2002) 309-314.
- [54] H. M. Koch, H. M. Bolt, & J. Angerer, Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP, *Archives of Toxicology* 78 (2004a) 123–130.
- [55] T. Schetter, Human exposure to phthalates via consumer products, *International Journal of Andrology*, 29 (2006) 134-139.
- [56] C. Foresta, A. Garolla, D. Zuccarello, D. Pizzol, A. Moretti, L. Barzon, G. Palù, *Fertility and Sterility*, (2008).
- [57] I. Rusyn, M.B. Kadiiska, A. Dikalova, H. Kono, M. Yin, K. Tsuchiya, R.P. Mason, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, B.H. Segal, S.M. Holland, R.G. Thurman, Phthalates rapidly increase production of reactive oxygen species in vivo: role of Kupffer cells, *Molecular Pharmacology*, 59 (2001) 744-750.
- [58] K.W. Seo, K.B. Kim, Y.J. Kim, J.Y. Choi, K.T. Lee, K.S. Choi, Comparison of oxidative stress and changes of xenobiotic metabolizing enzymes induced by phthalates rats, *Food and Chemical Toxicology*, 42 (2004) 1107-1114.
- [59] P. Ferre, The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity, *Diabetes*, 53 (2004) 43-50.
- [60] S. Luquet, C. Gaudel, D. Holst, J. Lopez-Soriano, C. Jehl-Pietri, A. Fredenrich, & P. A. Grimaldi, Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 30 (2005) 313-7.
- [61] K. F. Jepsen, A. Abildtrup, & S. T. Larsen, Monophthalates promote IL-6 and IL-8 production in the human epithelial cell line A549, *Toxicology In Vitro*, 18 (2004) 265-9.

- [62] A. M. Vetrano, D. L. Laskin, F. Archer, K. Syed, J. P. Gray, J. D. Laskin, N. Nwebube, & B. Weinberger, Inflammatory effects of phthalates in neonatal neutrophils, *Pediatric Research*, 68 (2010) 134-9.
- [63] N.J. Barlow, B.S. McIntyre, P.M. Foster, Male reproductive tract lesions at 6, 12, and 18 months of age following in utero exposure to di (n-butyl) phthalate, *Toxicologic Pathology*, 32 (2004) 79– 90.
- [64] J. Borch, O. Ladefoged, U. Hass, A.M. Vinggaard, Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats, *Reproductive Toxicology*, 18 (2004) 53– 61.
- [65] CDC, Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, NCEH Publ. No. 05-0570 (2005).
- [66] H.M. Koch, H. Drexler, J. Angerer, Internal exposure of nurseryschool children and their parents and teachers to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207 (2004) 15-22.
- [67] H.M. Koch, R. Preuss, J. Angerer, Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure- an update and latest results, *International Journal of Andrology*, 29 (2006) 155-165.
- [68] C. Rhodes, T.C. Orton, I.S. Pratt, P.L. Batten, H. Bratt, S.J. Jackson, C.R. Elcombe, Comparative pharmacokinetics and subacute toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in rats and marmosets: extrapolation of effects in rodents to man, *Environmental Health Perspectives*, 65 (1986) 299-307.
- [69] M. Wittassek, W. Heger, H.M. Koch, K. Becker, J. Angerer, M. Kolossa-Gehring, Daily intake of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by German children-A comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210 (2007) 35-42.

- [70] US CDC. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. <http://www.cdc.gov/exposurereport>.
- [71] K.K. Ferguson, R. Loch-Caruso, J.D. Meeker, Urinary phthalate metabolites in relation to biomarkers of inflammation and oxidative stress: NHANES 1999–2006, *Environmental Research*, 111 (2011) 718–726.
- [72] T. Otake, J. Yoshinaga & Y. Yanagisawa, Exposure to phthalate esters from indoor environment, *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 14 (2004) 524–528.
- [73] R. Green, R. Hauser, A. Calafat, J. Weuve, T. Schettler, S. Ringer, K. Huttner, & H. Hu, Use of Di(2-ethylhexyl) Phthalate Containing Medical Products and Urinary Levels of Mono(2-ethylhexyl) Phthalate in Neonatal Intensive Care Unit Infants, *Environmental Health Perspectives*, 113 (2005) 1222–1225.
- [74] N.S. Gayathri, C.R. Dhanya, A.R. Indu, P.A. Kurup, Changes in some hormones by low doses of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), a commonly used plasticizer in PVC blood storage bags & medical tubing, *Indian Journal of Medical Research*, 119 (2004) 139–144.
- [75] C.G. Bornehag, J. Sundell, L. Hagerhed, S. Janson, Pet-keeping in early childhood and airway, nose and skin symptoms later in life, *Allergy*, 58 (2003) 939–944.
- [76] T. Stroheker, N. Cabaton, G. Nourdin, J. F. Regnier, J. C. Lhuguenot & M. C. Chagnon, Evaluation of antiandrogenic activity of di-(2-ethylhexyl)phthalate, *Toxicology*, 208 (2005) 115–121.
- [77] K.K. Ferguson, R. Loch-Caruso, J.D. Meeker, Urinary phthalate metabolites in relation to biomarkers of inflammation and oxidative stress: NHANES 1999–2006, *Environmental Research*, 111 (2011).
- [78] R.W. Stahlhut, E. Van Wijngaarden, T.D. Dye, S. Cook, S.H. Swan, Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with

increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males, *Environmental Health Perspectives*, 115 (2007).

- [79] R. Hauser, J.D. Meeker, N.P. Singh, M.J. Silva, L. Ryan, S. Duty, A.M. Calafat, DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites, *Human Reproduction*, 22 (2007) 688-695.
- [80] M. Mushtaq, S.P. Srivastava, P.K.Seth, Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on glycogen metabolism in rat liver, *Toxicology*, 16 (1980) 153-161.
- [81] J. Boberg, S. Metzдорff, R. Wortziger, M. Axelstad, L. Brokken, A.M. Vinggaard et al., Impact of di iso butyl phthalate and other PPAR agonistson steroidogenesis and plasma insülin and leptin levels infetal rats, *Toxicology*, 250 (2008) 75–81.
- [82] K. Holemans, L. Aerts, F.A. VanAssche, Life time consequences of abnormal fetal pancreatic development, *The Journal of Physiology*, 547 (2003) 11–20.
- [83] J.C. Lhuguenot, A.M. Mitchell, G. Milner, E.A. Lock, and C.R. Elcombe, The metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) in rats: in vivo and in vitro dose and time dependency of metabolism, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 80 (1985) 11-22.
- [84] N.S. Gayathri, C.R. Dhanya, A.R. Indu, P.A. Kurup, Changes in some hormones by low doses of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP),acommonly used plasticizer in PVC blood storage bags & medical tubing, *Indian Journal of Medical Research*, 119 (2004) 139–144.
- [85] S. Rengarajan, C. Parthasarathy, M. Anitha, K. Balasubramanian, Diethyl-hexyl phthalate impairs insülin binding and glucose oxidation in Chang liver cells, *Toxicology In Vitro*, 21 (2007) 99–102.
- [86] J. Fan, K. Traore, W. Li, H. Amri, H. Huang, C. Wu, H. Chen, B. Zirkin, V. Papadopoulos, Molecular mechanisms mediating the effect of mono-(2-

- ethylhexyl) phthalate on hormone-stimulated steroidogenesis in MA-10 mouse tumor Leydig cells, *Endocrinology*, 151 (2010) 3348–3362.
- [87] A.M. Vetrano, D.L. Laskin, F. Archer, K. Syed, J.P. Gray, J.D. Laskin et al., Inflammatory effects of phthalates in neonatal neutrophils, *Pediatric Research*, 68 (2010) 134–9.
- [88] P. Erkekoğlu, W. Rachidi, O. G. Yuzugullu, B. Giray, A. Favier, M. Ozturk, & F. Hincal, Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di (2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono (2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 248 (2010) 52-62.
- [89] J.H. Kim, H.Y. Park, S. Bae, Y.H. Lim, Y.C. Hong, Diethylhexyl phthalates is associated with insulin resistance via oxidative stress in the elderly: a panel study, *Plos One* 8, (2013).
- [90] B.J. Goldstein, K. Mahadev, X. Wu, Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets, *Diabetes*, 54 (2005) 311–321.
- [91] J.W. Eriksson, Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation: a hypothetical common pathway causing insulin resistance, *FEBS Letters*, 581 (2007) 3734-3742.
- [92] T.J Schulz, K. Zarse, A. Voigt, N Urban, M. Birringer et al., Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress, *Cell Metabolism*, 6 (2007) 280–293.
- [93] R.E. Lamb, B.J. Goldstein, Modulating an oxidative-inflammatory cascade: potential new treatment strategy for improving glucose metabolism, insulin resistance, and vascular function, *International Journal of Clinical Practice*, 62 (2008) 1087–1095.
- [94] Y. Lin, J. Wei, Y. Li, J. Chen, Z. Zhou, L. Song, Z. Wei, Z. Lv, X. Chen, W. Xia, S. Xu, Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on

glucose homeostasis in the rat, *The American Journal of Physiology-Endocrinology Metabolism*, 301 (2011) 527-538.

- [95] C. Zhang, M. Zhang, Y. Sun, J. Li, M. Fang, X. Zhu, C. Liu, Effect of dibutyl phthalate and di-(2-ethylhexyl) phthalate on urine SOD activity and MDA content in rats, *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 32 (2012) 160-164.
- [96] D. Zhou, H. Wang, J. Zhang, X. Gao, W. Zhao, Y. Zheng, Di-n-butyl phthalate (DBP) exposure induces oxidative damage in testes of adult rats, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 56 (2010) 413-419.
- [97] Y.C. Hong, E.Y. Park, M.S. Park, J.A. Ko, S.Y. Oh et al., Community level exposure to chemicals and oxidative stress in adult population, *Toxicology Letters*, 184 (2009) 139–144.
- [98] K.W. Seo, K.B. Kim, Y.J. Kim, J.Y. Choi, K.T. Lee, K.S. Choi, Comparison of oxidative stress and changes of xenobiotic metabolizing enzymes induced by phthalates rats, *Food and Chemical Toxicology*, 42 (2004) 1107-1114.
- [99] D. Anderson, T.W. Yu, F. Hincal, Effect of some phthalate esters in human cells in the comet assay, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 19 (1999) 275-280.
- [100] N.H. Kleinsasser, U.A. Harréus, E.R. Kastenbauer, B.C. Wallner, A.W. Sassen, R. Staudenmaier, A.W. Rettenmeier, Mono(2-ethylhexyl) phthalate exhibits genotoxic effects in human lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract in the comet assay, *Toxicology Letters*, 148 (2004) 83-90.
- [101] O. Albert, B. Jégou, A critical assessment of the endocrine susceptibility of the human testis to phthalates from fetal life to adulthood, *Human Reproduction Update*, 20 (2014) 231-249.
- [102] R. A. Clewell, J. L. Campbell, S. M. Ross, K. W. Gaido, H. J. Clewell III, and M. E. Andersen, Assessing the relevance of in vitro measures of

- phthalate inhibition of steroidogenesis for in vivo response, *Toxicology*, 24 (2010) 327–334.
- [103] H.J. Koo, B.M. Lee, Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 67 (2004) 1901–1914.
- [104] A.M. Calafat, L.L. Needham, M.J. Silva, G. Lambert, Exposure to di(2 ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit, *Pediatrics*, 113 (2004) 429–434.
- [105] Q. Zeng, C. Wei, Y. Wu et al., Approach to distribution and accumulation of dibutyl phthalate in rats by immunoassay, *Food and Chemical Toxicology*, 56 (2013) 18–27.
- [106] Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR), National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services. NTP-CERHR Expert Panel Report on Di-n-Butyl Phthalate (2000).
- [107] R.C. Scott, P.H. Dugard, J.D. Ramsey, C. Rhodes, In vitro absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin, *Environmental Health Perspectives*, 74 (1987) 223-227.
- [108] K. Doan, L.R. Bronaugh, J.J. Yourick, In vivo and in vitro skin absorption of lipophilic compounds, dibutyl phthalate, farnesol and geraniol in the hairless guinea pig, *Food and Chemical Toxicology*, 48 (2010) 18–23.
- [109] J. Hogberg, A. Hanberg, M. Berglund, S. Skerfving, M. Remberger, A. M. Calafat, A. F. Filipsson, B. Jansson, N. Johansson, M. Appelgren et al., Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations, *Environmental Health Perspectives*, 116 (2008) 334-9.
- [110] R. Kavlock, K. Boekelheide, R. Chapin, Cunningham, M. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate, *Reproductive Toxicology*, 16 (2002) 489–527.



- [111] Linxi et. al., Comparison of the Effects of Dibutyl and Monobutyl Phthalates on the Steroidogenesis of Rat Immature Leydig Cells, *BioMed Research International* (2016).
- [112] E. Kleymenova, C. Swanson, K. Boekelheide, K.W. Gaido, Exposure in utero to di(n-butyl) phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat sertoli cells and disrupts sertoli cell–gonocyte contact, *Biology of Reproduction*, 73 (2005) 482–490.
- [113] A. Tanaka, A. Matsumoto and T. Yamaha, . Biochemical studies on phthalic esters. III. Metabolism of dibutyl phthalate (DBP) in animals, *Toxicology*, 9 (1978) 109-123.
- [114] B. Desvergne, J. N. Feige, & C. Casals-Casas, PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic?, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304 (2009) 43-48.
- [115] K. Liu, K.P. Lehmann, M. Sar, S.S. Young, W. Kevin, Gene expression profiling following in utero exposure to phthalate esters reveals new gene targets in the etiology of testicular dysgenesis, *Biology of Reproduction*, 73 (2005) 180–192.
- [116] G.K. Prasanth, L.M. Divya, C. Sadasivan, Effects of mono and di(n-butyl) phthalate on superoxide dismutase, *Toxicology*, 262 (2009) 38–42.
- [117] T. Shono, T. Taguchi, Short-time exposure to mono-n-butyl phthalate (mbp) induced oxidative stress associated with DNA damage and the atrophy of the testis in pubertal rats, *Environmental Science Pollution Research*, 21 (2014) 3187–3190.
- [118] WHO (World Health Organization), International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 189 di-n-butyl Phthalate, <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/> (Aralık, 2013).
- [119] R.D. White, D.E. Carter, D. Earnest, J. Mueller, Absorption and metabolism of three phthalate diesters by the rat small intestine, *Food Cosmetics and Toxicology*, 18 (1980) 383–386.

- [120] S.K. Khetan, Environmental Chemicals Targeting Estrogen Signaling Pathways. Endocrine Disruptors in The Environment, First Edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, (2014) 67-8.
- [121] Tunçel N. Endokrin Sistem. Fizyoloji. Erişim: [www.anadolu.edu.tr/aos/kitap/ehsm/1211/unite04.pdf](http://www.anadolu.edu.tr/aos/kitap/ehsm/1211/unite04.pdf) erişim tarihi: 18.04.2020
- [122] E. Jarvis, N.A. Campbell, J.B. Reece, Hormones and the Endocrine System, Wilbur B. Biology. San Francisco: Pearson Education, (2005) 945-946.
- [123] <https://www.livescience.com/40386-endocrine-system-surprising-facts.html> (27.06.2020)
- [124] Y. Aytakin, S. Solakoglu, Çeviri editörleri. Temel Histoloji. Ankara: Nobel Tıp Kitapları; (2006) (pp 328-330; 420-423).
- [125] R. Demir, Çeviri Editörü. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş Ankara:Palme Yayıncılık; (2006) (pp 453-458; 521-527).
- [126] D.W. Fawcett, A Text Book Of Histology. New York: Chapman&Hall; (1994) (pp 689-702).
- [127] M.H. Ross, E.J. Reith, Histology A Text and Atlas. Harper International Edition New York: Harper&Row; (1985) (pp 484-490).
- [128] K.A. Johansson, A. Grogin-Botton, Development and disease of the pancreas, Clinical Genetics, 62 (2002) 14- 23.
- [129] H. Beck-Nielsen, Clinical disorders of insulin resistance. In: Alberti KGMM, R.A. DeFronzo, H. Keen, P. Zimmet (eds), International Textbook of Diabetes Mellitus. 1st edition. Chichester, John Wiley&sons 1992, Vol I, Chap 20, 531-550.
- [130] M. Brissova, M.J. Fowler, W.E. Nicholson, A. Chu, B. Hirshberg, D.M. Harlan Powers et al., Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy, Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 53 (2005) 87-97.

- [131] S.O. Kayaalp, İnsülin, oral ve diğer antidiyabetik ilaçlar ve glukagon, Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9. Baskı. Cilt 2. Ankara, (2000) 1252-72.
- [132] F.J. Wackers, L.H. Young, S.E. Inzucchi, D.A. Chyun, J.A. Davey, E.J. Barrett, R. Taillefer, S.D. Wittlin, G.Y. Heller, N. Filipchuk, S. Engel, R.E. Ratner, A.E. Iskandrian, Detection of silent myocardial ischemia in asymptomatic diabetic subjects: the 36 DIAD study, *Diabetes Care*, 27 (2004) 1954-1961.
- [133] F.W. Morris, *Insulin*, AccessScience, McGraw-Hill Companies, (2008).
- [134] C.R. Kahn, G.C. Weir, G.L. King, A.M. Jacobson, A.C. Moses, R.J. Smith, editör. *Joslin's Diabetes Mellitus*.14th ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins; (2006).
- [135] I. Seghrouchni, J. Draï, E. Bannier ve ark., Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus, insulin treatment efficiency, *Clinica Chimica Acta*, 321 (2002) 89-96.
- [136] I. West, Radicals and oxidative stres in diabetes, *Diabetic Medicine*, 17 (2000) 171-180.
- [137] J.P. Kuyvenhoven, A.E. Meinders Oxidative stress and diabetes mellitus, Pathogenesis of long term complications, *European Journal of Internal Medicine*, 10 (1999) 9-19.
- [138] K. Ohtsubo, S. Takamatsu, M.T. Minowa, A. Yoshida, M. Takeuchi, J.D. Marth, Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes, *Cell*, 123 (2005) 1307-1321.
- [139] D.J. Withers, J.S. Gutierrez, H. Towery, D.J. Burks, J.M. Ren, S. Previs et al., Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice, *Nature*, 391 (1998) 900-904.

- [140] İ. Halifeoğlu, F. Karataş, R. Çolak, H. Canatan, S. Telo, Tip II diyabetik hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası oksidan ve antioksidan durum, Fırat Tıp Dergisi, 10 (2005) 117-122.
- [141] N. Delibaş, İ. Kılınç, İnsulin ve Gliklazid Tedavisinin Streptozotosin Diabetik Rat Hipokampüslerinde Lipid Peroksidasyonuna Etkisi, Türk Biyokimya Klinik Dergisi, 1 (2003) 33-39.
- [142] İ. Halifeoğlu, F. Karataş, R. Çolak, H. Canatan, S. Telo, Tip 2 Diyabetik Hastalarda tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum, Fırat Tıp Dergisi, 10 (2005) 117-122.
- [143] S. Kavak, Rozigitazonun Diyabetik Sıçan Papiller Kalp Kasının Mekanik ve Elektriksel Aktiviteleri Üzerine Etkisi (Doktora Tezi), Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı, Adana (2008).
- [144] S. İlhan, S. İmamoglu, C. Yılmaz, S. Akalın, Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, TEMD Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu Hasta Eğitim Kitapçıkları Serisi-03, İstanbul, (2011) ss 1-62.
- [145] N. Altan, D. A. Sepici, C. Koca, Diabetes mellitus ve oksidatif stres, Türk Biyokimya Dergisi, [Turkish Journal of Biochemistry], 31 (2006) 51–56.
- [146] O. Kanbagl, J. Balkan, G. Aykaç-Toker, M. Uysal, Hepatic mitochondrial prooxidant and antioxidant status in ethanol-induced liver injury in rats, Biological &Pharmaceutical Bulletin, 25 (2002) 1482-1484.
- [147] D.A. Allen, M.M. Yaqoob, S.M. Harwood, Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications, The Journal of Nutritional Biochemistry, 16 (2005) 705-713.
- [148] E. Ho, T.M. Bray, Antioxidants, NFkappaB activation, and diabetogenesis, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 222 (1999) 205-213.
- [149] R.A. Kowlurur, V. Kowluru, Y. Xiong, Y.S. Ho, Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from

- diabetes-induced oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, 41 (2006) 1187-1190.
- [150] H. Kaneto, T.A. Matsuoka, Y. Nakatani, D. Kawamori, M. Matsuhisa, Y. Yamasaki, Oxidative stress and the JNK pathway in diabetes, *Current Diabetes Reviews*, 1 (2005) 65-72.
- [151] Y.Y. Jang, J.H. Song, Y.K. Shin, E.S. Han, C.S. Lee, Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats, *Pharmacological Research*, 42 (2000) 361-371.
- [152] M.W. Fariss, C.B. Chan, M. Patel, B. Van Houten, S. Orrenius, Role of mitochondria in toxic oxidative stress, *Molecular Interventions*, 5 (2005) 94-111.
- [153] K. Kannan, S.K. Jain, Oxidative stress and apoptosis, *Pathophysiology*, 7 (2000) 153-163.
- [154] R.A. Kowluru, V. Kowluru, Y. Xiong, Y.S. Ho, Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, 41 (2006) 1187-1190.
- [155] M.W. Fariss, C.B. Chan, M. Patel, B. Van Houten, S. Orrenius, Role of mitochondria in toxic oxidative stress, *Molecular Interventions*, 5 (2005) 94-111.
- [156] M. Pollack, C. Leeuwenburgh, Mitochondrial control of apoptosis in aging and exercise [online], University of Florida, Gainesville, USA (2006).
- [157] A. Nilgün, A.S. Dinçel, C. Koca, Diabetes mellitus ve oksidatif stres, *Türk Biyokimya Dergisi*, 312 (2006) 51-56.
- [158] D. Mathis, L. Vence, C. Benoist, Beta-Cell death during progression to diabetes, *Nature*, 414 (2001) 792-798.
- [159] J.W. Baynes, S.R. Thorpe, Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm, *Diabetes*, 48 (1999) 1-9.

- [160] M. Tiedge, S. Lortz, J. Drinkgern, S. Lenzen, Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells, *Diabetes*, 46 (1997) 1733-42.
- [161] M. Tiedge, S. Lortz, R. Munday, S. Lenzen, Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species, *Diabetes*, 47 (1998) 1578-1585.
- [162] G. Joslowski, J. Halim, J. Goletzke, M. Gow, M. Ho, J.C.Y. Louie, S.P. Garnett, Dietary glycemic load, insulin load, and weight loss in obese, insulin resistant adolescents: RESIST study, *Clinical Nutrition*, 34 (2015) 89-94.
- [163] Y. Lin, J. Wei, Y. Li, J. Chen, Z. Zhou, L. Song, Z. Wei, Z. Lv, X. Chen, W. Xia, S. Xu, Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat, *The American Journal of Physiology-Endocrinology Metabolism*, 301 (2011) 527-E538.
- [164] C. Casals-Casas, J.N. Feige, B. Desvergne, Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism, *International Journal of Obesity*, 32 (2008) 53-61.
- [165] B. Desvergne, J. N. Feige, & C. Casals-Casas, PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic?, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304 (2009) 43-8.
- [166] S. Kersten, J. Seydoux, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, B. Desvergne, W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting, *Journal of Clinical Investigation*, 103 (1999) 1489-1498.
- [167] M. Lehrke, M.A. Lazar, The many faces of PPAR $\gamma$ , *Cell*, (2005) 123.
- [168] T. James-Todd, R. Stahlhut, J.D. Meeker, S.G. Powell, R. Hauser, T. Huang, J. Rich- Edwards, Urinary phthalate metabolite concentrations and diabetes among women in the National Health and Nutrition

Examination Survey (NHANES) 2001-2008, Environmental Health Perspectives, 120 (2012) 1307-1313.

- [169] R. Lupi, S. Del Guerra, L. Marselli, M. Bugliani, U. Boggi, F. Mosca, P. Marchetti, S. Del Prato, . Rosiglitazone prevents the impairment of human islet function induced by fatty acids: evidence for a role of PPAR gamma2 in the modulation of insulin secretion, *The American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism*, 286 (2004) 560-567.
- [170] J.A. Moibi, D. Gupta, T.L. Jetton, M. Peshavaria, R. Desai, J.L. Leahy, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates expression of PDX-1 and NKX6.1 in INS-1 Cells, *Diabetes*, 56 (2007) 88-95.
- [171] J. Le Lay, R. Stein, Involvement of PDX-1 in activation of human insulin gene transcription, *Journal of Endocrinology*, 188 (2006) 287-294.
- [172] D. Gupta, T.L. Jetton, R.M. Mortensen, S.Z. Duan, M. Peshavaria, J.L. Leahy, In vivo and in vitro studies of a functional peroxisome proliferator-activated receptor gamma response element in the mouse pdx-1 promoter, *Journal of Biological Chemistry*, 283 (2008) 32462-32470.
- [173] S. Oyadomari, K. Takeda, M. Takiguchi, T. Gotoh, M. Matsumoto, I. Wada, S. Akira, E. Araki, M. Mori, Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 98 (2001) 10845-10550.
- [174] M.M. Kesavulu, B.K. Rao, R. Giri, J. Vijaya, G. Subramanyam, C. Apparao, Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 53 (2001) 33-39.
- [175] J.V. Hunt, C.C. Smith, S.P. Wolff, Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose, *Diabetes*, 39 (1990) 1420-1424.
- [176] V.M. Bhor, N. Raghuram, S. Sivakami, Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-

- induced diabetic rats, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36 (2004) 89-97.
- [177] S. Venkateswaran, L. Pari, Effect of *Coccinia indica* leaf extract on plasma antioxidants in streptozotocin- induced experimental diabetes in rats, *Phytotherapy Research*, 17 (2003) 605-608.
- [178] O. Ozsoy-Sacan, O. Karabulut-Bulan, S. Bolkent, R. Yanardag, Y. Ozgey, Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var *cicla*) on the liver of the diabetic rats: a morphological and biochemical study, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68 (2004) 1640-1648.
- [179] R. Alemzadeh, D.T. Wyatt, Diabetes Mellitus. In: Behrman R.E, Kliegman R.M, Jenson H.B (eds). *Nelson Textbook of Pediatrics*. 17 edition, Pennsylvania: Elsevier Saunders, p.194772 (2004).
- [180] R. Fiallo-Scharer, G.S. Eisenbarth, Pathophysiology of Insulin-Dependent Diabetes. In: Pescovitz O.H, Eugster E.A (eds). *Pediatric Endocrinology*. 1 edition. Philadelphia (USA): Lippincott Williams and Wilkins; p.411-26 (2004).
- [181] M.J. Haller, M.A. Atkinson, D. Schatz, Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management, *Pediatric Clinics of North America*, 52 (2005) 1553-78.
- [182] A.W Norris, J.I. Wolfsdorf, Diabetes Mellitus. In: Brook G.D.C, Clayton P.E, Brown RS, Savage M.O (eds). *Clinical Pediatric Endocrinology*. 5 edition. Massachusetts (USA): Blackwell Publishing Ltd; p.436-91 (2005).
- [183] T. L. Hectors, C. Vanparys, A. Pereira-Fernandes, G. A. Martens & R. Blust, Evaluation of the INS-1 832/13 Cell Line as a Beta-Cell Based Screening System to Assess Pollutant Effects on Beta-Cell Function, *Plos One*, 8 (2013) 21.
- [184] K. Larsson, H. Elding-Larsson, E. Cederwall et al., Genetic and perinatal factors as risk for childhood type 1 diabetes, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 20 (2004) 429-37.



- [185] L. Blom, L. Nystrom, G. Dahlquist, The Swedish childhood diabetes study. Vaccinations and infections as risk determinants for diabetes in childhood, *Diabetologia*, 34 (1991) 176-81.
- [186] L. G. Grunnet, R. Aikin, M. F. Tonnesen, S. Paraskevas, L. Blaabjerg, J. Storling, L. Rosenberg, N. Billestrup, D. Maysinger & T. Mandrup-Poulsen, Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells, *Diabetes*, 58 (2009) 1807-15.
- [187] E. Bober, B. Dundar, A. Buyukgebiz, Partial remission phase and metabolic control in type 1 diabetes mellitus in children and adolescents, *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 14 (2001) 435-41.
- [188] M. Abdul-Rasoul, H. Habib, M. Al-Khouly, 'The honeymoon phase' in children with type 1 diabetes mellitus: frequency, duration, and influential factors, *Pediatr Diabetes*, 7 (2006) 101-107.
- [189] D. Schatz, J. Krischer, G. Horne et al., Islet cell antibodies predict insulin-dependent diabetes in United States school age children as powerfully as in unaffected relatives, *Journal of Clinical Investigation*, 93 (1994) 2403-2407.
- [190] M. Yang, B. Charlton, A.M. Gautam, Development of insulinitis and diabetes in B cell-deficient NOD mice, *Journal of Autoimmunity*, 10 (1997) 257-260.
- [191] M.J. Redondo, P.R. Fain, G.S. Eisenbarth, Genetics of type 1A diabetes, *Recent Progress in Hormone Research*, 56 (2001) 69-89.
- [192] J. Seissler, W.A. Scherbaum, Autoimmune diagnostics in diabetes mellitus, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44 (2006) 133-137.
- [193] W.E. Winter, The use of islet autoantibody markers in the prediction of autoimmune type 1 diabetes, *Clinical immunology Newsletter*, 19, (1999) 25-39.
- [194] L. N. Vandenberg, T. Colborn, T. B. Hayes, J. J. Heindel, D. R. Jacobs, Jr., Duk-Hee Lee, T. Shioda, A. M. Soto, F. S. vom Saal, W. V.

- Welshons, R. T. Zoeller, and J. P. Myers, Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals:Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses, *Endocrine Reviews*, 33 (2012) 378–455.
- [195] European Commission Joint Research Centre. (2004). European Union Risk Assessment Report: DIBUTYL PHTHALATE, CAS No: 84-74-2.
- [196] J.I. Ratter, D.L. Rimosn, The genetic of the glucose intolerances, *The American Journal of Medicine*, 70 (1981) 116.
- [197] H.E. Lebovitz, Therapy for diabetes mellitus and related disorders. American Diabetes Association Clinical Education Series, Third Edition, Virginia, 4-7, 1998.
- [198] Radhika Gupta, Prashant Kumar, Nighat Fahmi, Bhaskar Garg, Sriparna Dutta, Shilpee Sachar, Avtar S. Matharu, Karani S. Vimalleswaran. Endocrine disruption and obesity: A current review on environmental obesogens, *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 3 (2020) 100009.
- [199] S. Safe, Endocrine disruptors and human health: is there a problem, *Toxicology*, 205 (2004) 3-10.
- [200] G.M. Solomon and T. Schettler, Environment and health, Endocrine disruption and potential human health implications, *Canadian Medical Association Journal*, 1116 (2000) 1467-1474.
- [201] E. Durmaz, E.N. Özmert, Fitalatlar ve Çocuk Sağlığı, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53 (2010) 305-317.
- [202] J. Bradbury, UK panics over phthalates in babymilk formulae, *Lancet*, 347 (1996) 1541.
- [203] H. Frederiksen, N.E. Skakkebaek, A.M. Andersson, Metabolism of phthalates in humans, *Molecular Nutrition and Food Research*, 51 (2007) 899-911.

- [204] ATDSR. Toxicological Profile for Diethylphthalate. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta; USA, 1995.
- [205] G. Latini, Monitoring phthalate exposure in humans, *Clinical Chimica Acta*, 361 (2005) 20–29.
- [206] U.S. Department of Health and Human Services, Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-n-butyl phthalate(DBP). Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR), National Toxicology Program, NIH Publ No.,03-4486 (2003).
- [207] Member State Committee, Support Document for Identification of Dibutyl Phthalate (DBP) as a Substance of Very High Concern. Substance of Very High Concern (SVHC) Support Document, EC No., 201-557-4,6 (2008).
- [208] M. Ema, E. Miyawaki and K. Kunio, Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats, *Reproductive Toxicology*, 14 (2000) 13-19.
- [209] National Institute for Occupational Safety and Health, Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS). RTECS database available through the National Library of Medicine MEDLARS System: J-Mazand University Medical Science Article, A-10-1269-10, 1994.
- [210] N. M. Weldingh, L. Jørgensen-Kaur, R. Becher, J.A. Holme, J. Bodin, U. C. Nygaard, A. K. Bølling, Bisphenol A Is More Potent than Phthalate Metabolites in Reducing Pancreatic  $\beta$ -Cell Function, *BioMed Research International*, 2017 (2017) 1–11.

- [211] World Health Organization, Fact sheet diabetes: Global report on diabetes, Global Industry Analysts, “Bisphenol A—A Global Strategic Business Report”, (2013).
- [212] M.L. McMaster, S.Y. Kristinsson, I. Turesson, M. Bjorkholm, O. Landgren Mono-2-ethylhexyl phthalate induces oxidative stress responses in human placental cells in vitro Clin. Lymphoma, 9 (2010) 19-22.
- [213] P.R. Hannon, K.E. Brannick, W. Wang, J.A. Flaws, Mono(2-ethylhexyl) phthalate accelerates early folliculogenesis and inhibits steroidogenesis in cultured mouse whole ovaries and antral follicles, Biology of Reproduction, 92 (2015) 120–120.
- [214] L.T. Rael, R. Bar-Or, D.R. Ambruso, C.W. Mains, D.S. Slone, M.L. Craun, D. Bar-Or Phthalate esters used as plasticizers in packed red blood cell storage bags may lead to progressive toxin exposure and the release of pro-inflammatory cytokines, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2 (2009) 166-171.
- [215] Y. Hayashi, Y. Ito, N. Yamagishi, Y. Yanagiba, H. Tamada, D. Wang, D.H. Ramdhan, H. Naito, Y. Harada, M. Kamijima, F.J. Gonzales, T. Nakajima, Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  may have an important role in the toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on offspring of mice, Toxicology, 289 (2011) 1-10.
- [216] P.M. Lind, L. Lind, Circulating levels of bisphenol A and phthalates are related to carotid atherosclerosis in the elderly, Atherosclerosis, 218 (2011) 207–213.
- [217] K. Svensson, R.U. Hernández-Ramírez, A. Burguete-García et al., Phthalate exposure associated with self-reported diabetes among Mexican women, Environmental Research, 111 (2011) 792-796.

- [218] X. Sun, Y. Lin, Q. Huang, J. Shi, L. Qiu, M. Kang & S. Dong, Di (2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis in rat INS-1 cells is dependent on activation of endoplasmic reticulum stress and suppression of antioxidant protection, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19 (2015) 581-594.
- [219] L. Zhu, J. Lu, X. Tang, G. Fu, P. Duan, C. Quan, L. Zhang, Z. Zhang, W. Chang, Y. Shi, Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces apoptosis of GC-2spd cells via TR4/Bcl-2 pathway, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 44 (2016) 18-24.
- [220] M. Kanter, O. Coşkun, A. Korkmaz, S. Oter, Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats, *The Anatomical Record Part A Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 279 (2004) 685-691.
- [221] Y. She, L. Jiang, L. Zheng, H. Zuo, M. Chen, X. Sun, Q. Li, C. Geng, G. Yang, L. Jiang, X. Liu, The role of oxidative stress in DNA damage in pancreatic  $\beta$  cells induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate, *Chemico-Biological Interactions*, 265 (2017) 8-15.
- [222] J. Fan, K. Traore, W. Li, H. Amri, H. Huang, C. Wu, H. Chen, B. Zirkin, V. Papadopoulos, Molecular mechanisms mediating the effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on hormone-stimulated steroidogenesis in MA-10 mouse tumor Leydig cells, *Endocrinology*, 151 (2010) 3348-3362.
- [223] A.M. Vetrano, D.L. Laskin, F. Archer, K. Syed, J.P. Gray, J.D. Laskin, N. Nwebube, B. Weinberger, Inflammatory effects of phthalates in neonatal neutrophils, *Pediatric Research*, 68 (2010) 134-139.
- [224] P. Erkekoglu, W. Rachidi, O.G. Yuzugullu, B. Giray, A. Favier, M. Ozturk, F. Hincal, Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate

(MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 248 (2010) 52-62.

- [225] R. Hauser, J.D. Meeker, N.P. Singh, M.J. Silva, L. Ryan, S. Duty, A.M. Calafat, DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites, *Human Reproduction*, 22 (2007) 688-695.
- [226] Y. Miura, M. Naito, M. Ablake, H. Terayama, S. Q. Yi, N. Qu, L. X. Cheng, S. Suna, F. Jitsunari, M. Itoh, Short-term effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on testes, liver, kidneys and pancreas in mice, *Asian Journal of Andrology*, 9 (2007) 199-205.
- [227] I. Rusyn, M. B. Kadiiska, A. Dikalova, H. Kono, M. Yin, K. Tsuchiya, R. P. Mason, J. M. Peters, F. Gonzalez, B. H. Segal, Phthalates rapidly increase production of reactive oxygen species in vivo: role of Kupffer cells, *Molecular Pharmacology*, 59 (2001) 744-750.
- [228] S.H. Kim, S.S. Kim, O. Kwon, K.H. Sohn, S.J. Kwack, Effects of dibutyl phthalate and monobutyl phthalate on cytotoxicity and differentiation in cultured rat embryonic bud cells; protection by antioxidants, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 65 (2002) 461–472.
- [229] J. Carillon, C. Romain, G. Bardy, G. Fouret, C. Feillet-Coudray, S. Gaillet, D. Lacan, J.P. Cristol and J.M. Rouanet, Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase, *Free Radical Biology and Medicine*, 65 (2013) 254-261.
- [230] D. Schmoll, K.S. Walker, D.R. Alessi, R. Grempler, A. Burchell, S. Guo, R. Walther, and T.G. Unterman, Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B $\alpha$  and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -

independent effects of insulin on promoter activity, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (2000) 36324-36333.

- [231] S.K. Durham, A. Suwanichkul, A.O. Scheimann, D. Yee, J.G. Jackson, F.G. Barr, and D.R. Powell, FKHR binds the insulin response element in the insulin-like growth factor binding protein-1 promoter, *Endocrinology*, 140 (1999) 3140-3146.
- [232] J. Nakae, T. Kitamura, Y. Kitamura, W.H. Biggs, K.C. Arden, and D. Accili, The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation, *Developmental Cell*, 4 (2003) 119-129.
- [233] T. Kitamura, J. Nakae, Y. Kitamura, Y. Kido, W.H. Biggs, C.V. Wright, M.F. White, K.C. Arden, and D. Accili, The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic  $\beta$  cell growth, *Journal of Clinical Investigation*, 110 (2002) 1839-1847.
- [234] D.A. Salih, and A. Brunet, FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging, *Current Opinion in Cell Biology*, 20 (2008) 126-136.
- [235] T.E. Kippin, D.J. Martens, and D. Van der Kooy, p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity, *Genes & Development*, 19 (2005) 756-767.
- [236] C.M. Morshead, B.A. Reynolds, C.G. Craig, M.W. McBurney, W.A. Staines, D. Morassutti, S. Weiss, and D. Van der Kooy, Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells, *Neuron*, 13 (1994) 1071-1082.
- [237] T. Zhang, D.H. Kim, X. Xiao, S. Lee, Z. Gong, R. Muzumdar, V. Calabuig-Navarro, J. Yamauchi, H. Harashima, R. Wang, and R. Bottino,

FoxO1 plays an important role in regulating  $\beta$ -cell compensation for insulin resistance in male mice, *Endocrinology*, 157 (2016) 1055-1070.

- [238] D.A. Stoffers, M.K. Thomas, J.F. Habener, Homeodomain protein IDX-1: a master regulator of pancreas development and insulin gene expression, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 8 (1997) 145-151.
- [239] M.M. Sachdeva, K.C. Claiborn, C. Khoo et al., Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (2009) 19090-19095.
- [240] U. Ahlgren, J. Jonsson, L. Jonsson, K. Simu and H. Edlund,  $\beta$ -Cell-specific inactivation of the mouse *p1/PDX1* gene results in loss of the  $\beta$ -cell phenotype and maturity onset diabetes, *Genes & Development*, 12 (1998) 1763-1768.
- [241] E. Langley, M. Pearson, M. Faretta, U.M. Bauer, R.A. Frye, S. Minucci et.al., Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53- induced cellular senescence, *The EMBO Journal*, 21 (2002) 2383-2396.
- [242] A. Purushotham, T.T. Schug, Q. Xu, S. Surapureddi, X. Guo, X. Li, Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation, *Cell Metabolism*, 9 (2009) 327-338.
- [243] K.A. Moynihan, Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice, *Cell Metabolism*, 2 (2005) 105– 117.
- [244] L. Bordone, Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells, *Plos Biology*, 4 (2006) 31.



- [245] M.B. Soares, E. Schon, A. Henderson et al, RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon, *Molecular and Cellular Biology*, 5 (1985) 2090–2103.
- [246] K.H. Vousden, C. Prives, Blinded by the light: the growing complexity of p53, *Cell*, 137 (2009) 413–31.
- [247] K.T. Bieging, S.S. Mello, L.D. Attardi, Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression, *Nature Reviews Cancer*, 14 (2014) 359–70.
- [248] M. Zörnig, A-O. Hueber, W. Baum, G. Evan, Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1551 (2001) F1-F37.
- [249] K.H. Vousden, X. Lu, Live or let die: the cells response to p53, *Nature Reviews Cancer*, 2 (2002) 594- 604.
- [250] J.M. Adams, S. Cory, Life or death decions by the Bcl-2 family, *Trends in Biochemical Sciences*, 26 (2001) 61-6.
- [251] C. Adrain, S.J. Martin, The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas, *Trends in Biochemical Sciences*, 26 (2001) 390-7.
- [252] D.C. Spierings, E.G. de Vries, E. Vellenga et al, Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52 (2004) 821-831.
- [253] J.M. Adams, S. Cory, The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science*, 281 (1998) 1322–1326.
- [254] D.R. Green, Apoptotic pathways: the roads to ruin, *Cell*, 94 (1998) 695–698.

- [255] C. Da- Peng, T. Shi, S. Da-Guang, H. Chan- Juan, X. Hong- Fei, and M. Xu, Corrigendum to: exposure to mono-n-butyl phthalate disrupts the development of preimplantation embryos, *Reproduction, Fertility and Development*, 26 (2014) 491-503.
- [256] X. Chen, J. Wang, Q. Qin, Y. Jiang, G. Yang, K. Rao, Q. Wang, W., Xiong, J. Yuan, Mono-2- ethylhexyl phthalate induced loss of mitochondrial membrane potential and activation of Caspase3 in HepG2 cells, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 33 (2012) 421-430.
- [257] S. C. Hasmall, N. H. James, N. Macdonald, A. R. Soames, & R. A. Roberts, Species differences in response to diethylhexylphthalate: suppression of apoptosis, induction of DNA synthesis and peroxisome proliferator activated receptor alpha-mediated gene expression, *Archives of Toxicology*, 74 (2000) 85-91.
- [258] A. M. Cummings and L. E. JR. Gray, Dibutyl phthalate: Maternal effects versus fetotoxicity, *Toxicology Letters*, 39 (1987) 43-50.
- [259] N.S. Gayathri, C.R. Dhanya, A.R. Indu, P.A. Kurup, Changes in some hormones by low doses of di (2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP), a commonly used plasticizer in PVC blood storage bags & medical tubing, *Indian Journal of Medical Research*, 119 (2004) 139-144.
- [260] R.E. Stamateris, R.B. Sharma, D.A. Hollern, and L.C. Alonso, Adaptive beta-cell proliferation increases early in high-fat feeding in mice, concurrent with metabolic changes, with induction of islet cyclin D2 expression, *The American Journal of Physiology- Endocrinology Metabolism*, 305 (2013) E149-159.
- [261] H. Sone and Y. Kagawa, Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice, *Diabetologia*, 48 (2005) 58-67.

- [262] T. Deng, Y. Zhang, Y. Wu, P. Ma, J. Duan, W. Qin, X. Yang, M. Chen, Dibutyl phthalate exposure aggravates type 2 diabetes by disrupting the insulin-mediated PI3K/AKT signaling pathway, *Toxicology Letters*, 290 (2018) 1-9.
- [263] J. Wang, J. Li, K.R. Zahid, K. Wang, Y. Qian, P. Ma, S. Ding, X. Yang, X. Wang, Adverse effect of DEHP exposure on the serum insulin level of Balb/c mice, *Molecular and Cellular Toxicology*, 12 (2016) 83-91.
- [264] Y. Seino, K. Nanjo, N. Tajima, T. Kadowaki, A. Kashiwagi, E. Araki, Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus, *Diabetology International*, 1 (2010) 2-20.
- [265] T. Hanafusa, A. Imagawa, Fulminant type 1 diabetes: A novel clinical entity requiring special attention by all medical practitioners, *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*, 3 (2007) 36-45.
- [266] W.E. Winter, Diabetes disease management: differentiating type 1 and type 2 diabetes, *Clinical Laboratory News*, 31 (2005) 14-16.
- [267] American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, 32 (2008) 62-67.
- [268] D. E. Johnstan, Special considerations in interpreting liver function tests, *American Family Physician*, 59 (1999) 2223-2230.
- [269] K. D. R. Setchell, Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of isoflavones, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (1998) 1333-1346.
- [270] S.P. Cousin, S.R. Hugl, C.E. Wrede, H. Kajio, M.G. Jr. Myers, and C.J. Rhodes, Free fatty acid-induced inhibition of glucose and insulin-like growth factor I-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic beta-cell line INS-1, *Endocrinology*, 142 (2001) 229-240.

- [271] G. Dimitriadis, P. Mitrou, V. Lambadiari, E. Maratou, S. Raptis, Insulin effects in muscle and adipose tissue, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93 (2011) 52-59.
- [272] G.I. Shulman, Cellular mechanism of insulin resistance, *Journal of clinical investigation*, 6 (2000) 171-176.
- [273] S.E. Choi, R. Jung, Y.L. Lee, S.J. Lee, J.H. Lee, Y. Kim, H.S. Jun, K.W. Lee, C.B. Park, and Y. Kang, Stimulation of lipogenesis as well as fatty acid oxidation protects against palmitate-induced INS-1 beta cell death, *Endocrinology*, 152 (2011) 816-827.
- [274] S. Del Prato, A. Tiengo, The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus, *Diabetes metabolism research and reviews*, 3 (2001) 164-167.
- [275] P. Rajesh, S. Sathish, C. Srinivasan, J. Selvaraj, K. Balasubramanian, Diethyl hexyl phthalate (DEHP) is associated with insulin resistance in adipose tissue of male rat: protective role of antioxidant vitamins (C and E), *Journal of Cellular Biochemistry*, 114 (2013) 558-569.
- [276] W. Wang, Z.R. Craig, M.S. Basavarajappa, K.S. Hafner, J.A. Flaws Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces oxidative stress and inhibits growth of mouse ovarian antral follicles, *Biology of Reproduction*, 87 (2012) 152.
- [277] H.C. Chiang, C.H. Wang, S.C. Yeh, Y.H. Lin, Y.T. Kuo, C.W. Liao, F.Y. Tsai, W.Y. Lin, W.H. Chuang, T.C. Tsou, Comparative microarray analyses of mono (2-ethylhexyl) phthalate impacts on fat cell bioenergetics and adipokine network, *Cell Biology and Toxicology*, (2017).

- [278] M. Moore, Oncogenicity study in mice with di (2-ethylhexyl) phthalate including ancillary hepatocellular proliferation and biochemical analyses, Corning Hazleton Incorporated (CHV), (1997).
- [279] Y. Khasanah, Ratnayani, D. Ariani, M. Angwar, T. Nuraeni, In Vivo Study on Albumin and Total Protein in White Rat (*Rattus Norvegicus*) after Feeding of Enteral Formula from Tempe and Local Food, *Procedia Food Science*, 3 (2015) 274-279.
- [280] B. Wararut, Evaluation of biochemical, hematological and histopathological parameters of albino rats treated with *Stemona aphylla* Craib. extract, *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (2012).
- [281] Y. Zhang, S. Wang, T. Zhao, L. Yang, S. Guo, Y. Shi, X. Zhang, L. Zhou, L. Ye, Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) promoted lipid accumulation via JAK2/STAT5 and aggravated oxidative stress in BRL-3A cells, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184 (2019).
- [282] J. Hsu, C. Nien, S. Yeh, F. Tsai, H. Chen, T. Lee, S. Chen, Y. Kao, T. Tsou, Phthalate exposure causes browning-like effects on adipocytes in vitro and in vivo, *Food and Chemical Toxicology*, 142 (2020).