

**Dİ (2-ETİLHEKZİL) FİTALATIN PUBERTAL DÖNEMDEKİ  
ERKEK SIÇANLARDA GENOTOKSİK, HİSTOLOJİK VE  
BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF GENOTOXIC, HISTOLOGIC AND  
BIOCHEMICAL EFFECTS OF DI (2-ETHYLHEXYL)  
PHTHALATE ON PUBERTAL MALE RATS**

**GÖZDE KARABULUT**

**Prof. Dr. NURHAYAT BARLAS**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.

2014

**GÖZDE KARABULUT** 'un hazırladığı "**Di (2-ETİLHEKZİL) FİTALATIN PUBERTAL DÖNEMDEKİ ERKEK SIÇANLARDA GENOTOKSİK, HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Dürdane KOLANKAYA

Başkan

Prof. Dr. Nurhayat BARLAS

Danışman

Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Üye

Prof. Dr. Arzu KOÇKAYA

Üye

Prof. Dr. İsmet ÇOK

Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Canım Aileme...*

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

09/09/2014

GÖZDE KARABULUT

## ÖZET

# Di (2-ETİLHEKZİL) FİTALATIN PUBERTAL DÖNEMDEKİ ERKEK SİÇANLARDA GENOTOKSİK, HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Gözde KARABULUT**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

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

**Eylül 2014, 104 sayfa**

Bu çalışmada, plastikleştirici olarak kullanılan ve gündelik hayatta sıkça maruz kalınan 2-etilhekzilfitalat'ın (DEHP) pubertal dönemdeki erkek sıçanlarda genotoksik etkileri Comet testi ile araştırılmış, histopatolojik, hematolojik ve biyokimyasal analizler yapılarak incelenmiştir. Bu amaçla sıçanlar her grupta 6 hayvan olacak şekilde, pozitif kontrol (MMS), yağ kontrol, 100 mg/kg/gün, 200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün uygulama gruplarına ayrılmış ve 28 gün süreyle sıçanlara DEHP gavaj yoluyla oral uygulanmıştır. Deney sonuna kadar her hafta alınan kan örneklerinde genotoksik analiz yapılmıştır. Deney süresince sıçanlarda vücut ağırlığı, yem ve su tüketimleri ölçülmüştür. Deney süresi sonunda sıçanlardan alınan serum örneklerinde alanin aminotransferaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), üre, ürik asit, trigliserit, glikoz, kreatinin miktarları ölçülmüştür. Ayrıca kanda hematolojik analiz yapılmıştır. Karaciğer ve böbrek dokularında oluşabilecek histopatolojik etkiler ışık mikroskopunda incelenmiş ve değişik büyütmeler ile görüntülenmiştir. DEHP uygulanan gruplarda DNA hasarı oluşumu kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Trigliserit seviyelerinin de kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır. Yapılan histopatolojik incelemeler, DEHP'in böbrekte ve karaciğerde histopatolojik değişikliklere neden olduğunu ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Di (2-etilhekzil) Fitalat, Genotoksisite, Comet Testi, Sıçan, Karaciğer, Böbrek.

## **ABSTRACT**

# **INVESTIGATION OF GENOTOXIC, HISTOLOGIC AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF DI (2- ETHYLHEXYL) PHTHALATE ON PUBERTAL MALE RATS**

**Gözde KARABULUT**

**Master of Science, Department of Biology**

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

**September 2014, 104 pages**

In the present study, we investigated the genotoxic effects of DEHP which is widely used as a plasticizer and people were exposed in daily life on pubertal male rats. These effects were investigated with Comet assay and histopathological, hematological and biochemical analysis were investigated. For this purpose, rats were divided into 5 groups and each group had 6 animals. The dose groups were oil control, positive control (MMS), 100 mg/kg/day, 200 mg/kg/day and 400 mg/kg/day of DEHP. It was administered daily to the rats by oral gavage for 28 days and every week until the end of the experiment, genotoxic effect was measured in blood. During the experiment, body weights and feed and water consumption were recorded. At the end of the experiment blood samples were taken and hematological analysis, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), ure, uric acid, trigliserid, glucose, creatinine were determined in serum. Kidney and liver were dissected and tissues were investigated potential histopathologic findings and monitorized in different magnifications by the Leica light microscopy. DNA damage level was statistically different from treatment groups compared to the oil control. Triglycerid levels were also significantly higher in HFCS and sucrose groups. Histopathological examinations revealed histopathological changes in kidney and liver of rats received DEHP.

**Keywords:** Di (2-ethylhexyl) Phthalate, Genotoxicity, Comet Assay, Rat, Liver, Kidney.

## TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince beni yönlendiren, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurhayat BARLAS'a,

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

Comet testi analizlerinin yapılabilmesi için bize laboratuvarını açan sayın hocam Prof. Dr. İsmet ÇOK'a ve analizlerin hepsinde yanımda olup yardımcı olan sevgili uzman biyolog arkadaşım Gülşen GÖNEY'e

Deneyletimde ve her konuda bana yardımcı olup yol gösteren sevgili Egemen FOTO ve Araş. Gör. Fatma ZİLİFDAR'a,

Tezimin deneysel aşamalarında yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen, değerli arkadaşlarım Eylül TURASAN, Pınar KAÇAMAK ve Elnaz YOUSEFİ ARDEBİLİ'ye

Yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen başta oda arkadaşım Araş. Gör. Mehmet Kürşat ŞAHİN olmak üzere tüm Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Yardımcılarına,

Ne zaman arasam hemen koşarak gelen ve tez içinde ve dışında her konuda destek ve yardımcı olan canım kuzenim Damla Ceren AKIN'a, her konuda yanımda olup bana destek olan sonsuz güvendiğim canım teyzelerim Reyhan AKIN ve Şükran ÖZDEMİR'e,

Lisans döneminden beri yanımda olan, iyi ve kötü her anımı paylaştığım, her ihtiyacımda bir telefon kadar yakın olan canım dostlarım Araş. Gör. Hasan ÇALIŞKAN, Zeliha YILMAZ ve Araş. Gör. Merve ÖZCAN'a,

Yüksek lisansa başladığım günden beri birlikte güldüğüm, üzüldüğüm, sevindiğim, gezdiğim, eğlendiğim kısacası her anımı paylaştığım değerli dostlarım Derya AKKURT ve Araş. Gör. Sevcan ALDEMİR'e,

Beni gittiği her yolculukta yanında götüreren ve bu sayede uçak fobimi yenmemi sağlayan, her arayışımda bana güç veren ve güldüren, değerli hediyeleriyle beni şımartan değerli dostum Av. İpek GENÇOĞLU'na,

Her Őeyden 6nemlisi, hayatımın b6t6n anlarında yanımda olan, maddi ve manevi olarak hep beni destekleyen, g6venini hep hissettiğim canım babam Sermet KARABULUT'a, beni b6y6t6p bug6nlere getiren, her zaman arkamda olduğunu bilip g6venini her zaman hissettiğim, d6nyanın en fedakar annesi olan canım annem Nuran KARABULUT'a, her konuda bana akıl ve fikir verip yol g6steren, olgunluğuyla bana 6ok Őey katan ve yukarılara 6ıkaran, onsuz bir hayat d6Ő6nemediğim canım yol arkadaşım, canımın i6i kardeŐim Aslı KARABULUT'a sonsuz teŐekk6r ederim.

G6zde KARABULUT

Ankara, Eyl6l 2014



# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
1.GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.ENDOKRİN BOZUCULAR .....	3
2.1.1.Fitalatlar.....	8
2.1.1.1.Fitalatların Biyotransformasyonları .....	13
2.1.1.2.Fitalatların Yaptığı Toksik Etkiler .....	14
2.1.1.3 Di (2-etilheksil) Fitalat .....	16
2.1.1.3.1 DEHP' in Metabolizması.....	19
2.1.1.3.2 DEHP ve Toksisitesi .....	20
2.1.1.3.3 DEHP ve DNA Hasarı.....	21
2.2. Genetik Toksikoloji.....	22
2.2.1. DNA Hasarı.....	24
2.2.2. Genotoksisitenin Karsinojenезisle İlişkisi.....	27
2.2.3. Sık Kullanılan Bazı Genotoksisite Testleri.....	28
2.2.3.1 Kromozomal aberasyon (CA) testi.....	29
2.2.3.2. Mikroçekirdek Testi.....	29
2.2.3.3.Kardeş Kromatid Değişimi (Sister chromatid Exchange=SCE).....	29
2.2.3.4. COMET Tekniği (Single Cell Jel Elektroferez Tekniği) .....	29
2.2.3.4.1. Comet Testinin Avantajları .....	34
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	35

3.1. Gereç.....	35
3.1.1. Kimyasallar.....	35
3.1.2. Deney Hayvanlarının Temini.....	36
3.1.3. Laboratuvar Koşulları .....	36
3.2. Yöntem .....	36
3.2.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması.....	36
3.2.2. Vücut Ağırlıkları, Organ Ağırlıkları, Besin ve Su Tüketim Ölçümleri.....	37
3.2.3 Comet Yöntemi'nin Uygulanışı.....	37
3.2.3.1. Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	37
3.2.3.2. Lamların Hazırlanması.....	38
3.2.3.3. Taze Kandan Lenfositlerin İzole Edilmesi ve Hazırlanması.....	39
3.2.3.4. Lenfosit Sayımı ve Tripan Blue ile Canlılık Testi.....	39
3.2.3.5. Hücrelerin Lama Yayılması.....	39
3.2.3.6. Hücrelerin Lize Edilmesi.....	40
3.2.3.7. Alkali ile Muamele.....	40
3.2.3.8. Elektroforez.....	40
3.2.3.9 Boyama ve Değerlendirme.....	40
3.2.4. Histopatolojik İncelemeler.....	41
3.2.5. Hematolojik İncelemeler.....	41
3.2.6. Biyokimyasal İncelemeler.....	41
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	41
4. BULGULAR .....	43
4.1.Vücut ve Organ Ağırlıkları ile Besin ve Su Tüketim Sonuçları.....	43
4.2 Comet Analiz Sonuçları.....	46
4.3 Histopatolojik incelemeler.....	58

4.4 Hematolojik incelemeler .....	66
4.5.Biyokimyasal Analiz Sonuçları.....	67
5.TARTIŞMA .....	69
KAYNAKLAR.....	80

# 1. GİRİŞ

Çevremizde insan sağlığı bakımından tehlike oluşturan kimyasal maddelerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Günümüzde kimyasallar ve çevreden kaynaklanan kirleticiler, canlılar üzerinde toksik etki yapmakta ve onları strese sokmanın yanı sıra genetik yapılarını da bozmaktadırlar. Canlılar, doğal olarak tepkilerini fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik olarak göstermekte ve bu tepkiler laboratuvarıda ölçülmektedir. Genelde oral, dermal ya da solunum yoluyla maruz kalınan bu tür toksik maddelerin yol açtığı genetik bozukluklar ve hastalıklar, ilgili toksik etkene ve maruziyetin artışına paralel olarak artmaktadır [1].

Organizmaya dışarıdan alınarak endokrin fonksiyonları ve vücudun dengesini bozan, doğal ya da sentetik maddelere endokrin bozucular denir. Endokrin bozucular, hormonlara agonist ve/veya antagonist etkiler yapar. Bu etki, hormonun üretimine veya taşınması üzerine etki ederek, ya da hormon reseptörüne bağlanarak metabolize olması ve atılımını değiştirmesi ile ortaya çıkabilir. Bazı ilaçlar, dioksin ve dioksin benzeri bileşikler, poliklorlu bifeniller, bazı pestisitler, fitalatlar ve bisfenol A (BPA) gibi plastizer maddeler endokrin bozucu etkiye sahip maddeler arasında sıralanmaktadır. Bu maddelerin pek çoğu besinler, kozmetikler, kişisel bakım ürünleri, deterjanlar, oyuncaklar, plastik şişeler gibi günlük hayatta yoğun olarak kullanılan ürünlerde yer almaktadır.

Fitalatlar, yapı gereçleri, besin ambalaj gereci, tekstil, oyuncak, ocuk bakım ürünleri (biberon ve emzikler), kan torbası, enfüzyon seti, poli vinil klorür (PVC) tipi plastik ürünlerin esnekliğini ve dayanıklılığını sağlamak üzere plastikleştirici olarak kullanılan ve bu nedenle çok yaygın olarak karşılaşılan kimyasal maddelerdir [2]. Kozmetikler, parfümler ve sabunlar gibi kişisel bakım ürünlerinde de yaygın olarak kullanılırlar ve çok büyük hacimlerde üretilip tüketilirler. Plastik matriksinden sızmaları nedeniyle tıbbi uygulamalarla temas edildiği gibi, toplumun fitalatlara teması genellikle gıda ve kozmetik bakım ürünleri yoluyla olmaktadır. Di (2-etilhekzil) fitalat (DEHP), en yaygın kullanılan fitalat türevidir ve PVC-tıbbi malzemelerde %20–40 oranında bulunmaktadır [3,4]. Di (2-etilhekzil) fitalat ve diğer fitalatlar, endokrin bozucu kimyasal maddeler olarak değerlendirilmektedir. Özellikle ocukların bu etkiye daha duyarlı olduğu bilinmektedir [5]. Fitalatların

sıçanlarda karsinojenite, ftal ölüm, malformasyonlar, anti-androjenik etki, teratojenite, testiküler hasar ile üreme sistemi üzerinde diğer toksik etkilere neden oldukları yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [6].

Bu çalışmada, erkek sıçanlarda di (2-etilhekzil) fitalata pubertal dönemde maruziyetin yol açtığı metabolik etkiler, hematolojik, biyokimyasal, histopatolojik parametreler ile incelenmiş ve genetik bir hasar olup olmadığı "Comet testi" ile *in vivo* olarak araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Endokrin Bozucular

Endokrin Bozucular; endokrin sistemin gelişimi ve fonksiyonunu değiştiren, dışardan alınan madde veya madde karışımlarıdır [7,8]. Bu maddeler, hormonların üretim, salınım, bağlanma, taşınma, aktivite, yıkım ve vücuttan atılımları üzerine etki etmektedirler.

Endokrin bozucular, ilk olarak 1962'de biyolog Rachel Carson'un 'Silent Spring' isimli kitabında kimyasal maddelerin kuşlar üzerindeki zararlı etkileriyle ilgili incelemelerini yayınlamasıyla gündeme gelmiştir [9]. 1970'lerde Sullivan ve Barlow, çevredeki kimyasal maddelerin fötüs ve insanlar üzerindeki zararlı etkilerini bildirmişlerdir [10]. 1988'de Finkelstein ve ark. 'Bir cenaze hazırlayıcısının gizemi' başlıklı makalelerinde, 50 yaşındaki bir cenaze hazırlayıcısı erkekte; tedrici libido kaybı, testislerde küçülme, sakal büyümesinde yavaşlama, jinekomasti şikayetlerinin endokrin bozucu ile ilişkili olduğunu saptamışlardır [11]. Hasta serumunda, bilinmeyen bir maddenin radyoaktif işaretlenmiş östrojen ile yer değiştirdiği ve maddenin kaynağının devamlı kullanılan mumya kremi olduğu saptanmıştır. Kremle karşılaşma kesilince şikayetler düzelmiştir. Colborn 1993'de tıbbi açıdan, çevredeki kimyasal maddelerin endokrin sistem üzerine etkilerini vurgulamıştır [12]. İnsan vücudunda ölçülebilen kimyasal maddelerin sayısı arttıkça ve bu kimyasalların endokrin sistem, üreme sistemi, sinir sistemi ve karsinogenezi üzerine etkileriyle ilgili gözlem ve yayınlar çoğaldıkça; konu Birleşmiş Milletler'in, Dünya Sağlık Örgütü'nün ve hükümetlerin de gündemine girmiştir. 14 Mart 1997'de Birleşmiş Milletler Çevre ve Kalkınma Toplantısı'nda endokrin bozucular ele alınmıştır. Bu toplantıda insan vücudunda ölçülebilen en az 500 kimyasal maddenin taşındığı, bu maddelerin 1920'den önce insan kimyasının bir parçası olmadığını, son 20 yılda doğan bebeklerin anne rahminde bu maddelerle karşılaştıklarını bildirmiştir [13]. Başta Amerika Birleşik Devletleri (ABD) olmak üzere pek çok ülke hükümeti, 'Çevre ve Doğal Kaynaklar Komiteleri' kurarak, endokrin bozucularla ilgili araştırmalar başlatmış ve stratejiler geliştirmişlerdir.

Türkiye için endokrin bozucular son yıllarda gündeme gelmiştir. 2003 yılında Büyükgebiz ve ark., 'yöresel çilek festivali' sırasında, büyük ve düzensiz şekilli

ilek tüketen ve erken yaşta meme gelişimi gösteren üç vaka bildirmişler ve ilek büyütücü maddelerin meme gelişimi yapabileceğine dikkat çekmişlerdir [14].

Endokrin bozucu ile karşılaşma yaşına, süresine, miktarına, tek veya karışım maddeler ile alınma durumuna göre endokrin bozucuların etkileri değişebilmektedir. Bu açıdan en hassas dönemler gebelik, süt çocuğu ve pubertedir. Gebelikte endokrin sistemin işlevini bozan çeşitli kimyasallarla karşılaşma; fetusun endokrin sistemini etkileyerek, çok sayıda gelişim bozukluğuna neden olmaktadır. Bu kimyasal maddelerin çoğu plasentada etkisiz hale getirilememektedir. Maddelerin miktarları ne kadar fazla olursa etkisi de o derece artmaktadır fakat endokrin bozucularda durum diğerlerine göre farklı olabilmekte, düşük dozlarda da yüksek etki gözlenebilmektedir. Gebelik döneminde endokrin bozucular ile karşılaşıldığında; doğum ağırlığını, boyunu ve endokrin bezlerin çalışmasıyla ilgili eşik değerleri değiştirebilmektedirler. Bu maddeler ayrıca büyümenin çok hızlı olduğu puberte döneminde de özellikle hormonal değişikliklere yol açarak erken ergenlik gibi istenmeyen durumlara sebep olabilmektedirler [8,15].

Çevrede doğal olarak bulunabildiği gibi farklı sentetik ve endüstriyel ürünlerin içerisinde de yer almaktadırlar (Çizelge 2.1) [16,17].

Doğal endokrin bozucular; yarı ömürlerinin kısa olması ve dokularda birikmeden kolaylıkla vücuttan atıldıkları için genellikle önemli yan etkiler oluşturmayan maddelerdir. Bunların en iyi bilineni fitoöstrojenlerdir. Fitoöstrojenler, vücutta üretilen östrojenlere göre daha zayıf etki gösterirler ve günlük hayatta sık olarak tüketilen besinlerde (sarımsak, maydanoz, hububat, havuç, patates, vişne, ilek, elma ve kahve v.b) bulunurlar. Ancak fitoöstrojenler, yoğun ve çok miktarlarda özellikle sentetik olarak üretilenlerin alınmaları sonucunda belirgin etkiye neden olmaktadır [17].

Sentetik endokrin bozucular; endüstride, tarımda ve evde kullanılan değişik birçok ürünün içinde bulunurlar [18,19]. Güçlü östrojenik etkisi olan “diethylstilbestrol” (DES) en çok tanınandır. DES, ilk defa 1938 yılında üretilmiş, ABD ve Avrupa’da uzun yıllar boyunca zehirlenmelerde, erken doğum tehditinde ve fetal ölümlerin önlenmesinde kullanılmıştır. Ayrıca çalışmalarda, DES’e maruz kalan bayanlarda meme kanseri gelişme riskinin yaklaşık 2 kat arttığı ve DES’e intrauterin maruz

kalan kızlarda serviks kanseri, overyan germ hücre kanseri, serviko-vajinal displazi ve vajinal clear-cell adenokarsinoması ile intrauterin maruz kalan erkeklerde minör ürogenital anomali ve testis kanseri riskinin arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle DES piyasadan kaldırılmıştır [20,21].

Temizlik malzemeleri, fungusitler (mantar ilaçları), pestisitler (tarım ilaçları), herbisitler (yabani otları yok eden ilaçlar) ile boyalar, plastikler ve çözücüler gibi organik kimyasalların endokrin bozucu olma potansiyeli vardır. Bu maddelerin çoğunun yağda eriyerek yağ dokusunda birikerek veya yıkılıp zararsız hale getirilmeleri işlemi zor olduğu için vücutta uzun süre kalıp zararlı etkilere yol açtığı gösterilmiştir [21]. Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerine etkileri incelendiğinde özellikle üreme sistemi ve tiroid fonksiyonlarını etkilemekle birlikte diğer birçok etkilerinin de olduğu tespit edilmiştir [18,19].

<b>Çizelge 2.1: Başlıca Endokrin Bozucular [16,17]</b>	
Fitoöstrojenler	Daidzein, Genistein, Formononetin, Biokanin-A, Prunetin, Pratensein, Glisetein, Ekuol, Enterodiol
Organohalojenler	Dioksinler, Furanlar, Poliklorine Bifeniller, Hekzaklorobenzen, Pentaklorofenol
Pestisitler	Alaklor, Aldikarb, Amitrol, Atrazin, Benomil, Karbaril, Klordan, Diklorodifeniltrikloroetan ve metabolitleri, Endosülfan, Etilparation, Heptaklor, Kepon, Ketokonazol, Lindan, Malation, Metoksiklor, Vinklozolin, Trifluralin
Fitalatlar	Di (2-etilhekzil) fitalat, Butil benzil fitalat, Di-n-butil fitalat, Di-n-fetil fitalat, Di-hekzil-fitalat, Di-etil fitalat, Di-propil fitalat, Diklorohekzil fitalat
Ağır Metaller	Arsenik, Kadmiyum, Uranyum, Kurşun, Civa
İlaçlar	Doğum Kontrol Hapları, Dietilstilbestrol, Simetidin
Diğerleri	Bisfenol A,B ve F, Etan dimetan, Sulfonat, Metanol, Benzofenol, 4-nitrotoluen

Endokrin bozucuların zararlı etkileri açısından, yaşamın hangi döneminde maruz kalındığı büyük önem taşımaktadır. Bu dönemlerin başında intrauterin dönem yer almaktadır [22,23]. Örneğin çok toksik bir dioksin olan 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD)'ye, intrauterin maruz kalan erkek kemirgen hayvanların dış ve iç genital organlarının maskülizasyonunda, testislerin inmesinde, androjenlerin



üretiminde ve spermatogenezde problemler yaşandığı tespit edilmiştir. Ancak TCDD'ye postnatal maruz kalınması halinde sadece spermatogenez ile somatik ve genital büyümenin olumsuz yönde etkilendiği saptanmıştır [24].

Endokrin bozucuların oluşturacağı olumsuz etkide maruz kalınan doz ve etkilenme süresi de ortaya çıkacak etki için önemli faktörlerdendir. Etkilenme süresi uzadıkça veya doz arttıkça oluşabilecek olumsuz etki daha da şiddetli olabilmektedir. Endokrin bozucular, her zaman aynı etkiye neden olmamaktadır. Örneğin düşük dozda östrojen reseptörlerine bağlanarak etki gösteren bir kimyasal bozucu, yüksek dozda ise androjen reseptörlerine bağlanarak anti-androjenik etki gösterebilir. Endokrin bozucuların doz-cevap eğrisi her zaman doğrusal değildir. Unutulmaması gereken diğer bir nokta da endokrin bozucuların aynı anda birden fazla sistemi etkileyebilmesidir. Örneğin soyada bulunan Genistein, zayıf bir östrojenik madde olup üreme sisteminde bazı patolojilere neden olmasıyla birlikte, aynı zamanda tiroid peroksidazı inhibe ederek tiroid patolojilerine de neden olabilmektedir [25].

Endokrin bozucuların genellikle doza bağlı bir yanıt ilişkisi yoktur. Bu nedenle 'nonmonotonik' bir doz-yanıt ilişkisinden bahsedilir. Tek bir endokrin bozucu ile farklı yanıtlar görülebilir ve etkileri bir latent dönemin ardından ortaya çıkabilir. Bir kısmı yağ dokusunda biriktiği için uzun yıllar insan vücudunda kalabilir. Kendi etkileri farklı, metabolitlerinin etkileri farklı olabilir. Yaşamın bazı dönemleri kritik dönem olup az miktarda alınan endokrin bozucu bir kimyasal bile büyük etkiler gösterebilir. Bazen etki bu maddelerle yüzlerce kez karşılaşma sonucu ortaya çıkabilir. Bu maddeler atmosfer, sular ve gıda zincirlerinde bulunduğu için konu evrensel bir boyut kazanmaktadır [26,27]. Gebelikte etkisi, alınan doza ve alınma zamanına göre değişmektedir [28]. En önemli özelliği bazı etkilerinin nesiller boyunca ortaya çıkmasıdır. Bu da epigenetik mekanizma ile açıklanmakta olup bu maddelerin DNA sekansında değişiklik yapmadan fonksiyonunda değişmeye yol açarak etkiye neden olabilmesidir [29]. Germ hücrelerindeki epigenetik değişiklikler bir nesilden diğerine geçerek kalıtsal olabilir. Hayvan deneylerinde DES'e maruz bırakılan farelerin sadece yavrularında değil döller boyunca ( $F_1, F_2$  v.b) benzer bozuklukların görülmesi epigenetik mekanizma ile açıklanmaktadır.

Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerine etkileri incelendiğinde özellikle üreme sisteminde değişik mekanizmalarla birçok patolojiye yol açtığı gösterilmiştir

[30,31]. Endokrin bozucuların çoğu, östrojenik etkili olmakla birlikte antiöstrojenik ve antiandrojenik etki gösteren bozucular da bulunmaktadır. Ayrıca gonadotropin düzeylerini değiştirerek ya da sıklıkla reseptörlerini uyararak veya engelleyerek etki etmektedirler [32,33]. Fitalatların ve ketokonazolün direk androjen sentezini inhibe ettiği, DES'in erkek sıçanlarda hipotalamus-hipofiz-gonad aksını baskıladığı gösterilmiştir [20]. Fitalat verilen prepubertal ve yetişkin erkek sıçanların testislerinde belirgin hasar olduğu gösterilmiştir [34].

Bugün için sentetik endokrin bozuculardan bazılarının organ dokularında oksidatif stres üretimi ile apoptotik etki yaptığı gösterilmiştir. Özellikle gonadlarda oluşan apoptotik hücre ölümünün en önemli nedenlerinden birinin oksidatif stres olduğu ileri sürülmektedir. Endokrin bozucuların çok değişik mekanizmalar ile antioksidan enzimleri inhibe ettiği ve ortamda reaktif oksijen radikallerinin artmasıyla apoptotik hücre ölümüne neden oldukları düşünülmektedir. Nitrik oksidin DNA'da pürin ve pirimidinin deaminasyonuna neden olarak DNA zincirinde kırılma ve mutasyonlarda artışa neden olabildiği saptanmıştır [35]. Nitrik oksidin tetiklediği DNA hasarından sonra apoptoz sürecinin başladığı ileri sürülmektedir [36]. Ayrıca nitrik oksit, oksidatif DNA hasarını uyarmakla birlikte DNA tamir mekanizmalarını inhibe ederek apoptozise neden olmaktadır [37]. Apoptotik hücre ölümünde kalsiyum-kalmodulin bağımlı protein kinaz - fosfataz sistemi, kalsiyum bağımlı endonükleaz veya membran lipid peroksidasyonunun uyarılmasının da DNA kırılması ve hücre ölümüne neden olan mekanizmalar olabileceği ileri sürülmektedir. Örneğin deltametrine maruz kalan sıçanlarda, testiküler apoptoz ve DNA hasarı gösterilmiştir [36].

Son yıllarda özellikle çevresel koşulların (beslenme tarzı gibi) etkisi ile pubertenin başlangıcının erken yaşlara kaydığı gözlenmektedir. Ancak bunun dışında, bazı endokrin bozucuların pubertenin erkene kaymasında etkili olduğu da ileri sürülmektedir [30]. Yer cilası ve onların çözücüleri ile temas halindeki iki kız çocukta, erken puberte tespit edilmiş ve temas engellendiğinde pubertenin durduğu vurgulanmıştır [38]. Puerto Rico'da 1979 yılından itibaren prematür telarşlı çocukların sayısının ciddi derecede artması nedeniyle, bu çocuklar incelendiğinde serum fitalat düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir [39].

Endokrin bozucu kimyasallar ve ergenlik gelişimi arasındaki ilişkilerle ilgili yapılan pek çok epidemiyolojik çalışmada PCB, PBB, dioksin, DDE ve diğer kalıcı

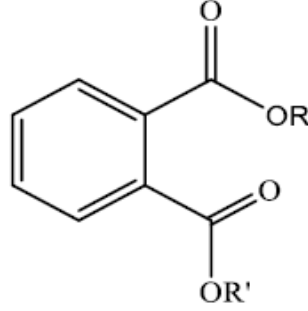
pestisitler üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak yumuşak plastik oyuncakların yapıldığı polivinil klorid plastikler ve besin paket materyallerinde bulunan fitalatlar gibi ev içi kimyasalların gündeme gelmesi daha sonra olmuştur. 2000 yılında Colon ve ark., çocuk endokrinologların 1979'dan beri erken meme gelişimi olan hasta sayısında artma olduğu konusunda alarma geçmiş olduklarını ve 6580 erken ergenlikli vakanın %71'inde erken meme gelişiminin rapor edildiğini saptamışlardır. 41 prematüre telarşlı hasta ve 35 kontrol grubunda, pestisitler ve metabolitleri ile fitalat ester ailesinin bazı bileşikleri çalışıldığında, erken meme gelişimi olanlarda serum fitalat ve fitalat esterlerinin (DEHP gibi) kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek bulunduğu görülmüştür [40]. Sonuçta, fitalatların *in vitro* östrojenik ve anti-androjenik etkilerinin bu durumdan sorumlu olduğu kanaatine varılmıştır. Ancak McKee, ölçülen fitalat düzeylerinin vinil laboratuvar malzemeleri ile kontamine kanlara bağlı olabileceğini, insan vücudunda fitalat esterlerinin hızla monoesterlere metabolize olduğunu, bu nedenle bu metabolitlerin *in vitro* değerlendirmelerde aktif olmadığını iddia etmiştir. Özet olarak, doğum öncesi PBB ve DDE ile karşılaşma, ergenlikte DDE ile karşılaşma, ergenlik öncesi fitalat ile karşılaşma ergenlik bulgularının erkene kayması ile ilişkili bulunmuştur [41].

### 2.1.1 Fitalatlar

Dünyada yaygın bir şekilde kağıt ve karton, kozmetik, deterjan, şampuan, sabun ve boya üretimi gibi çok çeşitli endüstriyel sektörlerde hammadde veya yardımcı kimyasal madde olarak kullanılan fitalatlar kanserojen ve endokrin bozucu kimyasallar listesinde yer almaktadırlar. Endüstride kullanılma amacı esneklik özelliğini arttırmak olan fitalatların kullanımda olan 60'dan fazla tipi bulunmaktadır. Yüksek molekülü fitalat esterleri endüstrilerde %80 oranında yaygın olarak kullanılmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı fitalatlardan ise selülozikler, akrilikler ve üretanlar gibi vinil olmayan reçinelerde plastikleştirici olarak yararlanılmaktadır [42]. Düşük molekülü fitalatlar; kağıt, karton, kozmetik, deterjan, şampuan, sabun, otomotiv, inşaat ve yapı malzemeleri, tıbbi torba, tüpler ve boya üretiminde hammadde veya yardımcı kimyasal olarak kullanılmaktadır.

Fitalatlar, ya da fitalat esterler, fitalik asit esterleridir ve plastiklere eklendiklerinde uzun polivinil moleküllerin birbirleri üzerinde kaymasına izin verirler. Suda çözünürlükleri düşük, yağda çözünürlükleri yüksek ve uçuculukları düşüktür [43].

Fitalik anhidrid ile uygun bir alkolün (genelde 6-13 karbonlu) reaksiyonu ile elde edilirler, renksiz ve oda ısısında sıvı olan maddelerdir [44,45]. Fitalatların genel kimyasal yapısı Şekil 2. 1'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.1.** Fitalatların genel kimyasal yapısı [45]

İnsanların fitalatlara maruziyeti intrauterin hayatta başlar. En yüksek temas kaynağını yetiştirme, üretim, işleme ve ambalajlama esnasında fitalatlarla kontamine olan besinler oluşturur. Besin paketlemede kullanılan fitalatlar başta çocuklar olmak üzere yüksek derecede maruziyete neden olurlar. Çocuklar emzik, biberon ve oyuncaklar yoluyla fitalatlara maruz kaldığı gibi [46,48] polivinil klorür (PVC) yer kaplamaları ve perdeler, evde kullanılan aeresoller/ev parfümleri ve kozmetikler de çocukların maruziyet kaynaklarını teşkil eder [49,50]. Yüksek derecede maruziyet ise özellikle kan transfüzyonları ve diyaliz gibi tıbbi müdahalelerle olmaktadır. Medikal malzemelerde kullanılan PVC tipi plastiklerin yüksek fitalat içeriği nedeniyle, özellikle yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde yatan bebeklerin önemli ölçüde fitalata maruziyeti söz konusudur. Bazı tabletlerin kaplama materyali ile de yüksek oranda fitalat alımı olasıdır [50-53].

Besinler, plastik malzemeler (biberon, emzik), kozmetik bakım ürünleri ve medikal uygulamalarla olan temaslarda dikkate alındığında fitalatlar oral, dermal ve inhalasyon yolu başta olmak üzere tüm giriş yollarından organizmaya girerler [54,55]. Fitalatlar plasentayı geçebildikleri gibi anne sütüne de geçerler. Perinatal dönem ve süt emme döneminden itibaren çocukların maruziyeti başlar ve vücut ağırlığına kıyasla yüksek kalori tüketmeleri, vücut yüzey alanının düşük olması ve

ventilasyon hacimlerinin yetişkinden fazla olması nedeniyle maruziyet düzeyi yetişkinden daha yüksektir [56-59]. Yakın tarihte yayınlanan bir çalışma bebek idrarında da fitalat metabolitlerine rastlandığını gösterirken [60], hamile kadınlardan alınan idrar örneklerinde de çeşitli fitalat metabolitlerinin bulunuyor olması fitalatlara maruziyetin prenatal hayatta başladığını göstermektedir [61,62]. Çizelge 2.2’de bazı fitalatlar ve genel kullanım alanları verilmiştir. Çizelge 2. 3’ de ise dünya genelinde yaygın olarak kullanılan fitalat listesi verilmiştir.

**Çizelge 2.2:** Fitalatların genel olarak kullanım alanları [63]

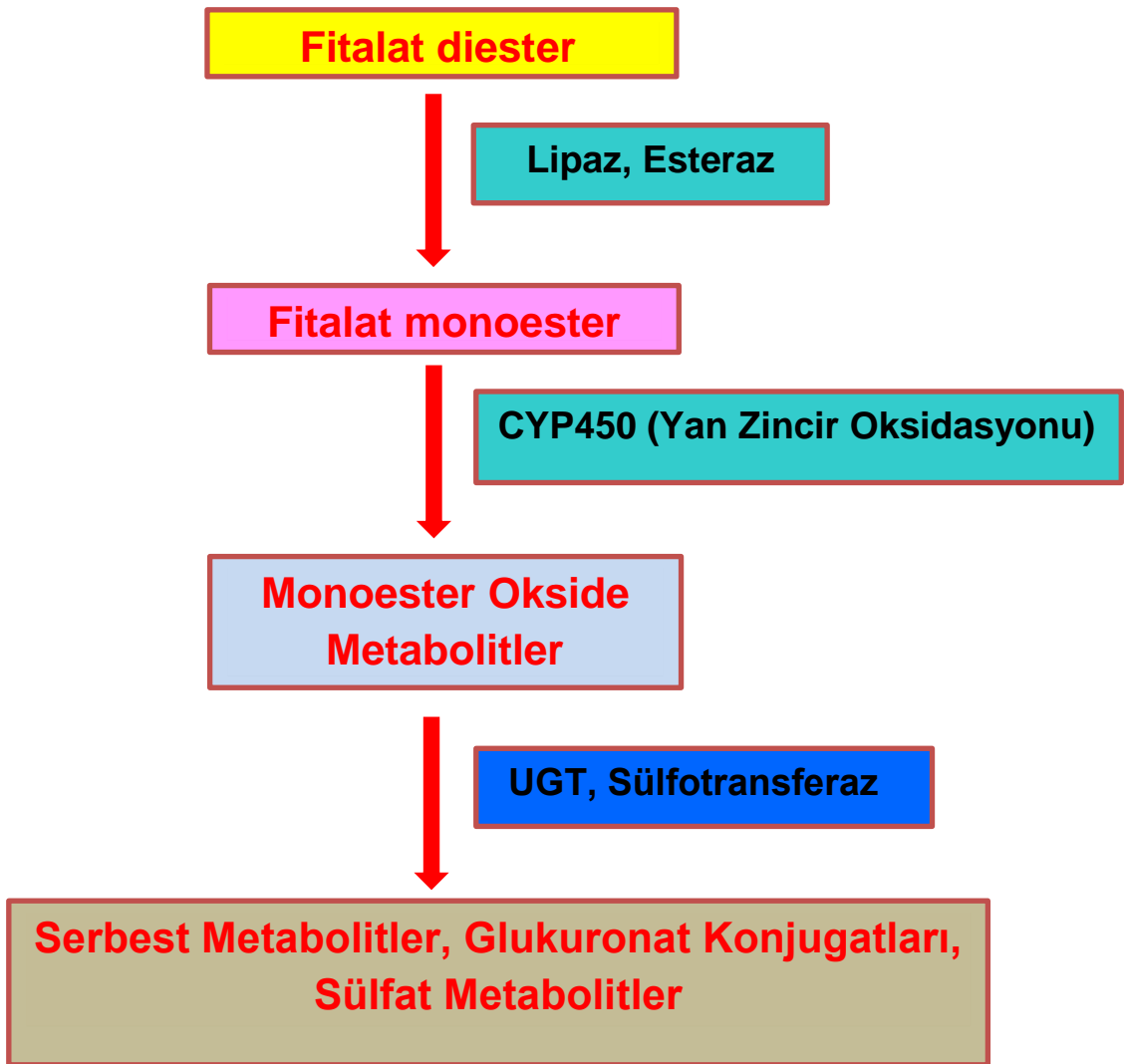
<b>Fitalat</b>	<b>Kısaltma</b>	<b>Kullanımı</b>
Dimetil fitalat	DMP	Repellent, plastikleştirici
Dietil fitalat	DEP	Kozmetiklerde (şampuan, parfüm, sabun, losyon), endüstriyel çözücü olarak, ilaçlarda (tablet kaplama, kapsül üretimi)
Dibutil fitalat	DBP	Ev ürünlerinde, kozmetiklerde, endüstriyel çözücü olarak, ilaçlarda (tablet kaplama, kapsül üretimi), yapıştırıcılarda
Diizobutil fitalat	DIBP	Ev ürünlerinde, kozmetiklerde, endüstriyel çözücü olarak, yapıştırıcılarda
Butil benzil fitalat	BBP	Vinil yer kaplamalarda, ev temizlik ürünlerinde, endüstride çözücü olarak, mühür üretimi
Disikloheksil fitalat	DCHP	Kauçuk ve polimer üretiminde stabilizatör
Di (2-etilheksil) fitalat	DEHP	Yumuşak plastiklerde plastikleştirici olarak (IV torbalar, oyuncaklar, ev ürünleri, gıda endüstrisinde gıda paketlenme torbaları), kağıt sanayi, elektrik kapasitörleri, boyalar/pigmentler, reçineler, kauçuk sanayi, tekstil ürünleri
Dioktil fitalat	DOP	Yumuşak plastiklerde plastikleştirici olarak
Diizononil fitalat	DINP	Yumuşak plastiklerde plastikleştirici olarak DEHP yerine kullanımı

**Çizelge 2.3:** Dünya genelinde yaygın olarak kullanılan ftalatlar [63]

<b>Fitalat</b>	<b>Kısaltma</b>	<b>Kimyasal Yapı</b>	<b>CAS No.</b>
Dimetil ftalat	DMP	$C_6H_4(COOCH_3)_2$	131-11-3
Dietil ftalat	DEP	$C_6H_4(COOC_2H_5)_2$	84-66-2
Dialil ftalat	DAP	$C_6H_6(COOCH_2CH=CH_2)_2$	131-17-9
Di-n-propil ftalat	DPP	$C_6H_4[COO(CH_2)_2CH_3]_2$	131-16-8
Di-n-butil ftalat	DBP	$C_6H_4[COO(CH_2)_3CH_3]_2$	84-74-2
Diisobutil ftalat	DIBP	$C_6H_4[COOCH_2CH(CH_3)_2]_2$	84-69-5
Di-n-pentil ftalat	DNPP	$C_6H_4[COO(CH_2)_4CH_3]_2$	131-18-0
Disikloheksil ftalat	DCP	$C_6H_4[COOC_6H_{11}]_2$	84-61-7
Bütilbenzil ftalat	BBP	$CH_3(CH_2)_3OOC C_6H_4COOCH_2C_6H_5$	85-68-7
Di-n-hekzil ftalat	DNHP	$C_6H_4[COO(CH_2)_5CH_3]_2$	84-75-3
Butildesil ftalat	BDP	$CH_3(CH_2)_3OOC C_6H_4COO(CH_2)_9CH_3$	89-19-0
Di(2- etilhekzil) ftalat	DEHP	$C_6H_4[COOCH_2CH(C_2H_5)(CH_2)_3CH_3]_2$	117-81-7

### 2.1.1.1 Fitalatların Biyotransformasyonları

Memelilerde fitalatların absorpsiyonu ve metabolizması oldukça hızlıdır ve oluşan metabolitlerin bazılarının ana maddeden daha toksik olduğu gösterilmiştir [63,64]. Metabolik kapasite farkları ve yaş, cins, ırk ve demografik koşullar nedeniyle fitalat metabolizması bireylerarası farklılık göstermektedir. Örneğin çocuklarda okside metabolitlerin idrardaki oranının erişkinlerden daha yüksek olduğu belirtilmektedir [56,58]. Fitalat diesterlerinin genel biyotransformasyon şeması Şekil 2.2 de görülmektedir.



Şekil 2.2. Fitalatların biyotransformasyonu [56]



### 2.1.1.2 Fitalatların Yaptığı Toksik Etkiler

Farklı fitalat esterlerinin toksisite profilleri ve potensleri farklıdır; tür farkları, temas yolu ve temas yaşı yönünden farklılıklar gözlenir ve toksisitenin ana maddenin toksik bir metabolite dönüşümüne bağımlı olduğu bildirilmektedir [65]. Laboratuvar hayvanlarında fetal ölüm, malformasyon, karaciğer hasarı, antiandrojenik etki, testiküler hasar, peroksizom proliferasyonu ve özellikle de üreme toksisitesine neden oldukları gösterilmiştir. Fitalat esterlerinin bazıları kemiricilerde karsinojen etkilidir. Örneğin; DEHP hepatokarsinojendir [66]. DINP'in ise böbrek ve karaciğer kanseri yaptığı belirtilmektedir [67]. Ancak bu risklerin insanlara ekstrapolasyonu temas düzeyleri ve koşulları yönünden yapılamadığı gibi, yeterli düzeyde ve kanıtlayıcı insan verileri bulunmamakta, uzman panellerin ve yönetsel kuruluşların değerlendirme ve yorumları sürekli endişe içermekle birlikte kesin bir yargıya varmamaktadır. Nitekim DEHP kemiricilerde hepatokarsinojen olmasına karşın Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından “insanda karsinojen olarak sınıflanamayan” (KATEGORİ III) olarak değerlendirilmektedir [68].

DEHP'in karsinojenik etki mekanizması peroksizom proliferasyonu yapıcı etkisine ve insan karaciğerinde bulunmayan bir dizi hücresel olaya bağlanmakta [69], DINP'in neden olduğu böbrek neoplazilerinin insanda bulunmayan mekanizmalar aracılığıyla geliştiği ileri sürülmektedir [70]. “Gap junction” intrasellüler iletişiminin (GJIC) inhibisyonunun nongenotoksik karsinogenezin mekanizmalarından biri olduğu hipotezinden hareketle yapılan bir çalışmada, yüksek konsantrasyonda DEHP ve DINP'in fare ve sıçanlarda GJIC inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir [71]. Gözlenen inhibisyon ile karaciğer tümör indüksiyonu ve peroksizom proliferasyonu göstergeleri arasında bir bağlantı olduğu görülmüştür. Ancak primat ve insan karaciğer hücrelerinde bu inhibisyon gözlenmemiştir. Bu bulguların, DEHP ve DINP 'in kemiricilerdeki karsinojenik etkisinin insanlar için geçerli olmadığı görüşünü desteklediği bildirilmektedir [72].

Fitalatların deney hayvanlarında gelişimsel toksisite gösterdiği ve teratojen etkili olduğu bilinmekle birlikte insan verileri yetersizdir. Son yıllarda bu konuda insanlarda da, özellikle erkek üreme gelişimini etkileyen gelişimsel ve reproduktif toksikanlar olabilecekleri düşünülmekte, endokrin bozucu etkilerinin olabileceği ileri sürülmektedir [73].

Fitalatların hem erkek hem de dişi sıçanlarda büyümeyi ve seksüel gelişimi bozdukları gözlenmiştir [74,75]. ABD'de Ulusal Toksikoloji Programı'na (NTP) bağlı insanda üreme riskinin değerlendirilmesine ilişkin merkezin (CERHR) raporuna göre gestasyonun 6-15. günlerinde gebe hayvanlara yüksek doz fitalat (BBP, DBP, DEHP ve DINP) uygulaması ile görülen tipik malformasyonların nöral tüp defektleri, yarı damak ve iskelet anomalileri olduğu rapor edilmiştir [76]. DBP verilen sıçanlarda testosteron düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı ve testiste Leydig hücre sayısının önemli derecede azaldığı bulunmuştur [77]. Araştırmalar sıçanların testiküler toksikanların etkisine en duyarlı deney hayvanı türü olduğunu göstermektedir. In utero etkinliğin gestasyonun 6-20. günlerinde olduğu, 15-17. günlerin özellikle önemli olduğu bildirilmektedir [78,79]. Bu dönemde uygulanan fitalatların primer hedefi fotal testistir ve görülen ilk olay testiküler Leydig hücre fonksiyonlarının veya gelişiminin bozulması [80-82] ve testosteron düzeylerinin önemli ölçüde azalmasıdır [83,84].

Fitalatların testiküler toksisitesinde hayvanın yaşı kritik faktördür. Genç erişkin sıçanlarda reproduktif toksisite yüksek dozlarda görülse de, testiküler lezyonlar nispeten daha kısa uygulama ile ortaya çıkmaktadır. Pubertal hayvanlarda erişkin hayvanlara kıyasla daha düşük dozlarda toksisitenin ortaya çıktığı ve tübüler atrofiyle beraber testiküler toksisite ve ciddi testis lezyonları görüldüğü bildirilmektedir [85]. Ayrıca fitalatların ester yan zincir uzunluğunun toksisite için önemli olduğu ve 4-6 karbonluk bir uzunluğu gerektirdiği bildirilmiştir [86].

Çalışmalarda gözlenen hipospadias (dış idrar deliğinin penisin ucu yerine alt tarafa açılması), kriptorşidizm (testislerden biri ya da ikisinin birden skrotuma inmeyip karın boşluğunda bulunması), anogenital açıklıkta azalma, semen kalitesinde düşme, erişkin erkeklerde fertilitenin azalması gibi bozuklukların oluşturduğu klinik duruma "testiküler disgenez sendromu" adı verilmektedir [87,88]. "Fitalat sendromu" adı da verilen bu bozuklukların insanlarda da görülen olgular olması fitalatlara temas konusundaki endişeleri artırmakla birlikte kesin kanıtların bulunmadığı ya da verilerin yetersiz olduğu görülmektedir.

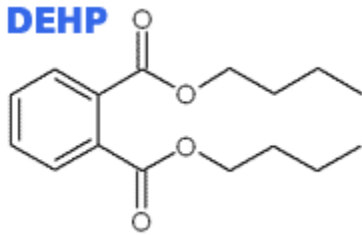
Fitalatların *in vitro* koşullarda karaciğer Kupffer hücrelerinde ROS oluşumunu, NADPH oksidaz üretimini ve mitojen sitokin salımını (örneğin; tümör nekroz faktör alfa (TNF $\alpha$ )) arttırdıkları, nükleer faktör kappa (NF-kB)'yi aktive ettikleri gösterilmiştir [89]. Peroksizom proliferatörü etkileriyle kemiricilerde peroksit üretici

enzimlerin aktivitelerini artırırken, peroksit yakalayıcı enzimlerin aktivitelerini değiştirmedikleri [90], neden oldukları oksidatif stresin 8-okzo-2'-deoksiguanozin (8-okzodG) gibi DNA hasarlarının oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir [91]. Son zamanlarda infertil erkeklerde yapılan bir çalışmada, Comet testi ile incelenen sperm DNA'sı hasarının idrar fitalat düzeyleri ile ilişkisi araştırılmış, DEP'in metaboliti olan monoetilfitalat (MEP) ile DNA hasarı arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir [92].

Di (2-etilhekzil) fitalat, insanlar tarafından üretilen ve maruz kalınan en yaygın fitalatlardan biridir ve plastiklere esneklik katmak için kullanılır [93]. Di (2-etilhekzil) fitalat, bir östrojen agonisti ve testosteron antagonisti olarak kabul edilmektedir ancak toksisite mekanizmaları tam aydınlatılamamıştır [94]. En sıklıkla maruz kalınan fitalatın DEHP olması, bu fitalatın etkilerinin diğer fitalatlara göre çok daha fazla araştırılmasına yol açmıştır.

### 2.1.1.3 Di (2-etilhekzil) fitalat

DEHP, plastizr olarak en yaygın kullanılan fitalat türevidir. 2-etilhekzanoln fitalik anhidrid ile reaksiyonu sonucu elde edilir [95]. DEHP 'in kimyasal formülü Şekil 2.3'de verilmiştir.



**Şekil 2.3** Di(2-etilhekzilfitalat) kimyasal formülü [95]

İlk kez 1939 yılında A.B.D'de üretilmeye başlanmıştır. 2002 yılında sadece A.B.D.'de 110 milyon ton DEHP retilmiştir [96]. DEHP, PVC plastizr olarak yapı malzemelerinden (duvar kâğıtları, yer kaplama malzemeleri), arabalara, giysilerden (yağmurluklar, yağmur botları), besin ambalaj materyaline, diş kaşıyıcılarından çeşitli oyuncaklara ve emzik ve biberon başlıklarına kadar çok çeşitli amaçlarla kullanılmaktadırlar. ABD'de populasyonun DEHP'e maruziyetinin 3-30 µg/kg/gün düzeyinde olduğu tahmin edilmekte, bunun çok önemli bir

kısının besinler yoluyla olması nedeniyle kronik temasın tolere edilebilir düzeyleri aşabileceğinden endişe duyulmaktadır ve bu doğrultuda maruziyet kaynaklarını ve düzeylerini en aza indirmek için tedbir alınmaya çalışılmaktadır [74]. Nitekim çocukların olası zararlı etkilerden korunması amacıyla oyuncaklarda ve çocuk bakım ürünlerinde DEHP'in kullanımına, Avrupa Birliğinde ve ABD'de son yıllarda yasak getirilmiştir [97,98]. EPA, DEHP'in referans dozunu (RfD) 20 µg/kg/gün olarak vermektedir [99]. Avrupa Birliğinde gıda katkı maddeleri ile ilgili bilimsel panel (AFC), DEHP'in testiküler toksisitesine ilişkin "advers etki gözlenmeyen düzey (NOAEL)" değerinin 5 mg/kg/gün olmasını esas alarak "tolere edilebilir günlük alım düzeyi"ni (TDI) 50 µg/kg olarak belirlemiştir [100].

DEHP oral, dermal, inhalasyon yoluyla absorbe edilmekte ve DEHP'e parenteral yol ve hemodiyaliz yoluyla da maruz kalınmaktadır. PVC ve medikal malzemelerde kullanılan fitalat sadece DEHP'tir ve kullanım oranı %20-40 düzeyindedir. Yetişkinlerde PVC intravenöz sıvı torbaları ve boruları dahil çeşitli medikal alet ve malzemelerle yapılan müdahaleler sonucu maruz kalınan DEHP düzeylerinin genel populasyon düzeylerinin 1000 kat üzerinde olabileceği bildirilmektedir. Aynı nedenlerle hamilelikte yoğun medikal tedavi gören annelerin bebeklerinde ve kritik medikal tedavi gören yeni doğanlarda DEHP fitalat maruziyetinin çok yüksek boyutlarda (genel populasyonun 100-1000 katı) olduğu bildirilmektedir [101]. Yaş gruplarına göre tahmini günlük DEHP alımı Çizelge 2.4'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.4:** Tahmini günlük DEHP alımı [74]

Yaş grubu	Günlük DEHP alımı (ortalama, µg/kg/gün)
Erişkin (20-70 yaş)	8.2
Genç (12-19 yaş)	10
Çocuk (5-11 yaş)	18.9
Oyun çocuğu (7 ay-4 yaş)	25.8
Süt çocuğu (0-6 aylık)	
Mama	5.0
Anne sütü	7.3

Bu bilgiler ışığında toplumun her yaş grubu dahil edilince ortalama günlük insanların kilo başına 3-30 µg DEHP'e maruz kaldığı hesaplanmaktadır. Bu hesaba iş yerinde maruziyet, tıbbi maruziyet ve çocukların plastik oyuncaklar ile maruziyeti dahil edilmiştir. Süt çocuğu ve oyun çocuklarında kg başına alınan günlük DEHP oranı daha yüksek olmaktadır çünkü bu grubun kg başına diyetinde daha fazla süt ürünü bulunması, dakikada yaptığı solunum sayısının erişkinlerden daha fazla olması ve plastik oyuncakları ağızlarına götürerek temas etmeleri nedeniyle etkilerinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir [74]. A.B.D'de ölçülen bazı besin maddeleri ve içerdiği DEHP konsantrasyonları Çizelge 2.5 'te verilmiştir.

**Çizelge 2.5:** Besin maddelerinde bulunan DEHP miktarları [74]

<b>Besin Maddeleri</b>	<b>Ortalama (<math>\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}</math>)</b>
Meşrubatlar	0.043
Tahıl	0.05
Yumurta	0.12
Balık	0.001
Meyveler	0.02
Sebzeler	0.048
Tohumlar	0.14
İşlenmiş et	0.05
İşlenmemiş et	0.45
Süt	0.035
Kabuklu kuruyemiş ve baklagiller	0.045
Kümes hayvanları	0.9
Çocuk maması (toz)	0.12
Çocuk maması (süt)	0.006
Anne sütü	0.062

#### **2.1.1.3.1 DEHP'in Metabolizması**

İnsanlarda oral yoldan alındığında %20-25 oranında absorbe edilir, dermal absorpsiyonu ise düşüktür. Ayrıca solunum yoluyla da absorbe olabilirler [102]. Ancak gastrointestinal absorpsiyonun mekanizması karmaşık olup diester yapılı DEHP' in kemiricilerde oral alımını takiben hızla absorbe edildiği, örneğin sıçanlarda oral dozun %90 'ının absorbe edilebildiği gösterilmiş ve bağırsak lümeninde pankreatik lipazlar ve intestinal mukozadaki enzimlerle hızla monoester türevi toksik metabolit olan MEHP 'ye dönüştüğü ve tüm dokulara dağıldığı bildirilmektedir [103]. Daha ileri metabolizması Sitokrom P450 4A (CYP4A), alkol

ve aldehit dehidrogenazlar ile iki kez okside edilerek gerçekleşir [104]. DEHP metabolitleri glukuronidasyonu takiben idrar ve feçes yoluyla atılırlar. Primatlarda DEHP'i metabolize eden enzimlerin aktivitelerinin kemiricilere kıyasla 100 kez düşük olduğu bildirmiştir. DEHP'in yarı ömrü 24 saat olup %80 'i 5-7 gün içinde vücuttan atılmaktadır [105].

#### **2.1.1.3.2 DEHP ve Toksisitesi**

DEHP kemiricilerde hepatokarsinojen olduğu ve bu etkinin mekanizması peroksizom proliferasyonu yapıcı etkisine ve insan karaciğerinde bulunmayan bir dizi hücresele olaya bağlanmakta, insanlarda karsinojenik olarak sınıflandırılmayacağı kabul edilmektedir [100]. Amerika Birleşik Devletleri'nde National Toxicology Programı'nda yapılan çalışmalarda, DEHP'in fare ve sıçanlarda karaciğer tümörüne neden olduğunun bulunması sonucu bununla ilgili yayını takiben bu madde üzerindeki araştırmalar yoğunlaşmıştır. DEHP'in karsinojenik etkileri hakkındaki son değerlendirmede Dünya Sağlık Örgütü'ne bağlı Kanseri Araştırma merkezi (IARC) bu maddenin fare ve sıçanlarda karsinojenik etkileri ile ilgili yeterli delil olduğunu bildirmektedir [105].

DEHP, sıçanlarda her iki eşeyde de üreme toksikantıdır, ancak en duyarlı sistemin gelişmekte olan erkek üreme sistemi olduğu ve bu mekanizmanın karsinojenite mekanizmasından farklılık gösterdiği belirtilmektedir. DEHP'in gelişimsel ve reproduktif toksik etkisi dişi sıçanlarda erkek sıçanlara oranla daha geç başlar ve çok daha yüksek dozu gerektirir. DEHP ve metaboliti olan MEHP'nin ana hedefi testis (Sertoli hücreleri) ve overlerde granuloza hücreleridir. Testislerde patolojik değişiklikler ve sperm sayısında azalma en belirgin toksik etkilerdir. Ayrıca DEHP'e intrauterin maruziyetle erkek yavrularda testis ağırlığında azalma, Sertoli hücrelerinde vakuolizasyon, seminifer tübüllerde atrofi ve fertilité azalması bildirilmiştir [106,107]. Testiküler hasarın FSH inhibisyonuna bağlı olduğu, uzun süre DEHP'e maruziyetin ise LH ve estradiol seviyelerini artırdığı bildirilmektedir [106]. Estrojen reseptörlerinin kardiyovasküler sistem ve kemik dokusu gibi diğer dokularda da var olduğu düşünülürse, serum estradiol seviyelerindeki değişimlerin sadece gelişimsel ve reproduktif toksisiteye değil, diğer birçok farklı fizyolojik değişikliğe neden olabileceği düşünülebilir [108,109]. DEHP'in androjen sentezi üzerine de etkisi vardır ve bu etki yaşla azalmaktadır. DEHP, steroidojenik

enzimleri inhibe ederek, anti-androjenik bir etki göstermektedir; CYP450scc, 3- $\beta$ -hidroksisteroid dehidrojenaz, 17- $\beta$ -hidroksisteroid dehidrojenaz ve CYP450 17 $\alpha$  inhibisyonu yapmaktadır. Ayrıca, DEHP'in testiste apoptozu indüklediği bildirilmiştir [110]. Gestasyon süresince 100-200 mg/kg/gün dozda oral DEHP verilen sıçanların yavrularında iskelet ve kardiyovasküler sistem anomalileri, nöral tüp defetleri, gelişimin gecikmesi ve intrauterin ölümler gözlenmiştir [108]. Gestasyon süresince ve/veya erken postnatal dönemde  $\geq 14$ -23 mg/kg/gün düzeyinde DEHP içeren yemle beslenen sıçanlarda erkek üreme organlarında anormal küçülme şeklinde ağır reproduktif toksisite saptanmıştır [111].

DEHP'in gelişimsel ve reproduktif toksisitesine ilişkin deneysel sonuçların insana uyarlanması konusu tartışmalıdır. İnsanda toksisiteye ilişkin direkt kanıtlar yoktur ve insan çalışmaları ya hiç yoktur ya da çok sınırlıdır. Bununla birlikte subfertil erkeklerde idrar fitalat düzeyleriyle semen karakteristikleri, sperm DNA hasarı, serum üreme hormon düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştıran bazı çalışmaların sonuçları olumsuz etkilerin varlığına işaret etmektedir [74]. Kadınlarda DEHP'in menstural siklus uzaması, ovulasyonun gecikmesi veya supresyonu, endometriozis, gestasyon süresinde azalma gibi gebelik komplikasyonlarına neden olduğunu ileri süren çalışmalar bulunmaktadır [73]. Fitalatlara prenatal olarak maruz kalan erkek bebeklerde anogenital açıklık azalması sıklığının yüksek olduğu ve bu anomalinin annenin üriner fitalat monoester düzeyleri ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir [112]. Bu ve benzeri bulgular, DEHP ve fitalatların, çocuklardaki olası gelişimsel ve üreme riskleri konusundaki endişeleri büyük ölçüde artırmaktadır. Yiyeceklerle ve DEHP içeren araç, gereç ve oyuncakları ağıza almaya bağlı temasın fazla olması, DEHP'i toksik forma dönüştüren lipaz aktivitesinin yüksek olması nedeniyle, özellikle 1 yaşın altındaki erkek çocuklar için duyulan endişe büyüktür.

#### **2.1.1.3.3 DEHP ve DNA Hasarı**

Yapılan az sayıdaki çalışmalar, DEHP veya ana metaboliti olan MEHP uygulamasını takiben 8-okzo-7-hidro-2'-deoksiguanozin (8-oksodG) düzeyleri ölçülmüştür. Ancak bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar birbiriyle çelişmektedir. Hücre kültür çalışmalarında DEHP'in sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının DNA hasarına neden olmadığı, kardeş kromatid değişimini (SCE) ve DNA hasarını



indüklediği belirtilmiştir [113-116]. Ayrıca MEHP'in hepatositlerde yüksek dozlarda bile (0.5 mM) DNA kırıklarına neden olmadığı ileri sürülmüştür [117]. Diyetle yüksek doz DEHP'e maruz bırakılan sıçanlarda peroksizomal  $\beta$ -oksidasyonunun indüklenmesine karşın, DNA hasarının gözlenmediği bildirilmiştir [118]. Bir diğer çalışmada, diyetle %1,2 DEHP uygulanan sıçanların hepatik 8-oksodG düzeyleri 3., 11. ve 22. haftalarda ölçülmüştür. DEHP uygulaması ile 3. haftada 8-oksodG düzeyleri azalmış; ancak 11. ve 22. haftalarda anlamlı olmayan bir artış belirlenmiştir. Bunun nedenin 8-oksodG düzeylerinin DEHP ile oluşan DNA hasarının iyi bir göstergesi olmadığı veya fitalatla oluşan hepatik karsinomaların altında yatan mekanizmaların farklı olabileceği bildirilmiştir [119]. Ancak infertil erkeklerden elde edilen ve üriner fitalat metabolitleri ve sperm DNA hasarının incelendiği çalışmalarda üriner fitalat metabolit konsantrasyonu ve sperm DNA hasarı arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir [119,120]. Ayrıca lökosit kültürleri ve mukozal hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda da DEHP ve MEHP'in genotoksik olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir [121,122]. DEHP ile yapılan genotoksik çalışmalar maalesef kısıtlı sayıda ve yapılmış olan çalışmaların sonuçları birbiri ile tutarlılık göstermemektedir. Bu yüzden DEHP'in genotoksik hasar yapıp yapmadığının belirlenmesi ve yapıyorsa altında yatan sebeplerin açığa kavuşturulması için daha çok çalışmaya gerek duyulmaktadır. Yetişkinlere kıyasla çocukların ve gençlerin DEHP'e daha yüksek oranda maruz kalması sebebiyle bu çalışmada, DEHP'in etkisi pubertal sıçanlarda *in vivo* olarak araştırılmıştır.

## 2.2. Genetik Toksikoloji

Genetik toksikoloji organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin kromozom ve DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilimdir [123,124]. Yeni bileşiklerin ve ilaçların toksikolojik açıdan değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir [123]. Genetik toksisite; hücre DNA'sında, kromozomlarda veya çekirdeğin yapısında meydana gelen hasarları, DNA onarım enzimlerinin indüksiyonu, DNA eklentileri, DNA zincir kırılımı, gen mutasyonu, kromozom aberasyonu, klastojenite ve anöploidi gibi olayları kapsayan genel bir terimdir [123-125]. DNA veya topoizomeraz gibi genomun kopyasının çıkarılmasını

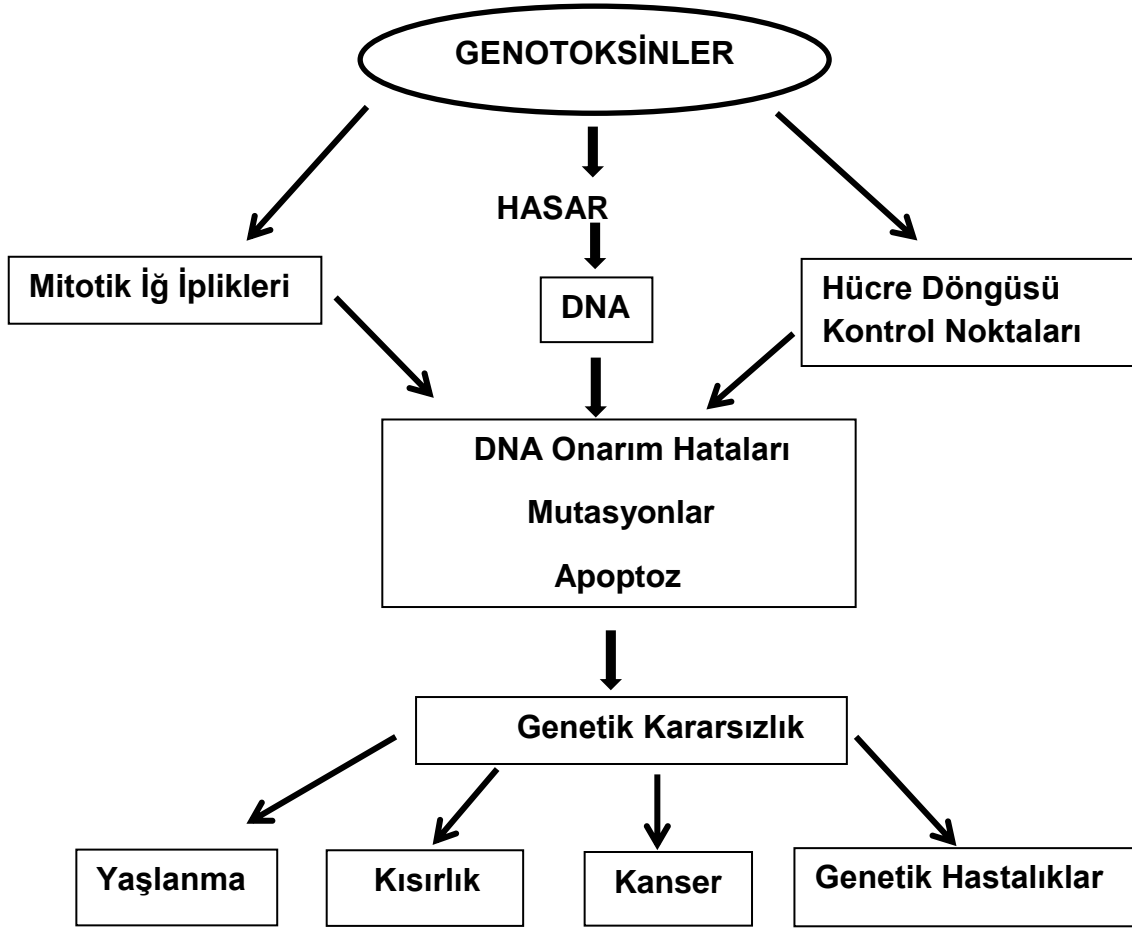
sağlayan enzimlerle etkileşime giren maddelere ve mutasyona neden olan kimyasallara genoma karşı toksik yani genotoksik adı verilmektedir [123]. DNA ile direk etkileşime girmeyen mitotik iğ iplikçiklerini bozarak veya topoizomeraz enzimini inhibe ederek mutajenik etki oluşturan bileşiklere indirek genotoksinler ya da DNA'ya reaktif olmayan genotoksinler adı verilmektedir [126]. Kimyasalın kendisi veya metabolitleri tarafından DNA'da meydana gelen hasar veya DNA eklentilerinin oluşması genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır. Genotoksik etkiler aynı zamanda düzensiz DNA sentezi (unscheduled DNA synthesis), kardeş kromatid değişimi ve mitotik rekombinasyonunu da içermektedir [123].

Organizmanın genetik materyal yapısında meydana gelen değişiklikler genel olarak mutasyon olarak tanımlanmaktadır. Bu değişiklikler bağımsız bir gende, gen bloklarında veya tüm kromozomlarda meydana gelebildiği gibi somatik doku hücrelerinde de oluşabilmektedir [126]. Mutasyonun zararlı etkileri üreme bozuklukları, embriyojenik ve perinatal ölüm, malformasyonlar, genelde hastalıklar ve kanser şeklinde görülmektedir [123]. Mutajenik fiziksel veya kimyasal ajanlara maruz kalma sonucu, eşey hücrelerinde meydana gelen mutasyon kalıtsal hastalıklara veya somatik hücrelerde meydana gelen mutasyon kanser oluşumuna neden olabilmektedir ve memelilerde *in vivo* mutasyona neden olabilen bileşikler potansiyel kanserojen olarak nitelendirilmektedir [127]. Kimyasal mutajenez, 1970'li yıllar öncesinde gen ve kromozom fonksiyonlarının araştırılmasında önemli bir konu olmuştur. Genetik toksikolojiye ilgi ise özellikle 20. yüzyılın ortalarında Auerbach ve Robson tarafından 1944 yılında çeşitli kimyasalların meyve sineği olan *Drosophila melanogaster*'de mutasyon oluşturduğunun rapor edilmesi sonucu başlamıştır. Bu testin bazı yanlış sonuçlara yol açması ve duyarlılığının çok düşük olması nedeniyle mutajenite izleme prosedürleri içerisinde yer almamıştır. Bunu izleyen 1950'li yılların başında *Escherichia coli*'de süspansiyon ve plaka (spot) testleri denenmiştir; bu testler sadece çok spesifik baz çifti değişimine duyarlıdır ve DNA'da baz eklenmesi veya çıkması sonucu kalıp kaymasına neden olan mutajenler bu testlerle saptanamamaktadır. Bruce Ames, 1971 yılında aynı spot test sistemini ve kendi geliştirdiği histidine karşı mutant *S. typhimurium* suşlarını kullanarak bakteriyel mutasyon testi olan Ames testini geliştirmiştir. Yanofsky aynı yıl Ames testinde triptofana karşı mutant *E. coli* suşlarında mutajenleri saptamada

kullanılabileceğini bildirmiştir. Bakteriyel mutasyon test sisteminin geliştirilmesine paralel olarak memeli hücrelerinde kromozom aberasyon testi, gen mutasyon testi gibi *in vitro* testler geliştirilmiştir. İlerleyen yıllarda mutajeniteyi saptamak amacıyla *in vivo* kemik iliği aberasyon ve kardeş kromatid değişimi testleri geliştirilmiştir. Zamanla bu testlerin yerini etkinlik yönünden Schmid ve ark. [128] tarafından geliştirilen kemik iliği mikronükleus testi almıştır [124].

### **2.2.1. DNA Hasarı**

Nükleik asitler, kalıtsal bilgi taşıma yeteneğine sahip, proteinler gibi polimerik yapıya sahip moleküllerdir. Proteinin yapı taşı aminoasitlerdir. Nükleik asitler ise nükleotid adı verilen yapı taşlarından oluşurlar. Nükleotid, bir fosfat grubu, riboz (RNA) veya deoksiriboz (DNA) diye adlandırılan beş karbonlu şeker ve şekerlerin birinci karbonuna glikozidik bağla tutunmaktadır. Karbon ve azot atomu taşıyan halkasal bazlar pürin ve pirimidin yapısındadır. Bunlardan urasil, timin yerine sadece RNA'da bulunur. Nükleik asitler, polimerik yapılarını şekerler arası (üçüncü ve beşinci karbon arasında) fosfodiester bağları ile kazanırlar [129]. İnsan genomu sürekli olarak endojen ve ekzojen etkenlerin saldırısına uğramaktadır. Bu etkenler nükleotitlerin kimyasal değişimine neden olarak ya da DNA'nın fosfodiester iskelet yapısını bozarak DNA hasarına neden olmaktadır. İnsan vücudunda bulunan  $10^{13}$  hücrenin her birinde aynı gün içinde on binlerce DNA hasarı oluşmaktadır [130]. DNA üzerinde oluşan hasarlar Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



**Şekil 2. 4.** Genotoksik bileşiklerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları [130]

DNA molekülünde mutasyonlara yol açan ajanlar ya da mutajenler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan, ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterirler [131]. DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multi-faktoryal hastalıklara yol açmaktadır (Şekil 2.4) [132].

DNA kolay zarar görebilen bir molekül olup üzerinde sürekli olarak hasar oluşmaktadır [133]. DNA üzerinde kendiliğinden değişimler sonucu veya çevresel etmenler sonucu hasar meydana gelebilmekte, oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından giderilmekle birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar mutasyona veya hücre ölümüne neden olmaktadır [134]. Kimyasal ajanların ya da

radasyonun gamet veya somatik hücrelerdeki DNA üzerinde oluşturduğu kalıcı değişimlere genel olarak mutasyon adı verilir. Mutasyona neden olan etkenlere ise mutajen denir.

Hücre tüm bu DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap vermektedir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptoz yolunu aktive ederek hücreyi ölüme götürmektedir. Hücre, DNA hasarlarını "DNA tamir mekanizmaları" ile tamir edebilir. DNA hasarı ikileşme sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, kanser ve yaşlanmaya neden olmaktadır. DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynar ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık olarak 500.000 adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olabilen hasar meydana gelmektedir. DNA hasarı sonunda DNA'nın yapısını ve dahası diğer nesillere aktarılan genetik bilgiyi değiştirebilirler. Küçük hasarlar çoğunlukla DNA onarım sistemleri tarafından onarılabilirken, orta derecedeki hasarların birikimi ise mutasyon ve kanser ile sonuçlanabilmektedir. Yüksek düzeydeki hasarlar ise apoptozisi uyararak "hücre ölümüne" yol açabilir ve böylelikle organizma kendini korumuş olur.

Başlıca hasar tipleri;

1. Deaminasyon (bir aminoasit ya da başka bir organik bileşikten bir NH<sub>2</sub> (amino) grubunun ayrılması)
2. Depurinasyon (Sağlıklı bir çift-sarmal DNA molekülündeki azotlu bazlardan birinin spontan olarak kaybedilmesi)
3. Alkilasyon
4. T-T and T-C dimerleri oluşumu
5. Replikasyon hataları
6. Çift iplik kırıkları
7. Oksidatif hasardır.

Kendiliğinden değişimler sonucu oluşan DNA hasarının nedenleri arasında; DNA sentezi sırasında bazların yanlış eşleşmesi, pürin ve pirimidin bazların ketoenol tautomerizm ve deaminasyon sonucu kimyasal yapısında gelişen değişimler, DNA yapısında bulunan pürin ve pirimidin bazlarının termal dayanıklılığına bağlı olarak hidrolitik baz kaybı ve hücresel metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarları önemli yer tutmakta olup çevresel hasar ise fiziksel ve kimyasal hasar olmak üzere iki grupta incelenmektedir.

DNA'nın bütünlüğünü bozup ve farklı DNA hasarlarının oluşmasına neden olan fiziksel etkenler arasında ultraviyole ve X-ışınları önemli yer tutmaktadır. DNA hasarlarının oluşmasına neden olan kimyasal ajanlar içinde, çevresel mutajen ve karsenojenlerin en geniş grubu olan ve çeşitli gıda maddelerinde, anti-tümöral ilaçlarda ve tütünde bulunan alkilleyici maddeler ve ksenobiotikler gibi elektrofilik reaktanları metabolize edilebilen kimyasallar yer almaktadır. Hücre, DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptoz yolunu (kansereleşen hücrenin programlı olarak ölmesi) aktive ederek hücreyi ölüme götürür. DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa neden olabilmektedir [135].

Fizikokimyasal etkileşim ile hücresel DNA; tek zincir kırıkları (SSBs), çift zincir kırıkları (DSBs), DNA–DNA ve DNA–protein çapraz bağları, pürin ve pirimidin bazlarında hasar veren çeşitli primer lezyonları üretir. Memeli hücreleri bu tür zararlar için etkili bir enzimatik tamir mekanizmasına sahiptir fakat radyasyon etkisiyle oluşan çift zincir DNA kırıkları geri dönüşümsüzdür. Böylelikle ortaya çıkan çift zincir DNA kırıkları önemli mutajenik ve kanserojen lezyonlarına sebep olur. Bu onarılamayan DNA, kromozomal delesyon ve düzensiz (translokasyon ve aralarında delesyon) birleşmelere yol açarak çeşitli kanserleri ortaya çıkarır.

### **2.2.2. Genotoksisitenin Karsinojenezisle İlişkisi**

Bir maddenin genotoksik potansiyeli mutajenik kapasitesi ile yakından ilgilidir. Karsinojenezis başlangıcında DNA en son hedef olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda, karsinojenik olan birçok maddenin genotoksik; benzeri şekilde genotoksik olan birçok maddenin de karsinojenik olduğu gösterilmiştir. Kimyasal maddelerin genotoksik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasındaki bu kuvvetli ilişkinin olması, genotoksisite testlerinin, kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında, tarama testleri olarak kullanılması sonucunu doğurmuştur. Kimyasal maddelerin kanser oluşturmasında;

- ✓ Mutasyon ve DNA onarımı yanı sıra, ikinci bir etkenin hücresel çoğalmayı uyarması,
- ✓ T lenfositlerinin baskılanması sonucunda bu T lenfositlerinin vücutta doğal olarak gelişen kanser hücrelerini yok etme fonksiyonlarının bozulması,

✓ Normal hücre çoğalmasına katkıda bulunan büyüme faktörlerinin ve mitozda rol oynayan diğer etkenlerin sentezini kontrol eden genlerin aktive edilmesi gibi mekanizmalar rol oynar.

Genotoksisite mekanizmasının aydınlatılması ve genotoksisite saptanması için çeşitli test sistemlerinin geliştirilmesi ve genotoksisitenin insanlar için oluşturduğu kalıtsal hastalık ve kanser riskinin azaltılması için yapılan çalışmalar toksikolojinin en önemli çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır. DNA'nın onarım sürecinin tam olarak sağlanamaması, kanser oluşumunda çok önemli bir faktördür. Bilhassa somatik hücrelerdeki mutasyonların kanser oluşumuna zemin hazırlayıcı rollerinin bulunması, genotoksisitenin klinik önemini artırmaktadır [136-137]. Bir ajanın genotoksisitesi birçok değişik hastalıkla sonuçlanabilir ancak kanser en sık rastlanılanıdır. Bundan dolayı kimyasal genotoksisite ve karsinogenez arasındaki ilişki iyi bağdaştırılmıştır ve genotoksisitenin, kanser oluşumunu başlatan en önemli mekanizma olduğuna inanılmaktadır. Genotoksisite ve karsinogenez arasında çok yakın bir ilişkinin ve genotoksik testlerin karsinogenleri tespit etmede etkinliğinin olması, genotoksisite araştırmalarının gerekliliğini ortaya koymaktadır [138].

### **2.2.3. Sık Kullanılan Bazı Genotoksisite Testleri**

Her zaman DNA hasarının izlenmesi için hızlı ve duyarlı yöntemler geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Genotoksisite testleri *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere kimyasalların farklı mekanizmalarla genetik hasara neden olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan testlerdir. Esas olarak kanserden korunmada, çevresel etkenlerin (UV vb. gibi), endüstriyel kimyasalların etkisini araştırmada, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada kullanılmaktadır [139,140].

Genotoksisite testleri; moleküler, gen ve kromozom düzeyinde olabilir [141]. Bu testler 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve o tarihten günümüze kadar birçok *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite testi geliştirilmiştir [140]. En çok kullanılanları alkali Comet tekniği (Tek hücre jel elektroforezi= single cell gel electrophoresis: SCGE), kromozomal aberasyon (CA) testi ve mikronükleus (MÇ) testidir.

### **2.2.3.1 Kromozomal Aberasyon (CA) Testi**

Kromozom sayısında değişiklikler, gen ya da kromozom parçalarında delesyon, duplikasyon ve aynı kromozom içinde ya da kromozomlar arasında genetik materyalin düzenlenmesi şeklinde modifikasyonlar görülebilir. Bu modifikasyonlara, gen mutasyonlarından ayırmak için kromozomal mutasyonlar ya da kromozomal bozuklular adı verilir. Anöploidi, diploidi, delesyon, duplikasyon, inversiyon ve translokasyonlar şeklinde görülebilir [142].

### **2.2.3.2. Mikroçekirdek Testi**

Mikroçekirdek (MÇ) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarıdır. MÇ sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilir. Organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek amacı ile kullanılan bir yöntemdir [143].

### **2.2.3.3. Kardeş Kromatid Değişimi (Sister chromatid Exchange=SCE)**

DNA replikasyonu sırasında kromozomun her iki kromatidinin homolog bölgelerinde DNA'da kırık oluşması ve kırılan bölgelerin yer değiştirip yeniden birleşmesi sonucunda oluşmaktadır. SCE analizi genotoksisite belirteci olarak kabul edilmekle birlikte kardeş kromatidlerin segmentlerindeki değişim artışına neden olan esas mekanizma halen tam olarak bilinmemektedir [144].

### **2.2.3.4. COMET Tekniği(Single Cell Jel Elektroforez Tekniği)**

İnsan popülasyonlarında genetik hasarın kabul edilebilir seviyesini tespit etmek, genotoksinlere hassasiyeti fazla olan kişileri belirlemek, çeşitli ajanlara maruz kalan bireyleri devamlı olarak izlemek, çevreye yayılan kimyasal maddeleri etkili bir şekilde kontrol altında tutmak ve bir popülasyondaki genetik hasar artış seviyesini tespit etmek amacıyla çeşitli teknikler tek veya kombine olarak kullanılmaktadır [145].

Sitogenetik yöntemler mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi de Comet Assay Tekniğidir. Son yıllarda gelişen Comet Assay Tekniği, DNA sarmal kırılmalarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir



yöntemdir [146]. Comet Assay Tekniği "*Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)*" ya da "*Mikrojel Elektroforez Tekniği*" olarak da adlandırılmaktadır.

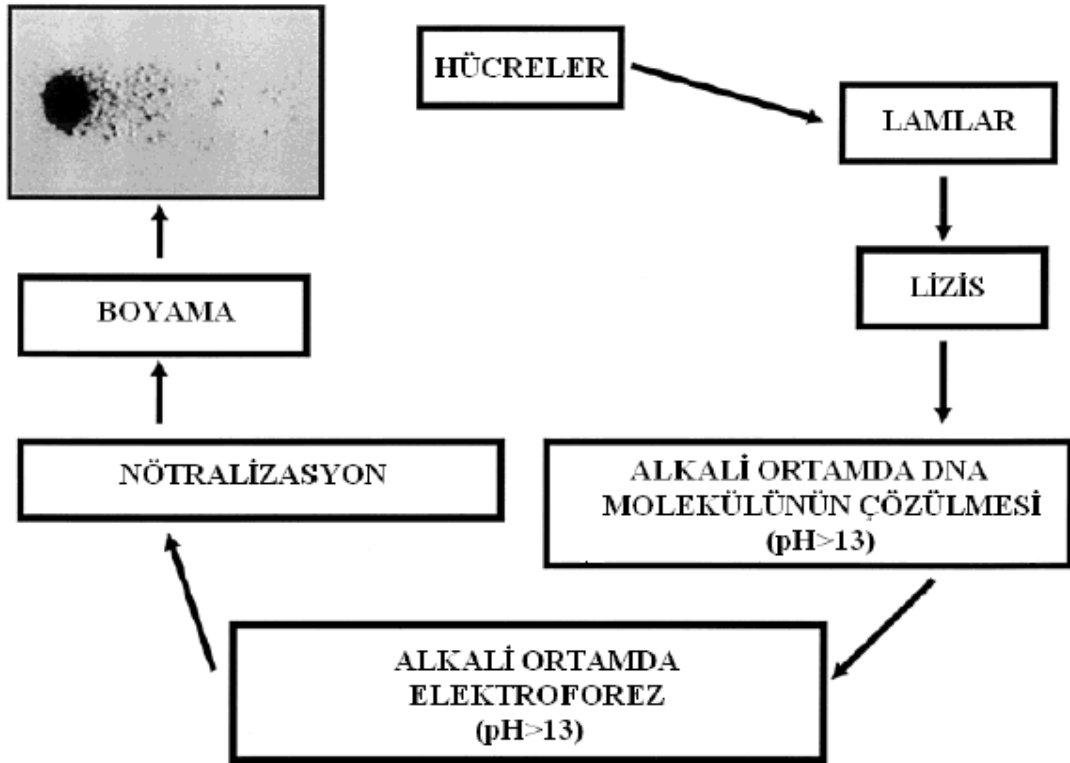
İnsan hücrelerinde DNA tek sarmal kırılmalarının tespiti ilk kez Rydberg ve Johanson tarafından gerçekleştirilmiştir. DNA'nın ayrılmasına izin veren hafif alkali şartlar altında lam üzerindeki agarozda gömülmüş olan hücreleri "lize" ederek hücreleri proteinlerinden ayırmışlardır. Daha sonra nötralize edip, akridin oranj kullanarak DNA'yı boyamışlar ve kırmızı/yeşil floresan oranını saptamışlardır. Kırmızı floresan tek sarmalı, yeşil floresan ise çift sarmalı göstermektedir. Fakat bu teknik çok yaygın olarak kullanılmamıştır. Bu nedenle nötral teknik 1984'te Ostling ve Johanson tarafından modifiye edilerek "Mikrojel Elektroforez Tekniği" olarak sunulmuştur. Ostling ve Johanson agarozda süspansiyon edilen hücreleri, lam üzerine yayarak, yüksek tuz ve deterjanla lize etmişler ve ardından elektroforeze tabi tuttuktan sonra, akridin oranj gibi DNA bağlayıcı floresan boyasıyla boyamışlardır. Eğer DNA kırık içeriyorsa (hasarlı DNA), çekirdekte anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümü verir. Bu nedenle hasarlı hücrelere "*Comet*" adı verilmiştir [147].

DNA sarmal kırıklarının ölçmeye yarayan yöntemler, genellikle sarmal kırığına neden olan ajanların DNA molekülünün büyüklüğünü azaltması prensibine dayanır. DNA tek ve çift sarmal kırıkları kromatin yapısında değişikliklere neden olabilir. DNA tek sarmal kırığını ölçen tekniklerde DNA çift sarmalının açılması gerekir. Denatürasyon, çift sarmalın çözülmesi ve tek sarmal kırıklarının yanında sadece alkali ortamda açığa çıkan kırıkların tespiti için de yüksek pH'dan yararlanılabilir. Pek çok ajanın DNA çift sarmal kırığına göre 5-2000 kat daha fazla tek sarmal kırığı meydana getirdiği düşünülürse, nötral koşulların DNA hasarını belirlemede alkali koşullar kadar duyarlı olmayacağı açıktır [148].

Ostling ve Johanson'ın geliştirdikleri teknikte kullanılan lizis şartları nötral pH'da olduğu için, DNA baz çiftleri ayrılmadığından sadece çift DNA sarmal kırıklarının saptanması mümkün olmuştur [149]. Teknik daha sonra Singh ve ark. tarafından lizis işlemi alkali koşullarda 1 saat süreyle yapılarak DNA çift sarmalının açılması için modifiye edilmiş ve sadece sarmal kırıklarının değil, alkali şartlarda saptanabilen hasarların, DNA çapraz bağlarının ve tamamlanamamış ekzisyon tamir bölgelerinin saptanmasına olanak sağlanmıştır [150]. Singh ve ark.'nın geliştirdikleri bu yöntem, şu anda bazı basamaklarda yapılan değişikliklerle

beraber en çok kullanılan yöntemdir [148] ve 7 basamaktan oluşmaktadır. Testin basamakları [151] Şekil 2.6' da gösterilmiştir:

- 1-Mikroskopik lamaların hazırlanması
- 2-DNA' nın serbestleşmesi için hücrelerin lizisi
- 3-Zincir kırıkları gibi lezyonların açığa çıkması için alkali muamele ( $\text{pH} > 13$ )
- 4-Alkali şartlarda elektroforez ( $\text{pH} > 13$ )
- 5-Alkali şartların nötralizasyonu ( $\text{pH} = 7.5$ )
- 6-DNA' nın boyanması ve Comet görüntülemesi
- 7-Comet skorlaması



**Şekil 2.6.** Comet testinin aşamaları [151]

DNA'nın negatif yüklü kırık uçları elektroforez sırasında pozitif yüklü uca, yani anoda doğru göç ederler. Bunun sonucunda da kuyruklu yıldız görünümü (Comet) meydana gelir. DNA göçü, DNA'daki kırık sayısına bağlıdır. Kuyruk uzunluğu hasara bağlı olarak artar ancak elektroforez şartlarına bağlı olarak maksimuma

ulaşır. Düşük hasar seviyelerinde DNA'da göçten çok yayılma görülürken, kırık sayısının artmasıyla DNA parçaları kuyruğa doğru göç etmeye başlar [152].

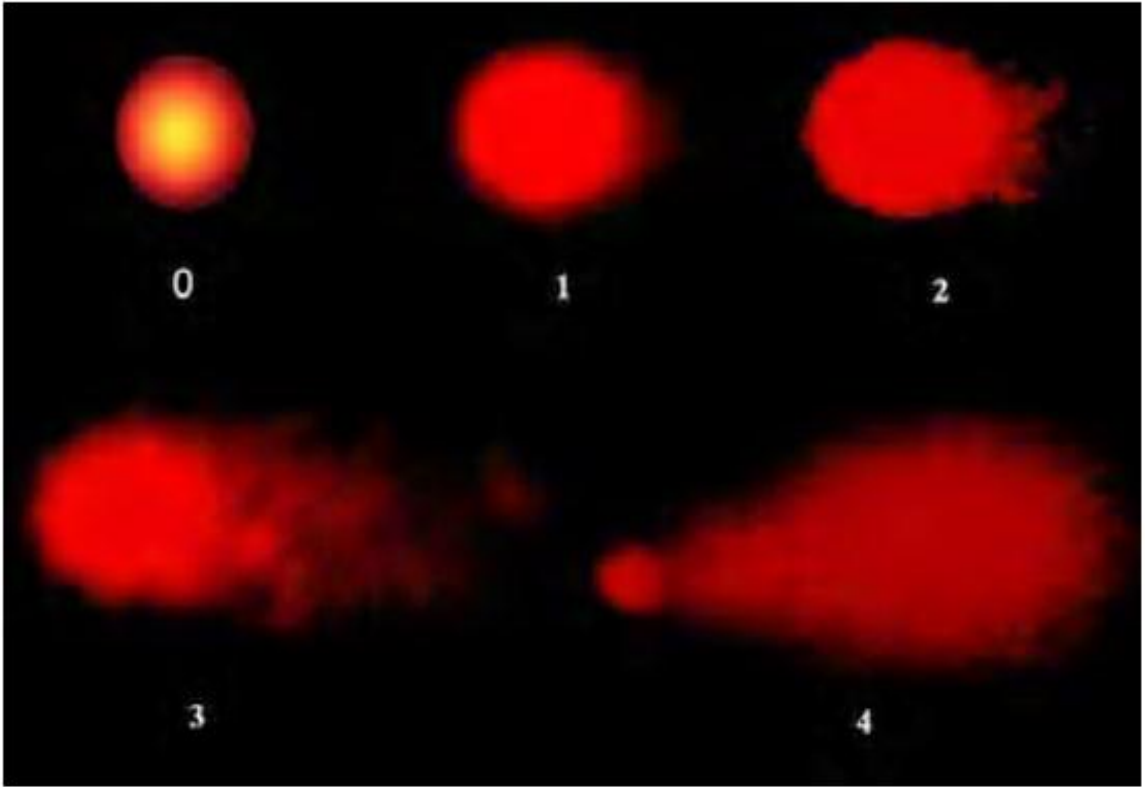
Kuyruktaki floresan şiddetinin hücrenin baş tarafına göre kıyaslanmasıyla sarmal kırıklarının sayısı hakkında bilgi edinilebilir. Hasarsız hücrelerde çekirdek parlaktır ve floresan şiddeti baş tarafta yoğundur, ancak DNA'da kırıklar söz konusu olduğunda floresan çekirdekten anoda doğru yayılarak kuyruksa şiddetlenir. Comet tekniği, hasarlı hücrelerde floresanın baş taraftan kuyruğa geçişini yansıttığından DNA hasarının kantitatif olarak saptanmasında kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu önemli parametrelerdir. "Kuyruk Momenti"; kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranı olarak tanımlanmaktadır [129]. Comet hücre parametreleri Şekil 2.7' de gösterilmiştir. Yöntemdeki uygulama farklılıklarının birçoğu elektroforez aşamasında uygulanan voltaj, elektroforez süresi, tampondaki tuz konsantrasyonları, çalışma dizaynı ve DNA hasar düzeyinin değerlendirilmesi ile ilişkilendirilmektedir [129].



**Şekil 2.7.** Comet hücre parametreleri [129]

Periferal kan lenfositlerinin tüm vücudu dolaşması nedeniyle hedef organdaki biyolojik etkileri iyi bir şekilde temsil ettiği düşünülmektedir. Bu nedenle lenfositler DNA hasarı ve kromozomal aberasyonlarla genotoksik riskin belirlenmesinde yaygın kullanıma sahiptir [153].

Comet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmenin yanı sıra *Comet Görüntü Analiz Programlarını* kullanmak suretiyle kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın kullanılan parametrelerdir [154]. *Comet Görüntü Analiz Programları* kullanılarak kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi veya sonuçların gözle değerlendirilmesi diğer parametrelere göre doz-yanıt ilişkisini daha iyi yansıtması sebebiyle tercih edilmektedir [155,156]. Comet tekniğinde hücrelerin hasar seviyesine göre sınıflandırılması [157] Şekil 2.8' de gösterilmiştir.



**Şekil 2.8.** Comet tekniğinde hücrelerin hasar miktarına göre sınıflandırılması (0:hasarsız DNA görüntüsü, 1-4: hasarlı olup, DNA'ları hasarın derecesine göre puanlanmıştır) [157]

### **2.2.3.5.1. Comet Testinin Avantajları**

- Az sayıda hücre gerektirir.
- Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir.
- Kolay uygulanabilir.
- Hassastır.
- Hızlıdır.
- Ekonomiktir.
- Güvenilirdir.
- Çeşitli türlerde DNA hasarlarını tespit edebilir.
- Tek hücre seviyesinde bilgi edinilebilir.
- Endüstriyel toksikoloji, çevresel toksikoloji, genetik toksikoloji, insan biyoizlemleri, DNA onarım ve hasarının temel mekanizması gibi çalışmalarda geniş olarak kullanılabilir [158,159].

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan Di (2-etilhekzil) fitalat (%99) Sigma firmasından temin edilmiştir. MS9-5 veteriner amaçlı kan sayım cihazı ile uyumlu kit kullanılarak hematolojik analizler yapılmıştır. Biyokimyasal analizler Audit Diagnostic (İrlanda) firmasından temin edilen ALT (Alanin aminotransferaz), AST (Aspartat aminotransferaz), Üre, Albümin, Trigliserit, Kreatinin ve Glikoz kitleri kullanılarak yapılmıştır. Comet testi için kullanılan kimyasallar ve temin edildiği firmalar aşağıda gösterilmiştir:

- DMSO (Merck)
- NaCl (Sigma)
- NaOH (Merck)
- Histopaque 1077 (Sigma, 1077-1)
- Etidyum Bromide (Sigma, E-8751)
- Triton-X 100 (Sigma, 9002-93-1)
- EDTA( Sigma, ED2SS)
- Trizma Base (Sigma, T-1503)
- Yüksek erime noktalı agaroz (Sigma, A-7174)
- Düşük erime noktalı agaroz (Sigma, A-4018)
- Fosfat tampon (PBS) tabletleri (Sigma, P-4417)
- Tripan Blue (Sigma)
- Saf etanol (Sigma)
- Metilmetansülfonat (Sigma)

### **3.1.2. Deney Hayvanlarının Temini**

Bu çalışmada, pubertal sıçanların di(2-etilhekzil) fitalata maruziyeti sonucu meydana gelebilecek genotoksik etkilerin incelenmesi amacı ile kullanılacak 6 haftalık Wistar albino (*Rattus norvegicus*) sıçanlar, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınan B.30.2.HAC.0.05.06.00/07 sayılı izinle temin edilmiştir.

### **3.1.3. Laboratuvar Koşulları**

Deney süresince laboratuvar sıcaklığı ortalama  $22,4\pm 1,6^{\circ}\text{C}$ , nisbi nemi  $47,2\pm 1$  olarak ayarlanmıştır. Fotoperiyot 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde zaman ayarlayıcı ile ayarlanmıştır. Çalışmada, boyutları 20x40x22 cm olan ızgara kapaklı temiz polikarbonat otoklavlanabilir kafesler kullanılmıştır. Çalışma süresince hayvanlara içme suyu olarak çeşme suyu ve standart sıçan yemi verilmiştir.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması**

Bu çalışmada 30 erkek Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar her grupta 6 erkek sıçan olacak şekilde rastgele dağıtılmıştır. DEHP mısır yağı içerisinde çözülmüştür, bu nedenle gavaj yoluyla mısır yağı verilen yağ kontrol grubu, hayvanlara diseksiyonundan 24 saat önce intraperitoneal yolla genotoksik bir ajan olan metil metansülfonat enjeksiyonu (60 mg/kg) yapılan pozitif kontrol grubu, 100 mg/kg/gün, 200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün dozlarında mısır yağında çözülerek 28 gün boyunca her gün aynı saatte gavaj yoluyla DEHP uygulaması yapılan 3 adet uygulama grubuyla birlikte toplam 5 gruba ayrılmıştır. Uygulama grupları için belirtilen dozlar, artan dozlarda etki derecelerini göstermek için, daha önce yapılan çalışmalar ve kimyasalların toksikokinetik özellikleri göz önüne alınarak seçilmiştir. MMS için genotoksik etki görülen doz, önceki çalışmalar referans alınarak 60 mg/kg olacak şekilde uygulanmıştır. Uygulama grupları ve doz miktarları Çizelge 3.1 'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Kontrol grupları ve uygulama gruplarındaki hayvan sayıları ve uygulanan doz miktarları

Gruplar		n	Dozlar		
Negatif (mısır yağı)	Kontrol	6	1 ml		
Pozitif (MMS)	Kontrol	6	60 mg/kg		
DEHP		6	100 mg/kg/gün	200 mg/kg/gün	400 mg/kg/gün

n: Hayvan sayısı; MMS: Metil metan sülfanat

### 3.2.2 Vücut Ağırlıkları, Organ Ağırlıkları, Besin ve Su Tüketim Ölçümleri

Hayvanların yem ve su tüketimine bir sınırlama konulmamış, her gün aynı saatte tükettikleri yem ve su miktarları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Hayvanların vücut ağırlıkları günlük olarak tartılarak ölçülmüştür. Deney sonunda hayvanlar eter ile bayıltılmış ve servikal dislokasyon yöntemi uygulanarak deney sonlandırılmıştır. Karaciğer ve böbrek dokuları alınarak üzerlerindeki kan kurutma kağıdı ile temizlendikten sonra tartılıp yağ ağırlıkları kaydedilmiştir. Relatif organ ağırlıkları, vücut ağırlıklarına oranlanarak hesaplanmıştır.

### 3.2.3 Comet Yöntemi'nin Uygulanışı

Sıçanlardan 0., 7., 14., 21. ve 28. günlerde anestezi altında kalpten steril enjektörle kan alınmış ve Comet testi uygulanmıştır.

#### 3.2.3.1. Comet Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

**5 M NaOH çözeltisi:** 100 g NaOH, distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

**0.2 M EDTA çözeltisi:** 37.2 g EDTA, distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

**5 N HCL çözeltisi:** 91.25 mL HCl (%37'lik) distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.



**PBS (Phosphate Buffer Saline) çözeltisi:** Bir tane PBS tableti, 200 ml distile suda çözüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

**Etidyum bromür çözeltisi:** 5 mg etidyum bromür 50 ml distile su ile çözüldü, 100 µg/mL'lik stok çözelti, 25 ml'lik kısımlar halinde +4°C'de karanlıkta saklandı. Çalışma çözeltisi olarak stok etidyum bromür çözeltisi, distile su ile 1/5 oranında seyreltildi ve 20 µg/mL konsantrasyonda kullanıldı.

**Lizis çözeltisi:** 146.1 g NaCl (2.5 M), 37.2 g EDTA (100 mM), 1.2 g tris (10 nM) 800 mL distile suda çözüldü. 5 M NaOH çözeltisi ile çözelti pH 10'a getirildi ve stok çözeltinin hacmi distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Çalışma çözeltisi olarak her şale için 62.3 mL stok lizis çözeltisi, 7 mL DMSO, 0.7 mL Triton-X ilave edildi ve kullanılıncaya kadar + 4°C'de saklandı ve aynı gün kullanıldı.

**Yüksek erime dereceli agaroz (YEDA) çözeltisi:** %1' lik çözeltisi PBS ile çözüldü ve hazırlandı. Çözelti sıcak iken lamlar bu çözeltinin içine daldırılarak agaroz ile kaplanıp oda sıcaklığında kurutuldu.

**Düşük erime dereceli agaroz (DEDA) çözeltisi:** %0,63'lük çözeltisi PBS ile çözüldü ve hazırlandı ve +4°C'de saklandı. Çözelti deney esnasında mikrodalga fırında çözüldü ve 37°C' ye getirilerek kullanıldı.

**Elektroforez tamponu:** 90 mL 5 M NaOH çözeltisi, 7.5 mL 0.2 M EDTA çözeltisi distile suyla 1500 mL'ye tamamlandı. Çözelti taze olarak hazırlanıp kullanıldı.

**Nötralizasyon tamponu:** 0.8 M tris (97 g tris distile suyla 1000 mL'ye tamamlanır) hazırlandı. Çözelti 5 N HCl ile pH 7.5'a getirildi. Nötralizasyon çözeltisi olarak 1:1 oranında distile su ile seyreltilerek kullanıldı. (0.4 M Tris).

### 3.2.3.2. Lamların Hazırlanması

Çalışmaya başlamadan önce %1'lik YEDA, PBS solüsyonu kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan çözelti mikro dalga fırında çözüldü. Lamlar hazırlanan çözeltiliye batırılarak tek yüzünün kaplanması sağlandı ve oda sıcaklığında bir gece bekletilerek kurutuldu.

### **3.2.3.3. Taze Kandan Lenfositlerin İzole Edilmesi ve Hazırlanması**

Sıçanların kuyruğundan alınan taze kan (1 ml), 1:1 oranında PBS ile sulandırıldı. Boş steril falkon tüp içine elimizde bulunan kan+PBS çözeltisinin hacmi kadar Histopaque-1077 solüsyonu eklendi. Bunun üzerine kan+PBS yavaşça konuldu. Tüpler 25°C ve 2300 rpm' de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç ayrı tabaka meydana geldi. En alt tabakada lökositler, eritrositler, trombositler ve diğer şekilli elemanlar, orta tabakada lenfositlerin içinde yüzdüğü Histopaque solüsyonu ve en üst tabakada ise plazma yer almaktadır. Santrifüj sonrası orta tabakada biriken lenfositler 1 ml'lik pipet yardımıyla boş bir tüpe alındı. Histopaque solüsyonunu uzaklaştırmak için lenfosit içeren histopaque üzerine 5 ml, 1M tuzlu fosfat tamponu (PBS) (pH=7.4) ilave edilip karıştırıldıktan sonra 25°C, 2000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atıldı ve lenfosit pelleti elde edildi.

### **3.2.3.4. Lenfosit Sayımı ve Tripin Blue ile Canlılık Testi**

Heparinize kandan ayırt edilen PBS içerisinde hazırlanmış lökosit süspansiyonu ile tripin blue boyası (% 0,4) 1:1 oranında karıştırıldı. 5 dk inkübasyon süresinden sonra 1 damla boyanmış lökosit hücrelerinin lam üzerine yaydırılmasıyla hücre süspansiyonunun lam ve lamel arasına iyice yayılması sağlandı. Işık mikroskobu altında boyanmış ve boyanmamış hücreler sayıldı. Lam üzerinde 25 mm<sup>2</sup>' ye düşen hücreler sayılarak aşağıda verilen formüle göre toplam lenfosit hücre sayısı belirlendi.

**Toplam Hücre Sayısı** =  $10^4 \times \text{ml} \times \text{lamdaki hücre sayısı} \times \text{dilüsyon katsayısı}$

### **3.2.3.5. Hücrelerin Lama Yayılması**

Her bir örnek, 37 °C'de 100 µL % 0.7' lik düşük erime dereceli agaroz (DEDA) ile pipetaj yapılarak karıştırıldı ve yaklaşık  $5 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$  hücre/µL hücre olacak şekilde daha önceden % 0.7' lik normal erime dereceli agaroz (NEDA) ile kaplanan lamlara yayıldı. Lamlar, lamel ile kapatıldı ve buzdolabında 15-30 dak. agaroz katılaşınca kadar bekletildi. Daha sonra lameller hafifçe kaydırılarak kaldırıldı.

### **3.2.3.6. Hücrelerin Lizis İşlemi**

Lamlar, bir gece boyunca +4 °C'de lizis çözeltisi tamponu (62.3 mL stok lizis çözeltisi, 7 mL DMSO, 0.7 mL Triton-X) içerisinde bekletildi. Bu aşamadan sonra örneklerin ışığa maruz kalmamasına dikkat edildi.

### **3.2.3.7. Alkali ile Muamele**

Lizis çözeltisinden çıkarılan lamlar, +4 °C'de elektroforez çözeltisi (90 mL 5 M NaOH, 7.5 mL 0.2 M EDTA) ile dolu olan elektroforez tankı veya cam şale içerisinde 20 dak. bekletildi. Bu aşamadan önce elektroforez tankının volt ve amper ayarları kontrol edildi. Tankın geometrisine uygun olarak sabit 25 V, 300 mA olacak şekilde elektroforez tamponunun hacmi ayarlandı. Elektroforez tankının altına buz konularak sıcaklığı +4 °C'de tutuldu.

### **3.2.3.8. Elektroforez**

Lamlar, DNA göçü anoda olacak şekilde elektroforez tankına yerleştirildi ve 30 dak. sabit 15 V, 300 mA'de elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Oluşturulan elektrik akımı sayesinde negatif yüklü DNA sarmal kırıklarının anoda göç etmesi sağlandı. Stabilize etmek, fazla tuz ve deterjanı uzaklaştırmak amacıyla örnekler, nötralizasyon tamponu içerisinde +4°C'de 3 kez 5'er dak. bekletilerek nötralize edildi.

### **3.2.3.9 Boyama ve Değerlendirme**

Her lam, DNA'nın floresan renk vermesi için 50 µL etidium bromür (20µL/mL) ile boyandı. Lamel ile kapatıldı ve 15 dak. buzdolabında bekletildi. Aynı gün içerisinde lamlar değerlendirildi. Lamlar boyandıktan sonra Olympus BX50 floresan ataçmanlı mikroskopta 400x büyütmede incelendi. Her birey için 100 lenfosit hücresi sayıldı DNA hasarının ölçülmesinde Comet Assay IV programı ile hücre skorlamaları yapılmıştır. Bu skorlamalarda her bir grup için baş, kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdeleri hesaplanmıştır.

### **3.2.4. Histopatolojik incelemeler**

28 günlük sürenin sonunda hayvanlara servikal dislokasyon uygulanmış ve karaciğer ve böbrekleri çıkartılmıştır. Çıkarılan organlar tartıldıktan sonra uygun boyutlarda kesilerek Bouin ve %10 formolin fiksatiflerinde tespit edilmiştir. Daha sonra sırayla %70'lik, %80'lik, %95'lik, %100'lük alkol ve ksilen serilerinden geçirilmiş ve ardından parafine gömülerek blok haline getirilmiştir. Bloklar mikrotomda (Leica RM2125RT) 5 µm kalınlığında kesilerek preparat haline dönüştürülmüştür. Hazırlanan preparatlar Hematoksilen & Eosin boyasıyla boyanarak Olympus BX51 ışık mikroskobunda incelenmiş ve Bab Bs200prop programı kullanılarak gözlenen histopatolojik değişiklikler değişik büyütmelerde fotoğraflanmıştır.

### **3.2.5. Hematolojik İncelemeler**

Deneyin sonunda deney gruplarındaki sıçanların kalplerinden steril enjektör ile alınan kanın yaklaşık 1 ml'si, pıhtılaşmayı önlemek amacıyla kullanılan heparinli tüplere konulmuştur. Heparinli örnekler aynı gün, MS 9-5 marka otomatik kan sayım cihazında test 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 sonuçlarını içeren kan tablosu elde edilmiştir.

### **3.2.6. Biyokimyasal İncelemeler**

Deney sonunda, hayvanların kanında yapılacak analizler için steril enjektörle kalplerinden kan alınmıştır. Toplanan kanlar serum analizi için jelli vakumlu tüplere, plazma analizi için EDTA'lı kan tüplerine alınmıştır. Kanlar 3000 rpm'de 25 dakika süreyle +4°C' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj ile ayrılan serum kısım, mikropipet ile çekilerek biyokimyasal analizler için ependorf tüplere konulup -80°C'de analiz yapılacağı güne kadar saklanmıştır. Serum örneklerinde ALT (Alanin aminotransferaz), AST (Aspartat aminotransferaz), üre, trigliserit, kreatinin, albümin, total protein ve glikoz ölçümleri AUDIT marka kitler kullanılarak yapılmıştır.

### **3.2.7. İstatistiksek Değerlendirme**

Deneysel verilerin istatistiksel analizi Statistica 7.0 istatistiksel programında gerçekleştirilmiştir. Tukey *post hoc* testi ile gruplar arasındaki farkın önemi

anlamlılık derecesinde analiz edilmiştir. Gruplar arasında histopatolojik bulguların karşılaştırılmasında istatistiksel önem kontrollerinin değerlendirilmesi için Fisher Exact Test kullanılmıştır. Değerlendirmede  $p \leq 0,05$  anlamlılık derecesi olarak kabul edilmiştir. Comet testinde sonuçlar kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruk yüzdesi şeklinde kaydedilmiştir ve ANOVA testi uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde hesaplanıp tablolarda gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi olarak diğerlerinde olduğu gibi  $p \leq 0,05$  kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Vücut ve Organ Ağırlıkları ile Besin ve Su Tüketim Sonuçları

Deney başında ve sonundaki vücut ağırlıklarına ait sonuçlar Çizelge 4. 1' de gösterilmiştir. Sıçan vücut ağırlıkları, hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Uygulama sonucunda hayvanlar disekte edilerek organ ağırlıkları kaydedilmiştir. Organ ağırlıkları ve rölatif organ ağırlık oranlarına ait sonuçlar Çizelge 4. 2' te gösterilmiştir.

**Çizelge 4. 1.** Yağ kontrol ve DEHP uygulanan gruplara ait sıçanların çalışma başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları ve % artış değerleri

Gruplar	Doz	Başlangıç Ağırlığı (g)	Bitiş Ağırlığı (g)	% Artış
Yağ Kontrol	1ml	220,8±1,0	310,9±1,2	50,02±0,2
DEHP	100mg/kg/gün	222,3±0,9	333,2±0,7	51,09±0,8
DEHP	200mg/kg/gün	217,8±0,1	340,5±0,4	55,01±0,3
DEHP	400mg/kg/gün	218,9±0,1	348,7±1,1	54,06±0,4

**Çizelge 4. 2.** Negatif kontrol ve DEHP uygulanan gruplara ait karaciğer ve böbrek ağırlıkları ve organların rölatif ağırlıkları

Gruplar	Doz	Karaciğer		Böbrek	
		Gerçek Ağırlık (g)	Rölatif Ağırlık( $10^{-3}$ )	Gerçek Ağırlık(g)	Rölatif Ağırlık( $10^3$ )
Yağ Kontrol	1ml	10,5±1,0	34,8±1,2	1,06±0,1	3,2±0,1
DEHP	100mg/kg/gün	16,5±0,9 <sup>a</sup>	32,7±0,7	1,32±0,9 <sup>a</sup>	3,1±0,2
DEHP	200mg/kg/gün	16,9±0,1 <sup>a</sup>	32,9±0,4	1,40±0,1 <sup>a</sup>	3,1±0,1
DEHP	400mg/kg/gün	17,48±0,1 <sup>a</sup>	33,1±1,1	1,53±0,1 <sup>a,b</sup>	3,0±0,2

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 100 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 200 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 400 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı ( $p \leq 0,05$ ).

İstatistiksel olarak DEHP uygulamasının bütün dozlarında karaciğer gerçek ağırlığı yağ kontrole göre anlamlı olarak artmıştır. Aynı şekilde böbrek gerçek ağırlığı da yağ kontrole göre bütün uygulama gruplarında anlamlı olarak artmıştır. Hem karaciğer hem de böbrek açısından rölatif ağırlıklardaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

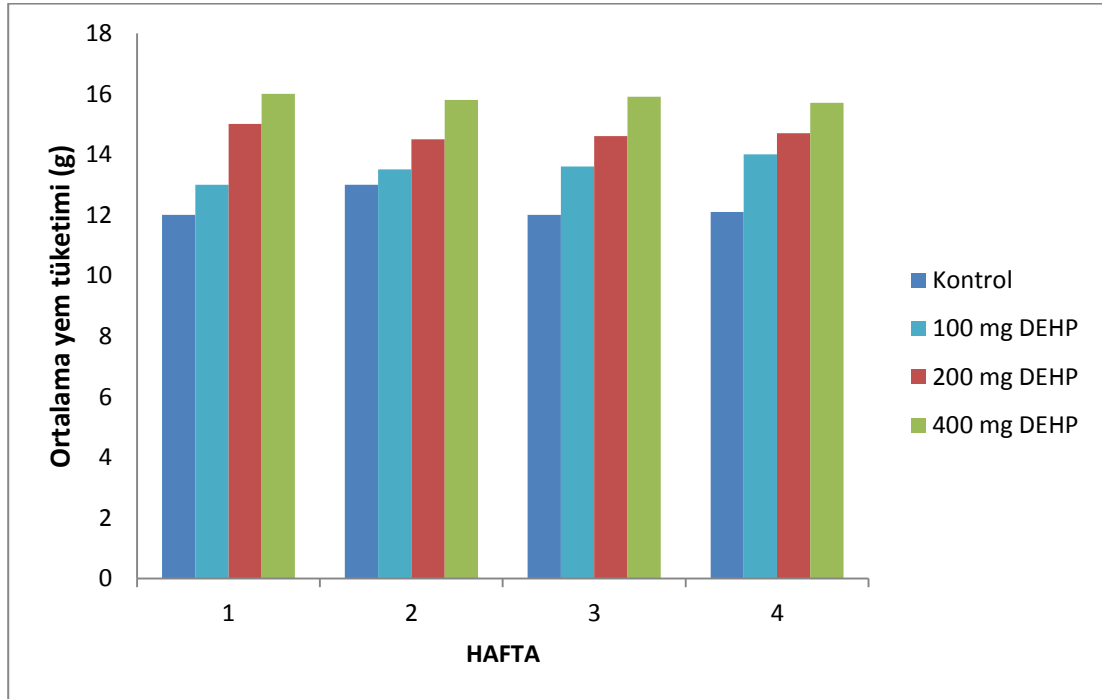
Yağ kontrol ve DEHP uygulama gruplarına ait erkek sıçanların deney süresince günlük olarak tükettikleri besin (g) ve su (ml) miktarlarının ortalamaları hesaplanmış ve Çizelge 4. 3, Şekil 4. 1 ve Şekil 4. 2' de gösterilmiştir.

**Çizelge 4. 3.** Yağ kontrol ve uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin ve su miktarları

	Yağ Kontrol (1 ml)	DEHP (100 mg/kg/gün)	DEHP (200 mg/kg/gün)	DEHP (400 mg/kg/gün)
<b>Besin(g)</b>	11,70±3,60	12,43±4,37	14,06±6,51	15,05±5,72
<b>Su(ml)</b>	11,82±2,76	12,75±2,95	12,12±2,39	13,34±3,71

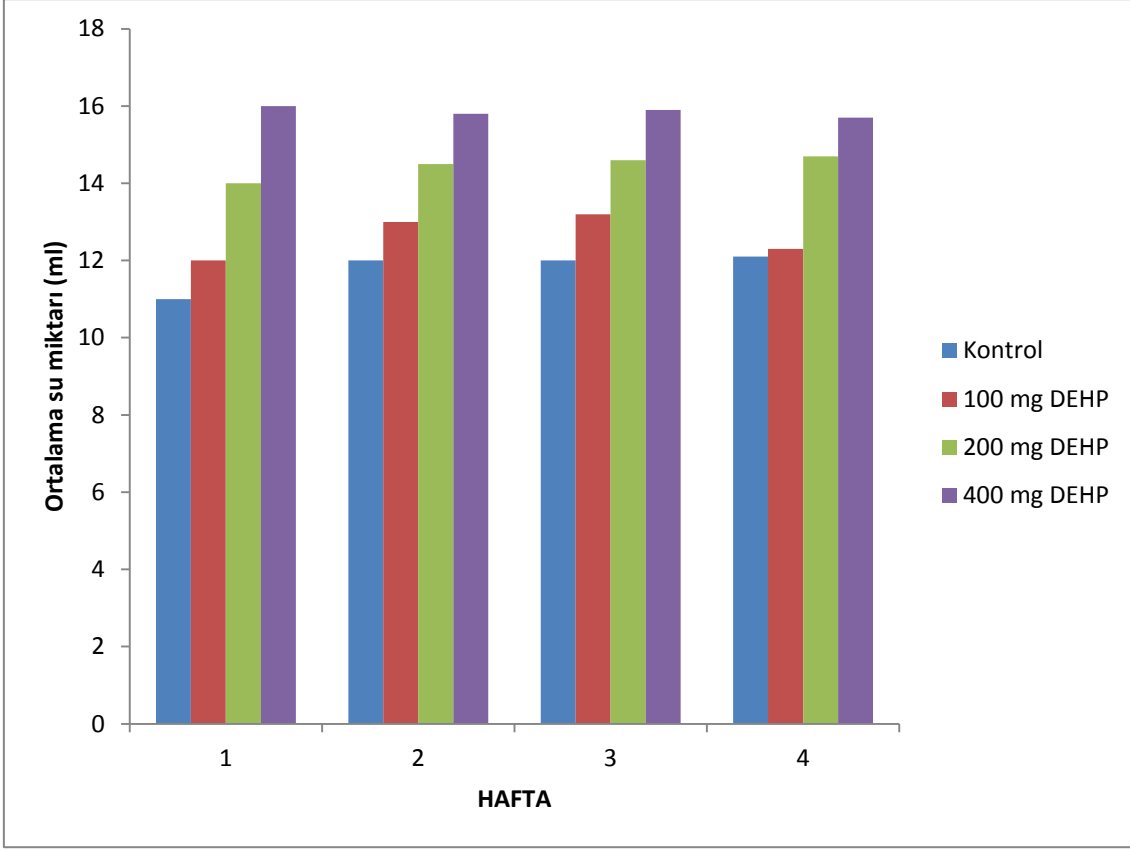
Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. ( $p \leq 0,05$ ).

Deney sonunda uygulama gruplarının su tüketimleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında artış görülmesine rağmen anlamlı olarak bir farklılık bulunamamıştır. Ayrıca uygulama gruplarının yem tüketimleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, oluşan artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



**Şekil 4. 1.** Kontrol grubu ve DEHP uygulanan gruplardaki sıçanların haftalık ortalama yem tüketimleri





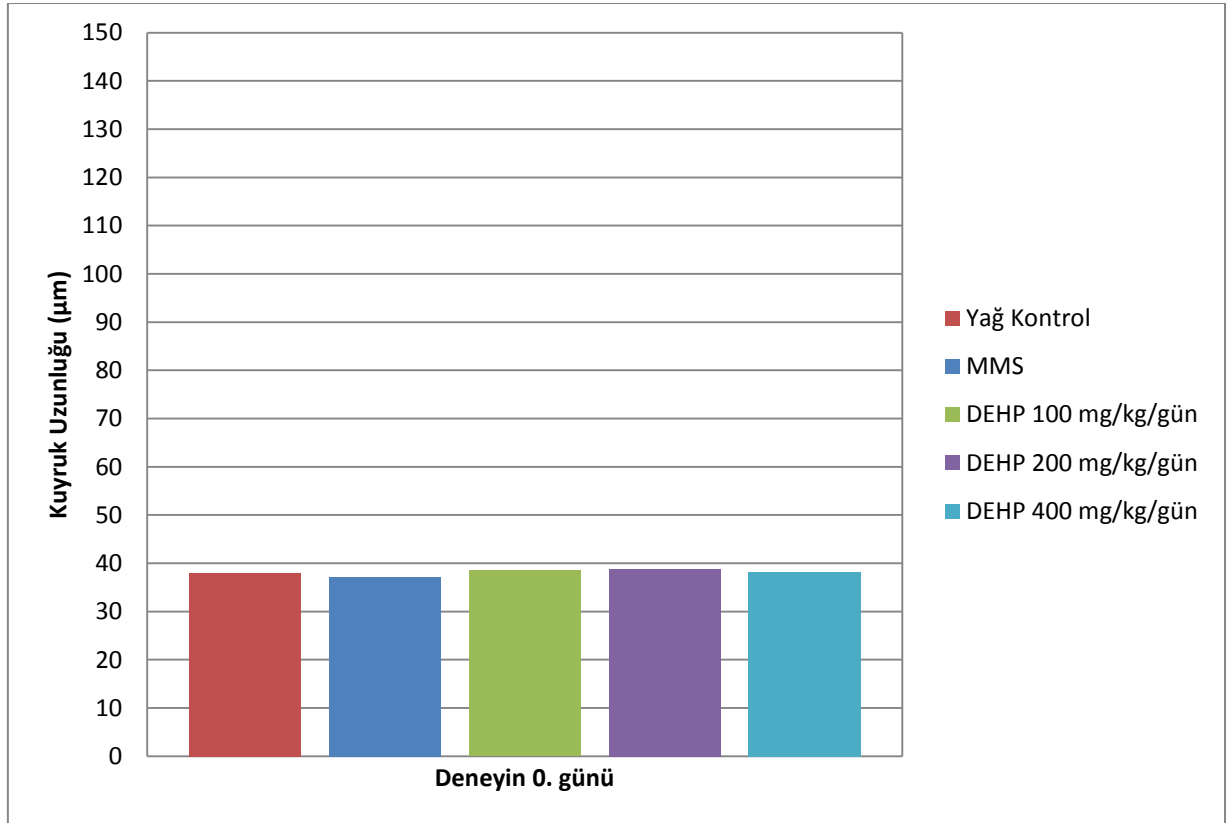
**Şekil 4. 2.** Kontrol grubu ve DEHP uygulanan gruptaki sıçanların haftalık ortalama su tüketimleri

#### 4.2 Comet Analiz Sonuçları

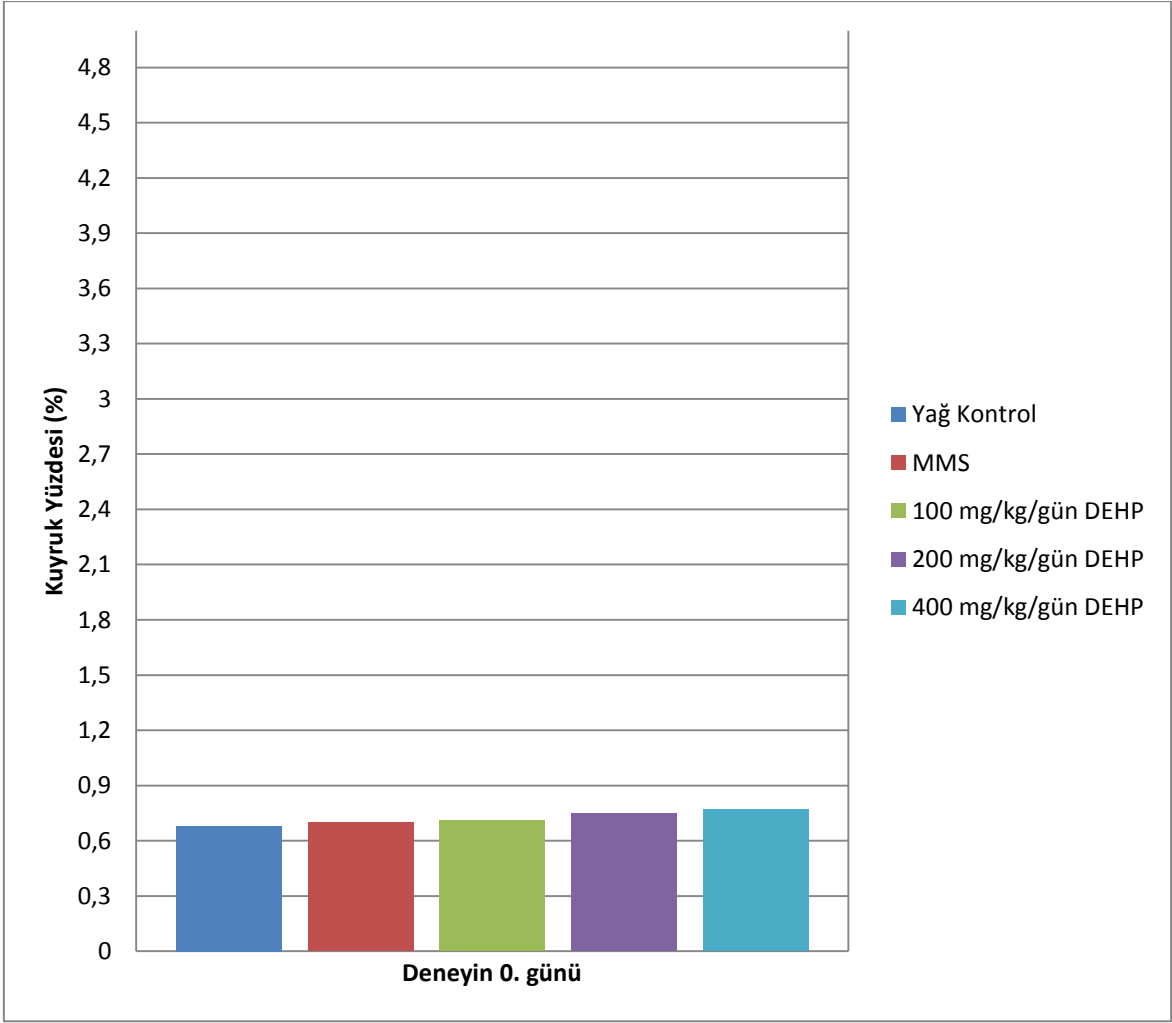
Yağ kontrol, pozitif kontrol ve DEHP uygulaması yapılan sıçanların 0., 7., 14., 21., ve 28. günlerin sonunda kalplerinden alınan kanda Comet testi yapılmıştır. Parametreler sırasıyla çizelge 4. 4-7 ve şekil 4. 3-8'de gösterilmiştir. Lenfositlere ait görüntüler sırasıyla şekil 4.9-12'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4. 4.** Kontrol grupları ve uygulama yapılacak olan sıçanların çalışmaya başlamadan önceki (0. Gün) Comet parametreleri

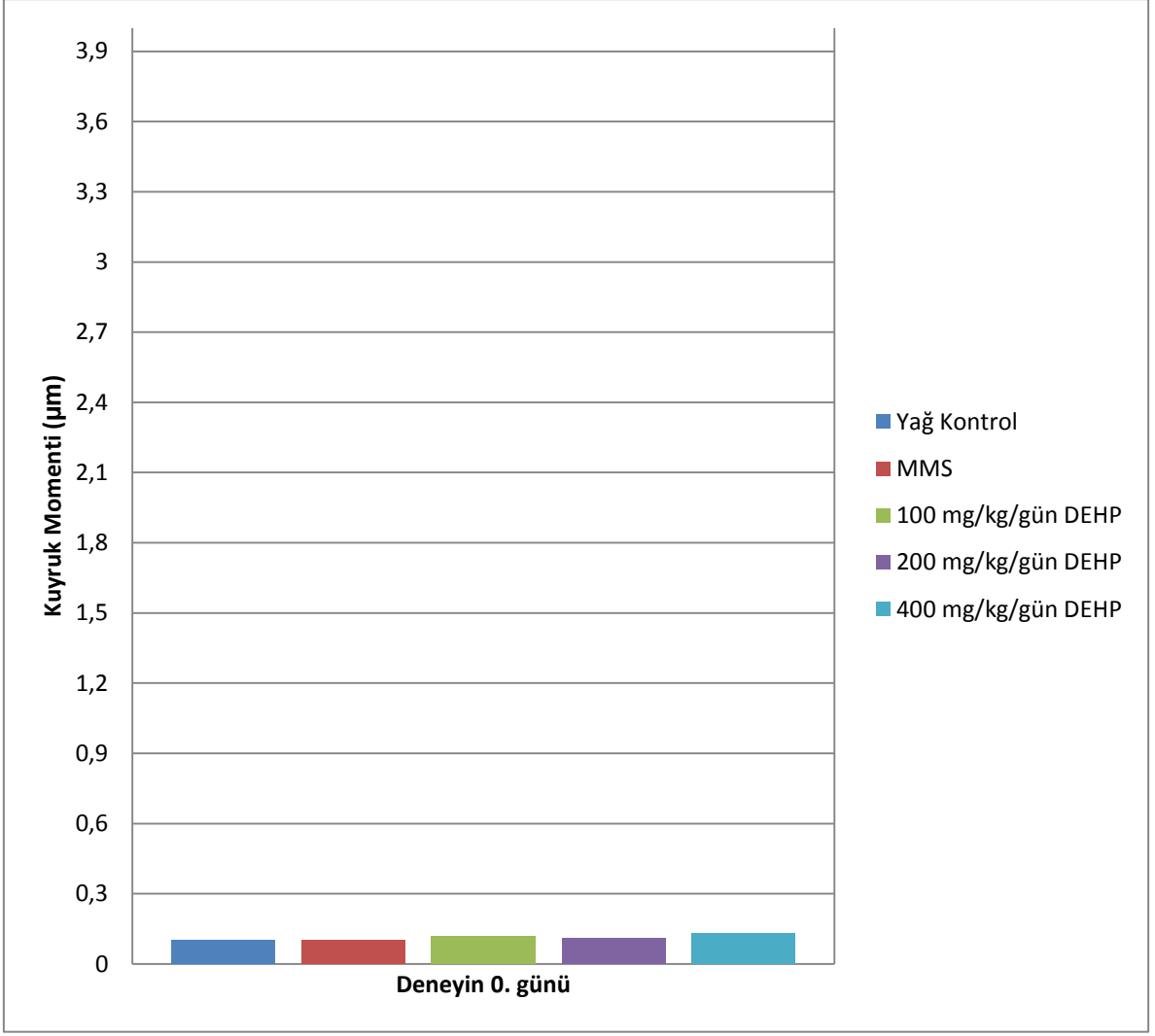
Gruplar	Doz	Kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ )	Kuyruk Yüzdesi (%)	Kuyruk Momenti ( $\mu\text{m}$ )
Yağ Kontrol	1 ml	38,02 $\pm$ 7,17	0,68 $\pm$ 6,32	0,10 $\pm$ 1,61
Pozitif Kontrol (MMS)	60 mg/kg	37,23 $\pm$ 3,2	0,70 $\pm$ 1,22	0,10 $\pm$ 1,02
DEHP	100 mg/kg/gün	38,55 $\pm$ 5,6	0,71 $\pm$ 0,7	0,12 $\pm$ 0,9
DEHP	200 mg/kg/gün	38,87 $\pm$ 5,63	0,75 $\pm$ 0,4	0,11 $\pm$ 0,1
DEHP	400 mg/kg/gün	38,13 $\pm$ 0,1	0,77 $\pm$ 5,5	0,13 $\pm$ 2,63



**Şekil 4.3.** Kontrol grupları ve uygulama gruplarındaki sıçanların çalışmaya başlamadan önceki kuyruk uzunluğu değerleri



**Şekil 4.4.** Kontrol grupları ve uygulama gruplarındaki sıçanların çalışmaya başlamadan önceki kuyruk yüzdesi değerleri



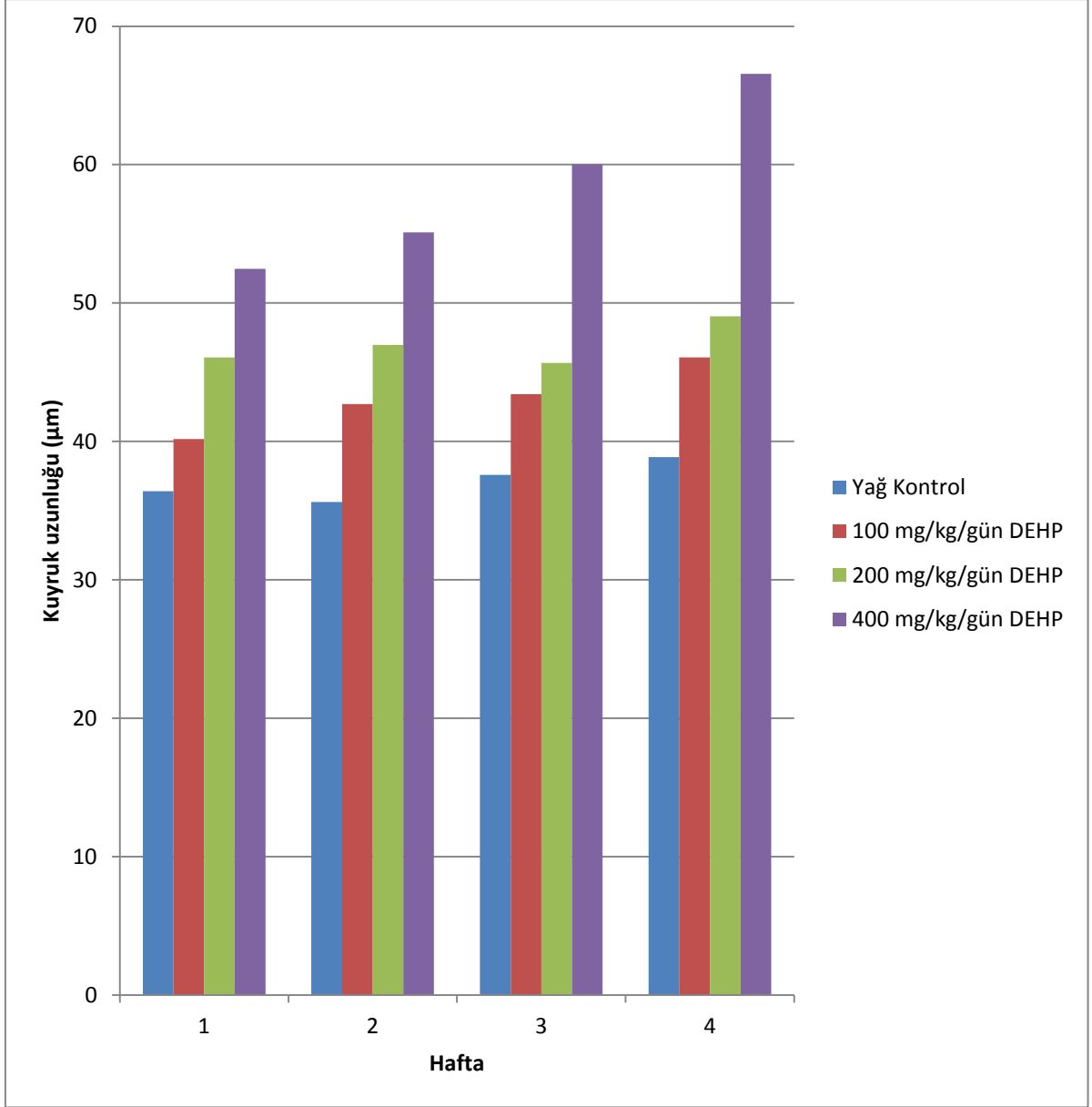
**Şekil 4. 5.** Kontrol grupları ve uygulama yapılacak olan sıçanların çalışmaya başlamadan önceki kuyruk momentleri değerleri

**Çizelge 4. 5.** Yağ kontrol ve DEHP uygulanan gruplara ait sıçanların haftalık kuyruk uzunluğu değerleri

KUYRUK UZUNLUĞU (µM)					
Gruplar	Doz	7.GÜN	14.GÜN	21.GÜN	28.GÜN
Yağ Kontrol	1ml	36,01±5,0	35,63±1,2	37,58±0,1	38,88±0,1
DEHP	100 mg/kg/gün	40,17±6,11	42,7±0,7	43,41±0,9 <sup>a</sup>	46,07±0,2
DEHP	200 mg/kg/gün	46,07±0,1 <sup>a</sup>	46,97±0,4 <sup>a,d</sup>	45,68±0,3 <sup>a,d</sup>	49,03±0,1 <sup>a,d</sup>
DEHP	400 mg/kg/gün	52,48±2,1 <sup>a,b</sup>	55,1±1,1 <sup>a,b</sup>	60,01±0,1 <sup>a,b,c</sup>	66,56±0,2 <sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 100 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 200 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 400 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı (p≤0,05).

Comet analizi sonuçlarına göre; haftalık olarak ölçülen parametrelerden kuyruk uzunluğu, 100 mg/kg/gün DEHP doz grubunda yağ kontrole göre artış olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün DEHP doz gruplarındaki artış ise yağ kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.6). 400 mg/kg/gün DEHP uygulaması yapılan sıçanlardaki kuyruk uzunluğu ise, haftalık olarak bir artış göstermiştir ve bu artış 7.günün ve 14. günün sonunda yağ kontrol ve 100 mg/kg/gün doz grubuna göre anlamlı bulunmuştur.



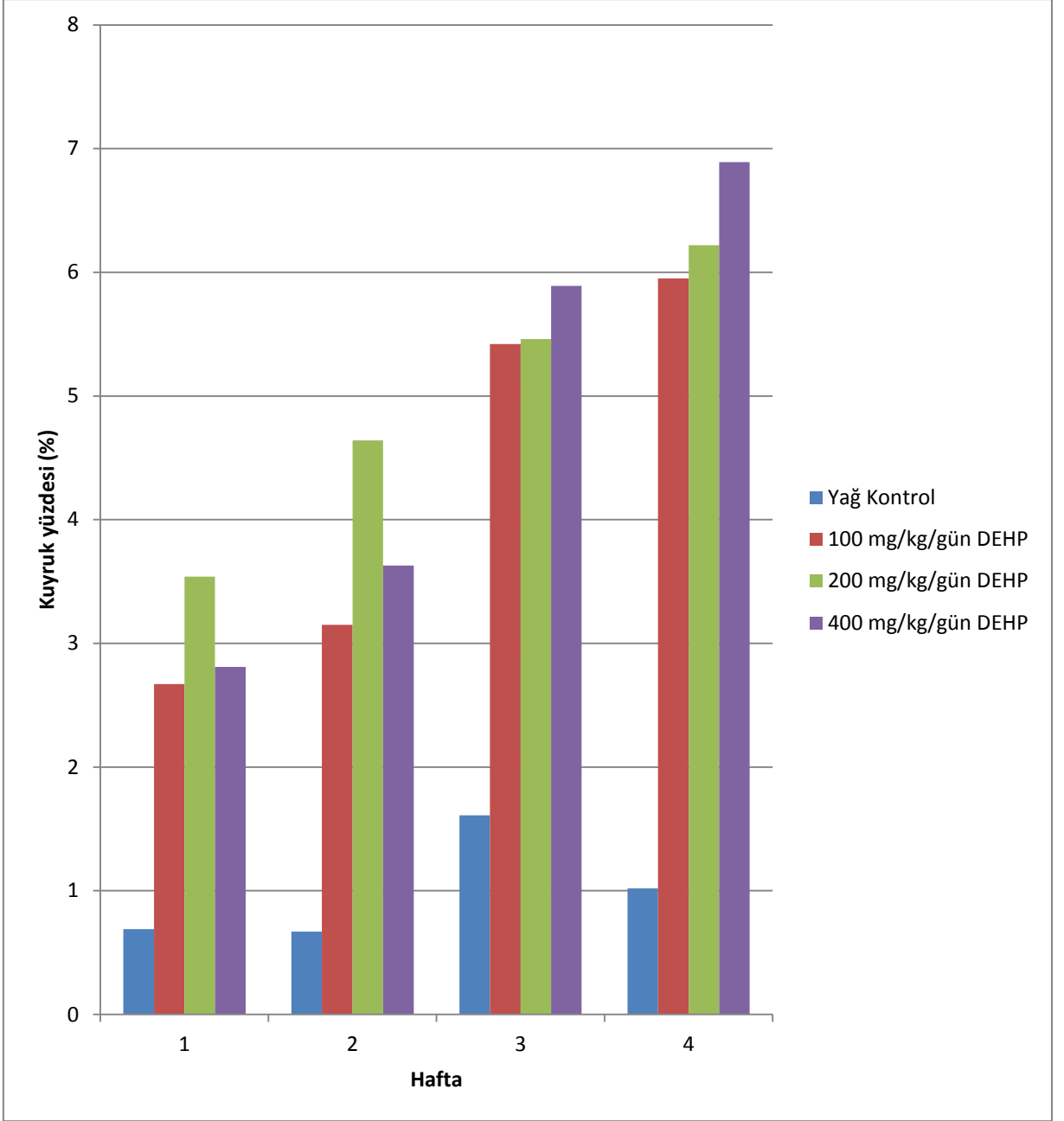
**Şekil 4. 6.** Yağ kontrol, pozitif kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların haftalık Comet analizi kuyruk uzunluğu değerleri

**Çizelge 4.6.** Yağ kontrol ve DEHP uygulanan gruplara ait sıçanların haftalık kuyruk yüzdesi değerleri

KUYRUK YÜZDESİ (%)					
Gruplar	Doz	7.GÜN	14.GÜN	21.GÜN	28.GÜN
<b>Yağ Kontrol</b>	1ml	0,69±0,1	0,67±1,2	1,61±0,3	1,02±0,2
<b>DEHP</b>	100 mg/kg/gün	2,67±6,11	3,15±0,7	5,42±0,9 <sup>a</sup>	5,95±0,8
<b>DEHP</b>	200 mg/kg/gün	3,54±0,1 <sup>a</sup>	4,64±0,4 <sup>a</sup>	5,46±0,3 <sup>a</sup>	6,22±0,1 <sup>a</sup>
<b>DEHP</b>	400 mg/kg/gün	2,81±2,1 <sup>a</sup>	3,63±1,1 <sup>a,b</sup>	5,89±0,1 <sup>a</sup>	6,89±0,2 <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 100 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 200 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 400 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı ( $p \leq 0,05$ ).

Kuyruk yüzdesine haftalık olarak bakıldığında, 100 mg/kg/gün uygulama grubunda yalnızca 21.günün sonunda yapılan analizde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir. 200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün DEHP doz gruplarında ise tamamında yağ kontrole göre anlamlı olan bir artış görülmüştür. 400 mg/kg/gün uygulama grubunda, 14. ve 28. günlerin sonundaki kuyruk yüzdesindeki artış, 100 mg/kg/gün doz grubuna göre anlamlı bulunmuştur.



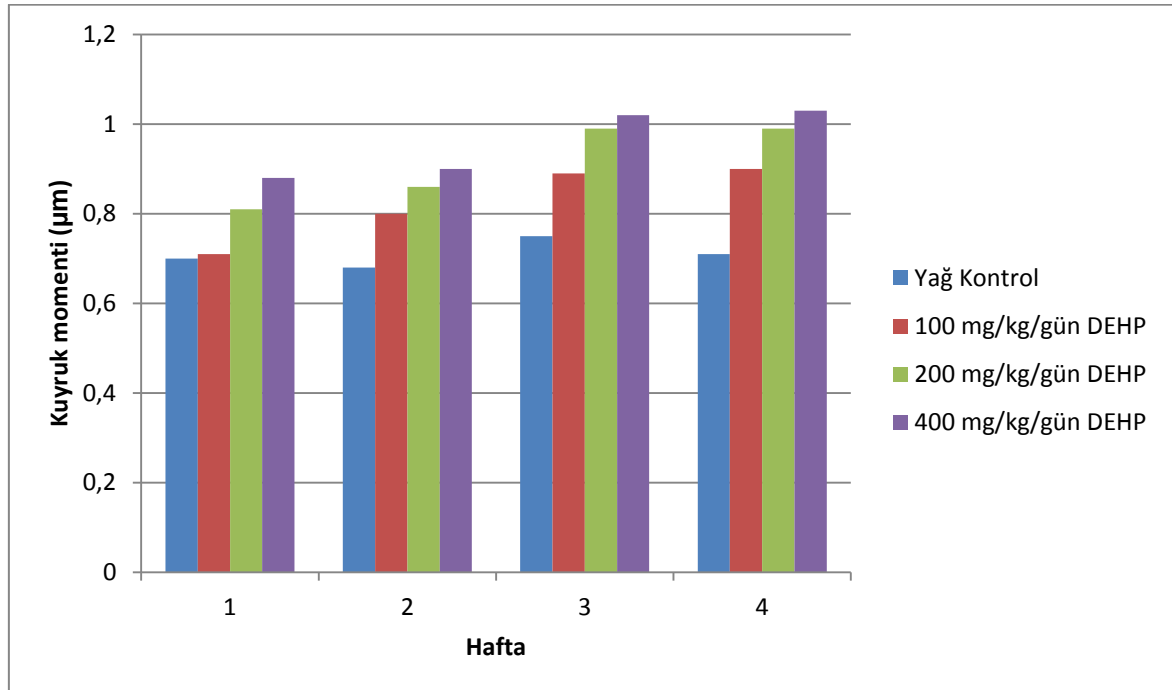
**Şekil 4. 7.** Yağ kontrol, pozitif kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların haftalık Comet analizi kuyruk yüzdesi değerleri



**Çizelge 4.7.** Yağ kontrol ve DEHP uygulanan gruplara ait sıçanların haftalık kuyruk momenti değerleri

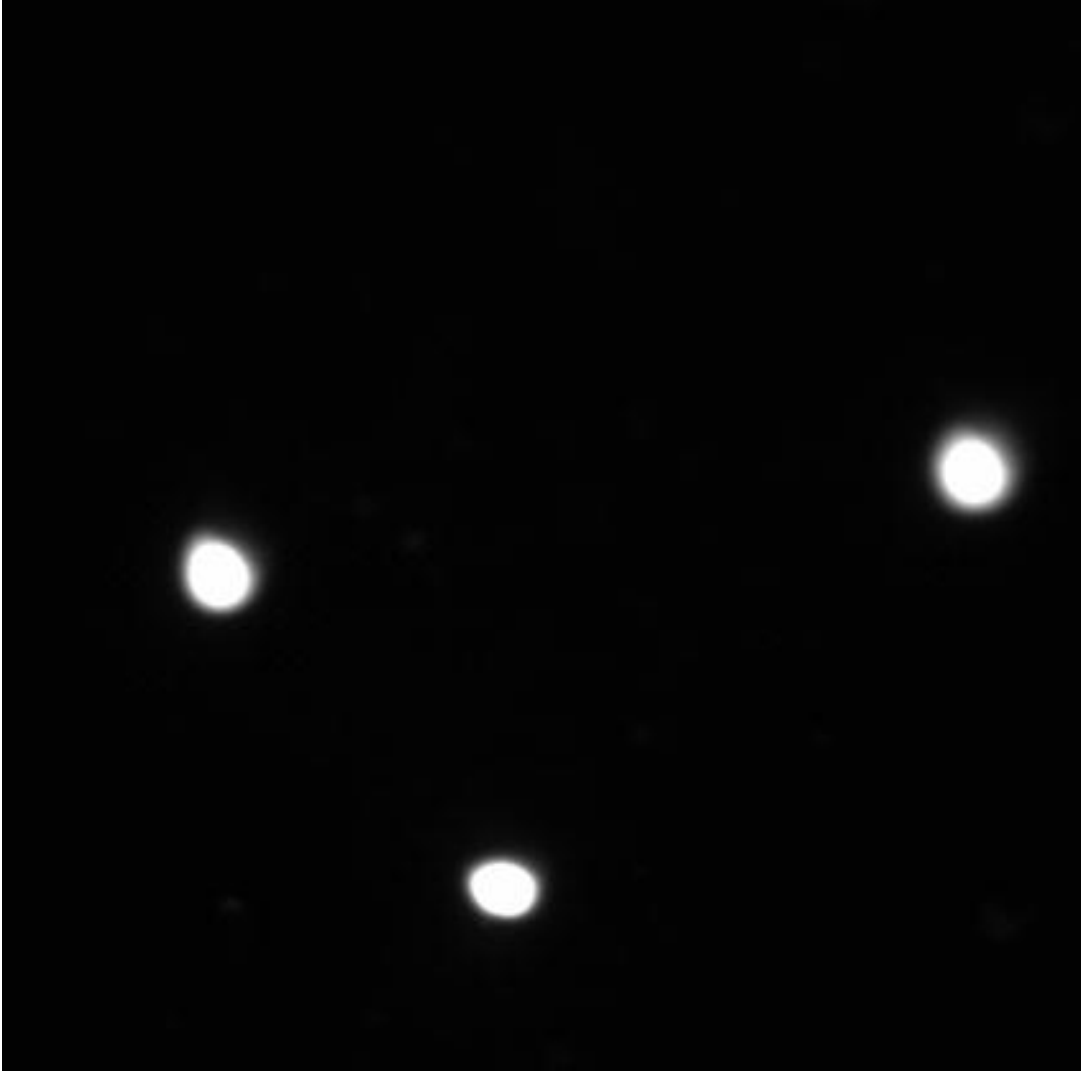
KUYRUK MOMENTİ (%)					
Gruplar	Doz	7.GÜN	14.GÜN	21.GÜN	28.GÜN
Yağ Kontrol	1ml	0,70±4,1	0,68±1,2	0,75±0,3	0,71±0,4
DEHP	100 mg/kg/gün	0,71±0,1	0,80±0,7 <sup>a</sup>	0,89±0,9 <sup>a</sup>	0,90±0,8 <sup>a</sup>
DEHP	200 mg/kg/gün	0,81±0,1 <sup>a,b</sup>	0,86±0,4 <sup>a</sup>	0,99±0,3 <sup>a,b</sup>	0,99±0,1 <sup>a</sup>
DEHP	400 mg/kg/gün	0,88±3,1 <sup>a,b</sup>	0,90±1,1 <sup>a,b</sup>	1,02±0,1 <sup>a,b</sup>	1,03±0,2 <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 100 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı, <sup>c</sup> 200 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 400 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı (p≤0,05).

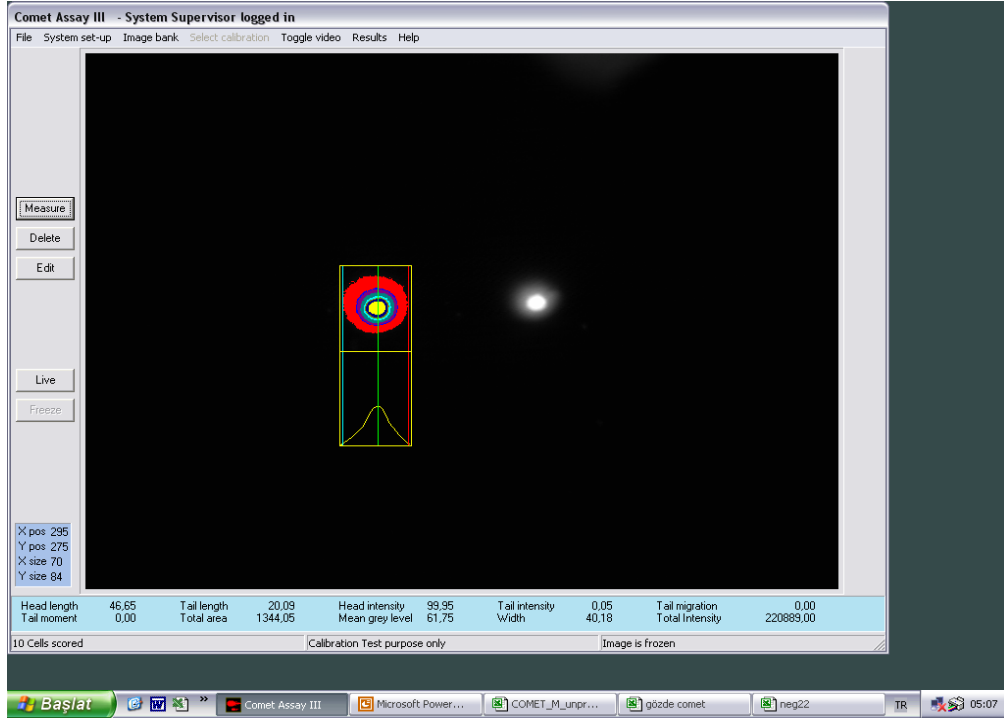


**Şekil 4. 8.** Yağ kontrol, pozitif kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların haftalık Comet analizi kuyruk momenti değerleri

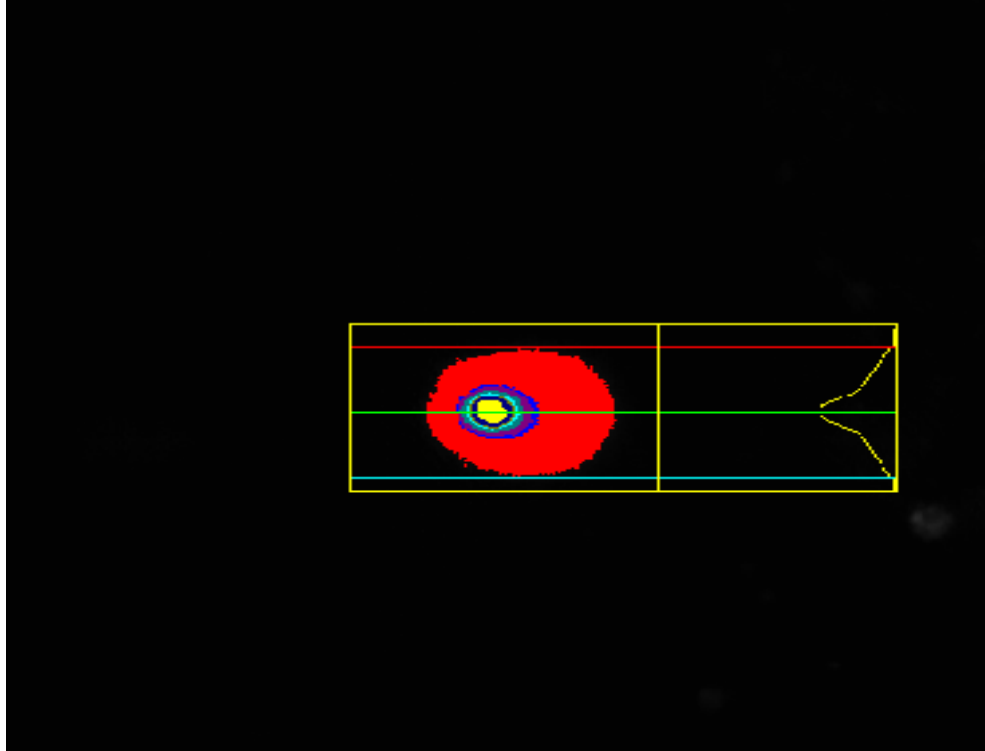
Kuyruk momenti açısından haftalara bakıldığında, 100 mg/kg/gün DEHP doz grubunda 14., 21. ve 28. günlerin sonunda bir artış olmuştur ve yağ kontrole göre anlamlıdır. 200 mg/kg/gün doz grubunda bütün ölçümler yağ kontrole göre anlamlı artış gösterirken, sadece 7. ve 21. günün sonundaki ölçümler 100 mg/kg/gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. 400 mg/kg/gün DEHP doz grubunda, kuyruk momenti bütün ölçümlerde yağ kontrol ve 100 mg/kg/gün doz grubuna göre anlamlı fakat 200 mg/kg/gün doz grubuna göre anlamsız artış göstermiştir.



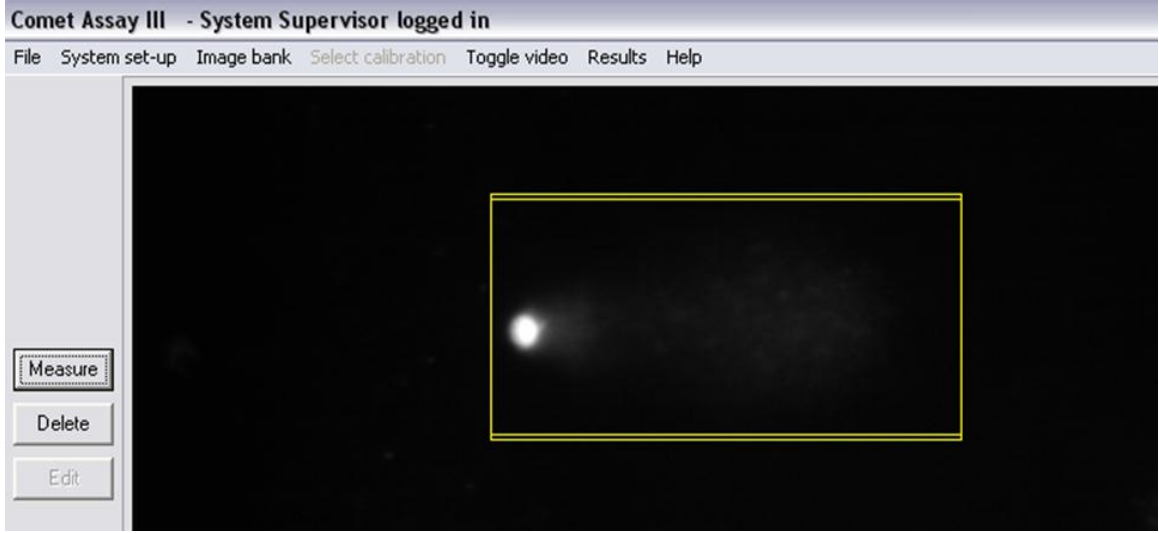
**Şekil 4.9** Yağ kontrol grubuna ait hasarsız lenfositler



**Şekil 4.10** 100 mg/kg/gün DEHP uygulama grubuna ait düşük hasarlı Comet görüntüsü



**Şekil 4.11** 200 mg/kg/gün DEHP uygulama grubuna ait orta derece hasarlı Comet görüntüsü



**Şekil 4.12.** 400 mg/kg/gün DEHP uygulamasına ait Comet analizinde kuyruk görüntüsü

**Çizelge 4.8.** Kontrol grupları ve DEHP uygulanan gruplara ait sıçanların deney sonunda ortaya çıkan Comet parametreleri

Grup	Doz	Kuyruk Uzunluğu( $\mu\text{m}$ )	Kuyruk Momenti( $\mu\text{m}$ )	Kuyruk Yüzdesi (%)
Yağ Kontrol	1 ml	38,88 $\pm$ 0,1	0,71 $\pm$ 0,4	1,02 $\pm$ 0,4
MMS (Pozitif Kontrol)	60 mg/kg	142,23 $\pm$ 9,87 <sup>a,c,d,e</sup>	21,49 $\pm$ 1,02 <sup>a,c,d,e</sup>	29,07 $\pm$ 1,22 <sup>a,c,d,e</sup>
DEHP	100 mg/kg/gün	46,07 $\pm$ 0,2 <sup>a,b,e</sup>	0,90 $\pm$ 0,8 <sup>a,b,d,e</sup>	5,95 $\pm$ 0,8 <sup>a,b,d,e</sup>
DEHP	200 mg/kg/gün	49,03 $\pm$ 0,1 <sup>a,b,e</sup>	0,99 $\pm$ 0,1 <sup>a,b,c,e</sup>	6,22 $\pm$ 0,1 <sup>a,b,c,e</sup>
DEHP	400 mg/kg/gün	66,56 $\pm$ 0,2 <sup>a,b,c,d</sup>	1,03 $\pm$ 0,2 <sup>a,b,c,d</sup>	6,89 $\pm$ 0,2 <sup>a,b,c,d</sup>

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> MMS kontrol grubundan farklı, <sup>c</sup> 100 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı, <sup>d</sup> 200 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı, <sup>e</sup> 400 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı ( $p \leq 0,05$ ).

### 4.3 Histopatolojik incelemeler

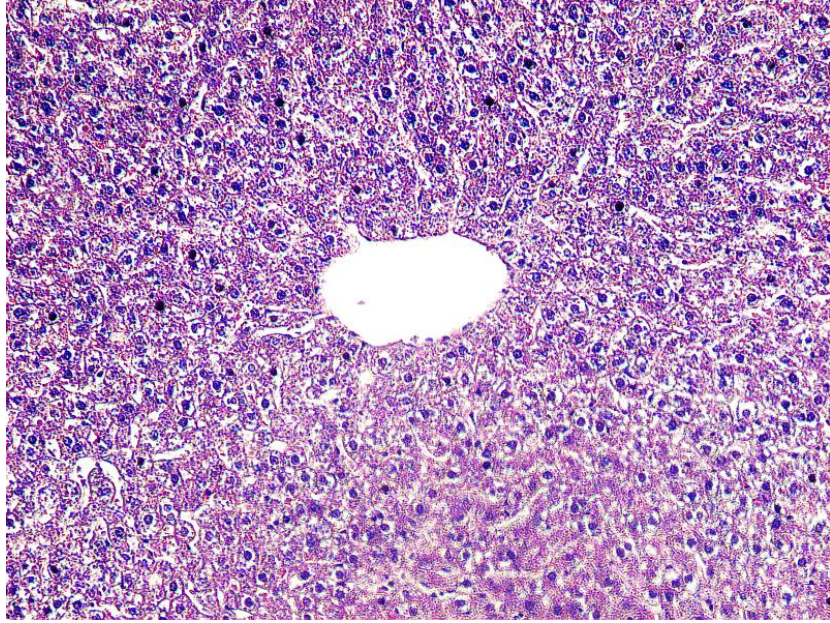
Rutin histolojik yöntemlerle hazırlanan ve H&E ile boyanan karaciğer ve böbrek doku preparatları histopatolojik açıdan incelenmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarının histopatolojik olarak incelenmesinden sonra 20X ve 40X büyütmelemlerde fotoğrafları çekilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda Çizelge 4. 8' de deney gruplarına ait sıçanların karaciğer histopatolojik bulgularının görülme sıklığı verilmiştir. Deney grubundaki sıçanlara ait karaciğer dokusunun genel görünümü Şekil 4. 9 - 4. 14' de verilmiştir. Buna göre uygulama gruplarının tümünde sinüzoidal dejenerasyon, ödem ve mononükleer hücre infiltrasyonu yağ kontrole göre artış göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 100 mg/kg/gün DEHP uygulamasında sitoplazmik erime görülmüş fakat anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 4. 9' da deney gruplarına ait sıçanların böbrek histopatolojik bulgularının görülme sıklığı verilmiştir. Deney grubundaki sıçanlara ait böbrek dokusunun genel görünümü Şekil 4. 15 - 4. 19' da verilmiştir. Buna göre DEHP uygulama gruplarının bütününde görülen bulgular, yağ kontrole göre artış göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

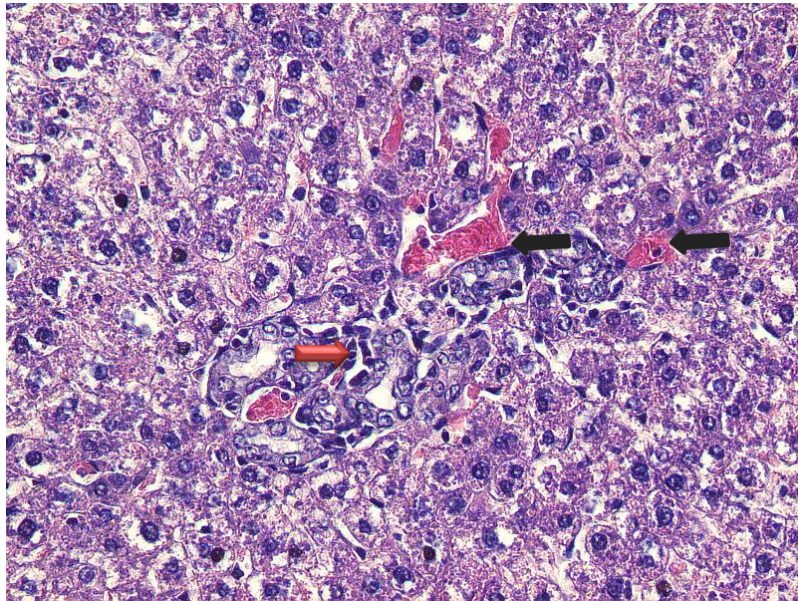
**Çizelge 4. 8.** Yağ kontrol ve DEHP uygulama gruplarına ait sıçanların karaciğer ve böbrek dokularına ait histopatolojik bulgular



	Yağ Kontrol (1ml)	DEHP (100mg/kg/gün)	DEHP (200mg/kg/gün)	DEHP (400mg/kg/gün)
<b><u>Karaciğer</u></b>				
Sinüzoidal dejenerasyon	0/6	5/6*	6/6*	6/6*
Konjesyon	1/6	6/6*	6/6*	6/6*
Sitoplazmik erime	1/6	3/6	6/6*	6/6*
Mononükleer hücre infiltrasyonu	0/6	5/6*	6/6*	6/6*
<b><u>Böbrek</u></b>				
Glomerulus dejenerasyonu	0/6	6/6*	6/6*	6/6*
Konjesyon	0/6	6/6*	6/6*	6/6*
Mononükleer hücre infiltrasyonu	0/6	5/6*	6/6*	6/6*

N: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,  $p \leq 0,05$ .

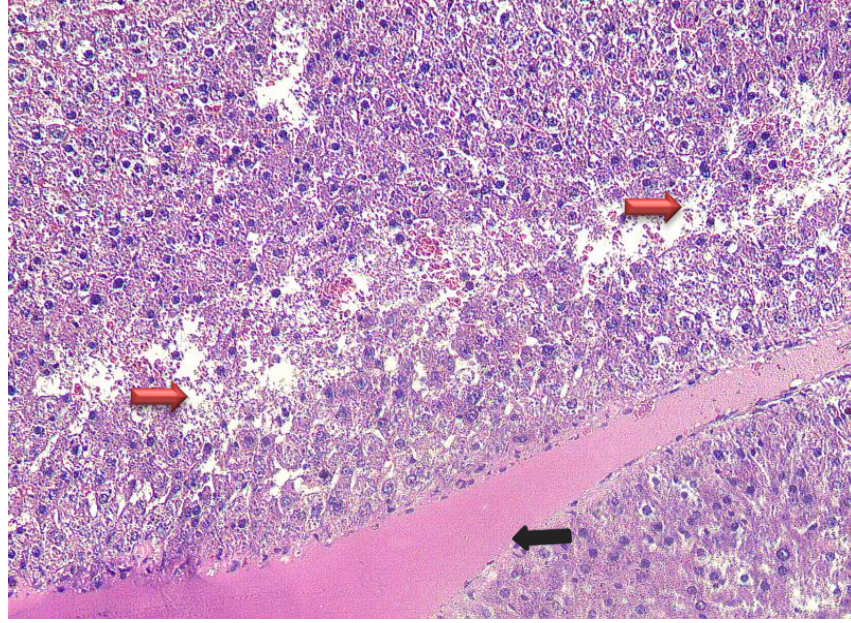


**Şekil 4.9** Kontrol grubu sıçanda karaciğerin histolojik görüntüsü (H&E,X400).

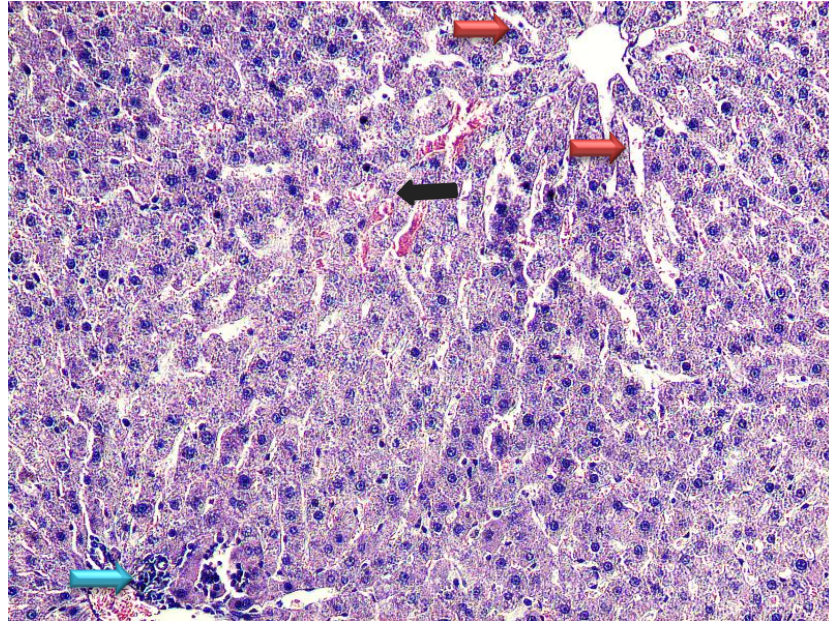


**Şekil 4.10** DEHP 100 mg/kg/gün DEHP uygulama grubunda karaciğerde mononükleer hücre infiltrasyonu (  ) ve minimal konjesyon (  )(H&E,X400).



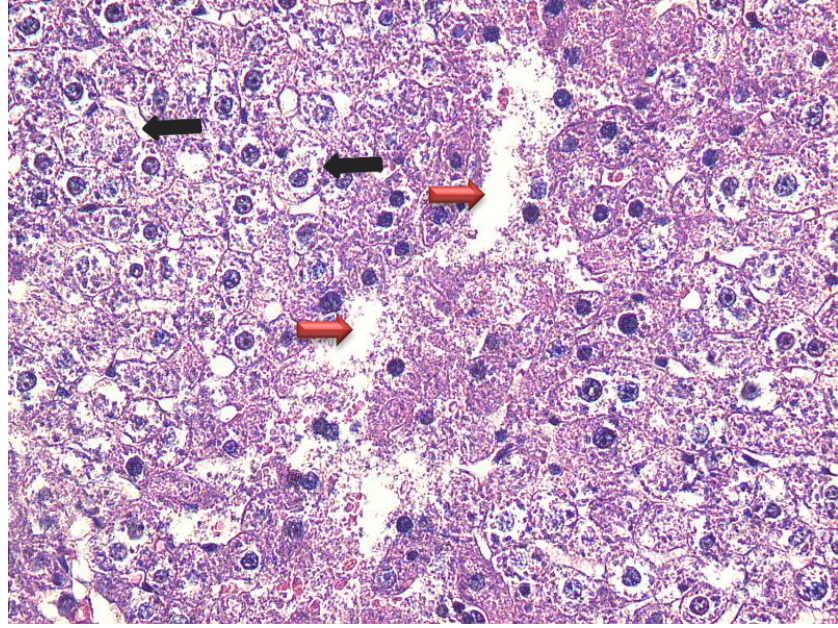


**Şekil 4.11** 100 mg/kg/gün DEHP uygulama grubu erkek sıçanda karaciğerde ödem (→) ve konjesyon (→)(H&E,X200).

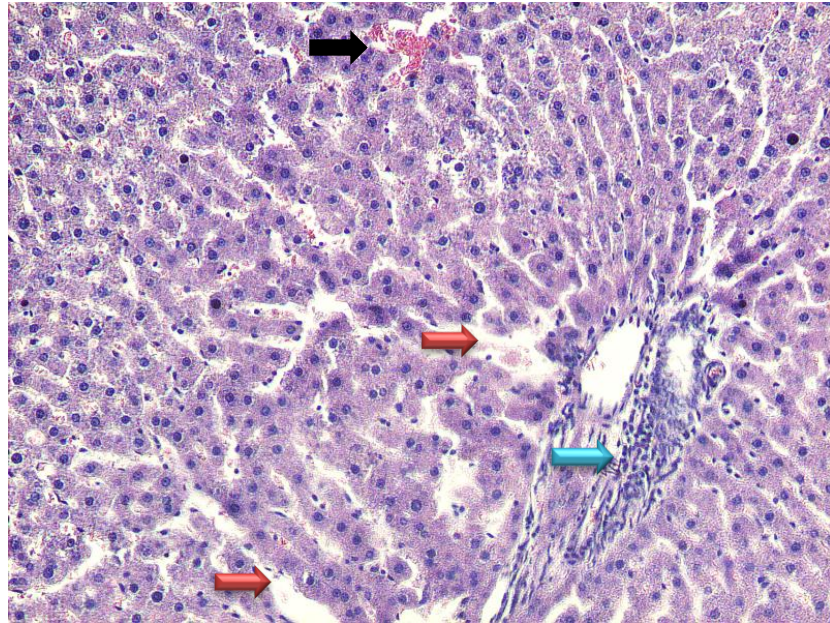


**Şekil 4.12** 200 mg/kg/gün DEHP uygulama grubu erkek sıçanda karaciğerde sinüzoidal genişleme (→ , konjesyon (→) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (→) (H&E,X200).



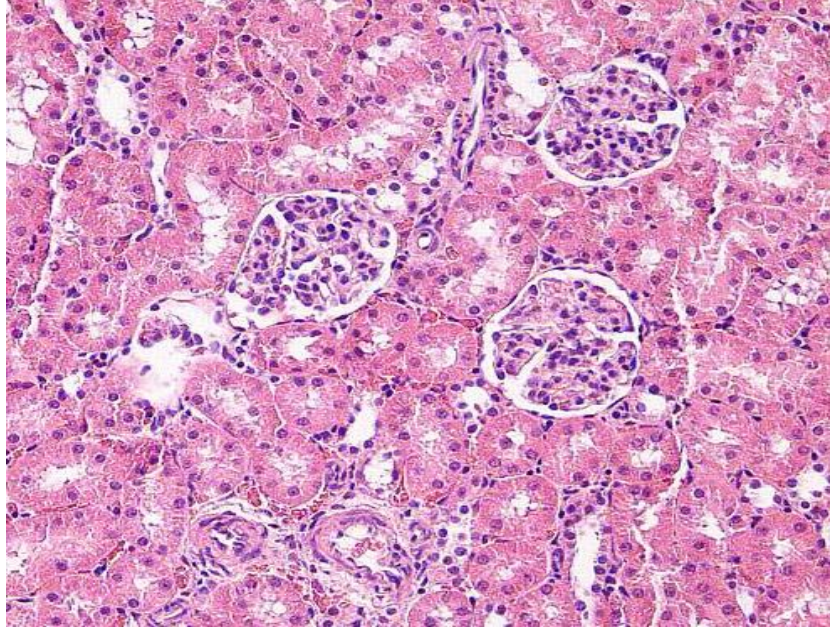


**Şekil 4.13** 200 mg/kg/gün DEHP uygulama grubu erkek sıçanda karaciğerde ödem ( → ) ve sitoplazmik erime( → ) (H&E,X400).

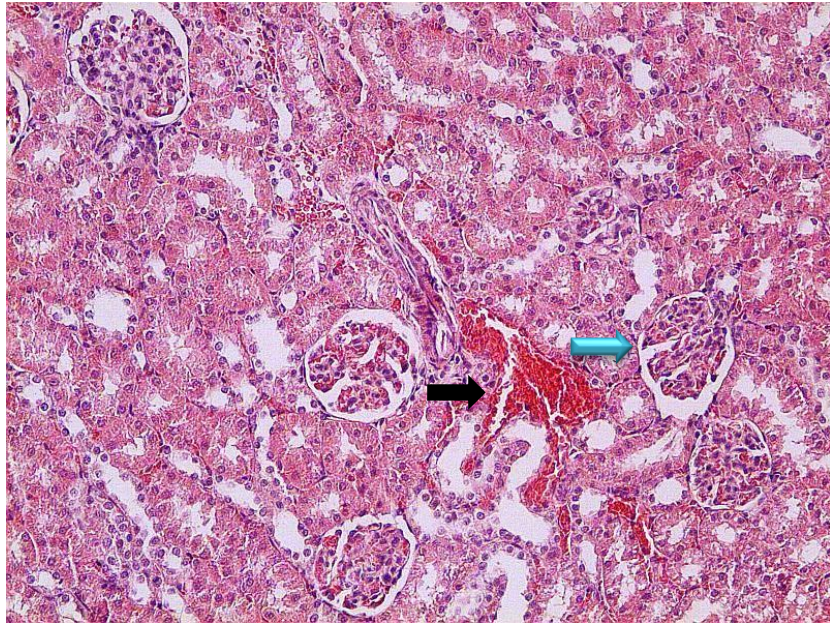


**Şekil 4.14** 400 mg/kg/gün DEHP uygulama grubu erkek sıçanda karaciğerde sinüzoidal dejenerasyon ( → ) , konjesyon ( → ) ve mononükleer hücre infiltrasyonu ( → ) (H&E,X200).



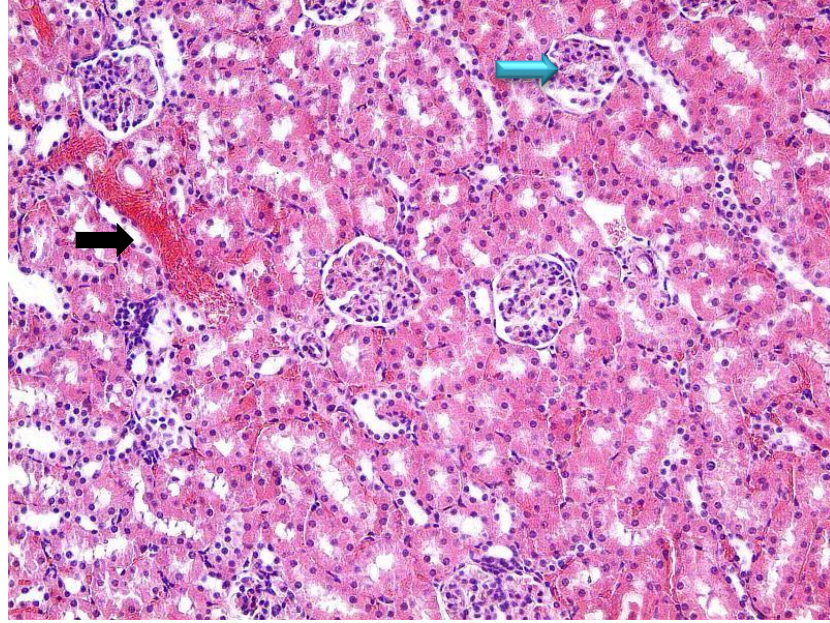




**Şekil 4.15** Kontrol grubu sıçanda böbreğin histolojik görüntüsü (H&E,X400)

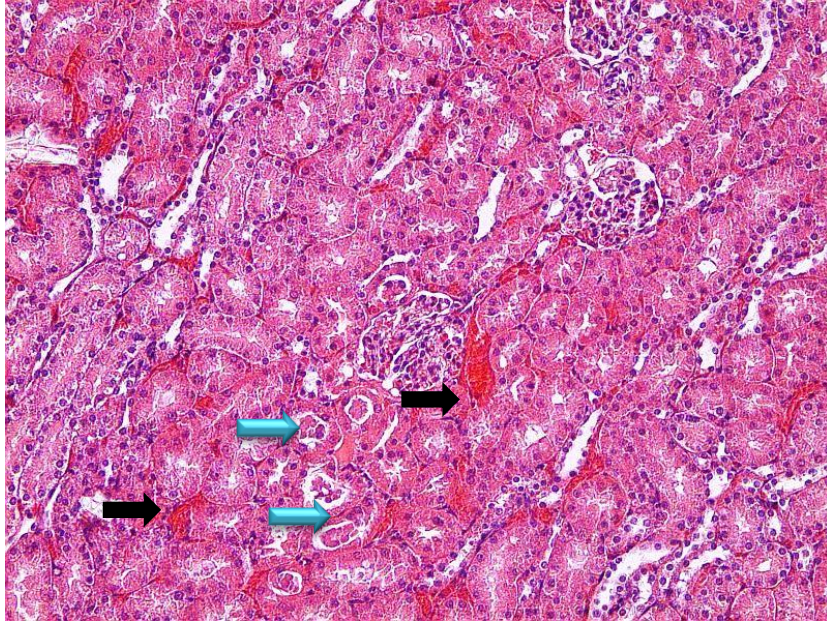




**Şekil 4.16** 100 mg/kg/gün DEHP uygulama grubu erkek sıçanda böbrekte glomerular bozulma (→) , konjesyon (→) (H&E,X200).

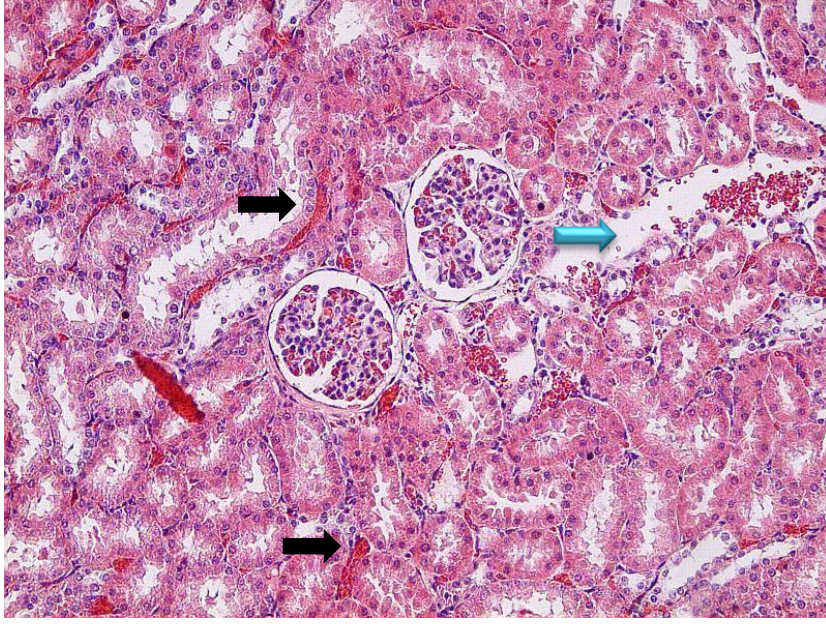




**Şekil 4.17** 100 mg/kg/gün DEHP uygulama grubu erkek sıçanda böbrekte glomerulus dejenerasyonu (  ve konjesyon (  ) (H&E,X200).



**Şekil 4.18** 200 mg/kg/gün DEHP uygulama grubu erkek sıçanda böbrekte tübüler dejenerasyon (  ) ve konjesyon (  ) (H&E,X200).



**Şekil 4.19** 400 mg/kg/gün DEHP uygulama grubu erkek sıçanda böbrekte tübüler dejenerasyon ( → ) ve konjesyon ( → ) (H&E,X200).

#### 4.4 Hematolojik incelemeler

Diseksiyon sonrası sıçanların kalbinden alınan kanda yapılan tam kan analizinden elde edilen değerler Çizelge 4. 10' da verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Yağ kontrol ve DEHP uygulama gruplarına ait sıçanların kan analiz sonuçları

Parametreler	Yağ Kontrol (1 ml)	DEHP (100mg/kg/gün)	DEHP (200mg/kg/gün)	DEHP (400 mg/kg/gün)
Lökosit (mm <sup>3</sup> )	2,35±1,54	2,98±2,34	3,13±1,11	1,19±0,39 <sup>a,b,c,d</sup>
Lenfosit (%)	69,60±6,17	70,83±1,34	65,42±8,39	78,41±6,90
Monosit (%)	11,17±1,40	11,40±2,41	10,30±1,97	2,40±0,10 <sup>a,b,c,d</sup>
Nötrofil/ Granülosit (%)	19,27±11,06	17,73±4,22	24,28±6,89	17,48±2,79
Eritrosit (mm <sup>3</sup> )	13,22±3,53	11,6±2,68	13,3±1,76	8,26±0,68
MCV (fl)	27,8±5,34	29,42±2,13	25,78±3,89	53,12±2,89 <sup>a,b,c,d</sup>
Hematokrit (%)	35,27±8,18	33,6±6,06	27,1±6,29	39,27±3,65
MCH (pg)	7,87±4,52	8,93±3,39	11,6±11,24	14,9±1,24
MCHC (g/dl)	26,75±8,78	29,8±9,16	23,05±6,05	28,07±1,06
Hemoglobin (g/dl)	8,92±1,26	9,5±1,16	9,02±1,6	6,33±0,93 <sup>a,b,c,d</sup>
Trombosit (mm <sup>3</sup> )	3287,83±76,73	4009,33±83,02	2266±98,19	2765,17±59,21
Pct (%)	3,92±1,45	5,7±3,34	3,97±1,89	3,61±1,42

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

Analiz sonuçlarına göre; uygulama grupları hemoglobin, lökosit, monosit açısından yağ kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür.



DEHP 400 mg/kg/gün doz grubundaki MCV değerleri, yağ kontrol, DEHP 100 mg/kg/gün ve DEHP 200 mg/kg/gün doz gruplarından istatistiksel olarak artan yönde farklılık bulunmuştur. Çizelge 4. 10'da görüldüğü gibi diğer tam kan parametreleri incelendiğinde kontrol grubu ile uygulama grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır.

#### **4.5.Biyokimyasal Analiz Sonuçları**

Deneyin sonunda erkek sıçanların kalbinden steril enjektör ile alınan kandan elde edilen serumdan ALT, AST, üre, total protein, trigliserit, glikoz, albümin ve kreatinin analizleri yapılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Gruplara ait biyokimyasal analiz sonuçları Çizelge 4. 11' de gösterilmiştir.

Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda, DEHP uygulama gruplarının hepsinde ALT ve AST değerleri incelendiğinde, yağ kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir. Aynı şekilde glikoz değerleri de yağ kontrole göre bütün gruplar da anlamlı bir artış göstermiştir. Bunun aksine trigliserit değerleri, uygulama gruplarının hepsinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir. 200 ve 400 DEHP mg/kg/gün uygulama grubu albümin değeri, DEHP 100 mg/kg/gün grubundan yüksek bulunmuştur Üre değeri ise DEHP 100 mg/kg/gün doz grubunda yağ kontrole göre düşüş göstermiştir. DEHP 200 ve 400 mg/kg/gün doz gruplarında ise üre değeri açısından anlamlı bir artış görülmüştür. Diğer parametrelerde kontrol grupları ve uygulama grupları arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır.

**Çizelge 4. 11.** yağ kontrol ve DEHP uygulama gruplarına ait sıçanların biyokimya analiz sonuçları

Parametreler	Yağ Kontrol (1 ml)	DEHP (100mg/kg/gün)	DEHP (200mg/kg/gün)	DEHP (400/mg/kg/gün)
ALT (IU/L)	45,65±7,41	55,25±1,99 <sup>a</sup>	66,63±0,72 <sup>a,b</sup>	82,91±7,82 <sup>a,b,c</sup>
AST (IU/L)	110,1±11,6	129,8±8,9 <sup>a</sup>	182,6±3,9 <sup>a,b</sup>	268,3±10,6 <sup>a,b,c</sup>
Trigliserit (mg/dl)	945,8±4,6	437,8±4,5 <sup>a</sup>	717,3±5,0 <sup>a,b,c</sup>	702,6±6,4 <sup>a,b,c</sup>
Glikoz (IU/L)	191,5±6,1	211,1±3,5 <sup>a</sup>	251,1±1,3 <sup>a,b</sup>	301,6±4,5 <sup>a,b,c</sup>
Total Protein (g/dl)	8,6± 0,8	9,5±2,6	8,8±0,3	9,6±0,4
Albümin (g/dl)	32,35±2,73	27,93±1,34	31,03±1,88 <sup>b</sup>	35,66±1,53 <sup>b,c</sup>
Kreatinin (mg/dl)	0,46±0,22	0,66±0,25	0,38±0,16	0,35±0,15
Üre (mg/dl)	14,8±3,3	7,7±1,8 <sup>a,c,d</sup>	22,3±8,3 <sup>a,b,d</sup>	21,5±2 <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Yağ kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> 100 mg/kg/gün DEHP grubundan farklı, <sup>c</sup> 200 mg/kg/gün DEHP grubundan farklı, <sup>d</sup> 400 mg/kg/gün DEHP uygulama grubundan farklı (p≤0,05).

## 5.TARTIŞMA

Yaşamımızı kolaylaştırmak için üretilen ancak tehlikeli olduğu düşünülen ve biyolojik etkileri henüz tam olarak bilinmeyen birçok sentetik madde bulunmaktadır. Bu maddelerin incelenmesi, gerekli deneylerin yapılması, insan sağlığı ve çevreye olan etkileri bakımından önem taşımaktadır. Bu amaçla gerçekleştirilen *in vivo* ve *in vitro* deneyler ile kimyasal maddelerin toksisitesi ortaya konmaya çalışılmakta, böylece alınması gereken önlemler ya da tedavi biçimleri hakkında ön bilgi oluşturulmaktadır.

Endokrin bozucu; endokrin sistemin çalışmasını değiştiren ve sonunda sağlıklı organizmada veya onun nesillerinde sağlık üzerine birtakım olumsuz etkilere neden olabilen, dışardan alınan madde veya bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Endokrin bozucu kimyasallar; plastiklerde, deterjanlarda, tarım ilaçlarında ve çok sayıda endüstriyel olarak üretilen kimyasalların bileşiminde bulunmaktadır. Bunların bazıları çevrede birikirken, bazıları çözünerek havaya, toprağa veya suya karışmaktadır. Bazıları lipofilik özellikte olup yağ dokusunda birikir ve süte salınır, bazıları sadece kısa bir zaman için ama gelişimin kritik bir periyodu sırasında rol alabilir. Bu nedenle endokrin çevre bozucular ve onların insan sağlığı üzerine olası etkileri giderek tartışmaların odağı haline gelmektedir.

DEHP, düşük maliyeti ve yüksek etkinliği sebebiyle fitalatlar içerisinde en çok kullanılanıdır [160]. Amerika Birleşik Devletleri'nde National Toxicology Programı'nın çalışmaları sonucu DEHP' in fare ve sıçanlarda karaciğer tümörüne neden olduğunun bulunması ve bununla ilgili yayını takiben, bu madde üzerindeki araştırmalar yoğunlaşmıştır.

DNA çeşitli reaktif moleküllerin hedefi olan, hasara duyarlılığı yüksek bir molekül dür. DNA hasarı normal DNA metabolizması sırasında kendiliğinden veya bazı çevresel faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır [161]. Genetik bilginin sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemli olduğundan çekirdekte DNA hasarını onaran çeşitli onarım sistemleri yer almaktadır. Ağır hasar oluştuğunda veya DNA onarım aktivitesi defektif ise DNA hasarı kısa dönemde replikasyon, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, uzun vade de ise mutasyona ve kromozom anomalilerine sebep olmaktadır [162]. Kanseri, diyabet, ateroskleroz gibi hastalıkların etiyolojisinde yer alan DNA hasarı



günümüzde kronik dejeneratif hastalıkların izlenmesinde, kemoterapi ve radyo terapinin etkinliğinin takibinde, ksenobiyotik ve radyasyon aracılı genotoksisitenin belirlenmesinde biyolojik belirteç olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle DNA hasarının hassas bir şekilde ölçülmesine olanak tanıyan teknikler günümüzde büyük önem kazanmıştır. Tek hücreli jel elektroforezi veya sıklıkla tercih edilen diğer adıyla “Comet Assay” tekniği hücre düzeyinde DNA hasarını saptamak ve miktarını belirlemek için uygulanan non-invaziv, hızlı ve hassas bir floresan mikroskopik yöntemdir [163].

Çalışmamızda DEHP, gavaj yoluyla pubertal dönemdeki erkek sıçanlara 28 gün boyunca her gün aynı saatte uygulanmış ve her hafta sıçandan alınan kanda genotoksik etkiler Comet test yöntemi uygulanarak ölçülmüştür. Negatif kontrol grubu olarak yağ kontrol grubu oluşturulmuştur. Pozitif kontrol olarak MMS (metil metan sülfonat) kullanılmıştır. MMS bir alkilleyici ajandır ve DNA bazlarını etkileyerek yanlış baz eşleşmelerine neden olup, DNA’da hasar oluşturmaktadır. Çalışmamızda 3 doz grubu (100, 200 ve 400 mg/kg/gün) ile çalışılmıştır ve uygulamaya başlamadan önce hayvanlardan kan alınıp DNA hasarı varlığı kontrol edilmiştir. Ölçümlerde kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruk yüzdesi parametreleri kullanılmış ve buna göre istatistiksel olarak karşılaştırma yapılmıştır.

Deney süresince her gün uygulamadan önce hayvanların vücut ağırlıkları, tükettikleri su ve yem miktarları kaydedilmiştir. Uygulama gruplarının hepsinde vücut ağırlıkları besin alımına bağlı olarak artmıştır fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aynı şekilde 28 günlük uygulama boyunca uygulama gruplarında su tüketiminin de arttığı görülmüş ama istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p \leq 0.05$ ). Ancak kemiricilerle yapılan birçok çalışmada, beş gün veya daha fazla süre 1000 mg/kg/gün DEHP uygulanan sıçanlarda kilo kaybı görülmüştür fakat bu çalışmaların çoğunda besin tüketimi izlenmediği için bu kaybın besin alımının azalmasından mı yoksa metabolizma hızının artmasından dolayı mı olduğu belirlenememiştir [164, 165].

Deney sonunda sıçanların gerçek ve relatif organ ağırlıkları arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre, böbrek ve karaciğerde DEHP uygulama gruplarında istatistiksel olarak yağ kontrole göre anlamlı bir artış olmuştur. Bununla uyumlu olarak, DEHP, sıçanlarla yapılan birçok çalışmadan

tekrarlanan dozlarda oral olarak uygulanmış ve etkiler karaciğer, testis ve böbrekte yoğun olarak görülmüştür. F-344 sıçanlarla yapılan 14 haftalık bir çalışmada, 789 mg/kg/gün DEHP uygulanmış, gerçek ve relatif karaciğer ağırlıklarında ve albümin seviyesinde önemli bir artış gözlenmiştir. Karaciğerdeki bu ağırlık artışın, peroksizom proliferasyonunun artması sonucu olduğu gösterilmiştir [166]. Yine aynı çalışmada, böbrek ağırlığında artış ve böbrek papillasında mineralizasyon ile dejenerasyonlar gösterilmiştir.

Sprague Dawley sıçanlarla yapılan diğer bir çalışmada, 0, 5, 50 ve 500 mg/kg/gün dozlarında DEHP 12 gün boyunca her gün aynı saatte uygulanmış ve deney sonunda vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış görülmemiş buna karşın karaciğer ve böbrek ağırlıklarında görülen artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir. Biyokimyasal parametrelerde ise anlamlı bir sonuç görülmemiştir [167].

Kurahashi ve arkadaşlarının 2005 yılında erkek Wistar sıçanlar ile yaptığı çalışmada, 50 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün olacak şekilde iki doz grubu oluşturulmuş ve 8 hafta boyunca uygulanmıştır. Deney sonunda vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış gözlenmemiştir [168].

Hasmall ve arkadaşları, erkek sıçanlar ile gine domuzlarını karşılaştırarak yaptıkları bir çalışmada, 4 gün boyunca 950 mg/kg/gün DEHP uygulaması yapmışlar ve sonuçta karaciğer ağırlığında ve peroksizom boyutunda artış ve hiperplazi oluştuğunu tespit etmişlerdir [169].

Subkronik maruziyeti ölçmek için 1000 ve 2000 mg/kg/gün DEHP uygulaması yapılan sıçanlarda, böbrek ağırlıklarında artış ve renal enzimlerde değişimler olduğu gösterilmiştir [170, 171].

Cammack ve arkadaşları 21 gün boyunca 3-5 günlük neonatal sıçanlara intravenöz olarak 0, 60, 300 ve 600 mg/kg/gün DEHP uygulaması yapmışlar ve 21 gün tamamlandıktan sonra uygulamayı keserek deneyi sonlandırmak için sıçanların 90 günlük olmasını beklemişlerdir. 90. günün sonunda hayvanlar dissekte edilmiş, sonuçta vücut ağırlıklarında düşüş ve karaciğer ağırlıklarında artış olduğunu rapor etmişlerdir [172].

David ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada 0, 100, 500, 1500 ve 6000 ppm dozlarında DEHP' yi B6C3F1 farelerine 104 hafta süre ile besinlerine katarak vermişlerdir. Deney sonunda yaptıkları morfolojik, hematolojik ve histolojik

incelemelerde yüksek doz hariç diğer gruplarda vücut ağırlık değerlerinin değişmediğini, yüksek dozda önemli bir azalmanın olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, karaciğer dokusunda hepatoselüler lezyonların olduğunu, hepatosit pigmentasyonu ve eozinofilik sitoplazma, böbrekte ise ilerlemiş kronik nefropati tespit etmişlerdir [173].

Rusyn ve arkadaşları, 6 hafta boyunca 1000 mg/kg/gün DEHP uygulaması yapılan sıçanlarda karaciğer ağırlığında artış gözlemlemişler ve bunu diğer çalışmalarda olduğu gibi hücre proliferasyonu artışına ve apoptozda azalışa bağlamışlardır [174].

Pubertal dönemdeki erkek sıçanlarda uygulama gruplarına ait vücut ağırlık değerleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiş, organ ve görece organ ağırlıklarında DEHP doz gruplarının tümünde, hem böbrek hem karaciğer açısından yağ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu durum karaciğerin fitallara maruz kalması sonucunda metabolizmasının artması ile açıklanabilir. Yukardaki çalışmalardan elde edilen sonuçlar, vücut ve organ ağırlıkları değişimleri açısından çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ile uyumludur.

Comet testi kullanılarak yapılan ölçümlerde, deney başlangıcı ile 7.,14.,21. ve 28. gün sonlarında yapılan ölçüm sonuçları karşılaştırıldığında, yağ kontrol grubuna göre artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur fakat pozitif kontrole göre olan artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kuyruk uzunluğu açısından bakıldığında, 200 ve 400 mg/kg/gün DEHP gruplarında haftalar arasında negatif kontrole göre bir artış olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir. 100 mg/kg/gün DEHP grubunda ise yağ kontrole göre anlamlı bir artış bulunmamıştır. Kuyruk yüzdesi ve kuyruk momenti açısından bakıldığında, aynı şekilde 200 ve 400 mg/kg/gün DEHP gruplarında yağ kontrole göre istatistiksel olarak artış görülmüştür. Genotoksisite ve karsinojenite arasındaki kuvvetli etkiden dolayı bu ölçümler önemlidir fakat DEHP ile yapılan önceki çalışmaların sonuçları birbiri ile tutarsızlık göstermektedir.

DEHP' in genotoksisitesi ile ilgili fazla çalışma olmamakla birlikte yapılan çalışmalar birbiri ile paralel sonuçlar göstermemiştir. Uluslararası Kansere Araştırmaları Merkezi (IARC), kısa dönemli yapılan genotoksisite testlerinin sonuçlarını karşılaştırmış ve yaygın olarak bulunan negatif sonuçlara göre DEHP' i

genotoksik olmayan bir kimyasal kategorisine sokmuştur [175]. Bakterilerle yapılan 15 çalışmada, Ames testi uygulanmış ve hepsinin sonuçları negatif çıkmıştır. Maksimum konsantrasyon 14700 µg/plak olacak şekilde test edilmiştir [176].

Peroksizomlar hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) içeren ve lipit metabolizması için çok önemli olan organellerdir. Peroksizom artışı, peroksizomların sayısı, hacmi ve yağ asidi oksidasyonundaki artışla belirgin bir durumdur. Fitalatların peroksizom çoğalması üzerine etkileri de uzun süredir bilinmektedir ve kanser yapıcı etkilerinin altında bu mekanizmanın yattığı bildirilmiştir [177]. Kemiricilerde yapılan çalışmalarda, fitalat esterlerinin ve benzer etki gösteren hipolipidemik ilaçların karaciğer parankimal hücrelerinde peroksizomal yağ asidi β-oksidasyonunu sağlayan enzimlerin ve dolayısıyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını arttırdıkları ve buna bağlı tümör gelişimine neden oldukları gösterilmiştir [178].

Lapinskas ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada, peroksizom proliferatör aktivatör alfa (PPARα) dan yoksun sıçanlar ile çalışılmış ve karaciğerde herhangi bir olumsuz bulguya rastlanılmamıştır. Buna göre, DEHP bağımlı karaciğer hasarı için PPARα ekspresyonunun yapılmasının şart olduğu söylenmiştir [179]. Aynı şekilde PPARα' nın varlığının etkisinin araştırılması için Ward ve arkadaşları, PPARα' dan yoksun fareler ile PPARα' ya sahip yabanıl-tip erkek Sv/129 fareleri karşılaştıracak şekilde bir deney planlamışlardır. Buna göre bütün farelere 24 hafta boyunca 800 mg/kg/gün DEHP uygulanmıştır. Deney sonunda PPARα yoksun farelerde karaciğerde herhangi bir toksisiteye rastlanmazken, yabanıl tip farelerde karaciğerde lezyonlar, hepatomegali ve peroksizom sayısında artış görülmüştür. PPARα yoksunu farelerde ise böbrek ve testislerde lezyonlar görülmüştür fakat bu organlarda lezyon oluşumu PPARα'dan bağımsız bir yol izlediği için çıkan sonuçlar, DEHP bağımlı karaciğer toksisitesi için PPARα' nın olması gerektiğini kanıtlamıştır [180]. Yine Lee ve Peters, yaptıkları çalışmalarda PPARα yoksunu sıçanlarla yaptıkları çalışmalarda, karaciğer kanseri ve PPARα arasındaki zorunlu ilişkiyi göstermişlerdir [181,182].

Voss ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 90 günlük Sprague-Dawley sıçanlara ömürleri boyunca 0, 30, 95 ve 300 mg/kg/gün DEHP uygulanmış ve 159. haftada sıçanlar öldürülmüş, deney sonunda karaciğerde hepatoselüler adenomlar ve karsinomlar meydana geldiği tespit edilmiştir [183].

Bu deneylerin sonucunda, bilim adamları DEHP' in hepatoselüler apoptozu baskılayarak peroksizom proliferasyonuna yol açtığını ve hepatokarsinojenitenin majör moleküler mekanizmasının bu olduğunu vurgulamışlardır.

Kluwe ve arkadaşları, DEHP' in sıçanlarda karsinojen olduğunu fakat bunu genotoksik mekanizmalar yoluyla değil de peroksizom proliferatörü olarak davranmasının bir sonucu olduğunu vurgulamışlardır. Ek olarak Salmonella suşları ile yapılan diğer çalışmada mutajenik etkiler gözlenmiştir. Buna zıt olarak insanlarda ise klastojenik etkiler gösterilmiştir [184].

Takashima ve arkadaşları, DEHP' in yaptığı etkilerin tamamen diğer peroksizom proliferatörleri ile aynı şekilde olduğunu ve PPAR $\alpha$  reseptörünün aktivasyonu ile oluştuğunu belirtmişlerdir. Hepatosit sayısında artışın bunu kanıtladığını ve DEHP' in genotoksik olmayıp, hepatokarsinojen olduğunu vurgulamışlardır [185].

İnsandaki PPAR $\alpha$  reseptörü ile etkileşimin anlaşılması için, Yang ve arkadaşları, insanda bulunan PPAR $\alpha$  reseptör genini, bu geni olmayan sıçana eklemişlerdir. Sıçan, insan PPAR $\alpha$  geni ile bu reseptörü üretmiş ve daha sonra DEHP uygulaması yapılmıştır. Deney sonunda hepatomegali veya hepatosit proliferasyonu görülmemiştir. Bundan dolayı, PPAR $\alpha$  agonistlerinin insanda karsinojen olmadığını vurgulamışlardır [186, 187].

DEHP' in genotoksitesisi hakkında tartışmalar sürerken, Dünya Sağlık Örgütü yaptığı açıklamada, birçok pozitif ve negatif sonuç bulunduğunu, bütün sonuçları Avrupa Birliği Risk Değerlendirmesi Programı kapsamında göz önüne aldıklarında, bütün pozitif sonuçlara rağmen DEHP' in mutajenik olmadığını, deneylerde gözlenen sonuçların çoğunluğunun hücre transformasyonu, anöploidi oluşumu, hücre proliferasyonu gibi nedenlere dayandığını ve bunların genotoksik olmayan mekanizmalar ile açıklandığını bildirmişlerdir. Bu mekanizmaların da genel olarak tümör promotörleri veya peroksizom proliferatörleri tarafından oluşturulduklarını bildirmişlerdir [188].

DEHP, hayvanlarda yaptığı etkilerle epigenetik bir karsinojen olarak tanımlanmıştır. Geri dönüşümlü olarak intersellüler 'gap junctional' iletişimi inhibe ettiği gösterilmiştir [169]. Bu etkisi dolayısıyla hücre çoğalması, farklılaşması ve programlı hücre ölümüne yol açtığı bildirilmiştir [189]. Karaciğer, vücuttaki

pozisyonu ve kan damarları ile ilişkisi, yapısı, ksenobiyotik metabolizmasındaki rolü ve fonksiyonu ile toksik bileşiklerin etkileri için en yaygın hedef organdır. Sıçan ve fare çalışmalarında ağız yolu ile uzun süreli DEHP alımı ile hayvanların karaciğerlerinin ağırlığında artış, morfolojik değişiklikler ve biyokimyasal parametrelerde belirgin farklılıklar görülmüştür. Karaciğerdeki büyümenin nedeni hepatosit hipertrofisi ve hiperplazisi olduğu öne sürülmüştür. Peroksizomların karaciğer hücrelerinde sayıca artış gösterdiği belirtilmiştir. Bunun sonucu olarak artan oksidatif stres tümör oluşumuna yol açmaktadır. Karaciğerde adenom ve hepatosellüler kanser olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda histopatolojik incelemelerde, karaciğerde sinüzoidal dejenerasyon ve konjesyon 100, 200 ve 400 mg/kg/gün DEHP uygulama gruplarında istatistiksel olarak yağ kontrole göre anlamlıdır. Karaciğer hasarı ve anlamlı DNA hasarı görülmesi fakat adenomların görülmemesi, DEHP'in bir tümör promotörü olarak davrandığını gösteren çalışmaları desteklemiştir.

Hematolojik analizler kapsamında, lökosit, lenfosit, monosit, eritrosit, MCV, hematokrit, MCH, MCHC, hemoglobin, trombosit ve Pct gibi önemli parametreler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Hematolojik parametrelerde incelenen bütün gruplarda 400 mg/kg/gün DEHP uygulama grubunda lökosit miktarının arttığı görülmüştür. Bu da bize vücuttaki herhangi bir enfeksiyona karşı savunma sistemini oluşturan hücrelerin miktarının arttığını göstermektedir. Bunun tersine lenfosit ve monosit yüzdelerinde 400 mg/kg/gün DEHP uygulama grubunda azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Lenfositler immün sistemin önemli hücrelerinden biri olması nedeniyle DEHP' e maruziyetin kan yapıcı organlar üzerinde olumsuz bir etkiye yol açtığını söyleyebiliriz. MCV 'nin yüksek olması eritrositlerin büyük hacimli olduğunu gösterir ve genellikle B12 vitamini eksikliği anemisinde MCV değeri yüksek bulunur. 400 mg/kg/gün DEHP uygulama grubunda yağ kontrol ve diğer uygulama gruplarına göre MCV değerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Eritrositlerde bulunan hemoglobin dokulara oksijen taşımaktadır. Akciğer ya da kalp işlev bozukluğunda kandaki düşük oksijen değerlerini kompanse etmek için eritrositler tarafından hemoglobin üretimi artar. 400 mg/kg/gün DEHP uygulama grubunda yağ kontrol ve diğer doz gruplarına göre hemoglobin değerinde anlamlı bir azalış görülmüştür. Ayrıca platelet sayısında anlamlı bir artış görülmüştür. Bu sonuç ilginç bulunmuştur çünkü DEHP'

in plateletlere bağlandığı ve onların üstünde yan etki yaptığı bilinmektedir. Bu durum, plateletlerin vasküler endotele adhezyonunda bir sorun oluşmasına ve bu yüzden dolaşımdaki sayılarının artmasına bağlanmıştır.

Poon ve arkadaşları 13 hafta boyunca 375 mg/kg/gün DEHP uygulamasının relatif böbrek ağırlığında yüksek bir artışa sebep olduğunu göstermişlerdir. Eritrositlerde ve hemoglobin değerlerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir. Aynı süre fakat 37 mg/kg/gün DEHP verdikleri sıçanların kan değerlerinde ise bir değişim olmadığını belirtmişlerdir. Bu nedenle hematopoetik sistem üzerindeki etkiler için süre ve dozun etkili olduğu belirtilmektedir [190].

Deney sonunda elde edilen serum örneklerinde karaciğer hasarında biyokimyasal belirteç olarak kullanılan ALT ve AST enzim aktivitelerine bakılmıştır. Biyokimyasal incelemelerde serumda birçok enzimin seviyesinin artması karaciğerde fonksiyonel ve yapısal bir bozukluğun olduğuna işaret etmektedir.

ALT; transaminazlara aittir. Serum glutamat piruvat transaminaz (SGPT) olarak da adlandırılır. Başta karaciğer olmak üzere böbrekte, kalpte ve iskelet kasında üretilir. ALT ölçümleri, parankimal karaciğer hasarını teşhis etmede kullanılır. Herhangi bir klinik anormallik olduğunda, bu enzim düzeylerinde artış gözlenir [191]. Yapılan analiz sonucunda, DEHP uygulama gruplarının hepsinde ALT değeri yağ kontrole göre artmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Histopatolojik incelemelerde görülen dejenerasyonlar ve DEHP' in karaciğerde hasara yol açtığına bilinmesi, bu bulguyu desteklemiştir.

AST, hücrenin sitoplazmasında ve yüksek konsantrasyonlarda kalpte, karaciğerde ve iskelet kas dokusunda bulunur. Miyokardiyal enfarktüs ve hepatik hastalıkların tedavi ve tanısında kullanılır. AST'nin 5-10 kat yükselmesi karaciğerde birincil metastatik karsinoma olduğunu gösterir [192]. DEHP uygulama gruplarının hepsinde bu denli bir artış olmasa da bulunan artış yağ kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıdır.

Trigliseritler insanda depo yağın en büyük bileşenidir ve büyük oranda karaciğerde sentezlenir. Trigliceridlerin kandaki oranının artması diğer lipoprotein seviyelerinde de anormalliklere ve koroner kalp rahatsızlıkları gibi hastalıklara neden olabilmektedir. Nair ve Kurup, yaptıkları bir çalışmada, sıçanlara 400 mg/kg/gün DEHP'in 6 hafta boyunca uygulanması sonucu trigliserit ve kolesterol seviyelerinde

bir düşüş tespit etmişlerdir. Karaciğerde lipit depolanmasının artışı dolaşımdaki trigliserit seviyesini düşürmüştür, DEHP' in fosfolipitler üzerindeki negatif etkisi sonucu kolesterol biyosentezini bozduğunu göstermişlerdir [193]. Böbrek ağırlıklarında artış, kronik nöropati ve papillalarda mineralizasyon oluşumu görülmüştür. Rhodes ve arkadaşlarının 14 gün boyunca 200 mg/kg/gün DEHP uygulaması yaptığı erkek sıçanlarda, kolesterol seviyesinin düştüğü gösterilmiştir [194]. Bizim çalışmamızda da yukardaki sonuçlara benzer şekilde DEHP uygulama gruplarının tümünde yağ kontrole göre trigliserit seviyesinde anlamlı bir azalış görülmüştür.

Glikoz, hücrelerin normal işlevi için gereklidir. Ölçümleri Tip 1 ve Tip-2 diabetin tanısında, neonatal hipoglisemi ve pankreatik adacık hücre karsinoma teşhisinde kullanılır. Östrojenlerin glukoz metabolizmasında rol oynadıkları ve insülin hassasiyetini düzenledikleri bilinmektedir [195]. Koch ve arkadaşları, karaciğerde oluşan ağırlık artışının karaciğer lipit metabolizmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir çünkü yaptıkları çalışmada, karaciğer glikojen depolarında düşüş ve kandaki glikoz seviyesinde artış gözlemişlerdir [196]. DEHP uygulama gruplarında, Gayathri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı destekler şekilde glikoz miktarında istatistiksel olarak yağ kontrole göre anlamlı bir artış görülmüştür.

Total protein, serum proteinleri özellikle karaciğerde, plazma hücrelerinde, lenf nodlarında, dalakta ve kemik iliğinde sentezlenir. Kan kaybında, nefrotik sendromda ve tuz tutma sendromunda düşük çıkar. 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 kullanılır. Moore ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 500 mg/kg/gün DEHP' in 17 hafta boyunca sıçanlara uygulanması sonucu hemoglobin platelet sayısında ve albumin miktarında azalma görülmüştür [197]. Bizim çalışmamızda 100 mg/kg/gün DEHP uygulama grubunda albümin ve total protein miktarında azalma görülmüş ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 200 ve 400 mg/kg/gün DEHP gruplarında ise her iki parametre için artış görülmüştür fakat istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır.



Kreatin vücutta; L-Arjinin, Glisin ve L-Metiyonin aminoasitlerinden; böbrekte, karaciğerde ve pankreasta sentezlenir. Biyosentezden sonra iskelet kaslarına, kalbe, beyne ve diğer dokulara taşınır. Kreatin bu dokularda en büyük enerji depolayıcı form olan kreatin fosfat halinde metabolize olur. Kan kreatin düzeyi artışı böbreğin yetersiz çalıştığına bir göstergesidir. Yapılan istatistiksel teste göre, çalışmamızda kontrol gruplarıyla uygulama grupları arasında fark olmadığı bulunmuştur.

Üre, ekzojen veya endojen doku proteinlerinin katabolizmasından ortaya çıkan bir metabolittir. İnsanlarda protein katabolizmasının metabolik ürünüdür. Pre-renal ve post-renal üremi ayırımını tespit etmede kreatin ile birlikte ölçülür. Pre-renal üremi kardiyak dengelemede, su tüketiminde, artan protein katabolizmasında, nefrit, kronik nefrit, polikistik böbrek ve nefrosklerozda gözlenir. Çalışmamızda, 100 mg/kg/gün DEHP grubunda yağ kontrole göre anlamlı bir düşüş görülürken, 200 ve 400 mg/kg/gün DEHP gruplarında anlamlı bir artış görülmüştür.

Fitalat ve plastik karışımı maddeler arasında kovalent bağ bulunmamasından ötürü fitalatların çevreye kolayca yayıldığı ve biyolojik parçalanmaya maruz kaldığı bilinmektedir. Doğada kalıcı olmamakla birlikte birçok fitalat türünün canlıların çeşitli organlarına zarar verdiği, ayrıca uzun süreli maruziyetin immün toksisiteye yol açtığı ve bağışıklık sistemini zayıflattığı bilinmektedir. Çalışmamızda kullandığımız DEHP (di-2-etil hekzil fitalat), PVC'nin esneklik kazanmasında kullanılan önemli bir çevre kirleticisidir. Sıklıkla kullanılan bu fitalat türüne uzun süreli maruziyetin karaciğer fonksiyon bozukluklarına yol açtığı ortaya konmuştur [198]. Peroksizom proliferasyonu, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumu ve DNA hasarı arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, DEHP'in sıçan karaciğerinde 52 veya 78 hafta süreyle uygulanmasıyla karaciğerde DNA hasarı artışına rastlanmadığı bildirilmiştir [199]. Diğer taraftan karaciğer ve böbrekte DEHP 'in peroksizomal  $\beta$ -oksidasyon enzimlerini artırdığı ve bunun 8-OHdG düzeylerinin artmasına neden olduğu belirtilmiştir [200]. Bir diğer çalışmada DEHP uygulamasının sıçanlarda hepatik 8-oksodG düzeylerini 3. haftada düşürdüğü, 11. ve 22. haftalarda artırdığı, ancak bu artışların anlamlı olmadığı gözlenmiştir [201]. Perinatal ve puberte öncesi sıçanlara 0,5 mg/kg/gün dozda ve gavajla DEHP uygulamasının hepatik, renal ve testiküler DNA hasarı üzerine etkisi incelenmiştir. Perinatal olarak DEHP' e maruz kalan sıçanların karaciğerlerinde 8-oksodG düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı,

böbrek 8-oksodG düzeylerinin ise azaldığı gözlenmiştir. Puberte öncesi DEHP' e maruz kalan sıçanlarda ise, 8-oksodG düzeyleri testis, karaciğer ve böbreklerde değişmemiştir. Bu bulgular fitalatlara perinatal maruziyetin DNA hasarına duyarlılığı artırdığını göstermektedir [202]. Buna karşılık Comet testi kullanarak yapılan çalışmalarda, DEHP ve metaboliti MEHP' in genotoksisiteye neden olduğunun gösterildiği çalışmalar da bulunmaktadır [203, 204]. ABD populasyonunda nötral Comet testi kullanarak yapılan çalışmalarda ise, sperm DNA hasarı ile MEP ve MEHP düzeyleri arasında anlamlı ilişkiler bulunduğu bildirilmiştir [205].

Çalışmamızın bulgularına göre DEHP doz gruplarında yağ kontrol ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı çıkan DNA hasarı görülmektedir fakat asıl genotoksik etkiyi gösteren pozitif kontrol (MMS)' ye göre karşılaştırma yapıldığında bu etkinin çok altında kalan bir DNA hasarı görülmektedir. Literatürde son yıllarda fitalatlara olan ilginin artmasıyla birlikte gözlenen çok sayıdaki çalışmanın hiçbirinde, pubertal dönemdeki sıçanlarda ergin oluncaya kadar genotoksisite ve histopatoloji ile birlikte bu kapsamda, biyokimyasal ve hematolojik göstergelerin çalışılıp DEHP' in etkisinin irdelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden daha önceden yapılan araştırmaların ve kendi sonuçlarımız ışığında, DEHP' in DNA hasarı yapıcı etkisi hakkında daha kesin bir yargıya varmak için sıçanlarda DNA hasarı yapıcı etki potansiyelinin suş, yaş, uygulama dozu, süresi ve yolu ile ilişkili olabileceği de dikkate alınarak daha ayrıntılı çalışmalarla ortaya konması gerektiği söylenebilir.

## KAYNAKLAR

- [1] Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., Harvala, C., Screening Of Some Grek Aromatic Plants For Antioxidant Activity, *Phytotherapy Research*, 17: 194-195, **2003**.
- [2] Erna, M., Harazono, A., Miyawaki, E., Ogawa, Y., Developmental toxicity of mono-*n*-benzyl phthalate, one of the major metabolites of the plasticizer *n*-butyl benzyl phthalate in rats, *Toxicology Letters*, 86, 19-25, **1996**.
- [3] Nebesio, T. D., Pescovitz, O. H., 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, 425-42, 2007.
- [4] Frederiksen, H., Skakkebaek, N. E., Andersson, A. M., Metabolism of phthalates in humans, *Mol Nutr Food Res*, 51: 899-911, **2007**.
- [5] ATDSR, Toxicological Profile for Diethylphthalate. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta; USA, **1995**.
- [6] Kai, H., Shono, T., Tajiri, T., Suita, S., Long-term effects of intrauterine exposure to mono-*n*-butyl phthalate on the reproductive function of postnatal rats, *J Pediatr Surg*, 40:429–33, **2005**.
- [7] Mclachlan JA Environmental Signaling: What embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals, *Endocrine Rev*, 2001;22:319-341, **2001**.
- [8] Stoker, T.E., Parks, L. G, Gray, L.E., Cooper, R.L., 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. Crit Rev Toxicol* 2000;30:197–252.
- [9] Carson, R., Silent Spring. In:Lear L, Wilson EO, eds. 40th ed. Boston: Houghton Mifflin Company, **2002**.

- [10] Sullivan, F. M., Barlow, S. M., Congenital malformations and other reproductive hazards from environmental chemicals, *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 205:91-110, **1979**.
- [11] Finkelstein, J. S, Mc Cully, W. F., MacLaughlin, D, T., Godine, J. E, Crowley, W. F., The mortician's mystery. Gynecomastia and reversible hypogonadotropic hypogonadism in an embalmer, *N Eng J Med*, 318:961-5,**1988**.
- [12] Colborn, T., vom Saal, F. S., Soto, A. M., Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ Health Persp*, 101:378-84, **1993**.
- [13] Goldman LR. New approaches for assessing the etiology and risks of developmental abnormalities from chemical exposure. *Reprod Toxicol* 1997;11:443-51, **1997**.
- [14] Buyukgebiz A, Bober E. Premature thelarche caused by plant growth factors, *J Pediatr Endocrinol Meta*, 16:237, **2003**.
- [15] Goldman JM, Laws SC, Balchak SK, Cooper RL, Kavlock RJ. Endocrine-disrupting chemicals: pre-pubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations, *Crit Rev Toxicol* ;30:135-196, **2000**.
- [16] Bigsby, R., Chapin, R. E., Daston, G. P., Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development, *Environ Health Perspect*, 107: 613-8,**1999**.
- [17] Lee, M. M., Endocrine Disrupters. A Current Review of Pediatric Endocrinology, 109-18, **2007**.
- [18] Kelce, W. R, Wilson, E. M., Antiandrogenic Effects of Environmental Endocrine Disruptors. In: Metzler M (ed). *The Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 39-61, **2001**.

- [19] Metzler, M, Pfeiffer, E., 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; p.63-80, **2001**.
- [20] Giusti, R. M., Iwamoto, K., Hatch, E. E., Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects, *Ann Intern Med*,122: 778-88, **1995**.
- [21] Solomon, G. M., Schettler, T., Environment and health and Endocrine disruption and potential human health implications, *Canadian Medical Association Journal*, 1116: 1467-74, **2000**.
- [22] Gray, L. E. Jr, Wilson, V. S, Stoker, T, Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals, *Int J Androl* 2006, 29: 96-104, **2006**.
- [23] Weuve, J., SÃ¡nchez, B.N., Calafat, A.M, Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: urinary concentrations of monoesters and oxidative metabolites, *Environ Health Perspect*, 114: 1424-31, **2006**.
- [24] Ishihara, K., Warita, K., Tanida, T., Sugawara, T., Kitagawa, H., Hoshi, N, Does paternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop- dioxin (TCDD) affect the sex ratio of offspring? *J Vet Med Sci*; 69: 347-52, **2007**.
- [25] Divi, R. L., Chang, H. C., Doerge, D.R., Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochem Pharmacol*, 54: 1087-96, **1997**.
- [26] Pombo, M, Castro-Feijóo, L., Endocrine disruptors, *J Ped Endocrinol Metab*, 18: 1145-1155, **2005**.
- [27] Harvey, P. W., Everett, D. J., Regulation of endocrine-disrupting chemicals: Critical overview and deficiencies in toxicology and risk assessment for human health, *Best Practice Res Clin Endocrinol Metab*, 20: 122-145, **2006**.

- [28] Massart, F., Harrell, J.C., Federico, G., Human breast milk and xenoestrogen exposure: A possible impact on human health, *J Perinat*, 25: 282-288, **2005**.
- [29] Anway, M. D., Skinner, M. K., Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors, *Endocrinology*, 147 (6): 43-49, **2006**.
- [30] Massart, F., Parrino, R., Seppia, P., Federico, G., Saggese, G., How do environmental estrogen disruptors induce precocious puberty? *Minerva Pediatr*, 58: 247-54, **2006**.
- [31] McLachlan, J.A., Simpson, E., Martin, M., Endocrine disrupters and female reproductive health, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 20: 63-75, **2006**.
- [32] Dötsch, J., Dörr, H.G., Wildt, L., Exposure to Endogenous Estrogens During Lifetime. In: Metzler M (ed). *The Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 81-99, **2001**.
- [33] Ward, W. E., Thompson, L.U., Dietary Estrogens of Plant and Fungal Origin: Occurrence and Exposure. In: Metzler M (ed). *The Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 101-28, **2001**.
- [34] Kondo, T., Shono, T., Suita, S., Age-specific effect of phthalate ester on testicular development in rats, *J Pediatr Surg*, 41: 1290-3, **2006**.
- [35] Nguyen, T., Brunson, D., Crespi, C.L., Penman, B.W., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R, DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro, *Proc Natl Acad Sci*, 89: 3030-4, **1992**.
- [36] El-Gohary, M., Awara, W.M, Nassar, S, Hawas S. Deltamethrin induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor, *Toxicology* 1999; 132: 1-8, **1999**.
- [37] Kröncke, K.D., Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V., Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric Oxide*, 1: 107-20, **1997**.
- [38] [www.endopedonline.com.ar/img/n4/REPORT%20th%20PUBERTY%20Ing.pdf](http://www.endopedonline.com.ar/img/n4/REPORT%20th%20PUBERTY%20Ing.pdf), **2013**.

- [39] Colon I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development, *Environ Health Perspect*, 108: 895-900, **2000**.
- [40] Vasiliu, O., Muttineni J, Karmaus W. In utero exposure to organochlorines and age at menarche, *Human Reproduction*, 19:1506-1512, **2004**.
- [41] Colon, I., Caro, D., Bourdony, C.J., Rosario, O., Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development, *Environ Health Persp*, 108:895-900, **2000**.
- [42] Matsumoto, M., Hirata-Koizui, M., Ema, M., Adsorptive removal of phthalate ester(Di-ethyl phthalate) from aqueous phase by activated carbon: A kinetic study, *Journal of Hazardous Materials*, 146, 278-282, **2007**.
- [43] Babu, B. and Wu, J.T., Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria, *Science of The Total Environment*, 408, 69-497 pp, **2010**.
- [44] Rusyn, I., Peters, J. M, Cunningham, M. L., Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver, *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 459-479, **2006**.
- [45] Hauser, R., Calafat, A.M., Phthalates and human health, *Occupational and Environmental Medicine*, 62, 806-818, **2005**.
- [46] Shea, K. M., American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health, Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers, *Pediatrics*, 111, 1467-1474, **2003**.
- [47] Kueseng, P., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., Trace phthalate and adipate esters contaminated in packaged food. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 42, 569-76, **2007**.

- [48] Dalgaard, M., Hass, U., Vinggaard, A.M., Jarfelt, K., Lam, H.R., Sørensen, I.K., Sommer, H.M., Ladefoged, O., Di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) induced developmental toxicity but not antiandrogenic effects in pre- and postnatally exposed Wistar rats, *Reproductive Toxicology*, 17, 163-170, **2003**.
- [49] Adibi, J.J., Hauser, R., Williams, P.L., Whyatt, R.M., Calafat, A.M., Nelson, H., Herrick, R., Swan, S.H., Maternal urinary metabolites of Di-(2- Ethylhexyl) phthalate in relation to the timing of labor in a US multicenter pregnancy cohort study, *American Journal of Epidemiology*, 169, 1015 -1024, **2009**.
- [50] Green, R., Hauser, R., Calafat, A.M., Weuve, J., Schettler, T., Ringer, S., Huttner, K., Hu, H., 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, 1222-1225, **2005**.
- [51] Green J., Plastic dangers. Leaching DEHP poses potential risk, *Materials Management in Health Care*, 11, 14-15, **2002**.
- [52] Sjöberg, P., Bondesson, U., Sedin, G., Gustafsson, J., Dispositions of diand mono-(2-ethylhexyl) phthalate in newborn infants subjected to exchange transfusions, *European Journal of Clinical Investigation*, 15, 430-436, **1985**.
- [53] Duty, S.M, Ackerman, R.M, Calafat, A.M., Hauser, R., Personal care product use predicts urinary concentrations of some phthalate monoesters, *Environmental Health Perspectives*, 113, 1530-1535, **2005**.
- [54] Ross, G., A perspective on the safety of cosmetic products: a position paper of the American Council on Science and Health, *International Journal of Toxicology*, 25, 269–277, **2006**.
- [55] Schetter, T., Human exposure to phthalates via consumer products, *International Journal of Andrology*, 29, 134-139, **2006**.



- [56] CDC, Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, NCEH Publ. No. 05-0570, **2005**.
- [57] Brock, J.W., Caudill, S.P., Silva, M.J., Needham, L.L., Hilborn, E.D., Phthalate monoesters levels in the urine of young children, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68, 309-314, **2002**.
- [58] Koch, H.M., Drexler, H., Angerer, J., Internal exposure of nurseryschool children and their parents and teachers to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207, 15-22, **2004**.
- [59] Koch, H.M., Bolt, H.M., Preuss, R., Eckstein, R., Weisbach, V., Angerer, J., Intravenous exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): metabolites of DEHP in urine after a voluntary platelet donation, *Archives of Toxicology*, 79, 689-93, **2005**.
- [60] Sathyanarayana, S., Calafat, A.M., Liu, F., Swan, S.H., Maternal and infant urinary phthalate metabolite concentrations: are they related? *Environmental Research*, 108, 413-418, **2008**.
- [61] Adibi, J.J., Perera, F.P., Jedrychowski, W., Camann, D.E., Barr, D., Jacek, R., Whyatt, R.M., Prenatal exposures to phthalates among women in New York City and Krakow, Poland, *Environmental Health Perspectives*, 111, 1719-1722, **2003**.
- [62] Wolff, M.S., Engel, S.M., Berkowitz, G.S., Ye, X., Silva, M.J., Zhu, C., Wetmur, J., Calafat, A.M., Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes, *Environmental Health Perspectives*, 116, 1092-109, **2008**.
- [63] Phthalates and Cumulative Risk Assessment, The Task Ahead. Board on Environmental Studies and Toxicology (BEST). Infant and Childhood Exposure. Internet Adresi: [http://books.nap.edu/openbook.php?record\\_id=12528&page=23](http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=12528&page=23).
- [64] Massachusetts Toxic Use Reduction Institute DEHP Chemical Fact Sheet. Internet adresi: [www.turi.org/content/download/3661/44824/file/dehp\\_factsheet\\_07.pdf](http://www.turi.org/content/download/3661/44824/file/dehp_factsheet_07.pdf)

- [65] Koch, H. M., Angerer, J., Drexler, H., Eckstein, R., Weisbach, V., Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) exposure of voluntary plasma and platelet donors, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 208, 489-498, **2005**.
- [66] Foresta, C., Garolla, A., Zuccarello, D., Pizzol, D., Moretti, A., Barzon, L., Palù, G., *Fertility and Sterility*, **2008**.
- [67] National Toxicology Program, Carcinogenesis Bioesey of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (CAS No. 117–81-7) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Feed Study), Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program, **1982**.
- [68] National Toxicology Program, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. NTP-CERHR Expert Panel Report on Di-isononyl Phthalate, Alexandria, VA: Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, US Department of Health and Human Services, **2000**.
- [69] Di(2-ethylhexyl)phthlate. Internet Adresi: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol77/mono77-6.pdf>,**2013**.
- [70] Youssef, J., Badr, M., Extraperoxisomal targets of peroxisome proliferators: mitochondrial, microsomal, and cytosolic effects. Implications for health and disease, *Critical Reviews in Toxicology*, 28, 1-33, **1998**.
- [71] Caldwell, D.J., Review of mononuclear cell leukemia in F-344 rat bioeseys and its significance to human cancer risk: A case study using alkyl phthalates, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 30, 45–53, **1999**.
- [72] McKee, R.H., 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, 51-55, **2000**.
- [73] Virtanen, H.E., Rajpert-De Meyts, E, Main, K.M., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., Testicular dysgenesis syndrome and the development and occurrence of male reproductive disorders, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207, 501-505, **2005**.

- [74] Latini, G., Monitoring phthalate exposure in humans, *Clinical Chimica Acta*, 361, 20–29, **2005**.
- [75] Lovekamp-Swan T, Davis B. J., Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system, *Environmental Health Perspectives*, 111, 139-145, **2003**.
- [76] NTP (National Toxicology Program), NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Butyl Benzyl Phthalate (BBP), NIH Pub. 03-4487, **2003**.
- [77] Foster, P.M., Mylchreest, E., Gaido, K.W., Sar, M., Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats, *Human Reproduction Update*, 7, 231-235, **2001**.
- [78] Wine, R.N., Li L.H., Barnes L.H., Gulati D.K., Chapin R.E., Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats, *Environmental Health Perspectives*, 105, 102-107, **1997**.
- [79] EPA (U.S. Environmental Protection Agency), Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.3700 Prenatal Developmental Toxicity Study. EPA712- C-98-207. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC., **1998**.
- [80] Shirota, M., Saito, Y., Imai, K., Horiuchi, S., Yoshimura, S., Sato, M., Nagao T., Ono, H., Kato, M., Influence of di-(2-ethylhexyl)phthalate on fetal testicular development by oral administration to pregnant rats, *Journal of Toxicological Sciences*, 30, 175-194, **2005**.
- [81] Shultz, V.D., Phillips, S., Sar, M., Foster, P.M., Gaido, K. W., Altered gene profiles in fetal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl) phthalate, *Toxicological Sciences*, 4, 233-242, **2001**.
- [82] Mylchreest, E., Sar, M., Wallace, D.G., Foster, P.M., Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate, *Reproductive Toxicology*, 16, 19-28, **2002**.
- [83] Lehmann, K.P., Phillips, S., Sa, M., Foster, P.M., Gaido, K.W., Dose dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in

the fötal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate, *Toxicological Sciences*, 81, 60-68, **2004**.

- [84] Howdeshell, K.L., Wilson, V.S., Furr, J., Lambright, C.R., Rider, C.V., Blystone, C.R., Hotchkiss, A.K., Gray, L.E., A mixture of five phthalate esters inhibits fötal testicular testosterone production in the spraguedawley rat in a cumulative, dose-additive manner, *Toxicological Sciences*, 105, 153-165, **2008**.
- [85] Gray, T.J., Butterworth, K.R., Gaunt, I.F., Grasso, G.P., Gangolli, S.D., Short-term toxicity study of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 15, 389-399, **1977**.
- [86] Foster, P.M., Thomas, L.V., Cook, M.W., Gangolli, S.D., Study of the testicular effects and changes in zinc excretion produced by some n-alkyl phthalates in the rat, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 54, 392-398, **1980**.
- [87] Swan, S. H., Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans, *Environmental Research*, 108, 177-184, **2008**.
- [88] Phillips, K.P., Tanphaichitr, N., Human exposure to endocrine disrupters and semen quality, *Journal Of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 11, 188-220, **2008**.
- [89] Rusyn, I., Kadiiska, M.B., Dikalova, A., Kono, H., Yin, M., Tsuchiya, K., Mason, R.P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Segal, B.H., Holland, S.M., Thurman, R.G., Pthalates rapidly increase production of reactive oxygen species in vivo: role of Kupffer cells, *Molecular Pharmacology*, 59, 744-750, **2001**.
- [90] O'Brein, M.L., Cunnigham, M.L., Spear, B.T., Glauert, H.P. Effects of peroxisome proliferators on glutathione and glutathione-related enzymes in rats and hamsters, *Toxicology Applied Pharmacology*, 171, 27-37, **2001**.
- [91] Seo, K.W., Kim, K.B., Kim, Y.J., Choi, J.Y, Lee, K.T., Choi, K.S., Comparison of oxidative stress and changes of xenobiotic metabolizing enzymes induced by phthalates rats, *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1107-1114, **2004**.

- [92] Hauser, R., Meeker, J.D., Singh, N.P., Silva, M.J., Ryan L, Duty S, Calafat A.M., DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites, *Human Reproduction*, 22, 688-695, **2007**.
- [93] ATDSR, Toxicological Profile for Diethylphthalate. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta; USA, **1995**.
- [94] National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction NTP-CERHR Expert Panel Report NPT-CERHR-DEHP-00 (National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, Washington DC; USA, **2000**.
- [95] Schetter, T., Human exposure to phthalates via consumer products, *International Journal of Andrology*, 29, 134-139, **2006**.
- [96] Use Nationally and in Massachusetts. Use of DEHP. Internet Adresi: [http://www.turi.org/library/turi\\_publications/massachusetts\\_chemical\\_facts\\_sheets/dehp/dehp\\_facts/use\\_nationally\\_and\\_in\\_massachusetts\\_\\_1](http://www.turi.org/library/turi_publications/massachusetts_chemical_facts_sheets/dehp/dehp_facts/use_nationally_and_in_massachusetts__1).
- [97] Eucomed Q&A on PVC DEHP. General Information. Internet Adresi: <http://www.medicalplast.com/upload/documents/document5.pdf>.
- [98] The weight evidence of DEHP, Overview of legal actions to restrict the use of phthalates, particularly in relation to medical care, Internet Adresi: <http://www.noharm.org>, **2005**.
- [99] CSTE (Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicology and the Environment), *Opinion on phthalate migration from soft PVC toys and childcare articles+opinion expressed at the 6th CSTE plenary meeeting*, **1998**.
- [100] [Integrated Risk Information System. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) (CASRN 117-81-7). Internet Adresi: [www.epa.gov/iris/subst/0014.htm](http://www.epa.gov/iris/subst/0014.htm).
- [101] Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on request from the commision related to bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials, *The EFSA Journal*, 243, 1-2, **2005**.

- [102] Latini, G., De Felice, C., Verrotti, A., Plasticizers, infant nutrition and reproductive health, *Reproductive Toxicology*, 19, 27-33, **2004**.
- [103] Rhodes, C., Orton, T.C., Pratt, I.S., Batten, P.L., Bratt, H., Jackson, S.J., Elcombe, C.R., 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*, 65:299-307, **1986**.
- [104] National Toxicology Program. U.S. Department of Health and Human Sciences. Center for the evaluation of risks to human reproduction. Draft NTP Brief on the potential human reproductive and developmental effects of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), **2006**.
- [105] Hauser, R., Calafat, A.M., Phthalates and human health, *Occupational and Environmental Medicine*, 62, 806-818, **2005**.
- [106] Hoyer, P.B., Reproductive toxicology: current and future directions, *Biochemical Pharmacology*, 62, 1557–1564, **2001**.
- [107] Latini, G., Del Vecchio, A., Massaro, M., Verrotti, A., De Felice, C., In utero exposure to phthalates and fötal development, *Current Medicinal Chemistry*, 13, 2527-2534, **2006**.
- [108] Grande, S.W., Andrade, A.J., Talsness, C.E., Grote, K., Chahoud, I., A dose-response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate: effects on female rat reproductive development, *Toxicological Sciences*, 91, 247–254, **2006**.
- [109] Bhattacharya, N., Dufour, J.M., Vo, M.N., Okita, J., Okita, R., Kim, K.H., Differential effects of phthalates on the testis and the liver, *Biological Reproduction*, 72, 745–749, **2005**.
- [110] Rusyn, I., Kadiiska, M.B., Dikalova, A., Kono, H., Yin, M., Tsuchiya, K., Mason, R.P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Segal, B.H., Holland, S.M., Thurman, R.G., Pthalates rapidly increase production of reactive oxygen species in vivo: role of Kupffer cells, *Molecular Pharmacology*, 59, 744-750, **2001**.
- [111] Dalsenter, P.R., Santana, G.M., Grande, S.W., Andradeb, A.J., Araujo, S.L., Phthalate affect the reproductive function and sexual behavior of

- male Wistar rats, *Human & Experimental Toxicology*, 25, 297–303, **2006**.
- [112] Marsee, K., Woodruff, T.J., Axelrad, D.A., Calafat, A.M., Swan, S.H., Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance, *Environmental Health Perspectives*, 114, 805–809, **2006**.
- [113] Kornbrust, D.J., Barfknecht, T.R., Ingram, P., Shelburne, J.D., Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate on DNA repair and lipid peroxidation in rat hepatocytes and on metabolic cooperation in Chinese hamster V-79 cells, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 13, 99-116, **1984**.
- [114] Butterworth, B.E., Bermudez, E., Smith-Oliver, T., Earle, L., Cattley, R., Martin, J., Popp, J.A., Strom, S., Jirtle, R., Michalopoulos, G., Lack of genotoxic activity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in rat and human hepatocytes, *Arcinogenesis*, 5, 1329-1335, **1984**.
- [115] Douglas, G.R., Hugenholtz, A.P., Blakey, D.H., Genetic toxicology of phthalate esters: mutagenic and other genotoxic effects, *Environmental Health Perspectives*, 65, 255-62, **1986**.
- [116] Schmezer, P., Pool, B.L., Klein, R.G., Komitowski, D., Schmähl, D., Various short-term eseys and two long-term studies with the plasticizer di(2- ethylhexyl)phthalate in the Syrian golden hamster, *Carcinogenesis*, 9, 37-43, **1988**.
- [117] Elliott, B.M, Elcombe, C.R., Lack of DNA damage or lipid peroxidation measured in vivo in the rat liver following treatment with peroxisomal proliferators, *Carcinogenesis*, 8, 1213-1218, **1988**.
- [118] Hayashi, F., Tamura, H., Yamada, J., Kasai, H., Suga, T., Characteristics of the hepatocarcinogenesis caused by dehydroepiandrosterone, a peroxisome proliferator, in male F-344 rats, *Carcinogenesis*, 15, 2215-2219, **1994**.
- [119] Cattley, R.C., Glover, S.E., Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine in hepatic DNA of rats following exposure to peroxisome proliferators:

relationship to carcinogenesis and nuclear localization, *Carcinogenesis*, 14, 2495-2499, **1993**.

- [120] Hauser, R., Urinary phthalate metabolites and semen quality: a review of a potential biomarker of susceptibility, *International Journal of Andrology*, 31, 112-117, **2008**.
- [121] Duty, S.M., Singh, N.P., Silva, M.J., Barr, D.B., Brock, J.W., Ryan, L., Herrick, R.F., Christiani, D.C., Hauser, R., The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay, *Environmental Health Perspectives*, 111, 1164-1169, **2003**.
- [122] Anderson, D., Yu, T.W., Hincal, F., Effect of some phthalate esters in human cells in the comet assay, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 19, 275-280, **1999**.
- [123] Hartmann, A., Agurell, A., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A.R., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R.: Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay, *Mutagenesis*, 18(1): 45-51, **2003**.
- [124] Young, R.R. Genetic toxicology: Web resources, *Toxicology*, 173:103-121, **2002**.
- [125] Zeiger, E. History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal, view, *Environ Mol Mutagen*, 44:363-371, **2004**.
- [126] Thybaud, V., Aardema, M., Clements, J., Dearfield, K., Galloway, S., Hayashi M., Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing, *Mutat Res*, **2007**.
- [127] Heddle A.J., Hite M., Kirkhart B., Mavournin K., MacGregor T.J., Newell W.G., The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutat Res*, 123, 61-118, **1983**.
- [128] Schmid W., The micronucleus test, *Mutat Res*, 31, 9-15, **1975**.



- [129] Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., et al., Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ Mol Mutagen*, 35: 206-21, **2000**.
- [130] Şekerlioğlu, Z. A., Şekerlioğlu, V., Genetik Toksikite Testleri, *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4-3, 221-229, **2011**.
- [131] Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., Decordier, I., Indirect mechanisms of genotoxicity, *Toxicology Letters*, 140-141: 63-74, **2003**.
- [132] Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volder, M., Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring, *Biochimie*, 88: 1515-31, **2006**.
- [133] Fidan, A.F., Deneysel Diyabet Olusturulmuş Ratlarda Diyete Katılan Farklı Yapılardaki Saponin çerikli Bitkilerin DNA Hasarı, Protein Oksidasyonu ve Lipid Peroksidasyonu ile Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkilerinin Araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Afyonkarahisar, 138 s., **2007**.
- [134] Dinçer, Y., Akçay, T., DNA Hasarı, *Türk Biyokimya Dergisi*, 25 (2): 73-79, **2000**.
- [135] Yeni, D., Fidan, A.F., Gündogan, M., Spermatozoon'da tek hücre jel elektroforezi (SCGE) ile DNA hasarı tespiti, *F.Ü. Sag. Bil. Vet. Dergisi*, 24 (3): 167- 173, **2010**.
- [136] Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, et al., Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study, *Environmental Health*, 6:1-7, **2007**.
- [137] Albers, A.B, Siegel, M, Cheng, D.M, Rigotti, N.A, Biener, L., Effects of restaurant and bar smoking regulations on exposure to environmental tobacco smoke among Massachusetts adults, *Am J Public Health*, 94(11):1959-64, **2004**.

- [138] Kurtulmuş, Sevcan, Aydın, Kevser, Dental döküm alaşımlarının genotoksisite, mutajenisite ve karsinojenisitesi, *SÜ Diş Hekimliği Fak Dergisi*,16:738, **2007**.
- [139] Bolognesi, C., Perrone, E., Landini, E., Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy, *Mutagenesis*, 17(5), 391-7, **2002**.
- [140] Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.ğ., Alvur, M., DNA Hasarı Analizinde  $\mu$ -FADU ve Comet Yöntemlerinin Karşılaştırılması, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* , 2(3), 97-103, **2004**.
- [141] İncedere, F.E., Bazı Pestisitlerin Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, MÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, **2009**.
- [142] Klug, W.S.; Cummings, M.R., Concepts of Genetic. Genetik Kavramlar, 6 th Edition; Çeviri Editörü Prof. Dr. Cihan Öner, Palme Yayıncılık, Ankara, Turkey, **2002**,
- [143] Demirel, S., Zamani, A.G., Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları, *Genel Tıp Dergisi.*, 12, 123-127, **2002**.
- [144] Bolognesi, C., Genotoxicity of pesticides: A Rewiev Of Human Biomonitoring Studies, *Mutat Res*, 543, 587-593, **2003**.
- [145] Fenech, M., The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutat Res*, 285: 35-44, **1993**.
- [146] Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., The comet assay: a comprehensive review, *Mutat Res*, 339: 37-59, **1995**.
- [147] Ostling, O., Johanson, K.J., Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 123: 291- 298, **1984**.

- [148] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res*, 175: 184-91, **1988**.
- [149] Kassie, F, Parzefall, W, Knasmüller, S., Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies, *Mutat Res*, 463: 13-31, **2000**.
- [150] Tice, R.R, Andrews, P.W, Hirai, O, Singh, N.P, The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells, *Adv Exp Med Biol*, 283: 157-164, **1991**.
- [151] Bilgici, B. Behçet hastalığında genotoksisite, Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Samsun, **2005**.
- [152] Douki, T, Reynaud-Angelin, A, Cadet, J, Sage, E, Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation, *Biochemistry*, 42 (30): 9221–6, **2003**.
- [153] Cebulska-Wasilewska, A., Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology, *Mutat Res*, 544: 289-297, **2003**.
- [154] Moller, P., Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA, *Mutat Res*, 612: 84-104, **2006**.
- [155] Moller, P., The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures, *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, 98: 336-345, **2006**.
- [156] Olive, P.L., DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology, *Int J Radiat Biol*, 75: 395-405, **1999**.

- [157] Yeni, D., Fidan, A.F., Gündogan, M., Spermatozoon'da tek hücre jel elektroforezi (SCGE) ile DNA hasarı tespiti, *F.Ü. Sag. Bil. Vet. Dergisi*, 24 (3):167- 173, **2010**.
- [158] Mortelmans, K. ve Rupa S.D., Current Issues in Genetic Toxicology Testing for Microbiologists, *Adv App Microbiology*, 56:379-401, **2004**.
- [159] Karakükcü, Ç., Sarılıklı Yeni Doganlarda Bilirubin Ve Fototerapiden Kaynaklanabilecek Genotoksik Etkilerin Alkali Comet Teknigi ile Degerlendirilmesi. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Yayınlanmış Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri, 89 s., **2008**.
- [160] Bradbury, J., UK panics over phthalates in babymilk formulae, *Lancet*, 347:1541, **1996**.
- [161] Lindahl, T., Repair of intrinsic DNA lesions, *Mutat Res*, 238(3):305-11, **1990**.
- [162] Johnson, R.T, Collins, A.R, Squires, S, Mulliner, A.M, Elliot, G.C, Downes CS, et al, DNA Repair under stress, *J Cell Sci (Suppl)*:263-88, **1987**.
- [163] Singh, N.P, McCoy, M.T, Tice, R.R, Schneider, E.L., A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res*, 175(1):184-91, **1988**.
- [164] Toxicological Profile for Di(2-Ethylhexyl)Phthalate, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency For Toxic Substances And Disease Registry, **2002**.
- [165] Dostal, L.A., Jenkins, W.L., and B.A. Schwetz., Hepatic peroxisome proliferation and hypolipidemic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal and adult rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 87: 81-90, **1987**.
- [166] Moore, M., Oncogenicity study in rats with di (2-ethylhexyl)phthalate including ancillary hepatocellular proliferation and biochemical analyses, 37662-5394, **1996**.
- [167] Sjöberg, P. O., Bondesson, U. G., Sedin, E. G. and Gustafsson, J. P., Exposure of newborn infants to plasticizers, Plasma levels of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate during exchange transfusion, *Transfusion*, 25: 424-428, **1985**.

- [168] Kurahashi, N, Kondo, T, Omura, M, Umemura, T, Ma, M, & Kishi, R, The effects of subacute inhalation of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the testes of prepubertal Wistar rats, *Journal of Occupational Health*, 47(5): 437-44, **2005**.
- [169] Hasmall, S.C, James, N.H, Macdonald, N, et al., Species differences in response to diethylhexylphthalate: suppression of apoptosis, induction of DNA synthesis and peroxisome proliferator activated receptor alpha-mediated gene expression, *Arch Toxicology*, 74:85-91, **2000**.
- [170] Dostal, L.A., Weaver, R.P., and Schwetz, B.A., Transfer of di(2-ethylhexyl) phthalate through rat milk and effects on milk composition and the mammary gland, *Toxicology Appl Pharmacol*, 91:315-325, **1987**.
- [171] Gray, L.E, Ostby, J, Furr, J, et al., Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat, *Toxicological Science*, 58:350-365, **2000**.
- [172] Cammack, J, White, R, Gordon, D, Gass, J, Hecke,r L, Conine, D, Bruen, U, Friedman, M, Echols, C, Yeh, T, & Wilson, D., Evaluation of reproductive development following intravenous and oral exposure to DEHP in male neonatal rats, *International Journal of Toxicology*, 22(3): 159-174, **2003**.
- [173] David, R.M., Moore, M.R, Finney, D.C and Guest, D, Chronic Toxicity of Di(2- ethylhexyl)phthalate in Mice, *Toxicological Science*, 58, 377-385, **2000**.
- [174] Rusyn, I., Denissenko M. F., Wong, V.A., Butterworth, B.E., Cunningham, M.L., Upton, P.B., Thurman, R.G., Swenberg, J.A., Expression of base excision repair enzymes in rat and mouse liver is induced by peroxisome proliferators and is dependent upon carcinogenic potency, *Carcinogenesis*, 2141–2145, **2000**.
- [175] IARC (International Agency for Research on Cancer), Di(2-ethylhexyl) phthalate, in: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Some Industrial Chemicals, vol. 77, p. 148176, **2000**.

- [176] Klimisch, H.J, Gamer, A.O, Hellwig, J, Kaufmann, W., & Jackh, R., Di-(2-ethylhexyl) phthalate: a short-term repeated inhalation toxicity study including fertility assessment, *Food & Chemical Toxicology*, 30(11): 915-919, **1992**.
- [177] Klaunig, J.E, Babich, M.A, Baetcke, K.P, et al., PPARalpha agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance, *Crit Rev Toxicology*, 33: 655-780, **2003**.
- [178] Ropero, A.B, Alonso-Magdalena, P., García-García, E., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal, A., Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis, *Int J Androl*, 31: 194-200, **2008**.
- [179] Lapinskas, P.J, Brown, S., Leesnitzer, L.M., Blanchard, S., Swanson, C., Cattley, R.C., Corton, J.C., Role of PPAR alpha in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver, *Toxicology*, 207: 149-163, **2005**.
- [180] Ward, J.M., Peters, J.M., Perella, C.M., Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice, *Toxicol Pathol*, 26(2):240-246, **1998**.
- [181] Lee, S.S.T, Pineau, T., Drago, J., et al., Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators, *Mol Cell Biol*, 15(6):3012-3022, **1995**.
- [182] Peters, J.M., Cattley, R.C., Gonzalez, F.J., Role of PPAR $\alpha$  in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643, *Carcinogenesis*, 18(11):2029-2033, **1997**.
- [183] Voss, C., Zerban, H., Bannasch, P., Berger, M.R., Lifelong exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces tumors in liver and testes of Sprague-Dawley rats, *Toxicology*, 206: 359-371, **2005**.

- [184] Kluwe, W.M., Haseman, J.K., Huff, J.E., The carcinogenicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in perspective, *J Toxicol Environ Health*,12:159-169, **1983**.
- [185] Takashima, K., Ito, Y., Gonzalez, F.J., Nakajima, T., Different mechanisms of DEHP-induced hepatocellular adenoma tumorigenesis in wild-type and Ppar alpha-null mice, *J Occup Health*, 50: 169-180, **2008**.
- [186] Yang, Q, Ito, S, Gonzalez, F.J., Hepatocyte-restricted constitutive activation of PPAR alpha induces hepatoproliferation but not hepatocarcinogenesis, *Carcinogenesis*, 28: 1171-1177, **2007**.
- [187] Yang, Q., Nagano, T., Shah, Y., Cheung, C., Ito, S., Gonzalez, F.J., The PPAR alpha-humanized mouse: a model to investigate species differences in liver toxicity mediated by PPAR alpha, *Toxicological Science*, 101: 132-139, **2008**.
- [188] World Health Organization, Diethylhexyl phthalate, Environmental Health Criteria 131, Chapter 7.7, *Carcinogenicity*, page 77-83, **1992**.
- [189] Trosko, J.E, Chang, C.C, Upham, B, Wilson, M., Epigenetic toxicology as toxicant-induced changes in intracellular signaling leading to altered gap junctional intercellular communication, *Toxicology Letters*, 102-103: 71-78, **1998**.
- [190] Poon, R., Lecavalier, P, Mueller, R, et al., Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in the rat, *Food Chemical Toxicology*, 35:225-239, **1997**.
- [191] Johnstan, D. E., Special considerations in interpreting liver function tests, *American Family Physician*, 59, 2223-2230, **1999**.
- [192] Setchell, K. D. R., Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of isoflavones, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1333-1346, **1998**.

- [193] Nair, N, Kurup, C.K., Investigations on the mechanism of the hypocholesterolemic action of diethylhexylphthalate in rats, *Biochemical Pharmacology*, 35:3441-3448, **1986**.
- [194] Rhodes, C., Elcombe, C.R, Batten, P.L, Bratt, H, Jackson, S.J, Pratt, I.S, Orton, T.C, The disposition of <sup>14</sup>C-di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) in the marmoset, *Toxicol Environ Sci.*,11:579-581, **1983**.
- [195] Goodsland, I. F., Oestrogens and insulin secretion, *Diabetologia*, 48, 2213-2220, **2005**.
- [196] Koch, H.M., Preuss, R. & Angerer, J., Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure – an update and latest results, *International Journal of Andrology*, vol. 29, pp. 155-165, **2006**.
- [197] Moore, M., Oncogenicity study in mice with di (2-ethylhexyl)phthalate including ancillary hepatocellular proliferation and biochemical analyses, *Corning Hazleton Incorporated (CHV)*, **1997**.
- [198] Williams, G.M, Maruyama, H., Tanaka, T., Lack of rapid initiating, promoting or sequential syncarcinogenic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate in rat liver carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 8(7):875880, **1987**.
- [199] Tamura, H., Iida, T., Watanabe, T., Suga, T., Lack of induction of hepatic DNA damage on long-term administration of peroxisome proliferators in male F-344 rats, *Toxicology*, 69, 55-62, **1991**.
- [200] Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R., Kurokawa, Y., Significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following short-term exposure to the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and di(2-ethylhexyl)adipate, *Japanese Journal of Cancer Research*, 81, 213-215, **1990**.
- [201] Cattley, R.C., Glover, S.E., Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine in hepatic DNA of rats following exposure to peroxisome proliferators: relationship to carcinogenesis and nuclear localization, *Carcinogenesis*, 14, 2495-2499, **1993**.



- [202] Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R., Kurokawa, Y., Relationship between hepatic peroxisome proliferation and 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver DNA of rats following long-term exposure to three peroxisome proliferators; di(2-ethylhexyl) phthalate, aluminium clofibrate and simfibrate, *Cancer Letters*, 53, 33-38, **1990**.
- [203] Anderson, D., Yu, T.W., Hincal, F., Effect of some phthalate esters in human cells in the comet assay, *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 19, 275-280, **1999**.
- [204] Kleinsasser, N.H., Harréus, U.A., Kastenbauer, E.R., Wallner, B.C., Sassen, A.W., Staudenmaier, R., Rettenmeier, A.W., 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, 83-90, **2004**.
- [205] Duty, S.M., Singh, N.P., Silva, M.J., Barr, D.B., Brock, J.W., Ryan, L., Herrick, R.F., Christiani, D.C., Hauser, R., The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay, *Environmental Health Perspectives*, 111, 1164-1169, **2003**.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı: Gözde KARABULUT

Doğum Yeri: Karabük

Medeni Hali: Bekar

E-posta:gozdekarabulut6@gmail.com

Adresi: Kuru Mah. Ankaralılar Cad. Temsa Sitesi 6. Blok daire:5  
Çayyolu / ANKARA

### Eğitim:

Lise: Karabük 75. Yıl Anadolu Lisesi

Lisans: Ankara Üniversitesi

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı

### Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce – Advanced (ileri)

### İş Deneyimi

07.2011 – 02. 2012 Araştırma Görevlisi, Dumlupınar Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya

02.2012 – Devam ediyor Araştırma Görevlisi, Hacettepe  
Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

### Deneyim Alanları

Genotoksikoloji, histoloji

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi (-)

**Tezden Üretilmiş Yayınlar (-)**

**Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/ veya Poster Sunumu İle Katıldığı  
Toplantılar (-)**