

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

**ERKEN ADÖLESAN VE ADÖLESAN DÖNEMDE
FTALAT MARUZİYETİNİN EPİGENETİK
MEKANİZMALAR VE METABOLİK PROFİL
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Uzm. Ecz. Ünzile SUR

Farmasötik Toksikoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2021

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

**ERKEN ADÖLESAN VE ADÖLESAN DÖNEMDE FTALAT
MARUZİYETİNİN EPIGENETİK MEKANİZMALAR VE
METABOLİK PROFİL ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Uzm. Ecz. Ünzile SUR

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL**

**ANKARA
2021**

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ERKEN ADÖLESAN VE ADÖLESAN DÖNEMDE FTALAT
MARUZİYETİNİN EPİGENETİK MEKANİZMALAR VE METABOLİK
PROFİL ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ
Öğrenci Adı: Ünzile Sur
Danışman: Prof. Dr. Belma Gümüşel

Bu tez çalışması 30/06/2021 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Nursen Başaran*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Tülay Çoban*
(Ankara Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Pınar Erkekoğlu*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Aylin Üstündağ*
(Ankara Üniversitesi)

Üye: *Dr. Öğr. Üyesi Ali Aşçı*
(Selçuk Üniversitesi)

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

08 Temmuz 2021

Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**”¹ kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

30/06/2021

Ünzile SUR

i

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, **tez danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında **tez danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

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



Uzm. Ecz. Ünzile Sur

TEŞEKKÜR

Tüm lisansüstü eğitimim boyunca heyecanıma ortaklık eden, değerli bilgileri ile bana yol gösteren, fikirlerimi destekleyerek çalışmalarım da beni her daim cesaretlendiren, sadece danışmanlık değil rehberlik de yaparak akademisyen olma yolumda bana ışık olan ve bu tez çalışmasının oluşması için her türlü desteği sağlayan saygıdeğer ve kıymetli hocam Prof. Dr. Belma Gümüşel'e,

Gerek birlikte yaptığımız çalışmalarda, gerek lisansüstü eğitimim sürecinde bana sağladığı bilimsel katkıların yanında manevi olarak da desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Pınar Erkekoğlu'na,

Bilimsel konulardaki yardımları ile tez çalışmamın geliştirilmesinde bana katkı sağlayan ve dostluğunu benden esirgemeyen University of Massachusetts Amherst School of Public Health and Health Sciences öğretim üyesi sayın J. Richard Pilsner ve sevgili ekibine,

Tez çalışmam boyunca bana destek olan Prof. Dr. Emirhan Nemutlu, Doç. Dr. N. Dilara Zeybek, Uzm. Kim. Tuba Reçber, Uzm. Bio. Eylem Baysal ve Uzm. Ecz. Anıl Yirün'e,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince bilimsel gelişimime katkı sağlayan ve bana akademik vizyon kazandıran tüm Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Tez çalışmamı değerli bularak destekleyen Hacettepe Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü, Lokman Hekim Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na,

Bu zorlu süreç boyunca beni her konuda tam anlamıyla destekleyen, hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili Eşim'e,

Ve canım Roket Takımı'na,

Teşekkür ederim.

ÖZET

Sur, Ü. Erken Adölesan ve Adölesan Dönemde Ftalat Maruziyetinin Epigenetik Mekanizmalar ve Metabolik Profil Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2021. Di (2-etil hekzil) ftalat (DEHP), kişisel bakım ürünlerinden oyuncaklara kadar birçok üründe/ambalajında kullanılan ve endokrin bozucu özellikleri olan bir kimyasal maddedir. DEHP ile ilgili yapılan çalışmalar toksisitenin özellikle erkek üreme sistemini hedeflediğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında, Sprague Dawley erkek sıçanlar, erken adölesan ve adölesan dönem boyunca 30 mg/kg/gün (DD grubu) ve 60 mg/kg/gün (YD grubu) DEHP'e maruz bırakılarak oluşan toksisitenin sonuçları yetişkinlik döneminde kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, sperm parametrelerindeki değişiklikler, oksidatif stres oluşumu (total glutasyon, total antioksidan kapasite ve lipid peroksidasyonu düzeyleri), histopatolojik ve apoptotik değişiklikler incelenmiştir. Epigenetik değişiklikler irdelenmiş ve metabolomik analizler yapılmıştır. DEHP maruziyeti ile sperm sayısı, motilite ve morfolojisinde anlamlı değişimler ve doku hasarına işaret eden histopatolojik değişiklikler meydana gelmiştir. Apoptoz DD ve YD grubunda sırasıyla 3,36 ve 7 kat artmıştır. Total glutasyon düzeyleri DD grubunda değişmezken YD grubunda %46,26 azalmıştır ($p<0,05$). DD ve YD gruplarında lipid peroksidasyonu (%41,03, %102,7, sırasıyla) ve total antioksidan kapasite (% 9,83, %19,38, sırasıyla) kontrole göre anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0,05$). Metabolomik analizde lipid ve enerji metabolizmasının değiştiği saptanmış ve bu metabolik yolların en önemli elemanlarından olan peroksizom proliferatör aktive reseptör gamma (PPAR- γ) düzeyleri doza bağlı olarak artmıştır ($p<0,05$). Her iki grupta da epigenetik profildeki değişimlerin en önemli göstergesi olan global DNA metilasyonlarının doza bağlı olarak azaldığı, histon metilasyon düzeylerinin ise arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu sonuçlar, yaşamın erken dönemlerinde DEHP'in, oksidatif stres, PPAR- γ , ve epigenetik modifikasyonlar aracılığı ile üreme sistemi üzerinde geri dönüşsüz bir toksisiteye neden olabileceğini göstermekte ve bu etkilerin sonraki nesillere aktarılabilmesine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Di (2-etil hekzil) ftalat, epigenetik, PPAR- γ , metabolomik, adölesan.

Bu tez çalışması TÜBİTAK-BİDEB 2214-A burs programı, Hacettepe Üniversitesi ÖYP Koordinatörlüğü ve Lokman Hekim Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje No: 20K00301) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Sur, Ü., Investigation of Effects of Phthalate Exposure on Epigenetic Mechanisms and Metabolic Profile in Early Adolescent and Adolescent Periods, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmaceutical Toxicology Program PhD Thesis, Ankara, 2021. Di (2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP) is a chemical that has endocrine disrupting properties and is widely used in many consumer products. Studies on DEHP show that toxicity specifically targets the male reproductive system. In this thesis, preadolescent Sprague Dawley male rats were exposed to 30 mg/kg/day (DD group) and 60 mg/kg/day (YD group) DEHP until the end of adolescence period and the toxicity were evaluated in adulthood by measuring sperm parameters, histopathologic and apoptotic changes, oxidative stress parameters (total glutathione, total antioxidant capacity and lipid peroxidation levels), epigenetic mechanisms and changes in metabolic profile. Significant alterations in sperm count, motility, and morphology in both study group and histopathological changes were observed by DEHP exposure compared to control. Testicular apoptosis increased 3.36 and 7 times in the DD and YD groups, vs control respectively. Total glutathione levels did not change in the DD group, it decreased by 46.26% in the DD group ($p < 0.05$). Lipid peroxidation (41.03%, 102.7%, respectively) and total antioxidant capacity (9.83%, 19.38%, respectively) increased significantly in DD and YD groups compared to control ($p < 0.05$). Metabolomic analysis revealed an altered lipid and energy metabolism. Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR- γ) levels as one of the most important elements of these metabolic pathways, were increased depending on the dose ($p < 0.05$). Global DNA hypomethylation and increased histone methylation levels which are the most important indicator of the changes in epigenetic profile, were also observed in both groups ($p < 0.05$). These results indicate that DEHP exposure in the early stages of life causes an irreversible reproductive system toxicity through oxidative stress, PPAR- γ , and epigenetic modifications and these effects may be transgenerationally inherited.

Keywords: Di (2-ethyl hexyl) phthalate, epigenetics, PPAR- γ , metabolomic, adolescent.

This thesis study was supported by TÜBİTAK-BİDEB 2214-A scholarship program, Hacettepe University Academic Member Training Program (OYP) Coordinator and Lokman Hekim University Scientific Research Unit (Project No: 20K00301).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Erkek Üreme Sistemi Hakkında Genel Bilgiler	4
2.2. Erkek Üreme Sistemi Bozuklukları	11
2.3. Epigenetik Mekanizmalar	13
2.4. DNA Metilasyonu	14
2.5. Histon Modifikasyonu	15
2.6. Sperm Hücrelerinin Gelişiminin Epigenetik Düzenlenmesi	16
2.7. DNA Metilasyonu ve Erkek İnfertilitesi	19
2.8. Histon Modifikasyonları ve Erkek İnfertilitesi	20
2.9. Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gamma	22
2.10. Erkek Üreme Sisteminde Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gamma Ekspresyonu ve Görevleri	22
2.11. Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gamma Aktivitesinin Fertilizasyon ve İnfertilitedeki Rolü	24
2.12. Oksidatif Stres	27
2.13. Oksidatif Strese Neden Olan Faktörler ve Erkek Üreme Sisteminde Oksidatif Stres	28
2.14. Erkek Üreme Sisteminde Oksidatif Stres ve Apoptoz İlişkisi	30
2.15. Oksidatif Stres ve Sperm Epigenomu	32
2.16. Endokrin Bozucu Kimyasallar	33

2.17. Di (2-Etil Hekzil) Ftalat	36
2.18. Di (2-Etil Hekzil) Ftalat ve Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkileri	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	42
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
3.3. Deneysel İşlemler ve Yöntemler	45
3.3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Dozlanması	45
3.3.2. Sperm Parametreleri	47
3.3.3. Histopatolojik Analiz	48
3.3.4. Apoptoz Tayini	51
3.3.5. Doku Homojenizasyonu	52
3.3.6. Protein Miktar Tayini	53
3.3.7. Total Glutatyon Tayini	54
3.3.8. Lipit Peroksidasyonu Düzeylerinin Ölçümü	57
3.3.9. Total Antioksidan Kapasite Tayini	58
3.3.10. Metabolomik Analiz	59
3.3.11. DNA İzolasyonu	63
3.3.12. Global DNA Metilasyonu Tayini	64
3.3.13. Histon Asetilasyonu Tayini	66
3.3.14. Nükleer Protein İzolasyonu	69
3.3.15. Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör- Gamma (PPAR- γ) Düzeyi	70
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	72
4. BULGULAR	74
4.1. Vücut ve Organ Ağırlıkları	74
4.2. Sperm Parametreleri	77
4.2.1. Sayımı ve Motilitesi	77
4.2.2. Sperm Morfolojisi	78
4.3. Histopatolojik Değerlendirme	80
4.4. Apoptotik Değerlendirme	87
4.5. Total Glutatyon Düzeyleri	90
4.6. Lipit Peroksidasyon Düzeyleri	91
4.7. Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri	92

4.8. Metabolik Profil	93
4.9. Global DNA Metilasyonu Düzeyleri	101
4.10. Histon Asetilasyon Düzeyleri	102
4.11. Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör- γ Düzeyi	103
5. TARTIŞMA	104
5.1. Vücut ve Organ Ağırlığı	105
5.2. Sperm Parametreleri	107
5.3. Histopatolojik Değerlendirme	108
5.4. Apoptoz	111
5.5. Oksidatif Stres	112
5.6. Metabolik Profil	115
5.7. Epigenetik Profil	121
5.8. Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gamma (PPAR- γ)	126
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	131
7. KAYNAKÇA	134
8. EKLER	
EK.1: Etik Kurul Onay Belgesi	
EK.2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	165

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-mC	Metil sitozin
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit
AMH	Anti-müllerian hormon
BAD	Beyaz adipoz doku
BSA	Sığır serum albümini
CER I	Sitoplazmik ekstraksiyon çözeltisi I
CER II	Sitoplazmik ekstraksiyon çözeltisi II
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DBP	Dibütil ftalat
DD	Düşük doz grubu
DEHP	Di (2-etil hekzil) ftalat
DHEA	Dihidroepiandrosteron
DHT	Dihidrotestosterona
DNMT	DNA metil transferaz
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTPA	Dietilen triamin penta asetik asit
DTT	Dithiotreitol
EBAD	Epididimal beyaz adipoz doku
EPA	Amerikan Çevre Koruma Ajansı
FSH	Folikül stimüle edici hormon
G6PDH	Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz
GF1	Lizis çözeltisi
GF2	Ekstraksiyon çözeltisi
GF3	Yıkama çözeltisi
GF4	Histon tamponu
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GSH	Total glutatyon

HAC	Histon asetilasyon
HPG	Hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen
LH	Lüteinleştirici hormon
K	Kontrol grubu
MDA	Malondialdehit
MEHP	Mono (2-etil hekzil) ftalat
MSTFA	2,2,2-Trifloro-N-metil-N-(trimetilsilil)-asetamid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojenaz
NER	Nükleer ekstraksiyon çözeltisi
NF- κB	Nükleer faktör- κ B
OH\cdot	Hidroksil
P	Protamin
PBS	Fosfat tamponu
PPAR-γ	Peroksizom proliferatör aktive reseptör gamma
PSA	Prostat spesifik antijen
QC	Kontrol çözeltisi
RAR	Retinoik asit reseptörü
ROO\cdot	Peroksil
ROS	Reaktif oksijen türleri
RXR	Retinoid X reseptörleri
SAM	S-adenozilmetiyonin
SEM	Standart hata
SOD	Süperoksit dismutaz
TAOC	Total antioksidan kapasite
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif madde
TCA	Trikloroasetik asit
TET	On-on bir translokasyon
TNF	Tümör nekroz faktör
TNP	Transizyon proteinleri

TRIS	Tris (hidroksimetil) aminometan
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz-aracılı dUTP işaretleme
YD	Yüksek doz grubu

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Erkek üreme organının anatomisi	4
2.2. Embriyoda erkek cinsiyet organının oluşumu	6
2.3. Sperm yapısı	9
2.4. PPAR- γ ekspresyonu ve erkek üreme sistemi üzerindeki etkinliği	23
2.5. Spermatogenez ve PPAR- γ aktivitesi	25
2.6. Di-(2-etilhekzil) ftalat'ın (DEHP) metabolizması	37
4.1. Çalışma gruplarının ortalama vücut ağırlığı değişimi	74
4.2. Çalışma gruplarının çalışma başlangıcı ve sonundaki ortalama vücut ağırlıkları	74
4.3. Çalışma gruplarındaki ortalama testis ve epididimis ağırlıkları	75
4.4. Çalışma gruplarındaki rölatif testis ve epididimis ağırlıkları	76
4.5. Deneş gruplarında farklı morfolojik özellikler gösteren sperm örnekleri	77
4.6. Deneş gruplarındaki anormal ve normal sperm yüzdeleri	79
4.7. Çalışma gruplarına ait seminifer tübül ışık mikrofrafı	80
4.8. Çalışma gruplarına ait seminifer epitel görüntüsü	81
4.9. Sıçanlarda seminifer epitel siklusu	82
4.10. Çalışma gruplarında Evre V'e ait seminifer tübül kesitleri	83
4.11. Çalışma gruplarında Evre VIII'e ait seminifer tübül kesitleri	84
4.12. Çalışma gruplarında Evre IX'a ait seminifer tübül kesitleri	85
4.13. Çalışma gruplarında Evre XIV'e ait seminifer tübül kesitleri	86
4.14. Kontrol grubuna ait seminifer tübüllerde gözlenen apoptotik hücreler	87
4.15. DD grubuna ait seminifer tübüllerde gözlenen apoptotik hücreler	87
4.16. YD grubuna ait seminifer tübüllerde gözlenen apoptotik hücreler	87
4.17. Testis dokusundaki ortalama TUNEL pozitif hücre sayısı	88
4.18. Testis total GSH düzeyleri	89
4.19. Testis MDA düzeyleri	90
4.20. Testis TAOC düzeyleri	91
4.21. Tüm gruplarda testis dokusu metabolomik profili	92

4.22.	Çalışma gruplarının ayrılmasında etkin olan metabolitler	93
4.23.	Kontrol ve DD grubuna ait metabolit dağılımı	93
4.24.	Kontrole göre DD grubunda azalan ve artan metabolitler	94
4.25.	Kontrol ve YD grubuna ait metabolit dağılımı	95
4.26.	Kontrole göre YD grubunda azalan ve artan metabolitler	96
4.27.	DD ve YD grubuna ait metabolit dağılımı	97
4.28.	DD grubuna göre YD grubunda azalan ve artan metabolitler	98
4.29.	Metabolitlerin rol aldığı metabolik yollar	99
4.30.	Sperm 5-metil sitozin (%5-mC) yüzdeleri	100
4.31.	Sperm histon asetilasyon yüzdeleri	101
4.32.	Testis PPAR- γ DNA bağlanma aktivitesi	102

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre sperm parametrelerine ait minimum referans değerleri	10
2.2. Sperm anomalilerinin tanımları	11
3.1. GC-MS Analiz Şartları	61
4.1. Çalışma gruplarının başlangıçtaki ortalama vücut ağırlıkları	73
4.2. Çalışma gruplarındaki ortalama testis ağırlıkları	75
4.3. Çalışma gruplarına ait toplam sperm sayısı, hareketli sperm sayısı ve hareketli sperm yüzdesi	77
4.4. Deney gruplarında sperm morfoloji değişikliklerine ait yüzdeler	78
4.5. Testis dokusunda ortalama TUNEL pozitif hücre sayısı	88
4.6. Testis total GSH düzeyleri	89
4.7. Testis MDA düzeyleri	90
4.8. Testis TAOC düzeyleri	91
4.9. Sperm 5-metil sitozin (%5-mC) yüzdeleri	100
4.10. Sperm histon asetilasyon yüzdeleri	101
4.11. Testis PPAR- γ DNA bağlanma aktivitesi	102
5.1. Sperm parametrelerindeki değişimler	106

1. GİRİŞ

Endokrin bozucular, homeostazın korunmasından ve gelişimsel süreçlerin düzenlenmesinden sorumlu vücuttaki doğal hormonların üretimi, salınımı, taşınması, metabolizması, bağlanması, hareketi veya eliminasyonu üzerinde etki gösterebilen, sentetik olarak üretilen ya da çevrede doğal olarak bulunabilen ekzojen bileşiklerdir (1). 20. yüzyıl başlarından günümüze kadar, sentetik endokrin bozucuların sentezi ve kullanımı her geçen gün artmaktadır. Endokrin bozucu kimyasallar, çözücüler, plastikler, ağır metaller, plastizerler (plastikleştiriciler), pestisitler, fungusitler ve daha birçok kimyasaldan oluşan geniş bir gruptur ve birçok farklı kaynaktan yaşam boyunca maruz kalınmaktadır (2, 3).

Ftalatlar, endokrin bozucu kimyasallar arasında en sık maruz kalınan bileşiklerdendir. Özellikle di (2-etil hekzil) ftalat (DEHP), plastik malzemelere esneklik ve yumuşaklık özelliği kazandırmak amacıyla kullanılan, oyuncaklar, kozmetik ürünler, kişisel bakım ürünleri, medikal cihaz ve malzemeler, tekstil ürünleri ve gıda ambalajları dahil olmak üzere çok geniş bir alanda tercih edilen bir kimyasaldır. Bu geniş kullanım alanı sebebiyle yüksek miktarlarda üretimi yapılmaktadır (4).

Yaşamın neredeyse her döneminde ve her alanında kullanılan farklı ürünler aracılığıyla DEHP'e maruziyet oral, dermal ve inhalasyon gibi birçok yol ile gerçekleşmektedir. Ana hedef organı olarak bilinen erkek üreme sistemi üzerindeki toksik etkilerinin ayrıntılı olarak belirlenebilmesi için birçok çalışma yapılmaktadır. Paracelsus'un "sola dosis facit venenum-zehiri zehir olmayandan ayıran tek şey dozudur." sözü temel prensip olarak kabul edilmiş olsa da, son yıllarda yürütülen birçok çalışma, DEHP gibi endokrin bozucu kimyasal maddelerde düşük dozda da toksisitenin gözlenebileceğine ve maruziyet döneminin de toksisitenin oluşmasında önemli bir role sahip olabileceğine işaret etmektedir (5).

Literatürdeki kısıtlı sayıda çalışma fetal dönem, çocukluk çağı ve ergenlik döneminde maruziyetin yetişkinlik dönemine göre çok daha ciddi sonuçlara sebep olabileceğini ve bu etkilerin kalıcı ve genetik olarak aktarılabilir hasarlara sebep

olabileceğini göstermektedir (6). Bununla birlikte, üreme sisteminin gelişimini tamamladığı ve işlevsellik kazandığı kritik dönemlerden biri olan preadölean ve adölesan dönemde maruziyetin sonuçlarını inceleyen çalışmalar son derece kısıtlıdır. Elde edilen verilere göre DEHP gibi endokrin bozuculara hayatın kritik dönemlerinde maruziyet, doku ve hücrelerin gelişimini bozarak, özellikle erkek üreme sisteminde geri dönüşlü olmayan hasara neden olabilmektedir, ancak eldeki veriler bu toksisitenin mekanizmasını anlamak için yeterli değildir.

Eldeki veriler ışığında DEHP maruziyetinin oksidatif stresi indükleyerek biyolojik süreçleri değiştirebildiği ve oluşan serbest radikallerin spermde veya testis dokusunda transkripsiyon faktörlerinin sinyal yollarını ve sonuç olarak gen ekspresyonlarını değiştirebileceği ön görülmektedir (7-9). Ayrıca metabolik yolları değiştirerek fonksiyonel bozukluklara yol açabildiği de bildirilmiştir (10, 11).

Bu bilgiler ışığında planlanan bu tez çalışmasında elde edilmesi beklenen veriler ile, erken adölesan ve adölesan dönemde DEHP maruziyetinin erkek üreme sistemi üzerindeki olası toksik etkilerinde oksidatif stres, epigenetik mekanizmalar ve metabolik profildeki değişikliklerin rolünün olup olmadığı sorusuna yanıt aranması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında Sprague Dawley erkek sıçanlar, süttten kesildikleri postnatal 21. günden itibaren alınarak kontrol (K), düşük doz DEHP (DD) ve yüksek doz DEHP (YD) olmak üzere 3 gruba ayrılmış ve preadölesan ve adölesan dönem boyunca (21-37. gün) oral gavaj yoluyla DEHP'e maruz bırakılmıştır. DD grubu için seçilen doz üreme sistemi için en düşük ters etki gözlenen düzey (LOAEL, 30 mg/kg/gün), YD grubu için seçilen doz ise LOAELx2 (60 mg/kg/gün) olarak belirlenmiştir. Gruplarda yer alan sıçanların dozlanmasını takiben erkek üreme sisteminin gelişiminin tamamlandığı postnatal 10. haftada ötenazi gerçekleştirilmiştir. Dekapitasyonu takiben testis dokusu analizler için kullanılmak amacıyla uygun şekillerde saklanmış ve epididimal sperm izolasyonu yapılarak sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Çalışma kapsamında testis dokusunda histopatolojik ve apoptotik incelemeler yapılmış, oksidatif stres parametreleri (total glutatyon (GSH), lipid peroksidasyonu ve total antioksidan kapasite (TAOC)) ile peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gamma (PPAR- γ) DNA bağlanma kapasitesi ölçümü ve metabolomik analizler yapılmıştır. Ayrıca

çalışma gruplarından elde edilen sperm örneklerinden DNA ve histon izolasyonu yapılarak global DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu düzeyleri tayin edilmiştir.

Çalışma sonunda elde edilen veriler ile gelişim ve farklılaşmanın devam ettiği erken adölesan ve adölesan dönemde DEHP maruziyetinin erkek üreme sistemi üzerindeki,

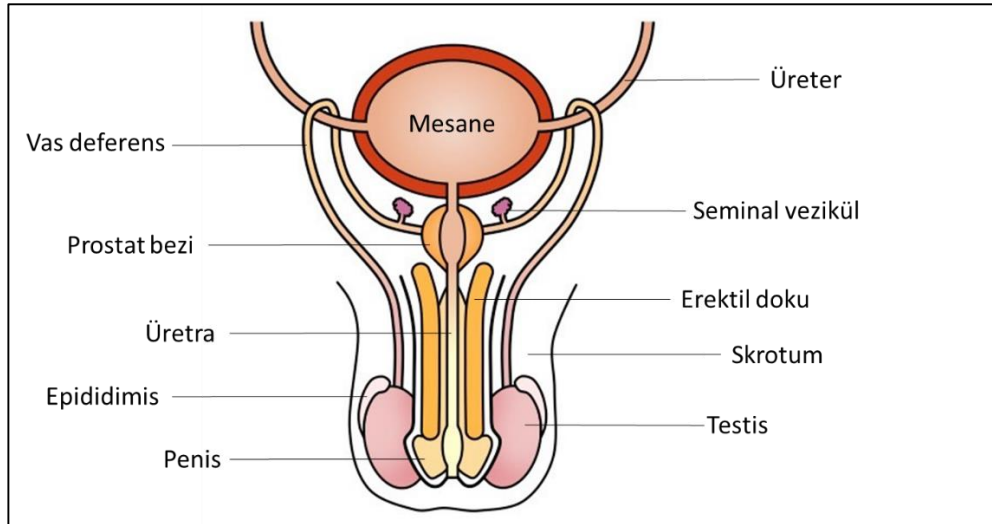
- Histopatolojik ve apoptotik etkileri incelenmiştir.
- Bu değişimlerin altında yatan olası mekanizmalardan biri olan epigenetik mekanizmalar değerlendirilmiştir.
- Oksidatif stresin bu sürece olan katkısı belirlenmiştir.
- PPAR- γ ekspresyonlarının epigenetik mekanizmalar ve oksidatif stres ile olan ilişkisi gösterilmiştir.
- Metabolomik analizler ile olası toksisite mekanizmalarının aydınlatılabilmesi ve bu yolların gösterilmesine katkı sağlanmıştır.

Sonuç olarak, literatürde ftalatların özellikle erken adölesan ve adölesan dönem maruziyeti ile oluşabilecek toksik etki mekanizmalarının bu kapsamda incelendiği bir çalışmaya rastlanmamış olması yönünden sunulan çalışma önem taşımaktadır. Bu çalışma sonunda elde edilen verilerin, ftalat maruziyetine bağlı oluşabilecek toksik etkilere ait mekanistik veriler olması nedeniyle literatüre önemli düzeyde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi Hakkında Genel Bilgiler

Erkek üreme sistemi, iç kısımda testisler, epididimis, vas deferens ve prostat, dış kısımda ise skrotum ve penisten meydana gelir. Bu yapıların tamamı, üremenin gerçekleşebilmesi için gereken spermin üretimi, depolanması ve boşaltılmasını kolaylaştıran ve erkek üreme sisteminin gelişimi için önemli olan androjenlerin salgılanmasını sağlayan iyi damarlanmış bezler ve kanallardan meydana gelir ve hem endokrin hem de ekzokrin organlar olarak çalışır (12). Erkeğe üreme sisteminin anatomik yapısı Şekil 2.1.'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Erkek üreme organının anatomisi

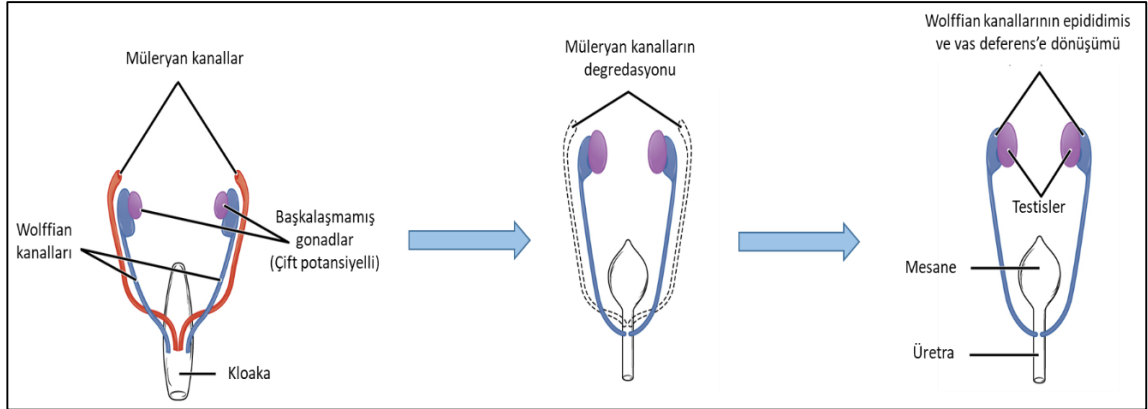
Ana androjen hormon olan testosteron, testislerde bulunan Leydig hücrelerinden üretilmektedir. Testosteron, prostat bezinin periferinde bulunan 5- α -redüktaz aracılığı ile daha aktif formu olan dihidrotestosterona (DHT) veya adipoz dokudaki aromataz aracılığı ile estradiole dönüştürülür. Bazı durumlarda, estradiolün estrojene fazla dönüşmesi, erkeklerde kemik erimesi, jinekomasti, libido kaybı veya infertilite ile sonuçlanabilecek durumlara sebep olabilir. Diğer önemli hormonlardan olan inhibin B ve anti-müllerian hormon (AMH) ise testislerdeki Sertoli hücrelerinden sentezlenmektedir. Bu hormonların üretim ve salgılanmasını düzenleyen folikül stimüle edici hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH), hipofiz bezinin ön

kısından salgılanır ve bu hormonların homeostazı ise gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ile sağlanır. Tüm bu hormonlar, bir arada çalışarak hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) eksen adı verilen ve erkek üreme sisteminin gelişimi ve fonksiyonlarından sorumlu olan sistemi oluşturur (13).

Erkek üreme sisteminin fonksiyonel hücrelerinden biri olan Leydig hücreleri, testislerin interstisyumunda ve seminifer tübüllere bitişik olan bölgede bulunmaktadır. Histolojik incelemelerde bu hücreler, içerdikleri Reinke kristalleri sebebiyle pembe sitoplazmalı olarak görünür. Leydig hücreleri, intraselüler reseptörlere bağlanarak protein ekspresyonunu düzenleyen testosteron hormonunu üretir (14). Sertoli hücreleri ise, seminifer tübüllerin periferinde bulunmaktadır. Buldukları bölgede spermatogenezi başlatan bu hücreler, birbirlerine sıkıca bağlanarak kan-testis bariyerini oluşturur. Böylelikle germ hücrelerini veya spermatogonyumları seminifer tübüllerde muhafaza ederler. Sertoli hücreleri germ hücrelerinden daha büyüktür ve çekirdekleri daha belirgindir. Germ hücreleri, olgunlaştıkça seminifer tübüllerin iç duvarına doğru yaklaşarak lümeneye doğru salgılanır. Lümeneye geçen bu olgun hücreler ise, daha koyu, büyük ve yoğun bir çekirdek görünümüne sahiptir (15).

İnsan embriyosunun cinsiyeti öncelikle dişi olarak meydana gelmektedir. Ancak embriyoda Y kromozomu varsa, bu kromozom sistemin erkek fenotipine ve erkek üreme sistemine farklılaşmasından sorumludur. Y kromozomunda cinsiyet belirleyici bölge adı verilen ve testislerin gelişimden sorumlu olan bir gen bulunmaktadır. Embriyonun gelişimi sırasında testisler, karnın arka duvarından farklılaşarak skrotuma doğru iner (Şekil 2.2.). Daha sonra Sertoli hücreleri olgunlaşarak AMH salgılar ve böylelikle dişi üreme sisteminin bir parçası olan müleryan kanalların gerilemesini indükler. Bununla birlikte, oluşan Leydig hücreleri ise erkek üreme sistemi gelişiminin ana düzenleyicisi olan testosteron salgısını başlatır. Testosteron, erkek fetusta testis, epididimis, vas deferens ve seminal veziküllerin oluşmasını sağlayan Wolffian kanallarının gelişimini indükler. Bununla birlikte testosteron, eritropoez, ergenliğin başlaması, kemik dansitesi, epifiz plağının kapanması, sesin kalınlaşması, kas yoğunluğunun artması, erkeğe özgü fiziksel gelişimin sağlanması ve libido gibi birçok fiziksel ve fizyolojik fonksiyondan sorumludur. Testosteron ve DHT aynı intaselüler androjen reseptörlerine bağlanırlar,

ancak DHT'nin afinitesi daha fazladır. DHT, prostat, skrotum ve penis gelişimini stimüle eder. Ayrıca, yüz, koltuk altı ve pubik bölgedeki kıl köklerinin gelişiminden, yağ bezlerinin çalışmasından ve sivilce oluşumundan sorumludur. Testosteron ve DHT erkek üreme sistemi gelişiminin en önemli basamağı olan pubertenin başlamasında da önemli bir role sahiptir (16).



Şekil 2.2. Embriyoda erkek cinsiyet organının oluşumu

Erkek çocuklarda 11-13 yaş arası testislerin büyümeye başlaması puberte başlangıcı olarak kabul edilir. Bu durum, aniden hipotalamustan GnRH salgılanmaya başlaması ve takiben ön hipofizden FSH ve LH salgılarının artması ile başlar. LH, Leydig hücrelerinin testosteron salgılamasını, böylelikle skrotum ve peniste büyüme ve pigmentasyonun başlamasını indükler. Daha sonra bu süreci, ikincil cinsiyet karakteristiği olarak adlandırılan yüz, koltuk altı, göğüs ve pubik bölgedeki kılların büyümesi, ses kalınlaşması ve büyüme atakları izler. Bu sırada, sistemin üreme fonksiyonlarının olgunlaştığını gösteren ilk fertil ejakülasyon gerçekleşir. Bunu takiben ise pubertenin bittiği ile epifiz plakları kapanır. Pubertal gelişim erkeklerde 20'li yaşlara kadar devam edebilmektedir.

Cinsiyet farklılaşması, ikincil cinsiyet karakteristiklerinin oluşması ve sperm üretiminin başarılı olarak gerçekleşmesi HPG ekseninin çalışmasına bağlıdır. Bu eksen, erkeklerde spermatogenez ve cinsel fonksiyonların ömür boyu devam etmesini sağlamaktadır. Hipotalamus, ön hipofizi uyarmak amacıyla hipotalamo-hipofiz portal sisteme GnRH salgısını gerçekleştirir. GnRH, hipotalamik nöronlar tarafından aralıklı olarak salgılanan bir peptid hormondur. FSH ve LH salınımını gerçekleştirmek için, ön hipofizdeki gonadotrop adı verilen bazofilik hücreleri uyarır. Bu uyarı,

gonadotroflar üzerinde bulunan ve hücre içi kalsiyum seviyelerini artıran inositol 1,4,5-trifosfat aktivasyonunu stimüle eden bir G protein reseptörüne bağlanarak başlatılır. GnRh salgısı testosteron, estrojen, estradiol ve prolaktin ile inhibe edilir (13). LH ve FSH kana salındıktan sonra, Leydig ve Sertoli hücrelerinin membranında bulunan G protein reseptörlerine bağlanır, böylelikle adenilat siklazları aktive ederek ve hücre içi cAMP düzeylerini yükselterek Leydig ve Sertoli hücrelerinin uyarılmasını sağlar. Her iki hormon da aynı glikoprotein ailesinden gelir ve aynı alfa alt birimlerine sahiptir. Farklı etkinlik göstermeleri beta alt birimlerindeki karakteristik farklılıklarından kaynaklanmaktadır. LH, Leydig hücrelerinde kolesterolün pregnonolone dönüşümünü gerçekleştiren desmolaz enzimini aktive eder. Bu dönüşüm sonunda, dihidroepiandrosteron (DHEA) ve androstenedion adında çok önemli iki zayıf androjen üretilir. 17- β -hidroksisteroid dehidrojenaz ise androstenedionun testosterona dönüşümünü tamamlar. Testosteron, hipotalamus ve ön hipofizi negatif geri besleme yoluyla uyararak LH ve FSH salgısını azaltır. FSH, Sertoli hücrelerinden androjen bağlayıcı protein salgılatarak spermatogenez sırasında germ hücrelerine gerekli olan testosteronun ulaşmasını sağlar. Ayrıca, Sertoli hücrelerinin sperm üretimini başlatması için uyarılması ile inhibin B ve AMH salgısı da FSH tarafından indüklenir. İnhibin B, HPG eksenindeki negatif geri besleme mekanizmasını uyararak FSH salgısını azaltmaktan sorumludur (17).

Puberteden önce, androjen ve gonadotropinlerin seviyeleri değişmez ve düşüktür. Puberte başladığında, her bir veya iki saatte bir GnRH salgılanarak, FSH, LH ve plazma testosteron seviyelerini ve hormonal dengeyi düzenler. Yetişkinlik dönemi sonrasında ise testosteron seviyeleri düşmeye başlar (13, 16, 18).

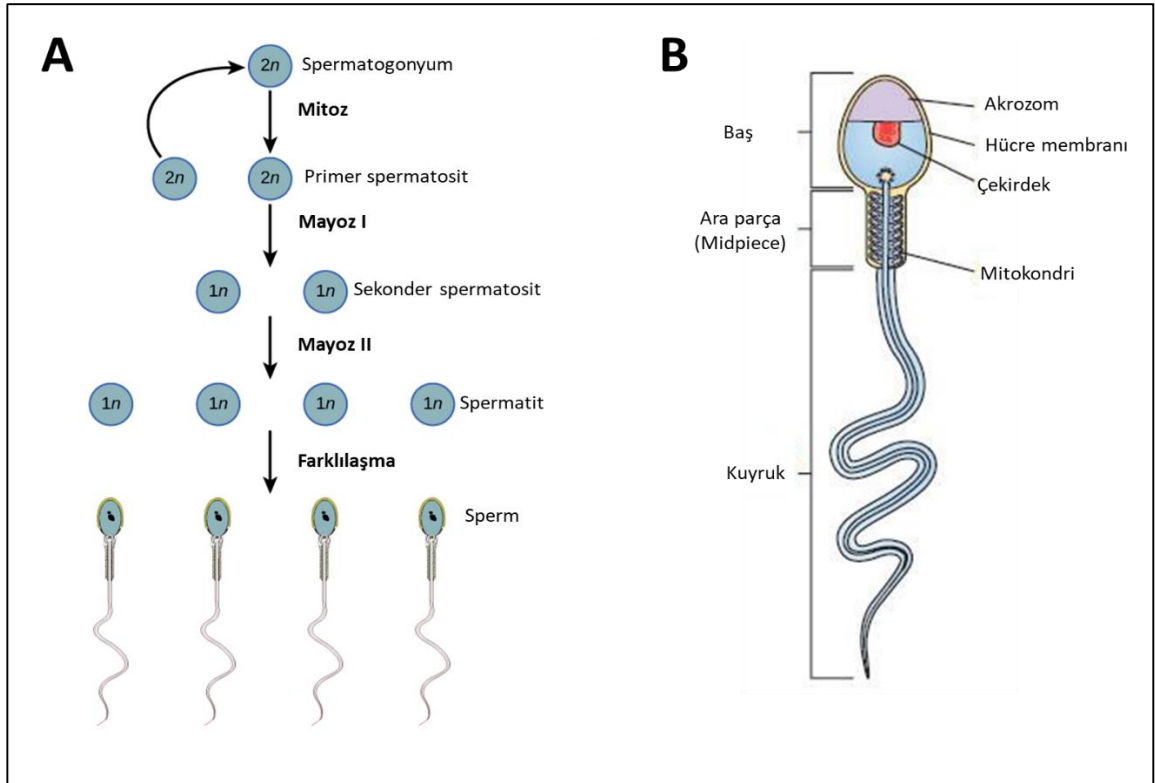
Testosteron salgısının büyük bir kısmı Leydig hücrelerinden gerçekleşiyor olsa da, adrenal korteks de androjen üretimine az da olsa katkı sağlar. HPG eksenine benzer olarak adrenal korteks de hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen tarafından kontrol edilir. Hipotalamus kortikotropin salıverici hormon salgılayarak ön hipofizde adronekortikotropik hormon üretimini sağlar. ACTH ise tıpkı testislerde olduğu gibi kolesterolün pergnonolona ve takiben testosterona dönüştürülmesi için desmolaz stimülasyonu gerçekleştirir. Özellikle adrenal meduladaki zona retikularis, DHEA ve

androstenedion salgısından sorumludur, bu androjenler ise daha sonra periferde estrojen veya testosteronu dönüştürülür (13).

Spermatogenez, puberte ile birlikte germ hücrelerinin olgunlaşması ile başlar. İnsanda bir spermatogenez döngüsü yaklaşık 13 gün sürer, ancak tüm seminifer tübüllerde eş zamanlı olarak gerçekleşmeyebilir. Spermatogenezin aşamaları Şekil 2.3.A'da gösterilmiştir. Spermatogenezin ilk basamağı, diploit spermatogoniaların mitoz bölünerek primer spermatositlere dönüşmesi ile başlar. En ilkel spermatositler seminifer tübüllerin periferindedir ve lümeneye doğru hareket ettikçe olgunlaşır. Bu hareket sırasında spermatositler mayoz bölünerek, haploid sekonder spermatositleri ve daha sonra haploid spermatitleri oluşturur. Spermatitler ise sitoplazmalarının bir kısmını kaybederek spermatozoaya dönüşür. Spermatozalar, hareketsizdir ve olgunlaşmanın gerçekleşeceği epididimise ulaşması için tübüllere salgılanır. Epididimis, baş, gövde ve kuyruk yapısından oluşmuş kıvrımlı bir yapıdır. Kuyruk kısmı vas deferens ile birleşir ve olgun sperme dönüşmenin son basamağı da tamamlanır. Epididimiste spermin olgunlaşması ve hareket kabiliyeti kazanması yaklaşık on iki gün sürer. Olgunlaşmış bu spermler ejakülasyona kadar epididimisin kuyruk kısmında depolanır (Şekil 2.3.B). Olgun bir sperm baş, ara parça (midpiece) ve kuyruktan oluşur. Baş kısmında çok az sitoplazmaya sahip bir çekirdek bulunur. İçi lizozomlar ile dolu bir akrozom yapısı bu bölgeyi korur ve bu yapı fertilizasyondan sorumludur. Ara parça, flagellum veya kuyruk için gerekli olan enerjiyi sağlamak amacıyla yüksek miktarda mitokondri içerir.

Seksüel stimülasyon, vazodilatasyona sebep olarak penise kan akımının artmasını sağlar. Kan akımı, *corpora cavernosa* ve *corpus spongiosum* boyunca ilerleyerek penisin büyümesini ve ereksiyonun gerçekleşmesini sağlar. Stimülasyonun devam etmesi ise, genital kan akımının artmasına ve ejakülasyona hazırlık için testislerin genişlemesine sebep olur. Ejakülasyon gerçekleştiğinde, epididimisteki düz kaslar kasılarak spermatik kordda bulunan spermleri vas deferense (ductus deferens) iletir. Ductus deferens, prostat yakınındaki seminal vezikül ile birleşerek, spermi ejakülasyon kanalına iletir. Seminal vezikül sperm motilitesi için gereken enerjiyi sağlayabilmek için fruktoz üretir ve fruktoz ile spermden oluşan, semen adı verilen sıvı karışım oluşur. Semen, ejakülasyon kanalından prostata doğru geçtiğinde,

spermlerin dişi üreme kanalında uzun süre canlı kalmasını sağlamak amacıyla, prostat tarafından alkali bir sıvı salgılanarak semen sıvısı yoğunlaştırılır. Bu sırada bulbosretral bezler ya da Cowper bezleri yoğun bir sıvı salgılayarak üretral kanalın kayganlaşmasını ve üretrada olabilecek idrar artıklarının temizlenmesini sağlar. Daha sonra semen üretral kanaldan geçerek, olgunlaşmış olan yumurtayı dölemek amacıyla dişi üreme sistemi içerisinde hareket eder (13, 17, 19).



Şekil 2.3. Sperm yapısı

A. Spermatogenezin aşamaları B. Olgun bir sperm yapısı

Erkek üreme sisteminin işlev ve fonksiyonlarının belirlenmesi için genel olarak kan testosteron seviyeleri ölçülür. Kandaki testosteronun büyük kısmı plazma proteinlerine özellikle de cinsiyet hormonu bağlayıcı globülinlere bağlı olarak bulunur ve bu proteinler depo olarak görev yaparlar. Bir kısım testosteron ise taşıma görevinden sorumlu olan albümine bağlı olarak bulunur. Testosteronun çok küçük bir kısmı plazmada serbest olarak sirküle olur (normal aralık 50-120 pg/ml). Total testosteron ise 300-1000 ng/ml seviyesinde normal kabul edilir (20).

Fertilite durumu ile seminifer tübüller, epididimis ve aksesuar cinsiyet bezlerinin fonksiyonlarının anlaşılabilmesi için semen analizi yapılmaktadır (21). Semen analizi için, sperm örneği alınarak mikroskop ile sayısı, motilitesi ve morfolojisi incelenir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre normal semen karakteristiği için belirlenen referans limitler Tablo 2.1.'de gösterilmiştir. Semen analizi infertilite veya vazektomi sonrası durumun değerlendirilmesi için de oldukça kolay bir yöntemdir. Normal sperm sayısı 15 milyon/ml dir ve sağlıklı bir erkekte bu spermelerin motilitesinin %40 ve üzerinde olması beklenir. Semen analizi sonunda ortaya çıkabilecek sperm anomalilerine ait terimler ise Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre sperm parametrelerine ait minimum referans değerleri

Parametre	Minimum Referans Değer
Semen hacmi	1,5 ml (1,4-1,7)
Sperm sayısı (10 ⁶ /ejakülasyon)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	15 (12-16)
Total motilite (PR + NP, %)	40 (38-42)
PR (%)	32 (31-34)
Canlılık (Canlı spermatozoa yüzdesi)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal form yüzdesi)	4 (3,0-5,0)

PR: Progresif motilite. Hızdan bağımsız olarak doğrusal veya geniş bir daire içinde aktif olarak hareket eden spermatozoa sayısıdır. NP: Non-progresif motilite. İleriye doğru hareketin olmadığı tüm diğer hareketlilik tipleridir.

Hormon düzeylerinin tayini ve semen analizi dışında, erkeklerde prostat kanseri teşhisi için kullanılan kanda prostat spesifik antijen (PSA) testi kullanılmaktadır. Normalde prostat bezinde PSA üretilir. Ancak prostat kanseri

durumunda seviyeleri artmaktadır (22). Yaş sınırı ülkelere göre değişmekle birlikte, genellikle 50 yaş ve üzeri erkeklerin bu testi düzenli olarak yaptırması önerilmekte ve 4 ng/ml üzerindeki değerler prostat kanseri varlığını gösterdiği için bu seviyelerin üzerindeki değerler için prostat biyopsisi tavsiye edilmektedir. Ayrıca rektal muayene ile idrara çıkmakta zorlanan ve yaşlı erkeklerde prostat bezinin büyümesine sebep olan hiperplazi gibi durumların da teşhisini koymak mümkündür.

Tablo 2.2. Sperm anomalilerinin tanımları

Aspermi	Semen ya da ejakülat üretilmemesi
Astenospermi	Sperm sayısının azalması
Astenoteratospermi	Progresif motilitesi olan ve normal morfolojiye sahip sperm sayısının azalması
Azospermi	Ejakülat içinde hiç sperm bulunmaması
Hemospermi	Ejakülat içinde eritrosit görülmesi
Lökospermi (piyospermi)	Ejakülat içinde lökosit görülmesi
Nekrospermi	Canlı sperm sayısının azalması ve hareketsiz (immotil) sperm sayısının artması
Oligospermi	Progresif motilitesi olan sperm sayısının azalması

2.2. Erkek Üreme Sistemi Bozuklukları

Dünya çapında çiftlerin yaklaşık %12'si infertilite problemi ile uğraşırken, erkeklere bağlı etmenler bu vakaların yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır (23). Hastaların büyük bir kısmında anormal sperm üretimi görülmekle beraber, bu duruma sebep olan etmenlerin kesin olarak belirlenememiş olması sebebiyle erkek üreme sistemi bozuklukları önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Günümüze dek birçok

çalışma, malignite, otoimmün hastalıklar ve/veya genetik bozukluklar gibi sistemik hastalıkların erkek infertilitesine sebep olabileceğini göstermiştir (24-26). Erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiş bazı bozukluklar şöyle sıralanabilir:

- HPG homeostazında meydana gelen bozukluklar sebebiyle hipogonadizm, geç puberte, hormon bozuklukları
- Testislerde gözlenen konjenital anomaliler, genetik bozukluklar sebebiyle klinefelter sendromu veya diğer kromozom anomalileri, testis kanseri
- Seminal kanal ve/veya aksesuar bezlerde meydana gelen immün reaksiyonlar, enfeksiyonlar
- Hipospadias gibi peniste şekil bozukluğuna sebep olabilecek hastalıklar, erektil disfonksiyon
- Jinekomasti, östrojen eksikliği, östrojen rezistansı, erkek tipi saç dökülmesi (androjenik alopesi) gibi androjenlerin hedef organlarında görülen bozukluklar

Erkek infertilitesinde, neden-sonuç ilişkisi kurmak oldukça zor olsa da, yapılan çalışmalar genetik nedenlerin yanında, kimyasal madde maruziyetinin de infertilitede önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (27, 28). Ayrıca, oksidatif stresin de patogeneizde önemli bir rol aldığı bilinmekle birlikte, bu durumun meydana gelen bozukluğun sebebi mi yoksa sonucu mu olduğu anlaşılamamıştır. Erkek üreme sisteminin oluştuğu ve geliştiği prenatal dönemde endokrin bozucu özellikleri olan kimyasallara maruziyetin erkek üreme sisteminde sperm motilite ve morfolojisi, testis histolojisi, hormon dengeleri ve antioksidan savunma sistemi üzerinde değişiklikler yapabileceği gösterilmiştir (29, 30). Son yıllarda, bu tip kimyasal maddelere maruziyetin etkilerinin epigenetik değişikliklere sebep olabileceği ve bir sonraki nesillere aktarılabilmesine dair veriler de elde edilmiştir (31-34).

2.3. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik, DNA sekansındaki değişikliklerden kaynaklanmayan, ancak kromatinde meydana gelen modifikasyonlar sebebiyle gen ekspresyonu ve gen stabilitesinin değişmesi ile sonuçlanan olayları inceleyen bilim dalıdır. Diğer bir deyişle epigenetik, genotipik bir değişim olmaksızın fenotipte meydana gelen değişimleri tanımlamaktadır. Nükleotid sekansında hiçbir değişim olmaksızın DNA üzerinde veya DNA ile yakından ilişkili olan histonlar üzerinde meydana gelebilecek tüm moleküler değişimler epigenetik modifikasyon olarak kabul edilir. Epigenetik modifikasyonlar, bir genin çalışmasını ve susturulmasını sağlayabilmekte veya hangi genin transkripsiyonunun yapılacağını belirleyebilmektedir. Örneğin, deri hücresi ile karaciğer, beyin, akciğer veya kas hücrelerinin aynı genomu taşıyor olmalarına rağmen birbirlerinden oldukça farklı metabolizmalara ve fenotipe sahip olmaları, tamamen epigenetik modifikasyonlar aracılığıyla aynı genin farklı şekillerde transkripte edilmesinden (bazı genlerin susturulup bazılarının çalıştırılması) kaynaklanmaktadır. DNA metilasyonu aracılı epigenetik susturma (*silencing*), genleri susturmak için kullanılan bir yoldur ve bu şekilde transkripsiyon farklılıkları ortaya çıkar. Bu susturma mekanizması, tek yumurta ikizlerinin aynı genomu taşıyor olmasına rağmen neden aynı fenotipe sahip olmadıklarını da açıklamaktadır (35, 36). Epigenetik değişimlerin büyük bir kısmı, sperm ve yumurta hücrelerinde gerçekleşir. Döllenme sırasında genler üzerindeki tüm epigenetik değişimler (metillenmiş veya asetillenmiş bölgeler) kaldırılır. Bu olaya “reprogramming” yani yeniden programlama denir. Yeniden programlama, döllenmiş hücrenin “sıfırdan” başlayarak kendi epigenetik değişimlerini oluşturmasına olanak sağlar (37, 38). Ancak, bazen sperm veya yumurta hücresindeki bazı epigenetik modifikasyonlar bu yeniden programlama sürecinden kaçabilir ve bir sonraki jenerasyona aktarılabilir (39). Epigenetik izlerin (örneğin DNA metilasyonu, histon asetilasyonu v.b.) kromatinde meydana gelip, stabil bir şekilde gamet aracılığı ile aktarılabilmesi durumuna ise nesiller arası epigenetik aktarım denir.

Epigenetik mekanizmaların amacı, DNA ve/veya histonlar üzerinde geri dönüşlü modifikasyonlar oluşturarak gen ekspresyonunu düzenlemektir (39). Önemli fizyolojik olayların ve hücre içinde bazı önemli moleküler/biyokimyasal olayların, gerçekleşmesi söz konusu olduğunda, genomun paketlenmesi ve genin yorumlanması

için bu modifikasyonlar hayati rol oynar. Metabolizmada en çok gözlenen epigenetik modifikasyonlar ise DNA metilasyonu ve histon modifikasyonudur (40).

2.4. DNA Metilasyonu

Memelilerde transkripsiyon, CG sekansı açısından oldukça zengin bölgeler olan promoter bölgelerde başlar. Sitozinin hemen arkasından guaninin geldiği ve bu iki bazın fosfat ile birbirine bağlandığı bu sekanslara CpG bölgesi adı verilir. DNA üzerindeki CpG açısından zengin olan bu bölgelere ise CpG adası denmektedir (38).

DNA metilasyonu, bir metil (-CH₃) grubunun DNA bazlarına kovalent bağlanmasıdır. Metilasyon reaksiyonları nadiren diğer bazlar üzerinde görülse de, sitozinin 5. karbonuna (5-mC) bağlanarak gerçekleşmektedir ve DNA metilasyonu denildiğinde aslında 5-mC kastedilmektedir (41). Bu metillenme reaksiyonları yoğunlukla ilgili genin promoter bölgesinde bulunan CpG adalarında gerçekleşir ve böylelikle ilgili gen susturulur.

Metilasyon reaksiyonu, DNA metil transferaz (DNMT) enzim ailesinin S-adenozilmetiyonin (SAM)'den aldıkları bir metil grubunu DNA'daki sitozinin 5. karbonuna transfer etmesi ile gerçekleşir. Bu ailede DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3C ve kofaktör DNMT3L olmak üzere 5 enzim vardır. Bu enzimler aktif olarak metilasyonun devamlılığını, de novo metilasyonu (yeniden programlama) ve hücrenin retrotranspozon¹ aktiviteden korunmasını sağlarlar (42).

DNMT1, DNMT ailesinin ana enzimidir. Yarı metillenmiş DNA'nın karşı zincirinin de metillenmesi sonucu iki zincirin de tam olarak metillenmesini ve böylelikle replikasyon sırasında da DNA metilasyon profilinin devam etmesini sağlar. DNMT3A ve DNMT3B yeni CpG bölgelerinin metillenmesinde görev aldıkları için, temel olarak de novo metilasyondan sorumludur (43). DNMT3C, erkek germ hücrelerinde oluşan yeni retrotranspozonların promoter bölgelerinin metillenerek

¹ Sınıf I yer değiştiren element (Class I transposable element) olarak da bilinir. DNA'dan RNA sentezi sırasında reverstranskriptaz enzimi, oluşan RNA'dan tekrar DNA sentezler. Asıl DNA'da bulunan bir bölgenin birebir kopyası olan bu parça, DNA'nın farklı bölgelerine yeniden eklenebilir. Bu birbirinin tekrarı olan parçalara retrotranspozon denir. DNA metilasyonu ile retrotranspozonlardaki genler susturularak aktive olmaları engellenir.

susturulmasından sorumludur. Özellikle erkek farelerde bu işlem üremenin gerçekleşmesi için gereklidir (44). DNMT3L ise oositlerde anneden gelen kalıtsal özelliklerin korunmasından ve erkeklerde spermatogenez sırasında eksprese edilir ve sperm üretiminin gerçekleşmesinden sorumludur (44). DNMT2 bu ailede bulunan bir diğer üye olarak, DNA metilasyonu yapamaz, embriyonik kök hücrelerde RNA metilasyonundan sorumludur (45). DNMT ailesindeki enzimlere ek olarak MeCP2, MBD1, MBD2 ve MBD4 gibi metil bağlanma bölgeleri içeren enzimler, metillenmiş DNA üzerinde bağlı kalarak, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engeller ve böylelikle gen susturulmuş olur (46).

DNA demetilasyonu sırasında metil sitozinin sitozine dönüştürülmesi hem aktif hem de pasif bir süreçtir. Aktif demetilasyon, replikasyondan bağımsız olarak gerçekleşir ve on-on bir translokasyon (TET - ten-eleven translocation) enzim ailesi (TET1, TET2 ve TET3) bu süreçte görev alır. TET'lerin 5-mC bölgelerinin hidroksilasyonunu aktive etmesini takiben sitidin deaminasyonu gerçekleşir. Deaminasyon sonucunda DNA kırılması ve onarımında yer alan mekanizmalar aktive olarak demetilasyon işlemi tamamlanır. Pasif demetilasyon ise replikasyona bağımlı olarak ve metilasyonun devam ettiremediği durumlarda gerçekleşir. Metil donörü olan SAM eksikliği, mutasyon sonucu DNMT1 fonksiyon kaybı veya Ca^{+2} 'nin çok fazla olduğu in vitro koşullarda DNMT'lerin demetilasyon yapmaya başlaması gibi durumlar, metilasyon profilinin korunmasını engelleyen durumlardır (47, 48). Bunun dışında, promoter bölgelerin hipermetilasyonu sebebiyle gen susturulduğunda da demetilasyon reaksiyonları başlayarak gen ekspresyonunun tekrar başlaması sağlanır (49).

2.5. Histon Modifikasyonu

Histonlar, DNA'yı sararak kromatin oluşturan yapılardır. Etrafına DNA sarılmış histonlara nükleozom ya da histon oktameri denir. Nükleozomların dış yüzeyindeki N terminalinde pozitif yüklü aminoasitler bulunur. 15-38 amino asitten oluşan bu yapıya histon kuyruğu adı verilir. Her bir nükleozom H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının her birinden ikişer tane bulundurur ve bir oktamer yapısında 147 DNA baz çifti 1.7 kere katlanır (50). Bu dört ana histonun N-terminal kuyruklarındaki

aminoasitler, enzim ile katalizlenen post-translasyonel modifikasyonlara tabi tutularak gen ekspresyonu ve DNA-histon etkileşimlerini düzenler (51). Bu modifikasyonlar; metilasyon, fosforilasyon, asetilasyon, deaminasyon, ADP ribozilasyonu, kuyruk kesimi, prolin izomerizasyonu, übikitinasyon ve sümüoylasyondur. Bir çok türde, histon H3 asetilasyonu lizin (K) 9, 14, 18, 23 ve 56; metilasyon arjinin (R) 2 ve K 4, 9, 27, 36 ve 79; fosforilasyon serin (S) 10, 28, treonin (T) 3 ve 11 konumlarında meydana gelir. H4'te ise asetilasyon K 5, 8, 12 ve 16; metilasyon R3 ve K 20; fosforilasyon S 1'de oluşmaktadır (52).

Histon modifikasyonları, kromatin yapısının oluşmasında, dolayısıyla gen ekspresyonu, DNA replikasyonu, rekombinasyon, onarım ve genom stabilitesinin düzenlenmesinde, heterokromatin (sıkıştırılmış) ve ökromatin (açık) formlarının oluşturulmasında oldukça önemli rol oynamaktadır (53). Ökromatin durumunda, H3K4, H3K36, H3K79 trimetilasyonu ve H3K9 asetilasyonu da dahil olmak üzere hiperasetilasyon gerçekleşir. Tam tersine heterokromatin durumunda asetilasyon seviyeleri oldukça düşüktür ve H3K9, H3K27 ve H4K20 metilasyonu gözlemlenir (54). Histon modifikasyonları, yazıcı (writer) ve silici (eraser) adı verilen düzenleyici enzimler ile yapıya eklenir ya da çıkartılır. Bu enzimler, belirli grupları içeren spesifik aminoasitleri bölgeye özel olarak tanıyarak transkripsiyonun düzenler.

Histon modifikasyonları, elektrostatik yükü değiştirerek kromatin yapısının düzenlenmesi ve böylelikle oluşan süstitüe grubun farklı adaptör proteinler tarafından tanınmasını sağlar (55). Başka bir deyişle, histon modifikasyonları, transkripsiyon faktörlerinin promoter bölgelere erişimini ve DNA ile oktamer arasındaki etkileşimleri düzenler (53). Bu sebeple, farklı histon modifikasyonlarının kantitatif olarak ölçülmesi, patofizyolojik durumlardaki epigenetik düzenlemeler hakkında önemli bilgilerin elde edilmesini sağlayabilir ve histon düzenleyici enzimleri hedefleyen tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir (56).

2.6. Sperm Hücrelerinin Gelişiminin Epigenetik Düzenlenmesi

Üreme hücrelerinin embriyo oluşturmak için gamete dönüşmesi (gametogenez) ve bu gametlerin birleşmesi (döllenme), gen üzerinde çok ciddi değişimler ve bunlara

bağlı olarak gerçekleşen hücre farklılaşması süreçlerini içerir. Tüm bu farklılaşmanın epigenetik mekanizmalar ile kontrol edildiği bilinmektedir (57). Normal hücrelerde epigenetik değişimler geri dönüşümlü olarak gerçekleşir ve gerektiğinde gen aktivitesini değiştirmeye izin verir. Üreme hücrelerinde bu değişimler sıklıkla gözlenir. Böylelikle sperm ve yumurtadaki epigenetik bilgi yeniden düzenlenerek, meydana gelen yavruların embriyonik veya postnatal dönemde nasıl gelişeceği belirlenir (58).

Gamet oluşumunda en önemli basamak mayoz bölünmedir. Bu aşamada homolog kromozomların eşleşmesi, yeniden birleşmesi ve kromatinlerin eşleşmeyen bölgelerinde mayotik susturma işleminin yapılması histon modifikasyonları ile kontrol edilir. Memelilerde sperm ve yumurta hücrelerindeki genler farklı şekillerde işaretlenir ve genomik baskılanma gerçekleşir (59). Gelişim sırasında üreme hücrelerinin epigenetik profili sürekli değişir ve bu da zigotun embriyoya dönüşümünü sağlar (60). Bu yeniden programlama süreci, embriyoda ebeveyne özgü epigenetik bilgilerin birleştirilebilmesini ve cinsiyet gelişimini sağlamaktadır (61). Ancak, epigenetik programlama süreci dış etkenler ile etkileşmeye oldukça açıktır. Dolayısıyla, özellikle üreme hücrelerinde dış etmenlere maruziyet sonucu epigenetik durumda meydana gelen değişimler bir sonraki jenerasyona aktarılabilir, gelişimi olumsuz yönde etkileyebilir ve hastalıkların gelişmesinde rol oynayabilir (62).

Spermatogenez sırasında, sperm başında bulunan DNA sıkıştırılmış olarak bulunur ve aktif olmayan bir heterokromatin oluşturmak için kapsamlı bir yeniden modelleme sürecinden geçer. Spermatid genomu, histonların astillenmesi ile gevşemeye ve topoizomerazlar yardımıyla DNA heliks yapısı açılmaya başlar. Hemen ardından transizyon proteinleri (TNP1 ve TNP2) ve sonrasında protaminler DNA'ya bağlanır. Spermatogenez sona erdiğinde sperm genomundaki protamin heterokromatinleri histon heterokromatinlerinden 6-20 kat daha sıkı oluşur. Bu sebeple sperm DNA'sı transkripsiyon açısından inaktiftir ve böylelikle nükleaz saldırısına ya da radyasyon veya toksik kimyasallar gibi etmenlere karşı daha dayanıklı hale gelir (63).

Spermatogenezin her aşamasında çok fazla sayıda epigenetik regülasyon meydana gelmektedir. Bu aşamada herhangi bir müdahale erkek inferitilitesine kadar varabilecek ciddi problemlere neden olabilir. Spermatid çekirdeğindeki DNA paketlenmesi dışında, spermatogenezin neredeyse her basamağında epigenetik düzenlemeler yapılır ve bu düzenlemeler kromozom yapısı, XY cinsiyet kromozomunun oluşumu ve retrotranspozonların susturulması gibi bir çok proses ile yakından ilişkilidir (64). Retrotranspozonlar insan DNA'sının yaklaşık %45'ini oluşturur. Bu bölgeler DNMT3L ile metilasyona tabi tutulmazsa, mutajenik etkiler ortaya çıkabilir ve kromozom kırılması, yanlış eşleşme ve genomun yeniden düzenlenmesi gibi problemler meydana gelebilir (65). Ayrıca, spermiler mayoz sırasında sadece monoallel ekspresyon yapabilir. Paternal genler metilasyon ile susturulur ve sadece maternal genler eksprese edilebilir. Bu da gen aktarımının epigenetik bir fenomen olduğunun kanıtıdır (66).

Yapılan gen susturma çalışmalarında, cinsiyet spesifik genlerin sperm oluşumu sırasında farklı şekillerde eksprese edildiği ve bu işlemlerde DNA metiltransferazlar, histon modifiye edici enzimler ve düzenleyici enzimler gibi bir çok epigenetik düzenleyicinin aktif olarak rol aldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, spermilerdeki DNA metilasyon profillerinin, kişiler arasında olduğu kadar aynı kişiye ait spermilerde de farklılık gösterdiği, böylece bir sonraki jenerasyonu birbirinden tamamen ayıracak fenotipik karakterin ortaya çıkmasını sağladığı anlaşılmıştır (60).

Spermilerdeki epigenetik düzenlemeler majör olarak DNA metilasyonu ile yapılır. DNA metilasyon hatalarının, ICF sendromu, RETT sendromu, X ile bağlantılı dominant veya non-spesifik mental retardasyon ve alfa talasemi gibi genetik hastalıklar ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (40). Epigenetik değişimlere bağlı bu hastalıklar, gen hataları (örneğin LIT1, H19, IGF2, UBE3A), delesyonlar (15q-13) veya uniparental disomi oluşması ile ilişkili olabilir. Farelerde yapılan gen susturma çalışmalarında Peg3 ve Peg1 geninin anormal maternal davranış bozukluğu, Grfl ve Gabrb3 genlerinin hafıza kaybı ve Ube3a geninin ise nöbet ve motor fonksiyon bozuklukları ile ilgili olduğu anlaşılmıştır (67).

Sperm farklılaşması sırasında tüm genom büyük bir farklılaşma sürecine girer ve bu da tüm nükleer yapının ve epigenetik bilginin değişmesine sebep olur (66). Dolayısıyla, sperm fonksiyonları için hayati önem taşıyan protaminler (P1 ve P2) görevlerini yerine getiremez ve haplo-yetersizlik² sebebiyle ilgili protein sentezinin yeterli miktarda gerçekleşmemesine neden olur. Fertil erkeklerde P1/P2 oranı 1.0'a yakın (0.8-1.2) kabul edilmektedir. Bu oranın azalması ya da artması düşük semen kalitesi, artmış DNA hasarı ve infertilitenin en önemli göstergesidir (68).

2.7. DNA Metilasyonu ve Erkek İnfertilitesi

Erkek infertilitesine sebep olabilen DNA metilasyonu, ekspresyonu yapılan ve yapılmayan tüm genler dahil olmak üzere sperm genomunun neredeyse her yerinde meydana gelebilmektedir (69). Spermatogenezin bozulmasının, DNA metilasyon profillerinin değişiminden kaynaklı gen ekspresyonundaki bozulmalar sebebiyle meydana gelebileceği bildirilmiştir (70). Metilentetrahidrofolat redüktaz (Mthfr)'nin promoter bölgesinde DNA metilasyonunun, IGF2-H19 geninin eksprese edilen bölgelerinde meydana gelen hipometilasyonun, mezoderm spesifik transkript (Mest), protein Lit-1 (Lit1), küçük nükleer ribonükleoprotein N (Snrpn), paternal ekspresyon 3 (Peg3) ve ADP-ribozilasyon faktörü GTPaz aktive edici protein AGD12(Zac) genlerinde oluşan hipermetilasyonun, ayrıca H-Ras, 3' nükleotidaz (Nt3), metalotiyonin 1A (Mt1a), paired box-8 (Pax8), GTP'ye bağlanan RAS benzeri protein 3 (Diras3), pleomorfik adenom geni benzeri 1 (Plagl1), stratifin (Sfn) ve spermidin/spermin N1-asetiltransferaz 2 (Sat2chrn1) gibi ekspresyonu yapılan ya da yapılmayan genlerdeki DNA metilasyon değişimlerinin infertilite ile ilişkili olduğu bilinmektedir (71). Ayrıca erkek infertil fenotipin ortaya çıkmasında sadece paternal değil, maternal gen metilasyon bozukluklarının da rol aldığı belirlenmiştir. Özellikle H19 geninin az ya da hiç metilasyona uğramaması ve buna eşlik eden Mest hipermetilasyonunun oligospermik fenotip oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (72, 73). Erkek infertilitesinde gözlenen bu bozulmuş DNA metilasyon profilleri, spermatogonyumda de-novo metilasyonun başarısız olması veya spermatositlerde

² Diploid organizmalarda, allellerin birindeki genin mutasyonu veya kaybı sebebiyle susturulması ve karşı alleldeki aynı fonksiyonu sağlayan genin ürettiği protein miktarının normal fenotip için yeterli miktarlara ulaşamaması sonucu, anormal fenotipin ortaya çıkması durumudur. Özellikle insanlarda otozomal dominant bozukluklar bu şekilde ortaya çıkmaktadır.

metilasyon profilinin korunamaması şeklinde gözlenebilir. Buna ek olarak, bozulmuş DNMT aktivasyonu da anormal DNA metilasyonu ile sonuçlanabilir (64).

Oligoastenoteratospermi ve oligospermi fenotipleri çoğunlukla DNA metilasyonuna bağlı gen ekspresyon bozuklukları sebebiyle ortaya çıkmaktadır (74). Bununla birlikte, yapılan bir çalışmada fertil ve infertil erkeklerde sperm DNA metilasyon profillerinin anlamlı ve tutarlı şekilde farklı olduğu belirlenmiştir (75). Ayrıca, bu çalışmada in vitro fertilizasyon sırasında oluşan embriyoların kalitesinin sperm DNA'sı tarafından belirlendiği, buna bağlı olarak normospermik erkeklerde sperm DNA metilasyonlarına bakılarak embriyo kalitesinin tahmin edilebileceği de bildirilmiştir. Dolayısıyla, sperm oluşumu ve olgunlaşmasında epigenetik modifikasyonların rolü göz önüne alındığında, infertil erkeklerin epigenetik profillerindeki bazı bozukluklar, infertilite tedavisi sırasında gözlenen beklenmedik komplikasyonların sebebi olarak düşünülebilir (72).

2.8. Histon Modifikasyonları ve Erkek İnfertilitesi

Post translasyonel histon modifikasyonları hücre fonksiyonlarının devamlılığında aktif rol oynar. Histon kuyruğunun N terminalindeki aminoasit miktarı, metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, übikitinasyon ve sümoylasyon ile belirlenir. Bu modifikasyonlar sonucu ortaya çıkan histon kodu, gen ekspresyonunun aktivasyonu veya inhibisyonundan sorumludur. Bu nedenle hatalı histon modifikasyonları erkek infertilitesinde çok önemli rol oynar (53).

Transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya yapışabilmesi için, kromatinin sıkı yapısının çözülmesi gerekir ve bu da histon asetilasyonu ile gerçekleşir. Aynı şekilde deasetilasyon sonucu ise gen susturulmuş olur (76). Testis spesifik bromodomain (Brdt) histon kuyruğunun N-terminalindeki asetillenmiş lizinleri tanıyarak sağlıklı ya da hastalıklı fenotipin ortaya çıkmasını sağlar. H3K9 asetilasyonu ve H3K27 trimetilasyonundaki değişimler Brdt ekspresyonunu azaltır ve böylelikle sağlıklı sperm oluşumu engellenir (77). H3K9'da demetilasyon gerçekleşmemesi, TNP1 ve P1 ekspresyonlarını azaltır. Böylelikle sperm üretimi sırasında histonlar tam olarak yerleşemez ve DNA hasarı gerçekleşir (78). Spermatidlerde H4 asetilasyonunda

azalma ise anormal spermatogenez ve infertilite ile sonuçlanır (79). Ayrıca spermatogenez sırasında önemli genlerin özellikle H4K12ac histonunda asetilasyonunun bozulması ise sperm kromatinlerinin yapısını bozarak bu bozukluğun zigotta da devam etmesine, böylelikle bir sonraki jenerasyona aktarılmasında neden olmaktadır (80).

Yapılan çalışmalarda bir histon asetilasyon inhibitörü olan triklorstanın spermatid sayısını anlamlı şekilde azalttığı ve ciddi erkek infertilite problemlerine sebep olduğu anlaşılmıştır (81, 82). Histon metil transferaz veya histon demetilaz H3 ve H4'teki lizinlerin metilasyon ve demetilasyonunu sağlayarak gen aktivasyonu ve susturulmasında önemli görev alır. H3K4 metilasyonu gen ekspresyonunu sağlarken, H3K9 ve H3K27 trimetilasyonu gen susturma ve heterokromatinin oluşmasından sorumludur. Mayoz bölünme sırasında H3K4 metilasyonundan sorumlu olan histon demetilaz enzimi LSD1 (diğer adıyla KDM1) inaktif olduğunda, üreme hücrelerinde apoptoz ve erkek infertilitesinin ortaya çıktığı anlaşılmıştır (78). Mayoz sırasında H3K4, H3K9 ve H3K27'de çok sayıda mono, di ya da trimetilasyon gerçekleşir ancak özellikle H3K9'un mayoz bölünme sonunda mutlaka demetile edilmesi gerekir. Çünkü bu reaksiyon spermiyogenezin başlayabilmesi için kritiktir (64). Farelerde yapılan bir çalışmada, H3K4 metil transferazının aktivitesinin azalması sonucu, spermatosit farklılaşmasını sağlayan döngünün bozulduğu ve aktive olan apoptotik bir mekanizma ile spermatosit sayısının azaldığı belirlenmiştir (83).

JMDA1 geni, testislerde eksprese edilen en önemli epigenetik düzenleyicidir, monometil ve trimetil H3K9'un demetilasyonundan sorumludur. Trimetil H3K9 üzerinde herhangi bir etkinliği yoktur. Transkripsiyonel etkinliğini, histon metilasyonunu azaltıp, histon asetilasyonunu artırarak gösterir. Eksikliği, üreme hücrelerinde apoptoz ve spermatid uzamasının (elongasyon) engellenmesi gibi durumlar ortaya çıkarak infertiliteye sebep olmaktadır. Çünkü bu genin eksikliği sadece metilasyon değil asetilasyon proflini de değiştirmektedir. TNP1, TNP2, P1 ve P2 gibi kromatin kondansasyonu için hayati önem taşıyan genlerin ekspresyonları asetilasyona bağımlıdır ve dolayısıyla JMDA1 eksikliğinde spermatidlerdeki oranları anlamlı derecede azalmaktadır (84).

2.9. Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gamma

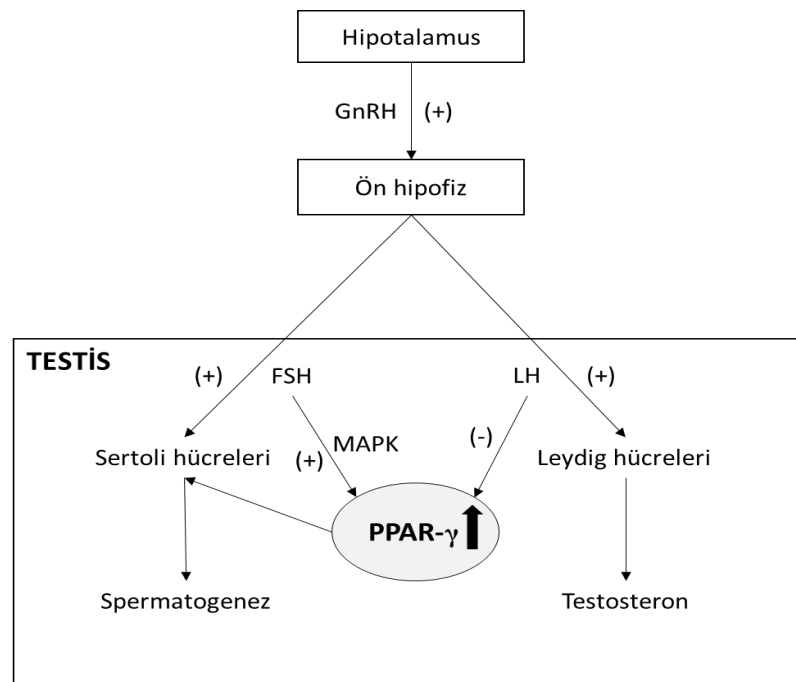
Peroksizom proliferatör aktive reseptör gamma (PPAR- γ), ilk olarak farelerde hepatik peroksizom proliferasyonu yaptığı keşfedildiği için bu şekilde adlandırılmıştır (85). PPAR ailesinde, farklı genler tarafından kodlanan PPAR α , PPAR β/δ ve PPAR- γ olmak üzere üç farklı alt tip bulunur (86). Bu reseptörler lipit metabolizması, inflamasyon, yara iyileşmesi, karsinojenez, adipojenez ve üreme ile ilgili birçok fizyolojik proseste hayati rol oynar (87). PPAR- γ ise özellikle hücre proliferasyonu, farklılaşması, morfojenez ve hücre içi metabolik faaliyetlerin düzenlenmesinden sorumludur. PPAR- γ 'nın lipojenik genleri aktive ederek adiposit farklılaşmasını düzenlediği düşünülmektedir. Adipoz dokuda çok fazla bulunduğu ve adipoz doku farklılaşması için gerekli olduğundan dolayı, adiposit olmayan hücrelerin de adiposit benzeri hücrelere dönüşümünü sağlayabilmektedir. Bununla birlikte PPAR- γ , hücresel glikoz ve lipit metabolizmasında önemli görevleri olan bir transkripsiyon düzenleyicidir (88). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar ve elde edilen bilgiler, obezite ve insülin rezistansı kaynaklı erkek infertilitesinde, PPAR- γ 'nın enerji metabolizması ve üreme sistemi arasındaki ilişkiyi kontrol eden bir eleman olarak önemli rol oynadığını göstermiştir (89, 90). Benzer şekilde dişi farelerde oosit ve gronulosa hücrelerinde PPAR- γ eksikliği fertilitate bozukluklarına sebep olabilmektedir (91). Sperm hücrelerinde farklı reseptör türlerinin ekspresyonu gerçekleşebilir (92, 93) ve bu reseptörlere ait ligandlar bir otokrin döngü oluşturarak sistemik regülasyondan bağımsız şekilde sperm fonksiyonlarını düzenleyebilir (94, 95).

2.10. Erkek Üreme Sisteminde Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gamma Ekspresyonu ve Görevleri

Üreme sistem hormonlarının kontrolü HPG tarafından yapılır, ancak PPAR- γ 'nın üreme fonksiyonları üzerindeki etkinliğinin bu sinyal yolağı ile kontrol edilip edilmediği henüz kesinleşmemiştir. Hipofizel gonadotroflarda PPAR- γ inhibisyonunun, dişi farelerde LH seviyelerini artırdığı, erkek farelerde ise FSH seviyelerini düşürdüğü ve düşük doğum ağırlığına sebep olduğu gösterilmiştir (96). Ayrıca, PPAR- γ fonksiyonlarının, mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı aracılığıyla FSH tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir (Şekil 2.4.) (97). Bu

bilgi PPAR- γ 'nin HPG sinyal yolağı tarafından kontrol edilebiliyor olacağını göstermektedir.

Testiste bulunan somatik ve germ hücreleri PPAR ekspresyonu yapabilmektedir. PPAR α ve PPAR β genellikle Leydig ve Sertoli hücrelerinde (98), PPAR- γ ise sadece Sertoli hücrelerinde eksprese edilir (99). Sertoli hücreleri fetal gonadlarda ilk farklılaşmaya başlayan hücre grubudur ve puberte sırasında da spermatogenezde çok önemli rol oynar. Sertoli hücrelerinin fiziksel ve metabolik desteğı olmadan, germ hücrelerinin farklılaşması, mayoz bölünme ve sperme dönüşüm gerçekleşmez (100). Spermatozoidlerde PPAR- γ 'ya ait mRNA bulunduğunu gösteren bir çalışmaya göre, PPAR- γ sinyalleri Sertoli hücrelerindeki lipid ve glukoz metabolizmasına ait anahtar genlerin ekspresyonlarını etkileyebilir (101).



Şekil 2.4. PPAR- γ ekspresyonu ve erkek üreme sistemi üzerindeki etkinliğı

Spermatogenez, spermatidlerin daha kompleks yapılar olan spermelere dönüşümüdür (Şekil 2.5.A). Ancak, üreme ile ilgili fizyolojik olaylar çok yüksek enerji gerektirir ve enerji depoları ya da gıda alımı yetersiz olduğunda üreme davranışı ve fizyolojik yanıtlar inhibe olur. Bu yetersiz gıda alımına ve düşük enerji üretimi durumu beslenmeye bağılı infertilitenin en bilinen sebebidir (102). Enerjinin temel kaynağı,

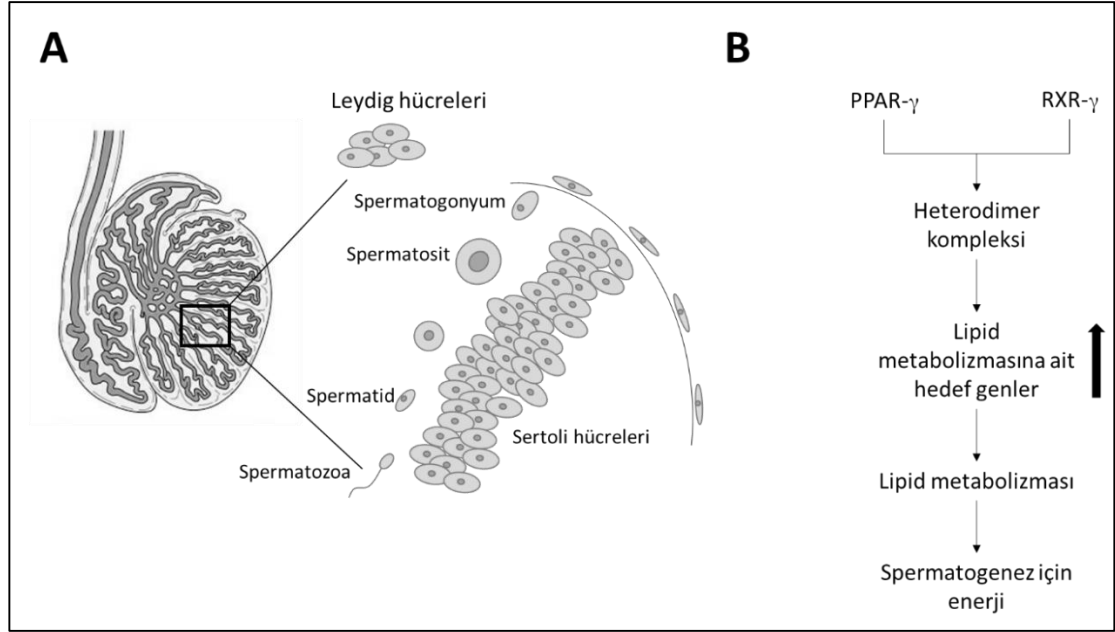
triasilgliserollerin depolanması ile oluşan beyaz adipoz doku (BAD)'dur (103-105). Epididimal BAD (EBAD), normal spermatogenez için gerekli lokal faktörlerin üretiminde gerekli enerjinin kaynağı olduğu için, EBAD'daki herhangi bir azalma spermatogenezini bozmaktadır (104, 106). Ancak, yapılan bir çalışmada pubik bölgenin diğer noktalarından BAD çıkartıldığında herhangi bir değişim gözlenmemiştir ve bu bulgu enerji ihtiyacı ve yağ dokusunun gerekli olduğu hipotezinin tersini göstermiştir (107). Çıkarılan yağ dokusuna rağmen spermatogenezin devam ediyor olması, henüz tanımlanamamış bir mekanizmayla EBAD'dan temellenen büyüme ve gelişimden sorumlu faktörlerin spermatogenezini düzenlemesinden de kaynaklanıyor olabilir. PPAR- γ , adipojenezden, germ ve Sertoli hücrelerinin farklılaşmasından sorumlu ana düzenleyicidir. Özellikle Sertoli hücrelerindeki lipid metabolizmasıyla ilgili genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir. Bu da PPAR- γ sinyal yolağının spermatogenez için ne kadar önemli olduğunun bir göstergesidir (99, 101).

Enerji homeostazı ve hücre farklılaşması sırasında görev alan önemli genlerin transaktivasyonu için gerekli olan transkripsiyon faktörlerinin üretilmesi, PPAR'lerin retinoid X reseptörleri (RXR) ile heterodimer oluşturmasına bağlıdır (Şekil 2.5.B) (108-110). Spermatogenez sırasında özellikle mayoz bölünmenin başlangıç aşamalarında PPAR ve RXR ekspresyonları maksimum seviyelere ulaşmaktadır (101). PPAR- γ seviyeleri ise spermatogenezin son safhalarına doğru, RXR- β ve RXR- γ ekspresyonlarıyla eş zamanlı olarak leptoten/zigoten spermatositlerde artmaya başlar. Olgunlaşmış Sertoli hücrelerinde eksprese edilen predominant faktör PPAR- γ /RXR- γ heterodimeri, Sertoli hücrelerindeki lipid metabolizmasına ait genlerin up-regülasyonunu, ve spermatogenez sırasında gereken enerjinin üretilmesini kontrol eder. Bu mekanizmada bir bozukluk olursa erkek infertilitesi meydana gelebilir (111, 112).

2.11. Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gamma Aktivitesinin Fertilizasyon ve İnfertilitedeki Rolü

Fertilizasyon, spermlerin dişi üreme kanalına girdiği kompleks biyokimyasal bir süreçtir. Dişi kanalına giren olgunlaşmış spermlerin üreme yetenekleri yoktur ve dişi üreme kanalında ilerlerken üreme özelliği kazanırlar. Bu işleme kapasitasyon denir. Kapasitasyon sonucunda sperm, oositteki zona pellucida (oosit etrafındaki

jelimsi örtü) üzerine penetre olarak, yumurtanın döllenmesini sağlayan akrozom reaksiyonunu başlatabilir (113). İnsan ve domuz spermlerinde ejakülasyonu takiben spermde PPAR- γ ekspresyonlarının arttığı ve buna bağlı olarak sperm motilitesinin, kapasitasyonun, akrozom reaksiyonunun, hayatta kalma süresinin ve metabolizmanın da arttığı anlaşılmıştır (114, 115).



Şekil 2.5. Spermatojeniz ve PPAR- γ aktivitesi

A. Testiste sperm farklılaşması. En yüksek PPAR- γ ekspresyonu Sertoli hücrelerinde, en düşük PPAR- γ ekspresyonu spermatozoidlerde yapılır. B. PPAR- γ ve RXR- γ kompleksini oluşturarak lipid metabolizmasındaki hedef genleri düzenler. Böylelikle spermatojeniz için gerekli enerji açığa çıkmış olur. PPAR- γ : peroksizom proliferatör aktive reseptör gamma; RXR- γ : retinoid X reseptör gamma

Kolesterol salgısı, membran sıvısı ve hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun artması ile aktin polimerizasyonu kapasitasyon göstergesi olarak kabul edilir (116-119). Kapasitasyon sırasında enerji üretiminin temelleri tam olarak anlaşılamamış olsa da, gamet aktivasyonu için bioenerji devamlılığının hayati rol oynadığı unutulmamalıdır. Adenozin trifosfat spermde aerobik veya aneorobik olarak sentezlenebilir. Normal bir spermde PPAR- γ ekspresyonları, sperm başının apikal kısmında, subkromozomal bölgede ve orta kısımda olurken, kuyruk kısmında yok denecek kadar azdır. Ancak, kapasitasyon sonrası bu tablo tam tersine dönmektedir (115). Yapılan bir çalışmada, PPAR- γ aktivitesini geri dönüşümsüz olarak inhibe eden PPAR- γ antagonisti GW9662 varlığında düşen sperm canlılığının, PPAR- γ agonisti prostaglandin J2 ile arttığı

gözlenmiştir (114). Bu da PPAR- γ 'nın sperm canlılığında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Aynı çalışmada, GW9662'nin, spermdeki kolesterol miktarlarını ve triozin fosforilasyonunu değiştirerek kapasitasyon yeteneğini azalttığı, böylelikle olgunlaşmasını engellediği belirlenmiştir. Dolayısıyla, PPAR- γ 'nın glukoz ve enerji metabolizmasında aktif rol aldığı göz önüne alındığında, kapasitasyonu tamamlanmış sperm motilitesinin artırılması PPAR- γ ile sağlanıyor olabilir.

Glikoz metabolizması yaşamın devamlılığı için gereken enerjinin üretilmesinde en önemli yolaktır. Tip 2 diyabette glikoz seviyelerinin azaltılabilmesi için PPAR- γ ligandlarının kullanılması sonucu, bu reseptörlerin enerji metabolizmasındaki önemi anlaşılmıştır (120, 121). Sperm olgunlaşması sırasında glikoz etkinliği pentoz fosfat yolağı aracılığıyla gerçekleşmektedir (122). Glikoz-6-fosfat pentoz fosfat yolağına girdiğinde, glikoliz veya Krebs döngüsünde meydana gelenden daha fazla miktarda nikotinamid adenin dinükleotid hidrojenaz (NADPH) üretilir, böylelikle yüksek miktarda hidrojen donörü elde edilmiş olur (123). Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH), insan spermdeki bu metabolik yolda doza bağımlı aktivite göstermektedir (124). PPAR- γ da, G6PDH'nin bu doz bağımlı aktivitesini kontrol ederek, spermdeki enerji metabolizmasını kontrol eder (115).

PPAR- γ , periferel dokuların insüline hassasiyetlerini artırarak insülin rezistansını düzenler. İnsülin rezistansı sperm sayısı ve kalitesini düşüren etmenlerden biridir (125). Ek olarak, insülin HPG'ye mediyatör ve modülatör olarak etki etmektedir. Özellikle erkek üreme potansiyeli ve tüm vücudun homeostazı ile ilgili düzenlemelerde önemli rol almaktadır (125, 126). HPG üzerindeki bu etkinliğinin bozulması hastaların hipogonadal fenotipte olmalarına neden olabilir. Obeziteye eşlik eden hiperinsülinemi durumlarında, seminal insülin konsantrasyonlarının arttığı ve erkek üreme sisteminin bu durumdan olumsuz etkilendiği bilinmektedir (126).

İnfertilite, 12 ay boyunca düzenli ve korunmasız ilişkiye rağmen gebeliğin gerçekleşmemesi durumu olarak tanımlanmaktadır (127). 1997-2017 yılları arasında Türkiye'nin da aralarında bulunduğu 195 ülkeden toplanan veriler ile yapılan bir istatistik çalışmasına göre, 10 yılda dünya çapında kadın infertilitesi her yıl % 0.396 oranında artarken, erkek infertilitesinde bu oran yılda % 0.293 artış şeklinde

belirlenmiştir (128). Aynı çalışmada Türkiye’de kadın infertilitesinin yıllık %4’ün üzerinde, erkek infertilitesinin ise yılda %1-2 oranında artış gösterdiği rapor edilmiştir. Son yıllarda sperm konsantrasyonlarında düşüş gözlenmekte ve birçok durumda bu sayı ve kalite düşüşünün sebebi belirlenememektedir. Erkek infertilitesindeki bu artışın fiziksel problemlerin yanında, tedavi masrafları sebebiyle evlilik ve eşlerin psikososyal durumları üzerinde de ciddi etkileri olduğu bir gerçektir. Bununla birlikte, paternal sağlık durumu bir sonraki jenerasyona aktarılabildiği için, otizm spektrum bozuklukları (129) ve çevresel kimyasallara maruziyet ile ilişkili çocukluk hastalıklarında da ciddi artışlar gözlenmektedir (130, 131). Ayrıca, paternal infertilitenin de tıpkı metabolik hastalıklar gibi bebeğe aktarılabildiği bilinmektedir (132). Diyet (133), egzersiz (134), obezite (135) ve psikolojik stresin (136, 137) erkek infertilitesindeki rolleri uzun yıllardır çalışılmaktadır. Erkek obezitesinin üreme üzerindeki negatif etkilerini sadece sperm kalitesini düşürerek değil, testiküler germ hücrelerinin fiziksel ve moleküler yapısını değiştirerek de gösterdiği anlaşılmıştır (135). Glukoz, insülin ve leptin, HPG üzerinden fertilitenin düzenlenmesinde önemli rolleri olan değişkenlerdir (138-143). PPAR ailesi de bu değişkenlerin gerek HPG üzerinden gerek direkt olarak doku ve hücre içinde regülasyonundan sorumludur.

2.12. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri (ROS), yapısında oksijen bulunduran ve çok yüksek oksidasyon yetenekleri bulunan serbest radikallere verilen isimdir. Süperoksit (O_2^*), (H_2O_2), peroksil (ROO^*) ve hidroksil (OH^*) radikalleri en bilinen ROS’lardır (144). Seminal plazmadaki lökositler ve spermlerdeki mitokondriyal aktivite erkek üreme sistemindeki en büyük ROS kaynağıdır. ROS kaynaklı sperm hasarının erkek infertilite vakalarına %30-80 oranında katkıda bulunduğu gösterilmiştir (145, 146). ROS, apoptotik proseslerin olmazsa olmaz elemanıdır, ayrıca yüksek oranda polarize ve hızla farklılaşan sperm kapasitasyonunda da çok miktarda üretilir (147). Hücre içi faaliyetlerin ve en önemlisi enerji üretiminin devamlılığı için ROS hayati önem taşımaktadır. Ancak, yüksek miktarlarda ROS, metabolik proseslerin devam etmesini engeller ve oksijen paradoksu durumu ortaya çıkar (148). Hücrelerin antioksidan savunma sisteminin yüksek miktarda ROS üretimini dengeleyemediği bu duruma oksidatif stres denir. Oksidatif stres, spermelerin yapısını ve fonksiyonel bütünlüğünü

bozarak erkek infertilitesinin patogenezinde önemli rol oynamaktadır (149-152). Düşük seviyelerde ROS, sperm kapasitasyonu ve hiperaktivasyon gibi fizyolojik proseslerin devamlılığı için gerekli olan redoks reaksiyonlarının oluşmasını sağlar, ancak suprafizyolojik dozlarda membran yapısını ve geçirgenliğini bozar (153). Oksidatif stresin sperm fonksiyonları üzerindeki etkilerinin mekanizması henüz bilinmese de, kuyrukta oluşan peroksidatif hasar, hücre içi ATP seviyelerinin azalması, 4-hidroksinonenal üretimi, lipid membran komponentlerinin oksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) seviyelerinin artması ve nükleer ve mitokondriyal DNA fragmantasyonu ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (153, 154).

2.13. Oksidatif Strese Neden Olan Faktörler ve Erkek Üreme Sisteminde Oksidatif Stres

Erkek üreme sistemi bozuklukları, genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin bir araya gelmesiyle oluşan multifaktöriyel bozukluklardır. Sigara, alkol, yağ ve protein içeriği yüksek diyet, sedanter yaşam, psikolojik stres, obezite ve artmış paternal yaş (>40) riske katkısı en büyük olan etkenlerdir. Ek olarak, hava kirliliği, kalıcı organik kirleticiler, yüksek sıcaklıklar, plastizerler (bisfenol A, ftalatlar), metaller (özellikle kurşun, kadmiyum, demir ve bakır gibi geçiş metalleri), kemoterapötikler, çevresel kirleticiler (akrilamit, endosülfan), elektromanyetik radyasyon, sistemik ve testiküler enfeksiyon ve varikozel gibi problemlerin spermde oksidatif stresi artırdığı bilinmektedir (155, 156).

Dr. John MacLeod tarafından 1943 yılında yapılan bir çalışmada, yüksek oksijene maruz kalan spermelerde motilitenin, H_2O_2 'yi su ve oksijene parçalayan katalaz enziminin varlığında inhibe edildiği belirlenmiştir (157). Bu çalışma aynı zamanda oksidatif stresin sperm fonksiyonlarını bozabileceğini gösteren ilk çalışma olmuştur. Daha sonra bugünkü çalışmalara da temel oluşturacak, bilimsel veriler birçok önemli bilim insanı tarafından keşfedilmiştir (158-163).

Oksidatif fosforilasyon, sitokrom P450 kaynaklı ilaç metabolizması, peroksizomlar ve inflamatuvar reaksiyonlar sonucu ROS oluşabilir. Özellikle sperm içinde oluşan ve normal fizyolojik işlevleri engelleyecek miktardaki ROS'un lipid peroksidasyon seviyesi ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir (164). Araştırmacılar

bir gece inkübe edilen spermelerde motilite kaybının, sperm plazma membranındaki lipitlerin H_2O_2 oksidasyonu ile başlayan bir lipit peroksidasyon sürecinden kaynaklandığı göstermişlerdir. Benzer bir çalışmada ise, sperm plazma membranındaki lipitlerin uğradığı oksidatif hasarın, peroksidasyon reaksiyonlarını engelleyebilen bir antioksidan olan α -tokoferol varlığında tersine döndürülebildiği gösterilmiştir (165).

Sperm içerisinde ROS üretimi, kapasitasyon ve aktivasyon amacıyla ezrin proteinlerinin ve nükleer faktör-kappa-B alt ünite 105'ine ait tirozin fosforilasyonunun indüklenmesi ile gerçekleşir. Üretilen H_2O_2 tirozin fosfataz aktivitesini baskılar ve cAMP seviyeleri iki katına çıkar (166). Bu yükselme, H_2O_2 'in adenil siklazı aktive etmesi sonucu meydana gelir ve artan cAMP seviyeleri protein kinaz-A bağımlı tirozin fosforilasyonunu başlatır. Oksidatif fosforilasyon mitokondriyal membranın iç yüzeyinde oksijen ve hidrojen arasındaki bir redoks reaksiyonu ile başlar. Enerji üretmek amacıyla gerçekleşen bu reaksiyonda yan ürün olarak ROS oluşur. Oluşan ROS iki şekilde davranabilir (148): 1. Sperm plazma membranında lipit oksidasyonu sebebiyle sperm motilitesinde ve zona pellucidaya entegre olma yeteneğinde azalmalar meydana gelebilir. 2. Spermde bulunan nükleer DNA ve RNA hasar görererek parental genomun embriyoya aktarımı engellenebilir.

Sperm sitoplazmasında dokosaheksanoik asit gibi serbest radikal saldırısına açık potansiyel oksidasyon bölgeleri bulduran çoklu doymamış yağ asitleri yüksek miktarda bulunduğundan, bu ortam oksidatif stres için oldukça uygundur. Yağ asitlerinin yüksek miktarda bulunduğu ortamda NADPH hidrojen üretimine ve $ROO\cdot$ gibi lipit radikalleri ile lipit peroksidasyonunun başlamasına sebep olur. Böylelikle spermde motilite kaybı meydana gelebilir (167). Ayrıca, bu reaksiyonlar sonucu, akrolein, 4-hidroksinonenal ve malondialdehit gibi düşük molekül ağırlıklı hem elektrofilik hem nükleofilik özellikte aldehitler oluşur. Ortamda malondialdehit miktarı arttıkça mutajenik özellikte homodimerler meydana gelerek, özellikle tümör baskılayıcı genlerde ve onkogenlerde DNA eklentileri oluşturabilir (168). Ayrıca, bu aldehitler, mitokondriyal proteinlere bağlanarak ROS üretimini tetikleyebilir, böylelikle ortamdaki serbest elektron ve süperoksit miktarları da artabilir. Spermatogenez sırasında total ve serbest yağ asidi oranları düşer, dokosaheksanoik

asit miktarları artar. Eğer sperm hasarlı ise bu tablo tam tersi olur (169). Bir spermde yağ asidi seviyeleri fazla ise, membran yapısı bozulacağı için yumurta penetrasyonu gerçekleşmez. Doymamış yağ asitlerinin artmış olması sperm mitokondrisinde yüksek miktarda ROS üretildiğini gösterir. Bu da lipit peroksidasyonu ve oksidatif strese neden olabilir (170).

Yüksek miktarda ROS üretiminin DNA hasarı yaptığı bilinmektedir. Mitokondri serbest radikallerin hem kaynağı hem de hedefidir. Mitokondriyal DNA'da, nükleer DNA'dan farklı olarak DNA'yı koruyacak histon proteinlerinin bulunmaması ve eksizyon onarım yolağının olmaması sonucu DNA onarımı daha azdır ve bu nedenle DNA hasarı ihtimali nükleer DNA'dan daha fazladır (171). Sperm hücrelerinde DNA'sı hasarlanmış birçok mitokondri bulunur. Bu da hücrelerin apoptoza girememesine sebep olduğu için, ejakülat içerisinde hasarlı DNA'ya sahip birçok sperm bulunur (172). Mutasyonlu DNA içeren bu spermlerin mitokondrileri, sağlıklı spermlere göre daha az ATP üretir. ATP'nin spermatogenez sırasında meydana gelen mayoz bölünmeye yetmemesi sonucu hipospermatogenez, mayoz bölünmenin kısmen devam etmesi ve oluşan hücre iskeletinin düzgün olmaması sonucu astenospermi meydana gelebilir (173). İnfertil erkeklerde sıklıkla karşılaşılan parçalanmış DNA'ya sahip spermlerin serbest radikal kaynaklı oluşabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (174-176). DNA'sı hasarlı olan sperm, sağlıklı spermlere nazaran biyolojik engellere daha kolay takılır, böylelikle hatalı DNA'nın bir sonraki nesile aktarılması engellenmiş olur. Ancak, infertilite tedavisi ile bu tip spermlerle meydana gelen embriyoların hayatta kalabilme şansı artacağı için, tedavi bebeklerinde genetik hastalıkların ortaya çıkma riski spontan gebeliklerde olduğundan yüksek olabilir (177, 178).

2.14. Erkek Üreme Sisteminde Oksidatif Stres ve Apoptoz İlişkisi

Apoptoz, diğer adıyla programlı hücre ölümü, çok hücreli canlılarda hücre bölünme ve hücre ölümü oranlarını kontrol altında tutmak için bulunan çok önemli bir düzenleme mekanizmasıdır. Apoptoz bir çeşit hücre intiharıdır. Süreç DNA parçalanması ile başlar, sonrasında sitoplazma azalır, çekirdek membranı dağılır ve sonuç olarak hücre çevre hücrelere zarar vermeden ölür. Apoptoz, erkek üreme

sistemini geliştiği embriyonik fazda, spermatogoniyal kök hücrelerin hayat döngülerinin düzenlenmesinde hayati rol oynamaktadır. Özellikle Sertoli hücrelerinin oranı ve dolayısıyla erkeğin fertilité yeteneği apoptoz sayesinde düzenlenir (179). Spermatogenezin son safhalarında çok sayıda oluşan premayotik sperm hücreleri de yine apoptoz sayesinde uygun sayıya indirilir (180). Yapılan çalışmalarda, apoptozu düzenleyen BCL-2 benzeri protein 1 ve BAX proteinlerini kodlayan genlerin silinmesinin, germ hücrelerinin apoptoza girmemesi sonucu germ hücresi:Sertoli hücresi oranını bozduğu ve infertiliteye sebep olduğu anlaşılmıştır (181-183). Apoptozun düzenlenmesi, germ hücrelerini gelişimi, farklılaşması ve fonksiyonu için de hayati rol oynar. Apoptoz, hasar görmüş ya da problemlili germ hücrelerinin seminifer tübüllerde yok edilmesini sağlayarak, bu hücrelerin spermatogeneze girmesini ve böylelikle üremeye katılmasını engeller.

Sağlıksız yaşam tarzı, elektromanyetik radyasyon maruziyeti, çevresel toksinler, sisplatin gibi kemoterapötik ajanlar, bisfenol A ve ftalat gibi endokrin bozucu kimyasallar ve spermatogenezi düzenleyen genlerde delesyon gibi faktörlerin hem insanda hem de hayvanlarda apoptozu indüklediği belirlenmiştir (184-186). Tüm bu faktörler, oksidatif stresi artırarak spermatogenez üzerinde istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasına sebep olur. Ayrıca yine oksidatif stres sebebiyle sperm kromatin yapısının da bozulması söz konusu olabilir. İnfertil erkeklerde seminal oksidatif stresin ve apoptozun fertillere göre artmış olduğu anlaşılmıştır. Erkek üreme sisteminin gelişimi sırasında yüksek miktarlarda ROS ve oksidatif strese maruziyeti, testiste kromatin yapısı bozulmuş apoptotik spermlerin birikmesine veya yüksek seviyelerde fosfotidilserin içeren, kaspaz aktiviteleri yüksek ve DNA hasarı oluşmuş diğer hücrelerin sayısının artmasına neden olacaktır. Bu değişimlerin hepsi erkek infertilitesinin sebepleri olarak bilinmektedir (187).

Spermde meydana gelen DNA hasarının büyük bir kısmı oksidatif stres kaynaklıdır. Oksidatif stres, spermin fiziksel yapısını bozarak nükleazların nükleer DNA'ya ulaşmasını engeller ve böylece parçalanma başlar. Yüksek miktarda ROS ve oksidatif stres sperm fonksiyonlarını engeller. Böylelikle inaktif ve immotil hale gelen sperm için apoptotik yolak aktive olur. Dolayısıyla, spermde oksidatif stres kaynaklı apoptozun engellenmesi için antioksidan terapilerin kullanımı önerilmektedir (188).

Diğer taraftan, sperm içinde oksidatif stres sebebiyle biriken serbest radikaller tümör nekroz faktör (TNF) reseptörlerine bağlanarak inflamatuvar sitokin ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B) seviyelerini artırır. Artan sitokinler apoptoz yolağını inhibe ederek hasarlı hücrelerin çoğalmasına yol açar. Bu yolak, infertil erkeklerin ejakülatı içinde bulunan DNA hasarlı spermlerin varlığını açıklayabilmektedir (189). Bu hasarlı spermler apoptotik yolağa girseler dahi, bozulmuş mitokondriyal aktivite ve artan NF- κ B'ye bağlı oluşan apoptoz inhibisyonu sebebiyle, yolak tamamlanamaz ve ejakülat içinde varlıklarını sürdürürler (190).

2.15. Oksidatif Stres ve Sperm Epigenomu

Epigenetik, nükleer kromatin modifikasyonları veya genotipte herhangi bir değişim oluşturmadan fenotip değişimlerine sebep olan kovalent bağlı DNA eklentilerinin gen ekspresyonlarında meydana getirdiği değişimleri inceler. DNMT tarafından yapılan sitozin metilasyonu en önemli epigenetik mekanizmadır. Sperm DNA'sı protaminlere bağlı olduğu için hem transkripsiyonel hem de translasyonel olarak inert durumdadır. Ancak, sperm genomunun %15'ini oluşturan nükleozomal komponent yüksek oranlarda asetillenmiş histon içerir. Bu özellik transkripsiyonel aktivitenin en önemli göstergesidir (191).

Oksidatif DNA hasarı, sperm DNA metilasyon profilini değiştirerek global hipometilasyona ve genomik stabilitenin bozulmasına sebep olur. Buna bağlı olarak, retrotranspozonlar aktive olarak eksprese edilirler. Bu durum erkek infertilitesi ile yakından ilişkili kabul edilmektedir (192). Histon asetilasyon profillerindeki farklılıklar ise, spermatogenezin bozulması ve testiküler kanserler gibi hastalıklara sebep olabilmektedir (193). İnfertilite tedavisi ile dünyaya gelen çocuklarda Del Castillo sendromu, Beckwith-Wiedeman sendromu, Russel-Silver sendromu ve retinoblastoma gibi genomik baskı hatalarından kaynaklı hastalıkların meydana gelme ihtimali, doğal olarak meydana gelenlerden daha yüksektir (194, 195). Testislerde bulunan sperm henüz olgunlaşmamıştır. Epididimal spermler ise epigenetik olgunluğa ulaşmış olmakla birlikte bu süreçte oksidatif strese maruz kaldıkları için oksidatif hasarlar barındırmaktadır. Tümör baskılayıcı genler gibi önemli genler üzerindeki global hipometilasyon veya hipermetilasyon benzeri de novo epigenetik

modifikasyonlar, embriyonun gelişimi ve doğumundan sonraki hayatını etkiler (196, 197). Son yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, oksidatif stresin DNMT ekspresyonunun upregülasyonu aracılığı ile hipermetilasyona sebep olduğunu göstermiştir (192, 198).

2.16. Endokrin Bozucu Kimyasallar

Diklorodifeniltrikloroetan maruziyetinin cinsiyet gelişim ve üreme sistemi üzerinde etkileri ilk olarak 1962 yılında Rachel Carson tarafından tanımlanmıştır (199). Bu keşiften kısa bir süre sonra Arthur Herbst, düşük ve ölü doğum riskinin azaltılması için kullanılan sentetik östrojen türevi dietilstilbestrole, prenatal olarak maruz kalan bir grup hastada, yetişkinlik döneminde vajinal adenokarsinoma geliştiğini bildirmiştir (200). O döneme kadar, Paracelsus'un "sola dosis facit venenum-zehiri zehir olmayandan ayıran tek şey dozudur." sözü temel prensip olarak kabul edilmekte ve sentetik kimyasalların homeostazı ve hormonal sistemi nadiren etkileyebileceği düşünülmektedir. Ancak yaklaşık 50 yıl içinde yapılan bilimsel çalışmalardan elde edilen veriler bu iki varsayımın çok da kusursuz olmadığını göstermiştir. Yapılan birçok çalışma kimyasal maddelerin endokrin sistem ile etkileşebileceğini göstermekle birlikte, bu çalışmalarda araştırılan kimyasalların bazılarında doz-yanıt ilişkisinin doğrusal olmadığı belirlenmiştir (5). Bu konvensiyonel olmayan ilişkinin tanımlanmasında mekanistik çalışmalar önemli bir rol oynamıştır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından yapılan bir çalışmada 1800 adet kimyasalın östrojen, androjen ve tiroid yolaklarından en az birini bozduğu belirlenmiştir (201). Benzer şekilde Avrupa Birliği Komisyonu tarafından araştırılan 575 kimyasaldan 320'sinin endokrin bozucu özellikler taşıdığı veya endokrin bozucu olma potansiyeli olduğu belirlenmiştir (202).

Endokrin bozucu kavramı ilk olarak Amerikan Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından 1996 yılında yapılmıştır. EPA'nın başlattığı programda amaç, valide test sistemlerini ve bilimsel verileri kullanarak bazı kimyasalların insan vücudundaki östrojen ve diğer hormonları taklit edip etmediğini ve bu hormonların etkilerini değiştirip değiştirmediğini anlamak olarak açıklanmıştır (203). Aynı yıl EPA, endokrin bozucuları " endokrin sistemin yapısı ve fonksiyonlarını değiştirerek canlı

organizmaları, popülasyonları ve gelecek nesilleri etkiledikleri bilimsel prensipler, veriler ve kanıtlar ile anlaşılan ekzojen bir kimyasal ya da kimyasal karışımı” olarak tanımlamıştır. EPA’nın son tanımına göre endokrin bozucu, homeostazın korunmasından ve gelişimsel süreçlerin düzenlenmesinden sorumlu vücuttaki doğal hormonların üretimi, salınımı, taşınması, metabolizması, bağlanması, hareketi veya eliminasyonu üzerinde etki gösterebilen bileşiklerdir (1). Avrupa Birliği ise endokrin bozucuyu, endokrin fonksiyonundaki değişikliklere ikincil olarak, sağlam bir organizmada veya onun soyunda olumsuz sağlık etkilerine neden olan ekzojen maddeler olarak tanımlamıştır. Buna göre potansiyel bir endokrin bozucu, sağlam bir organizmada endokrin sistemin bozulmasına yol açması beklenebilecek özelliklere sahip tüm maddelerdir (204). DSÖ’ye göre endokrin bozucu, endokrin sistemin işlev(ler)ini değiştiren ve sonuç olarak bir organizmada veya onun soyunda veya (alt) popülasyonlarında olumsuz etkilere neden olan ekzojen bir madde veya karışımdır (205).

Endokrin bozucu kimyasalların toksisitesinden bahsedilirken, tıpkı mutajenitenin kanser göstergesi olması gibi, hormon sistemi üzerindeki etkiler de endokrin bozucu özelliğin işaretçisi kabul edilmiştir. Ancak, sadece hormon aktivitesini etkileyen her kimyasal madde endokrin bozucu olma riskini taşımaz. Bu sınıflandırmaya girecek maddelerin toksisitesi tanımlanırken maruziyet dozu ve süresi yanında maruziyetin yaşamın hangi hassas/kritik dönemde gerçekleştiği önem taşımaktadır. Endokrin bozucu kimyasallara prenatal maruziyetin erken doğum, düşük ağırlıklı doğum, anogenital açıklıkta azalma, nörolojik gelişim bozuklukları, bilişsel faaliyet bozuklukları, davranışsal bozukluklar, otizm spektrum bozukluğu, obezite ve metabolizma bozukluğu gibi durumlarla; gebelik döneminde maruziyetin annede gestasyonel diyabet ile; yetişkinlerde tip 2 diyabet ve obezite, erkek üreme sistemi hastalıkları (genetik malformasyonlar, testis kanseri, prostat kanseri, hormon bozuklukları, semen kalitesinde bozulmalar) ve dişi üreme sistemi hastalıkları (polikistik over sendromu, endometriyozis, over, meme ve over kanseri) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (206).

Hormonlar, fizyolojik etkilerini reseptörler aracılığı ile gösterir (207). Dolayısıyla, bir hormonun etkinliği reseptör ve hormonun birbirlerine olan afinitesine

ve reseptör sayısına bağlı olmakla birlikte henüz mekanizması anlaşılammış başka değişkenler de mevcuttur (208, 209). Buna ek olarak, hormonların maksimum etkilerini, reseptörü doygunluğa ulaştıracak seviyelerin çok altında olduklarında gösterdikleri belirlenmiş, bu durum “yedek reseptör hipotezi” olarak adlandırılmıştır (5, 210). Bu durum hem hormonların hem de endokrin bozucu kimyasalların doz-yanıt eğrilerinin beklenenden farklı olmasına neden olmuştur. Dolayısıyla bu durum endokrin bozucu özellikleri olan bir kimyasalın yüksek doz karakteristiği ile düşük doz karakteristiğinin birbiriyle aynı olmayabileceği anlamına gelmektedir. Bu sebeple, endokrin bozucu kimyasalların risk değerlendirmeleri yapılırken diğer kimyasallarda olduğu gibi bir maruziyet limitinden söz edebilmek her zaman mümkün olmayabilir. Endokrin bozucular için maruziyet limitlerinin belirlenmesindeki zorluklar hayvanlarda (211, 212) ve epidemiyolojik çalışmalarda (213) gösterilmiştir. İnsanların bu kimyasallara düşük dozlarda ve kronik olarak maruz kaldıkları düşünöldüğünde bir maruziyet limitinden söz etmek mümkün olmamaktadır ve bu sebeple endokrin bozucuların risk değerlendirmeleri için yeni bir yaklaşıma ihtiyaç duyulmaktadır.

Gelişim sırasında olan hormon aktiviteleri genellikle kalıcı sonuçlar doğurur. Örneğin erkek üreme sisteminin oluştuğu aşamada Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron, Wolfian kanallarının gelişimini indükler. Benzer şekilde organların gelişimini tamamladığı bu evrelerde endokrin bozuculara maruziyet de kalıcı etkilere neden olabilir ve tıpkı dietilstilbestrol olayında olduğu gibi bu etkiler yetişkinlik dönemine kadar gözlenmeyebilir. Diğer endokrin bozuculara maruziyetin de benzer etkiler ortaya çıkarabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (214-216). Dolayısıyla, endokrin bozucu kimyasallara jenerasyonlar boyunca ve sürekli maruz kalındığı göz önüne alındığında, sadece prenatal değil, hayatın diğer dönemlerinde maruziyetin de gözlenebileceği modellerin geliştirilmesi önem taşımaktadır.

Hormonların etki mekanizmaları oldukça karmaşıktır. Kimyasal maddeler de benzer şekilde karmaşık mekanizmalarla endokrin bozucu etkilerini gösterebilir, ancak birebir hormonun etkisini taklit etmeyebilirler. Endokrin bozucu kimyasalların olası etki mekanizmaları şöyle sıralanabilir (217, 218):

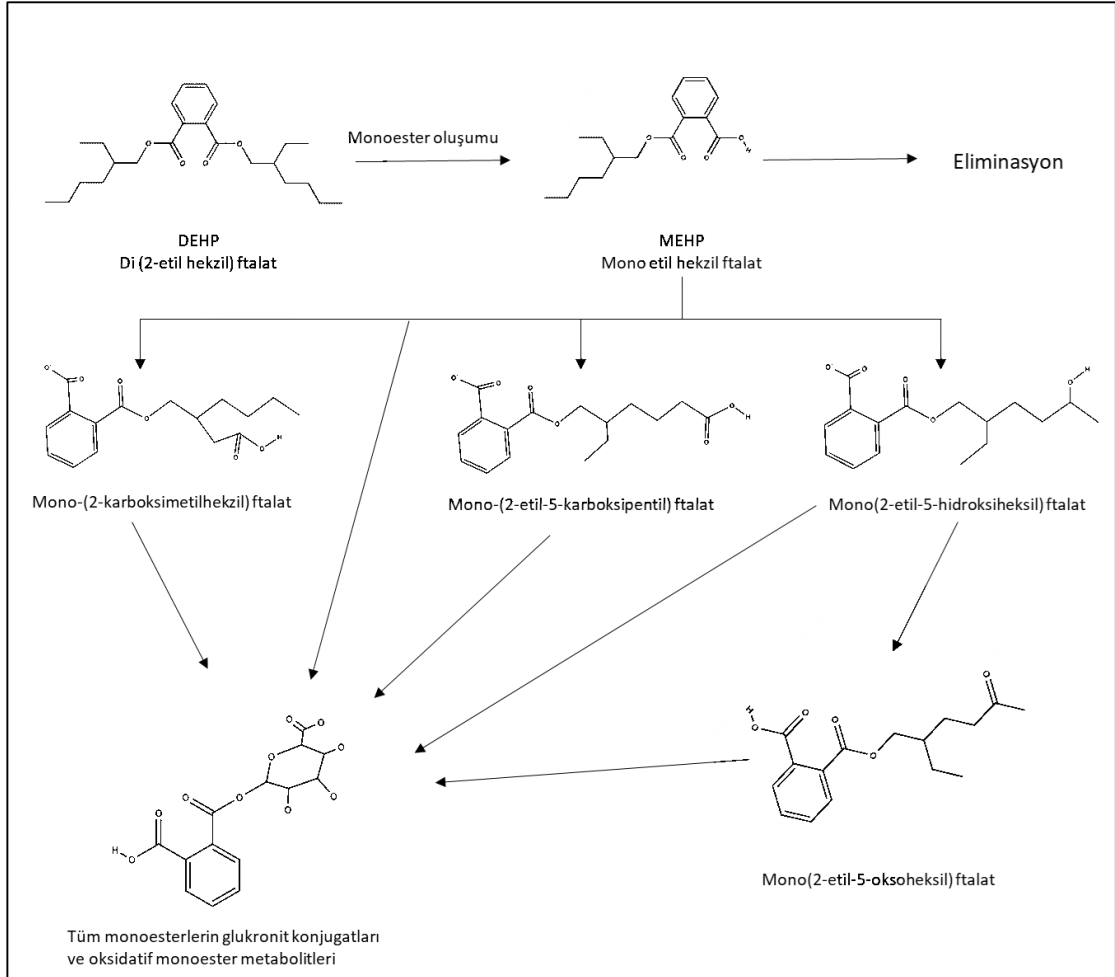
- Endokrin bozucu kimyasallar hedef dokudaki reseptörlere bağlanarak birebir hormon etkisini taklit edebilir.
- Endokrin bozucu kimyasallar hedef dokuda metabolize olabilir (örneğin hidroksil metabolitleri) ve metabolitler oluştukları dokudaki reseptörlere bağlanarak hormon metabolizmasını bozabilir.
- Endokrin bozucu kimyasallar ve metabolitleri, reseptör açısından yoğun veya ilgili reseptörün izoformlarını içeren başka dokulara birikerek hormon metabolizmasını bozabilir.

Tüm bu olasılıklar göz önüne alındığında, endokrin bozucuların tüm endokrin sistem bileşenleri üzerinde aynı etkiyi göstermesini beklemek doğru olmayacaktır. Ayrıca bu kimyasal maddeler reseptörlere hormonlar kadar iyi tutunamadıkları için hormon etkisini birebir oluşturamayabilirler (219). Bu da, endokrin bozucu kimyasalların bağlanması ile reseptörlerin normalde oluşturmayacakları bir cevap oluşturmalarının mümkün olduğunu göstermektedir.

2.17. Di (2-Etil Hekzil) Ftalat

Ftalatlar, özellikle plastik endüstrisinde kullanılmak üzere çok yüksek miktarlarda üretilen ftalik asit esterleridir. Dünya çapında her yıl iki milyon tondan daha fazla di-(2-etilhekzil) ftalat (DEHP) üretilmektedir (220). Endüstrideki kullanımlarına moleküler ağırlıklarına bağlı olarak karar verilir. DEHP ve diizonil ftalat (DiNP) gibi yüksek molekül ağırlıklı ftalatlar yağmurluk, ayakkabı, gıda paketleri, oyuncaklar ve medikal malzemelerde esneklik özelliği için kullanılırken (221), dimetil ftalat (DMP), dietil ftalat (DEP) ve dibütil ftalat (DBP) gibi düşük molekül ağırlıklı olan ftalatlar genellikle kişisel bakım ürünleri, insektisit ve kaplamalarda solven olarak kullanılır (222). Yüksek molekül ağırlıklı ftalatlara oral yoldan maruz kalırken, düşük molekül ağırlıklı ftalatlara kapalı alan havasından ya da dermal yoldan maruz kalınmaktadır. İş yeri maruziyeti söz konusu olduğunda inhalasyon ana maruziyet yolağıdır (223). Biyolojik yarı ömürleri saatler ile günler arasında değişir ve vücutta birikme eğiliminde değildir (224). DEHP'in metabolizması Şekil 2.6.'da verilmiştir. Dünya çapında yapılan çalışmalarda, katılımcıların

tamamının idrarında ftalat metabolitleri bulunmuştur. Bu da maruziyetin her gün gerçekleştiğine işaret etmektedir (225).



Şekil 2.6. Di-(2-etilhekzil) ftalat'ın (DEHP) metabolizması

Avrupa Birliği ülkelerinde 2007 yılında DEHP'in oyuncaklar, çocuk malzemeleri, kozmetikler ve gıdaya temas eden bazı materyallerde kullanımı yasaklanmıştır. 2015 yılında, Avrupa Birliği'nin yeni kimyasal politikası olan ve "Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzni ve Kısıtlanması" anlamına gelen İngilizce kelimelerin baş harflerinden türetilen REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) kapsamında, Avrupa Birliği ülkelerinde DEHP kullanımı özel izin ile kullanımı hariç tamamen yasaklanmıştır (226). Benzer şekilde Türkiye'de 2010 yılında resmi gazetede yayınlanan bir yazı ile oyuncak ve bebek bakım ürünlerinde kullanımı "kütle bazında %0.1'den daha fazla olamaz" şeklinde kısıtlanmıştır (227). Bu kısıtlamalar sebebiyle DEHP maruziyet miktarları

değişmeye başlamış, ancak yerine diğer yüksek molekül ağırlıklı türevleri kullanılmaya başlanmıştır (228).

DEHP'in içme sularında bulunabilecek maksimum miktarı EPA tarafından 6 ng/ml olarak sınırlandırılmış ve üretim bandında bir kerede 45,3 kg (100 pound) atık üreten işletmelerin kuruluşa rapor vermesi gerektiğini belirtmiştir. Amerikan İş Güvenliği ve Sağlığı İdaresi (OSHA) iş yerinde 8 saatlik bir çalışma süresince maruz kalınabilecek maksimum dozu 5 mg/m³ olarak belirlemiştir. 15 dakikalık maruziyet söz konusu ise 10 mg/m³ maksimum maruz kalınabilecek doz olarak limitlendirilmiştir (229).

Yapılan çalışmalar ve elde edilen verilere göre DEHP maruziyeti aşağıdaki durumlarla ilişkili kabul edilmektedir:

Hepatotoksisite: Hepatotoksisite ile ilgili insan verileri çok kısıtlı ve birbiri ile uyumsuzdur. Kemirgenlerde yüksek doz DEHP maruziyetinin dejeneratif ve nekrotik doku değişimlerine neden olduğu, düşük dozlarda ise peroksizom proliferasyonuna bağlı karaciğerde büyüme (organ ağırlığının artması, hepatoselüler hipertrofi) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (229, 230).

Nefrotoksisite: İnsan verisi oldukça kısıtlıdır. Hayvan çalışmalarında, özellikle oral maruziyet sonrası böbreklerin hedef organlardan biri olabileceğini gösteren veriler bulunmaktadır. Ancak böbreklerde hasarın görüldüğü çalışmaların büyük bir çoğunluğu yüksek doz maruziyet çalışmalarıdır (229).

İmmünotoksisite: İnsan verisi oldukça kısıtlıdır. Prenatal ve çocukluk dönemi maruziyetinin IgE seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (231). Ancak bazı hayvan çalışmalarında düşük dozlarda immünosensitizasyona sebep olabileceği de belirtilmiştir (232, 233).

Reprodüktif toksisite: Epidemiyolojik çalışmalar DEHP maruziyeti ile üreme sistemi toksisitesi arasında bir ilişki olabileceğini göstermiştir. Detaylı bilgi bir sonraki bölümde anlatılmıştır.

2.18. Di (2-Etil Hekzil) Ftalat ve Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Deney hayvanlarında bugüne kadar yapılan birçok çalışmada, DEHP'in antiandrojenik etkinliği olduğunu kanıtlanmıştır (234). DEHP, Avrupa Kimyasal Ajansı (ECHA) tarafından grup 1B üreme sistemi toksikani olarak sınıflandırılmış ve H360 yani "Üreme sistemine veya doğmamış bebeğe zarar verebilir" şeklinde etiketlenmiştir (235).

DEHP'in en bilinen ve kolay gözlenen üreme sistemi toksisitesi hem erkek hem dişide anogenital açıklığın azalması durumudur (236). Anogenital açıklık, anüsten skrotumun ön ve orta noktası arasındaki mesafe olarak tanımlanabilir (237). Anogenital açıklık fetal androjen aktivitesini gösteren ve üreme sistemi toksisitesinin en önemli belirteçlerindedir. Anti-androjen maruziyetine çok hassastır. Yapılan hayvan çalışmalarında prenatal DEHP maruziyetinin anogenital mesafede kısılmaya neden olduğu gösterilmiştir (238, 239).

Yapılan bir araştırmaya göre infertilite vakalarının %50'si erkek faktörü kaynaklıdır (23). Ancak 1991 yılında Fransa'nın üç bölgesinde yapılan ve 1.850.000 kişinin takip edildiği bir çalışmada, 1686 çiftin infertilite sebebiyle kliniklere başvurduğu gözlenmiştir (240). Bu çalışmaya göre erkek infertilitesi vakaları toplam vakaların %20'sini oluşturmaktadır ve semen kalitesinin ciddi anlamda düştüğü gözlenmiştir. Yapılan insan çalışmalarında çeşitli maruziyet kaynaklarından (iş yeri, içme suyu vb) kronik olarak DEHP'e maruz kalan erkeklerde sperm sayısında azalma gözlenmiştir (241-244). Sperm motilite ve morfoloji bozuklukları ise daha çok DEHP değil, metabolitleri kaynaklı gözlenmiştir (245-248).

Erkek üreme sisteminin yapısı göz önüne alındığında HPG eksenini hormonal ve gelişimsel düzenin sağlıklı bir şekilde devam edebilmesi için kritik bir öneme sahiptir. Özellikle pubertenin tam zamanında olması HPG ekseninin düzgün çalışmasına ve testosteron salgısının uygun seviyelerde üretiliyor olmasına bağlıdır (249). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda DEHP maruziyetinin HPG ekseninin homeostazını bozabildiği belirlenmiştir (250-253). Bununla beraber gestasyonel maruziyetin de erkek yavrularda cinsiyet gelişimini etkileyebildiği ve gonadal disfonksiyona sebep

olabildiği bilinmektedir (234, 254). Özellikle pre-pubertal ve post-pubertal erkek sıçanlarda serum testosteron seviyelerini azaltarak Leydig hücre proliferasyonunu etkilediği (255, 256), ROS üretimini artırdığı, apoptozu indüklediği ve steroidojenezi olumsuz olarak etkilediği (257-259) belirlenmiştir. Ayrıca iş yeri maruziyetinin incelendiği bir çalışmada, plazma DEHP ve metaboliti olan mono (2-etil hekzil) ftalat (MEHP) seviyeleri yüksek olan erkek işçilerde hormon metabolizmasının bozulduğu, oksidatif stresin ve DNA hasarının arttığı anlaşılmıştır (260). Benzer şekilde 2020 yılında yayınlanan ve 2013-2016 yılları arasında 20 yaş üstü 1420 erkek ile yapılan bir çalışmada, serum DEHP seviyeleri diğerlerine göre yüksek olan erkeklerde total ve serbest testosteron seviyelerinin düşük olduğu belirlenmiştir (261). Yetişkin erkek testisinden elde edilen primer hücre kültüründe DEHP ve primer metaboliti MEHP'in testosteron üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir (262).

DEHP maruziyetinin dozu ve maruziyet yolu kadar yaşamın hangi safhasında maruz kaldığı da önem taşımaktadır. Prenatal, neonatal, prepubertal, pubertal veya yetişkinlik döneminde maruziyetin sonuçları birbirinden farklı olabilmektedir. Pubertal sıçanlarda kısa süreli DEHP maruziyetinin, DHEA, androstenedion ve testosteron seviyelerini değiştirdiği, oksidatif reaksiyonlarda görev alan CYP2C11 ve CYP3A2 aktivitelerini artırdığı anlaşılmıştır (263). Benzer şekilde pubertal sıçanlarda 250 mg/kg/gn dozda DEHP maruziyetinin hücre homeostazında görev alan PI3K-Akt-mTOR yolağında görev alan proteinlerin ekspresyonlarını azaltarak, oksidatif strese, testiste morfolojik değişimlere, apoptoza ve sperm morfolojisinde bozulmalara neden olduğu belirlenmiştir (264). Pre-pubertal dönemde düşük doz DEHP ise yetişkinlik dönemine göre daha fazla DNA hasarı, genotoksisite, histolojik, immünohistokimyasal ve morfolojik değişimlere, hormon seviyelerinde kalıcı bozulmalara sebep olmaktadır (265). Bu durum prepubertal dönemde üreme sisteminin henüz gelişimini tamamlamamış olmasından ve oluşan hasarın yetişkinliğe aktarılmasından kaynaklanmaktadır. Kadınlarda prepubertal maruziyetin, erken puberteye yol açabileceğine dair veriler olsa da (266-268), erkeklerde bu veriler yeterli değildir ve birbiri ile tutarsızdır (269, 270).

Maruziyetin bir diğer sonucu bu toksik etkilerin epigenom üzerinde değişimlere sebep olarak, ilgili bozukluğun bir sonraki jenerasyona aktarılma

olasılığdır. Yapılan bazı çalışmalarda özellikle prenatal maruziyet sonucu östrojen ve testosteron reseptörlerine ait proteinleri sentezleyen genlerde hipo/hipermetilasyon meydana gelebildiği gösterilmiştir (271-274). Meydana gelen bu değişimin sperm motilitesi ve morfolojisi ile ilişkisi belirlenmiş ve PPAR proliferasyonunun da bu konuda bir etkisi olabileceği düşünölmekle birlikte, henüz mekanizma anlaşılamamıştır (275, 276). Prepubertal maruziyetin spermatogenezde görevli histonların (277) asetilasyon profillerini de etkilediği, bazı antioksidanların DEHP'in bu etkisini engelleyerek spermatogenez bozukluklarına bağılı infertilitede olumlu sonuçlar ortaya çıkarabildiği belirlenmiştir (278). Bu epigenetik değişimlerin birkaç nesil sonraya aktararak, ilk jenerasyonda görülenden daha ciddi infertilite, testis steroid kapasitesi ve spermatogenez problemlerine yol açabileceği unutulmamalıdır (32). Ayrıca, yukarıda da belirtildiği gibi, ana molekül yerine metabolit olan MEHP'in de epigenetik etkileri olabileceğine dair yapılan bir çalışmada, MEHP'in yağ metabolizması ve obezite ile ilişkili proteinin üretiminde yer alan RNA'larda hipermetilasyon yaparak Leydig hücrelerinde hasara sebep olabileceği belirlenmiştir (279).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Buz makinesi	Scotsman AF-100
Buzdolabı	Arçelik
Deiyonize su cihazı	Barnstead EASYpure UV
Derin dondurucu (-20 C ⁰)	Arçelik, AEG-1350S
Derin dondurucu (-80 C ⁰)	Revco ULT1386-5-V36
Dijital kamera	Leica DC490
Doku prosesleme aleti	Leica EM Tissue Processor
ELISA karıştırıcısı	Tecan
ELISA plak okuyucu	Molecular Devices SPECTRAmax M2
Ependorf tüpü	Kapaklı, 1.5 ml
Etüv	Dedeoğlu
Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC-MS-QP2010 Ultra)	Shimadzu
Hassas terazi	Mettler
Hassas terazi	AND GR-202
Hemositometre	Marienfeld
Homojenizatör	Thomas Scientific
Işık mikroskopu	Leica DM 6000
Işık mikroskopu takip cihazı	Leica TP1020
İnser (250 µl)	Agilent Technologies
Lam	Isolab
Lamel	Isolab
Laminar flow	Heraeus
Mikro pipet 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf, Mettler, Finnpipette
Mikrosantrifüj cihazı	Hettich
Nanodrop	Maestrogen Spectrophotometer
Parafin istasyonu	Leica Eg1150H

pH metre	NEL, pH 890
pH metre elektrodu	Hanna, HI 1131
Santrifüj cihazı	Hettich Universal 30RF, Barnstead, SIGMA 3K30
Sıvı rezervuarı	Isolab
Su banyosu	Kotterman Labortechnik
Ultrasonik banyo	Ellma Transsonic 460/H
Vial (2ml) ve vial kapağı	Agilent Technologies
Vorteks	Janke & Kunkel VF 2
Yatay çalkalayıcı	Heidolph Rotamax 120 Instruments
Yüklü adezivli lam	Laborant

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

2,2,2-Trifloro-N-metil-N-(trimetilsilil)- asetamid ile %1 klorotrimetilsilan (MSTFA plus 1% TMCS)	Thermo Fisher Scientific
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Lab Vision Ultra Vision Plus Detection System
Alüminyum potasyum sülfat	Sigma-Aldrich
Amonyak	Atabay Kimya Sanayi ve Ticaret A.Ş.
Apoptoz kiti	Roche
Asetik asit	Sigma-Aldrich
Aseton	Merck Millipore
Di- (2-etil hekzil) ftalat (DEHP)	Sigma-Aldrich
DiffQuik Boyama Kiti (Modified Giemsa)	Electron Microscopy Sciences Inc.
DNA İzolasyon Kiti	NucleoGene
Dietilen triamin penta asetik asit (DTPA)	Sigma-Aldrich
Eozin yellowish (Eozin Y)	H&E
Sabitleme çözeltisi, Entellan®	Merck Millipore
Etil Alkol (%96)	Alkomed

Fosfat tampon tuzu (PBS)	Abcam
Gliserol	Merck Millipore
Global DNA metilasyon kiti	Epigentek
Hematoksilen kristali	Merck
Heparin (Nevparin)	Mustafa Nevzat
Hidrojen peroksit	Merck
Histon H3 Asetilasyon kiti	Epigentek
Kloral hidrat	Riedel-de Haen
Koyun serumu	A. Ü. Veterinerlik Fakültesi'nden alınmıştır.
Ksilol	VWR Prolabo Chemicals
Metafosforik asit	Sigma-Aldrich
Metanol (%99,9)	Merck
Metoksiamin hidroklorür	Sigma-Aldrich
Miristik asit d27 Atom %D, %99	Sigma-Aldrich
Nükleer ve sitoplazmik ekstraksiyon kiti	Thermo Scientific
NE-PER™	
Fosfat tamponu (PBS)	Sigma
Pikrik Asit	Sigma-Aldrich
Fenil metil sülfonil florid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör γ (PPAR- γ) transkripsiyon faktör kiti	Cayman Chemical
Protein miktar tayini kiti (BCA kiti)	Sigma – Aldrich
Serum fizyolojik	Osel İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma-Aldrich
Sitrik asit	Merck
Sodyum iyodat	Sigma-Aldrich
Sperm yıkama sıvısı, Pure Sperm Wash ®	NidaCon International
Tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) ölçüm kiti	Cayman Chemical
Tiyopental	İ.E. Ulagay
Total antioksidan kapasite ölçüm kiti	Rel Assay Diagnostics

Total glutatyon (GSH) ölçüm kiti	Cayman Chemical
Trikloroasetik asit (TCA, % 100) çözeltisi	Sigma-Aldrich
Trietanolamin	Sigma-Aldrich
Tris (hidroksimetil) aminometan (TRIS)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Merck

3.3. Deneysel İşlemler ve Yöntemler

3.3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Dozlanması

Sunulan tez çalışması kapsamında yer alan deney hayvanı çalışmaları, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınan G.Ü.ET-18.012 kod numaralı etik kurul onayı ile yapılmıştır (EK.1.'de sunulmuştur) Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları ünitesinden Sprague-Dawley erkek sıçanlar doğumlarından 21-23 gün sonra (sütten kesilmeyi takiben) alınmış ve rastgele yöntemle kontrol (K, n=6), düşük doz DEHP (DD, n=6) ve yüksek doz DEHP (YD, n=6) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. DD grubu için seçilen doz üreme sistemi için en düşük ters etki gözlenen düzey (LOAEL, 30 mg/kg/gün), YD grubu için seçilen doz ise LOAELx2 (60 mg/kg/gün) olarak belirlenmiştir.

Sıçanların dozlanması amacıyla iki ayrı DEHP çözeltisi hazırlanmıştır. DD grubundaki sıçanların dozlanması amacıyla 750 mg DEHP tartılarak 100 ml mısır özü yağında çözülerek 7,5 mg/ml DEHP çözeltisi hazırlanmıştır. 125 g ağırlığında bir hayvana bu çözülden 0,5 ml verildiğinde 30 mg/kg/ gün DEHP uygulaması yapılmış olmaktadır. YD grubu için ise 1500 mg DEHP tartılarak 100 ml mısır özü yağında çözülerek 15 mg/ml DEHP çözeltisi hazırlanmıştır. 125 g ağırlığında bir hayvana bu çözülden 0,5 ml verildiğinde 60 mg/kg/ gün DEHP uygulaması yapılmış olmaktadır. Gruplardaki tüm hayvanlar her gün tartılarak ağırlıklarına göre hesaplanan DEHP çözeltisi oral gavaj ile verilmiştir.

Çalışma grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur.

1. Kontrol grubu (n=6): Doğumlarının ardından 23. günden başlayarak adölesan dönem bitimine kadar (37 gün) oral gavajla mısır özü yağı uygulanan erkek Sprague-Dawley sıçanlardan oluşmuştur.

2. DEHP Düşük Doz Grubu (n=6): Doğumlarının ardından 23. günden başlayarak adölesan dönem bitimine kadar (37 gün) oral gavajla 30 mg/kg/gün DEHP uygulanan erkek Sprague-Dawley sıçanlardan oluşmuştur.

3. DEHP Yüksek Doz Grubu (n=6): Doğumlarının ardından 23. günden başlayarak adölesan dönem bitimine kadar (37 gün) oral gavajla 60 mg/kg/gün DEHP uygulanan erkek Sprague-Dawley sıçanlardan oluşmuştur.

Çalışma gruplarda yer alan hayvanlar süttten kesildikten sonra ayrı kafeslere alınarak ağırlıkları tartılmış ve randomize olarak gruplandırılmıştır. Tüm hayvanlar postnatal 23. günden itibaren adölesan dönem bitimine kadar (37 gün boyunca) her gün, son olarak ise dekapite edilmeden hemen önce tartılarak tüm veriler kaydedilmiştir. YD grubunda bir hayvan dozlamasının 10. gününden itibaren, DD grubunda ise bir hayvan dozlamasının 19. gününden itibaren kilo kaybetmeye başlamıştır. Sırasıyla 15. ve 32. günde kafeste ölü olarak bulunmuştur.

Gruplarda yer alan sıçanların dozlanması tamamlandıktan sonra erkek üreme sisteminin gelişiminin tamamlandığı postnatal 10. haftada (280), 100 mg/kg tiyopental anestezisi altında intrakardiyak kan alınması yöntemi ile ötenazi gerçekleştirilmiştir. Dekapitasyonu takiben testis ve epididimis dokuları çıkartılarak serum fizyolojik ile yıkanmış ve tartılmıştır. Sol testis histopatolojik analizler için ayrılmıştır. Sol epididimis ve 3 parçaya ayrılan sağ testis ise sıvı azotta dondurularak analize kadar -80°C’de saklanmıştır. Sağ epididimis sperm izolasyonu için taze olarak ileri işleme tabi tutulmuştur.

3.3.2. Sperm Parametreleri

Çalışma gruplarından elde edilen sol epididimis yağ dokularından ayrıldıktan sonra kuyruk (cauda) kısmı bir tüpe alınmıştır. Üzerine 1 ml sperm yıkama sıvısı eklenerek anatomik makas yardımı ile parçalanmıştır. Epididimal spermlerin

serbestleşmesini takiben 1500 devir/dk ile 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet sperm sayımı, motilite ve morfolojisinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Sperm Sayımı ve Motilitesinin Değerlendirilmesi

Santrifüj ile elde edilen epididimal spermelere ait pellet, sperm yıkama çözeltisi kullanılarak uygun şekilde süspande edilmiştir. Bu süspansiyonun 10 µl'si hemositometreye yayılarak sperm sayılmış, sperm motilitesi ise ileri hareketli ve hareketsiz sperm olarak değerlendirilmiştir.

Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi

Epididimal sperm süspansiyonundan 10 µl alınarak bir lam üzerine damlatılmıştır ve 45 derecelik açı verilen başka bir lam kullanılarak sperm yayma preparatı hazırlanmıştır. Daha sonra DiffQuik kiti kullanılarak boyama işlemi yapılmıştır. Kitteki tüm çözeltiler (fiksatif, çözelti I ve çözelti II) kullanıma hazır olarak bulunmaktadır. Boyama işlemi aşağıdaki gibi yapılmıştır.

1. Kuruyan örnekler 1,5 dakika boyunca fiksatif içinde bekletilir.
2. Fiksatiften çıkarılan örnekler 5 dakika boyunca çözelti I içinde bekletilir ve presleme yapılarak fazla boyadan arındırılır.
3. Takiben örnekler 5 dakika boyunca çözelti II içinde bekletilir ve presleme yapılarak fazla boyadan arındırılır.
4. Son olarak 5-6 kere distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.

Her örnek mikroskop altında x40'lık büyütme oranı ile morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Her örnekte 4 kere 100 sperm sayılmıştır. Morfolojik değerlendirmede normal sperm morfolojisi gösteren sperm, başsız, kuyruksuz, kıvrık kuyruklu (curved), sarmal kuyruklu (coiled), düğümlü (looped) kuyruklu sperm sayılarak, bulunan sonuçların ortalaması alınıp yüzde olarak verilmiştir.

3.3.3. Histopatolojik Analiz

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Doymuş Pikrik Asit Çözeltisi: Pikrik asidin deiyonize sudaki doymuş çözeltisidir. %1,3 oranında pikrik asit içerir.

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

%90'lık alkol çözeltisi: 100 ml %96'lık alkol 7 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanır.

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

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

Mayer's Hematoksilen Boyası: 1 g hematoksilen kristali, 50 gr alüminyum potasyum sülfat ve 0,2 g sodyum iyodat tartılır. 1000 ml distile sudan bir miktar eklenerek önce maddeler çözülür ve geri kalan su üzerine eklenir. Elde edilen çözeltiye 50 gr kloral hidrat ve 1 gr sitrik asit eklenerek kaynatılır. Soğuyan karışımın içinde tortu kaldıysa süzülerek kullanılır.

Amonyaklı su: 500 ml distile suya 3 damla derişik amonyak eklenerek hazırlanır.

Eozin Boyası: 3 g eozin Y tartılarak 1000 ml distile su ile çözülür. Elde edilen çözeltiye 125 ml %96 etanol, 375 ml distile su ve 2 damla glasiyal asetik asit eklenir.

Doku Fiksasyonu

1. İlk olarak testis dokuları Bouin çözeltisi içinde 18 saat fikse edilir.

2. Fikse edilen dokular ışık mikroskopu takip cihazına konularak dehidrate etmek amacıyla her birinde 1 saat olacak şekilde sırasıyla %70, %80, %90, %96 ve mutlak alkolde bekletilir.
3. Takiben şeffaflandırma işlemi için dokular 2 kere 1 saat ksilolde bekletilir.
4. Tüm dokular parafine alıştırma amacıyla 2,5 saat boyunca saf parafinde bekletilir.
5. Takip cihazından çıkarılan örnekler parafin istasyonunda saf parafine gömülür.
6. Elde edilen bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınır.

Hematoksilen-Eozin ile Boyama

1. Parafin bloklardan alınan kesitler 60°C'ye ayarlanmış bir etüvde bir gece dinlendirilir.
2. Ertesi gün kesitler 15 dakika ksilolde ve takiben 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve bu işlem toplamda 3 kere yapılarak dokuların deparafinize olması sağlanır.
3. Oda sıcaklığında kuruyan kesitler iki kere 10 dakika %96'lık alkolde ve bir kere 10 dakika %80'lik alkolde bekletilir.
4. Tüm kesitler önce çeşme suyundan sonra kaynar sudan geçirilir.
5. Mayer's Hematoksilen boyasında 15 dakika bekletilerek boyama işlemi gerçekleştirilir.
6. Daha sonra çeşme suyunda yıkanan kesitler amonyaklı suya batırılıp çıkartılır ve tekrar çeşme suyunda yıkanarak fazla boyanın kesitlerden uzaklaştırılması sağlanır.

7. Yıkanan kesitler 1 dk boyunca Eozin boyası içinde bekletilir.
8. Takiben 1 kere %80, 1 kere %96'lık ve 1 kere absolü alkole batırılıp çıkartılarak oda sıcaklığında bekletilir.
9. Dehidrate kesitler en az 45 dakika boyunca ksilolde bekletilerek şeffaflandırma işlemi yapılır ve sabitleme çözeltisi Entellan® ile kapatılarak ışık mikroskobu ile incelenir.

3.3.4. Apoptoz Tayini

Çalışma gruplarından alınan testis dokusunda bulunan apoptotik hücrelerin tayini, TUNEL (terminal deoksinükleotidil transferaz-aracılı dUTP işaretleme) yöntemi esasına göre çalışan ticari *in situ* hücre ölümü tayini kiti kullanılarak yapılmıştır.

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Hidrojen peroksit çözeltisi (%3): 200 µl %30'luk hidrojen peroksit çözeltisi üzerine 900 µl distile su ve 900 µl metanol eklenir.

Triton X-100 çözeltisi (%0,1): 0,01 gr trisodyum sitrat tartılarak 10 ml distile suda çözülerek karışımın üzerine 10 µl Triton X-100 eklenir.

PBS tampon çözeltisi: 40 ml PBS üzerine 960 ml distile su eklenir. pH: 7,6 olarak ayarlanır.

PBS-BSA çözeltisi (%2,5): 2.5 ml sığır serum albümini (BSA) üzerine 100 ml PBS eklenir.

Koyun serumu çözeltisi (1/20): 100 µl koyun serumu üzerine 1900 µl PBS-BSA çözeltisi eklenir.

3,3'-Diaminobenzidine (DAB) çözeltisi: 40 µl DAB kromojen üzerine 2 ml DAB substrast eklenerek filtre ile süzülür.

TUNEL Boyama

TUNEL yöntemi ile boyama 3 aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

1. Deparafinizasyon: Doku kesitleri 60°C'lik etüvde bir gece boyunca inkübe edilerek hematoksilen-eozin boyama işleminde yapıldığı gibi ksilen ve alkol serilerinden geçirilir. Distile su ile yıkanan deparafinize kesitler, %3'lük hidrojen peroksit çözeltisinde 10 dakika bekletilerek endojen peroksidazlar inhibe edilir. Daha sonra PBS tampon çözeltisi ile 3 kere yıkanarak, buz üzerinde %0.1 Triton X-100 içerisinde 8 dakika bekletilir ve doku permeabilitesi artırılır. Son olarak kesitler 3 kere PBS tamponu ile yıkanır.
2. TUNEL yöntemi ile işaretleme: Spesifik olmayan boyanmanın engellenebilmesi amacıyla kesitler koyun serum çözeltisinde 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Kit içerisinde kullanıma hazır olarak bulunan işaretleme çözeltisinden 450 µl, enzim çözeltisinden 50 µl alınarak reaksiyon karışımı hazırlanır. İnkübasyon bittikten sonra, negatif kontrole 50 µl işaretleme çözeltisi, örneklere 50 µl reaksiyon karışımı eklenerek homojen olarak dağılması sağlanır. Örnekler ve negatif kontrol 37°C'de nemli ve karanlık ortamda, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. İnkübe edilmiş örnekler 3 kere PBS tamponu ile yıkanır.
3. Sinyal dönüşümü: Her örneğe kitle kullanıma hazır olarak bulunan converter-POD çözeltisinden 50 µl eklenip homojen şekilde dağıtılarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Takiben örnekler 1 kere PBS tamponu ile yıkanır ve DAB çözeltisinde 5 dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra tüm örnekler distile su ile yıkanır. Daha sonra çekirdeklerin boyanması için 45 saniye Hematoksilin ile boyanır ve PBS ile yıkanarak boyanın fazlalık kısmı uzaklaştırılır. Son olarak tüm örnekler 15 dakika ksilende bekletilerek entellan ile kapatılır.

Basamaklar tamamlandıktan sonra örnekler X200 ve X400 büyütme oranı ile ışık mikroskopunda incelenmiştir. Her örnekte 20 adet seminifer tübül incelenerek, pozitif olarak boyanan hücrelerin (apoptotik hücreler) sayısı belirlenmiştir.

3.3.5. Doku Homojenizasyonu

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Tris/PMSF/DTPA Tamponu: Tampon çözeltisi 10 mM Tris, 1 mM PMSF ve 1 mM DTPA içerir. Hazırlanan tamponun ömrü 48 saattir ve soğukta bekletilmelidir. 302,85 g Tris (MA: 121,14 g/mol), 98,325 g DTPA (MA: 393,3 g/mol) ve 348,4 mg PMSF (MA: 174,2 g/mol) tartılır. Tartılan Tris ve DTPA bir kap içerisine alınarak bir miktar suda çözülür. Başka bir kapta 20 ml izopropil alkol ile PMSF karıştırılır. PMSF çözeltisinden alınan 2,5 ml Tris-DTPA karışımına eklenir ve karışım distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.

Doku Homojenatlarının Hazırlanması

1. Homojenize edilecek testis dokusu tartılarak mg cinsinden ağırlık kaydedilir.
2. Doku örneklerine 1:5 (a/h) olacak şekilde Tris/PMSF/DTPA tamponu eklenir.
3. Doku parçası ve tampon homojenizatöre alınarak buz içinde homojenize edilir.
4. Homojenat 10 dk 4000 rpm hızda ve 4°C'de santrifüj edilir.
5. Süpernatant GSH, total antioksidan kapasite, MDA ve total protein seviyelerinin ölçümü için alikotlarına ayrılarak -80°C'de analize kadar saklanır.

3.3.6. Protein Miktar Tayini

Total protein miktar tayini, alkali pH'da oluşturulan protein kompleksindeki Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesi ve BCA'nın alkali pH'da Cu^{+1} ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan mavi-mor renkli kompleksin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanan ticari bir kit kullanılarak yapılmıştır.

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Standart Çözeltileri: Kit içeriğinde bulunan protein stok çözeltisinin konsantrasyonu $1000 \mu\text{g/ml}$ 'dir. Bu çözeltiden hareketle 100, 50, 30, 20, 10, 5, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında standartlar hazırlanır. Kör olarak ise sadece distile su kullanılır.

Çalışma Çözeltisi: Kit içeriğinde kullanıma hazır olarak sunulan QuantiPro Buffer QA, QuantiPro Buffer QA ve Bakır (II) sülfat çözeltilerinden sırasıyla 5 ml, 5 ml ve $200 \mu\text{l}$ alınarak hazırlanır. Çözeltinin deney sırasında taze olarak hazırlanması gerekmektedir.

Protein Miktarının Ölçülmesi

1. Doku homojenatları $1/30$ oranında, spermden elde edilen histon ekstraktı ise $1/5$ oranında distile su ile seyreltilir.
2. Kör, standart çözeltiler ve örneklerin her birinden kuyucuklara $150 \mu\text{l}$ konulur, en az dublike olarak çalışılır.
3. Tüm kuyucuklara $150 \mu\text{l}$ çalışma çözeltisi eklenir ve plağın üstü kapatılır.
4. Yatay çalkalayıcıda 1-2 dakika karıştırılarak 37°C 'de 2 saat inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonrası 562 nm 'de absorbans ölçülür.

Protein Miktarının Hesaplanması

Öncelikle kör/standart/örneklere ait absorbands değerlerinin (A_1 ve A_2) ortalamaları alınır ve tüm değerlerden köre ait absorbands değeri çıkartılarak örnek ve standartlara ait absorbands değeri hesaplanır. Standartlara ait absorbands değerleri kullanılarak 0'dan geçen bir standart eğri oluşturulur. Doğru denklemini kullanılarak örneklere ait protein düzeyleri $\mu\text{g/ml}$ cinsinden hesaplanır.

3.3.7. Total Glutasyon Tayini

Testis dokusunda total GSH düzeyleri, glutasyon redüktazın (GR) da içinde yer aldığı bir enzimatik geri dönüşüm reaksiyonunun esasına göre çalışan ticari kit kullanılarak yapılmıştır. Yöntemin esası, GSH'da bulunan sülfidril grupları ile DTNB'nin reaksiyona girmesi ile meydana gelen GSTNB'nin GR tarafından redükte GSH ve TNB'ye parçalanması esasına dayanır. Oluşan TNB'nin absorbandsı 414 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (281).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Metafosforik Asit Çözeltisi (0,1 g/ml): 5g metafosforik asit ile 50 ml distile su karıştırılarak hazırlanır.

4 M Trietanolamin çözeltisi: 531 μl trietanolamin ve 469 μl distile su karıştırılır. Çözelti oda sıcaklığında 4 saat dayanıklıdır.

Seyreltilmiş 2-etansülfonik Asit (MES) Tamponu: Kit içeriğinde bulunan 60 ml MES tamponu ile 60 ml distile su karıştırılır.

Standart Çözeltileri: Kit içinde bulunan 25 μM GSSG stok çözeltisinden hareketle 8, 6, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 μM 'lık standartlar MES tamponu ile hazırlanır. Kör olarak seyreltilmiş MES tamponu kullanılır. Standart çözeltiler 4°C'de 1 yıl dayanıklıdır.

Ko-Faktör Karışımı: Kit içinde hazır olarak bulunan liyofilize toz karışımı 0,5 ml distile su ile karıştırılır. İçeriğinde NADP⁺ ve glukoz-6-fosfato-faktör karışımı 4°C’de 2 hafta dayanıklıdır.

Enzim Karışımı: Kit içinde hazır olarak bulunan ve GR ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz içeren enzim karışımına 2 ml seyreltilmiş MES tamponu eklenir. Enzim karışımı 4°C’de 2 hafta dayanıklıdır.

DTNB Karışımı: Kit içinde hazır olarak bulunan liyofilize DTNB kullanılmadan hemen önce 0,5 ml distile su ile karıştırılır ve kullanılabileceği kadar buz içinde bekletilir. Hazırlandıktan sonra 10 dakika içinde kullanılmalıdır.

Çalışma Çözeltisi: 11,25 ml seyreltilmiş MES tamponu, 0,45 ml ko-faktör karışımı, 2,1 ml enzim karışımı, 2,3 ml distile su ve 0,45 ml DTNB karışımı kullanılarak hazırlanır. Deney sırasında kullanılmadan hemen önce hazırlanmalı ve 10 dakika içinde kullanılmalıdır.

Glutasyon Düzeyinin Ölçülmesi

1. 0,5 ml doku homojenatı ile 0,5 ml metafosforik asit çözeltisi karıştırılır.
2. 5 dakika oda sıcaklığında beklettikten sonra 2 dakika 5000 rpm’de santrifüj edilir.
3. Tüm süpernatan ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne alınır. Eğer bu aşamada deney durdurulacaksa süpernatanlar -20 derecede 6 ay dayanıklıdır.
4. 50 µl 4 M trietanolamin çözeltisi eklenerek karıştırılır. Bu aşamadan sonra örneklerin hemen analiz edilmesi gerekmektedir.
5. 50 µl kör/standart/örnek kuyucuklara eklenir. En az dublike olarak çalışılır.

6. Tüm kuyucuklara 150 µl çalışma çözeltisi eklenir ve ışıktan koruyacak şekilde kapatılarak yatay çalkalayıcıda ve oda sıcaklığında 25 dakika boyunca karıştırılır.
7. Absorbans değerleri 414 nm’de ölçülür.

Glutasyon Düzeyinin Hesaplanması

Öncelikle kör/standart/örneklere ait absorbans değerlerinin (A1 ve A2) ortalamaları alınır ve tüm değerlerden köre ait absorbans değeri çıkartılarak örnek ve standartlara ait absorbans değeri hesaplanır. Standartlara ait absorbans değerleri kullanılarak 0’dan geçen bir standart eğri oluşturulur. Doğru denklemi kullanılarak örneklere ait GSH düzeyleri nmol GSH/mg protein cinsinden hesaplanır.

3.3.8. Lipit Peroksidasyonu Düzeylerinin Ölçümü

Testis dokusundaki lipit peroksidasyonu düzeyleri, yüksek sıcaklıkta ve asidik koşullarda oluşan MDA ve tiyobarbitürik asit kompleksinin renk şiddetinin 530 nm’de ölçen ticari bir kit ile belirlenmiştir (282).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Asetik Asit Çözeltisi: Kit içeriğinde bulunan 40 ml asetik asit 160 ml distile su ile karıştırılır. Bu çözelti oda sıcaklığında saklandığında 3 ay dayanıklıdır.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi: Kit içeriğinde bulunan 20 ml NaOH ile 180 ml distile su karıştırılır. Bu çözelti plastik bir şişe içerisinde oda sıcaklığında saklandığında 3 ay dayanıklıdır.

Standart Çözeltileri: Kit içeriğinde bulunan 500 µM MDA stok çözeltisinden 250 µl alınır ve 750 µl distile su karıştırılarak 125 µM ara stok çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltiden su ile dilüsyon sonucu 50, 25, 10, 5, 2,5, 1,25 ve 0,625 µM konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanır. Kör olarak distile su kullanılır.

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

Renk Reaktifi: Kit içeriğinde bulunan tiyobarbitürük asitten 530 mg tartılır, 50 ml asetik asit çözeltisi ve 50 ml sodyum hidroksit çözeltisi ile karıştırılır. Hazırlanan çözelti 24 saat dayanıklıdır.

Lipit Peroksidasyon Düzeyinin Ölçülmesi

1. 10 ml'lik cam deney tüpüne 100 µl kör/standart/örnek konularak üzerine kit içeriğinde kullanıma hazır olarak bulunan 100 µl sodyum dodesil sülfat eklenir ve iyice karıştırılır.
2. Her tüpe 4 ml renk reaktifi eklenerek ağzı sıkıca kapatılır ve 90°C'de su banyosunda 1 saat inkübe edilir.
3. İnkübasyon süresi sonunda tüm tüpler hızlıca buza konularak 10 dakika soğutulur.
4. Daha sonra 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, 150 µl süpernatant kuyucuklara eklenir. En az dublike olarak çalışılır.
5. Absorbans değerleri 530 nm'de ölçülür.

Lipit Peroksidasyon Düzeyinin Hesaplanması

Kör/standart/örneklere ait absorbans değerlerinin (A1 ve A2) ortalamaları alınır ve tüm değerlerden köre ait absorbans değeri çıkartılarak örnek ve standartlara ait absorbans değeri hesaplanır. Standartlara ait absorbans değerleri kullanılarak 0'dan geçen bir standart eğri oluşturulur. Doğru denklemleri kullanılarak örneklere ait MDA düzeyleri nmol MDA/mg protein cinsinden hesaplanır.

3.3.9. Total Antioksidan Kapasite Tayini

Testis dokusuna ait total antioksidan kapasite, koyu mavi renkli 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) radikalinin örnekte bulunan antioksidan moleküller tarafından renksiz ABTS formuna dönüştürülmesi sırasında meydana gelen

absorbans değişiminin 660 nm'de ölçülmesi esasına dayanan ticari bir kit kullanılarak belirlenmiştir. Kör olarak distile su kullanılmıştır (283).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Reaktif 1: 0,4 mol/L pH 5,8 asetat tamponu içerir. Kit içeriğinde kullanıma hazır olarak sunulmuştur.

Reaktif 2: 30 mmol/L ABTS içeren prokromojen çözeltisidir. Kit içeriğinde kullanıma hazır olarak sunulmuştur.

Standart çözeltisi: 1 mmol/L Trolox içerir. Kit içeriğinde kullanıma hazır olarak sunulmuştur.

Kalite kontrol çözeltileri: 0,5 mmol/L ve 2,0 mmol/L Trolox içerir. Kit içeriğinde kullanıma hazır olarak sunulmuştur. Reaksiyonun doğruluğunu teyit etmek amacıyla kullanılmaktadır.

Total Antioksidan Kapasitenin Ölçülmesi

1. Kuyucuklara 18 µl kör/standart/örnek eklenir. En az dublike olarak çalışılır.
2. Tüm kuyucuklara 300 µl Reaktif 1 eklenerek 30 saniye sonra 660 nm'de absorbans ölçülür.
3. Daha sonra tüm kuyucuklara 45 µl Reaktif 2 eklenerek ağzı kapatılır. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir.
4. Son olarak 660 nm'de tekrar absorbans ölçülür.

Total Antioksidan Kapasitenin Hesaplanması

Kör/standart/örnek için elde edilen final absorbans değerinden (A_2) ilk absorbans değeri (A_1) çıkartılarak kör/standart/örnek için ΔA değeri hesaplanır. Daha

sonra Formül 3.1. kullanılarak dokudaki total antioksidan kapasite değeri mmol/L cinsinden hesaplanır.

$$\text{Total Antioksidan kapasite } \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) = \frac{(\Delta A_{\text{kör}} - \Delta A_{\text{örnek}})}{(\Delta A_{\text{kör}} \cdot \Delta A_{\text{standart}})} \quad (3.1.)$$

3.3.10. Metabolomik Analiz

Testis dokusuna ait metabolomik profilin belirlenmesi amacıyla, dokuda bulunan metabolitlerin gaz fazına geçirilmesi ve gaz halindeki hareketli faz yardımıyla katı faza olan afinitelerine göre ayrılması esasına dayanan bir yöntem kullanılmıştır. Kromatografi ile ayrılan metabolitler kütle/yük oranlarına göre belirlenerek, özel istatistik yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır (284).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Metanol çözeltisi (%99,9): 10 ml metanol üzerine 90 ml deiyonize su eklenir.

Metoksiamin Çözeltisi (20 mg/ml): 100 mg metoksiamin hidroklorür tartılarak 20 ml piridin ile çözülür.

Doku Ön İşlemi

Doku ön işlemlerinin tamamı buz üstünde yapılmıştır ve kullanılan tüm çözeltiler ve malzemelerin soğuk olması sağlanmıştır.

1. Boş mikrosantrifüj tüpleri buza saplanarak soğutulur.
2. Daha önce kısımlara ayrılan testis dokusu bir havanın içine alınır. Sıvı azot ile dondurulur ve iyice ezilerek toz haline getirilir.
3. Ezilen toz, soğutulmuş mikrosantrifüj tüpünün içinde tartılır.
4. Dokudan alınan her mg için 30 µl metanol çözeltisi eklenir.

5. Mikrosantrifüj tüpü buza saplanarak, doku parçaları ultrasonik prob yardımıyla tamamen homojenize edilir. Homojenize edilen dokular tüm işlemler bitene kadar -20°C 'de bekletilmelidir.
6. Homojenizasyon işlemi bittikten sonra tüm örnekler 1500 rpm ve -8°C 'de 20 dakika boyunca santrifüj edilir ve 400 μl süpernatant soğutulmuş mikrosantrifüj tüpüne alınır.
7. Ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne her örnekten 200 μl süpernatant alınarak karıştırılır. Bu karışım analiz sırasında kalite kontrol çözeltisi (QC) olarak kullanılacaktır.
8. Tüm örnekler kuruluğa kadar uçurulur. Bu örnekler analize kadar -80°C 'de saklanmalıdır.

Türevlendirme ve Metabolomik Analiz

Türevlendirme işlemlerinin tamamı çeker ocak altında ve gaz maskesi kullanılarak yapılmıştır.

1. Kurutulmuş numunelerin üzerine 20 μl metoksiamin çözeltisi eklenir. Kapağı sıkıca kapatılır ve karıştırılır.
2. Örnekler 30°C 'de 90 dakika inkübe edilir.
3. İnkübasyondan sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletilen örnekler 80 μl MSTFA eklenir. Kapağı sıkıca kapatılır ve karıştırılır.
4. Örnekler 37°C 'de 30 dakika inkübe edilir.
5. İnkübasyondan sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletilen örneklerden 100 μl alınarak içine insert yerleştirilmiş viallere aktarılır ve GC-MS ile analiz edilir. Analiz şartları Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. GC-MS Analiz Şartları

Cihaz	GCMS-QP2010 Ultra
Kolon	DB5-MS kolon (30 m +10 m duraguard x 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness)
Gecikme zamanı	5,90 dakika
Fırın sıcaklığı	Başlangıç sıcaklığı 60°C, 1 dakika Dakikada 10°C artış Final sıcaklık 325°C (Soğumadan 10 dakika önceye kadar sabit)
MSD transfer hattı sıcaklığı	290°C
Mobil faz	Helyum
Akış hızı	1 ml He/dakika
Analiz süresi	37,5 dakika
Kütle aralığı	50-650 lton

Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen verilerin düzenlenmesi, piklerin gruplandırılması ve veri matrislerinin oluşturulması işlemleri için MS-DIAL (ver. 4.0) yazılımı kullanılmıştır. Veri matrisleri MS Excel'e aktarılmış, QC'den elde edilen sonuçlar da kullanılarak günler arası varyasyonu elimine etmek amacıyla normalize edilmiştir. Değerlerinin %50'si eksik olan metabolitler (>%30 RSD) GC-MS data matrisinden çıkarılmıştır. Matristen çıkarılan verinin yerine gruptaki en düşük konsantrasyonun yarı değeri

konulmuştur. Metabolitlerin belirlenmesi için, yüksek doğruluk oranına sahip (%70) veri bankası yazılımı olan Fiehn Retention Index Library(LECO Inc, Michigan, ABD) kullanılmıştır.

Daha sonra tüm veriler SIMCA-P+ (Sartorius Inc., Göttingen, Almanya) programına aktarılarak temel bileşenler analizi (PCA) ve kısmi en küçük kareler farklılaştırma analizi (PLS-DA) yöntemleri ile grupların ayrılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları belirlenmiştir.

3.3.11. DNA İzolasyonu

Epididimal spermlerden DNA izole etme işlemi, çeşitli tamponlar kullanılarak lizis yapılması ve serbestleşen nükleik asitlerin kolon filtrede tutulması esasına göre çalışan ticari bir kit ile yapılmıştır.

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Yıkama Çözeltisi I: 5 ml yıkama çözeltisi I ve 5 ml etanol karıştırılır.

Yıkama Çözeltisi II: 7 ml yıkama çözeltisi I ve 7 ml etanol karıştırılır.

Proteinaz K: Kit içeriğinde liyofilize toz halinde gelen enzim 1 ml nükleazsız su ile karıştırılır. Bu çözelti -20°C’de saklanabilir.

Lizis çözeltisi, bağlanma çözeltisi ve elüsyon çözeltisi kullanıma hazır olarak sunulmuştur. Kullanılan çözeltilerin içerik bilgileri kit kullanım kılavuzunda paylaşılmamıştır.

DNA İzolasyonunun Yapılması

1. Bölüm 3.3.2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan sperm lizat 10 dk 5.000 rpm’de santrifüj edilir.
2. Süpernatant atılır ve pellet üzerine 400 µl lizis çözeltisi ve 25 µl Proteinaz K eklenerek 56°C’de inkübe edilir.

3. İnkübasyondan sonra tüplere 400 µl bağlanma çözeltisi eklenerek 15 saniye boyunca karıştırılır.
4. Tüm çözelti spin kolona aktarılarak 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir.
5. Spin kolon yeni bir tüpe alınarak üzerine 500 µl yıkama çözeltisi I eklenir.
6. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
7. Spin kolon yeni bir tüpe alınarak üzerine 750 µl yıkama çözeltisi II eklenir.
8. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
9. Spin kolon yeni bir tüpe alınarak 10.000 rpm'de 3 dakika daha santrifüj edilerek rezidüel alkol uzaklaştırılır.
10. Spin kolon 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 150 µl elüsyon çözeltisi eklenir ve 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
11. Elde edilen çözelti analize kadar -80°C'de saklanır.

İzole Edilen DNA Miktarının Ölçülmesi

Elde edilen çözeltideki DNA miktarı nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

Buna göre;

- $A_{260}/A_{280}=1,9-2,1$
- DNA miktarı = 25 ng-5 µg

Sonuçlar ng/µl cinsinden ifade edilmiştir.

3.3.12. Global DNA Metilasyonu Tayini

Sperm DNA'sına ait global DNA metilasyon düzeyinin belirlenmesi, DNA'ya yüksek afinite gösteren proteinlerle kaplı bir ELISA plağın, örnekte bulunan DNA moleküllerini bağlayarak, DNA'daki metillenmiş sitozinler (5-mC) ile renk reaksiyonu veren antikörlerin oluşturduğu kompleksin renk şiddetinin 450 nm'de ölçülmesi esasına göre çalışan ticari bir kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir (285).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Yıkama Çözeltisi: 13 ml yıkama çözeltisi ile 117 ml distile su karıştırılır. Oluşan çözelti +4°C'de 6 ay dayanıklıdır.

5-mC Kompleks Çözeltisi: 1 ml yıkama çözeltisi ile 1 µl 5-mC antikoru (mcAb) karıştırılır. Daha sonra üzerine 1 µl sinyal indikatörü ve 0,5 µl sinyal artırıcı eklenerek iyice karıştırılır. Bu çözelti taze hazırlanarak 10 dk içinde kullanılmalıdır.

Standart Çözeltiler: 1 µl pozitif kontrol (%5 5-mC içeren 5 ng/µl çözelti) ile 9 µl negatif kontrol karıştırılır. Bu karışımdan hareketle %5, %2, %1, %0,5, %0,2 ve %0,1 pozitif kontrol içeren standart seri hazırlanır.

Bağlanma çözeltisi, developer çözeltisi ve durdurma çözeltisi ticari kit içinde kullanıma hazır olarak sunulmuştur. Kullanılan çözeltilerin içerik bilgileri kit kullanım kılavuzunda paylaşılmamıştır.

Global DNA Metilasyonu Düzeyinin Ölçülmesi

1. Kullanılacak tüm kuyucuklara 100 µl bağlanma çözeltisi eklenir.
2. Üzerine 2 µl negatif kontrol/pozitif kontrol/50 ng DNA içeren örnek eklenerek pipet ile karıştırılır ve 60 dakika 37°C'de inkübe edilir.
3. Kuyucuklardaki sıvı atılarak, 150 µl yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkanır. Bu işlem toplam 3 kere yapılır.

4. Kuyucuklara 50 µl 5-mC kompleks çözeltisi konularak yatay çalkalayıcıda iyice karıştırılır.
5. 50 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, 3. basamaktaki yıkama işlemi toplam 5 kere tekrarlanır.
6. Çoklu kanallı pipet yardımıyla tüm kuyucuklara 100 µl developer çözeltisi eklenir ve koyu mavi renk gözlenene kadar yatay çalkalayıcıda oda sıcaklığında bekletilir. Bu süre 3-4 dakikadır.
7. Mavi renk oluştuğunda 100 µl durdurma çözeltisi eklenerek 1-2 dakika yatay çalkalayıcıda bekletilir.
8. Oluşan sarı renkli kompleksin absorbansı 450 nm’de ölçülür.

Global DNA Metilasyon Düzeyinin Hesaplanması

Pozitif kontrol ve örneklere ait absorbans ortalamalarından negatif kontrole ait absorbans ortalaması çıkartılmıştır. Elde edilen pozitif kontrol absorbansları kullanılarak logaritmik bir absorbans-konsantrasyon grafiği çizilmiştir. Formül 3.2. kullanılarak örneğe ait global DNA metilasyon düzeyleri hesaplanmıştır.

$$Y = a \ln(x) + b \quad \%5\text{-mC} = \frac{e^{\left[\frac{Y-b}{a}\right]}}{S} \times 100 \quad (3.2.)$$

Formülde “x” %5-mC, “Y” örnek absorbansı, “a” eğim, “b” y kesişimi ve “S” deneyde kullanılan ng cinsinden DNA miktarını temsil etmektedir. Sonuçlar %5-mC olarak ifade edilmiştir.

3.3.13. Histon Asetilasyonu Tayini

Sperm DNA’sına ait global histon H3 asetilasyon düzeyinin belirlenmesi, histon proteinine yüksek afinite gösteren proteinlerle kaplı bir ELISA plağın, örnekte bulunan asetillenmiş histonları bağlayarak, spesifik antikorların varlığında

oluşturduğu kompleksin renk şiddetinin 450 nm’de ölçülmesi esasına göre çalışan ticari bir kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir (286).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Lizis (GF1) Çözeltisi: 5 ml GF1 ile 45 ml distile su karıştırılır.

Ekstraksiyon (GF2) Çözeltisi: 100 µl gliserol ile 900 µl GF2 çözeltisi karıştırılır.

Aseton Çözeltisi: 49,865 ml aseton ile 135 µl %37’lik HCl karıştırılır.

Yıkama (GF3) Çözeltisi: 1 ml GF3 ile 9 ml distile su karıştırılır.

Pozitif Kontrol: 60 µg/ml konsantrasyondaki pozitif kontrol vialinden 5 µl alınır 10 ml GF4 (histon tamponu) ile seyreltilir.

Bağlayıcı Antikor Çözeltisi: 100 µg/ml konsantrasyondaki stoktan 10 µl alınır 990 µl antikor tamponu ile karıştırılır.

Deteksiyon Antikor Çözeltisi: 400 µg/ml konsantrasyondaki stoktan 3 µl alınır 2997 µl antikor tamponu ile karıştırılır.

Histon Tamponu (GF4) kit içeriğinde kullanıma hazır olarak sunulmuştur. Kullanılan çözeltilerin içerik bilgileri kit kullanım kılavuzunda paylaşılmamıştır.

Global Histon H3 Asetilasyon Düzeyinin Ölçülmesi

Nükleer Faktör Ekstraksiyon Hazırlığı

1. Sperm lizatı 10 dk 5.000 rpm’de santrifüj edilir. Elde edilen pelletten 40 mg tartılır.
2. 200 µl GF1 çözeltisi eklenerek doku homojenizasyonu yapılır.

3. Elde edilen homojenat 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.

Histon Ekstraksiyonu

4. Süpernatant atılarak pellet üzerine 10 µl GF1 ve 30 µl GF2 eklenir. Karışım iyice karıştırılır ve 5 dakika buzda inkübe edilir.
5. Daha sonra 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir ve süpernatant yeni bir tüpe alınır.
6. 39 µl süpernatanta 13 µl %100 TCA eklenerek buz üzerinde 30 dakika inkübe edilir.
7. Örnekler 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılır.
8. Pellet üzerine 1 ml aseton çözeltisi eklenip karıştırılarak 1 dakika buz üzerinde inkübe edilir.
9. Örnekler 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılır. Tüplerin kapakları açılarak pelletin tamamen kuruması sağlanır (5 dakika).
10. Pellet 10 µl distile su ile süspansiyon edilir. Bu süspansiyon -80°C'de saklanabilir.

Histon H3 Asetilasyonunun Ölçülmesi

11. Süspansiyonun protein miktarı ölçülerek her bir örnek 200 ng/µl protein içerecek şekilde GF4 ile seyreltilir.
12. Kullanılacak hücrelere 5 µl negatif kontrol (GF4)/pozitif kontrol/protein çözeltisi eklenir.
13. 37°C'de 90 dakika ağzı açık şekilde inkübe edilerek kuruması sağlanır.

14. Kuyucuklara 150 µl bloklama çözeltisi eklenir ve 37°C’de 30 dakika inkübe edilir.
15. İnkübasyonu takiben kuyucuktaki sıvı atılarak 150 µl GF3 çözeltisi eklenerek yıkama yapılır. Bu işlem toplam 3 kere tekrar edilir.
16. 50 µl bağlayıcı antikor çözeltisi eklenerek, yatay çalkalayıcı üzerinde (50-100 rpm) oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edilir.
17. Daha sonra 15. basamaktaki yıkama işlemi toplam 4 kere yapılır.
18. 50 µl deteksiyon antikor çözeltisi eklenerek, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilir.
19. Tekrar 15. basamaktaki yıkama işlemi 4 kere yapılır ve son yıkamada çözelti kuyucuk içerisinde 3 dakika bekletilir.
20. 100 µl developer çözelti eklenerek oda sıcaklığında ve ışıktan korunarak mavi renk oluşana dek bekletilir. Bu süre 2-10 dakika sürebilir.
21. Son olarak 50 µl durdurma çözeltisi eklenerek oluşan sarı renkli kompleksin absorbansı 450 nm’de ölçülür.

Global Histon H3 Asetilasyon Düzeyinin Hesaplanması

Elde edilen absorbans verileri ile Formül 3.3. kullanılarak global histon H3 düzeyleri hesaplanmıştır. Sonuçlar % H3 asetilasyonu olarak ifade edilmiştir.

$$\% \text{ H3 Asetilasyonu} = \frac{\text{Absorbans (Örnek-Negatif Kontrol)}}{\text{Absorbans (Pozitif Kontrol-Negatif Kontrol)}} \times 100 \quad (3.3.)$$

3.3.14. Nükleer Protein İzolasyonu

Testis dokusundan nükleer protein izolasyonu, farklı özellikteki tamponlar kullanılarak doku lizatı hazırlamayı sağlayan ticari bir kit kullanılarak yapılmıştır.

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Sitoplazmik ekstraksiyon çözeltisi I (CERI), sitoplazmik ekstraksiyon çözeltisi II (CERII), ve nükleer ekstraksiyon çözeltisi (NER) kullanıma hazır olarak sunulmuştur. Kullanılan çözeltilerin içerik bilgileri kit kullanım kılavuzunda paylaşılmamıştır.

Nükleer Protein Tayini

1. 40 mg testis dokusu tartılarak bir tüpe alınır.
2. 1 ml PBS eklenerek 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek doku yıkanır.
3. Dikkatli bir şekilde tüm PBS atılarak dokunun üzerine 400 µl CER I eklenerek 15 saniye hızlı bir şekilde karıştırılır.
4. Daha sonra tüpler 10 dakika buz üzerinde inkübe edilir.
5. İnkübasyon bittiğinde 22 µl soğutulmuş CER II eklenerek 5 saniye hızla karıştırılır ve 1 dakika buz üzerinde inkübe edilir.
6. Tekrar 5 saniye hızla karıştırılır ve 15000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
7. Süpernatant önceden soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine aktarılır. Bu süpernatant sitoplazmik faktörleri içerir ve -80°C'de saklanabilir.
8. Nükleer faktörleri içeren pellet üzerine soğutulmuş 200 µl NER çözeltisi eklenerek 15 saniye hızla karıştırılır.
9. Tüpler 40 dakika boyunca her 10 dakikada bir 15 saniye karıştırılarak inkübe edilir.

10. İnkübasyon bittikten sonra 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılır ve süpernatant önceden soğutulmuş mikrosantrifüj tüpüne alınır. Nükleer faktörleri içeren bu çözelti analize kadar -80°C'de saklanabilir.
11. Elde edilen lizatlardaki total protein miktarı, BCA kiti kullanılarak ölçülmüştür.

Nükleer Protein Düzeyinin Hesaplanması

Elde edilen lizatlardaki total protein miktarı, Bölüm 3.3.6'da belirtildiği şekilde ölçülmüştür.

3.3.15. Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör- Gamma (PPAR- γ) Düzeyi

Testis dokusunda eksprese edilen PPAR- γ düzeyinin belirlenmesi, PPAR- γ 'ya yüksek afinite gösteren proteinlerle kaplı bir ELISA plağın, örnekte bulunan PPAR- γ 'yı bağlayarak, spesifik antikörlerin varlığında oluşturduğu kompleksin renk şiddetinin 450 nm'de ölçülmesi esasına göre çalışan ticari bir kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuç PPAR- γ DNA bağlanma aktivitesini göstermektedir.

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Bağlayıcı Tampon: Kit içeriğinde hazır olarak bulunan tampon çözeltisinden 2 ml alınarak 18 ml distile su ile karıştırılır. Seyreltilmiş tampon 4°C'de 6 ay dayanıklıdır.

Yıkama Çözeltisi: 5 ml 400x yıkama çözeltisi, 1995 ml distile su ve kit içeriğinde hazır olarak verilen Polisorbata 20 çözeltisinden 1 ml alınarak karıştırılır. Çözelti 4°C'de 2 ay dayanıklıdır.

Reaksiyon Tamponu: 7008 μ l distile su, 2400 μ l 4x reaksiyon tamponu, 96 μ l Reaktif A ve 96 μ l 300 mM dithiotreitol (DTT) karıştırılır. Reaktif A ve DTT kit içeriğinde hazır olarak sunulmuştur. Bu çözelti kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanmalıdır.

PPAR- γ Antikor Çözeltisi: 100 μ l PPAR- γ antikorunu ile 9900 μ l bağlayıcı tampon karıştırılarak ve taze olarak hazırlanır.

HRP Konjugatı: 100 μ l anti-tavşan HRP konjugatı ile 9900 μ l bağlayıcı tampon karıştırılarak ve taze olarak hazırlanır.

Standart Çözeltiler: Kit içeriğinde hazır olarak sunulan ve saflaştırılmış hücre lizati içeren pozitif kontrolden hareketle, reaksiyon tamponu ile yarı yarıya seyreltilerek 6 dilüsyon hazırlanması önerilmektedir. Kör olarak reaksiyon tamponu kullanılmıştır.

Developer çözeltisi ve durdurma çözeltisi ticari kit içinde kullanıma hazır olarak sunulmuştur. Kullanılan çözeltilerin içerik bilgileri kit kullanım kılavuzunda paylaşılmamıştır.

PPAR- gamma Düzeyinin Ölçülmesi

1. Örnekler eşit miktarda protein içerecek şekilde dilüe edilir.
2. Oda sıcaklığına getirilmiş kuyucuklara 10 μ l negatif kontrol/pozitif kontrol/örnek ile 90 μ l reaksiyon tamponu eklenir.
3. Kuyucuklar kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir.
4. Kuyucuklar boşaltılarak 200 μ l yıkama çözeltisi ile yıkanır. Bu işlem toplam 5 kere tekrarlanır.
5. 100 μ l PPAR- γ antikor çözeltisi kör hariç tüm kuyucuklara eklenir ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir.
6. İnkübasyon sonrası 4. basamaktaki yıkama işlemi 5 kere tekrarlanır.
7. 100 μ l HRP konjugatı kör hariç tüm kuyucuklara eklenir ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir.

8. İnkübasyon sonrası 4. basamaktaki yıkama işlemi 5 kere tekrarlanır.
9. Tüm kuyucuklara 100 µl developer çözelti eklenerek oda sıcaklığında hafifçe çalkalayarak ve ışıktan korunarak mavi renk oluşana dek bekletilir. Bu süre 15-45 dakika sürebilir.
10. Son olarak 100 µl durdurma çözeltisi eklenerek oluşan sarı rengin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

PPAR- gamma Ekspresyonu Düzeyinin Hesaplanması

Elde edilen örnek absrbanslarından kör değeri çıkartılır. PPAR- γ DNA bağlanma kapasitesi ortalama absorbans değerleri ile ifade edilmiştir.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde ifade edilmiştir. Gruplar arası farklılıklar Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ve Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir. İstatistiksel analiz Statistical Package for Social Sciences Program (SPSS) (SPSS Inc., Chicago, IL) programının 17.0 versiyonu kullanılarak yapılmış ve 0,05'ten küçük p değerleri ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Vücut ve Organ Ağırlıkları

Deney grupları için sütten yeni kesilmiş (21-23 günlük) Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanılmıştır. Çalışmanın ilk günü tüm sıçanlar rastgele olarak gruplandırılmış ve ortalama vücut ağırlıkları hesaplanmıştır (Tablo 4.1.). Çalışma başlangıcında grupların ortalama ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

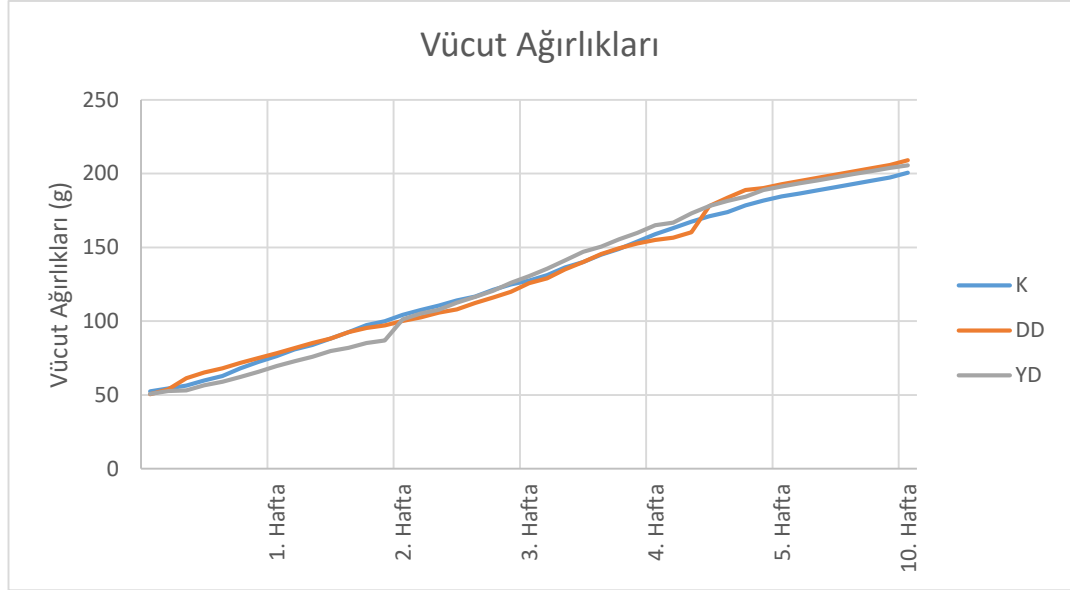
Tablo 4.1. Çalışma gruplarının başlangıçtaki ortalama vücut ağırlıkları

Çalışma Grupları	Çalışma Başlangıcındaki Vücut Ağırlıkları (g)	Çalışma Sonundaki Vücut Ağırlıkları (g)
K (n=6)	52,34 ± 3,77	200,67 ± 4,51
DD (n=6)	50,50 ± 2,06	209,00 ± 3,36
YD (n=6)	50,67 ± 3,79	205,60 ± 9,03

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

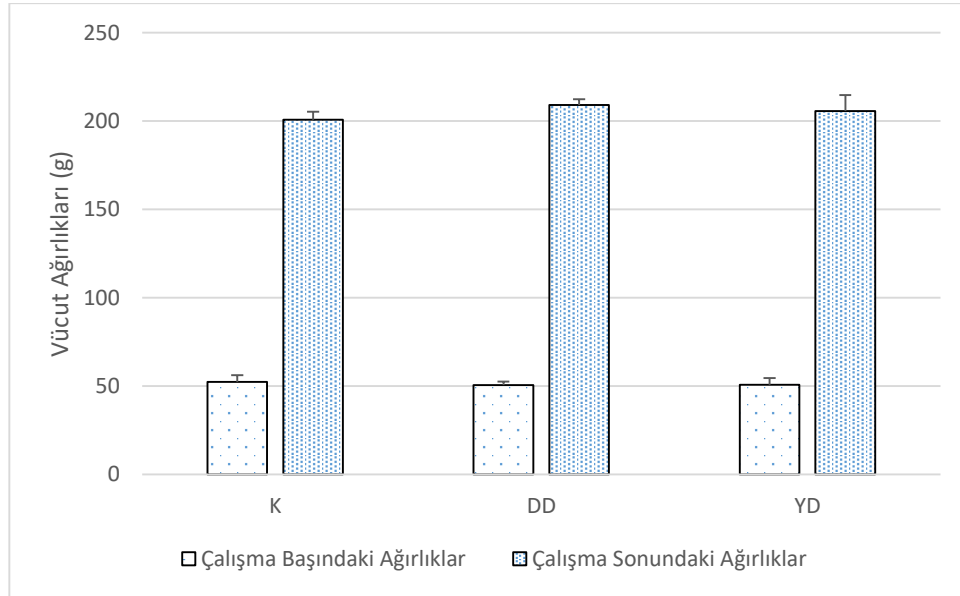
Çalışma gruplarına ait vücut ağırlıkları dozlama boyunca her gün (37 gün boyunca), dozlama bittikten sonra ise dekapitasyon öncesi (10. hafta) ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Ortalama ağırlık değişimleri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. YD grubunda bir sıçan çalışmanın 10. günü, DD grubunda bir sıçan ise çalışmanın 19. günü hızla kilo kaybetmeye başlayarak sırasıyla 15. ve 32. günde çalışma dışı kalmıştır.

Çalışma boyunca yapılan ölçümde elde edilen ortalama vücut ağırlıkları Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. DD grubunun vücut ağırlığında K grubuna göre % 4,2 artış gözlenirken, YD grubunda bu artışın %2.5 olduğu belirlenmiştir. Ortalama vücut ağırlığı değişimi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.1. Çalışma gruplarının ortalama vücut ağırlığı değişimi

K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu



Şekil 4.2. Çalışma gruplarının çalışma başlangıcı ve sonundaki ortalama vücut ağırlıkları

Tüm değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

Dekapitasyonu takiben testis ve epididimis dokuları tartılmış ve ağırlıklar kaydedilmiştir. K grubu ile karşılaştırıldığında DD grubunda ortalama testis ağırlığı %4,83, YD grubunda ise %7,28 azalmıştır (Tablo 4.2. ve Şekil 4.3.). K grubu ile karşılaştırıldığında DD grubunda ortalama epididimis ağırlığı %14,15, YD grubunda

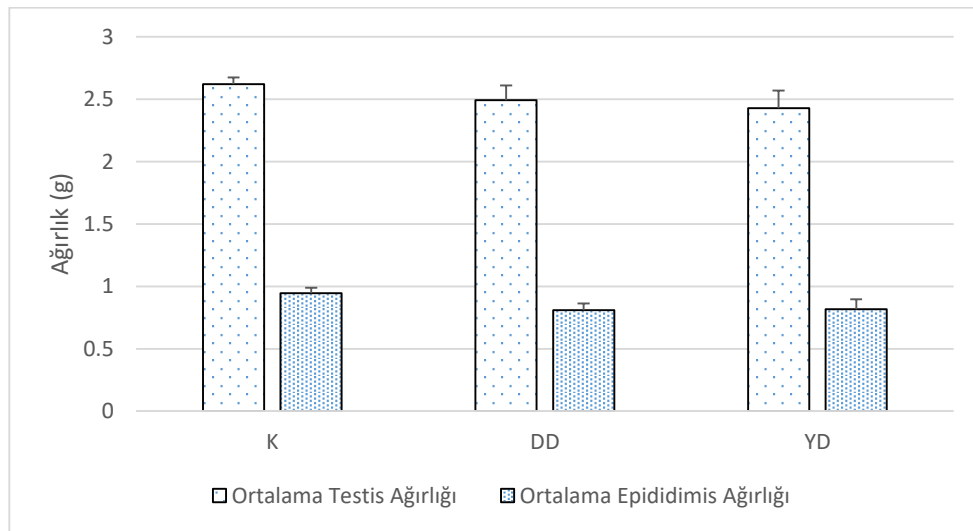
ise %13,39 azalmıştır (Tablo 4.2. ve Şekil 4.3.). Bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Gruplar rölatif testis ağırlığı açısından değerlendirildiğinde, DD grubunda kontrole göre %8,57, YD grubunda ise %9,22 oranında azalma olduğu anlaşılmıştır (Tablo 4.2. ve Şekil 4.4.). Gruplar arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Gruplar rölatif epididimis ağırlığı açısından değerlendirildiğinde, DD grubunda kontrole göre %18,62, YD grubunda ise %15,29 oranında azalma olduğu anlaşılmıştır (Tablo 4.2. ve Şekil 4.4.). DD grubunda meydana gelen bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 4.2. Çalışma gruplarındaki ortalama testis ağırlıkları

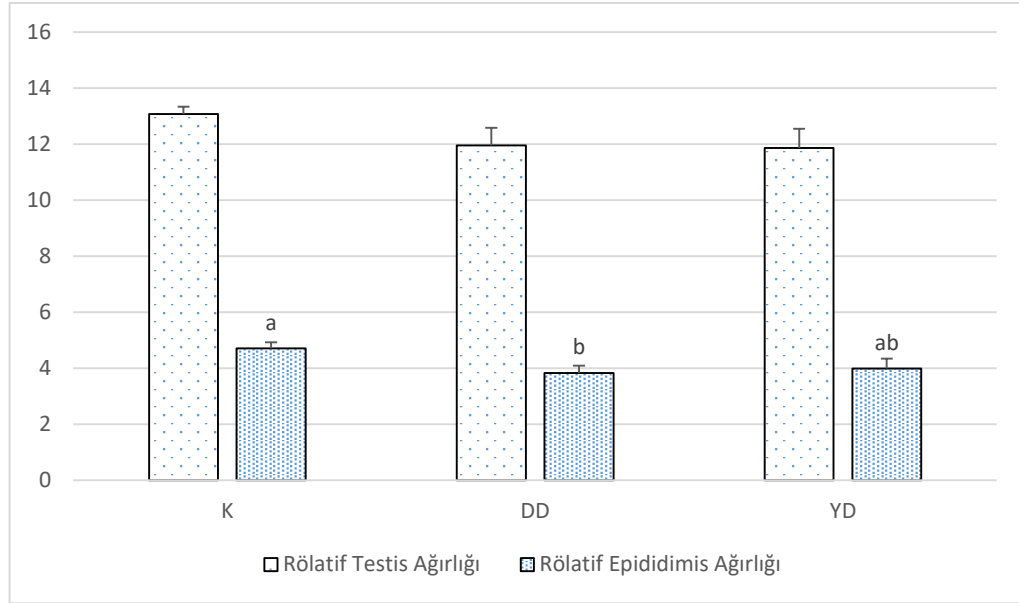
Çalışma Grupları	Ortalama Testis Ağırlığı (g)	Rölatif Testis Ağırlığı (mg/g)	Ortalama Epididimis Ağırlığı (g)	Rölatif Epididimis Ağırlığı (mg/g)
K (n=6)	2,620 ± 0,05	13,07 ± 0,27	0,94 ± 0,05	4,71 ± 0,22 ^a
DD (n=5)	2,494 ± 0,12	11,95 ± 0,63	0,81 ± 0,05	3,83 ± 0,36 ^b
YD (n=5)	2,429 ± 0,14	11,87 ± 0,68	0,82 ± 0,08	3,99 ± 0,35 ^{ab}

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu



Şekil 4.3. Çalışma gruplarındaki ortalama testis ve epididimis ağırlıkları

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu



Şekil 4.4. Çalışma gruplarındaki rölatif testis ve epididimis ağırlıkları

Tüm değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

4.2. Sperm Parametreleri

4.2.1. Sayımı ve Motilitesi

Çalışma gruplarına ait ortalama toplam sperm sayısı, hareketli sperm sayısı ve hareketli sperm yüzdeleri Tablo 4.3.'te verilmiştir. Sperm motilitesi belirlenirken ileri hareket kabiliyeti olan spermeler hareketli sayılmıştır (287). DD grubundaki toplam sperm sayısı K grubuna göre % 31,36 artarken, YD grubunda ise K grubuna göre % 35,56 azalmıştır. Hareketli sperm sayısı ise DD grubunda K grubuna göre % 11,13 artarken, YD grubunda % 55,45 oranında azalmıştır. Toplam sperm sayısı ve hareketli sperm sayısı açısından DD ile YD grupları arasında gözlenen farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). DD ve YD grubundaki hareketli sperm yüzdelerinin K grubuna göre sırasıyla % 14,10 ve % 28,10 oranında azaldığı belirlenmiştir. K grubuna kıyasla YD grubunda hareketli sperm yüzdesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

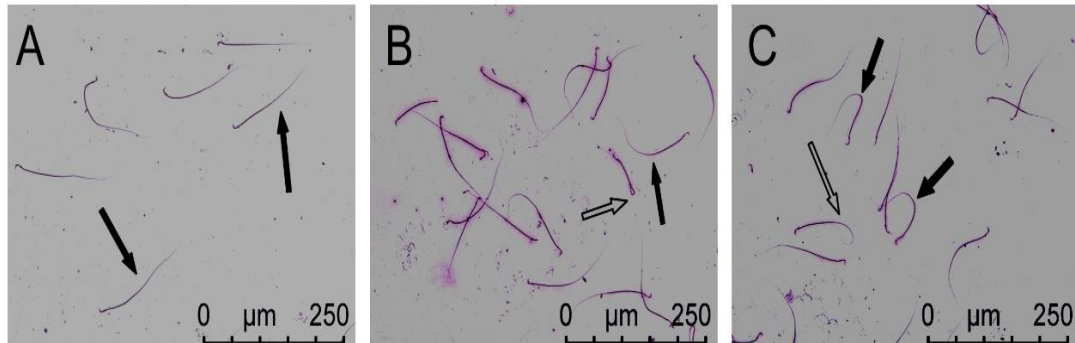
Tablo 4.3. Çalışma gruplarına ait toplam sperm sayısı, hareketli sperm sayısı ve hareketli sperm yüzdesi

Çalışma Grupları	Toplam Sperm Sayısı (/g epididimis)x10 ⁶	Hareketli Sperm Sayısı (/g epididimis)x10 ⁶	Hareketli Sperm Yüzdesi (%)
K (n=6)	313,60 ± 61,78 ^{ab}	192,38 ± 42,96 ^{ab}	60,16 ± 2,86 ^a
DD (n=5)	411,93 ± 55,29 ^a	213,78 ± 33,27 ^a	51,68 ± 4,76 ^{ab}
YD (n=5)	202,12 ± 39,88 ^b	85,70 ± 15,02 ^b	43,26 ± 1,75 ^b

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı sütunda bulunan ancak aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

4.2.2. Sperm Morfolojisi

Deney gruplarında normal sperm morfolojisi gösteren spermelerin yanı sıra başsız, kuyuksuz, kıvrık kuyruklu (curved), sarmal kuyruklu (coiled), düğümlü (looped) kuyruklu sperm de gözlenmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Deney gruplarında farklı morfolojik özellikler gösteren sperm örnekleri.

A- Kontrol grubunda normal sperm (ok) B- DD grubunda düğümlü kuyruğa sahip sperm (içi boş ok) ve kıvrık kuyruklu sperm (siyah ok) C- YD grubunda kıvrık kuyruklu sperm (siyah ok) ve sarmal kuyruklu sperm (içi boş ok) (DiffQuick X200).

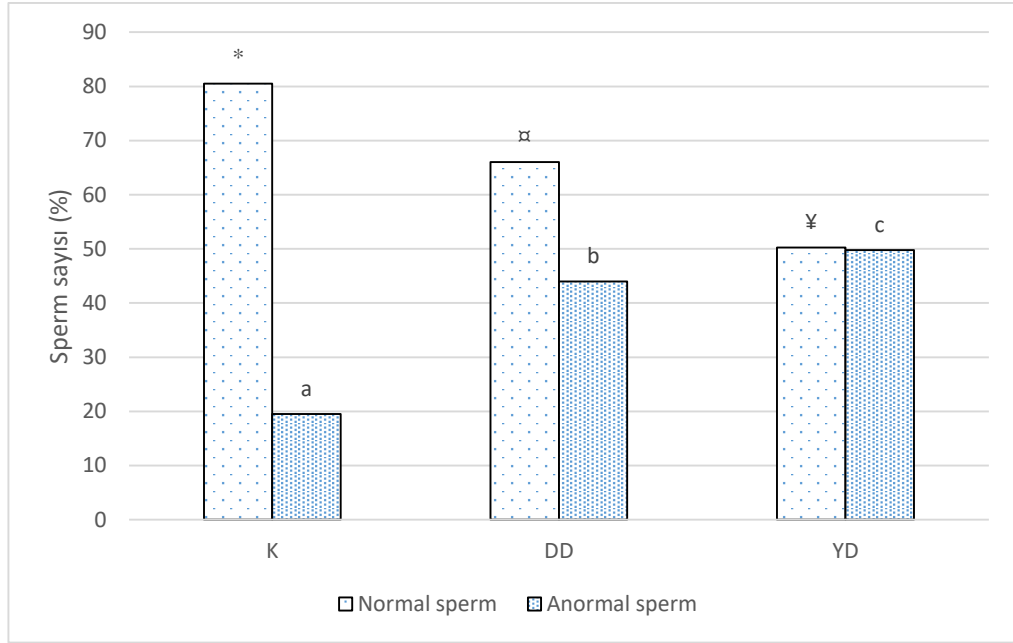
Normal ve anormal morfoloji gösteren spermere ait veriler Tablo 4.4.'te ve Şekil 4.6.'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre, K grubunda % 80,50 oranında normal sperm, %19,50 oranında anormal sperm morfolojisi izlenmiştir. DD ve YD gruplarında anormal sperm yüzdesi K grubuna göre artmış ve sırası ile % 44,0 ve % 49,75 olarak saptanmıştır (p<0,05 vs K). YD grubunda saptanan yüzde anormal sperm sayısının DD grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0,05). Başsız sperm K grubunda % 7,0 iken, DD ve YD

gruplarında % 14,75 olarak gözlenmiştir. K grubunda kuyruksuz sperm % 1,75 iken, DD ve YD gruplarında % 2,75 olarak saptanmıştır. K grubunda kıvrık kuyruklu sperm yüzdesi % 7,25 iken, DD ve YD gruplarında kıvrık kuyruklu sperm yüzdesi sırası ile % 20,25 ve % 23,25 olarak belirlenmiştir. Sarmal kuyruklu spermeler K grubunda % 2,25, DD ve YD gruplarında ise sırasıyla % 3,50 ve % 3,75 olarak saptanmıştır. Halka şeklinde kıvrımlı kuyruk morfolojisine sahip sperm yüzdesi ise K grubunda % 1,50, DD grubunda % 2,75, YD grubunda ise % 4,50 olarak saptanmıştır.

Tablo 4.4. Deney gruplarında sperm morfoloji değişikliklerine ait yüzdeler

	K	DD	YD
Normal sperm %	80,50 ^a	66,00 ^b	50,25 ^c
Anormal sperm sayısı toplamı %	19,50 ^a	44,00 ^b	49,75 ^c
Başsız sperm %	7,00 ^a	14,75 ^b	14,75 ^b
Kuyruksuz sperm %	1,75 ^a	2,75 ^b	2,75 ^b
Kıvrık kuyruklu sperm %	7,25 ^a	20,25 ^b	23,25 ^b
Sarmal kuyruklu sperm %	2,25 ^a	3,50 ^b	3,75 ^{ab}
Düğümlü kuyruklu sperm %	1,50 ^a	2,75 ^b	4,50 ^b
Toplam sperm sayısı %	100	100	100

Tüm değerler yüzde olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı satırda aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p < 0,05). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

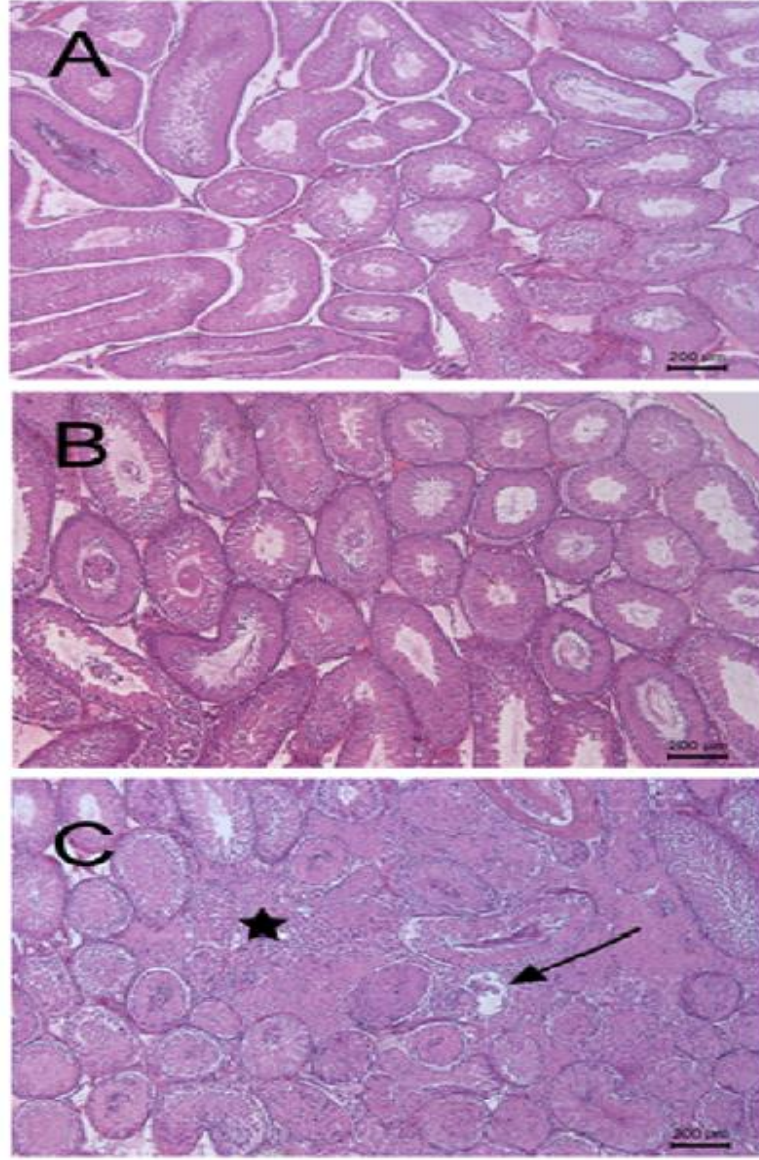


Şekil 4.6. Deney gruplarındaki anormal ve normal sperm yüzdeleri

Tüm değerler yüzde olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). ^{*, α, γ} Aynı üssel sembelleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

4.3. Histopatolojik Değerlendirme

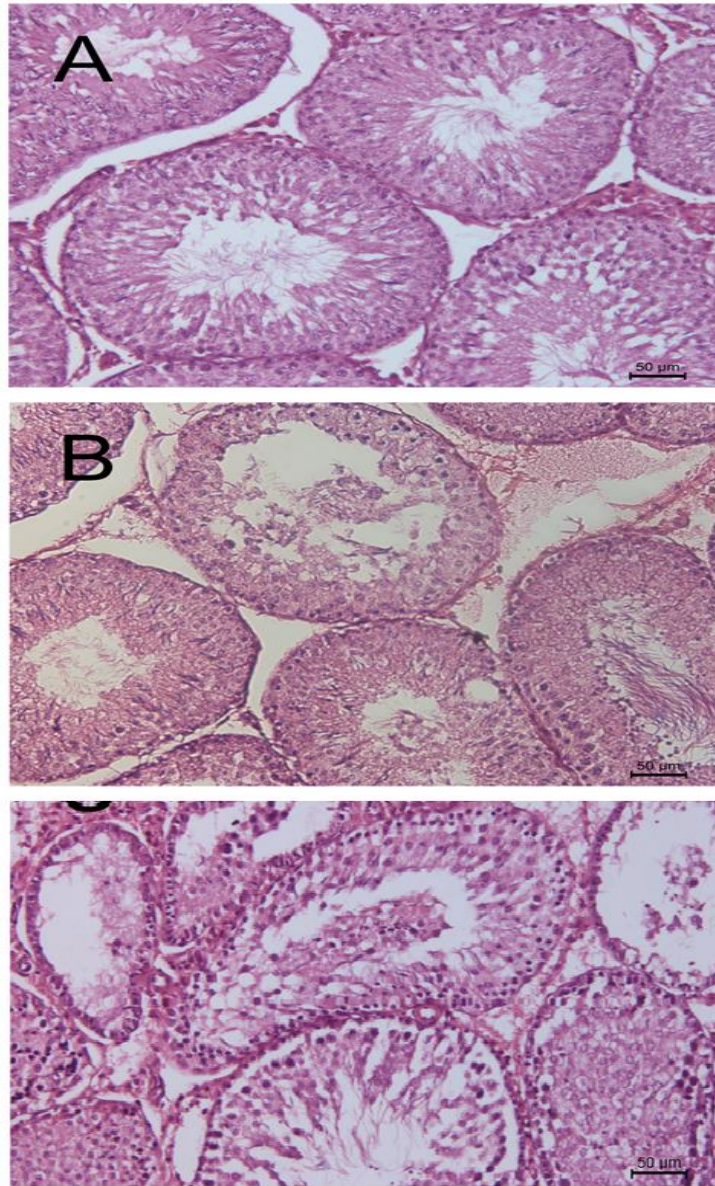
Deney gruplarına ait testis örneklerinin kesitleri ışık mikroskobu altında incelendiğinde seminifer tübüller ve aralarındaki bağ dokusu gözlenmiştir. K, DD ve YD gruplarında seminifer tübülleri döşeyen Sertoli hücreleri ve spermatogenetik seriye ait hücrelerden oluşan seminifer tübül epiteli karşılaştırıldığında, YD grubunda bazı seminifer tübüllerde seminifer epitelin bozulduğu, bazı tübüllerin bütünlüğünün tamamen dağıldığı ve içeriğinin seminifer tübüller arasına yayıldığı izlenmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Çalışma gruplarına ait seminifer tübül ışık mikrosafı.

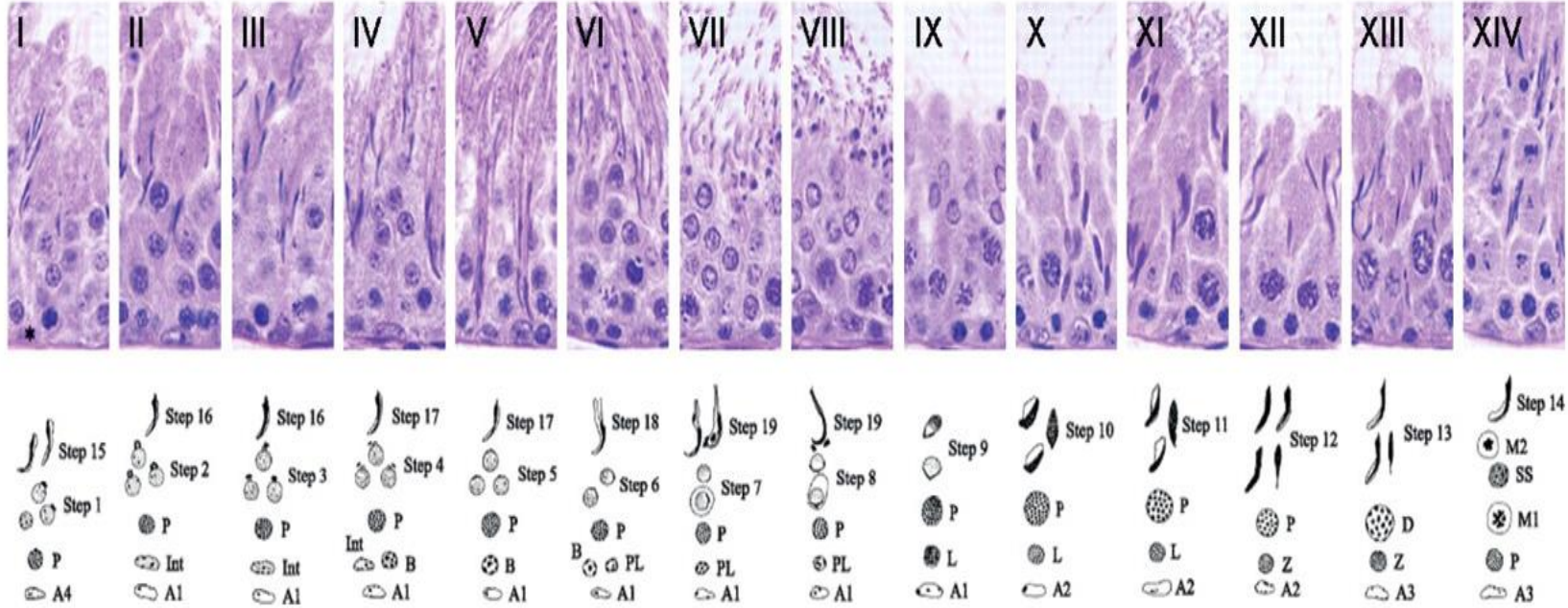
Yüksek doz DEHP uygulanan grupta bazı seminifer tübüllerde seminifer epitelin bozulduğu (ok), bazı tübüllerin bütünlüğünün tamamen dağıldığı (yıldız) ve içeriğın seminifer tübüller arasına yayıldığı izlenmektedir. A: Kontrol grubu, B. Düşük doz DEHP grubu C: Yüksek doz DEHP grubu. Hematoksilen-eosin X50

Düşük doz grubunda bazı tübüllerin epitelinde bozulma izlenirken, YD grubunda seminifer epitelin tek sıra olarak kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.8.). Seminifer tübüllerin enine kesitleri incelendiğinde spermatogonyumların bazal lamina üzerinde yerleştiği, spermatogonyumlar üzerinde spermatozoidlerin bulunduğu ve apikale doğru 1 veya 2 sıra spermatidlerin bulunduğu izlenmektedir. Sıçanlarda spermatogenik siklus 14 evreye ayrılmaktadır (Şekil 4.9.).



Şekil 4.8. Çalışma gruplarına ait seminifer epitel görüntüsü

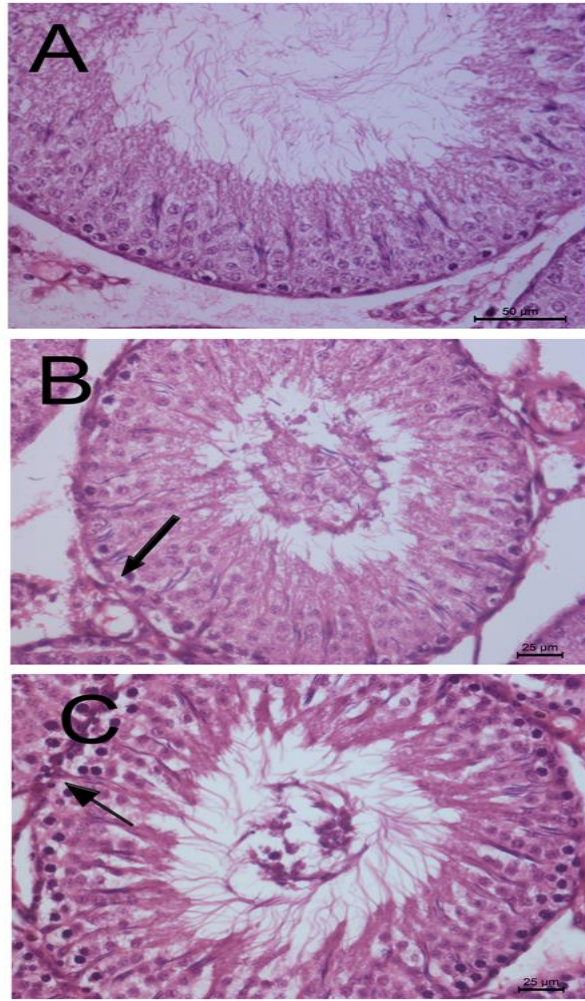
DD ve YD gruplarında seminifer epitelin bozulduğu izlenmektedir. A: Kontrol grubu, B. Düşük doz grubu C: Yüksek doz grubu. Hematoksilen-eosin X200



Şekil 4.9. Sıçanlarda seminifer epitel siklusu (288)

Histolojik ve şematik görüntüler testis dokusundan alınan tübüllerde gözlenebilecek tüm germ hücrelerini ve bu hücelere ait 14 aşamayı göstermektedir (I ile XIV arasında numaralandırılmıştır). Bu sınıflandırma, spermatidlerde gözlenen akrozom morfogenezine dayanmaktadır. Step I az farklılaşmış Step 19 farklılaşmış akrozomu temsil etmektedir. A1, A2, A3, A4, orta (Int) ve B spermatozoid türlerini, temsil etmektedir. PL: Preleptoten spermatozoid, L: Leptoten spermatozoid, Z: Zigoten spermatozoid, P: Pakiten spermatozoid, D: Diploten spermatozoid, M1 ve M2: Mayoz bölünen spermatozoidler.

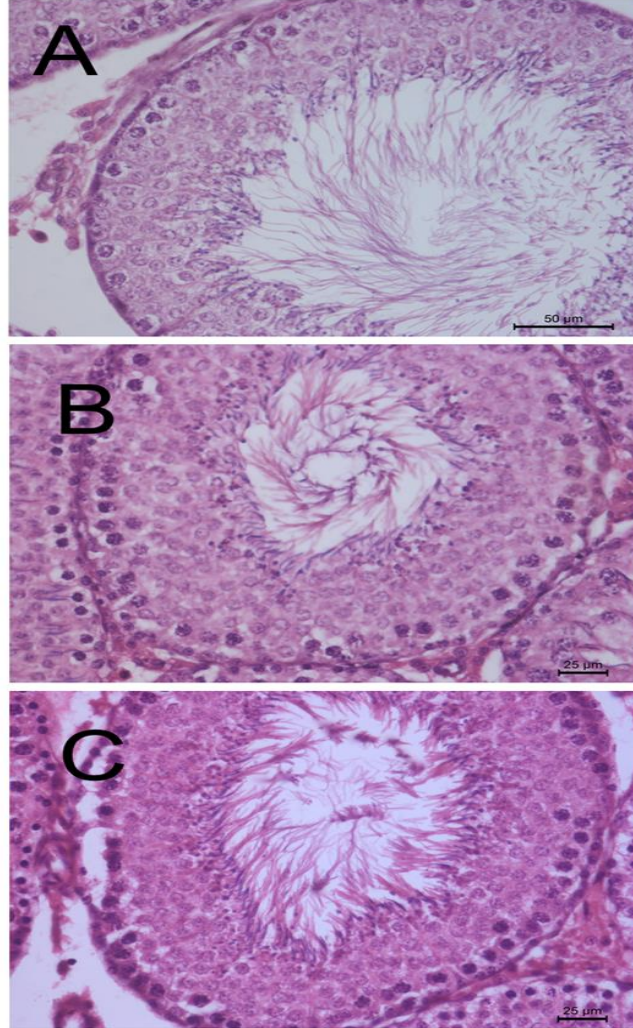
Deney gruplarının testis kesitlerindeki seminifer tübüller Şekil 4.9.'daki spermatogenik evrelere göre incelenmiştir. Buna göre, DD ve YD grubundaki evre V'e ait ve doku bütünlüğünü koruyan tübüllerdeki Sertoli hücreleri ile spermatositler arasında ayrılmalar gözlenmiştir. Tübüllerin lümeninde, lümene dökülmüş ve farklanmasını tamamlayamamış spermatogenetik seriye ait hücreler izlenmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Çalışma gruplarında Evre V'e ait seminifer tübül kesitleri

Evre V'e ait seminifer tübül kesitlerinde düşük doz ve yüksek doz DEHP uygulanan gruplarda Sertoli hücreleri ile spermatositler arasında ayrılmalar (ok) ve tübüllerin lümeninde lümene dökülmüş farklanmasını tamamlayamamış spermatogenetik seriye ait hücreler izlenmektedir. A: Kontrol grubu, B. Düşük doz grubu C: Yüksek doz grubu. Hematoksilen-eosin X400

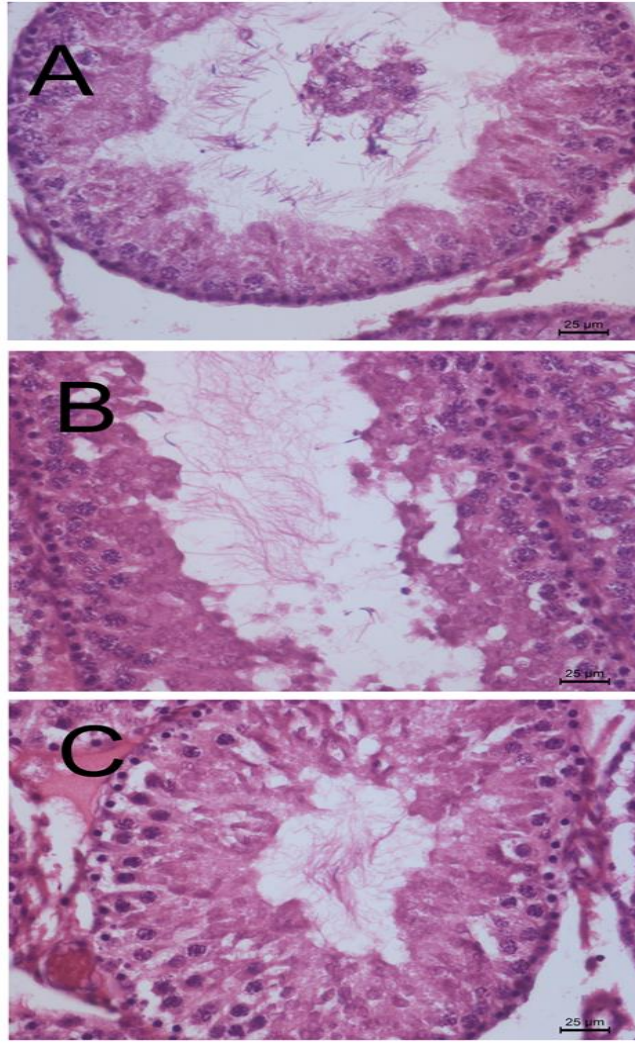
Evre VIII'e ait tübül kesitlerinde de hem DD hem YD grubunda, spermatositler ile altında yerleşen spermatogonyum ve destek sağlayan Sertoli hücreleri arasında yer yer ayrılmalar gözlenmiştir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Çalışma gruplarında Evre VIII'e ait seminifer tübül kesitleri

Evre VIII'e ait tübül kesitlerinde DEHP uygulanan her iki grupta da spermatositler ile altında yerleşen spermatogonyum ve destek sağlayan Sertoli hücreleri ile yer yer ayrılmalar izlenmektedir. A: Kontrol grubu, B: Düşük doz grubu C: Yüksek doz grubu. Hematoksilen-eosin X400

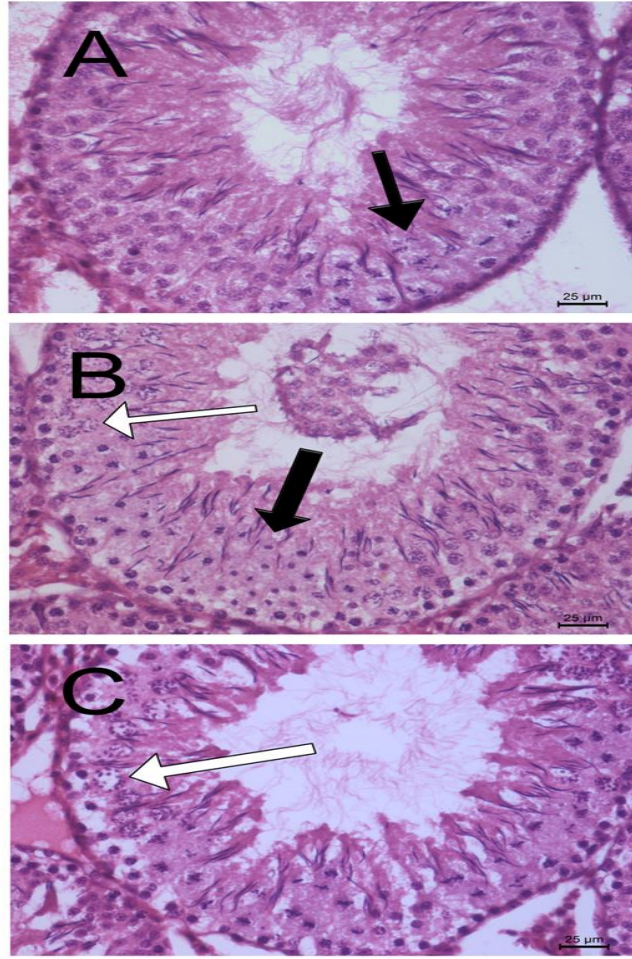
Benzer şekilde DD ve YD grubuna ait Evre IX kesitlerinde de spermatositlerde ayrılmalar izlenmiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Çalışma gruplarında Evre IX'a ait seminifer tübül kesitleri

Evre IX'a ait seminifer tübül kesitlerde düşük ve yüksek doz uygulanan gruplarda spermatositler ile altında yerleşen spermatogonyum ve destek sağlayan Sertoli hücreleri ile yer yer ayrılmalar izlenmektedir. A: Kontrol grubu, B: Düşük doz grubu C: Yüksek doz grubu. Hematoksilen-eosin X400

Son olarak, Evre XIV'e ait kesitlerde epitelde bölünen spermatositler incelenmiştir. DD grubuna ait spermatositlerde kromozomlarda kondansasyon ile küçülme belirlenmiştir. DD ve YD grubunda ise zigoten spermatositlerde çevreden ayrılma gözlenmektedir (Şekil 4.13.).

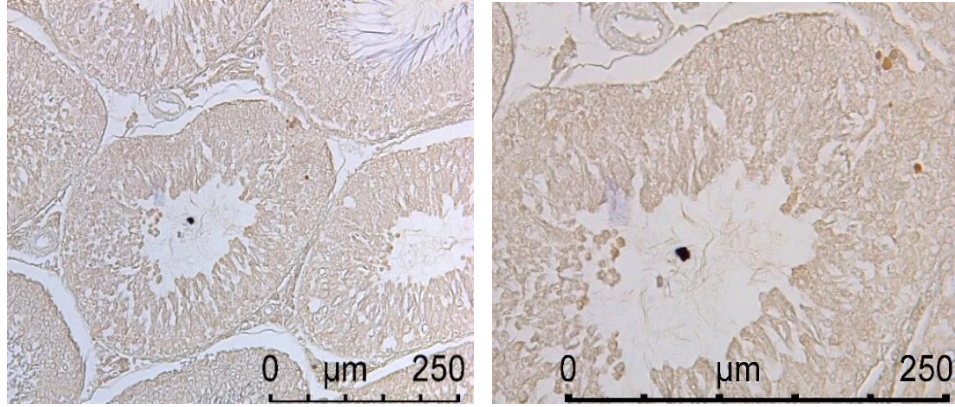


Şekil 4.13. Çalışma gruplarında Evre XIV'e ait seminifer tübül kesitleri

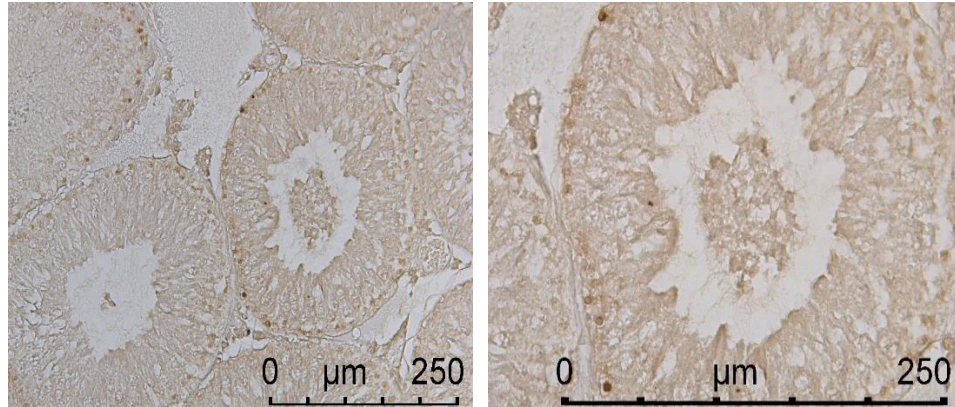
Evre XIV'e ait kesitlerde epitelde bölünen spermatositler (siyah ok), düşük doz uygulanan grupta kromozomlarda kondansasyon ile küçülme, düşük ve yüksek doz uygulanan grupta zigoten spermatositlerde ayrılma gözlenmektedir. A: Kontrol grubu, B: Düşük doz grubu C: Yüksek doz grubu. Hematoksilen-eosin X400

4.4. Apoptotik Değerlendirme

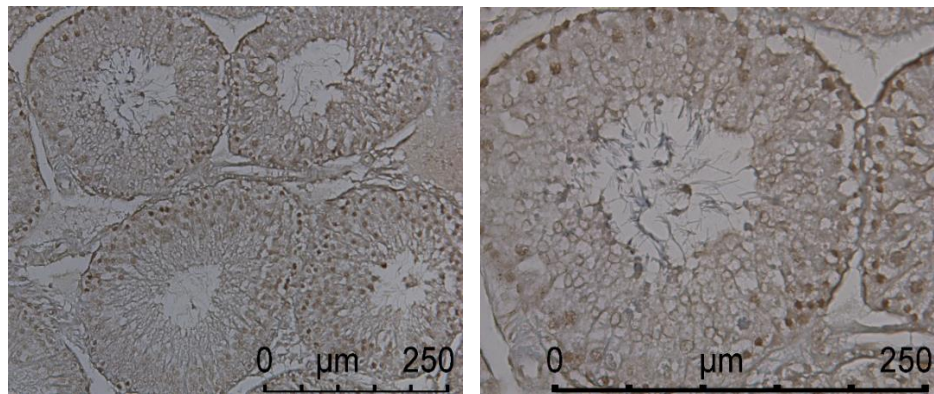
Deney gruplarına ait seminifer tübüllerde TUNEL yöntemi işaretleme yapılmış ve her örnek için 20 tübül seçilerek pozitif boyanan hücreler sayılmıştır. K, DD ve YD gruplarına ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.14., Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.'de verilmiştir. Elde edilen sayımlara göre, K grubunda ortalama 4 adet (Şekil 4.14), DD grubunda 14 adet (Şekil 4.15.) ve YD grubunda 29 adet (Şekil 4.16.) TUNEL pozitif apoptotik hücre saptanmıştır. Özellikle YD grubunda kontrole göre apoptotik hücre sayısında gözle görülür bir artış olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.14. Kontrol grubuna ait seminifer tübüllerde gözlenen apoptotik hücreler
Kahverengi noktalar TUNEL kit ile pozitif boyanan apoptotik hücreleri göstermektedir. (X200, X400)



Şekil 4.15. DD grubuna ait seminifer tübüllerde gözlenen apoptotik hücreler
Kahverengi noktalar TUNEL kit ile pozitif boyanan apoptotik hücreleri göstermektedir. (X200, X400)



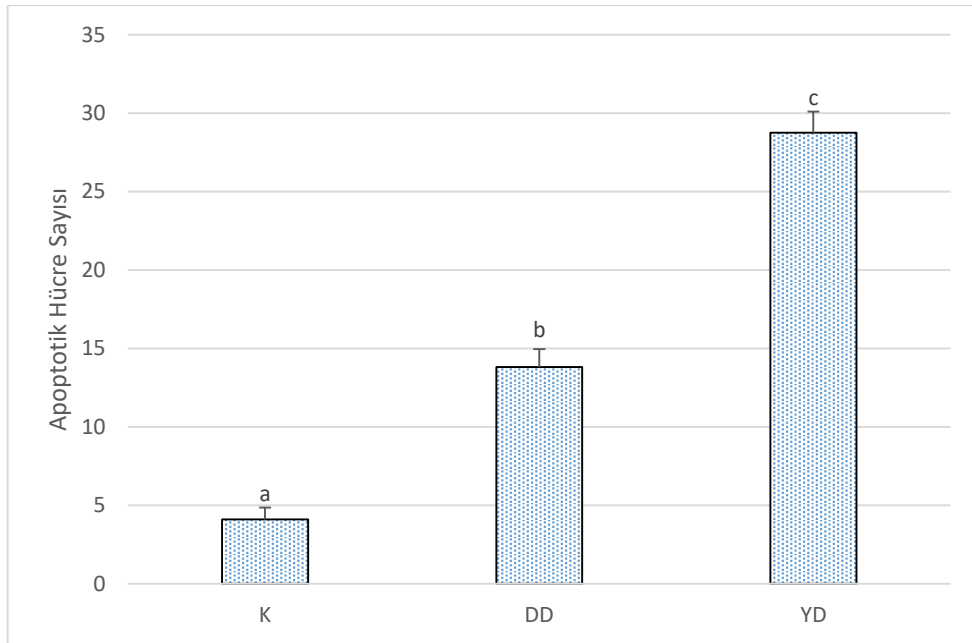
Şekil 4.16. YD grubuna ait seminifer tübüllerde gözlenen apoptotik hücreler
Kahverengi noktalar TUNEL kit ile pozitif boyanan apoptotik hücreleri göstermektedir. (X200, X400)

Ortalama apoptotik hücre sayısının DD ve YD grubunda K grubuna göre sırasıyla 3,36 kat ve 7 kat arttığı belirlenmiştir. Bu artışın hem kontrole göre hem de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir ($p < 0,05$) (Tablo 4.5. ve Şekil 4.17.).

Tablo 4.5. Testis dokusunda ortalama TUNEL pozitif hücre sayısı

Çalışma Grupları	Ortalama TUNEL Pozitif Hücre Sayısı
K (n=6)	4.11 ± 0.75 ^a
DD (n=5)	13.82 ± 1.14 ^b
YD (n=5)	28.76 ± 1.34 ^c

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu



Şekil 4.17. Testis dokusundaki ortalama TUNEL pozitif hücre sayısı

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

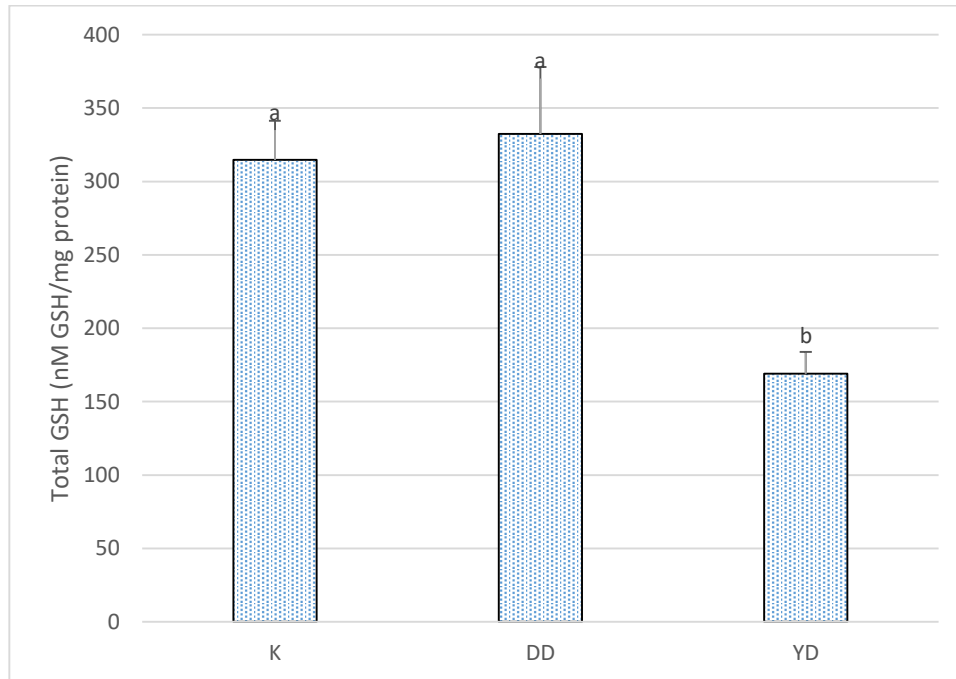
4.5. Total Glutasyon Düzeyleri

Testis dokusunda ölçülen total GSH düzeyleri Tablo 4.6.'da ve Şekil 4.18.'de verilmiştir. Total GSH düzeyleri, DD grubunda K grubuna oranla değişmezken, YD grubunda %46,26 oranında azalmıştır ($p < 0,05$).

Tablo 4.6. Testis total GSH düzeyleri

Çalışma Grupları	Total GSH (nmol/mg protein)
K (n=6)	314.72 ± 26.63 ^a
DD (n=5)	332.34 ± 45.69 ^a
YD (n=5)	169.12 ± 14.73 ^b

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu



Şekil 4.18. Testis total GSH düzeyleri

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

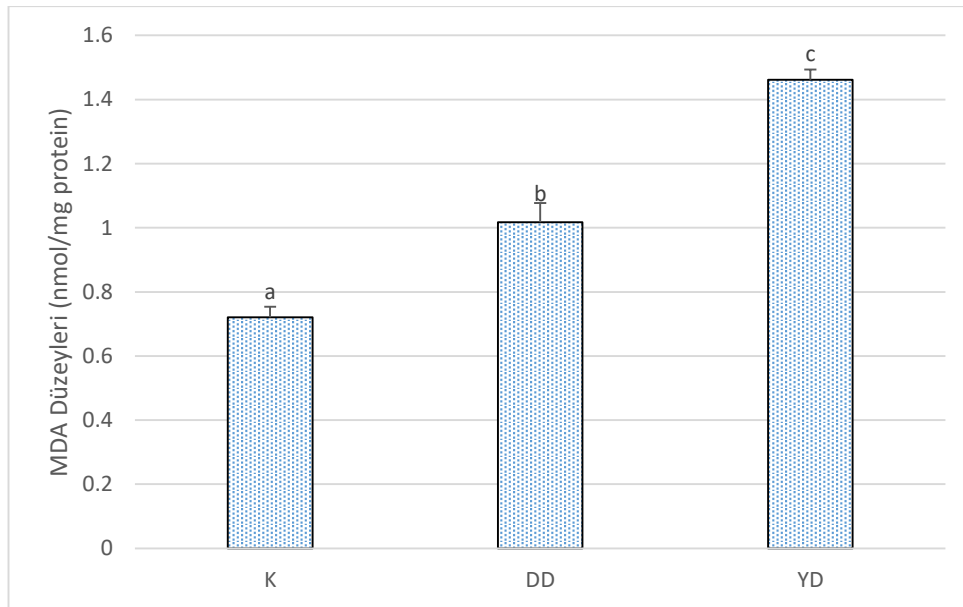
4.6. Lipit Peroksidasyon Düzeyleri

Lipit peroksidasyonunu belirlemek için testis dokusunda ölçülen MDA düzeyleri Tablo 4.7.'de ve Şekil 4.19.'de verilmiştir. K grubu ile karşılaştırıldığında DD grubuna ait MDA düzeyleri %41,03, YD grubunda ise %102,7 oranında artmıştır ($p < 0,05$).

Tablo 4.7. Testis MDA düzeyleri

Çalışma Grupları	MDA (nmol/mg protein)
K (n=6)	0.72 ± 0.03^a
DD (n=5)	1.02 ± 0.06^b
YD (n=5)	1.46 ± 0.03^c

Tüm değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu



Şekil 4.19. Testis MDA düzeyleri

Tüm değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

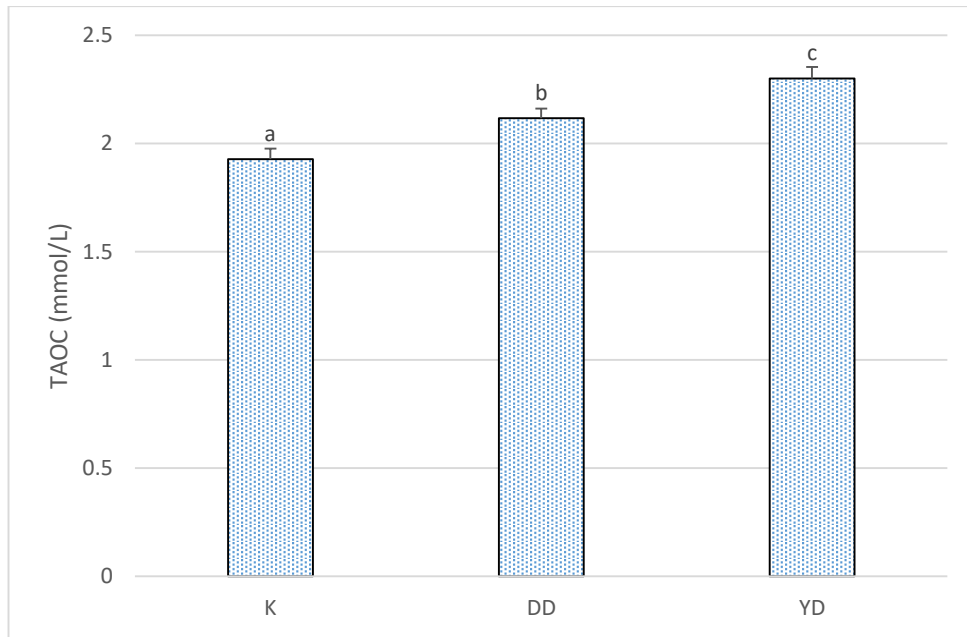
4.7. Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri

Testis TAOC düzeyleri Tablo 4.8.'de ve Şekil 4.20.'de verilmiştir. Buna göre TAOC düzeylerinin, DD grubunda K grubuna kıyasla % 9,83 oranında ve YD grubunda %19,38 oranında arttığı saptanmıştır ($p < 0,05$). YD grubunda saptanan değerler DD grubuna kıyasla önemli düzeyde yüksektir ($p < 0,05$).

Tablo 4.8. Testis TAOC düzeyleri

Çalışma Grubu	TAOC Düzeyi (nmol/L)
K (n=6)	0.72 ± 0.03^a
DD (n=5)	1.02 ± 0.06^b
YD (n=5)	1.46 ± 0.03^c

Tüm değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

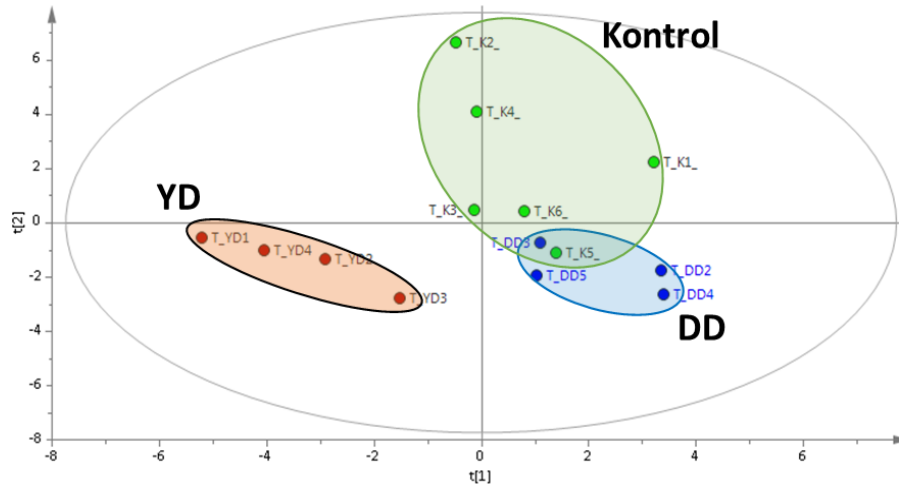


Şekil 4.20. Testis TAOC düzeyleri

Tüm değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

4.8. Metabolik Profil

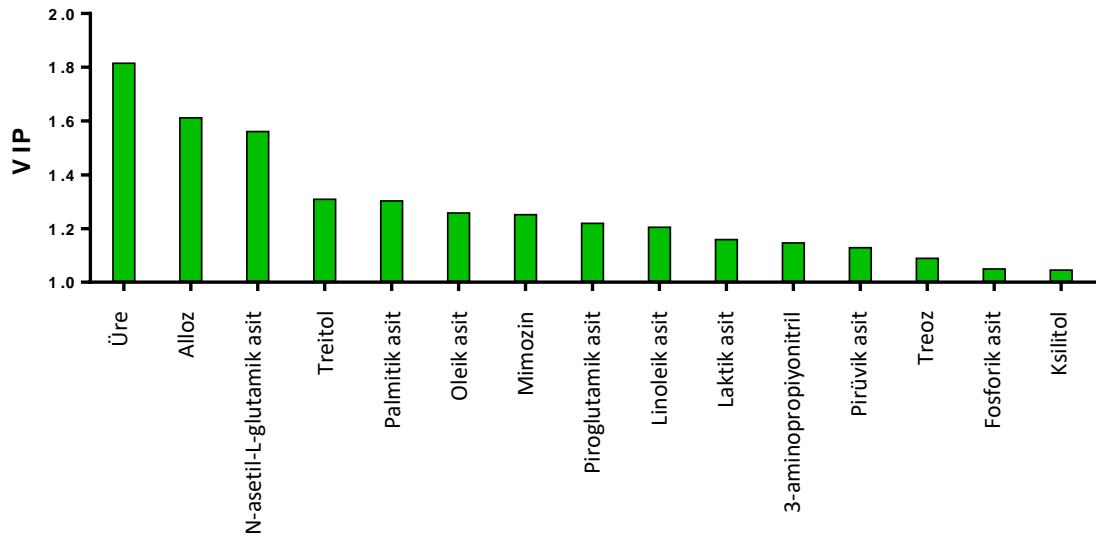
Testis dokusunda yapılan metabolomik analiz sonucunda elde edilen veriler MS-DIAL1 isimli program kullanılarak işlenmiştir. YD5 ve DD1 numaralı örnekler grup dağılımından saptığı için analiz dışında bırakılmıştır (Şekil4.21.).



Şekil 4.21. Tüm gruplarda testis dokusu metabolomik profili

DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

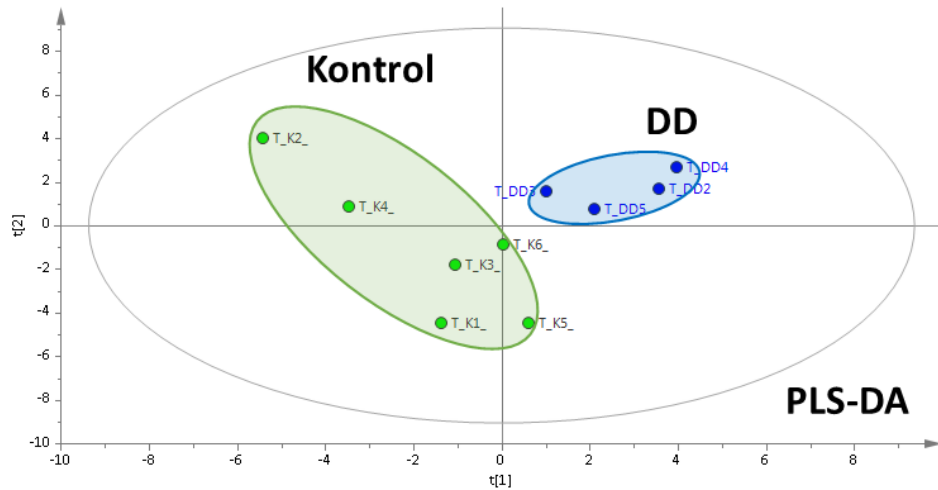
Tüm çalışma grupları birlikte değerlendirildiğinde grupların ayrılmasında etkin olan metabolitler (VIP-Variable Important in Project) Şekil 4.22.'de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre en fazla değişen metabolitlerin üreaz, alloz ve N-asetil-L-glutamik asit olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.22. Çalışma gruplarının ayrılmasında etkin olan metabolitler

VIP: Variable Important in Project

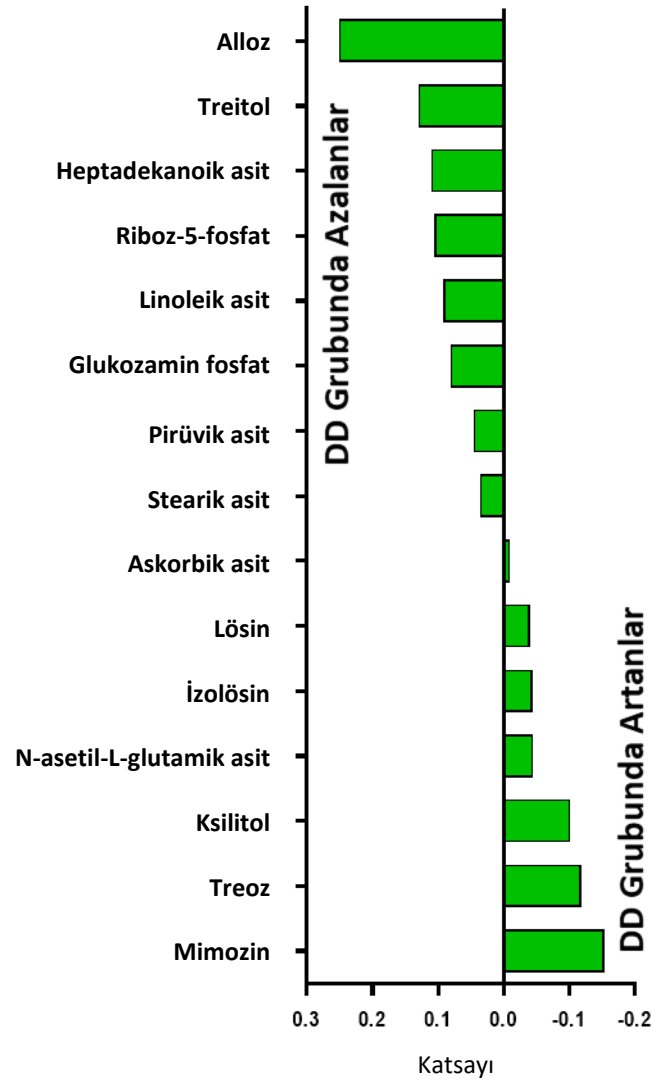
Kontrol grubu ile DD karşılaştırıldığında elde edilen metabolit dağılımı Şekil 4.23.'de verilmiştir. Model doğruluğunu gösteren Q^2 ve model uyumluluğunu gösteren R^2 (her ikisinin de 0,5 ile 1 arasında olması ve 1'e olabildiğince yakın olması istenir) değerleri hesaplanarak sırasıyla 0,651 ve 0,998 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.23. Kontrol ve DD grubuna ait metabolit dağılımı

DD: Düşük doz DEHP grubu, PLS-DA: Kısmi en küçük kareler farklılaştırma analizi

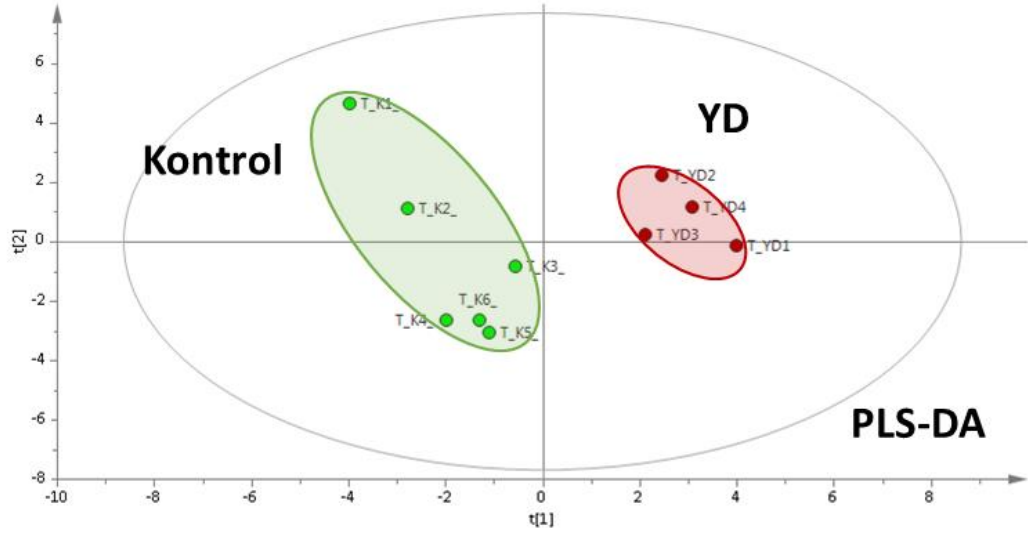
Elde edilen verilere göre DD grubunda artan ve azalan tüm metabolitler Şekil 4.24.'de gösterilmiştir. K grubu ile karşılaştırıldığında DD grubunda alloz, treitol, heptadekanoik asit isimli metabolitler azalırken, mimozin, treoz ve ksilitol isimli metabolitler artmıştır.



Şekil 4.24. Kontrole göre DD grubunda azalan ve artan metabolitler

DD: Düşük doz DEHP grubu

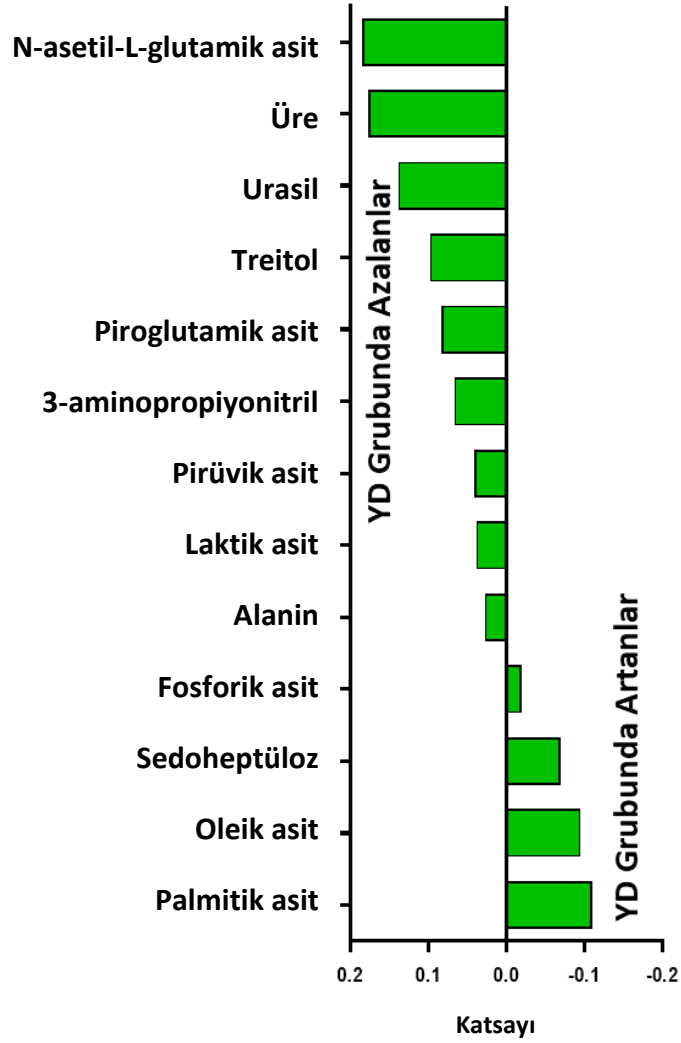
Kontrol grubu ile YD karşılaştırıldığında elde edilen metabolit dağılımı Şekil 4.25.'de verilmiştir. Q^2 ve R^2 değerleri sırasıyla 0,862 ve 0,821 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.25. Kontrol ve YD grubuna ait metabolit dağılımı

YD: Yüksek doz DEHP grubu, PLS-DA: kısmi en küçük kareler farklılaştırma analizi

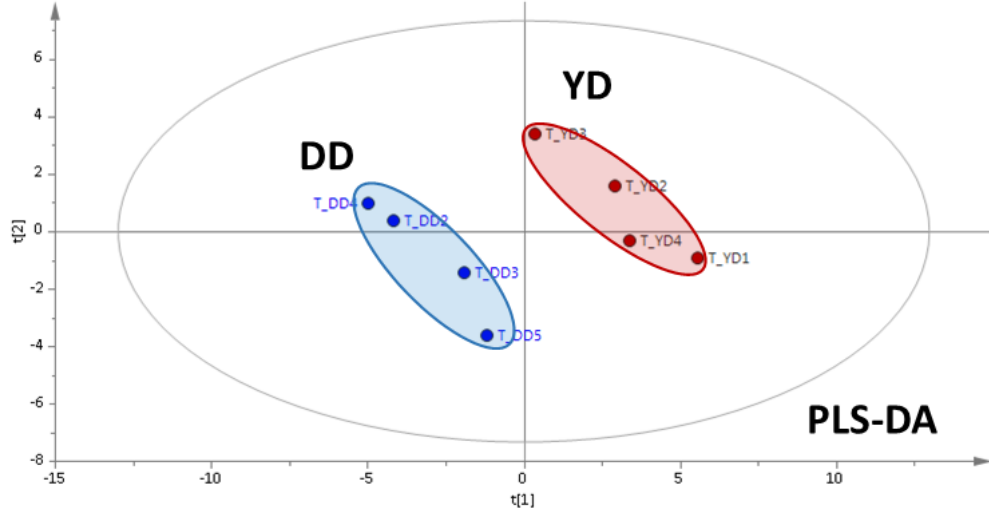
Elde edilen verilere göre YD grubunda artan ve azalan tüm metabolitler Şekil 4.26.'de gösterilmiştir. K grubu ile karşılaştırıldığında YD grubunda N-asetil-L-glutamik asit, üre, urasil isimli metabolitler azalırken, palmitik asit, oleik asit ve sedoheptuloz isimli metabolitler artmıştır.



Şekil 4.26. Kontrole göre YD grubunda azalan ve artan metabolitler

YD: Yüksek doz DEHP grubu

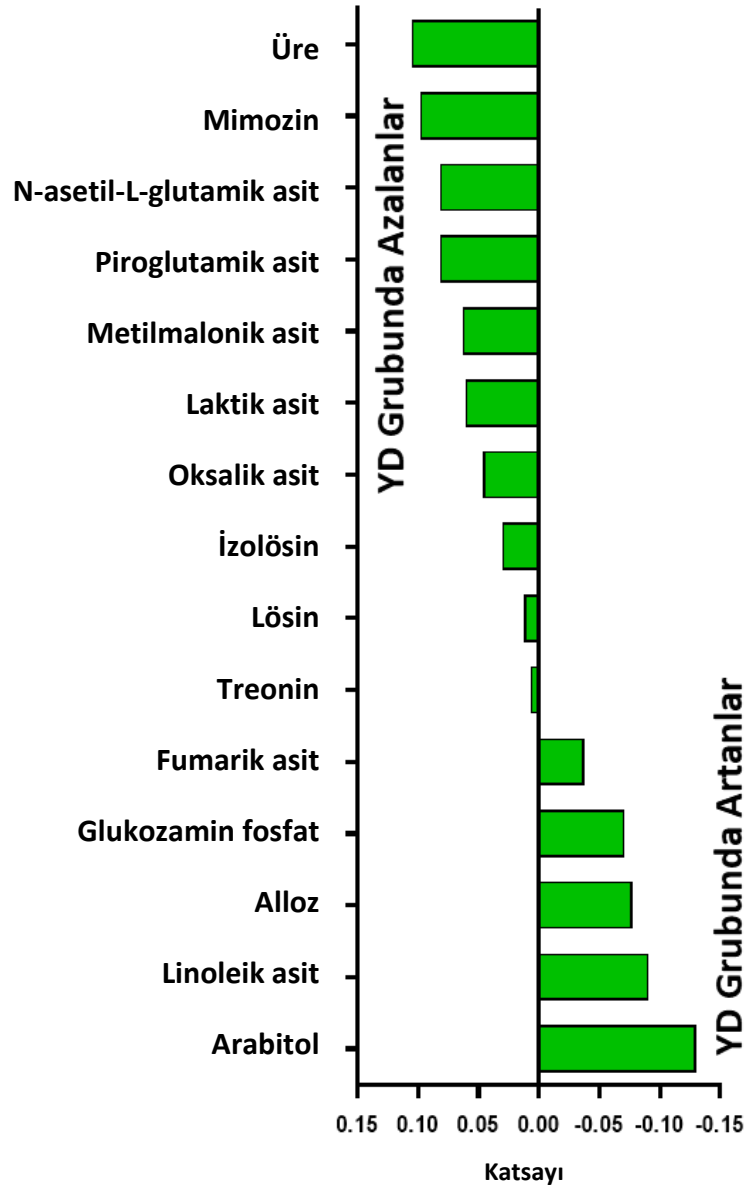
Düşük doz grubu ile YD karşılaştırıldığında elde edilen metabolit dağılımı ise Şekil 4.27.'de verilmiştir. Q^2 ve R^2 değerleri sırasıyla 0,751 ve 0,951 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.27. DD ve YD grubuna ait metabolit dağılımı

DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu, PLS-DA: kısmi en küçük kareler farklılaştırma analizi

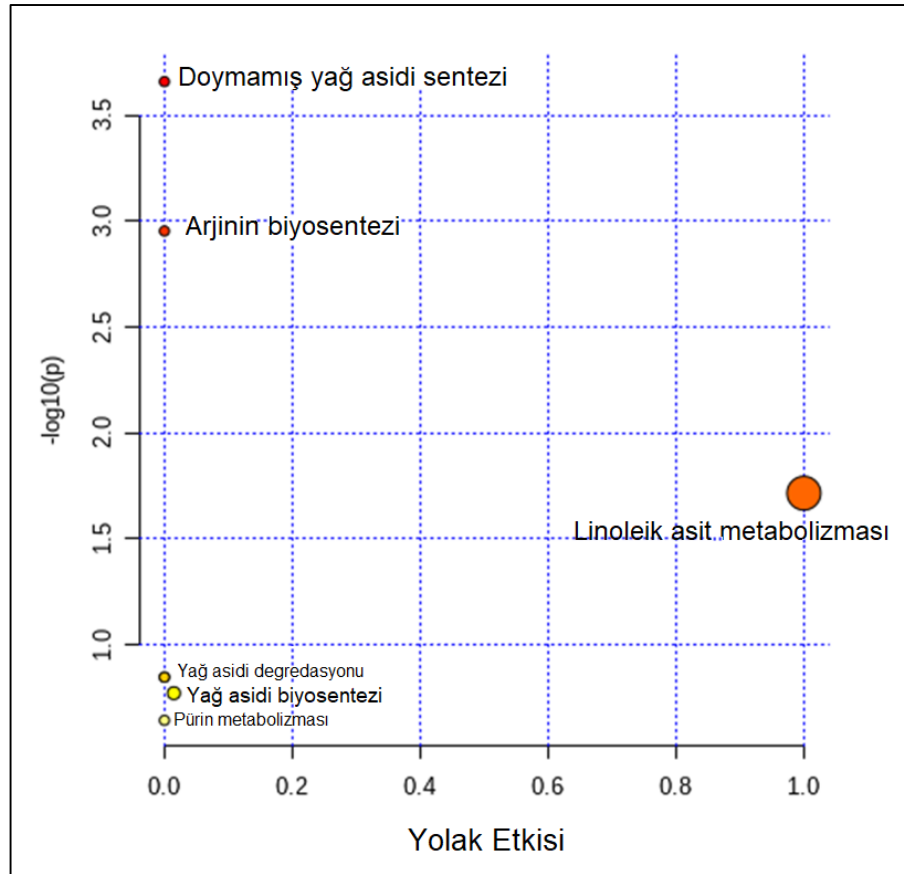
Düşük doz grubu ile karşılaştırıldığında YD grubunda artan ve azalan tüm metabolitler Şekil 4.28.'de gösterilmiştir. DD grubuna göre YD grubunda üre, mimosin, N-asetil-L-glutamik asit ve piroglutamik asit isimli metabolitler azalırken, arabitol, linoleik asit, alloz ve glukozamin fosfat isimli metabolitler artmıştır.



Şekil 4.28. DD grubuna göre YD grubunda azalan ve artan metabolitler

DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

Çalışma gruplarında yapılan analizlerde değiştiği saptanan metabolitlerin hangi metabolik yollarda görev aldıklarının anlaşılabilmesi için öncelikle elde edilen metabolit isimleri MetPA isimli kütüphaneye aktarılmıştır. Daha sonra tür olarak Sprague-Dawley seçilip analiz detayları sisteme tanımlanarak metabolit haritalaması yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.29.'da verilmiştir. Bu şekil üzerinde gözlenen noktalar metabolitlerin rol aldıkları metabolik yolları simgelemektedir. Koyu kırmızı renk istatistiksel olarak en anlamlı yolağı göstermektedir. Doymamış yağ asidi sentezi, arjinin biyosentezi ve linoleik asit metabolizması en çok etkilenen yolaklardır.



Şekil 4.29. Metabolitlerin rol aldığı metabolik yollar

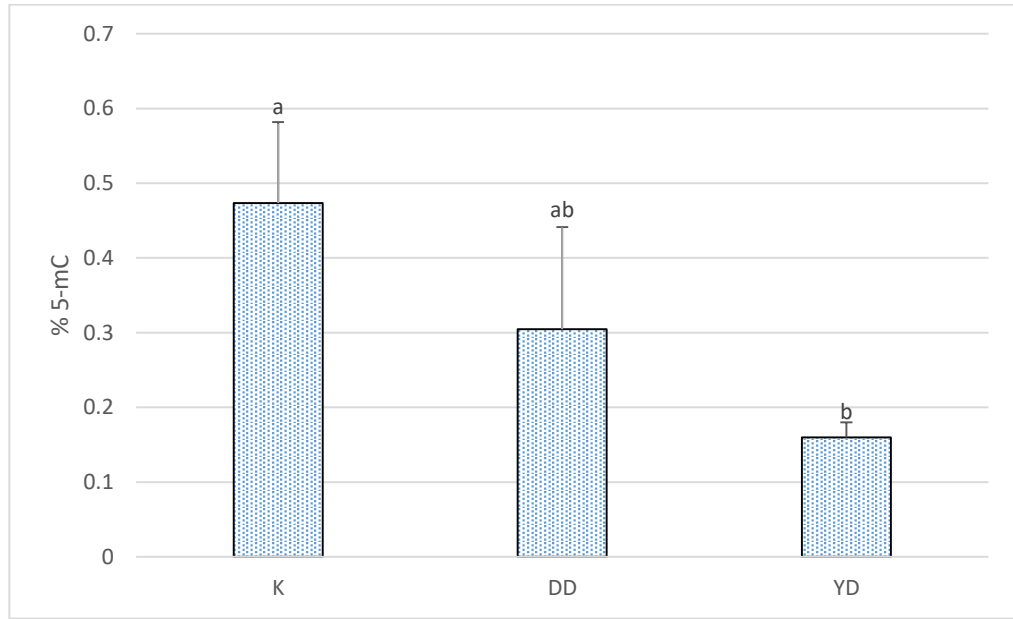
4.9. Global DNA Metilasyonu Düzeyleri

Sperm global DNA metilasyonu düzeylerini gösteren 5-metil sitozin (5-mC) yüzdeleri Tablo 4.9.'da ve Şekil 4.30.'de verilmiştir. K grubu ile karşılaştırıldığında 5-mC düzeyleri DD grubunda % 35,62 oranında azalırken ($p=0,05$), YD grubunda %66,21 oranında azalmıştır ($p<0,05$). YD grubunda 5-mC düzeylerindeki azalmanın daha belirgin olduğu, DD grubuna kıyasla % 47,52 oranında azaldığı belirlenmiştir ($p=0,05$).

Tablo 4.9. Sperm 5-metil sitozin (%5-mC) yüzdeleri

Çalışma Grupları	5- mC (%)
K (n=6)	0.24 ± 0.02 ^a
DD (n=5)	0.15 ± 0.03 ^{ab}
YD (n=5)	0.08 ± 0.004 ^b

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu



Şekil 4.30. Sperm 5-metil sitozin (%5-mC) yüzdeleri

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

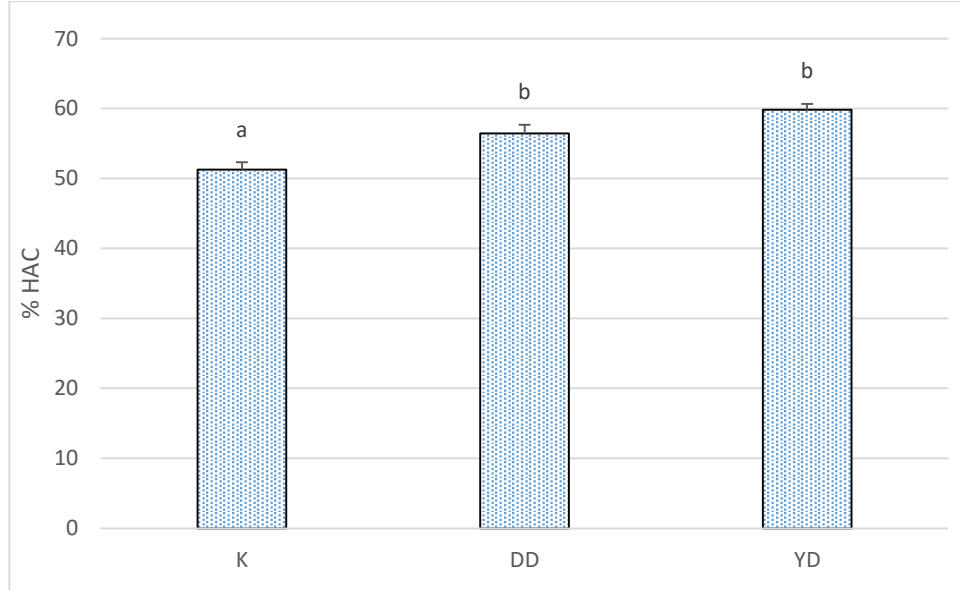
4.10. Histon Asetilasyon Düzeyleri

Sperm histon asetilasyon (HAC) düzeylerini gösteren HAC yüzdeleri Tablo 4.10.'da ve Şekil 4.31.'de verilmiştir. K grubu ile karşılaştırıldığında DD grubuna ait HAC düzeyleri %10,05 oranında artarken, YD grubunda ise kontrole oranla artışın %16,63 olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Gruplar arası fark ise %5,98 olarak belirlenmiştir ($p = 0,05$).

Tablo 4.10. Sperm histon asetilasyon yüzdeleri

Çalışma Grupları	HAC (%)
K (n=6)	51.30 ± 1.03 ^a
DD (n=5)	56.45 ± 1.24 ^b
YD (n=5)	59.83 ± 0.85 ^b

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu



Şekil 4.31. Sperm histon asetilasyon yüzdeleri

Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

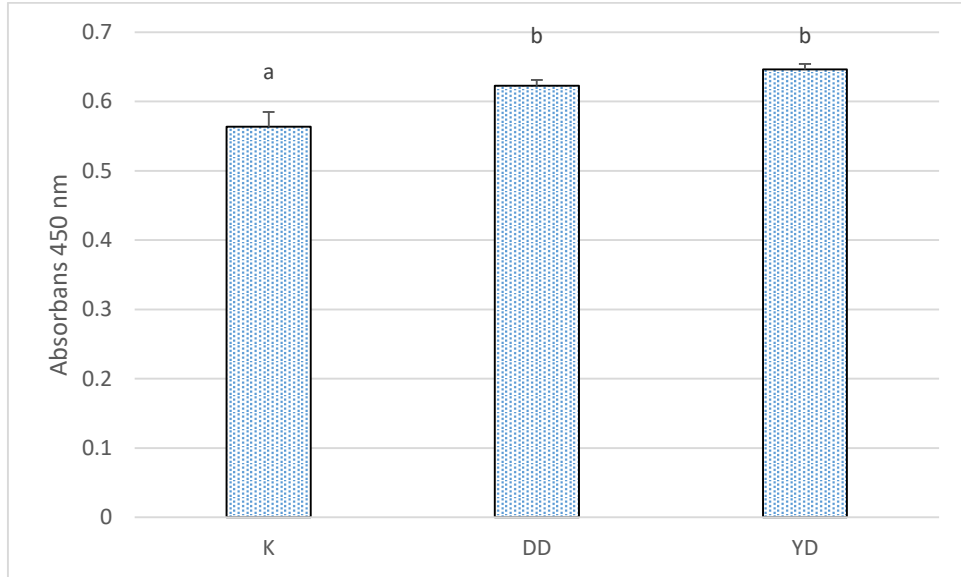
4.11. Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör- γ Düzeyi

Testis dokusunda PPAR- γ DNA bağlanma aktivitesi Tablo 4.11.'de ve Şekil 4.32.'de verilmiştir. K grubu ile karşılaştırıldığında DD grubunda PPAR- γ düzeyleri %10,49, YD grubunda ise %14,71 oranında artmıştır ($p < 0,05$).

Tablo 4.11. Testis PPAR- γ DNA bağlanma aktivitesi

Çalışma Grupları	PPAR- γ Düzeyi (Absorbans 450nm)
K (n=6)	0.56 \pm 0.02 ^a
DD (n=5)	0.62 \pm 0.01 ^b
YD (n=5)	0.65 \pm 0.01 ^b

Tüm değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu



Şekil 4.32. Testis PPAR- γ DNA bağlanma aktivitesi

Tüm değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). K: Kontrol grubu DD: Düşük doz DEHP grubu YD: Yüksek doz DEHP grubu

5. TARTIŞMA

Ftalatlar, plastik malzemelere esneklik ve yumuşaklık özelliği kazandırmak amacıyla kullanılan, oyuncaklar, kozmetik ürünler, kişisel bakım ürünleri, medikal cihaz ve malzemeler, tekstil ürünleri ve gıda ambalajları dahil olmak üzere çok geniş bir alanda tercih edilen ve dolayısıyla en sık maruz kalınan endokrin bozucu kimyasallar maddelerdir. Ftalatlar içinde en sık kullanıma sahip olan DEHP toksisitesi ile ilgili son 50 yılda çok sayıda *in vivo*, *in vitro* ve epidemiyolojik çalışma yapılmış, DEHP'in özellikle erkek üreme sistemi üzerinde toksik etkileri olduğu kanıtlanmıştır. Oksidatif stres ve buna bağlı olarak testiküler hasar, hormon homeostazında bozulmalar, epigenetik değişimler ve enerji metabolizmasındaki bozulmalar gibi birçok mekanizmanın, DEHP'e bağlı üreme sistemi toksisitesinde önemli göstergeler olduğuna ilişkin veriler bulunmakla birlikte, bu parametrelerin birbirleri ile ilişkisi henüz tam anlamı ile aydınlatılamamıştır. Ayrıca, yaygın kullanımı sebebiyle DEHP'e maruziyet hayat boyu devam etmekte ve erkek üreme sistemi üzerinde oluşturduğu toksisitenin gelecek nesillere aktarılabilecek bir takım değişikliklere neden olabileceği ön görülmektedir.

Son yıllarda toksisite temel prensibi olarak “zehiri belirleyen tek şey dozudur.” yaklaşımı yanında toksisite doz-yanıt ilişkisinin doğrusal olmayabileceği görüşünün de üzerinde durulmaktadır. Özellikle DEHP gibi endokrin bozucularda bu ilişkinin doğrusal olmayabileceği ile maruziyet döneminin de toksisitedeki önemli rolü vurgulanmıştır (5).

Bu tez çalışmasında gelişimin devam ettiği preadölesan ve adölesan dönemde DEHP maruziyetinin erkek üreme sistemi üzerindeki toksisitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. DEHP toksisitesi, iki farklı doz düzeyinde maruziyet değerlendirilmiş ve toksik etkilerin altında yatması olası mekanizmalar olarak histopatolojik, apoptotik, metabolomik ve epigenetik değişiklikler ile oksidatif stres biyogöstergeleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre DEHP maruziyeti:

- Sperm sayısı, motilite ve morfolojisinde bozulmalara,

- Testiküler hasara ve apoptoza,
- Oksidatif stres parametrelerinde farklılıklara ve buna bağlı oksidatif hasara,
- Önemli metabolik yolların değişmesine,
- Doku bütünlüğü, sperm olgunlaşması ve aktivitesi açısından önemli bir enzim olan PPAR- γ ekspresyonunda değişime,
- En önemli epigenetik göstergeler olan DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu seviyelerinin değişmesine,

neden olmaktadır. Bu önemli parametrelerin birbirleri ile olan ilişkisi ilerleyen bölümlerde detaylı bir şekilde irdelenecektir.

5.1. Vücut ve Organ Ağırlığı

Çalışmada sütten yeni kesilmiş (21-23 günlük) Sprague-Dawley erkek sıçanlar preadölesan dönemden adölesan dönemin sonuna kadar (37 gün) dozlanmıştır. Daha sonra sıçanların yetişkin olarak kabul edildikleri 10. hafta bitimine kadar beklenerek dekapitasyon gerçekleştirilmiştir. Çalışma gruplarında bulunan sıçanların çalışma boyunca her gün vücut ağırlıkları ölçülmüştür ve DEHP maruziyetine bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Yaşamın hassas dönemlerinden biri olarak preadölesan ve adölesan dönem maruziyetinin sonuçlarını inceleyen son derece sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Literatürdeki çalışmalarda, DEHP maruziyetinin vücut ağırlığı üzerindeki etkilerini gösteren araştırmaların sonuçları çelişkili olmakla beraber, özellikle preadölesan dönem maruziyetinin (50, 150 ve 450 mg/kg/gün DEHP) gözlemediği bir çalışmada vücut ağırlığının anlamlı şekilde değişmediği belirlenmiştir (289). Benzer şekilde, preadölesan, adölesan ve yetişkinlik dönemi boyunca oral yol ile düşük doz DEHP maruziyetinin (0,5, 50, 5000 μ g/kg/gün) erkek sıçanlarda vücut ağırlığını değiştirmediği saptanmıştır (290). Başka bir çalışmada ise postnatal 3. günden sütten kesilmeye kadar olan sürede 600 mg/kg/gün DEHP'e maruz kalan erkek sıçanların

vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir (291). Bu tez çalışmasında sıçanların vücut ağırlıklarında, literatürdeki veriler ile uyumlu olarak herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

Sunulan tez çalışmasında çalışma gruplarına ait dekapitasyonu takiben testis ve epididimis ağırlıkları da kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, her iki DEHP grubunda da testis, epididimis ve rölatif testis ağırlıkları kontrol grubuna oranla anlamlı olarak değişmemiştir. Ancak DD grubunda rölatif epididimis ağırlığının kontrole göre anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Testis ve epididimis ağırlıklarındaki değişimler erkek üreme sisteminin fonksiyonelliği açısından önem taşımaktadır. Testis ağırlığındaki önemli azalma germ hücrelerinin zarar gördüğü anlamına gelebilmektedir. Benzer şekilde epididimis sperm hareketliliğinden sorumlu yapı olduğundan ağırlık kaybı sperm hareketliliğini etkilemektedir. Çalışma gruplarında rölatif epididimis ağırlıklarının azalması ile sperm hareketliliği arasındaki ilişki de bu durumun sonucu olabilir. Bununla birlikte, morfolojik bir problemin veya testiküler/epididimal bir ağırlık kaybının olmadığı durumlarda da sperm üretimi ve fonksiyonu açısından bir takım problemlerin ortaya çıkabileceği bilinmektedir (292). DEHP maruziyeti ile testis ve epididimis ağırlıklarındaki değişimin incelendiği çalışmalarda da, vücut ağırlığına benzer şekilde sonuçların çelişkili olduğu gözlenmiştir. 2018 yılında yapılan bir çalışmada 400 mg/kg/gün DEHP maruziyetinin rölatif testis ağırlıklarında artışa neden olurken epididimal ağırlıkları değiştirmediği belirlenmiştir (265). Buna karşın başka bir çalışmada ise 1000 mg/kg/gün DEHP'in testis ve epididimis ağırlıklarında herhangi bir değişime neden olmadığı belirlenmiştir (293). 250 mg/kg/gün DEHP'e maruz kalan dişi sıçanların yavrularında ise postnatal 22. günde yapılan ölçümlerde epididimal ağırlıkların anlamlı ölçüde azaldığı belirlenmiştir (294). DEHP'e prenatal maruziyetin ölçüldüğü başka bir çalışmada ise rölatif testis ve rölatif epididimis ağırlıklarının 30 mg/kg/gün DEHP maruziyeti ile arttığı gözlenmiştir (295). Yapılan çalışmaların hiç birinde testis ve epididimis ağırlıklarındaki bu birbiri ile tutarsız değişimin nedeni açıklanamamıştır. Sunulan tez çalışmasında ise testis ağırlıkları değişmemiş olup rölatif epididimal ağırlık Zhang ve ark. (294) çalışmasına benzer şekilde azalmıştır.

5.2. Sperm Parametreleri

Çalışmada incelenen sperm parametrelerinin değişimleri Tablo 5.1.'de özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre DEHP maruziyetinin sperm sayısını azalttığı, sperm motilitesi ve morfolojisine zarar verdiği anlaşılmıştır. DD grubunda sperm sayısı artmış gibi görünmekle birlikte, hareketli sperm yüzdesindeki azalma ile anormal sperm yüzdesindeki artış, üretilen spermelerin normal işlevlerini yerine getiremeyecek nitelikte hasarlı olabileceğini göstermektedir.

Tablo 5.1. Sperm parametrelerindeki değişimler

	Hareketli Sperm Yüzdesi	Normal Sperm Yüzdesi	Anormal Sperm Yüzdesi
DD vs. K	↓	↓	↑
YD vs. K	↓	↓	↑
DD vs. YD	↓*	↓	↑

* Bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Yaşamın farklı dönemlerinde DEHP maruziyetinin sperm parametreleri üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarda elde edilen veriler çelişkili olmakla birlikte, DEHP maruziyetinin sperm üretiminde bozulma, fonksiyon kaybı ve yapı bozukluğu gibi sonuçlara neden olabileceği anlaşılmaktadır. 2020 yılında CD1 fareler ile yapılan bir çalışmada, gebeliğin 10-20.günleri arasında ve postnatal 21-45. günler arasında DEHP maruziyetinin sperm sayısı ve motilitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı, ancak sperm morfolojisinde ciddi bozulmalara neden olduğu anlaşılmıştır (296). Yine aynı yıl yapılan başka bir çalışmada ise, 28 gün boyunca 250, 500, 1000 mg/kg DEHP'e maruz bırakılan 6 haftalık Sprague-Dawley erkek sıçanlarda, özellikle 500 ve 1000 mg/kg dozlarda sperm sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (297). Pubertal DEHP maruziyetinin sonuçlarının incelendiği bir diğer çalışmada, 6 haftalık C57BL/6j erkek fareler 28 gün boyunca 0, 125, 250 ve 500 mg/kg/gün DEHP'e maruz bırakılmıştır. Çalışmada 250 ve 500

mg/kg/gün DEHP maruziyetinin sperm sayısını anlamlı derecede azalttığı belirlenmiştir (277). Bir diğer araştırmada ise, 10 gün boyunca oral yol ile 1000 mg/kg DEHP'e maruz kalan Sprague Dawley yetişkin erkek sıçanlarda sperm sayısı ve motilitesinin azaldığı, kuyruk anomalisine sahip spermelerin sayısının ise anlamlı düzeyde arttığı anlaşılmıştır (293). Oudir ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 21 günlük Wistar erkek sıçanlar 120 günlük olana kadar oral 0,5, 50, 5000 µg/kg/gün DEHP'e maruz bırakılmıştır (290). Bu çalışmada ise, prepubertal, pubertal ve postpubertal dönemlerde 50 µg/kg/gün DEHP maruziyetinin sperm sayısında artışa neden olduğu gözlenirken, en düşük ve en yüksek doz düzeylerinde (0,5 ve 5000 µg/kg/gün) DEHP maruziyeti sonucu sperm sayısında anlamlı düzeyde azalma meydana gelmiştir.

Elde edilen veriler, DEHP maruziyetine bağlı olarak meydana gelen sperm sayısındaki artış ve azalışın dozdan bağımsız bir şekilde meydana geldiğini ve DEHP toksisitesinde doz-yanıt ilişkisinin doğrusal olmayabileceğini göstermektedir. Ayrıca sperm morfolojisinin incelendiği çalışmalarda gözlenen yapısal bozukluğu olan spermeler, DEHP maruziyetinin sayıdan bağımsız bir şekilde sperm morfolojisini bozarak spermin dölleme yeteneğini bozabileceği anlamına gelmektedir. Bu tez çalışmasında da benzer şekilde düşük doz grubunda sperm sayısında artış gözlenirken, yüksek doz grubunda sperm sayısı keskin şekilde azalmıştır. Her iki grupta da hareketli sperm yüzdesinde azalma ve morfolojinin bozulmuş olması, DEHP'in spermin hareket yeteneğini ve yapısını bozarak erkek infertilitesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

5.3. Histopatolojik Değerlendirme

Testiküler dokuda yapılan histopatolojik incelemeler DD ve YD grubunda doza bağımlı hasar meydana geldiğini göstermektedir. Özellikle yüksek dozda meydana gelen tübüler hasar ve farklanması tamamlanmamış spermatositlerin varlığı, sperm morfolojisinde bozulmanın DEHP'e bağlı testiküler hasardan kaynaklanabileceğini göstermektedir. Ayrıca, testis dokularındaki spermatositlerde meydana gelen kromatin kondensasyonu spermlerdeki morfolojik bozulma ile yakından ilişkilidir (298). Benzer sonuçlar prepubertal, pubertal ve postpubertal dönemlerde yapılan çalışmalarda da

elde edilmiştir. 28 gün boyunca oral yol ile 250, 500 ve 1000 mg/kg/gün DEHP'e maruz bırakılan pubertal dönemdeki (6 haftalık) Sprague-Dawley erkek sıçanlardan 250 mg/kg/gün DEHP grubunda histopatolojik herhangi bir bozulmaya rastlanmazken, diğer gruplarda testis dokusundaki spermatojenik hücre tabakalarının azaldığı belirlenmiştir (297). Bu gruplarda, spermatogonyumlar spermatojenik epitelin bazal membranından ayrılmış ve sperm hücreleri spermatojenik tübüllere dağılmıştır. Bu çalışmada kullanılan en düşük doz, tez çalışmasındaki en yüksek dozun yaklaşık 5 katı olmasına rağmen, histopatolojik herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, Sertoli hücrelerinin aktif olarak proliferasyon yaptığı prepubertal dönemde maruziyet gerçekleşmemiş olmasından kaynaklanmış olabilir. Pubertal erkek Wistar albino sıçanlara 28 gün boyunca 100, 200 ve 400 mg/kg/gün DEHP uygulanan bir diğer çalışmada ise tüm çalışma gruplarının testis dokularında tübül dejenerasyonu gözlenirken, 200 ve 400 mg/kg/gün DEHP uygulanan gruplarda Sertoli hücre sitoplazmalarında vakuolizasyon olduğu belirtilmiştir. Oudir ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada, 21 günlük Wistar erkek sıçanlar post natal 21 ile 120 gün arasında (prepubertal, pubertal ve postpubertal dönem) 0,5, 50, 5000 µg/kg/gün DEHP'e maruz bırakılmıştır (290). Bu çalışmada, en düşük ve en yüksek dozda seminifer tübüllerde görülmesi beklenen olgunlaşmış spermatozoaların ya çok az ya da hiç olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca Sertoli hücrelerinin doza bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir.

DEHP, maruziyet zamanı ve doza göre farklı toksisite gösterebilir. Gebelik ve emzirme dönemi boyunca oral olarak 30 mg/kg/gün DEHP'e maruz kalan dişi Sprague Dawley sıçanların erkek yavruları incelenmiştir (295). Buna göre, seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri ile spermatogonyum arasındaki hücreler arası bağlantıların bozulduğu, seminifer tübüllerin duvarlarında farklılaşan spermatogenetik seri hücreleri arasında da ayrılıklar olduğu gözlenmiştir. Sunulan tez çalışmasına benzer şekilde gözlenen bu histopatolojik bulgular, gebelik ve laktasyon döneminde düşük dozlarda dahi olsa DEHP maruziyetinin, erkek üreme sisteminin yapı ve fonksiyonlarını bozabileceğini göstermektedir. Bu çalışmalardan farklı olarak, CD1 farelerde gestasyonel ve pubertal DEHP maruziyetinin (içme suyunda 20 µg/L, insanda 2.4–3 µg/kg/gün DEHP'e eşdeğer) sonuçlarının yetişkinlik döneminde

incelendiği bir çalışmada, testis dokusunda herhangi bir histopatolojik değişikliğe rastlanmamıştır (296). Ancak apoptotik incelemelerde gözlenen anlamlı farklılıklar, düşük dozda DEHP maruziyetinin doku hasarı yerine germ hücrelerinde apoptoz meydana getirerek sperm sayılarında düşüşe neden olduğunu göstermektedir. Bir diğer çalışmada, postnatal 3-21. günler arası oral 60, 300 ve 600 mg/kg/gün DEHP'e maruz kalan Sprague Dawley erkek sıçanlarda, tüm gruplarda germinal epitelde azalma ile Sertoli hücre sitoplazmalarında vakualizasyon gözlenmiştir (291).

Sonuç olarak, çalışmalarda görülen seminifer tübüllerde olgunlaşmamış sperm varlığı, primer spermatidlerde azalma ve seminifer tübül yapılarında bozulmalar, DEHP maruziyetinin testis doku bütünlüğünü ve sperm olgunlaşmasını bozarak, olgunlaşmış ve işlevsel sperm sayısında ve motilitesinde azalmaya, amorf sperm sayısında artışa neden olduğuna işaret etmektedir. Sunulan tez çalışmasında maruziyet gruplarındaki epididimal normal sperm yüzdesinin kontrol grubuna göre azalmış olması bu sonucu desteklemektedir. Ayrıca, maruz kalınan DEHP dozuna bağlı olarak sperm üzerindeki etki mekanizmasının da değişebileceği; sperm sayı ve hareketliliğinden sorumlu farklı enzimlerin etkilenebileceği bildirilmektedir (299). Testis dokusunda yalnızca adiposit metabolizmasından değil, enerji ve doku farklılaşmasından da sorumlu olan PPAR- γ aktivitesindeki değişikliklerin, sperm sayısında artış ve sperm morfolojisinde bozulmalara neden olabileceği bilinmektedir (299). Tarafımızdan elde edilen veriler, DD grubundaki sperm sayısında artış, her iki grupta anormal sperm yüzdesinde artış ve dokuda gözlenen bozulmalar ile PPAR- γ aktivitesi arasında ilişki olabileceğine de işaret edebilir.

Diğer taraftan, histopatolojik incelemede gözlenen spermatidlerdeki kromatin kondensasyonu, sperm DNA'sının paketlenmesinden sorumlu olan protamin ve histonların da DEHP maruziyetinden doğrudan ya da dolaylı olarak etkilendiğini göstermektedir. Ayrıca sperm olgunlaşması ve hareketliliğinden sorumlu mekanizmalarda görev alan genlerin aktif olarak kullanımı ya da susturulması da hem histon modifikasyonları hem de DNA metilasyonu ile yakından ilgilidir. Çalışmada elde edilen sonuçlar DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunun da DEHP maruziyeti ile değiştiğini göstermektedir. Testis dokuda gözlenen bu değişimlerin, sperm

DNA 'sındaki epigenetik göstergeler açısından değerlendirilmesi ilerleyen bölümlerde yapılacaktır.

5.4. Apoptoz

Bu çalışmada apoptotik değişikliklerin gözlenmesi amacıyla TUNEL testi kullanılmıştır. TUNEL testi, apoptotik hücre sinyali ile ilişkili DNA fragmanlarının 3-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT)'nin bağlanması sonucu, erken apoptotik sinyallerin belirlenebilmesini sağlayan bir yöntemdir. Böylelikle, çekirdek morfolojisinin henüz değişmediği, DNA parçalanmasının başlamadığı ancak kromatin kondensasyonunun gerçekleştiği aşamada apoptotik hücreleri belirlemek mümkün olmaktadır. Çalışma gruplarına ait testis dokusunda yapılan apoptotik hücre tayininde, her iki gruba ait seminifer tübüllerde TUNEL pozitif hücre sayısının kontrole göre anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca bu artış doz ile doğrusal olarak gerçekleşmiştir.

Karabulut ve ark. tarafından pubertal Wistar albino erkek sıçanlarda yapılan bir çalışmada, 28 gün boyunca 100, 200 ve 400 mg/kg/gün DEHP maruziyetinin benzer şekilde doza bağlı olarak apoptotik hücre sayısını artırdığı anlaşılmıştır (265). Benzer şekilde yürütülen iki çalışmada ise, pubertal Sprague Dawley erkek sıçanlarda 200 ile 1000 mg/kg/gün doz aralığında DEHP maruziyetinin 200 mg/kg/gün maruziyet grubunda anlamlı bir değişime sebep olmazken, 250, 500 ve 1000 mg/kg/gün DEHP gruplarında apoptotik hücre sayısının anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (297, 300). C57BL/6j pubertal erkek farelerin kullanıldığı bir diğer çalışmada da, 125, 250, 500 mg/kg/gün DEHP maruziyetinin apoptotik hücre sayısını doza bağlı şekilde ve istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı gözlenmiştir (277). Bu çalışmalarda apoptotik hücre sayısındaki artışın, DEHP maruziyetine bağlı oksidatif stres ve testosteron seviyeleri ile ilgili olabileceği vurgulanmıştır. Tez çalışmasında kullanılan dozlar bu çalışmalarda kullanılan doz aralığı ile karşılaştırıldığında neredeyse 10'da biri seviyesinde düşük olsa da, elde edilen apoptotik veriler bu çalışmalar ile örtüşmektedir. Farklı dönemlerde maruziyetin sonuçlarının da farklı olabileceği göz önüne alındığında, doz düzeylerindeki farklılığa rağmen benzer etkilerin gözlenmesi maruziyetin erkek üreme sisteminin gelişiminin henüz devam ettiği erken adölesan

dönem boyunca devam etmesi ile açıklanabilir. Bulgular, yaşamın hassas dönemlerinde maruziyetin düşük dozlarda dahi önemli toksisitelere sebep olabileceğini desteklemektedir. Nitekim, CD1 farelerde gestasyonel ve pubertal DEHP maruziyetinin sonuçlarının yetişkinlik döneminde incelendiği bir çalışmada 2,4 ve 3 µg/kg/gün seviyesinde oldukça düşük dozlarda dahi çalışma gruplarına ait testis dokularında apoptotik hücre sayısının arttığı gözlenmiştir (296). Her ne kadar gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yaşamın hassas dönemlerinde DEHP maruziyetinin apoptotik süreçleri indükleyebileceği gösterilmiştir. Benzer şekilde Balcı ve ark. tarafından yapılan çalışmada, gestasyonel ve laktasyonel maruziyetin (30 mg/kg/gün DEHP) çalışma grubundaki apoptotik hücre sayısını anlamlı düzeyde (yaklaşık 2 kat) artırdığı gözlenmiştir (295). Postnatal 3. günden süttten kesilmeye kadar olan sürede oral yolla 60, 300 ve 600 mg/kg/gün DEHP'e maruziyetindeğerlendirildiği bir diğer araştırmada, erkek sıçanlarda doz ile doğru orantılı olarak testis dokusunda apoptotik hücre sayısında artış olduğu saptanmıştır (291).

DEHP maruziyetine bağlı olarak testiküler dokuda apoptozun indüklenmesi, oksidatif stres ve testosteron sentezinin bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkmış olabilir. Testis dokusundaki apoptotik hücrelerin özellikle tübül yapılanmalarının etrafında gözlenmesi abnormal sperm sayısındaki artışın ana nedenlerinden olabilir. Bu sonucun mekanizmasının anlaşılabilmesi için ileri çalışmalar gerekmektedir.

5.5. Oksidatif Stres

Bu çalışmada oksidan ve antioksidan sisteme ait parametreler, DEHP'in neden olduğu erkek üreme sistemi toksisitesinde oksidatif stresin rolünü anlamak amacıyla ölçülmüştür. Bu amaçla antioksidan savunma sisteminin en önemli molekülü olan GSH, dokudaki lipid peroksidasyonunu gösteren MDA ve metabolizmanın dokuyu oksidatif hasardan koruma yeteneğini gösteren TAOC seviyeleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre GSH seviyeleri DD grubunda değişmezken YD grubunda anlamlı düzeyde azalmıştır. MDA ve TAOC seviyeleri ise her iki grupta da doza bağlı şekilde anlamlı düzeyde artmıştır.

Prepubertal ve pubertal dönemde DEHP maruziyetinin oksidatif stres ile ilişkisini değerlendiren çalışmalar son derece sınırlı sayıdadır. Prepubertal ve pubertal dönem maruziyetinin yetişkinlikteki sonuçlarının incelendiği bir çalışmada, Sprague Dawley erkek sıçanlara 50, 150 ve 450 mg/kg/gün DEHP uygulanmıştır (301). Bu çalışmada, sunulan tez çalışmasına benzer şekilde, GSH seviyelerinde azalma ve MDA seviyelerinde artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Ancak tam tersine TAOC seviyeleri anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu farklılık, uygulanan dozların yüksek olması sebebiyle antioksidan savunma mekanizmasının, doza bağlı oluşan oksidatif hasarı telafi edememesinden kaynaklanmış olabilir. Daha yüksek dozların uygulandığı (250 ve 500 mg/kg/gün DEHP) benzer bir çalışmada da, TAOC seviyelerinin doza bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir (34). Maruziyetin yüksek dozda ve prepuberte ile yetişkinliği de kapsayacak şekilde gerçekleştirildiği başka bir çalışmada ise 250, 500 ve 1000 mg/kg/gün DEHP'in MDA seviyelerini değiştirmedeği belirlenmiştir. (297). Her ne kadar bu çalışmada maruziyet süresi uzun olsa da, maruziyetin yetişkinlik dönemini kapsamaması bu dönem içinde antioksidan savunma sisteminin rolünün daha belirgin olması ile istenmeyen etkinin önlenebileceğini göstermektedir. Ancak aynı doz aralığının sadece pubertal dönemde uygulandığı benzer bir çalışmada MDA miktarlarının anlamlı düzeyde ve doza bağlı olarak arttığı kaydedilmiştir (300). Bu durum pubertal dönemde antioksidan savunma sisteminin yeterli korumayı sağlayamadığına ve oksidatif stresin daha belirgin olarak gözlenebildiğine işaret etmektedir.

Daha düşük dozların kullanıldığı bazı çalışmalarda da yüksek dozlarda olduğu gibi birbiri ile çelişkili sonuçlar gözlenmiştir. Prepubertal dönemde içme suyu ile %1 DEHP'e maruz kalan Sprague Dawley erkek sıçanlarda testis dokusundaki MDA düzeylerinde herhangi bir değişim gözlenmezken (302), pubertal dönemde maruziyeti gösteren bir çalışmada 10 mg/kg/gün ve daha yüksek dozlarda MDA seviyelerinin anlamlı düzeyde arttığı anlaşılmıştır (303). DEHP'in ana metaboliti MEHP'in preadölesan Sprague Dawley sıçanlardan alınmış Sertoli hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen *in vitro* bir çalışmada ise, 10 ve 100 $\mu\text{mol/L}$ MEHP maruziyetinin TAOC ve GSH seviyelerini anlamlı düzeyde azaltırken, MDA seviyelerini artırdığı gözlenmiştir

(304). Bu, DEHP'in sadece kendisinin değil metabolitlerin de sperm sayı, motilite ve morfolojisi üzerinde toksisiteye sebep olabileceğini göstermektedir.

Tüm bu çalışmalardan elde edilen veriler incelendiğinde, benzer deneysel kuruluma sahip çalışmaların birbiri ile çelişkili sonuçları olduğu gözlenmiştir. Bu durum, testis dokusunun oksidatif etkenlere karşı oluşturduğu adaptif yanıtın kaynaklanıyor olabilir. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, DEHP maruziyetinin neden olduğu oksidatif stresin testis dokusunda oksidasyona neden olduğunu, antioksidan savunma mekanizmasının çalışmasını engellediğini ve buna bağlı olarak doku hasarı ile birlikte testis dokusunda ve özellikle germ hücrelerinde apoptoza neden olarak sperm parametrelerinde değişime neden olabileceğini göstermektedir.

DEHP kaynaklı oksidatif hasarın germ hücrelerinde ve testis dokusunda PPAR aktivitesini değiştirerek sperm hücrelerinde mitokondriyal hasara neden olabileceği ve böylelikle spermatogenezi bozabileceği de belirtilmiştir (305). Bununla birlikte, sperm hareketliliğinde önemli rolü olan histon ve protaminlerin de oksidatif stres ve buna bağlı kromatin kondensasyonundan etkilendiği bilinmektedir (306). Bu değişimler sonucunda spermatojenik aktivite bozularak, ejakülat içinde hasarlı, olgunlaşmamış, hareketli olmayan ve anormal spermilerin miktarı artabilmektedir. Parametreler arasındaki bu ilişki, DD grubunda gözlenen sperm sayısındaki artışın yanı sıra bu spermilerin büyük bir bölümünün anormal morfolojideki spermilerden oluşuyor olmasını açıklamaktadır. DEHP'in oksidatif stresin yanı sıra DNA metilasyon profilini de bozduğu bilinmektedir. Bu iki DEHP kaynaklı değişim ise, metilasyon için gerekli olan homosistein, GSH sentezi ve birçok antioksidan enzimin de aktivitesini içeren karmaşık bir metabolizma ile yürütülmektedir (307).

Oksidatif stres, DEHP maruziyeti sonucu ortaya çıkan ana tablolardan biridir. Ancak maruziyete bağlı oluşan erkek üreme sistemi bozukluklarının bir sonucu mu yoksa sebebi mi olduğu ise elde edilen verilerin çelişkili olması sebebiyle anlaşılammıştır. DEHP'in erkek üreme sistemi üzerindeki toksik etkilerini inceleyen çalışmalarda, enerji metabolizmasından, enzimatik reaksiyonlara, doku ve hücre farklılaşmasından, epigenetik değişimlere birçok yolağın bu toksisitede rol aldığı anlaşılmaktadır. Antioksidan/oksidan denge ise tüm bu parametrelerle ilişkili olarak

değişmektedir. Bu durumda DEHP kaynaklı meydana gelen oksidatif stresin, hem sebep hem de sonuç olarak değerlendirilmesi mümkündür. Oksidatif stres parametrelerinin PPAR- γ , metabolomik sonuçları, DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu ile ilişkisi ilerleyen bölümlerde detaylı şekilde değerlendirilecektir.

5.6. Metabolik Profil

Kompleks bir yapı olan organizmada biyomoleküllerin düzenlenmesi ve kontrolü birçok fizyolojik ve patolojik yolağa bağlıdır. Normal şartlarda biyolojik sıvılar ve dokulardaki metabolitler dinamik bir denge halindedir. Ancak patofizyolojik durumlar veya toksik maddelere maruziyet bu dengeyi bozarak, ilgili metabolitlerin konsantrasyonlarını değiştirebilir. Bunun sonucunda ise metabolitlerin dahil olduğu enzim aktivitesi ve nükleik asit metabolizması gibi bir çok fizyolojik yolak etkilenebilir. Dolayısıyla vücut kompartmanlarında bulunan metabolit miktarlarındaki değişimler, bu değişimlerin mekanizmalarını anlayabilmek adına oldukça önemli verilerdir. Bu tez çalışmasında testis dokusundaki metabolitlerin DEHP maruziyetine bağlı olarak nasıl değiştikleri incelenerek metabolik yolak analizi yapılmıştır.

Antioksidan özellikleri olan alkoz molekülünün, özellikle DEHP'e bağlı, oksidatif stres, MDA üretimi, apoptoz ve buna bağlı gelişen testis ve epididimis ağırlığındaki azalmayı engelleyebileceği bilinmektedir (308). Tez çalışmasında DD grubunda alkoz miktarının azalmasının yanı sıra, rölatif epididimis ağırlığında azalma, MDA seviyelerinde artış, doku hasarı ve apoptoz gözlenmiştir. Bu durum birçok faktörün bir araya gelmesiyle oluşmaktadır, ancak alkoz metabolizmasının bozulması, sürece katkıda bulunan mekanizmalardan biri olabilir.

Testis dokusundaki ürenin ana kaynağı, kan-testis bariyerini oluşturarak sperm olgunlaşması için uygun mikro çevreyi oluşturmakla görevli olan Sertoli hücreleridir. Sertoli hücreleri, normal metabolik faaliyetleri sırasında arjinaz hidrolizi ile yüksek miktarda üre meydana getirir ve mikro çevredeki üre miktarı, sperm olgunlaşması ve kapasitasyonu için hayati önem taşır (309). YD grubunda gözlenen üre miktarındaki azalma, histopatolojik analizde gözlenen, seminifer tübül hasarı ve Sertoli hücre kaybı sonucu üre üretiminin azalması ile ilişkili olabilir. Apoptotik hücrelerin de seminifer

tübül çevresinde yoğunlaşmış olması, DEHP'in özellikle bu yapıları hedeflediğini ve hem doku hasarı, hem de üre miktarı üzerinden sperm metabolizmasını bozarak erkek infertilitesine sebep olabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda özellikle DD grubunda arttığı gözlenen ve antioksidan savunma sisteminin aktivitesi sonucu üretilen lösin, testiküler oksidatif hasarın en önemli göstergelerindendir (310).

Olgunlaşmış spermeler, hareket ve üreme faaliyetleri için gerekli olan enerjiyi başta glikoz olmak üzere çeşitli şeker moleküllerini okside ederek karşılar. Nadir kullanılan şeker moleküllerinden olan ksilitolün birikmesi, spermın glukoz kullanım kapasitesinin düştüğünü gösteren önemli bir belirteçtir (311). Benzer şekilde sedoheptüloz metaboliti de, karbonhidrat metabolizması üzerinden glikoliz ve Krebs (TCA) döngüsünü etkileyerek enerji üretiminde aktif rol alır. Ayrıca sedoheptüloz, pentoz fosfat yolağının oksidatif olmayan evresinde glikolizi başlatan moleküllerdendir. Bu molekülün dokuda artışı pentoz fosfat yolağının bozulduğunu göstermektedir (312). Bu nedenle, DD grubunda ksilitol ve YD grubunda sedoheptüloz miktarlarının artışı ile sperm hareketliliğindeki azalma, enerji metabolizmasının bozulması ile ilişkili olabilir. Ek olarak, glikozdan enerji üretimi ile ilgili metabolik faaliyetler sonucu meydana gelen glukozamin fosfat, aynı zamanda spermın yumurtayı döllemesi için gerekli olan akrozom reaksiyonu sırasında üretilmektedir (313). Dolayısıyla DD grubunda gözlenen glukozamin fosfat miktarındaki azalma, üretilen spermaların fertil olmayabileceğini göstermektedir.

Riboz-5-fosfat, pürin sentezini başlatan ve DNA ile RNA sentezinde hayati rol taşıyan bir moleküldür (314). Ayrıca NADPH'den sonra pentoz fosfat yolağında üretilen en önemli ikinci üründür (315). Enerji metabolizmasının olmazsa olmaz molekülü olan riboz-5-fosfat, spermatozoid farklılaşması ve sperm kapasitasyonunda aktif rol oynayan glukoz 6 fosfat metabolizması ile sentezlenir (316, 317). Benzer şekilde diğer adı eritroz olan treoz da pentoz fosfat yolağının elemanıdır ve miktarındaki değişimler enerji metabolizmasındaki bozulmayı işaret etmektedir (318). Tez çalışmasında, DD grubunda riboz-5-fosfat miktarının kontrole göre azaldığı, eritroz miktarının ise arttığı belirlenmiştir. Bu DEHP maruziyetinin düşük dozda dahi, enerji metabolizmasını birkaç mediyatör üzerinden etkileyerek sperm fonksiyon ve farklılaşmasını engelleyebildiğini göstermektedir.

Bunlara ek olarak hem DD hem YD grubunda treitol miktarının azaldığı gözlenmiştir. Treitol, NADPH/NADP⁺ dönüşümü, glikoliz yolağı ve NADPH aracılı reaktif oksijen türevlerinin üretimi ile ilgili metabolik yollarda rol alan bir ara metabolittir (319) ve degradasyonu PPAR- γ tarafından kontrol edilir (320). Tez çalışmasında gözlenen hem DD hem YD gruplarında PPAR- γ ekspresyonundaki artış, elde edilen bu veriyi destekler niteliktedir.

Yapılan analiz sonucunda hem DD hem YD grubunda N-asetil glutamik asit miktarının değiştiğı belirlenmiştir. N-asetil glutamik asit, arjinin sentezinin ilk elemanı ve üre siklusunun düzenleyicisidir (321). Dokuda arjinin birikmesinin ise NO radikalının miktarını artırarak oksidatif stres kaynaklı testiküler hasara neden olabileceğı belirlenmiştir (322). Yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı, spermin ana enerji kaynağı olan pentoz fosfat yolağı inhibe olduğunda ve glikoz 6 fosfat metabolizması çalışmadığında, dokuda arjinin artarak süksinik asit sentezini ve devamında TCA siklusunu başlatır (323). Bu spermin enerji üretimini devam ettirebilmek için kullandığı alternatif bir yoldur (317). Bu yolda sperm motilitesinin devam ettirilebilmesi için, mitokondride pirüvik asit hızla laktik asite dönüştürülür. DD ve YD grubunda gözlenen pirüvik asit miktarındaki azalma da bu yolağın devreye girdiğinin göstergesidir. Ancak TCA siklusunda enerji üretimi için kullanılan elektron transferleri ve meydana gelen serbest radikaller, oksidatif stresi indükleyerek, buna bağılı doku hasarına ve mitokondriyal hasara neden olabilir (324).

Piroglutamik asit, diğere adıyla pidolik asit, enzimatik ve non-enzimatik yollar aracılığıyla doğal olarak meydana gelen bir aminoasit türevidir. Yapılan çalışmalar piroglutamik asit düzeylerinin glutatyon metabolizması ile yakından ilişkili olduğunu, özellikle parasetamol zehirlenmesi gibi GSH düzeylerinin hayati önem arz ettiği durumlarda, seviyelerinin arttığını göstermektedir (325-327). Bu veriler, YD grubunda gözlenen ve antioksidan savunma metabolizmasının en önemli molekülü olan GSH düzeylerindeki azalma ile yine YD grubunda belirlenen azalmış piroglutamik asit miktarının birbiri ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, otozomal dominant bir hastalık olan ve tirozin metabolizmasının bozulduğu Hawkinsinüri hastalığında da piroglutamik asit metabolitin miktarlarının değiştiğı bilinmektedir (328). Bilindiğı üzere, sperm kapasasyonu sırasında, mitokondride

üretilen ROS'un en önemli kaynağı tirozin fosforilasyonudur (166). Dolayısıyla, YD grubunda sperm hareketliliğinde gözlenen anlamlı azalma, yüksek doz DEHP maruziyetinin, hem ROS üretimini hem de antioksidan savunma mekanizmasını etkileyerek sperm üretim ve kapasitasyonunu bozabileceğini göstermektedir.

Sperm metabolizması ve testiküler doku bütünlüğü için hayati olan bir diğer mekanizma yağ asit metabolizmasıdır. Oleik asit, yağ asidi degradasyonu sonucu ortaya çıkan önemli bir uzun zincirli yağ asididir (329). Palmitik asit ise, lipojeniz sırasında oluşturulan ilk yağ asididir, enerji üretimi ve TCA siklusunda görevli olan asetil CoA ile negatif feedback yaparak çalışır (330, 331). Özellikle YD grubunda oleik asit ve palmitik asidin artışı, asetil CoA üzerinden TCA siklusunun engellenmiş olabileceğini göstermektedir. Bunun sonucu olarak da YD grubunda laktik asit miktarlarının azaldığı gözlenmiştir. Bu durumda hem pentoz fosfat yolağının hem de TCA siklusunun bozulması sebebiyle sperm hareketliliği azalmış olabilir. Diğer yandan, palmitik asit artışı lipojenizin arttığını göstermektedir. Bu da DEHP'in obezogen etkilerinin sonucu olabilir. Bununla birlikte oleik asit artışı ise yağ asidi degradasyonunu göstermektedir. Bu birbirinin tersi metabolik faaliyetler, hücre ve doku iskeletinin ana bileşeni olan lipitlerin metabolizmasını dengelemek ve doku bütünlüğünü sağlamak amacıyla ortaya çıkan bir adaptasyon faaliyeti olabilir.

Benzer şekilde özellikle DD grubunda azalan heptadekanoik asit ve linoleik asit yağ metabolizmasının ürünleridir. Sperm hareketliliğini sağlamak amacıyla, hem testiste, hem de ejakülat içerisinde yüksek miktarlarda bulunur (332). Dolayısıyla çalışma grubunda bu metabolitlerin miktarlarının azalması, yukarıdaki metabolik faaliyetlere benzer şekilde sperm hareketliliğini azaltan bir diğer faktör olabilir. Bazı çalışmalarda, linoleik asit miktarındaki azalmanın, oksidatif stres, inflamasyon, hormon metabolizması ve apoptoz gibi yollar üzerinden, seminifer tübül yapısını bozduğu gösterilmiştir (333-336). Diğer yandan, linoleik asidin, metil donörlerinin metabolizmasını bozarak, sperm epigenetik profilini özellikle DNA metilasyon profilini değiştirdiği bilinmektedir (337). Ancak, metil donörlerinin metabolizması ile yağ metabolizması arasında bir ilişki olup olmadığı henüz anlaşılamamıştır.

Metabolomik analiz sonucunda elde edilen önemli bir değişim ise YD grubunda urasilin azalmasıdır. Urasil, RNA'nın en önemli bazıdır ve pentoz fosfat yoluyla üretilir. Urasil miktarı değiştiğinde ise, folat metabolizması bozularak DNA hasarına neden olabilir (338). Yapılan bir çalışmada urasil miktarı ile CpG adalarında sitozin deaminasyonu ve buna bağlı epigenetik değişimler arasında ilişki saptanmıştır (339). Urasil miktarının azalmasına bağlı olarak folat metabolizmasının bozulması, nükleik asit sentezi, antioksidan aktivitede görev alan metiyonin üretimi ve redoks reaksiyonları gibi birçok hayati faaliyetin de bozulmasına neden olmaktadır (340). Bununla birlikte, antioksidan moleküllerin prekürsörü olan metiyoninin aynı zamanda bir metil donörü olduğu bilinmektedir ve DNA metilasyon profilindeki değişimler ile ilişkili olabileceği vurgulanmaktadır (341).

DD v YD gruplarında miktarı artan mimozin ve arabitol metabolitleri intrinsik yollara ait değildir. Bu metabolitlerin dozlama sırasında DEHP çözeltisi hazırlamak amacıyla kullanılan taşıyıcıdan kaynaklandığı belirlenmiştir.

Literatürde DEHP maruziyetinin metabolik profildeki etkilerini inceleyen çalışmalar oldukça kısıtlı sayıdadır. Ancak elde edilen veriler ve değiştiği saptanan metabolik yollar, tez çalışmasında elde edilen veriler ile örtüşmektedir. 3 haftalık C57BL/6 erkek fareler ile yapılan bir çalışmada, 522 mg/kg/gün DEHP maruziyetinin testiste arjinin ve prolin metabolizması, yağ asidi biyosentezi ve yağ asit degradasyonu ile ilgili metabolitleri değiştirdiği belirlenmiştir (342). Yetişkin Wistar sıçanlara 28 gün 3000 ppm DEHP verilen bir diğer çalışmada ise peroksizom proliferasyonu ve yağ asidi metabolizmasına ait metabolitler değişmiştir (343). Tez çalışmasına benzer olarak, treonin ve heptadekanoik asit gibi sperm için önemli metabolitlerin de değiştiği gösterilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada hem dişi hem erkek fareler kullanılarak elde edilen veriler cinsiyetlere göre karşılaştırılmış, erkek farelerde lipit metabolizması ile ilgili metabolitlerin dişilere göre daha çok değiştiği belirlenmiştir. DEHP toksisitesinde hedef organ ve sistemin erkek üreme sistemi olması, bu cinsiyete bağlı yanıt ile ilişkili olabilir. Başka bir çalışmada ise maternal DEHP maruziyetinin, erkek yavruların metabolik profilinde meydana getirdiği değişimlerin anlaşılması amacıyla, dişi Sprague Dawley sıçanlara gebelik ve emzirme dönemi boyunca 600 mg/kg/gün DEHP verilmiştir. Çalışmadaki erkek yavrular 14 haftalık yetişkin

olduklarında incelenmiş ve pürin metabolizması, yağ asidi sentezi, oksidatif stres, PPAR fonksiyonu ve adiposit farklılaşması ile ilgili yolların değiştiği belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca incelenen erkek yavruların sperm fonksiyonlarının da bozulduğu gözlenmiştir (344). DEHP'e yapıcı benzeyen bir ftalat türevi olan dibütil ftalat ile yapılan bir çalışmada ise, yetişkin Sprague Dawley sıçanlara cinsiyetin belirlendiği embriyonik dönemin 8 ile 14. günleri arasında 500 mg/kg/gün DBP verilerek, F0, F1, F2 ve F3 jenerasyonunun metabolik ve epigenetik profillerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Bu çalışmada, embriyonik dönemde DBP maruziyetinin, metil donör metabolizmasını bozarak, tez çalışmasında da gözlendiği gibi 5-mC miktarlarını azaltarak epigenetik profili bozduğu ve bu değişimin sonraki jenerasyonlara aktarıldığı anlaşılmıştır (345).

Özetle, metabolomik analiz sonucunda elde edilen veriler DEHP maruziyetinin yağ asidi metabolizmasını bozduğunu kanıtlar niteliktedir. Histopatolojik incelemelerde gözlenen doku hasarı, doku ve hücre membranının önemli bir komponenti olan yağ moleküllerinin sentez ve degradasyonundan sorumlu mekanizmaların bozulmasından kaynaklanıyor olabilir. Bununla birlikte, sperm fonksiyonu için gerekli olan fosfolipit ve prostaglandinlerin de başlangıç molekülleri yağ asididir. Böylelikle bu mekanizmaların bozulması sperm fonksiyonlarını da etkileyebilir. Testis, Sertoli hücreleri, kök hücreler ve spermatojenik hücrelerden oluşur ve yağ asit sentezi hücre membranlarının stabilitesi için oldukça önemlidir. Dolayısıyla bu fonksiyonlardaki bozulma ile histopatolojik analizlerde gözlenen seminifer tübül hasarı ve seminifer epitel içeriğinin lümene dağılması gibi bulgular ilişkili olabilir. Diğer yandan, çalışmada DEHP'in PPAR- γ ekspresyonunu her iki çalışma grubunda da artırdığı gözlenmiştir. Yağ asidi sentezi, pentoz fosfat yolağı, TCA siklusu ve glikoliz, PPAR ailesininin aktif rol aldığı yollarlardır. DEHP'in PPAR inhibisyonu yapabileceği göz önüne alındığında (346), ekspresyon seviyelerindeki artış, bu inhibisyona yanıt olarak gelişmiş olabilir. Ancak, elde edilen veriler bu mekanizmanın tanımlanabilmesi için yeterli değildir ve daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

Sonuç olarak, sunulan tez çalışmasında DEHP maruziyeti, sperm parametrelerindeki değişimler, epigenetik değişiklikler ve oksidatif stresin oluşumu ile

ilişkilendirilebilecek metabolik profil değişiklikleri gözlenmiştir. Elde edilen mekanistik verilerin, hem çalışmadaki diğer parametrelerin ölçümlerinden elde edilen sonuçları kapsar nitelikte olduğu, hem de sınırlı sayıdaki literatür verisi ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

5.7. Epigenetik Profil

Bu çalışmada, DEHP'in epigenom üzerinde meydana getirebileceği değişimlerin incelenmesi amacıyla, en önemli epigenetik biyogöstergelerden olan global DNA metilasyonu ve önemli histon modifikasyonlarından biri olan histon asetilasyonu seviyeleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, sperm DNA'sının doza bağlı olarak hipometilasyona uğradığını, histonlarda ise yine doza bağlı şekilde asetilasyonun arttığını göstermektedir. Erkeklerde endokrin bozucu maruziyetinin sonraki nesillerde sperm DNA metilasyon profilini değiştirdiği bilinmektedir (347). Ancak, DEHP ile ilgili yapılan çalışmalar son derece kısıtlı sayıdadır. Bu çalışmalar genellikle prenatal maruziyet ve nesiller arası epigenetik aktarım ile ilgilidir ve sperm epigenomu üzerindeki çalışmalar oldukça kısıtlı sayıdadır. Yapılan literatür incelemesinde preadölesan ve adölesan dönem maruziyetinin sperm DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu üzerindeki etkilerini yetişkinlik döneminde inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Prepubertal, pubertal ve yetişkinlik dönemi boyunca 5, 50 ve 500 mg/kg/gün DEHP'e maruz kalan sıçanlarda yapılan bir çalışmada, karaciğerde lipit ve enerji metabolizmasının en önemli elemanı olan PPAR- γ geninin promotör bölgesinde DNA metilasyonunun azaldığı belirlenmiştir (348). Sunulan tez çalışmasında buna benzer şekilde DEHP maruziyetinin sperm DNA metilasyonunu azalttığı ancak PPAR- γ DNA bağlanma aktivitesi dolayısıyla ekspresyonunu doza bağlı şekilde artırdığı anlaşılmıştır. Yetişkin F344 erkek sıçanlarda kronik DEHP maruziyetinin incelendiği bir çalışmada da benzer şekilde hepatik global DNA metilasyon seviyelerinin azaldığı ancak H3K9 ve H4K20 histon asetilasyonlarının değişmediği belirlenmiştir (349). Ayrıca çalışmada önemli bir metil donörü olan S-adenozil metiyonin (SAM) seviyeleri değişmemekle beraber DNMT-1 protein ekspresyonunun arttığı anlaşılmıştır. Karaciğerde, DNA metilasyonu ile PPAR aracılı non-genotoksik karsinogenez

arasındaki ilişki bilinmektedir (350). Bu tez çalışmasında, enerji ve hücre farklılaşma mekanizmalarının değiştiği, histopatolojik, apoptotik, metabolomik ve epigenetik veriler ile gösterilmiştir. PPAR- γ ekspresyonundaki artış ve bunun hücre bölünme ve farklılaşması ile ilişkisi göz önüne alındığında, DD grubunda gözlenen sperm sayısındaki artış ve bu spermelerin büyük bir çoğunluğunun hasarlı spermelerden oluşması da bu ilişkiyi doğrular niteliktedir. Epigenetik profildeki değişimler ile PPAR- γ arasındaki ilişkinin anlaşılması için yapılan başka bir *in vitro* çalışmada, bir ftalat türevi olan BBP maruziyeti sonucu, H3K9 asetilasyonunun doza bağlı olarak arttığı, HDAC'lerin aktivitesinin azaldığı ve PPAR- γ aktivitesinin arttığı anlaşılmıştır (351). Ayrıca çalışmada kültür ortamında lipit yığılması olduğu gözlenmiştir. Buna göre ftalatlar, lipit metabolizmasını ve adipojenezi epigenetik mekanizmalar üzerinden değiştirmektedir. Tez çalışmasından elde edilen histon asetilasyon artışı, metabolomik veriler ile PPAR- γ ekspresyonundaki değişimler, toksisitenin bu çalışmada da belirtildiği spesifik genlerdeki epigenetik değişimlerden kaynaklanabileceğini göstermektedir. Ek olarak, C3H10T1/2 mezenşimal kök hücreler ile yapılan bu çalışmada, aynı zaman G9a geninin de ekspresyonu azalmıştır.

G9a geni, sperm oluşumu ve olgunlaşmış sperm aktivitesi için oldukça önemli bir genidir. G9a, sperm farklılaşmasında leptoten spermatidlerin oluşumunu sağlar. Bu genin regülasyonunun bozulması sperm farklılaşmasını durdurur ve buna bağlı olarak pakiten hücre popülasyonunda artış olur. Ayrıca sperm olgunlaşması sırasında meydana gelen mayoz bölünme süreçleri de aksar. Bir çalışmada G9a geni susturulan farelerin steril olduğu gösterilmiştir (352). Ayrıca G9a, heterokromatinlerin oluşumu ve transkripsiyonel gen susturması için kritik olan H3K9'un asetilasyonundan da sorumludur (353). Pubertal C57BL/6j erkek farelerde yapılan bir çalışmada, çalışma grupları 28 gün boyunca 0, 125, 250 ve 500 mg/kg/gün DEHP'e maruz bırakılmış ve puberte bitiminde oluşan epigenetik değişimler incelenmiştir (277). Buna göre DEHP maruziyetinin yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde doza bağlı olarak G9a ekspresyonunu ve H3K9 metilasyonunu azalttığı anlaşılmıştır. Tez çalışmasında histon asetilasyonunun arttığı, histopatolojik incelemelerde, seminifer tübüllerde pakiten hücrelerin biriktiği ve farklılaşmasını tamamlayamamış spermelerin tübül lümenine dağıldığı gözlenmiştir. Histon asetilasyonu ve G9a geni ilişkisi

değerlendirildiğinde, tez çalışmasında elde edilen sonuçlar bu gen gibi sperm olgunlaşması ile ilgili genlere ait epigenetik mekanizmaların değişmiş olabileceğini göstermektedir. Ancak sorumlu mekanizmanın anlaşılabilmesi için gen-spesifik deneylere ihtiyaç duyulmaktadır.

Ftalatlar, histonlar üzerindeki etkilerini doğrudan göstermeyebilir. Histon proteinlerindeki asetil miktarını düzenlemekle sorumlu olan HDAC'ler mekanizmada önemli rol oynayabilir. Bir çalışmada, C57BL/6 farelerden alınan sertoli hücrelerinden hazırlanan primer kültür ortamında, 200 μ M MEHP'in, HDAC2 aktivitesini artırarak metastaz ve apoptozun düzenlenmesinden sorumlu Mta1 ve Sertoli hücrelerinden germ hücrelerinin gelişimini sağlayan Timp2 genlerini susturduğu belirlenmiştir (354). Tez çalışmasında elde edilen sonuçlarda yer alan apoptotik hücrelerde artış ve histopatolojide gözlenen olgunlaşmamış spermler, DEHP'in de benzer bir mekanizma üzerinden toksisite oluşturabileceğini göstermektedir. İnsan nöroblastoma hücreleri SH-SY5Y ile yapılan *in vitro* bir çalışmada da kronik DEHP maruziyetinin HDAC4 aracılı deasetilasyonu artırarak, nörotoksosite gösterdiği ve nöronal hücre ölümünü indüklediği belirlenmiştir (355). TM3 Leydig hücre hattı ile yapılan bir çalışmada ise 100, 200, 300, 400 μ M MEHP'in, testiküler gelişimin tamamlanması için hayati rol oynayan m6A geninin ekspresyonunu artırdığı ve bu gene ait histonlarda doza bağlı hiperasetilasyon meydana getirdiği gözlenmiştir (356). Ek olarak testiküler ROS miktarındaki artış, otofaji ve testiste gözlenen yapısal hasarlar, çalışmadan elde edilen diğer önemli sonuçlardır. Bu durum histon asetilasyonunun spesifik genlerin regülasyonunu bozarak, testiküler gelişimi engellemesine ve bölgesel hücre ölümlerinin gerçekleşmesine neden olabilir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Literatürde DEHP ve diğer ftalatların epigenetik etkilerinin incelendiği kısıtlı sayıda çalışma olmakla beraber, erkek üreme sistemi ile ilgili çalışmalar genelde birkaç jenerasyonu kapsayacak şekilde tasarlanmıştır ve epigenetik değişimlerin nesiller arası aktarılıp aktarılmadığı konusuna yoğunlaşmıştır. Dişi Sprague Dawley sıçanların gebelik boyunca 5 ve 500 mg/kg/gün DEHP'e maruz bırakıldığı bir çalışmada, F1 ve F2 jenerasyonundaki erkek sıçanlarda toplam 60 gende hipermetilasyon, 136 gende ise hipometilasyon görülmüştür (357). Ayrıca, F1 ve

F2'de sperm sayı ve hareketliliğinin anlamlı şekilde azaldığı, epigenetik profili değişen genlerin ise, peptid-tireonin fosforilasyonu, karbonhidrat metabolizması, lipid metabolizması ve hücre farklılaşması gibi mekanistik yollarda görev aldığı anlaşılmıştır. Başka bir çalışmada ise 0,01, 0,1 ve 1 mg/kg/gün prenatal ve laktasyonel DEHP maruziyetinin, yetişkinlik döneminde prostat dokusunda hücre büyümesini regüle eden PSCA geninin promotör bölgesinde hipometilasyona neden olduğu belirlenmiştir (358). Hipermetilasyonun gen susturma mekanizması olduğu bilinmekle birlikte, hipometilasyonun mekanizması ve sonuçları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Spesifik genlerdeki hipometilasyon, gen işlevlerini bozarak doku veya sistemlerde gelişim bozukluğuna neden olabilir. Bu çalışmada ayrıca östrojen reseptörü (ESR2) ekspresyonu da ölçülerek değişmediği belirlenmiştir. Bu durumda, DEHP'e yaşamın erken dönemlerinde maruziyet sonucu oluşan toksisite, DEHP'in östrojenik etkileri ile ilgili olmayabilir. Reseptör regülasyonları ve hormon seviyelerinin ölçülmesi, ilgili mekanizmanın anlaşılabilmesi için önemli bir katkı sağlayabilir.

İki ayrı fare türünün (FVB/N ve C57BL/6J) karşılaştırıldığı bir çalışmada ise, gebelik dönemi boyunca 300 mg/kg/gün DEHP maruziyetinin, diğer çalışmalardan farklı olarak her iki türde de sperm DNA hipermetilasyonuna neden olduğu gözlenmiştir (359). Bununla birlikte, sperm kemotaksisi ve post transkripsiyonel düzenleyici mekanizmalardan sorumlu genlerin promotörlerinde DNA hipometilasyonunun arttığı anlaşılmıştır. Bu sonuç, DEHP maruziyetinin spermlerin olgunlaşmasını engellediğini, olgunlaşmamış ve üreme kabiliyeti olmayan sperm sayısında artışa neden olabileceğini göstermektedir. Her ne kadar tez çalışmasında global hipometilasyon gözlenmiş olsa da, gözlenen fenotipik sonuçlar bu çalışma ile örtüşmektedir. Bu durum, DNA metilasyon profilindeki değişimlerin rastgele değil spesifik genlerde meydana geldiğini, mekanizmanın anlaşılabilmesi için gen spesifik analizlerin gerekliliğini göstermektedir.

Abdel-Maksoud ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, gebelik döneminde 5 ve 50 µg/kg/gün DEHP'e maruz kalan erkek sıçanlar postnatal 10, 21, 35 ve 90. günlerde incelenmek üzere 4 gruba ayrılmıştır (360). 90 günlük yetişkin erkekler hariç diğer grupların tamamında testis global DNA hipometilasyonu gözlenmiştir. Ayrıca testiküler gelişim ve sperm farklılaşmasında da önemli rolü olan Dnmt3a

proteinlerinde artış meydana gelmiştir. Benzer şekilde gebelik dönemi boyunca 1, 10, 100 mg/kg/gün DEHP maruziyetinin, erkek yavruların yetişkinlik döneminde Leydig hücrelerine ait DNA'da global hipometilasyona neden olurken, Dnmt-1 Dnmt3a ve Dnmt3b gibi testiküler fonksiyonlardan sorumlu elemanların regülasyonlarını değiştirdiği anlaşılmıştır (361). Başka bir çalışmada, gebelik döneminde 750 mg/kg/gün DEHP maruziyetinin benzer şekilde Dnmt-1 Dnmt3a ve Dnmt3b ekspresyonlarını artırdığı, buna ek olarak metilasyon profili değişen genlerin pentoz-fosfat ve riboz-fosfat yolları, glikoliz ve hücre farklılaşmasından sorumlu genler olduğu belirlenmiştir (362). Aynı dozda DEHP ve gebelik dönemi maruziyetinin incelendiği başka bir çalışmada da 197 tane genin kontrole göre metilasyon profillerinin değiştiği ve bunların metabolizma, sinyal yolları, hücre farklılaşması ve hücre ölüm mekanizmaları ile ilgili genler olduğu anlaşılmıştır (363). Bu çalışmada özellikle F3 jenerasyonunda anlamlı düzeyde sperm sayısında azalma ve testiküler hasar belirlenmiştir. Döllenmeden hemen önce sperm epigenomu tamamen demetile duruma geçerek, döllenme sonrasında remetilasyon gerçekleşmektedir. Ancak bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, epigenetik parmak izlerinin, epigenomun yeniden yazılma işleminden kaçabildiğini göstermektedir. Dolayısıyla yaşamın erken dönemlerinde maruziyet, birkaç nesil sonra dahi yetişkin dönemi hastalıklarına sebep olabilmektedir.

Elde edilen tüm veriler ve literatürdeki çalışmalar değerlendirildiğinde parametrelerin birbirleri ile ilişkisi ve ilgili mekanizmaların çoğunlukla kemirgen türlerine spesifik olduğunu belirtmek gerekmektedir. Benzer mekanizmaların varlığının anlaşılabilmesi için insan çalışmalarına ihtiyaç vardır. Literatürde bu konuda yapılmış kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. İnfertilite kliniğine başvuran 118 erkekte alınan spermlerde yapılan analizlere göre maruz kalınan DEHP miktarı arttıkça total DNA hipometilasyonunun arttığı anlaşılmıştır (275). Gen spesifik analizlerde ise, sperm motilitesinde görevli Line-1 geninde hipometilasyon ve yine aynı yolda görev alan h19 geninde hipermetilasyon, bunlara bağlı olarak kromatin yapılarında ve sperm kalitesinde bozulmalar olduğu anlaşılmıştır. Tez çalışmasında da benzer şekilde kromatin kondensasyonu gözlenmiştir.

Literatürden elde edilen verilere göre, ftalat maruziyeti insanlarda, kan (364), plasenta (365), kord kanı (366) gibi biyolojik sıvılarda global DNA hipometilasyonu yapabilmektedir. Ftalatların DNA ile nasıl etkileştiği halen bilinmemekle birlikte, altta yatan mekanizmalardan birinin oksidatif stres olabileceği gözden kaçmamalıdır. Çünkü ftaltların ROS üretimini artırdığı bilinmektedir (367). Ek olarak sitozinin oksidasyona karşı oldukça hassas olması, ROS varlığında kolaylıkla metil sitozin veya hidroksimetil sitozin meydana gelmesine neden olabilir. Bu durum da CpG adacıklarına bağlanan proteinlerin aktivitesini engelleyebilir (368).

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, oluşan oksidatif stres, doku hasarı ve sperm parametrelerindeki değişimlerin, epigenetik profildeki doza bağlı farklılıklar ile ilgili olduğunu ve tüm bunların metabolomik analiz ile elde edilen mekanistik veriler ile desteklendiğini göstermektedir.

5.8. Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gamma (PPAR- γ)

Tez çalışmasında, DEHP'in neden olduğu üreme sistemi toksisitesinde, enerji ve yağ metabolizmasının rolünün anlaşılabilmesi amacıyla PPAR- γ DNA bağlama aktivitesi ölçülmüştür. Bu parametrede gözlenen değişimler PPAR- γ ekspresyonundaki değişim ile doğrudan ilişkilidir. Ftalatların hepatotoksitesisi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda, özellikle DEHP'in, PPAR- γ indüksiyonu yaptığı bilinmektedir (369-371). Ancak DEHP'in testiküler dokudaki PPAR- γ ekspresyonu üzerindeki etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. PPAR- γ aktivitesinin testis fonksiyonları için önemli olduğu düşünülmeyle birlikte, altında yatan mekanizma henüz tam olarak anlaşılammıştır. Elde edilen sonuçlar, PPAR- γ ekspresyonunun doza bağlı şekilde arttığını göstermektedir.

PPAR'ler yağ ve enerji metabolizmasının en önemli bileşenleridir. PPAR'lerin testis dokusundaki dağılımı ve fonksiyonları henüz tam olarak anlaşılammamakla birlikte, özellikle Leydig ve Sertoli hücrelerinde lokalize olduğu bilinmektedir (372). Gelişmekte olan testiküler dokuda PPAR- γ inhibisyonu sonucu, Leydig hücrelerinde mitokondriyal aktivitenin bozulduğu, Leydig hücrelerinin farklılaşmasının tamamlanamadığı ve testiküler dokuda lipid damlacıklarının

gözleendiği belirlenmiştir (373). Tez çalışmasında da buna benzer şekilde, DEHP dozuna bağlı olarak PPAR- γ ekspresyonu artmakla birlikte, histopatolojik incelemelerde de yine doza bağlı olarak testis tübül yapısının bozulduğu, olgunlaşmamış spermlerin tübül lümenine dağıldığı gözlenmiştir. Ek olarak, doymamış yağ asidi sentezi sırasında oluşan ROS'un büyük bir kısmı PPAR aktivitesi sonucu oluşur (374) ve PPAR- γ aktivitesi ile oksidatif stres göstergeleri olan GSH, MDA, SOD ve TAOC arasında da anlamlı bir bağlantı olduğu bilinmektedir (375). Dolayısıyla tez çalışmasında gözlenen doku hasarı ve oksidan/antioksidan parametrelerdeki değişimler, PPAR- γ kaynaklı oksidatif stres ve buna bağlı testiküler doku hasarını düşündürmektedir. Ancak, PPAR- γ ekspresyonu ile testis dokusundaki hasar ilişkisini değerlendiren çalışmaların sonuçları birbiri ile çelişmektedir. Azalan ekspresyonun testiküler doku bütünlüğünü bozabileceği belirtilmekle birlikte (376), yüksek miktarda ekspresyonun dokuda apoptozu indükleyebileceği de bilinmektedir (377). Dişi Sprague-Dawley sıçanlara gebelik boyunca oral 500 mg/kg/gün DEHP verilen bir çalışmada, doğan erkek yavruların testis dokuları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, apoptozun indüklendiğini ve testis PPAR- γ ekspresyonunun kontrole göre neredeyse 4 kat arttığını göstermektedir (378). Bununla birlikte, antioksidan olduğu bilinen E vitamini suplemantasyonunun, DEHP'in sebep olduğu PPAR- γ indüksiyonunu geri döndürdüğü ve supleman alan gruplarda, apoptotik hücre sayısının DEHP grubuna göre anlamı düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla DEHP, testis üzerindeki toksisitesini PPAR- γ üzerinden ve oksidatif stres yollarını kullanarak gösteriyor olabilir. Bir çalışmada, 30 günlük Sprague Dawley erkek sıçanlara tek doz 1200 mg/kg DEHP verilerek, karaciğer ve testis dokusunda meydana getirdiği hasar incelenmiştir (379). Çalışmada maruziyet kaynaklı indüksiyonun testis dokusunda karaciğere göre anlamlı düzeyde fazla olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, Sertoli hücrelerinin çekirdeğinde bulunan ve enerji metabolizmasında rol alan retinoik asit reseptör (RAR) ekspresyonlarının da azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla, dokuda meydana gelen DEHP kaynaklı RAR ekspresyonundaki azalmayı kompanse etmek amacıyla PPAR- γ ekspresyonu artmış olabilir. Prepubertal Sprague Dawley erkek sıçanlara 28 gün boyunca 250, 500 ve 750 mg/kg/gün DEHP verilen bir diğer çalışmada, benzer şekilde PPAR- γ ekspresyonunun, DNA kırıklarının ve diğer çalışmanın aksine RAR ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir (380). Ayrıca, özellikle

en yüksek doz alan grupta rölâtif testis ağırlığında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Tez çalışmasında TUNEL testinden ve oksidan-antioksidan parametre ölçümlerinden elde edilen sonuçlar, PPAR- γ ekspresyonundaki artışın apoptozu indükleyebileceği ve bunu oksidatif yollar üzerinden yapabileceği bilgisi ile uyumludur. Ayrıca, DD ve YD grubunda rölâtif testis ağırlığı hafifçe azalmış ancak bu farkın kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Bu durum, tez çalışmasında, benzer çalışmalara göre daha düşük doz aralığının kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir.

Testis dokusunda tümöröenez sırasında yüksek miktarlarda ekspresyonu yapılan PPAR- γ 'nın (381), insanlarda prostat ve testis kanserinde de önemli bir role sahip olduğunu gösteren veriler bulunmaktadır (382-384). Ancak bu ilişkinin mekanizması henüz anlaşılammıştır. Bununla birlikte PPAR- γ , sperm üretimi ve fonksiyonu açısından da oldukça önemli bir role sahiptir. İnsanlarda PPAR- γ , testiküler HPG aksının regülasyonuna ve spermatogeneze aktif olarak katkı sağlamakla birlikte, ejakülat içindeki spermelerde de yüksek miktarlarda salgılanmakta ve sperm ileri hareketliliği için gerekli olan enerjinin üretimini sağlamaktadır (385). Testiküler PPAR- γ ekspresyonu artan farelerde, sperm sayı ve hareketliliğinde artış olduğu belirlenmiştir (386). Tez çalışmasında gözlenen, özellikle DD grubunda sperm sayı ve motilitesindeki artışın, PPAR- γ 'nın bu mekanizmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Prepubertal Sprague Dawley erkek sıçanlara 28 gün boyunca 250 ve 750 mg/kg/gün DBP verilen bir çalışmada PPAR- γ ekspresyonunun doza bağlı olarak arttığı belirlenmiştir (387). Ayrıca çalışmada, sperm sayı ve motilitesinin azaldığı, SR-B1, PBR, StAR ve Cyp19 genlerinin ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. DBP'nin de tıpkı DEHP gibi, steroid mekanizmasındaki genler üzerinden sperm üretimini ve hareketliliğini azalttığı düşünülmektedir (388). Farelerde yapılan bir çalışmada artan PPAR- γ ekspresyonu ile sperm kromatin yapısında bozulma ve DNA kırıkları arasında da ilişki belirlenmiştir (389). Ayrıca, testiküler PPAR- γ ekspresyonlarını azaltan ilaçların kullanılması ile sperm kalitesinin arttığı da bilinmektedir (390). Çalışmamızda, YD grubunda DD grubuna göre sperm sayı ve motilitesinde anlamlı ve keskin bir düşüş gözlenmiştir. DEHP dozunun artmasıyla, hem doku ve primer spermatositlerde meydana gelen hasar, hem PPAR- γ 'nın yüksek

miktarda ekspresyonu sonucu, sperm kromatin ve DNA yapısı bozulmuş olabilir. Histopatolojik incelemelerde gözlenen kromatin kondansasyonu ve sperm morfoloji sonuçları da, bu hipotezi desteklemektedir.

Shen ve ark. tarafından 3 haftalık C57BL/6 erkek fareler ile yapılan bir çalışmada, 522 mg/kg/gün DEHP maruziyetinin testiste PPAR aktivitesi ile yakından ilişkili olan arjinin ve prolin metabolizması, yağ asidi biyosentezi ve yağ asit degradasyonu ile ilgili metabolitleri değiştirdiği belirlenmiştir (342). Başka bir çalışmada ise dişi Sprague Dawley sıçanlara gebelik ve emzirme dönemi boyunca 600 mg/kg/gün DEHP verilmiştir (344). Çalışmadaki erkek yavrular 14 haftalık yetişkin olduklarında incelenmiş ve pürin metabolizması, yağ asidi sentezi, oksidatif stres, PPAR fonksiyonu ve adiposit farklılaşması ile ilgili yolakların değiştiği belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca incelenen erkek yavruların sperm fonksiyonlarının da bozulduğu gözlenmiştir. Sunulan tez çalışmasında elde edilen metabolomik veriler de PPAR- γ ile yakından ilişkili birçok metabolik yolağa ait metabolitlerin seviyelerinin değiştiğini göstermektedir. Elde edilen veriler literatürdeki veriler ile uyumludur. Ancak enerji ve yağ metabolizmasında birden çok gen ve protein görev almaktadır. DEHP toksisitesi ile ilişkili yolakların anlaşılabilmesi için gen-spesifik çalışmaların yapılması gereklidir. Bu çalışmalar yapılırken, gen ekspresyonlarını düzenleyen epigenetik mekanizmalar da göz önüne alınmalıdır. Çeşitli dönemlerde ve farklı maruziyet düzeylerinde DEHP ve diğer ftalatların, PPAR- γ ile ilişkili genlere ait promotör bölgelerde DNA metilasyonu profillerini ve histon asetilasyonu yolaklarını değiştirdiği önceki bölümlerde belirtilmiştir (348-351).

Sonuç olarak tez çalışmamızda gözlenen, PPAR- γ ekspresyonundaki doza bağlı artış ile diğer tüm parametrelerde gözlenen değişimler birbirleri ile uyumludur. DEHP maruziyetine bağlı doku hasarı, apoptoz, sperm sayısı, motilite ve morfolojisindeki değişimler, oksidatif stres ve en önemlisi metabolomik yolak çalışmasında elde edilen veriler, PPAR- γ ekspresyonunun, DEHP'in erkeklerde meydana getirdiği üreme sistemi toksisitesinde önemli bir role sahip olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca epigenetik parametrelerdeki ve PPAR- γ ekspresyonundaki değişimler, toksisitenin bu çalışmada da belirtilen spesifik genlerdeki epigenetik değişimlerden kaynaklanabileceğini göstermektedir, ancak bu ilişkinin

kanıtlanabilmesi için spesifik gen ekspresyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Diğer yandan, PPAR- γ 'nın, farelerde Leydig hücre membranındaki östrojen reseptörü ile etkileşerek steroidojenik aktiviteyi değiştirdiği de gösterilmiştir (391, 392). Dolayısıyla DEHP toksisitesinde gözlenen östrojenik ve steroidojenik etkilerin, PPAR- γ aktivitesi ile meydana geliyor olabileceği de göz önüne alınmalıdır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, yaygın olarak kullanılan bir plastizer olan DEHP'e erkek üreme sisteminin gelişmekte olduğu preadölesan ve adölesan dönemde maruziyetin sonuçlarının yetişkinlik döneminde değerlendirilmesi ve bu etkilerin mekanizmalarının anlaşılması amaçlanmıştır. Özetle;

1. Preadölesan ve adölesan dönemdeki gerek düşük gerekse yüksek doz DEHP maruziyeti, yetişkinlik dönemindeki normal sperm yüzdesi ve hareketli sperm yüzdesini azaltırken, anormal sperm yüzdesini artırmıştır. Sperm parametrelerinde gözlenen değişimlerin doz artışı ile daha belirgin hale geldiği belirlenmiştir.
2. Yetişkinlik döneminde yüksek doz DEHP maruziyetinin değerlendirildiği çalışmalar ile karşılaştırıldığında, tez çalışmamızda kullanılan doz düzeyleri daha düşük olmasına rağmen, sperm parametreleri ve testiküler doku hasarı yönünden gözlenen değişikliklerin benzer olduğu saptanmıştır. Bu durum dozdan bağımsız olarak DEHP toksisitesinde maruziyet döneminin önemini göstermektedir.
3. Pubertal dönemin bitişi ile birlikte maruziyetin kesilmesi ve sonuçların yetişkinlikte incelenmesi açısından bu çalışma benzer çalışmalardan farklılık göstermektedir. Elde edilen veriler, maruziyet kesilse dahi toksik etkilerin devam ettiğini, yani DEHP toksisitesinin oluşturduğu hasarın geri dönüşüzlü olabileceğini göstermektedir.
4. Histopatolojik incelemelerde doza bağlı olarak gözlenen, seminifer tübül yapılarındaki bozulmalar, epitel hücre kayıpları, Sertoli hücrelerinin yapıdan ayrılması, olgunlaşması tamamlanmamış sperm popülasyonu, apoptotik hücre sayısındaki artış, sperm morfolojisindeki bozulmalar ve sperm kromatin kondensasyonu gibi veriler, düşük dozlarda ve yaşamın erken dönemlerinde DEHP maruziyetinin yetişkinlik döneminde olası infertilite tablosuna neden olabileceğini göstermektedir.

5. Oksidan/antioksidan parametrelerin deęiřimi, artan dozun oksidatif strese neden olabileceęini, dūřuk dozlarda adaptif yanıtın geliřebileceęini gōstermektedir. Ancak yūksək dozlarda bu adaptif yanıtın oluřan hasarı yeterince kompanse edemedięi gōr÷lmektedir.
6. Metabolomik analiz sonucunda elde edilen veriler, DEHP maruziyetinin primer olarak enerji ve lipit metabolizmasını etkilediğini gōstermiřtir. Bununla birlikte, sperm üretimi ve farklılaşması, antioksidan savunma mekanizması, DNA metilasyon yolakları ve aminoasit sentezi gibi önemli biyolojik fonksiyonların da bu maruziyetten olumsuz etkilendiği anlaşılmıştır.
7. Sperm global DNA hipometilasyonu ve artmış histon asetilasyonu DEHP'in epigenetik profilde önemli değişimler meydana getirdiğini gōstermektedir. Bu değişimlerin, antioksidan savunma mekanizması, PPAR- γ ekspresyon dūzeyleri ve dolayısıyla sperm motilitesi, sperm sayısı, sperm DNA ve kromozom bütünlüğü, doku hasarı ve apoptoz ile yakından ilgili olduğu belirlenmiştir.
8. PPAR- γ ekspresyonundaki doza bağlı artış ile metabolomik veriler birbirlerini doğrular niteliktedir. Ayrıca PPAR- γ 'nın aktif rol aldığı mekanizmalar üzerinden testis dokusu, sperm parametreleri, oksidatif stres, epigenetik ve metabolomik değişimler ile ilişkisi göz önüne alındığında DEHP toksisitesi için kritik bir parametre olduğu anlaşılmıştır.

Tüm bu sonuçlar, erkek üreme sisteminin gelişimini henüz tamamlamadığı preadölesan ve adölesan dönemde maruziyetin dūřuk dozlarda dahi yetişkinlik döneminde ciddi sonuçlara neden olabileceğini, DEHP toksisitesinde birden çok yolağın aynı anda görev aldığını ve özellikle enerji ve lipit metabolizmasının bu maruziyetten olumsuz yönde etkilendiğini gōstermektedir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, gelişimin erken dönemlerinde DEHP maruziyetinin sonuçlarının yetişkinlik döneminde ve bu kapsamda incelendiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca çalışmada elde edilen verilerin mekanistik veriler olması ve

eşdeğer çalışmalardan daha düşük doz aralığının kullanılması, toksisitenin anlaşılması adına literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır. Ancak mekanizmaların işleyişinde çok sayıda yolak yer almaktadır. Bu yolaklarda görevli proteinlerin ve genlerin regülasyonunun DEHP maruziyetine bağlı değişimlerinin anlaşılması adına gen-spesifik ölçümlerin yapılması büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, türler arası farklılıklar göz önüne alındığında, *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilerin ekstrapolasyonuna ve/veya detaylı insan çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKÇA

1. Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect.* 1996;104(suppl 4):715-40.
2. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2009;30(4):293-342.
3. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem.* 2011;127(3-5):204-15.
4. Latini G, Verrotti A, De Felice C. Di-2-ethylhexyl phthalate and endocrine disruption: a review. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2004;4(1):37-40.
5. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs Jr DR, Lee D-H, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev.* 2012;33(3):378-455.
6. Quinnes KM, Doyle TJ, Kim KH, Rissman EF. Transgenerational effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on stress hormones and behavior. *Endocrinology.* 2015;156(9):3077-83.
7. Golshan M, Hatef A, Socha M, Milla S, Butts IA, Carnevali O, et al. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate disrupts pituitary and testicular hormonal functions to reduce sperm quality in mature goldfish. *Aquat Toxicol.* 2015;163:16-26.
8. Oudir M, Chader H, Bouzid B, Bendisari K, Latreche B, Boudalia S, et al. Male rat exposure to low dose of di (2-ethylhexyl) phthalate during pre-pubertal, pubertal and post-pubertal periods: Impact on sperm count, gonad histology and testosterone secretion. *Reprod Toxicol.* 2018;75:33-9.
9. Sun X, Chen W, Weng S, Pan T, Hu X, Wang F, et al. Effects of the environmental endocrine disruptors di-2-ethylhexyl phthalate and mono-2-ethylhexyl phthalate on human sperm function in vitro. *Reprod Fertil and Dev.* 2020;32(6):629-36.
10. Wang Y, Ren W, Li Y, Xu Y, Teng Y, Christie P, et al. Nontargeted metabolomic analysis to unravel the impact of di (2-ethylhexyl) phthalate stress on root exudates of alfalfa (*Medicago sativa*). *Sci Total Environ.* 2019;646:212-9.
11. Dong X, Zhang Y, Dong J, Zhao Y, Guo J, Wang Z, et al. Urinary metabolomic profiling in rats exposed to dietary di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) using ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS). *Environ Sci Pollut Res.* 2017;24(20):16659-72.
12. Tiwana MS, Leslie SW. *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Testicle.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC.; 2020.
13. Mawhinney M, Mariotti A. Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontol 2000.* 2013;61(1):232-51.
14. Al-Agha OM, Axiotis CA. An in-depth look at Leydig cell tumor of the testis. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(2):311-7.

15. Dimitriadis F, Tsiampali C, Chaliasos N, Tsounapi P, Takenaka A, Sofikitis N. The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones*. 2015;14(4):479-503.
16. Nassar GN, Raudales F, Leslie SW. *Physiology, Testosterone*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC.; 2020.
17. Heindel JJ, Treinen KA. Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicol Pathol*. 1989;17(2):411-45.
18. Basaria S. Male hypogonadism. *Lancet*. 2014;383(9924):1250-63.
19. Plant TM, Marshall GR. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocr Rev*. 2001;22(6):764-86.
20. Lee OD, Tillman K. An Overview of Testosterone Therapy. *Am J Mens Health*. 2016;10(1):68-72.
21. Esteves SC. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *Int Braz J Urol*. 2014;40(4):443-53.
22. Robinson JG, Hodges EA, Davison J. Prostate-specific antigen screening: a critical review of current research and guidelines. *J Am Assoc Nurse Pract*. 2014;26(10):574-81.
23. Kumar N, Singh A. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci*. 2015;8(4):191-6.
24. Maduro MR, Lamb DJ. Understanding New Genetics of Male Infertility. *J Urol*. 2002;168(5):2197-205.
25. Eisenberg ML, Li S, Brooks JD, Cullen MR, Baker LC. Increased Risk of Cancer in Infertile Men: Analysis of U.S. Claims Data. *J Urol*. 2015;193(5):1596-601.
26. Eisenberg ML, Li S, Cullen MR, Baker LC. Increased risk of incident chronic medical conditions in infertile men: analysis of United States claims data. *Fertil Steril*. 2016;105(3):629-36.
27. Nieschlag S. *Andrology: male reproductive health and dysfunction*: Springer Science & Business Media; 2013.
28. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Ind J Exp Biol*. 2005;43:963-974.
29. Balcı A, Özkemahlı G, Erkekoglu P, Zeybek D, Yersal N, Kocer-Gumusel B. Effects of prenatal and lactational bisphenol a and/or di (2-ethylhexyl) phthalate exposure on male reproductive system. *Int J Environ Health Res*. 2020:1-14.
30. Karmakar PC, Ahn JS, Kim YH, Jung SE, Kim BJ, Lee HS, et al. Paternal Exposure to Bisphenol-A Transgenerationally Impairs Testis Morphology, Germ Cell Associations, and Stemness Properties of Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15).
31. Almstrup K, Frederiksen H, Andersson AM, Juul A. Levels of endocrine-disrupting chemicals are associated with changes in the peri-pubertal epigenome. *Endocr Connect*. 2020;9(8):845-57.

32. Barakat R, Lin PC, Park CJ, Zeineldin M, Zhou S, Rattan S, et al. Germline-dependent transmission of male reproductive traits induced by an endocrine disruptor, di-2-ethylhexyl phthalate, in future generations. *Sci Rep.* 2020;10(1):5705.
33. Michels KB, De Vivo I, Calafat AM, Binder AM. In utero exposure to endocrine-disrupting chemicals and telomere length at birth. *Environ Res.* 2020;182:109053.
34. Zhao TX, Wang JK, Shen LJ, Long CL, Liu B, Wei Y, et al. Increased m6A RNA modification is related to the inhibition of the Nrf2-mediated antioxidant response in di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced prepubertal testicular injury. *Environ Pollut.* 2020;259:113911.
35. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1057.
36. Talbert PB, Henikoff S. Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. *Nat Rev Genet.* 2006;7(10):793-803.
37. Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Csoka AB. Epigenetics across the human lifespan. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:49.
38. Teperek M, Miyamoto K. Nuclear reprogramming of sperm and somatic nuclei in eggs and oocytes. *Reprod Med Biol.* 2013;12(4):133-49.
39. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2002;3(9):662-73.
40. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003;33(3):245-54.
41. Gibney E, Nolan C. Epigenetics and gene expression. *Heredity.* 2010;105(1):4-13.
42. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer.* 2011;2(6):607-17.
43. Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet.* 2009;10(11):805-11.
44. Barau J, Teissandier A, Zamudio N, Roy S, Nalesso V, Héroult Y, et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science.* 2016;354(6314):909-12.
45. Raddatz G, Guzzardo PM, Olova N, Fantappiè MR, Rampp M, Schaefer M, et al. Dnmt2-dependent methylomes lack defined DNA methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(21):8627-31.
46. Bogdanović O, Veenstra GJC. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma.* 2009;118(5):549-65.
47. Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev.* 2011;25(23):2436-52.
48. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell.* 2011;146(6):866-72.
49. Chen C-C, Wang K-Y, Shen C-KJ. DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases. *J Biol Chem.* 2013;288(13):9084-91.

50. Mariño-Ramírez L, Kann MG, Shoemaker BA, Landsman D. Histone structure and nucleosome stability. *Exp Rev Proteom*. 2005;2(5):719-29.
51. Morales V, Richard-Foy H. Role of histone N-terminal tails and their acetylation in nucleosome dynamics. *Mol Cell Biol*. 2000;20(19):7230-7.
52. Wood C, Snijders A, Williamson J, Reynolds C, Baldwin J, Dickman M. Post-translational modifications of the linker histone variants and their association with cell mechanisms. *The FEBS journal*. 2009;276(14):3685-97.
53. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011;21(3):381-95.
54. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
55. Sadakierska-Chudy A, Filip M. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs. *Neurotox Res*. 2015;27(2):172-97.
56. Deb M, Sengupta D, Kar S, Rath SK, Roy S, Das G, et al. Epigenetic drift towards histone modifications regulates CAV1 gene expression in colon cancer. *Gene*. 2016;581(1):75-84.
57. Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*. 2005;434(7033):583-9.
58. Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos T R Soc B Sci*. 2013;368(1609):20110330.
59. Kota SK, Feil R. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. *Dev Cell*. 2010;19(5):675-86.
60. Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet*. 2008;9(2):129-40.
61. Hogg K, Western PS, editors. Refurbishing the germline epigenome: out with the old, in with the new. *Seminars in cell & developmental biology*; 2015: Elsevier.
62. Hochberg Ze, Feil R, Constancia M, Fraga M, Junien C, Carel J-C, et al. Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocr Rev*. 2011;32(2):159-224.
63. Casas E, Vavouri T. Sperm epigenomics: challenges and opportunities. *Front Genet*. 2014;5:330.
64. Stuppia L, Franzago M, Ballerini P, Gatta V, Antonucci I. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clin Epigen*. 2015;7(1):1-15.
65. Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet*. 2009;10(10):691-703.
66. Barlow DP, Bartolomei MS. Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol Csh Perspect Biol* 2014;6(2):a018382.

67. Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum Reprod update*. 2004;10(1):3-18.
68. Nanassy L, Liu L, Griffin J, T Carrell D. The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. *Prot Pept Let*. 2011;18(8):772-7.
69. Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, Yang A, Laird PW, Sokol RZ. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PloS one*. 2007;2(12):e1289.
70. Hartmann S, Bergmann M, Bohle RM, Weidner W, Steger K. Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod*. 2006;12(6):407-11.
71. Botezatu A, Socolov R, Socolov D, Iancu IV, Anton G. Methylation pattern of methylene tetrahydrofolate reductase and small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N promoters in oligoasthenospermia: a case-control study. *Reprod Biomed*. 2014;28(2):225-31.
72. Marques C, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, et al. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod*. 2008;14(2):67-74.
73. Li B, Li J-b, Xiao X-f, Ma Y-f, Wang J, Liang X-x, et al. Altered DNA methylation patterns of the H19 differentially methylated region and the DAZL gene promoter are associated with defective human sperm. *PloS one*. 2013;8(8):e71215.
74. Kitamura A, Miyauchi N, Hamada H, Hiura H, Chiba H, Okae H, et al. Epigenetic alterations in sperm associated with male infertility. *Congenit Anom*. 2015;55(3):133-44.
75. Aston KI, Uren PJ, Jenkins TG, Horsager A, Cairns BR, Smith AD, et al. Aberrant sperm DNA methylation predicts male fertility status and embryo quality. *Fertil Steril*. 2015;104(6):1388-97. e5.
76. Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure A-K, Usson Y, Pelletier R, Sèle B, et al. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone-deacetylases. *Eur J Cell Biol*. 2000;79(12):950-60.
77. Steilmann C, Cavalcanti MC, Bartkuhn M, Pons-Kühnemann J, Schuppe H-C, Weidner W, et al. The interaction of modified histones with the bromodomain testis-specific (BRDT) gene and its mRNA level in sperm of fertile donors and subfertile men. *Reproduction*. 2010;140(3):435.
78. Okada Y, Scott G, Ray MK, Mishina Y, Zhang Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature*. 2007;450(7166):119-23.
79. Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K. Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia*. 2002;34(6):384-90.
80. Paradowska AS, Miller D, Spiess A-N, Vieweg M, Cerna M, Dvorakova-Hortova K, et al. Genome wide identification of promoter binding sites for H4K12ac in human sperm and its relevance for early embryonic development. *Epigenetics*. 2012;7(9):1057-70.

81. Fenic I, Hossain HM, Sonnack V, Tchatalbachev S, Thierer F, Trapp J, et al. In Vivo Application of Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin-A Impairs Murine Male Meiosis. *J Androl.* 2008;29(2):172-85.
82. Glaser S, Lubitz S, Loveland KL, Ohbo K, Robb L, Schwenk F, et al. The histone 3 lysine 4 methyltransferase, Mll2, is only required briefly in development and spermatogenesis. *Epigen Chrom.* 2009;2(1):5.
83. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* 2004;119(7):941-53.
84. Liu Z, Zhou S, Liao L, Chen X, Meistrich M, Xu J. Jmjd1a demethylase-regulated histone modification is essential for cAMP-response element modulator-regulated gene expression and spermatogenesis. *J Biol Chem.* 2010;285(4):2758-70.
85. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990;347(6294):645-50.
86. Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, et al. Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- α) and PPAR- γ messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR- γ -responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology.* 2000;141(11):4021-31.
87. Ehrmann J, Vavrusová N, Collan Y, Kolar Z. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2002;146(2):11-4.
88. Abbott BD. Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR α), beta (PPAR β), and gamma (PPAR γ) in rodent and human development. *Reprod Toxicol.* 2009;27(3-4):246-57.
89. Froment P, Gizard F, Defever D, Staels B, Dupont J, Monget P. Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J Endocrinol.* 2006;189(2):199-209.
90. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril.* 2002;77(3):433-44.
91. Cui Y, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist UK, Gonzalez FJ, Flaws J, et al. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPAR γ) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J Biol Chem.* 2002;277(20):17830-5.
92. Aquila S, Middea E, Catalano S, Marsico S, Lanzino M, Casaburi I, et al. Human sperm express a functional androgen receptor: effects on PI3K/AKT pathway. *Hum Reprod.* 2007;22(10):2594-605.
93. Guido C, Perrotta I, Panza S, Middea E, Avena P, Santoro M, et al. Human sperm physiology: Estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *J Cell Physiol.* 2011;226(12):3403-12.
94. Aquila S, Gentile M, Middea E, Catalano S, Andò S. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. *Endocrinology.* 2005;146(2):552-7.

95. Aquila S, Gentile M, Middea E, Catalano S, Morelli C, Pezzi V, et al. Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(8):4753-61.
96. Sharma S, Sharma PM, Mistry DS, Chang RJ, Olefsky JM, Mellon PL, et al. PPAR γ regulates gonadotropin-releasing hormone signaling in LbetaT2 cells in vitro and pituitary gonadotroph function in vivo in mice. *Biol Reprod.* 2011;84(3):466-75.
97. Mouihate A, Boissé L, Pittman QJ. A novel antipyretic action of 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 in the rat brain. *J Neurosci.* 2004;24(6):1312-8.
98. Li Y, Ramdhan DH, Naito H, Yamagishi N, Ito Y, Hayashi Y, et al. Ammonium perfluorooctanoate may cause testosterone reduction by adversely affecting testis in relation to PPAR α . *Toxicol Lett.* 2011;205(3):265-72.
99. Corton JC, Lapinskas PJ. Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract? *Toxicol Sci.* 2005;83(1):4-17.
100. Krishnamoorthy G, Selvakumar K, Venkataraman P, Elumalai P, Arunakaran J. Lycopene supplementation prevents reactive oxygen species mediated apoptosis in Sertoli cells of adult albino rats exposed to polychlorinated biphenyls. *Interdiscip Toxicol.* 2013;6(2):83-92.
101. Thomas K, Sung D-Y, Chen X, Thompson W, Chen YE, McCarrey J, et al. Developmental patterns of PPAR and RXR gene expression during spermatogenesis. *Front Biosci.* 2011;3:1209-20.
102. Navarro VM, Tena-Sempere M. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(1):40.
103. Sale E, Denton RM. β -Adrenergic agents increase the phosphorylation of phosphofructokinase in isolated rat epididymal white adipose tissue. *Biochem J.* 1985;232(3):905-10.
104. Floryk D, Kurosaka S, Tanimoto R, Yang G, Goltsov A, Park S, et al. Castration-induced changes in mouse epididymal white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;345(1-2):58-67.
105. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med.* 2013;19(10):1338-44.
106. Pichiah PT, Sankarganesh A, Kalaiselvi S, Indirani K, Kamalakkannan S, SankarGanesh D, et al. Adriamycin induced spermatogenesis defect is due to the reduction in epididymal adipose tissue mass: a possible hypothesis. *Med Hypotheses.* 2012;78(2):218-20.
107. Chu Y, Huddleston GG, Clancy AN, Harris RB, Bartness TJ. Epididymal fat is necessary for spermatogenesis, but not testosterone production or copulatory behavior. *Endocrinology.* 2010;151(12):5669-79.
108. Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Cubacha R, et al. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol.* 2006;20(9):2141-55.

109. Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem.* 1997;272(41):25500-6.
110. Han K, Song H, Moon I, Augustin R, Moley K, Rogers M, et al. Utilization of DR1 as true RARE in regulating the Ssm, a novel retinoic acid-target gene in the mouse testis. *J Endocrinol.* 2007;192(3):539-51.
111. de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Hum Reprod.* 1998;13(suppl_1):1-8.
112. Chu DS, Shakes DC. Spermatogenesis. Germ cell development in *C elegans*: Springer; 2013. p. 171-203.
113. Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung J-J, Clapham DE. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:453-75.
114. Aquila S, Bonofiglio D, Gentile M, Middea E, Gabriele S, Belmonte M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ is expressed by human spermatozoa: Its potential role on the sperm physiology. *J Cell Physiol.* 2006;209(3):977-86.
115. Santoro M, Guido C, De Amicis F, Sisci D, Vizza D, Gervasi S, et al. Sperm metabolism in pigs: a role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). *J Exp Biol.* 2013;216(6):1085-92.
116. Breitbart H. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2003;49(3):321-8.
117. Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, et al. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development.* 1995;121(4):1139-50.
118. Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod.* 2003;68(3):837-45.
119. Wang L, Chen W, Zhao C, Huo R, Guo X-J, Lin M, et al. The role of ezrin-associated protein network in human sperm capacitation. *Asian J Androl.* 2010;12(5):667.
120. Krentz A, Friedmann P. Type 2 diabetes, psoriasis and thiazolidinediones. *Int J Clin Pract.* 2006;60(3):362-3.
121. Savkur RS, Miller AR. Investigational PPAR- γ agonists for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs.* 2006;15(7):763-78.
122. Miraglia E, Lussiana C, Viarisio D, Racca C, Cipriani A, Gazzano E, et al. The pentose phosphate pathway plays an essential role in supporting human sperm capacitation. *Fertil Steril.* 2010;93(7):2437-40.
123. Pena F, Rodríguez Martínez H, Tapia J, Ortega Ferrusola C, Gonzalez Fernandez L, Macias Garcia B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod Domest Anim.* 2009;44(2):345-9.

124. Aquila S, Guido C, Middea E, Perrotta I, Bruno R, Pellegrino M, et al. Human male gamete endocrinology: 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (1, 25 (OH) 2D₃) regulates different aspects of human sperm biology and metabolism. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009;7(1):140.
125. Morrison CD, Brannigan RE. Metabolic syndrome and infertility in men. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2015;29(4):507-15.
126. Leisegang K, Bouic PJ, Menkveld R, Henkel RR. Obesity is associated with increased seminal insulin and leptin alongside reduced fertility parameters in a controlled male cohort. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12(1):34.
127. Skakkebaek NE, Jørgensen N, Main KM, Meyts ERD, Leffers H, Andersson AM, et al. Is human fecundity declining? *Int J Androl*. 2006;29(1):2-11.
128. Sun H, Gong T-T, Jiang Y-T, Zhang S, Zhao Y-H, Wu Q-J. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(23):10952-91.
129. Hultman C, Sandin S, Levine S, Lichtenstein P, Reichenberg A. Advancing paternal age and risk of autism: new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. *Mol Psychiat*. 2011;16(12):1203-12.
130. Cooper R, Hyppönen E, Berry D, Power C. Associations between parental and offspring adiposity up to midlife: the contribution of adult lifestyle factors in the 1958 British Birth Cohort Study. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(4):946-53.
131. Milne E, Greenop KR, Scott RJ, Bailey HD, Attia J, Dalla-Pozza L, et al. Parental prenatal smoking and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Epidemiol*. 2012;175(1):43-53.
132. Halliday J. Outcomes for offspring of men having ICSI for male factor infertility. *Asian J Androl*. 2012;14(1):116.
133. Olsen J, Ramlau-Hansen CH. Dietary fats may impact semen quantity and quality. *Asian J Androl*. 2012;14(4):511.
134. Safarinejad MR, Azma K, Kolahi AA. The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testis axis, and semen quality: a randomized controlled study. *J Endocrinol*. 2009;200(3):259.
135. Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*. 2012;2(4):253-63.
136. Lampiao F. Variation of semen parameters in healthy medical students due to exam stress. *Malawi Med J*. 2009;21(4).
137. Gollenberg AL, Liu F, Brazil C, Drobnis EZ, Guzick D, Overstreet JW, et al. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertil Steril*. 2010;93(4):1104-11.
138. Nandi A, Wang X, Accili D, Wolgemuth DJ. The effect of insulin signaling on female reproductive function independent of adiposity and hyperglycemia. *Endocrinology*. 2010;151(4):1863-71.

139. Schoeller EL, Albanna G, Frolova AI, Moley KH. Insulin rescues impaired spermatogenesis via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in Akita diabetic mice and restores male fertility. *Diabetes*. 2012;61(7):1869-78.
140. Tena-Sempere M. Interaction between energy homeostasis and reproduction: central effects of leptin and ghrelin on the reproductive axis. *Horm Metabol Res*. 2013;45(13):919-27.
141. Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez L, Dieguez C, Casanueva F, Aguilar E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *J Endocrinol*. 1999;161:211-8.
142. Baldelli R, Dieguez C, Casanueva FF. The role of leptin in reproduction: experimental and clinical aspects. *Annals Med*. 2002;34(1):5-18.
143. Velez LM, Abruzzese GA, Motta AB. The biology of the peroxisome proliferator-activated receptor system in the female reproductive tract. *Curr Pharm Des*. 2013;19(25):4641-6.
144. Aitken RJ, Buckingham DW, West KM. Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell Physiol*. 1992;151(3):466-77.
145. Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*. 1994;16(4):259-67.
146. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology*. 2006;67(1):2-8.
147. Aitken RJ, Curry BJ. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(3):367-81.
148. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
149. Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Resprod Biomed Online*. 2003;7(1):65-70.
150. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;250(1-2):66-9.
151. Agarwal A, Virk G, Ong C, Du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 2014;32(1):1-17.
152. Venkatesh S, Shamsi M, Deka D, Saxena V, Kumar R, Dada R. Clinical implications of oxidative stress & sperm DNA damage in normozoospermic infertile men. *Indian J Med Res*. 2011;134(3):396.
153. Aitken RJ, Gibb Z, Mitchell LA, Lambourne SR, Connaughton HS, De Iuliis GN. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biol Reprod*. 2012;87(5):110, 1-11.

154. De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl.* 1992;13(5):368-78.
155. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update.* 2008;14(3):243-58.
156. Kumar S, Murarka S, Mishra V, Gautam A. Environmental & lifestyle factors in deterioration of male reproductive health. *Indian J Med Res.* 2014;140(Suppl 1):S29.
157. MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *American Journal of Physiology-Legacy Content.* 1943;138(3):512-8.
158. Totic J, Walton A. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect on respiration. *Nature.* 1946;158(4014):485-.
159. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers B. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1976;15(4):471-6.
160. Shannon P, Curson B. Kinetics of the aromatic l-amino acid oxidase from dead bovine spermatozoa and the effect of catalase on fertility of diluted bovine semen stored at 5 C and ambient temperatures. *Reproduction.* 1982;64(2):463-7.
161. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Reproduction.* 1987;81(2):459-69.
162. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl.* 1987;8(5):338-48.
163. Aitken RJ, Buckingham DW, Fang HG. Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *J Androl.* 1993;14(2):132-41.
164. Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. 1998 Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl.* 21:81-94.
165. Aitken R, Clarkson J. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *J Reprod Fertil.* 1987;41:183-97.
166. Aitken R, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine D. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci.* 1998;111(5):645-56.
167. Koppers AJ, Garg ML, Aitken RJ. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Rad Biol Med.* 2010;48(1):112-9.

168. Lushchak V, Semchyshyn H. Oxidative stress: molecular mechanisms and biological effects: BoD–Books on Demand; 2012.
169. Lenzi A, Gandini L, Maresca V, Rago R, Sgro P, Dondero F, et al. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. *Mol Hum Reprod.* 2000;6(3):226-31.
170. Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN, Koppers AJ, McLaughlin EA. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):4154-63.
171. Dianov GL, Souza-Pinto N, Nyaga SG, Thybo T, Stevnsner T, Bohr VA. Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. *Progress Nucl Acid Res Mol Biol.* 2001;68:285-98.
172. Shamsi MB, Kumar R, Bhatt A, Bamezai R, Kumar R, Gupta NP, et al. Mitochondrial DNA mutations in etiopathogenesis of male infertility. *Indian journal of urology: J Urol Soc India.* 2008;24(2):150.
173. Feng C-Q, Song Y-B, Zou Y-G, Mao X-M. Mutation of MTCYB and MTATP6 is associated with asthenospermia. *Nat J Androl.* 2008;14(4):321-3.
174. Iommiello VM, Albani E, Di Rosa A, Marras A, Menduni F, Morreale G, et al. Ejaculate oxidative stress is related with sperm DNA fragmentation and round cells. *Int J Endocrinol.* 2015;2015.
175. Dorostghoal M, Kazeminejad S, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia.* 2017;49(10):e12762.
176. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril.* 1997;68(3):519-24.
177. Bay B, Mortensen EL, Hvidtjørn D, Kesmodel US. Fertility treatment and risk of childhood and adolescent mental disorders: register based cohort study. *Bmj.* 2013;347:f3978.
178. Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, Van Essen P, Priest K, Scott H, et al. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *NEJM.* 2012;366(19):1803-13.
179. Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB. Apoptosis in the germ line. *Reproduction.* 2011;141(2):139.
180. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology.* 2008;134(6):1641-54.
181. Rucker III EB, Dierisseau P, Wagner K-U, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Flaws JA, et al. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Mol Endocrinol.* 2000;14(7):1038-52.
182. Manku G, Culty M. Dynamic changes in the expression of apoptosis-related genes in differentiating gonocytes and in seminomas. *Asian J Androl.* 2015;17(3):403.

- 183.**Aitken RJ, Baker MA. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol.* 2013;57(2-3-4):265-72.
- 184.**Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010;365(1546):1501-15.
- 185.**Li Y-J, Song T-B, Cai Y-Y, Zhou J-S, Song X, Zhao X, et al. Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicol Sci.* 2009;108(2):427-36.
- 186.**Sedha S, Kumar S, Shukla S. Role of Oxidative Stress in Male Reproductive Dysfunctions with Reference to Phthalate Compounds. *Urol J.* 2015;12(5):2304-16.
- 187.**Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl.* 2011;13(1):36.
- 188.**Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl.* 2005;26(3):349-53.
- 189.**Havrylyuk A, Chopyak V, Boyko Y, Kril I, Kurpysz M. Cytokines in the blood and semen of infertile patients. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(3):337.
- 190.**Pentikäinen V, Suomalainen L, Erkkilä K, Martelin E, Parvinen M, Pentikäinen MO, et al. Nuclear factor- κ B activation in human testicular apoptosis. *Am J Pathol.* 2002;160(1):205-18.
- 191.**Rousseaux S, Reynoird N, Escoffier E, Thevenon J, Caron C, Khochbin S. Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online.* 2008;16(4):492-503.
- 192.**Urduingio RG, Bayón GF, Dmitrijeva M, Toraño EG, Bravo C, Fraga MF, et al. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum Reprod.* 2015;30(5):1014-28.
- 193.**Faure A, Pivot-Pajot C, Kerjean A, Hazzouri M, Pelletier R, Peoc'h M, et al. Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Mol Hum Reprod.* 2003;9(12):757-63.
- 194.**Murrell A, Heeson S, Cooper WN, Douglas E, Apostolidou S, Moore GE, et al. An association between variants in the IGF2 gene and Beckwith–Wiedemann syndrome: interaction between genotype and epigenotype. *Hum Mol Genet.* 2004;13(2):247-55.
- 195.**Marees T, Dommering C, Imhof S, Kors W, Ringens P, Van Leeuwen F, et al. Incidence of retinoblastoma in Dutch children conceived by IVF: an expanded study. *Hum Reprod.* 2009;24(12):3220-4.
- 196.**Jenkins TG, Aston KI, Meyer TD, Hotaling JM, Shamsi MB, Johnstone EB, et al. Decreased fecundity and sperm DNA methylation patterns. *Fertil Steril.* 2016;105(1):51-7. e3.
- 197.**Dinesh V, Shamsi M, Dada R. Supraphysiological free radical levels and their pathogenesis in male infertility. *Reprod Sys Sexual Disorders.* 2012;1(114):2.

- 198.**Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(2):89-97.
- 199.**Carson R. *Silent spring*: Houghton Mifflin Harcourt; 2002.
- 200.**Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC. Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *NEJM.* 1971;284(16):878-81.
- 201.**Ding D, Xu L, Fang H, Hong H, Perkins R, Harris S, et al., editors. *The EDKB: an established knowledge base for endocrine disrupting chemicals.* BMC bioinformatics; 2010: Springer.
- 202.**Watson R. European Commission tables scientific criteria for endocrine disruptors. *BMJ (Online).* 2016;353.
- 203.**Laws SC, Eldridge CJC. *The US EPA's Tier 1 Screening Battery for Endocrine Disruptor Compounds.* Endocrine Toxicology, Third Edition: CRC Press; 2016. p. 13-38.
- 204.**Commission E, editor *European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. Report of the proceedings*; 1996.
- 205.**Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van Der Kraak G. *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors.* Geneva: World Health Organization. 2002:11-32.
- 206.**Kahn LG, Philippat C, Nakayama SF, Slama R, Trasande L. Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(8):703-18.
- 207.**Kovacs WJ, Ojeda SR. *Textbook of endocrine physiology*: OUP USA; 2011.
- 208.**Charlton SJ. Agonist efficacy and receptor desensitization: from partial truths to a fuller picture. *British J Pharmacol.* 2009;158(1):165-8.
- 209.**Jeyakumar M, Carlson KE, Gunther JR, Katzenellenbogen JA. Exploration of dimensions of estrogen potency parsing ligand binding and coactivator binding affinities. *J Biol Chem.* 2011;286(15):12971-82.
- 210.**Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect.* 2003;111(8):994-1006.
- 211.**Sheehan DM. No-threshold dose–response curves for nongenotoxic chemicals: findings and applications for risk assessment. *Environ Res.* 2006;100(1):93-9.
- 212.**Sheehan DM, Willingham E, Gaylor D, Bergeron JM, Crews D. No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? *Environ Health Perspect.* 1999;107(2):155-9.
- 213.**Sheehan DM, Willingham E, Gaylor D, Bergeron JM, Crews D. No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? *Environ Health Perspect.* 1999;107(2):155-9.
- 214.**Walker DM, Gore AC. Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(4):197-207.

215. Gore AC, Patisaul HB. Neuroendocrine disruption: historical roots, current progress, questions for the future. *Frontiers Neuroendocrinol.* 2010;31(4):395.
216. Skinner MK, Anway MD, Savenkova MI, Gore AC, Crews D. Transgenerational epigenetic programming of the brain transcriptome and anxiety behavior. *PloS one.* 2008;3(11):e3745.
217. Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Kimura-Kuroda J, Miyazaki W, Shimokawa N, Koibuchi N. Disruption of thyroid hormone receptor-mediated transcription and thyroid hormone-induced Purkinje cell dendrite arborization by polybrominated diphenyl ethers. *Environ Health Perspect.* 2011;119(2):168-75.
218. Miyazaki W, Iwasaki T, Takeshita A, Tohyama C, Koibuchi N. Identification of the functional domain of thyroid hormone receptor responsible for polychlorinated biphenyl-mediated suppression of its action in vitro. *Environ Health Perspect.* 2008;116(9):1231-6.
219. McKinney JD, Waller CL. Molecular determinants of hormone mimicry: halogenated aromatic hydrocarbon environmental agents. *J Toxicol Environ Health Rev.* 1998;1(1):27-58.
220. Koch HM, Rossbach B, Drexler H, Angerer J. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates—determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ Res.* 2003;93(2):177-85.
221. Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, et al. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate. *Reprod Toxicol.* 2002;16(5):679-708.
222. Duty SM, Ackerman RM, Calafat AM, Hauser R. Personal care product use predicts urinary concentrations of some phthalate monoesters. *Environ Health Perspect.* 2005;113(11):1530-5.
223. Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, Hungerbühler K. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Analysis.* 2006;26(3):803-24.
224. Koch HM, Bolt HM, Angerer J. Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol.* 2004;78(3):123-30.
225. Wittassek M, Wiesmüller GA, Koch HM, Eckard R, Dobler L, Müller J, et al. Internal phthalate exposure over the last two decades—a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hygiene Environ Health.* 2007;210(3-4):319-33.
226. The European Chemicals Agency. Evaluation of new scientific evidence concerning the restrictions contained in annex XVII to regulation (EC) No 1907/2006 (REACH) Review of new available information for di-‘isononyl’ phthalate (DINP) [Internet]. 2020 [Erişim tarihi: 20 Mart 2020]. Erişim adresi: <https://echa.europa.eu/documents/10162/31b4067e-de40-4044-93e8-9c9ff1960715>.
227. Resmi Gazete. Bazı Tüketici Ürünlerinin Tehlikeli Kimyasal Madde İçeriğine Yönelik Piyasa Gözetimi ve Denetimine İlişkin Tebliğ 2011 [Internet]. 2020

- [Erişim Tarihi: 20 Mart 2020]. Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-9.htm>.
- 228.**Zota AR, Calafat AM, Woodruff TJ. Temporal trends in phthalate exposures: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2010. *Environ Health Perspect*. 2014;122(3):235-41.
- 229.**Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Di-(2-Ethylhexyl)Phthalate (DEHP) [İnternet]. 2020 [Erişim Tarihi 20 Mart 2020]. Erişim adresi: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/TP.asp?id=684&tid=65>.
- 230.**Hall A, Elcombe C, Foster J, Harada T, Kaufmann W, Knippel A, et al. Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse and non-adverse) changes—conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicol Pathol*. 2012;40(7):971-94.
- 231.**Bastos Sales L, van Esterik JC, Hodemaekers HM, Lamoree MH, Hamers T, van der Ven L, et al. Analysis of lipid metabolism, immune function, and neurobehavior in adult C57BL/6JxFVB mice after developmental exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate. *Frontiers Endocrinol*. 2018;9:684.
- 232.**Hirai S, Naito M, Kuramasu M, Ogawa Y, Terayama H, Qu N, et al. Low-dose exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) increases susceptibility to testicular autoimmunity in mice. *Reprod Biol*. 2015;15(3):163-71.
- 233.**Koike E, Inoue K-i, Yanagisawa R, Takano H. Di-(2-ethylhexyl) phthalate affects immune cells from atopic prone mice in vitro. *Toxicology*. 2009;259(1-2):54-60.
- 234.**Fabjan E, Hulzebos E, Mennes W, Piersma AH. A category approach for reproductive effects of phthalates. *Critic Rev Toxicol*. 2006;36(9):695-726.
- 235.**The European Chemicals Agency. Bis(2-ethylhexyl) phthalate 2008 [İnternet]. 2020 [Erişim tarihi: 21 Mart 2020]. Erişim adresi: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15358/2/1>.
- 236.**Liu C, Xu X, Huo X. Anogenital distance and its application in environmental health research. *Environ Sci Poll Res*. 2014;21(8):5457-64.
- 237.**Salazar-Martinez E, Romano-Riquer P, Yanez-Marquez E, Longnecker MP, Hernandez-Avila M. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environ Health*. 2004;3(1):1-6.
- 238.**Dent MP, Carmichael PL, Jones KC, Martin FL. Towards a non-animal risk assessment for anti-androgenic effects in humans. *Environ Int*. 2015;83:94-106.
- 239.**Dean A, Sharpe RM. Anogenital Distance or Digit Length Ratio as Measures of Fetal Androgen Exposure: Relationship to Male Reproductive Development and Its Disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(6):2230-8.
- 240.**Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial M-L, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989)*. *Hum Reprod*. 1991;6(6):811-6.
- 241.**Huang L-P, Lee C-C, Hsu P-C, Shih T-S. The association between semen quality in workers and the concentration of di (2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride pellet plant air. *Fertil Steril*. 2011;96(1):90-4.

242. Thurston SW, Mendiola J, Bellamy AR, Levine H, Wang C, Sparks A, et al. Phthalate exposure and semen quality in fertile US men. *Andrology*. 2016;4(4):632-8.
243. Wirth JJ, Rossano MG, Potter R, Puscheck E, Daly DC, Paneth N, et al. A pilot study associating urinary concentrations of phthalate metabolites and semen quality. *Syst Biol Reprod Med*. 2008;54(3):143-54.
244. Herr C, zur Nieden A, Koch HM, Schuppe H-C, Fieber C, Angerer J, et al. Urinary di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)—metabolites and male human markers of reproductive function. *Int J Hygiene Environ Health*. 2009;212(6):648-53.
245. Bloom M, Whitcomb B, Chen Z, Ye A, Kannan K, Buck Louis G. Associations between urinary phthalate concentrations and semen quality parameters in a general population. *Hum Reprod*. 2015;30(11):2645-57.
246. Pan Y, Jing J, Yeung LW, Sheng N, Zhang H, Yao B, et al. Associations of urinary 5-methyl-2'-deoxycytidine and 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine with phthalate exposure and semen quality in 562 Chinese adult men. *Environ Int*. 2016;94:583-90.
247. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Ligocka D, Radwan P, Bochenek M, et al. Human urinary phthalate metabolites level and main semen parameters, sperm chromatin structure, sperm aneuploidy and reproductive hormones. *Reprod Toxicol*. 2013;42:232-41.
248. Huang L-P, Lee C-C, Fan J-P, Kuo P-H, Shih T-S, Hsu P-C. Urinary metabolites of di (2-ethylhexyl) phthalate relation to sperm motility, reactive oxygen species generation, and apoptosis in polyvinyl chloride workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 2014;87(6):635-46.
249. Assessment RTR. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. 1996.
250. Hamid N, Junaid M, Manzoor R, Jia PP, Pei DS. Prioritizing phthalate esters (PAEs) using experimental in vitro/vivo toxicity assays and computational in silico approaches. *J Hazard Mater*. 2020;398:122851.
251. Liu N, Wang Y, Yang Q, Lv Y, Jin X, Giesy JP, et al. Probabilistic assessment of risks of diethylhexyl phthalate (DEHP) in surface waters of China on reproduction of fish. *Environ Pollut*. 2016;213:482-8.
252. Ye T, Kang M, Huang Q, Fang C, Chen Y, Shen H, et al. Exposure to DEHP and MEHP from hatching to adulthood causes reproductive dysfunction and endocrine disruption in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Aquat Toxicol*. 2014;146:115-26.
253. Wang X, Yang Y, Zhang L, Ma Y, Han J, Yang L, et al. Endocrine disruption by di-(2-ethylhexyl)-phthalate in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Environ Toxicol Chem*. 2013;32(8):1846-54.
254. Repouskou A, Panagiotidou E, Panagopoulou L, Bisting PL, Tuck AR, Sjödin MOD, et al. Gestational exposure to an epidemiologically defined mixture of phthalates leads to gonadal dysfunction in mouse offspring of both sexes. *Sci Rep*. 2019;9(1):6424.

- 255.**Li X-W, Liang Y, Su Y, Deng H, Li X-H, Guo J, et al. Adverse effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on Leydig cell regeneration in the adult rat testis. *Toxicol Lett.* 2012;215(2):84-91.
- 256.**Noriega NC, Howdeshell KL, Furr J, Lambright CR, Wilson VS, Gray Jr LE. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and Long-Evans rats. *Toxicol Sci.* 2009;111(1):163-78.
- 257.**Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M, Konaka R, Hiramoto K, Sasaki J, et al. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di (2-ethylhexyl) phthalate. *Biochem J.* 2002;365(3):849-56.
- 258.**Erkekoglu P, Rachidi W, Yuzugullu OG, Giray B, Favier A, Ozturk M, et al. Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di (2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono (2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicol Appl Pharm.* 2010;248(1):52-62.
- 259.**Zhou L, Beattie MC, Lin C-Y, Liu J, Traore K, Papadopoulos V, et al. Oxidative stress and phthalate-induced down-regulation of steroidogenesis in MA-10 Leydig cells. *Reprod Toxicol.* 2013;42:95-101.
- 260.**Gurdemir G, Erkekoglu P, Balci A, Sur U, Ozkemahli G, Tutkun E, et al. Oxidative Stress Parameters, Selenium Levels, DNA Damage, and Phthalate Levels in Plastic Workers. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2019;38(3):253-70.
- 261.**Woodward MJ, Obsekov V, Jacobson MH, Kahn LG, Trasande L. Phthalates and Sex Steroid Hormones Among Men From NHANES, 2013-2016. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(4):e1225-34.
- 262.**Desdoits-Lethimonier C, Albert O, Le Bizec B, Perdu E, Zalko D, Courant F, et al. Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates. *Hum Reprod.* 2012;27(5):1451-9.
- 263.**Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. *Arch Toxicol.* 2003;77(8):446-51.
- 264.**Fu G, Dai J, Li Z, Chen F, Liu L, Yi L, et al. The role of STAT3/p53 and PI3K-Akt-mTOR signaling pathway on DEHP-induced reproductive toxicity in pubertal male rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2020;404:115151.
- 265.**Karabulut G, Barlas N. Genotoxic, histologic, immunohistochemical, morphometric and hormonal effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) on reproductive systems in pre-pubertal male rats. *Toxicol Res (Camb).* 2018;7(5):859-73.
- 266.**Shao P, Wang Y, Zhang M, Wen X, Zhang J, Xu Z, et al. The interference of DEHP in precocious puberty of females mediated by the hypothalamic IGF-1/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019;181:362-9.
- 267.**Liu T, Wang Y, Yang M, Shao P, Duan L, Li M, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces precocious puberty in adolescent female rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2018;21(8):848-55.

268. Durmaz E, Erkekoglu P, Asci A, Akçurum S, Bircan İ, Kocer-Gumusel B. Urinary phthalate metabolite concentrations in girls with premature thelarche. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018;59:172-81.
269. Kasper-Sonnenberg M, Wittsiepe J, Wald K, Koch HM, Wilhelm M. Pre-pubertal exposure with phthalates and bisphenol A and pubertal development. *PLoS One*. 2017;12(11):e0187922.
270. Wen Y, Liu SD, Lei X, Ling YS, Luo Y, Liu Q. Association of PAEs with Precocious Puberty in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(12):15254-68.
271. Stenz L, Rahban R, Prados J, Nef S, Paoloni-Giacobino A. Genetic resistance to DEHP-induced transgenerational endocrine disruption. *PLoS One*. 2019;14(6):e0208371.
272. Xia B, Wang Y, Wang X, Wu J, Song Q, Sun Z, et al. In utero and lactational exposure of DEHP increases the susceptibility of prostate carcinogenesis in male offspring through PSCA hypomethylation. *Toxicol Lett*. 2018;292:78-84.
273. Chen CH, Jiang SS, Chang IS, Wen HJ, Sun CW, Wang SL. Association between fetal exposure to phthalate endocrine disruptor and genome-wide DNA methylation at birth. *Environ Res*. 2018;162:261-70.
274. Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V. Prenatal phthalate exposure: epigenetic changes leading to lifelong impact on steroid formation. *Andrology*. 2016;4(4):573-84.
275. Tian M, Liu L, Zhang J, Huang Q, Shen H. Positive association of low-level environmental phthalate exposure with sperm motility was mediated by DNA methylation: A pilot study. *Chemosphere*. 2019;220:459-67.
276. Pogribny IP, Tryndyak VP, Boureiko A, Melnyk S, Bagnyukova TV, Montgomery B, et al. Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver. *Mutat Res*. 2008;644(1-2):17-23.
277. Liu C, Qian P, Yang L, Zhang L, Chen C, He M, et al. Pubertal exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate inhibits G9a-mediated histone methylation during spermatogenesis in mice. *Arch Toxicol*. 2016;90(4):955-69.
278. Zhang T, Zhou Y, Li L, Zhao Y, De Felici M, Reiter RJ, et al. Melatonin protects prepubertal testis from deleterious effects of bisphenol A or diethylhexyl phthalate by preserving H3K9 methylation. *J Pineal Res*. 2018;65(2):e12497.
279. Zhao T, Wang J, Wu Y, Han L, Chen J, Wei Y, et al. Increased m6A modification of RNA methylation related to the inhibition of demethylase FTO contributes to MEHP-induced Leydig cell injury(☆). *Environ Pollut*. 2020;268(Pt A):115627.
280. Ojeda S, Advis J, Andrews W, editors. Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Federation proceedings*; 1980.
281. Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem*. 1990;190(2):360-5.

- 282.**Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Free Radic Diag Med.* 1994;43-58.
- 283.**Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277-85.
- 284.**Nemutlu E, Zhang S, Xu Y-Z, Terzic A, Zhong L, Dzeja PD, et al. Cardiac resynchronization therapy induces adaptive metabolic transitions in the metabolomic profile of heart failure. *J Card Fail.* 2015;21(6):460-9.
- 285.**Fang X, Corrales J, Thornton C, Scheffler BE, Willett KL. Global and gene specific DNA methylation changes during zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem Mol Biol.* 2013;166(1):99-108.
- 286.**Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, et al. Association of a functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):4002-7.
- 287.**Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986;46(6):1118-23.
- 288.**Lagarrigue M, Becker M, Lavigne R, Deininger S-O, Walch A, Aubry F, et al. Revisiting Rat Spermatogenesis with MALDI Imaging at 20- μ m Resolution. *Mol Cell Proteom.* 2011;10(3):M110.005991.
- 289.**Zhang L, Li H, Gao M, Zhang T, Wu Z, Wang Z, et al. Genistein attenuates di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced testicular injuries via activation of Nrf2/HO-1 following prepubertal exposure. *Int J Mol Med.* 2018;41(3):1437-46.
- 290.**Oudir M, Chader H, Bouzid B, Bendisari K, Latreche B, Boudalia S, et al. Male rat exposure to low dose of di(2-ethylhexyl) phthalate during pre-pubertal, pubertal and post-pubertal periods: Impact on sperm count, gonad histology and testosterone secretion. *Reprod Toxicol.* 2018;75:33-9.
- 291.**Camacho L, Latendresse JR, Muskhelishvili L, Law CD, Delclos KB. Effects of intravenous and oral di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and 20% Intralipid vehicle on neonatal rat testis, lung, liver, and kidney. *Food Chem Toxicol.* 2020;144:111497.
- 292.**Creasy DM. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol Pathol.* 1997;25(2):119-31.
- 293.**Erkekoglu P, Zeybek ND, Giray B, Asan E, Arnaud J, Hincal F. Reproductive toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate in selenium-supplemented and selenium-deficient rats. *Drug Chem Toxicol.* 2011;34(4):379-89.
- 294.**Zhang L-D, Deng Q, Wang Z-M, Gao M, Wang L, Chong T, et al. Disruption of reproductive development in male rat offspring following gestational and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and genistein. *Biol Res.* 2013;46:139-46.
- 295.**Balci A, Ozkemahli G, Erkekoglu P, Zeybek ND, Yersal N, Kocer-Gumusel B. Histopathologic, apoptotic and autophagic, effects of prenatal bisphenol A and/or

- di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on prepubertal rat testis. *Environ Sci Poll Res.* 2020;27(16):20104-16.
- 296.**Dostalova P, Zatecka E, Ded L, Elzeinova F, Valaskova E, Kubatova A, et al. Gestational and pubertal exposure to low dose of di-(2-ethylhexyl) phthalate impairs sperm quality in adult mice. *Reprod Toxicol.* 2020;96:175-84.
- 297.**Fu G, Dai J, Li Z, Chen F, Liu L, Yi L, et al. The role of STAT3/p53 and PI3K-Akt-mTOR signaling pathway on DEHP-induced reproductive toxicity in pubertal male rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2020;404:115151.
- 298.**Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl.* 2000;45(3):215-25.
- 299.**Parmar D, Srivastava SP, Seth PK. Effect of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on spermatogenesis in adult rats. *Toxicology.* 1986;42(1):47-55.
- 300.**Shi YQ, Fu GQ, Zhao J, Cheng SZ, Li Y, Yi LN, et al. Di(2-ethylhexyl)phthalate induces reproductive toxicity via JAZF1/TR4 pathway and oxidative stress in pubertal male rats. *Toxicol Ind Health.* 2019;35(3):228-38.
- 301.**Zhang LD, Li HC, Chong T, Gao M, Yin J, Fu DL, et al. Prepubertal exposure to genistein alleviates di-(2-ethylhexyl) phthalate induced testicular oxidative stress in adult rats. *Biomed Res Int.* 2014;2014:598630.
- 302.**Suna S, Yamaguchi F, Kimura S, Tokuda M, Jitsunari F. Preventive effect of D-psicose, one of rare ketohexoses, on di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced testicular injury in rat. *Toxicol Lett.* 2007;173(2):107-17.
- 303.**Wang CY, Zhang JJ, Duan P. Antagonistic effect of vitamin E on di-2-ethylhexyl phthalate-induced reproductive toxicity in male rats. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2018;24(7):589-95.
- 304.**Zhang L, Gao M, Zhang T, Chong T, Wang Z, Zhai X, et al. Protective Effects of Genistein against Mono-(2-ethylhexyl) Phthalate-Induced Oxidative Damage in Prepubertal Sertoli Cells. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2032697.
- 305.**Suna S, Yamaguchi F, Kimura S, Tokuda M, Jitsunari F. Preventive effect of D-psicose, one of rare ketohexoses, on di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced testicular injury in rat. *Toxicol Lett.* 2007;173(2):107-17.
- 306.**Blanchard Y, Lescoat D, Le Lannou D. Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa: Anormale Verteilung basischer Kern-Proteine in menschlichen rundköpfigen Spermatozoen. *Andrologia.* 1990;22(6):549-55.
- 307.**Menezo YJR, Silvestris E, Dale B, Elder K. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. *Reprod Biomed Online.* 2016;33(6):668-83.
- 308.**Suna S, Tokuda M. Effects of D-allose and D-allulose on DEHP toxicities in rats. *Int J Pharm Sci Res.* 2020;11:21-6.
- 309.**Guo L, Zhao D, Song Y, Meng Y, Zhao H, Zhao X, et al. Reduced urea flux across the blood-testis barrier and early maturation in the male reproductive system in UT-B-null mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293(1):C305-12.

- 310.** Erukainure OL, Atolani O, Banerjee P, Abel R, Pooe OJ, Adeyemi OS, et al. Oxidative testicular injury: effect of L-leucine on redox, cholinergic and purinergic dysfunctions, and dysregulated metabolic pathways. *Amino Acids*. 2021;53(3):359-80.
- 311.** King TE, Mann T. Sorbitol Metabolism in Spermatozoa. *Proc R Soc Lon Biol Sci*. 1959;151(943):226-43.
- 312.** Hippias PP, Ackermann K, Holland WH, Sherman WR. Synthesis of sedoheptulose from non-dialyzable, endogenous substrates in mammalian tissue extracts. *Carb Res*. 1981;96(1):1-6.
- 313.** Montag M, van der Ven K, Dörbecker C, van der Ven H. Characterization of testicular mouse glucosamine 6-phosphate deaminase (GNPDA). *FEBS Lett*. 1999;458(2):141-4.
- 314.** Litwack G. Chapter 10 - Nucleic Acids and Molecular Genetics. In: Litwack G, editor. *Human Biochemistry*. Boston: Academic Press; 2018. p. 257-317.
- 315.** Mikami T, Kitagawa J. Intense exercise induces the degradation of adenine nucleotide and purine nucleotide synthesis via de novo pathway in the rat liver. *Eur J Appl Physio*. 2006;96(5):543-50.
- 316.** Chen J, Wu H, Zhang W, Mu W. Ribose-5-phosphate isomerases: characteristics, structural features, and applications. *Appl Microb Biotech*. 2020;104(15):6429-41.
- 317.** Bajpai M, Gupta G, Setty BS. Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. *Eur J Endocrinol*. 1998;138(3):322-7.
- 318.** Wamelink MMC, Struys EA, Jakobs C. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: A review. *J Inher Metab Dis*. 2008;31(6):703-17.
- 319.** Sellick CA, Croxford AS, Maqsood AR, Stephens GM, Westerhoff HV, Goodacre R, et al. Metabolite profiling of CHO cells: Molecular reflections of bioprocessing effectiveness. *Biotech J*. 2015;10(9):1434-45.
- 320.** Tickner J, Fan LM, Du J, Meijles D, Li JM. Nox2-derived ROS in PPAR γ signaling and cell-cycle progression of lung alveolar epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(3):763-72.
- 321.** Auditore JV, Wade L, Olson EJ. Occurrence of N-acetyl-L-glutamic acid in the human brain. *J Neurochem*. 1966;13(11):1149-55.
- 322.** Özokutan BH, Küçükaydın M, Muhtaroglu S, Tekin Y. The role of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *J Ped Surg*. 2000;35(1):101-3.
- 323.** Caldovic L, Tuchman M. N-acetylglutamate and its changing role through evolution. *Biochem J*. 2003;372(Pt 2):279-90.
- 324.** Nagaraj R, Sharpley MS, Chi F, Braas D, Zhou Y, Kim R, et al. Nuclear Localization of Mitochondrial TCA Cycle Enzymes as a Critical Step in Mammalian Zygotic Genome Activation. *Cell*. 2017;168(1):210-23.e11.
- 325.** Mullins ME, Jones MS, Nerenz RD, Schwarz ES, Dietzen DJ. 5-Oxoproline concentrations in acute acetaminophen overdose. *Clin Toxicol (Phila)*. 2020;58(1):62-4.

- 326.**Creer MH, Lau BW, Jones JD, Chan KM. Pyroglutamic acidemia in an adult patient. *Clin Chem.* 1989;35(4):684-6.
- 327.**Guneral F, Bachmann C. Age-related reference values for urinary organic acids in a healthy Turkish pediatric population. *Clin Chem.* 1994;40(6):862-6.
- 328.**Hocart CH, Halpern B, Hick LA, Wong CO. Hawkinsinuria--identification of quinolacetic acid and pyroglutamic acid during an acidotic phase. *J Chromatogr.* 1983;275(2):237-43.
- 329.**Lalman JA, Bagley DM. Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. *Water Res.* 2001;35(12):2975-83.
- 330.**Carta G, Murru E, Banni S, Manca C. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Frontiers in Physiol.* 2017;8:902.
- 331.**Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Comm.* 2020;11(1):102.
- 332.**Mills S, Scott T. Metabolism of fatty acids by testicular and ejaculated ram spermatozoa. *Reproduction.* 1969;18(2):367-9.
- 333.**Loveland KL, Klein B, Poeschl D, Indumathy S, Bergmann M, Loveland BE, et al. Cytokines in male fertility and reproductive pathologies: immunoregulation and beyond. *Frontiers in Endocrinol.* 2017;8:307.
- 334.**Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl.* 2008;29(5):488-98.
- 335.**Appasamy M, Muttukrishna S, Pizzey A, Ozturk O, Groome N, Serhal P, et al. Relationship between male reproductive hormones, sperm DNA damage and markers of oxidative stress in infertility. *Reprod Biomed Online.* 2007;14(2):159-65.
- 336.**Theas MS. Germ cell apoptosis and survival in testicular inflammation. *Andrologia.* 2018;50(11):e13083.
- 337.**Morgan HL, Ampong I, Eid N, Rouillon C, Griffiths HR, Watkins AJ. Low protein diet and methyl-donor supplements modify testicular physiology in mice. *Reproduction (Cambridge, England).* 2020;159(5):627-41.
- 338.**Ma H, Wu Y, Simon K, Ahmed A, Cabelof DC. Uracil accumulation induced by folate depletion is dependent on uracil DNA glycosylase (UDG) activity. *FASEB J.* 2013;27(1): 1077.13.
- 339.**Alsøe L, Sarno A, Carracedo S, Domanska D, Dingler F, Lirussi L, et al. Uracil Accumulation and Mutagenesis Dominated by Cytosine Deamination in CpG Dinucleotides in Mice Lacking UNG and SMUG1. *Sci Rep.* 2017;7(1):7199.
- 340.**Bailey LB, Gregory III JF. Folate metabolism and requirements. *J Nutr.* 1999;129(4):779-82.
- 341.**Mahmoud AM, Ali MM. Methyl Donor Micronutrients that Modify DNA Methylation and Cancer Outcome. *Nutrients.* 2019;11(3):608.
- 342.**Shen G, Zhou L, Liu W, Cui Y, Xie W, Chen H, et al. Di(2-ethylhexyl)phthalate Alters the Synthesis and β -Oxidation of Fatty Acids and Hinders ATP Supply in

- Mouse Testes via UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS-Based Metabonomics Study. *J Agr Food Chem.* 2017;65(24):5056-63.
- 343.** van Ravenzwaay B, Coelho-Palermo Cunha G, Strauss V, Wiemer J, Leibold E, Kamp H, et al. The individual and combined metabolite profiles (metabolomics) of dibutylphthalate and di(2-ethylhexyl)phthalate following a 28-day dietary exposure in rats. *Toxicol Lett.* 2010;198(2):159-70.
- 344.** Zhang Y, Zhang W, Fu X, Zhou F, Yu H, Na X. Transcriptomics and metabonomics analyses of maternal DEHP exposure on male offspring. *Environ Sci Poll Res.* 2018;25(26):26322-9.
- 345.** Yuan B, Wu W, Chen M, Gu H, Tang Q, Guo D, et al. From the Cover: Metabolomics Reveals a Role of Betaine in Prenatal DBP Exposure-Induced Epigenetic Transgenerational Failure of Spermatogenesis in Rats. *Toxicol Sci.* 2017;158(2):356-66.
- 346.** Feige JN, Gelman L, Rossi D, Zoete V, Métiévier R, Tudor C, et al. The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor γ modulator that promotes adipogenesis. *J Biol Chem.* 2007;282(26):19152-66.
- 347.** Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science.* 2005;308(5727):1466-9.
- 348.** Xu Q, Qi W, Zhang Y, Wang Q, Ding S, Han X, et al. DNA methylation of JAK3/STAT5/PPAR γ regulated the changes of lipid levels induced by di (2-ethylhexyl) phthalate and high-fat diet in adolescent rats. *Environ Sci Poll Res.* 2020;27(24):30232-42.
- 349.** Pogribny IP, Tryndyak VP, Boureiko A, Melnyk S, Bagnyukova TV, Montgomery B, et al. Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver. *Mut Res.* 2008;644(1-2):17-23.
- 350.** Yang Q, Ito S, Gonzalez FJ. Hepatocyte-restricted constitutive activation of PPAR α induces hepatoproliferation but not hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2007;28(6):1171-7.
- 351.** Sonkar R, Powell CA, Choudhury M. Benzyl butyl phthalate induces epigenetic stress to enhance adipogenesis in mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;431:109-22.
- 352.** Tachibana M, Nozaki M, Takeda N, Shinkai Y. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *The EMBO journal.* 2007;26(14):3346-59.
- 353.** Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, et al. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Gene Dev.* 2002;16(14):1779-91.
- 354.** Zhang C, Lai J-h, Hu B, Zhang S, Zhao J, Li W. A chromatin modifier regulates Sertoli cell response to mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) via tissue inhibitor

- of metalloproteinase 2 (TIMP2) signaling. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2014;1839(11):1170-82.
- 355.**Guida N, Laudati G, Galgani M, Santopaolo M, Montuori P, Triassi M, et al. Histone deacetylase 4 promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of Sp3 in SH-SY5Y cells treated with di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), determining neuronal death. *Toxicol Appl Pharm.* 2014;280(1):190-8.
- 356.**Zhao T, Wang J, Wu Y, Han L, Chen J, Wei Y, et al. Increased m6A modification of RNA methylation related to the inhibition of demethylase FTO contributes to MEHP-induced Leydig cell injury. *Environ Poll.* 2021;268:115627.
- 357.**Hsu PC, Jhong JY, Huang LP, Lee KH, Chen HP, Guo YL. Transgenerational Effects of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate on Anogenital Distance, Sperm Functions and DNA Methylation in Rat Offspring. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8).
- 358.**Xia B, Wang Y, Wang X, Wu J, Song Q, Sun Z, et al. In utero and lactational exposure of DEHP increases the susceptibility of prostate carcinogenesis in male offspring through PSCA hypomethylation. *Toxicol Lett.* 2018;292:78-84.
- 359.**Prados J, Stenz L, Somm E, Stouder C, Dayer A, Paoloni-Giacobino A. Prenatal Exposure to DEHP Affects Spermatogenesis and Sperm DNA Methylation in a Strain-Dependent Manner. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132136.
- 360.**Abdel-Maksoud FM, Leasor KR, Butzen K, Braden TD, Akingbemi BT. Prenatal Exposures of Male Rats to the Environmental Chemicals Bisphenol A and Di(2-Ethylhexyl) Phthalate Impact the Sexual Differentiation Process. *Endocrinology.* 2015;156(12):4672-83.
- 361.**Sekaran S, Jagadeesan A. In utero exposure to phthalate downregulates critical genes in Leydig cells of F1 male progeny. *J Cell Biochem.* 2015;116(7):1466-77.
- 362.**Chen J, Wu S, Wen S, Shen L, Peng J, Yan C, et al. The Mechanism of Environmental Endocrine Disruptors (DEHP) Induces Epigenetic Transgenerational Inheritance of Cryptorchidism. *PloS one.* 2015;10(6):e0126403-e.
- 363.**Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS One.* 2013;8(1):e55387.
- 364.**Huen K, Calafat AM, Bradman A, Yousefi P, Eskenazi B, Holland N. Maternal phthalate exposure during pregnancy is associated with DNA methylation of LINE-1 and Alu repetitive elements in Mexican-American children. *Environ Res.* 2016;148:55-62.
- 365.**Zhao Y, Chen J, Wang X, Song Q, Xu H-H, Zhang Y-H. Third trimester phthalate exposure is associated with DNA methylation of growth-related genes in human placenta. *Sci Rep.* 2016;6(1):1-8.
- 366.**Huang L-L, Zhou B, Ai S-H, Yang P, Chen Y-J, Liu C, et al. Prenatal phthalate exposure, birth outcomes and DNA methylation of Alu and LINE-1 repetitive elements: a pilot study in China. *Chemosphere.* 2018;206:759-65.

- 367.**Kim JH, Lee J, Moon H-B, Park J, Choi K, Kim SK, et al. Association of phthalate exposures with urinary free cortisol and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in early childhood. *Sci Total Environ.* 2018;627:506-13.
- 368.**Valinluck V, Tsai H-H, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucl Acid Res.* 2004;32(14):4100-8.
- 369.**Li Y, Zhang Q, Fang J, Ma N, Geng X, Xu M, et al. Hepatotoxicity study of combined exposure of DEHP and ethanol: A comprehensive analysis of transcriptomics and metabolomics. *Food Chem Toxicol.* 2020;141:111370.
- 370.**Ghosh J, Das J, Manna P, Sil PC. Hepatotoxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate is attributed to calcium aggravation, ROS-mediated mitochondrial depolarization, and ERK/NF- κ B pathway activation. *Free Rad Biol Med.* 2010;49(11):1779-91.
- 371.**Zhao Y, Ma D-X, Wang H-G, Li M-Z, Talukder M, Wang H-R, et al. Lycopene Prevents DEHP-Induced Liver Lipid Metabolism Disorder by Inhibiting the HIF-1 α -Induced PPAR α /PPAR γ /FXR/LXR System. *J Agric Food Chem.* 2020;68(41):11468-79.
- 372.**Wang G, Cheng S, Zhang S, Zhu Y, Xiao Y, Ju L. LPS impairs steroidogenesis and ROS metabolism and induces PPAR transcriptional activity to disturb estrogen/androgen receptor expression in testicular cells. *Mol Biol Rep.* 2020;47(2):1045-56.
- 373.**Kotula-Balak M, Duliban M, Pawlicki P, Tuz R, Bilinska B, Płachno BJ, et al. The meaning of non-classical estrogen receptors and peroxisome proliferator-activated receptor for boar Leydig cell of immature testis. *Acta Histochem.* 2020;122(3):151526.
- 374.**Latruffe N, Malki MC, Nicolas-Frances V, Clemencet M-C, Jannin B, Berlot J-P. Regulation of the peroxisomal β -oxidation-dependent pathway by peroxisome proliferator-activated receptor α and kinases. *Biochem Pharm.* 2000;60(8):1027-32.
- 375.**Mahmoud NM, Kabil SL. Pioglitazone abrogates testicular damage induced by testicular torsion/detorsion in rats. *Iranian J Basic Med Sci.* 2019;22(8):884-92.
- 376.**Liu Y, He Y, Wang Q, Guo F, Huang F, Ji L, et al. Vitamin D(3) supplementation improves testicular function in diabetic rats through peroxisome proliferator-activated receptor- γ /transforming growth factor-beta 1/nuclear factor-kappa B. *J Diabetes Investig.* 2019;10(2):261-71.
- 377.**Hase T, Yoshimura R, Mitsuhashi M, Segawa Y, Kawahito Y, Wada S, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in human testicular cancer and growth inhibition by its agonists. *Urology.* 2002;60(3):542-7.
- 378.**Wang Y, Chen B, Lin T, Wu S, Wei G. Protective effects of vitamin E against reproductive toxicity induced by di(2-ethylhexyl) phthalate via PPAR-dependent mechanisms. *Toxicol Mech Met.* 2017;27(7):551-9.
- 379.**Bhattacharya N, Dufour JM, Vo M-N, Okita J, Okita R, Kim KH. Differential Effects of Phthalates on the Testis and the Liver1. *Biol Reprod.* 2005;72(3):745-54.

- 380.**Ryu JY, Whang J, Park H, Im JY, Kim J, Ahn MY, et al. Di(2-ethylhexyl) Phthalate Induces Apoptosis Through Peroxisome Proliferators-Activated Receptor-Gamma and ERK 1/2 Activation in Testis of Sprague-Dawley Rats. *J Toxicol Environ Health*. 2007;70(15-16):1296-303.
- 381.**Sozmen M, Kabak Y, Gulbahar M, Gacar A, Karayigit M, Guvenc T, et al. Immunohistochemical characterization of peroxisome proliferator-activated receptors in canine normal testis and testicular tumours. *J Comp Pathol*. 2013;149(1):10-8.
- 382.**Matsuyama M, Yoshimura R. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Is a Potent Target for Prevention and Treatment in Human Prostate and Testicular Cancer. *PPAR Res*. 2008;2008:249849-.
- 383.**Matsuyama M, Yoshimura R. A novel approach to anticancer therapies: peroxisome proliferator activator-receptor-gamma as a new target therapy in the treatment of human urological cancer. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2009;9(1):76-83.
- 384.**Liu S, Lin SJ, Li G, Kim E, Chen YT, Yang DR, et al. Differential roles of PPAR γ vs TR4 in prostate cancer and metabolic diseases. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(3):R279-300.
- 385.**Liu L-L, Xian H, Cao J-C, Zhang C, Zhang Y-H, Chen M-M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in human sperm physiology. *Asian J Andr*. 2015;17(6):942-7.
- 386.**Badr G, Abdel-Tawab HS, Ramadan NK, Ahmed SF, Mahmoud MH. Protective effects of camel whey protein against scrotal heat-mediated damage and infertility in the mouse testis through YAP/Nrf2 and PPAR-gamma signaling pathways. *Mol Reprod Dev*. 2018;85(6):505-18.
- 387.**Ryu JY, Lee E, Kim TH, Lee YJ, Lee J, Lee BM, et al. Time-Response Effects of Testicular Gene Expression Profiles in Sprague-Dawley Male Rats Treated with Di(n-Butyl) Phthalate. *J Toxicol Environ Health*. 2008;71(23):1542-9.
- 388.**Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(3):775-80.
- 389.**Duale N, Steffensen I-L, Andersen J, Brevik A, Brunborg G, Lindeman B. Impaired sperm chromatin integrity in obese mice. *Andrology*. 2014;2(2):234-43.
- 390.**Hasan MM, El-Shal AS, Mackawy AMH, Ibrahim EM, Abdelghany E, Saeed AA, et al. Ameliorative effect of combined low dose of Pioglitazone and omega-3 on spermatogenesis and steroidogenesis in diabetic rats. *J Cell Biochem*. 2020;121(2):1524-40.
- 391.**Górowska-Wójtowicz E, Dutka P, Kudrycka M, Pawlicki P, Milon A, Plachno B, et al. Regulation of steroidogenic function of mouse Leydig cells: G-coupled membrane estrogen receptor and peroxisome proliferator-activated receptor partnership. *J Physiol Pharm*. 2018;69(3).
- 392.**Kotula-Balak M, Gorowska-Wojtowicz E, Milon A, Pawlicki P, Tworzydło W, Płachno BJ, et al. Towards understanding leydigioma: do G protein-coupled

estrogen receptor and peroxisome proliferator-activated receptor regulate lipid metabolism and steroidogenesis in Leydig cell tumors? *Protoplasma*. 2020;257(4):1149-63.

8. EKLER

EK.1: Etik Kurul Onay Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 21/02/2018-E.8196



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



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

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

Araştırmacı grubu Belma GÜMÜŞEL, Pınar ERKEKOĞLU, Dilara ZEYBEK, Emirhan NEMUTLU, Ünzile SUR, Tuba REÇBER, Eylem BAYSAL, Anıl YÜRÜN, Erhan TAN, Asena Ayşe GENÇ'ten oluşan, G.Ü.ET-18.012 kod numaralı ve "Erken Adölesan ve Adölesan Dönemde Ftalat Maruziyetinin Epigenetik Mekanizmalar ve Metabolik Profil Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-18.012 and entitled "Investigation of Effects of Phthalate Exposure on Epigenetic Mechanisms and Metabolic Profile in Early Adolescent and Adolescent Periods " is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations. With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Sıçan Sprague-Dawley
Hayvan Sayısı : 18

Ek:1 Liste

22 02 18
Esengül BOŞNAK
TC.

Evrak Doğrulama İçin: <https://belgedogrulama.gazi.edu.tr>

Ankara

Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76

Posta, İletişim ve Kurum Bilgi Merkezi İnternet Adresi: <http://belgek.gazi.edu.tr/>

Pin: 37312

Bilgi için :Esengül BOŞNAK

Genel Evrak Sorumlusu

Telefon No:03122022666

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 3. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK.2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu

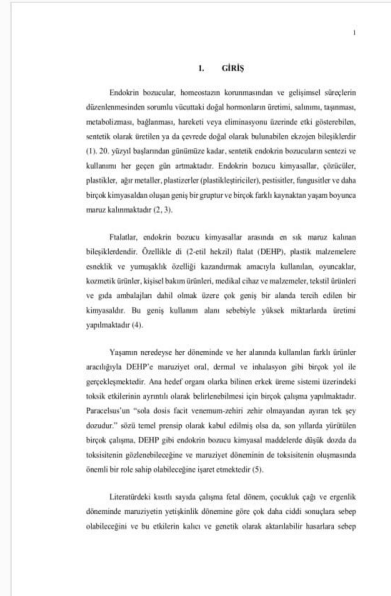


Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Ünzütle Sur
 Assignment title: ERKEN ADÖLESAN VE ADÖLESAN DÖNEMDE FTALAT MARUZİ...
 Submission title: ERKEN ADÖLESAN VE ADÖLESAN DÖNEMDE FTALAT MARUZİ...
 File name: 6_Ana_metin.docx
 File size: 12.01M
 Page count: 132
 Word count: 26,748
 Character count: 188,187
 Submission date: 07-Jul-2021 11:15PM (UTC+0300)
 Submission ID: 1616861743



TEZİN TAM BAŞLIĞI: ERKEN ADÖLESAN VE ADÖLESAN DÖNEMDE FTALAT MARUZİYETİNİN EPİGENETİK MEKANİZMALAR VE METABOLİK PROFİL ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ
ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: ÜNZİLE SUR
DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 132

ERKEN ADÖLESAN VE ADÖLESAN DÖNEMDE FTALAT MARUZİYETİNİN EPİGENETİK MEKANİZMALAR VE METABOLİK PROFİL ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 5	% 5	% 1	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 3
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
4	katalog.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	TEPEBAŞI, Muhammet Yusuf and CALAPOĞLU, Nilüfer Şahin. "Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1?) C111A gen polimorfizmi ile hemogloblin konsantrasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması", Süleyman Demirel Üniversitesi, 2016. Yayın	<% 1
6	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1

dyuthi.cusat.ac.in