

**PROPİL PARABENİN OLGUNLAŞMAMIŞ ERKEK
SIÇANLARDAKİ ANTIANDROJENİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**ASSESSING ANTIANDROGENIC EFFECTS OF PROPYL
PARABEN ON IMMATURE MALE RATS**

ECEM ÖZDEMİR

PROF. DR. NURHAYAT BARLAS

Tez Danışmanı

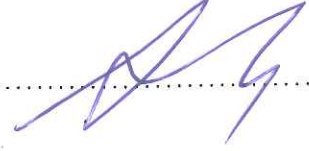
Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2017

ECEM ÖZDEMİR' in hazırladığı "**Propil Parabenin Olgunlaşmamış Erkek Sıçanlardaki Antiandrojenik Etkilerinin Araştırılması**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. E. Arzu KOÇKAYA

Başkan



Prof. Dr. Nurhayat BARLAS

Danışman



Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Üye



Prof. Dr. İsmet ÇOK

Üye



Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU

Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA 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 kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

13 / 07 / 2017

(imza)

Öğrencinin Adı Soyadı

Eren Özdeğer

ETİK

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

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

beyan ederim.

14/06/2017



ECEM ÖZDEMİR

Her Őeyden çok sevdiğim aileme..

ÖZET

PROPİL PARABENİN OLGUNLAŞMAMIŞ ERKEK SIÇANLARDAKİ ANTIANDROJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ECEM ÖZDEMİR

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nurhayat BARLAS

Haziran 2017, 67 sayfa

Gelişen endüstriyel sanayi ile en çok kullanılan paraben çeşitlerinden biri olan propil paraben (propil 4-hidroksibenzoat) çevresel ve fiziksel koşullara karşı stabilitesi, geniş spektrumlu aktivitesi, dünya çapında kabul edilen uygunluğu, kimyasal biyoçözünürlülüğü, küf ve mantar oluşumunu engellemesi ve düşük maliyeti gibi özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada propil parabenin 6 haftalık kısırlaştırılmış Wistar albino erkek sıçanlar üzerindeki antiandrojenik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. 10 gün boyunca gerçekleştirilecek doz uygulamasında propil parabenin erkek üreme sistemi dokuları üzerindeki antiandrojenik etkilerinin ayrıntılı olarak incelenmesi için Hershberger Yöntemi seçilmiştir. 10 günlük uygulama sonunda sıçanların ventral prostat, seminal vezikül, Cowper bezi, penis ucu, karaciğer ve böbrek ağırlıkları ve günlük tüketilen yem ve su tüketimleri kaydedilmiş, kalpten alınan kan örnekleri ile hematolojik analizler ile folikül stimüle edici hormon ve luteinize edici hormon (FSH, LH) ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Yapılan karşılaştırmalı analitik çalışmalar sonucunda, 250 mg/kg/gün propil paraben doz miktarında incelenen ventral prostat, seminal vezikül, Cowper bezi, penis ucu ile karaciğer doku ağırlıklarında azalma, dokularda küçülmeye bağlı gözlenen atrofik histopatolojik bulgular ve serum LH düzeyinde artış meydana gelmiştir. Bu bulgular antimikrobiyal bir koruyucu olarak kullanılan propil parabenin antiandrojenik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Endokrin bozucu, propil paraben, Hershberger yöntemi, Sıan

ABSTRACT

ASSESSING ANTIANDROGENIC EFFECTS OF PROPYL PARABEN ON IMMATURE MALE RATS

ECEM ÖZDEMİR

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nurhayat BARLAS

June 2017, 67 pages

With the effects of developing industrial industry, one of the most used paraben class; the propyl paraben (propyl 4-Hydroxybenzoate), is widely used in many products because of their low toxicity, physical and chemical stability, wide spectrum activity, worldwide admitted applications, biosolubility, preventing from mold and yeast and their low cost.

In this study it will undertake to understand the antiandrogenic effects of propyl paraben on the 6-weeks old castrated male Wistar albino rats. Due to aim of investigating the antiandrogenic effects of propyl paraben on the male reproductive tracts, the 10-days Hershberger Bioassay has chosen. After the 10-days treatment period, the evaluation of weights of accessory tissues of the male reproductive tracts, body and weights plus food and water consumption were recorded. The LH and FSH hormone levels and hematologic results had also analyzed.

As a result of the comparative analytical studies, there was a decrease in androgenic tracts and liver tissues weights, increase in serum LH levels and atrophic aspects on histopathological endpoints on 250 mg/kg/day of propyl paraben dose. These specific

findings strongly indicate that propyl paraben, an antimicrobial preservative, has an antiandrogenic activity.

Keywords: Endocrine disruptors, propyl paraben, Hershberger Bioassay, rat

TEŞEKKÜR

Bilgi ve önerileri ile yüksek lisans eğitim hayatım boyunca bana yol gösteren, her türlü zorlukların üstesinden gelmemde sabırlı bir şekilde yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, içinde bulunduğum bilim insanı olma yolunda aktardığı tecrübelerinden çok şey öğrendiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurhayat BARLAS' a, tezimin son halini almasında önerileri ile beni yönlendiren jüri üyelerine, çalışmamın hassasiyetini oluşturan cerrahi işlemler için bana sağladığı imkanlar ve büyük katkıları için Sayın Prof. Dr. Zeki ALKAN' a, verdiği eğitimlerle deneyin zorluklarını atlatmamda yardımcı olan başta Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR ve değerli Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyelerine, alanında gerek teorik gerek pratik bilgileriyle çok şey öğrendiğim, yardımını büyük bir borç bildiğim Sayın Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA' ya, tezimin her bir aşamasında katkılarıyla sabırla maddi/manevi yanımda olan, desteğini esirgemeyen, yüksek lisans hayatım boyunca edindiğim en güzel meslektaşım Eylül TURASAN' a, gösterdiği yol, aktardığı tecrübeler ve sağladığı kolaylıklarla tezimin oluşmasında büyük katkısı olan çok sevdiğim arkadaşım Gözde KARABULUT' a, çalışma ortamımda gösterdikleri anlayış için Özlem METE ve Burcu ÖZTAŞÇI' ya, geç tanıştığım çok çabuk sevdiğim canım meslektaşım İpek ACAR' a, her türlü desteğiyle yanımda olan, kendisinden çok şey öğrendiğim Burak UÇAR' a, çalışma azmini kendime örnek aldığım, tavsiyeleri ile bilimsel alanda büyük bir yol katettiğim meslektaşım Doç. Dr. Murat TELLİ' ye, gözü kapalı yaptığı büyük yardımlarla dostum olmasından bir kez daha gururlandığım, kardeşim olarak gördüğüm canım arkadaşım Yağmur ÖZDEMİR' e, nerede olursa olsun bir telefonuyla yanımda olabilen, ihtiyacım olduğunda gerekli motivasyonu sağlayan diğer kardeşim Burak ŞAHİN' e, çalışmamın büyük kısmında ettikleri kocaman yardımlarla ne kadar teşekkür etsem az geleceği, haklarında en güzelini istediğim, en sevdiğim iki öğrencim, Elif BAŞ ve Reyhan KATİK' e, yaptığım Erasmus programı boyunca manevi katkılarıyla dönemi güzel geçirmemde en çok sevdiğim iki dostum Jessica REALE ve Chio Hernandez BACA' ya, son olarak, bu tezi adadığım biricik aileme; hayatıma renk getiren, bu hayatı paylaştığım diğer yarım İdil ÖZDEMİR' e, sadece eğitim hayatım boyunca değil her alanda aldığım en büyük örneğim, hep arkamda duran canım babam Prof. Dr. Nebi ÖZDEMİR' e ve beni sevgiyle büyüten, kişiliğimin oluşmasında en büyük katkısı olan, yaptığım her işe sevgiyle yaklaşmamı sağlayan canım annem Fatma ÖZDEMİR' e teşekkürü büyük bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Androjenler	2
2.1.1 Androjenlerin Etki Mekanizması	3
2.1.2. Testosteron propiyonat.....	3
2.2. Antiandrojenler	4
2.2.1. Antiandrojenlerin Etki Mekanizmaları	5
2.2.2. Antiandrojenlerin Tedavide Kullanım Alanları.....	5
2.2.3. Flutamid	5
2.3. Endokrin Bozucular	6
2.4. Parabenler	7
2.4.1. Parabenlerin Yapısı ve Sınıflandırılması.....	8
2.4.2. Parabenlerin Ürünlerde Bulunma Oranları	8
2.4.3. Parabenlerin Zararlı Etkileri	9
2.4.4. Propil paraben	11
2.5. OECD Hershberger Protokolü (Endokrin bozucular Tarama Programı Test Kılavuzu; OPPTS 890.1400: Hershberger Bioassay)	13
2.6. Erkek Üreme Sistemi	14

2.6.1 Testisler	15
2.6.2 Epididimis	15
2.6.3. Seminal Vezikül	16
2.6.4. Prostat Bezi	16
2.6.5. Cowper Bezi	16
2.6.6. Levator ani ve Bulbokavernozus Kası	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	17
3.1. Gereç.....	17
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	17
3.1.2. Deney Hayvanlarının Temini	17
3.1.3. Laboratuvar Koşulları	17
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması ve Uygulama Planı	17
3.2.2. Vücut Ağırlıkları, Organ Ağırlıkları, Besin ve Su Tüketim Ölçümleri.....	21
3.2.3 Histopatolojik İncelemeler.....	21
3.2.4. Hormon Analizleri	21
3.2.5. Tam Kan Analizleri	21
3.2.6. İstatiksel Değerlendirmeler.....	22
4. BULGULAR.....	22
4.1. Vücut Ağırlıkları, Organ Ağırlıkları, Besin ve Su Tüketim Sonuçları	22
4.2. Histopatolojik İnceleme Sonuçları.....	25
4.3. Hormon Analiz Sonuçları	45
4.4. Tam Kan Analizi Sonuçları	47
5. TARTIŞMA.....	48
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	66

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Propil parabenin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	11
Çizelge 4.1. Kontrol ve propil paraben uygulanan gruplara ait sıçanların başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları.....	22
Çizelge 4.2. Kontrol ve uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin ve su miktarları.....	23
Çizelge 4.3. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların ortalama doku ağırlıkları...24	
Çizelge 4.4. Deney gruplarına ait erkek sıçanların androjenik dokularda tespit edilen histopatolojik bulguların görülme sıklıkları.....	43
Çizelge 4.5. Deney gruplarına ait erkek sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında tespit edilen histopatolojik bulguların görülme sıklıkları.....	44
Çizelge 4.6. Kontrol ve uygulama gruplarına ait FSH ve LH hormonu değerleri.....	45
Çizelge 4.7. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve propil paraben uygulama gruplarına ait sıçanların kan analiz sonuçları.....	47
Çizelge 5.1. Propil parabenin erkek üreme sistemi üzerine risk değerlendirmesi.....	50
Çizelge 5.2. Androjenik dokuların antagonist cevaba verdikleri etki yüzdeleri.....	54

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.** Testosteron propiyonatın kimyasal yapısı.....3
- Şekil 2.2.** Flutamidin kimyasal yapısı.....5
- Şekil 2.3.** Parabenlerin kimyasal yapısı: R= metil (CH₃), etil (C₂H₅), propil (C₃H₇), bütül (C₄H₈).....8
- Şekil 2.4.** Erkek sıçan üreme sistemi organları.....15
- Şekil 3.1.** Cerrahi olarak skrotumdan kesik açılması ve testislerin çıkartılması.....18
- Şekil 3. 2.** Cerrahi olarak testis, epididimis, dokulara bağlı damar ve veziküllerin çıkarılması.....19
- Şekil 3.3.** Hershberger yöntemi ve uygulama şeması.....20
- Şekil 4.1.** Kısırlaştırılmış erkek sıçanların uygulama süresince vücut ağırlıklarının günlere göre değişimleri.....23
- Şekil 4.2.** Yağ kontrol grubunda karaciğerin histolojik yapısı (H&E, X200).....25
- Şekil 4.3.** Yağ kontrol grubunda karaciğerin histolojik yapısı (H&E, X400).....26
- Şekil 4.4.** Negatif kontrol grubunda (Testosteron propiyonat) karaciğerde merkezi vende oluşan konjesyon (➡), ven çevresinde sayıca artmış uğramış hücreler (★) (H&E, X200).....26
- Şekil 4.5.** Pozitif kontrol grubunda (FLU) karaciğerde oluşan minimal konjesyonlar

(➡) ve sinüzoidal genişleme (➡) (H&E, X200).....27

Şekil 4.6. 10 mg/kg/gün PP uygulama grubunda karaciğerde oluşan mononükleer hücre infiltrasyonu (➡), konjesyon (➡) ve hücrel dejenerasyon (➡) (H&E, X200).....27

Şekil 4.7. 250 mg/kg/gün PP uygulama grubunda karaciğerde oluşan mononükleer hücre infiltrasyonu(➡) (H&E, X400).....28

Şekil 4.8. 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda karaciğerde konjesyon (➡) ve damar etrafında mononükleer hücre infiltrasyonu(★) (H&E, X200).....28

Şekil 4.9. 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda karaciğerde Kupffer hücrelerinin ven çevresinde çoğalması (➡) (H&E, X400).....29

Şekil 4.10. Yağ kontrol grubunda böbrek dokusunun histolojik yapısı (H&E, X200)...29

Şekil 4.11. Yağ kontrol grubunda böbrek dokusunun histolojik yapısı (H&E, X400)...30

Şekil 4.12. Negatif kontrol grubunda (TP) böbrekte oluşan konjesyon (➡) ve hücrel dejenerasyon (★) (H&E, X100).....30

Şekil 4.13. Pozitif kontrol grubunda (FLU) böbrekte oluşan tübüler dejenerasyon (➡), ödem (★) ve proksimal tüp lümenine hücre atılması (➡)(H&E, X200).....31

Şekil 4.14. 10 mg/kg/gün PP uygulama grubunda böbrekte oluşan tübüler dejenerasyon (➡) ve Bowman kapsülünde genişleme (★) (H&E, X200).....31

Şekil 4.15. 250 mg/kg/gün PP uygulama grubunda böbrekte oluşan konjesyon (➡) ve minimal derecede mononükleer hücre infiltrasyonu (★), (H&E, X100).....32

Şekil 4.16. 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda böbrekte oluşan Bowman kapsülünde genişleme (➡), tübüler dejenerasyon (➡) ve distal tüp lümene atılmış hücreler (★) (H&E, X400)32

Şekil 4.17. Yağ kontrol grubu sıçanlarda ventral prostatın normal histolojik görüntüsü (H&E, X200).....33

Şekil 4.18. Negatif kontrol grubunda (TP) ventral prostatta oluşan aşırı hiperplazik hücreler (büyümeye bağlı olarak lümene doğru polip oluşumu (➡), epitel yüksekliğinde artış (★) ve minimal konjesyon (➡) (H&E, X200).....33

Şekil 4.19. Pozitif kontrol grubunda (FLU) ventral prostatta oluşan tübüler atrofi (➡) ve konjesyon (➡) (H&E, X200).....34

Şekil 4.20. 10 mg/kg/gün PP uygulama grubunda ventral prostatta görülen minimal konjesyon (➡) (H&E, X200).....34

Şekil 4.21. 250 mg/kg/gün PP uygulama grubunda ventral prostatta görülen konjesyon (➡) ve tübüler atrofi (➡) (H&E, X200).....35

Şekil 4.22. 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda ventral prostatta lümeninde toplanmış hücreler (➡) lümene doğru polip oluşumu (★) ve tübüler atrofi (➡) (H&E, X100).....35

- Şekil 4.23.** 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda ventral prostat lümeninde görülen hücreler (→) ve nodülde polipleşme (➡) (H&E, X200).....36
- Şekil 4.24.** Yağ kontrol grubu sıçanda seminal vezikül normal histolojik görüntüsü (H&E, X200).....36
- Şekil 4.25.** Negatif kontrol grubu (TP) sıçanda seminal vezikülde oluşan konjesyon (➡), bezi çevreleyen fibromusküler stroma miktarında artış (→) ve hiperplazi gösteren hücreler (→) (H&E, 200X).....37
- Şekil 4.26.** Pozitif kontrol grubu (FLU) sıçanda seminal vezikülde hiyalinozis (→) ve atrofik veziküller (➡) (H&E, X200).....37
- Şekil 4.27.** 10 mg/kg/gün PP uygulama grubunda seminal vezikül lümeninde hücre birikimi (➡) bezi çevreleyen fibromusküler stroma miktarında artış (→), atrofi gösteren veziküller (☆) (H&E, X200).....38
- Şekil 4.28.** 250 mg/kg/gün PP uygulama grubunda seminal vezikülde hiyalinozis (➡) ve anastomozlaşma (→) (H&E, X200).....38
- Şekil 4.29.** 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda seminal vezikülde görülen hiyalinozis (➡), vezikül lümeninde hücre birikimi (→), anastomozlaşma (→) (H&E, X200)39
- Şekil 4.30.** Yağ kontrol grubunda LABC'nin genel görüntüsü (H&E, X200)39
- Şekil 4.31.** 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda LABC'de kas fibrillerinin ayrılması (➡) (H&E, X200).....40

Şekil 4.32. Yağ kontrol grubunda Cowper bezinin genel histolojik görüntüsü (H&E, X200).....	40
Şekil 4.33. 250 mg/kg/gün PP doz grubunda Cowper bezinde bazal hücrelerde görülen hipertorfi (➡) (H&E, X200).....	41
Şekil 4.34. Yağ kontrol grubunda Glans penisin genel histolojik görüntüsü (H&E, X100).....	41
Şekil 4.35. 750 mg/kg/gün PP doz grubunda Glans penisin görüntüsü (H&E, X100)...	42
Şekil 4.36. Kısırlaştırılmış erkek sıçanlardan alınan serum örneklerinde LH değerleri * p≤0.05, negatif kontrol grubundan farklı.....	46
Şekil 4.37. Kısırlaştırılmış erkek sıçanlardan alınan serum örneklerinde FSH değerleri * p≤0.05, negatif kontrol grubundan farklı.....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

mg	Miligram
kg	Kilogram
g	Gram
L	Litre
ml	Mililitre
U	Ünit

Kısaltmalar

ADI	Kabul Edilebilir Günlük Alım Değeri
AR	Androjen reseptörü
DHEA	Dehidroepiandrosteron
DHT	Dihidrotestosteron
ER	Östrojen reseptörü
FLU	Flutamid
FSH	Folikül stimüle edici hormon
GnRH	Gonadotropin salgılayıcı hormonu
HPG	Hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen
LH	Lüteinleştirici hormon
OECD	Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü
PHBA	Parahidroksibenzoik asit
TP	Testosteron propiyonat
USEPA	ABD Çevre Koruma Ajansı

1. GİRİŞ

Gelişen teknoloji ile beraber günlük hayatta kullanılan endüstriyel ürünlerin tüketimi büyük bir artış göstermektedir. Son yıllarda bu tüketime bağlı olarak görülmeye başlanan hastalıkların yükselmesi toplumda büyük kaygıların oluşmasına neden olmaktadır. Bu hastalıkların klinik incelemeleri sürecinde, çevrede bulunan endokrin bozucu kimyasalların bu bozukluklar üzerinde oldukça önemli etkilere sahip oldukları saptanmış olup, insanlar üzerindeki potansiyel zararlı etkileri önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmıştır.

İçerdikleri antimikrobial ve antifungal özelliklerinden dolayı tüketim ürünlerinin korunması ve saklanması oldukça yaygın bir kullanıma sahip olan parabenler dünya çapında kabul edilen uygunlukları ile günümüzde en çok tercih edilen raf ömrünü uzatıcı koruyucu maddeler arasında yerlerini almaktadır [1,2]. Geçmişte yürütülen incelemelerde parabenlerin maruziyeti sonucu erkek üreme sistemindeki cauda epididimisteki sperm rezervi ve konsantrasyonlarında, testisteki günlük sperm üretiminde azalmalar olduğu saptanmıştır [3]. Başka bir çalışmada ise çeşitli parabenlerin testosteronun transkripsiyonal aktivitesini inhibe ettiği belirtilmektedir [4].

Bu çalışma, propil parabenin erkek üreme sistemi içinde yer alan aksesuar bezler ve androjenik dokular üzerindeki etkilerini göstermeyi amaçlayarak tasarlanmıştır. Yöntem olarak, OECD (Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü-Organisation for Economic Co-operation and Development) onaylı, endokrin bozucuların antiandrojenik etkilerinin belirlenmesinde uygun bir yöntem olarak gösterilen Hershberger Yöntemi seçilmiştir [5]. Daha net ve hassas sonuçlar almak amacıyla uygulaması planlanan Hershberger Yönteminden elde edilen istatistiksel verilerin karşılaştırmalı analizleri yapılarak ülkemizde de satışı gerçekleştirilen veya üretilen endüstriyel ürünlerin kullanımı konusundaki hassasiyetin artırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Androjenler

Hem erkek hem de dişi üreme sisteminde bulunan androjenler, embriyo ve fetus gelişimi sırasında cinsiyet farklılaşmasından, dış genital organlar ve sekonder cinsiyet karakterlerinin (kılınma, ses kalınlaşması, libido, ereksiyon, cilt kalınlaşması ve yağ bezlerinin aktivitesi) gelişiminden ve spermatogenezden sorumlu steroid yapılı hormonlar olarak adlandırılmaktadır [6,7]. Bunların dışında androjenlerin protein yapımı, hematopoiez, kemik formasyonu, lipit ve karbonhidrat metabolizması gibi birçok metabolik aktiviteyi etkilediği de bilinmektedir [8,9,10,11]. Tüm androjenler karaciğerde ve hedef dokularda metabolize edilerek türevlerine yıkılırken, androjenlerin bir kısmı aromataz enzimi ile östrojene dönüşmektedir [12]. Androjenler salgılandıkları yere göre adrenal ve gonadal androjenler olmak üzere ikiye ayrılırlar:

Adrenal androjenler; androstenedion, dehidroepiandrosteron (DHEA) ve 11β -hidroksiandrostenedionu içermektedir. Kantitatif bakımdan en önemli adrenal androjenler dehidroepiandrosteron ve dehidroepiandrosteron-sülfat olarak bilinmektedir. Dolaşımdaki DHEA'nın %50'ye yakını ve DHEA-S'nin %90'ından fazlası adrenal bezlerden salgılanır. Yağ, kemik, kas, akciğer, prostat, cilt ve beyin gibi birçok doku DHEA'yı testosteron ve dihidrotosterona dönüştürecek enzimleri içerir [13].

Gonadal androjenlerin %95'inden fazlasını testosteron hormonu oluşturmaktadır. Testiste testosteron hormonunun üretimi gebeliğin altıncı haftasında başlar. Ön hipofizden salınan lüteinize edici (LH) hormonun Leydig hücrelerini uyarması ile testosteron salınımı vücutta gerçekleşir. Testislerden salgılanan testosteron hormonu, kullanılacak hedef dokularda NADPH bağımlı mikrozomal bir enzim olan 5α -redüktaz enzimi yardımı ile testosteronun aktif formu olan dihidrotosterona (DHT) çevrilir. Testosteron Wolf kanalından köken alan yapıların (epididimis, vas deferens, seminal vezikül, ejakülatör kanallar) farklılaşması ve gelişimine direkt olarak katılırken; dihidrotosteron ürogenital sinüs ve tüberkül ile bunlardan köken alan (prostat bezi, skrotum, uretra, penis) diğer androjen hedef dokularda aktif ligand olarak bulunduğu bilinmektedir. Androjenlerin biyosentezi Leydig hücresindeki kolestrol molekülünün pregnenolon molekülüne dönüşmesiyle başlar. Bu reaksiyon androjen sentezinde hız-sınırlayıcı

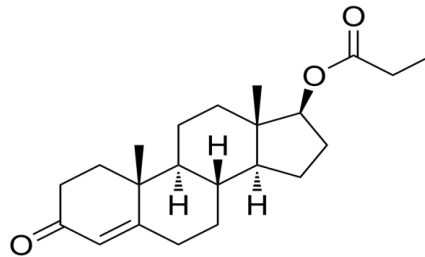
basamak olarak geçmektedir. Daha sonra progesterona yükseltgenen pregnenolon molekülü androsteniona dönüşerek testosteronu oluşturur. Testosteron ve DHT plazmada serbest veya globülin ve albumin gibi plazma proteinlerine bağlı olarak dolaşımında seyretmektedir [14].

2.1.1. Androjenlerin Etki Mekanizmaları

Androjenler, etkilerini androjen reseptörüne bağlanarak oluştururlar. Androjen reseptörleri başlıca; DNA-bağlanma bölgesi, C-terminal ligand-bağlanma bölgesi ve N-terminal transaktivasyon bölgesi olmak üzere üç fonksiyonel bölge içerir. Serbest haldeki testosteron molekülü, pasif difüzyon ile hücre zarını geçerek sitoplazmaya girer. Sitoplazmaya giren testosteron, hedef hücrede ya bu şekilde kalır ya da 5 α -redüktaz enzimi ile DHT'ye dönüştürülür. Reseptöre hormon bağlanma eylemi sitoplazma veya nükleusta gerçekleşir. Hormonun androjen reseptörüne bağlanması; şaperon ısı-şok proteinlerinin ayrılmasına ve androjen reseptöründe konformasyonel bir değişikliğe yol açar. Bu konformasyonel değişiklik; androjen-cevab elemanı olarak adlandırılan, AR geni üzerindeki “promoter” ve “enhancer” bölgelerinde yer alan DNA segmentlerine reseptörün bağlanmasını kolaylaştırır. Androjen reseptörü, diğer transkripsiyon faktörleri ile birlikte mRNA ekspresyonunu düzenleyerek mRNA ve ilgili protein sentezi sonucu spesifik androjen yanıtı oluşturur [15].

2.1.2 Testosteron propiyonat (17 β -Hidroksi-4-androsten-3-on 17-propiyonat)

Testosteron propiyonat ilk olarak Alman kimyager Adolf Butenandt tarafından 1935 yılında androjen eksikliğine bağlı hastalıkların tedavisinde kullanılmak amacıyla geliştirilmiştir. Propiyonat, propiyonik asitin konjuge bazıdır. Kısa ester olarak da bahsi geçen propiyonatın, testosteron hormonunun 17- β -hidroksil ucuna bağlanmasıyla oluşur. Testosteron propiyonat, ester bağına sahip olmasıyla kolay kana karışma ve daha çok yağ çözebilme özelliklerini içinde bulundurmasıyla oldukça tercih edilmektedir [16].



Şekil 2.1. Testosteron propiyonatın kimyasal yapısı [17]

Vücut geliştirme ve atletizm alanlarındaki kullanımının oldukça geniş olduğu bilinen testosteron propiyonat, bugün en çok tercih edilen anabolik steroidler arasında yer almaktadır. Genellikle yağ bazlı ve enjekte edilebilir bir testosteron bileşiği olarak sunulan testosteron propiyonatın avantajlı özellikleri aşağıda sıralanmıştır;

- Nitrojenin kastaki tutumunu arttırarak protein depolanmasını akabinde kas genişlemesini sağlar
- Vücut metabolizması için önemli olan 'IGF-1' ve 'MGF' gibi büyüme faktörlerinin seviyesini arttırır
- Vücutta su tutmaz
- Hemoglobin seviyesini arttırır
- Bir anti-glukokortikoid gibi davranarak, kaslar üzerinde geniş bir anti-katabolik etki yaratır
- Kollajen sentezini ve kemikteki mineral madde miktarını arttırır.

Testosteron propiyonatın bilinen yan etkileri arasında ise; yağlı cilt ve akne sorunları, iştahta artış, saldırganlık ve huysuzluk hissi, yüz/vücut kıllarında büyümeyi tetikleme ve kılların incelmeyeine bağlı olarak var ise kellik sürecini hızlandırması görülebilir. Ayrıca propiyonat, testosteronun östrojene dönüşme reaksiyonunu regüle eden aromataz enziminin östrojene bağlanma ilgisini arttırabilir. Bu aromatisasyon reaksiyonu sonucu östrojenik etki artarak erkekte göğüslerde büyüme gibi fiziksel değişiklikler ortaya çıkabilmektedir [18].

2.2. Antiandrojenler

Antiandrojenler; hedef dokularda endojen androjenlerin reseptörlerine bağlanarak androjenik etkiyi inhibe eder. Antiandrojenler yapısal ve hormonal aktivite olarak steroid ve non-steroid olmak üzere iki gruba ayrılır. Steroid antiandrojenler (siproteron asetat, megastrol asetat, klormadinon asetat) parsiyel agonistik ve antagonistik androjenik etkiye sahip olup; saf antiandrojenik etki göstermezken, parsiyel progestasyonel ve glukokortikoid etki ile antigonadotropik etki de sergileyebilirler [19]. Bu tip antiandrojenler, hipofizde progesteron reseptörüne bağlanıp, LH-FSH salınımını ve testislerden testosteron üretimini inhibe ederler [20]. Ayrıca testosteron düzeylerindeki azalma sonucu libido ve seksüel fonksiyon kaybına yol açarlar [21]. Non-steroidal

antiandrojenler ise (flutamid, nilutamid, bicalutamid, anandron gibi) herhangi bir hormonal aktivite göstermeksizin; androjen reseptörünü bloke ederek saf bir antiandrojenik etki gösterirler [22]. Bu tip antiandrojenler hipotalamik-hipofiz eksenine direk etki ederek gonadal steroidlerin negatif feed-back mekanizmasını inhibe ederler; böylece hipofizden daha fazla gonadotropin ve gonadlardan daha fazla testosteron ve östradiol salınımına yol açarlar [23].

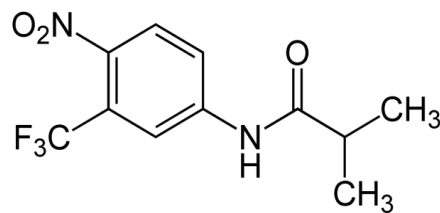
2.2.1. Antiandrojenlerin Etki Mekanizmaları

Antiandrojenler hedef hücrede androjen reseptörüne bağlanarak testosteron hormonunun ve DHT'nun reseptöre bağlanmasını kompetitif olarak inhibe ederler. Antiandrojenlerin androjen reseptörü ile etkileşimleri geridönüşümsüz bir antiandrojen- reseptör kompleksi oluşumu ile sonuçlanır. Bu kompleks androjen-bağımlı gen transkripsiyonu ile protein sentezini durdurur ve spesifik androjen yanıtı oluşumunu engeller. Antiandrojenlerin androjen reseptörüne bağlanma affinitesi zamanla azalmaktadır [24].

2.2.2. Antiandrojenlerin Tedavide Kullanım Alanları

Antiandrojenler, androjene duyarlı çeşitli hastalıkların tedavi edilmesinde topikal veya sistemik olarak uygulanmaktadır [23]. Antiandrojenlerin en önemli ve en yaygın bilinen klinik uygulama alanı ise prostat kanserinin tedavisidir [24]. Non-steroidal antiandrojenlerden flutamid, bicalutamid ve nilutamidin bu tedavi için kullanıldıkları bilinmektedir. Bunun yanı sıra kadınlarda hirsutizm (kılınma), akne, sebore (yağ bezlerinin aşırı derecede salgı yapması veya normal dışı deri yağı akışıyla belirgin deri bozukluğu) ve androgenetik alopesi (saç dökülmesi) gibi hiperandrojenik bozukluklar, erkeklerde ise erken puberte, hiperseksüalite ve seksüel sapma gibi durumlarda da antiandrojenlerin kullanımı mevcuttur [25,26].

2.2.3. Flutamid (2-metil N-[4-nitro-3-(triflorometil)fenil]- propanamid)



Şekil 2.2. Flutamidin kimyasal yapısı [27]

Flutamid güçlü bir nonsteroid antiandrojendir. Flutamidin klinik kullanımı ilk olarak 1975’de FDA tarafından onaylanarak metastatik prostat kanseri için tedavi amaçlı gerçekleştirilmiştir. Flutamid prostat bezindeki androjen reseptörleri için testosteron ve DHT metabolitleri gibi androjenlerle yarışmaktadır [28]. Absorbsiyonundan sonra, flutamid hızlıca aktif formu olan α -hidroksilenmiş primer formuna dönüşür. Flutamidin yarı ömrü genellikle 5-6 saat seyretmektedir [29].

Flutamid ve metabolitinin %90’dan fazlasının plazma proteinlerine bağlandığı bilinirken, vücuttan atımları büyük oranda idrar ve az bir oranda da gayta yolu ile gerçekleşir [30].

2.3. Endokrin Bozucular

Endokrin bozucular ilk olarak, 1962’de biyolog Rachel Carson’un ‘Silent Spring’ adlı, pestisitlerin kuşlar üzerindeki zararlı etkilerini konu edinen bir kitap yayınlamasıyla gündeme gelmiştir. Bu bozucular, gelişim sırasında uygun veya doğal olmayan bir yolla maruz kalınan, organizmanın çevresiyle etkileşimini ve tepkisini kontrol eden endokrin sistemin işleyişini bozan doğal veya sentetik yapıdaki kimyasallara denmektedir. Günümüzde çok sayıda çevresel kirleticinin endokrin bozucu özelliklere sahip olduğu bilinmektedir, bunun için 1996 yılında ABD Çevre Koruma Ajansı (US EPA) bünyesinde EB tarama ve test etme programları geliştirmek üzere Endokrin Bozucu Tarama ve Test Danışma Kurulu oluşturulmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda endokrin bozucuların memeliler ve diğer omurgalı hayvanların gonad gelişiminde değişime ve androjen reseptörü ile etkileşime girerek androjenik ve antiandrojenik etki gösterdiği açıklanmıştır [31]. Endokrin bozucular birden fazla mekanizma ile etkisini göstermektedir. Hormon reseptörleri ile direkt etkileşim başlığı altında agonist ve antagonist etki şu şekilde açıklanabilir;

- Agonist etki; bileşiklerin hücre reseptörlerine reseptörün doğal ligandı gibi bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu etki tipi reseptör bağlanma ilgisine ve reseptörü aktive etme yeteneğine bağlıdır. Çoğu endokrin bozucu sentetik bileşik hormon reseptörleri üzerinde agonist etkilidir.
- Antagonist etki; reseptörün normal aktivasyonunu engelleyerek oluşacak etkiyi bloke eder. Endojen agonist ile ekzojen antagonist aktif bağlanma bölgesine bağlanmak için yarışarak yarışmalı inhibisyon gerçekleşir. Yarışmasız

inhibisyonda ise inhibitör, reseptör veya reseptör-hormon kompleksinin aktif olmayan bölgesine bağlanarak inhibisyon gerçekleşir.

Yarışmalı inhibisyon sonucunda reseptörün deaktivasyonu meydana gelirken, yarışmasız inhibisyonda reseptörün sebep olduğu reaksiyonların azalması veya yavaşlaması oluşmaktadır [32].

Endokrin bozucular ayrıca doğal ve sentetik olmak üzere iki başlık altında incelenebilir:

- Doğal endokrin bozucular, doğal hormon yapısında oldukları için yarı ömürleri kısa, kolayca metabolize olabilen, dokuda birikmeden kolaylıkla vücuttan atılan kimyasallardır. Fitoöstrojenler bu sınıflandırmaya örnek verilebilir.
- Yapay endokrin bozucular ise endüstride, tarımda ve evde kullanılmak üzere üretilen maddelerdir. Temizlik maddeleri, kozmetik ve bakım ürünleri, ilaçlar ve hazır gıdalar içinde genellikle koruyucu olarak bulunan bu endokrin bozucu bileşikler tüm canlılarda olumsuz etkilere yol açabilmektedir [32].

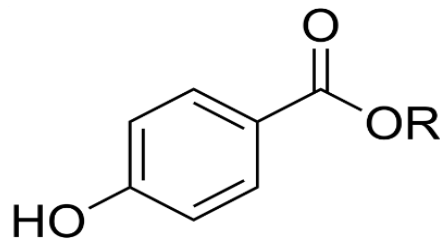
2.4. Parabenler

Parabenler, p-hidroksibenzoik asidin esterleri olup paraben ismini buradan almaktadırlar. Parabenler gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde koruyucu ajan olarak yaygın biçimde kullanılan kimyasal maddelerdir. Raf ömrünü uzatıcı olarak kullanılan bu bileşiklerin asıl tercih edilme sebepleri, bakteri ve mantarları yok edici özelliklere sahip olmalarıdır. Ayrıca diğer ajanlara göre daha az irritasyona yol açmaları ve daha az oranda duyarlanmaya neden olmaları, kozmetik ürünlerdeki geniş pH aralığı içinde stabil kalabilmeleri gibi nedenlerden dolayı parabenler ideal bir koruyucu olarak da tanımlanmaktadır. Aldıkları gruplara göre metil, etil, propil ve bütül paraben olarak sınıflandırılır. Bunlardan başka parabenlerin izobütül paraben, izopropil paraben, benzil paraben gibi tuz formları da bulunmaktadır. Parabenler yalnız olarak kullanılabilirdiği gibi diğer parabenlerle ortak olarak da kullanılabilirler. Beraber kullanımı daha çok yaygındır [33].

2.4.1. Parabenlerin Yapıları ve Sınıflandırılması

Parabenler, p- hidroksibenzoik asidin metil, etil, propil ve bütül ile yaptığı esterler sonucu oluşmaktadır. Ticari şekli genelde toz formunda bulunan parabenler, kokusuz olup hidroliz reaksiyonlarına karşı dayanıklıdır.

Parabenlerin çözünürlükleri zincirdeki karbon sayısı ile ters orantılı olup antifungal ve antimikrobial etkisi R zincirinin uzunluğu ile doğru orantılıdır. Fakat zincir uzunluğu sudaki çözünürlüğü azalttığı için genelde ticari kullanım alanlarında kısa zincirli esterler tercih edilmektedir [34].



Şekil 2.3. Parabenlerin kimyasal yapısı: R= metil (CH₃), etil (C₂H₅), propil (C₃H₇), bütül (C₄H₈) [35]

Yapılan çalışmalarda parabenlerin serumda albumine bağlandığı rapor edilmiştir. Bağlanma süreci doğada endotermik ve hidrofiliktir [36]. Parabenler sindirim yoluyla alınabildiği gibi havadaki toz partiküllerine tutunmuş halde solunabilir veya krem gibi ürünlerin kullanımına bağlı olarak deriden absorbe edilebilirler. Oral yolla alındığında bağırsak ve karaciğerde esterazlar ile metabolize edilerek ana metabolit olan parahidroksibenzoik asite (PHBA) parçalanır, idrar ve feçes ile vücuttan uzaklaştırılırlar. Ancak parabenin zincir uzunluğu arttıkça idrarla vücuttan atılım hızı yavaşlamaktadır. Atılırken ürede azalan konsantrasyonlarla p-hidroksibenzoik asit şeklinde seyrederek [37].

2.4.2. Parabenlerin Ürünlerde Bulunma Oranları

Parabenler sentetik yolla üretilenler gibi doğal olarak da bulunabilirler. Propil paraben *Stocksia brahuica* bitkisinde bulunurken, metil parabene yaban mersininin yapısında rastlanmıştır [38].

Çevresel ve fiziksel koşullara karşı dayanıklı olması bu maddeyi içeren ürünlerde antimikrobiale madde kullanımını büyük bir oranda azaltmakta ve bu da ticari olarak olumlu bir tablo çizmektedir.

Parabenler;

- Kişisel bakım ürünlerinde; fondoten, pudra, göz farı, maskara, makyaj temizleyicileri, ruj, çabuk kuruyan ojeler, nemlendiriciler, losyonlar, el, yüz veya vücut kremleri, diş macunları, güneş yağları, tonikler, deodorantlar, sabun ve şampuanlarda
- İlaçlarda; rektal ve vajinal ilaçlar, lokal anestezi ilaçlarında
- Hazır gıdalarda; kekler, ekmek kabuğu, dolgu malzemeleri vb., aroma ekstraktlarında, jelatin, reçel, jel, malt ekstraktlarında, zeytinde, turşuda, salata soslarında, şuruplarda, kremalarda, karbonatlı içeceklerde, şarapta, ketçap, mayonez, hardal ve dondurulmuş yiyeceklerde bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucu toplam günlük paraben maruziyeti (1 mg/gün gıda miktar, 50 mg/gün kişisel bakım ürünleri ve 25 mg/gün ilaç miktarı da hesaba katılarak) 76 mg/gün olarak belirlenmiştir. Ayrıca temizlik malzemeleri, oyuncaklar, su bazlı boyalar gibi ev ürünlerinde 18-30 aylık bir dayanıklılığa sahip olduğu bilinen parabenlerin varlığını ve hangi sıklıkta bulunduğunu tespit etmek amacıyla Madde Akım Analizi yöntemi uygulanmıştır. Parabenler bu ürünlerde 7,2-7,3 ton değerinde bulunurken, atık sularda 40–900µg/L değerinde tespit edilmiştir [39].

2.4.3. Parabenlerin bilinen zararlı etkileri

Raf ömrü uzatıcı olarak kullanılan parabenlerin olası zararlı etkileri son yıllarda tüm dünyada tartışma konusu olmuştur. Parabenleri içeren ürünlerin sağlığa zararlı olabileceği tartışmaları ilk kez 1956 yılında farelere intraperitoneal yolla enjekte edilen 400 mg/kg/gün propil parabenin farelerde tersinir düzeyde paraliz gözlenmesiyle gündeme gelmiştir [40]. Bunu takiben 1987 yılında propil parabenin hamsterlar üzerindeki proliferatif etkilerine bakılmış ve üriner bölgede oluşan proliferasyon sonucu maddenin

üriner kese kanserini indükleyebileceği düşünölmüştür [41]. Parabenlerin memeli mitototik hücre miktarında azalmaya ve DNA zincirinde kırılmalara yol açtığı bilinirken [42] oral, subkutanoz ve dermal yollarla her şekilde absorbe edildiği ve tüm uygulamaların plazma miktarında artışa sebebiyet verdiği belirtilmiştir [43].

Parabenler vücutta östrojeni taklit eden maddeler olarak da bilinmektedir. Parabenler, uterus ağırlığında artışa sebebiyet verirken, metil paraben hariç tüm parabenler [3H]E2 östrojen bağlanma reseptörüyle etkileşime girmektedir [44]. Parabenlerin vajinal açıklığın oluşumunu ciddi bir seviyede geciktirirken östrus siklusunun maruziyete bağlı olarak azaldığı rapor edilmiştir. Ayrıca histopatolojik çalışmalar sonucu corpora lutea da düşüş, sistik foliküllerde artış, foliküler epitelyumunda ise incelmeye olduğu saptanmıştır. Parabenlerin östrojen reseptörlerine bağlanma ilgileri ise: izobütöl paraben>bütöl paraben>izopropil paraben=propil paraben>etil paraben şeklinde belirlenmiştir [45]. Bunu ek olarak ovaryum adenokarsinoma hücrelerinde proliferasyon sürecini hızlandırdığı bilinmektedir [46]. Parabenlerin insan östrojen reseptörü γ (ERR γ) üzerindeki antogonistik aktivitelerinin incelendiği bir çalışma sonucu tüm paraben çeşitlerinin ERR γ reseptörü üzerinde önemli bir antagonist aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Moleküler analizler sonucu, parabenlerin östrojen reseptörünün aktif bölgesine hidrojen bağları ile bağlanmış olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında doğrudan ERR γ 'e bağlanan ilaç (tamoxifen gibi) kullanan hastaların ekstra bir hassasiyet göstermeleri gerektiği literatüre sunulmuştur [47].

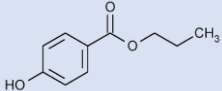
Yapılan çalışmalarda parabenlerin antiandrojenik etki gösterdiği de bilinmektedir. İnsan spermatozoası için güçlü bir spermid etkiye sahip olduğu ayrıca spermatozadaki akrozin enziminin proteolitik aktivitesini etkilediği ve maruziyet sonunda oluşan spermatozoa ölümlerinin nedeninin sperm membranı fonksiyonunun özelliğini kaybetmesiyle gerçekleştiği anlaşılmıştır [48]. Alınan sonuçlar ışığında parabenlerin doğum kontrol uygulamasında etken bir madde olarak kullanılabilceği belirtilmiştir [49]. Parabenlerin cauda epididimisteki sperm rezervi ve konsantrasyonlarında, testisteki günlük sperm üretiminde ve verimlilikte düşüşler gözlendiği [3] ve testosteronun transkripsiyonal aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir [4]. Ayrıca parabenlerin, sperm DNA sı hasarıyla pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmektedir [50]. Son yapılan çalışmalarda ise seminal veziküllerdeki spermatojenik hücrelerin veziköl lümenine doğru

toplanmasına, vimentin filamentlerinde kısa uzantıların oluşmasına neden olduğu belirtilmektedir [51].

2.4.4. Propil paraben

P-hidroksibenzoik asidin propil alkil grubu ile yaptığı bağ sonucu oluşan propil paraben kozmetik ve ilaç endüstrilerinde koruyucu madde olarak yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Özellikle kişisel bakım ürünü solüsyonlarda gösterdikleri sinerjik ve mikrobiyal etkisinden dolayı metil ve propil parabenin beraber kullanımının oldukça yaygın olduğu bilinmektedir. [52]. Parabenlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.1.'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Propil parabenin tamamen absorbe edildiği, genelde karaciğer ve böbrekte hızlıca metabolize olduğu ve birikmeden vücuttan atıldığı yapılan çalışmalar sonucunda belirtilmiştir [53]. Bu atılım parabenlerin hepatik karboksiesteraz enzimleri aracılığıyla hızlıca p-hidroksibenzoik asit ve propil alkole hidrolize olmasıyla gerçekleşmektedir [54].

Çizelge 2.1. Propil parabenin fiziksel ve kimyasal özellikleri [55]

Kimyasal yapısı	
Kimyasal formülü	C ₁₀ H ₁₂ O ₃
Fiziksel görünüm	Kokusuz, tatsız, beyaz kristal toz
Molekül ağırlığı	1802g/mol
IUPAC ismi	Propil 4-hidroksibenzoat
Erime noktası	96-99°C
Kaynama noktası	271° F (1.0 mm civa)
pH (1 g/l)	7
Suda çözünürlük	2,5 g/l
Yoğunluk	1,06 g/cm ³

Endüstriyel alanda tek başına kullanılabilirdiği gibi diğer paraben türleriyle beraber kullanılabilen propil paraben, yapılan çalışmalarla ikinci en sık rastlanan paraben çeşidi olarak (%74) tespit edilmiş olup özellikle propil paraben antimikrobial bir koruyucu olarak kozmetik, şampuan, nemlendirici, kapatici ve güneş kremi gibi su bazlı ürünlerde yaygın olarak bulunmaktadır [56]. Propil parabenin uzun süredir mantar ve bakteri için inhibitör olarak kullanıldığı bilinmektedir. Furr ve Russel propil parabenin bakterinin hücre duvarından hücre içi materyalin sızıntı yapmasını indüklediğini bulmuşlardır [57].

Yapılan *in vitro* toksisite çalışmaları, propil parabenin sinir sistemi üzerinde hiçbir toksik etkiye neden olmadığı kaydedilmiştir [58]. Propil parabenin antiandrojenik etkileri insandan alınan sperm örneklerinden oluşan *in vitro* deney düzeneğinde yapılan çalışma sonucu, 3mg/ml propil parabenin insan spermatozoası için güçlü bir spermid etkiye sahip olduğunun belirtilmesiyle bu alan incelenmeye başlanmıştır [48]. Daha sonra Oishi tarafından yapılan bir çalışmada 20 günlük erkek Wistar sıçanlar üzerinde (10/100/1000mg/kg/gün) 4 haftalık propil paraben uygulaması gerçekleştirilmiştir. Deney sonunda cauda epididimdeki sperm rezervi ve konsantrasyonlarında, testisteki günlük sperm üretiminde ve verimlilikte düşüşler gözlenmiştir. Ayrıca serum testosteron seviyesinde gözlenen kritik düşüş bu alanda yapılacak olan çalışmalara zemin hazırlamıştır [3].

Avrupa İlaç Ajansı'nın 2010 tarihinde yaptığı değerlendirmede metil ve etil parabenler için belirlenen günlük alım değerinin maksimum (ADI) 10 mg/kg/gün olarak belirtmiş bu değer propil paraben için de uygulanabileceği söylemişlerdir. Ancak, propil paraben üzerine yapılmış çalışmalardan elde edilen veriler, 3 yaş ve altı çocuklarda kullanılan formülasyonlarda propil parabenin kullanılmaması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. [59].

En son yayımlanan çalışmalar ışığında Avrupa Komisyonu Tüketici Güvenliği Bilimsel Komitesinin 2011 yılında yaptığı risk değerlendirmesinde, komite bu değerlendirmede propil parabenin ürünlerde en fazla %0,4 oranında kullanılmasının tüketicinin güvenliği için uygun olacağı kararına varılmıştır [60].

2.5. OECD Hershberger Yöntemi Protokolü: (Endokrin Bozucular Tarama Programı Test Kılavuzu; OPPTS 890.1400: Hershberger Bioassay)

Son yıllarda endokrin bozucu kimyasalların insan sağlığı üzerindeki etkileri halk arasında ve bilimsel çevrelerde ciddi bir kaygı oluşturmaktadır. 1996'da Çevre Koruma Ajansı (EPA: Environmental Protection Agency), yaygın bir şekilde kullanılan kimyasal testlerindeki olası eksikliklerden dolayı, Gıda Kalitesi Korunması (Food Quality Protection), Güvenli İçme Suyu Yasası (Safe Drinking Water Acts) desteği ile endokrin bozucuların olası etkilerini araştırmak üzere tarama ve test programı geliştirmek için uygulama başlatmıştır. EPA tarafından güncelleştirilen Tarama Test ve Danışma Komitesi, (EDSTAC; Endocrine Disruptor Screening and Testing and Advisory Committee) 1998'de endokrin bozucu kimyasallar için bir dizi tarama ve test stratejisi önermiştir. Bu önerge; değerlendirme, önerme, tarama ve test dizisi için kimyasalların öncelik sırasına göre düzenlenme sürecini kapsamaktadır. Değerlendirme aşamasındaki kimyasallar grubu, tarama programına ilk alınan öncelikli kimyasalların bir alt grubu olan 80.000'den fazla kimyasal maddeyi kapsamaktadır. EDSTAC tarafından tavsiye edilen tarama dizisi, memelilerde ve diğer canlılarda hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen (HPG) işlevlerindeki değişiklikleri, östrojen, androjen ve tiroid hormon sentezini ve androjen reseptörü (AR) ve östrojen reseptörü (ER) aracılı etkileri saptamak için düzenlenmiştir. Hershberger Yöntemi, OECD tarafından onaylanmış, laboratuvarlar arası çalışmalarda, güvenilir ve tekrarlanabilir çalışmaların protokolleri temel alınarak hazırlanmıştır. Hershberger Yöntemi'ni geliştirmede OECD'nin 441 numaralı test kılavuzu kaynak alınmıştır. OECD 1998'de potansiyel endokrin bozucuları taramak ve test etmek için test kılavuzunu revize etmek ve yeni kılavuzlar geliştirmek üzere yüksek öncelikli bir aktivite başlatmıştır. Bu aktivitelerden biri sıçan Hershberger Yöntemi'ni geliştirmek olmuştur. 1962'de yöntem yetkin komite tarafından ilk defa standart hale getirilmiştir. 2001 ve 2007 yılları arasında sıçan Hershberger Yöntemi, detaylı çalışmaları içeren geniş bir çalışma kılavuzuna dönüştürülmüştür. Bu çalışmalar, referans androjen (TP), iki potansiyel sentetik androjen (trenbol asetat ve metil testosteron), potansiyel antiandrojenik madde (flutamid), DHT metabolitinin sentezini engelleyen potansiyel inhibitör (finasterid), birkaç zayıf antiandrojenik pestisit (linuron, vinclozolin, prosimidon, p, p' DDE), potansiyel 5 α redüktaz inhibitörü (finasterid) ve iki negatif kimyasal (dinitrofenol ve nonilfenol) maddenin katılımıyla desteklenmiştir. Endokrin Bozucu Tarama Programı tarafından hazırlanan, östrojen, androjen ve tiroid hormonu ile etkileşmesi muhtemel maddeleri tespit etmek için tam bir tarama dizisi oluşturan OPPTS 890 (Pestisit, Toksik

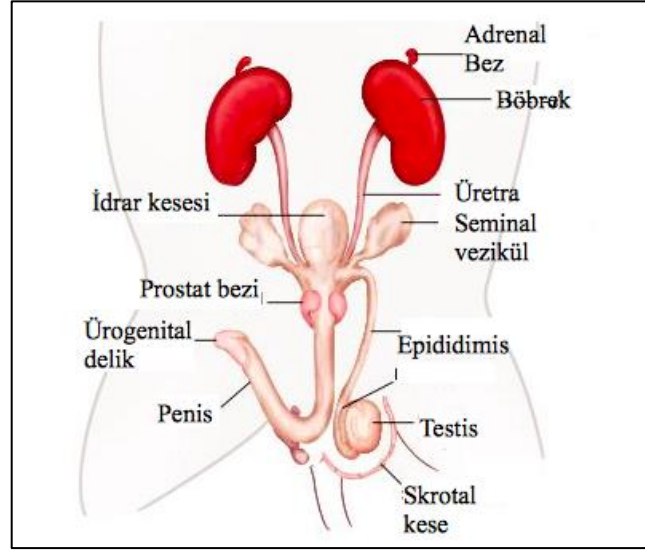
Maddeler ve Önlem Ofisi-Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances) serisi testlerinden biri olan bu analizin, aynı serideki diğer testlerle bağlantılı olarak kullanılacağı düşünülerek hazırlanmıştır [5].

Hershberger Yöntemi, tek bir endokrin mekanizmayı; androjen agonistleri, androjen antagonistleri ve 5 α -redüktaz inhibitörlerini tanımlamak ve bu konuda veri tabanı oluşturmak amacıyla tasarlanmış bir *in vivo* tarama testidir. Bu test, *in vivo* testlerden oluşan, insan sağlığı ve çevre üzerine risk değerlendirmesi yapabilmek için maddelerin endokrin sistemle etkileşimlerini saptamaktadır. Hershberger Yöntemi erkek üreme sistemindeki androjenik dokuların ağırlık değişimlerinin incelenmesi üzerine tasarlanmış kısa süreli *in vivo* tarama testidir. Bahsedilen beş doku; ventral prostat, seminal vezikül, levator ani-bulbokavernozus kası, Cowper bezleri ve penis ucunu kapsarken, dokuların ağırlığı androjenik etki gösterdiği bilinen madde kullanımıyla artıp, antiandrojenik etki ettiği bilinen madde uygulaması ile azalmaktadır.

Yöntemin en önemli avantajı, erkeklerde endojenik androjen üretimini azaltmasıyla üreme toksikolojisi çalışma alanında büyük bir özerklik niteliği oluşturmasıdır. Kısırlaştırma işlemi, endokrin geri dönüşüm mekanizmalarını ve sirkadiyen ritim ile değişkenlik gösteren serum testosteron seviyelerini bloke ederek, elde edilecek sonuçların kararlılığını arttırmaktadır. Bu sebeple kısırlaştırma işlemi, endokrin aktivitenin gözlenmesi için kullanılacak hayvan sayısının azalmasına olanak vermektedir.

2.6. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sisteminin temel işlevleri haploid erkek gametin (spermatozoa) üretilmesi, olgunlaşması, geçici olarak depolanması ve erkek eşey hormonlarının üretiminden sorumludur. Beyinden salgılanan nörotransmitterler hipotalamustaki gonadotropin salgılayıcı hormonu (GnRH) uyarır. GnRH ise adenohipofizden folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) salgılanmasını uyarır. LH spermatogenezisi dolaylı olarak uyarırken, endojen testosteronu aktive eder. FSH'ın hedefi ise spesifik reseptörleri olan testisteki Sertoli hücreleridir. Erkek üreme sistemi; spermleri üretilen sentezleyen ve androjenleri salgılayan bir çift testis, sperm taşınmasından sorumlu olan, dış kanallar sistemini oluşturan epididimis, semen kitlesini oluşturan ve ejaküle spermatozoayı besleyen yardımcı bezler; seminal vezikül, prostat bezi ve Cowper bezlerinden oluşmaktadır [61].



Şekil 2.4. Erkek sıçan üreme sistemi organları [62]

2.6.1. Testisler

Skrotum içinde bulunan testisler dıştan testiküler bir kapsül ile sarılıdır. Her testis içinde seminifer tübül adı verilen sperm kanalcıkları bulunur. Seminifer tübüller kompleks bir germinal epitel ile döşeli olup bu epitel dıştan özelleşmiş fibröz doku ile sarılmıştır. Bu doku içerisinde çok miktarda bağ dokusu lifleri, fibroblastlar ve miyoid hücreler bulunur. Spermatogenez; testisin seminifer tübüllerinde gerçekleşir. Gelişmekte olan hücreler, seminifer tübülün dış duvarına yakın olan yerleşim yerlerinden, ortadaki boşluğa doğru hareket ederek, hareket özelliği kazandıkları epididimise iletirler [63].

2.6.2. Epididimis

Epididimis spermatozoonları olgun hale gelene dek depolayarak, testisten ejakülatör kanala geçişini sağlar. Epididimis baş (caput), gövde (corpus) ve kuyruk (cauda) olarak üç bölüme ayrılmıştır. Epididimiste meydana gelen değişimler; nuklear DNA yoğunlaşması, sperm başında ve gövdesinde oluşan fiziksel değişiklikler olarak sayılabilir [63].

2.6.3. Seminal Vezikül

Çift halde, prostat bezinin posteriorunda bulunan seminal vezikülleri vas deferensle birleşip ejakulator kanalı oluşturmaktadır. Vezikülün epitel hücrelerinden salgılanan alkali ve mukoid sıvı, semenin %60'ını oluşturur. Bu sıvı, sperm hareketi için gerekli olan enerji kaynağı fruktoz şekeri, fibrinojen, askorbik asit ve prostoglandinler adlı yağ asitlerini içerir. Prostoglandinler servikal mukusla etkileşime girerek, sperm hareketi için uygun bir ortam oluştururlar [61].

2.6.4. Prostat Bezi

Salgı granülleri ve lizozom bakımından oldukça zengin olan prostat bezi tübüloalveolar bir bez olup, semen üretimine yardımcı olur (%20). Prostat salgısı sütümsü bir sıvı olup alkali özelliktedir. Salgı ayrıca pıhtılaşmayı önleyici enzimleri (fibrinolizin), kalsiyum, fosfat-çinko iyonları ve sitrati içerir. Bahsedilen pıhtılaşma enzimi, seminal vezikülden gelen fibrinojeni aktive ederek pıhtı oluşturur. Bu olay spermin içinde yer aldığı semenin vajinanın derinliklerine tutunmasına yardım eder. Prostat bezi ergenlikten itibaren testosteron etkisiyle büyümeye başlar [61].

2.6.5. Cowper Bezi (Bulbouretral bez)

Bulbouretral bezler bir çift olup, üretranın arkasında ve bağ dokusu içerisinde yerleşim gösterir. Cowper bezleri ince bir bağ dokusuna ait kapsül ile sarılmıştır, bezin dışında çizgili kas bulunur. Septumlar bez içerisine girerek dokuyu lobüllere böler. Cowper bezinin salgısı yapışkan ve müköz olup galaktoz, galaktozamin, galakturonik asit, sialik asit ve metilpentoz bakımından zengindir. Salgı penil üretranın asiditesinin nötralizasyonunda görev alır [64].

2.6.6 Levator Ani ve Bulbokavernozus Kası (LABC)

Musculus levator ani ve bulbokavernozus kası fare ve sıçanlarda hormona bağlı olarak gelişen seksüel dimorfik kaslar arasında en iyi bilinenidir. Verdiği androjenik cevaptan dolayı, çalışmada uygulanan Hershberger protokolünün içinde dissekte edilmesi gereken dokular arasında yer almaktadır [5].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan propil paraben (%97) ve flutamid (%98) Sigma-Aldrich firmasından (ABD), testosteron propiyonat (%97) Hangzhou Dayang Chemicals (Çin) adlı kimyasal şirketinden temin edilmiştir. Rat FSH ve LH ELISA Kit, 96 wells Eastbiopharm (Çin) şirketinden alınıp, kısırlaştırma işleminde kullanılan stur iplik ve cerrahi takım Seypa Medikal'den temin edilmiştir. Tam kan analizi için laboratuvarda mevcut olan MS9-5 kan sayım cihazı kullanılmıştır.

3.1.2. Deney hayvanlarının temini

EDSTAC, endokrin taramaları ve testleri için laboratuvar sıçanlarının seçenekler arasında en uygun tür olduğunu belirtmektedir. Bu çalışmada 6 haftalık Wistar Albino (*Rattus norvegicus*) erkek sıçanlar kullanılmış, sıçanlar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edilmiştir. Çalışma ayrıca 2015/86 numaralı dosya kayıt numarasıyla Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

3.1.3. Laboratuvar Koşulları

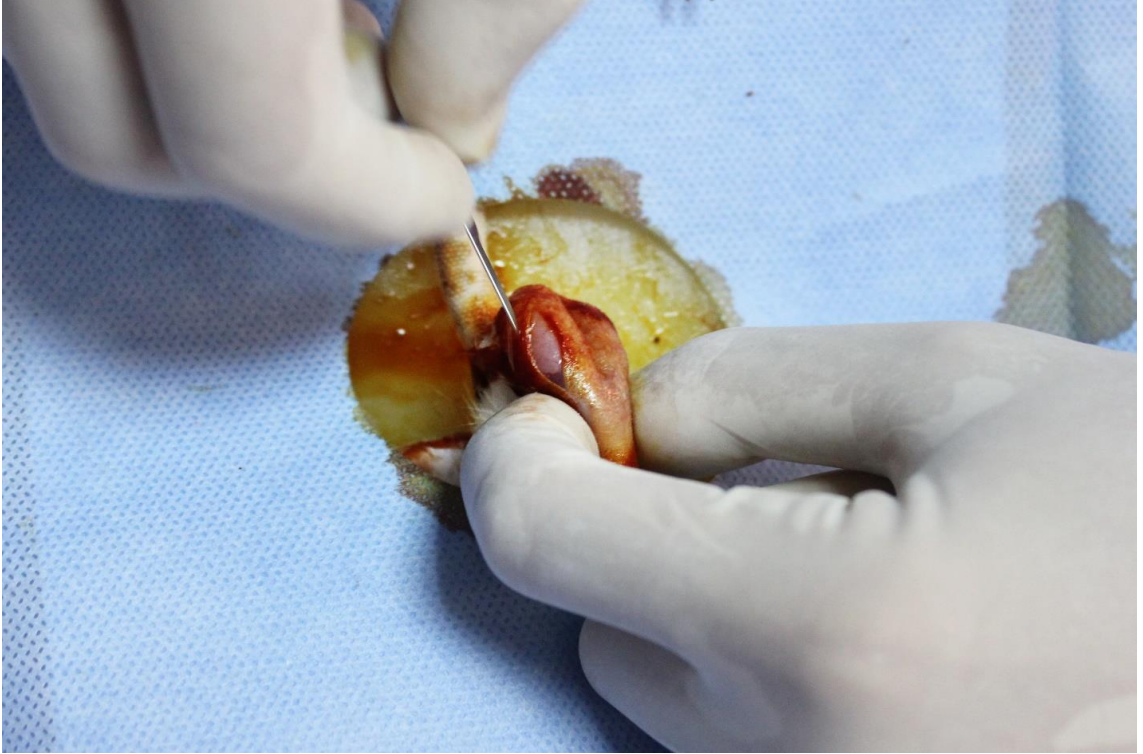
25 günlük deney boyunca laboratuvar sıcaklığı ortalama $22^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$, nisbi nem $47,3\pm 1$ olarak ayarlanmıştır. Fotoperiyot 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneyde içme suyu olarak çeşme suyu kullanılmış olup yem olarak normal sıçan yemi verilmiştir.

3.2. Yöntem

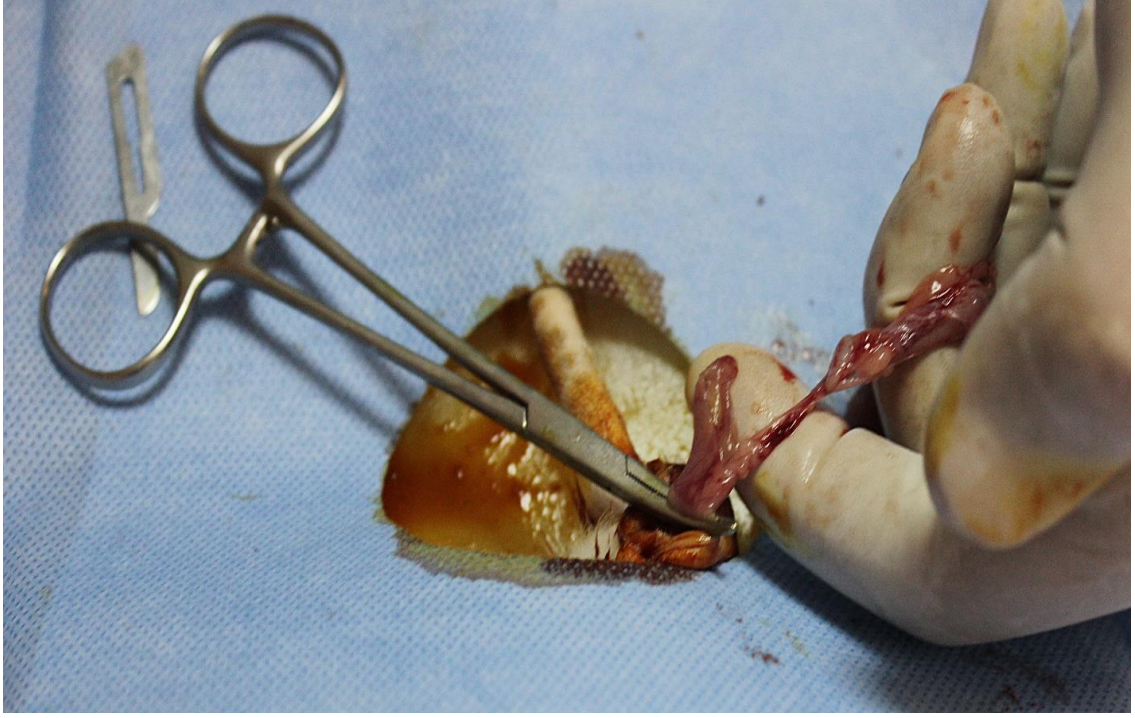
3.2.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması ve Uygulama Planı

Çalışmada; kısırlaştırma, kısırlaştırma sonrası iyileştirme ve uygulama işlemleri Hacettepe Üniversitesi, Deney Hayvanları Biriminde bulunan laboratuvarda gerçekleştirilmiştir. Deneyde kullanılacak sıçanlar 42. günlerinde alınıp, kısırlaştırma işlemi için cerrahi girişimden yaklaşık 12 saat öncesi diyeti kesilerek genel anestezi uygulanmıştır. Verilecek anestezik madde miktarının belirlenmesi için öncelikle hayvan tartılmıştır. Deneyde kullanılan sıçanın ağırlığına göre ksilazinin (alfazin) kilogram başına hayvana verilecek dozu 10 mg ve 1ml'sinde 20 mg etken madde bulunması gereğince hesap yapılarak elde edilen veriler sonucunda hayvana kaç ml verileceği

hesaplanmıştır. Aynı şekilde ketaminin kilogram başına 90 mg hayvana verilecek doz olarak bilinirken, 1ml'sinde 100 mg etken madde bulunmasının gereği ile yine aynı şekilde yapılmış orantı ile hayvana kaç ml verileceği hesaplanmıştır. Anestezi işleminden sonra, skrotumdan açılan kesikle her iki testis ve epididimis dokulara bağlı damar ve veziküllerle beraber çıkarılmış, açılan kesit sutur ipliklerle kapatılmıştır (şekil 3.1. ve 3.2.).



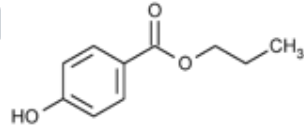
şekil 3.1. Cerrahi olarak skrotumdan kesik açılması ve testislerin çıkartılması



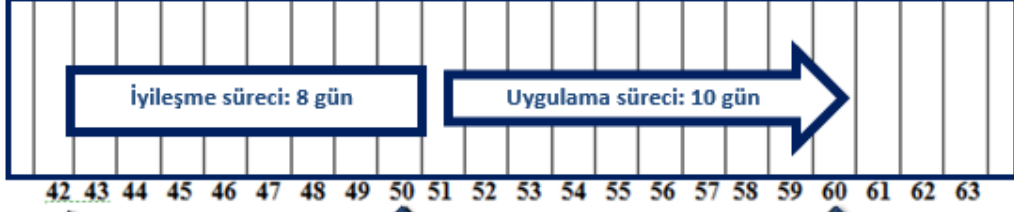
Şekil 3. 2. Cerrahi olarak testis, epididimis, dokulara bağlı damar ve veziküllerin çıkartılması

Sıçanlar kısırlaştırma işleminden hemen sonra 8 gün iyileşme sürecine bırakılmış ve bu sürede günlük olarak klinik gözlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte herhangi bir hastalık görülen hayvan deneyden çıkarılmıştır. İyileşme sürecinden sonra sıçanlar uygulama gruplarına dağıtılmıştır (Şekil 3.3.).

YÖNTEM



Sıçanın yaşı (gün)



Kastrasyon

Vücut ağırlıklarına göre
kısır erkek sıçanların
gruplandırılması (n:6)

Nekropsi

İncelenen parametreler;

- ❖ Vücut ağırlığı
- ❖ Tüketilen yem ve su miktarı

- ❖ Ventral prostat
- ❖ Seminal vezikül
- ❖ LABC
- ❖ Cowper bezi
- ❖ Penis ucu
- ❖ Karaciğer
- ❖ Böbrek

Androjenik dokular

- ❖ FSH
- ❖ LH

Androjenik hormonlar

Uygulama Grupları	Doz (mg/kg/gün)	Sıçan sayısı
Yağ kontrol grubu: mısır yağı	0	6
Negatif kontrol grubu: Testosteron Propiyonat (CAS No. 57-85-2)	0.4	6
Uygulama grubu: Propil paraben (CAS No. 94-13-3) +Testosteron propiyonat	10	6
Uygulama grubu: Propil paraben +Testosteron propiyonat	250	6
Uygulama grubu: Propil paraben + Testosteron propiyonat	750	6
Pozitif kontrol grubu: Flutamid (CAS No. 13311-84-7) + Testosteron propiyonat	3	6

Şekil 3.3. Hershberger yöntemi ve uygulama şeması

Deneyde yer alan gruplar, sadece mısır yağının oral gavaj olarak verildiği Yağ Kontrol Grubu, testosteron propiyonatın (TP) 0,4 mg/kg/gün olarak subkutanöz enjeksiyon ile uygulandığı Negatif Kontrol Grubu, propil parabenin oral gavaj olarak 3 farklı dozda TP (0,4mg/kg/gün) ile uygulandığı (10, 250 ve 750 mg/kg/gün) doz grupları ve son olarak flutamidin oral gavaj olarak ve TP eşliğinde uygulandığı Pozitif Kontrol gruplarıdır.

Propil paraben, testosteron propiyonat ve flutamid belirlenen doz miktarlarına göre taşıyıcı materyal olarak mısır yağında çözülmüştür. Uygulamalar 10 gün süre ile her gün aynı saatlerde olmasına dikkat edilerek gerçekleştirilmiştir. Son uygulamadan 24 saat sonra servikal dislokasyon ile sıçanlar öldürülmüştür.

3.2.2. Vücut Ağırlıkları, Günlük Tüketilen Yem ve Su Miktarları ve Organ Ağırlıklarının Ölçülmesi

Çalışma planı gereği sıçanların kısırlaştırma günü itibari ile vücut ağırlıkları ve günlük tükettikleri yem/su miktarları 10 gün boyunca her gün kaydedilmiştir. Hershberger yöntemi için gereken androjenik dokular; ventral prostat, penis ucu, seminal vezikül (koagulasyon bezleri dahil), Cowper bezleri, Levator ani (bulbokavernozus kasları dahil), karaciğer ve böbrek dissekte edildikten sonra çıkartılmış ve sıvı dolu ağırlıkları kaydedilmiştir.

3.2.3. Histopatolojik İncelemeler

Deney sonunda sıçanlardan çıkartılan dokular %10'luk formol ve bouin fiksatiflerinde 6 saat bekletildikten sonra %70'lik alkole alınmıştır. Doku takibi işlemi sonunda dokular 55°C'lik parafine gömülerek bloklanmıştır. Bloklanan dokular, Leica marka mikrotomda 5 µm kalınlığında kesilmiştir. Kesitler normal lamlara alınıp Hematoksilen&Eosin boyası ile boyanmış, Leica (RM2125RT) ışık mikroskopunda histopatolojik incelemeleri yapılmış ve gerekli alanlar Pixera Pro 150ES görüntüleme programı aracılığıyla fotoğrafları çekilerek kaydedilmiştir.

3.2.4. Hormon Analizi Sonuçları

Uygulama sonunda disekte edilen sıçanların kalbinden alınan kan örnekleri heparinli tüplere alınıp, 25 dakika boyunca 4°C de 3600 rpm'de santrifüj edilmiştir. Serum kısmı mikropipet yardımı ile ependorf tüplerine çekilmiş ve FSH ve LH hormon analizleri yapılmak üzere -80'de bekletilmiştir.

3.2.5. Hematolojik İncelemeler

Çalışma sonunda sıçanların öldürülmesinden hemen sonra sıçanların göğüs kısmı açılarak kalpten enjektörle alınan kan örneğinin pıhtılaşmasına izin vermeden EDTA'lı kan tüplerine alınmıştır. Alınan kan örnekleri bekletilmeden MS9-5 kan sayım cihazı aracılığı ile tam kan analizi yapılmıştır.

3.2.6. İstatiksel Değerlendirmeler

Bu çalışmada, uygulama gruplarının taşıyıcı kontrol grubuna göre değerlendirilebilmesi için tek yönlü varyans analizi, ANOVA kullanılmış olup, grupların vücut ağırlıkları, günlük tüketilen yem ve su miktarları, androjenik dokuların dolu ağırlıkları, hormon ve hematolojik verileri yönünden taşıyıcı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir etki olup olmadığını değerlendirmek üzere karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır. Gruplar arasında fark bulunduğu durumda hangi gruplar arasında fark olduğunu tespit etmek için post-hoc test olarak varyansların eşit olduğu durumda ‘Tukey’ testi uygulanmıştır. İstatistiksel olarak önemlilik düzeyi 0.05 alınmıştır.

4. BULGULAR

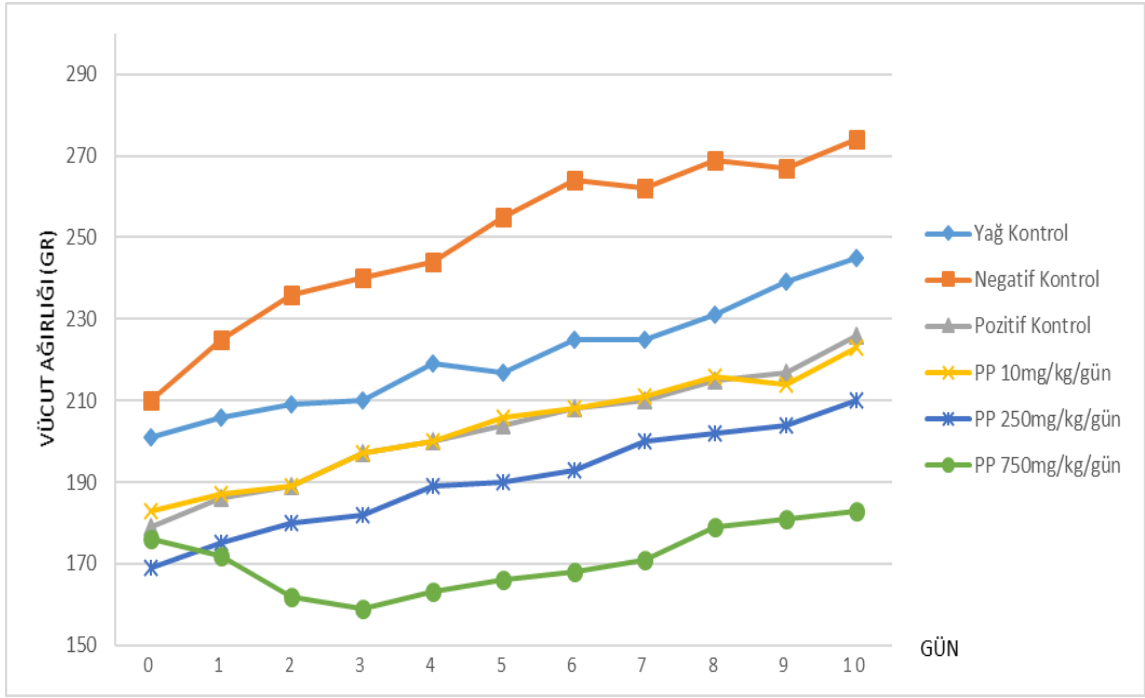
4.1 Vücut ve Organ Ağırlıkları ile Besin ve Su Tüketim Sonuçları

Deney başlangıcında ve sonundaki vücut ağırlıklarına ait sonuçlar Çizelge 4.1.’de gösterilmiştir. Kısırlaştırılmış erkek sıçanların ağırlıkları her grup için anlamlı bulunmuş olup günlere göre ağırlık dağılımları Şekil 4.1.’de gösterilmiştir. Uygulama sürecinde günlük tüketilen yem ve su miktarlarına ait sonuçlar ise Çizelge 4.2.’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kontrol ve propil paraben uygulanan gruplara ait sıçanların başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları

Gruplar	Doz	Başlangıç ağırlığı (g)	Bitiş ağırlığı (g)
Yağ Kontrol	1 ml	201±15,3 ^{c,e,f}	246,3±15,9 ^{b,c,d,e,f}
Negatif Kontrol	0,4 mg/kg/gün TP	210±10,3 ^{c,d,e,f}	274±2,6 ^{a,c,d,e,f}
Pozitif Kontrol	3 mg/kg/gün FLU	179,6±13,1 ^{a,b}	226,8±10,0 ^{a,b,e,f}
Propil paraben	10 mg/kg/gün	183,6±6,8 ^b	223,3±9,3 ^{a,b,e,f}
Propil paraben	250 mg/kg/gün	169,6±9,9 ^{a,b}	204±9,9 ^{a,b,c,d}
Propil paraben	750 mg/kg/gün	176±12,4 ^{a,b}	187,1±9,7 ^{a,b,c,d}

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. ^a Yağ kontrol grubundan farklı, ^b Negatif kontrol grubundan farklı, ^c Pozitif kontrol grubundan farklı, ^d 10 mg/kg/gün doz grubundan farklı, ^e 250 mg/kg/gün doz grubundan farklı, ^f 750 mg/kg/gün doz grubundan farklı (p≤0,05).



Şekil 4.1. Kısırlaştırılmış erkek sıçanların uygulama süresince vücut ağırlıklarının günlere göre değişimleri

Kontrol ve propil paraben uygulama gruplarına ait sıçanların deney süresince günlük olarak tükettikleri besin (g) ve su (ml) miktarlarının ortalamaları hesaplanmış ve Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Kontrol ve uygulama gruplarındaki erkek sıçanların tükettikleri besin ve su miktarları

	Yağ Kontrol	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	PP (10 mg/kg/gün)	PP (250 mg/kg/gün)	PP (750 mg/kg/gün)
Besin (g)	16,4±0,3 ^{d,e,f}	18,4±0,5 ^{d,e,f}	16,8±0,2 ^{d,e,f}	13,3±0,8 ^{a,f,b}	12,9±0,1 ^{a,b,c,f}	9,44±0,6 ^{a,b,c,d,e}
Su (ml)	15±0,3 ^b	18,8±0,1 ^{a,d,e,f}	16,6±0,2 ^f	15±0,2 ^b	14±0,1 ^b	13±0,4 ^{b,c}

Değerler ortalama ± standart sapma değerleri olarak verilmiştir. ^a Yağ kontrol grubundan farklı, ^b Negatif kontrol grubundan farklı, ^c Pozitif kontrol grubundan farklı, ^d 10 mg/kg/gün doz grubundan farklı, ^e 250 mg/kg/gün doz grubundan farklı, ^f 750 mg/kg/gün doz grubundan farklı ($p \leq 0,05$).

Kontrol ve propil paraben uygulama gruplarına ait sıçanların ortalama doku ağırlıkları nekropsi sonrası teker teker tartılmış olup ortalamaları hesaplanmış ve Çizelge 4.3.'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. İstatistiksel olarak propil paraben uygulamasının bütün dozlarında organ ağırlıkları yağ kontrole göre anlamlı olarak artarken, testosteron propiyonatin uygulandığı (0,4 mg/kg/gün) negatif kontrol grubunda organ ağırlığı değerleri yüksek olarak tespit edilmiştir. Pozitif kontrol grubu ile 250 mg/kg/gün ve 750mg/kg/gün propil paraben doz grupları arasında diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir benzerlik bulunmuştur. Böbrek organ ağırlık değerleri ise gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

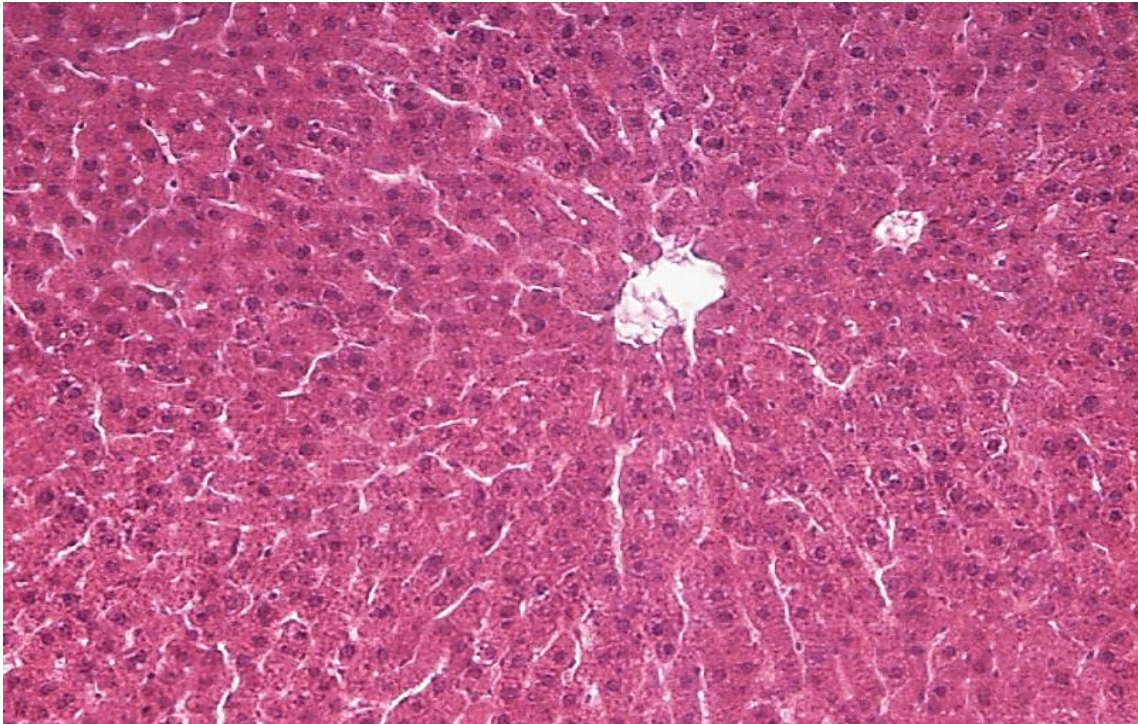
Çizelge 4.3. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların ortalama doku ağırlıkları

Dokular (mg)	Yağ Kontrol (1 ml)	Negatif Kontrol (0.4 mg/kg/gün)	Pozitif Kontrol (3 mg/kg/gün)	Propil paraben (10 mg/kg/gün)	Propil paraben (250mg/kg/gün)	Propil paraben (750mg/kg/gün)
Ventral prostat	30±4,1 ^{b,d,e,f}	181±7,5 ^{a,c,d,e}	48,3±4,1 ^{b,d,e}	126±17,5 ^{a,b,c,e,f}	73,3±15.1 ^{a,b,c,d}	60±7,5 ^{a,b,c,d}
Seminal vezikül	66,7±16.3 ^{b,c,d,e}	868,3±53.1 ^{a,c,d,e}	356,7±39.3 ^{a,b}	391,7±37.1 ^{a,b}	383,3±55.7 ^{a,b}	353,3±8.2 ^{a,b}
LABC	191,7±11.7 ^{b,c,d,e,f}	733,3±32.6 ^{a,c,d,e,f}	388,3±9.8 ^{a,b,f}	396,7±64.7 ^{a,b,f}	380±40,8 ^{a,b}	316,7±32.6 ^{a,b,c,d}
Cowper bezi	13,3±5,2 ^{b,c,d,e,f}	81,7±4.1 ^{a,c,d,e}	41,7±4.1 ^{a,b}	46,7±10.6 ^{a,b}	41,7±6.1 ^{a,b}	43,3±8.2 ^{a,b}
Penis ucu	23,3±5,2 ^{b,c,d,e}	63,3±5.2 ^{a,c,d,e,f}	41,7±4.1 ^{a,b}	43,3±6.1 ^{a,b}	43,3±6.3 ^{a,b}	38,3±9.8 ^b
Karaciğer (g)	10,4±5,1 ^{b,d,e,f}	12,0±1,1 ^{a,c,d,e,f}	9,6±0,3 ^{b,d,e,f}	8,4±0,2 ^{a,b,c,e,f}	6,5±0,4 ^{a,b,c,d}	6,4±0,7 ^{a,b,c,d}
Böbrek (g)	1,7±0,1	1,6±0,8	1,7±0,1	1,3±0,3	1,3±0,06	1,3±0,01

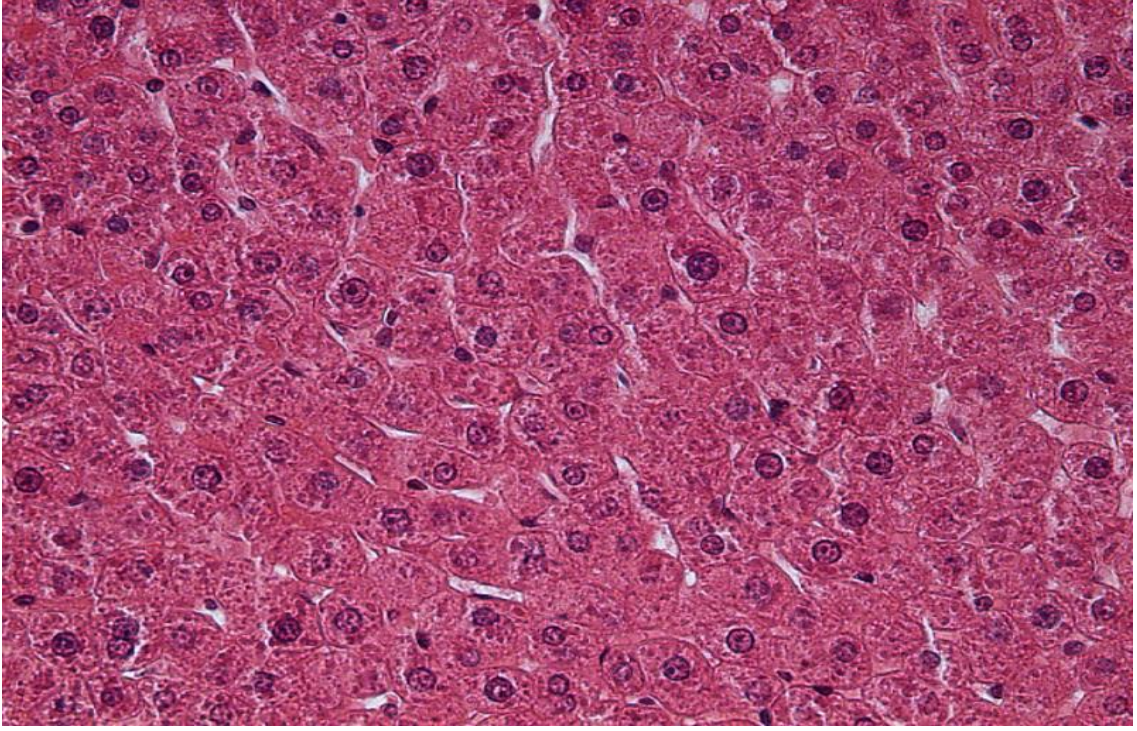
Değerler ortalama ± standart sapma değerleri olarak verilmiştir. ^a Yağ kontrol grubundan farklı, ^b Negatif kontrol grubundan farklı, ^c Pozitif kontrol grubundan farklı, ^d 10 mg/kg/gün doz grubundan farklı, ^e 250 mg/kg/gün doz grubundan farklı, ^f 750 mg/kg/gün doz grubundan farklı (p≤0,05).

4.2. Histopatolojik incelemeler

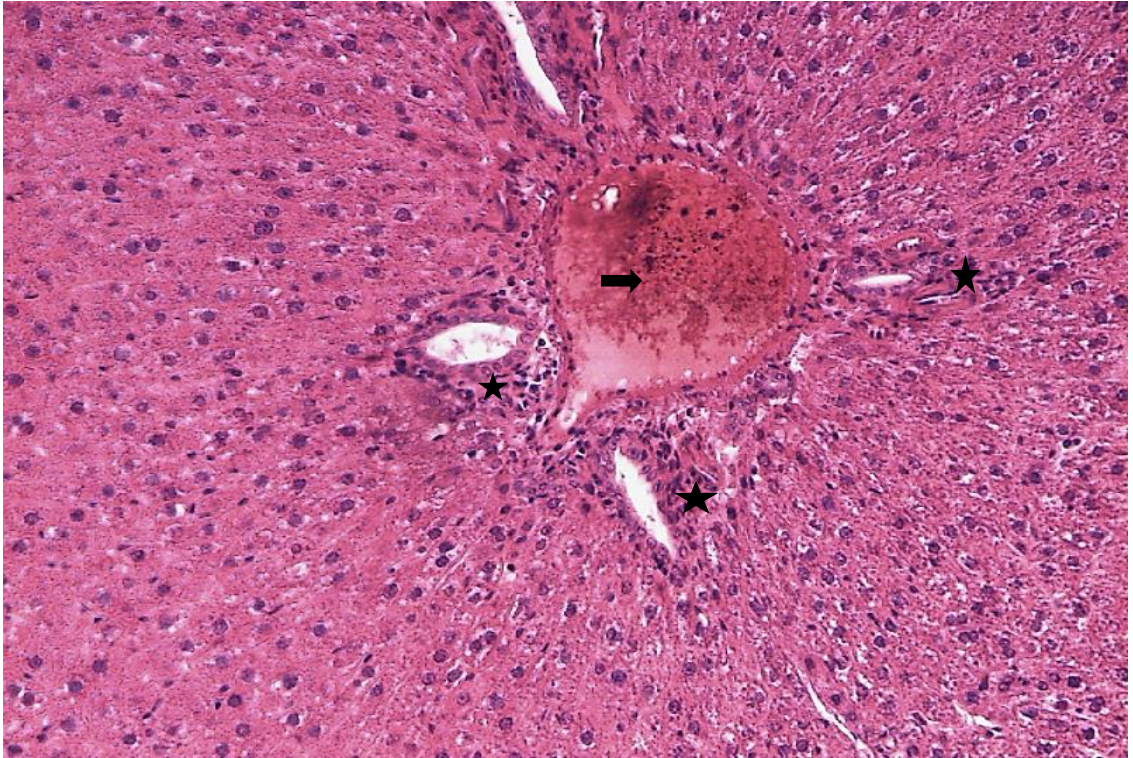
Rutin histolojik yöntemlerle hazırlanan ve Hematoksilen Eosin ile boyanan doku preparatları histolojik olarak incelenmiş, tespit edilen histopatolojik bulguların 10X, 20X ve 40X büyütmelerde fotoğrafları çekilmiş ve Şekil 4.2.- 4.35.'de gösterilmiştir. Fisher istatistik yöntemi ile yapılan incelemeler sonucunda ise histopatolojik bulgularının görülme sıklıkları Çizelge 4.4 ve 4.5' de verilmiştir. Karaciğer dokularında 250 ve 750 mg/kg/gün propil paraben maruziyetinde Kupffer hücrelerinde çoğalma, sinüzoidal genişleme ve mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenirken böbrek dokusunda Bowman kapsülünde genişleme, tübüler dejenerasyon ve distal tüp lümenine atılmış hücrelere rastlanmıştır. Ayrıca ventral prostat ve seminal vezikül dokularında doz artışına bağlı atrofi, hiyalinozis ve vezikül lümeninde genişleme gözlenmiştir. Cowper bezinde bazal hücre sayısında artış gözlenirken, LABC dokusunda fibril kopması meydana gelmiştir. Çalışmada glans penis dokusunda hiçbir histopatolojik değişiklik gözlenmemesi nedeniyle bulgular bölümüne sadece kontrol ve 750 mg/kg/gün PP doz grubu eklenmiştir.



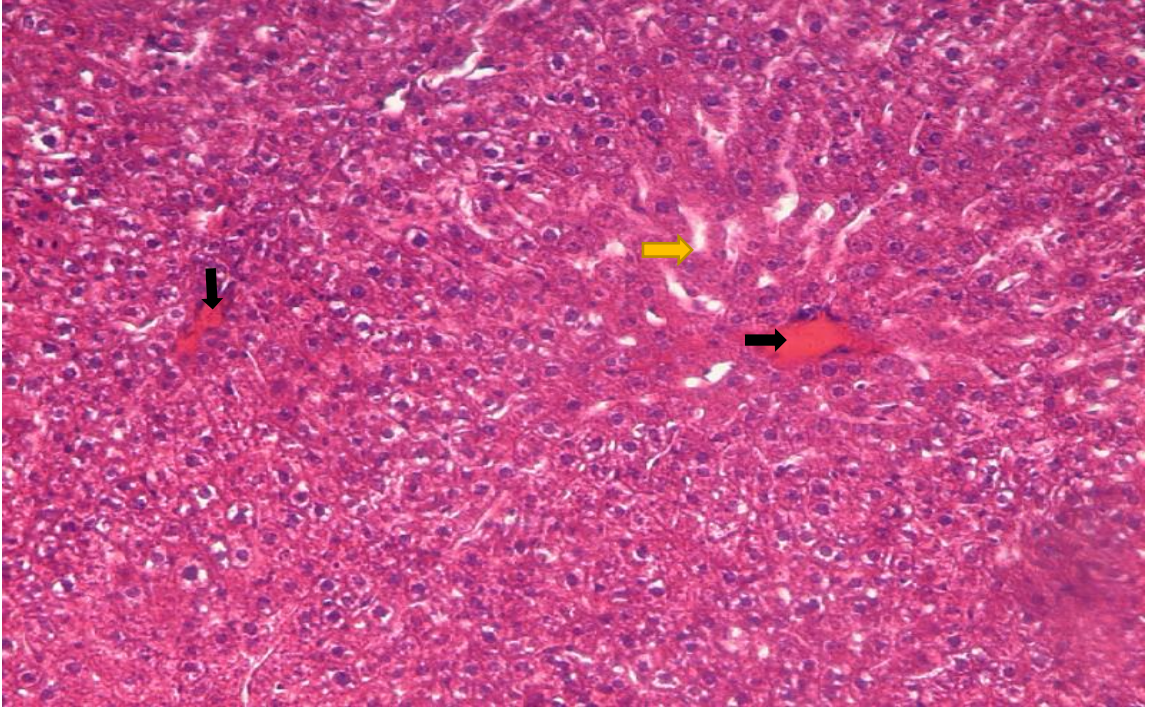
Şekil 4.2. Yağ kontrol grubunda karaciğerin histolojik yapısı (H&E, X200)



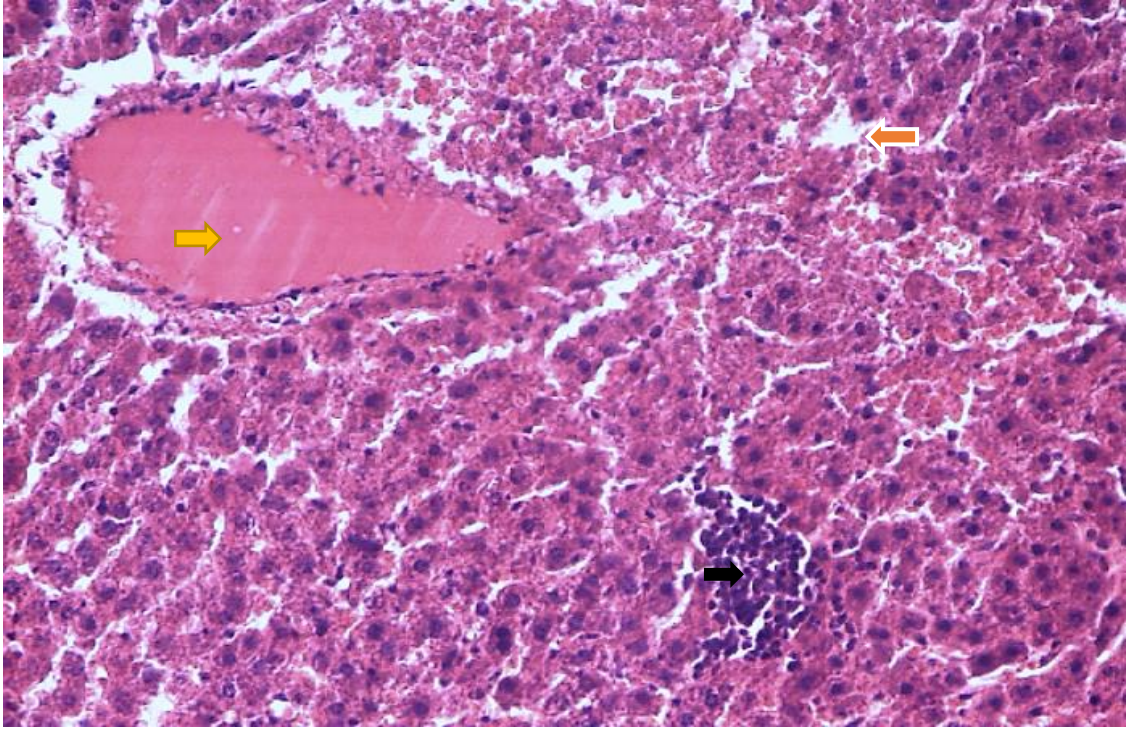
Şekil 4.3. Yağ kontrol grubunda karaciğerin histolojik yapısı (H&E, X400)



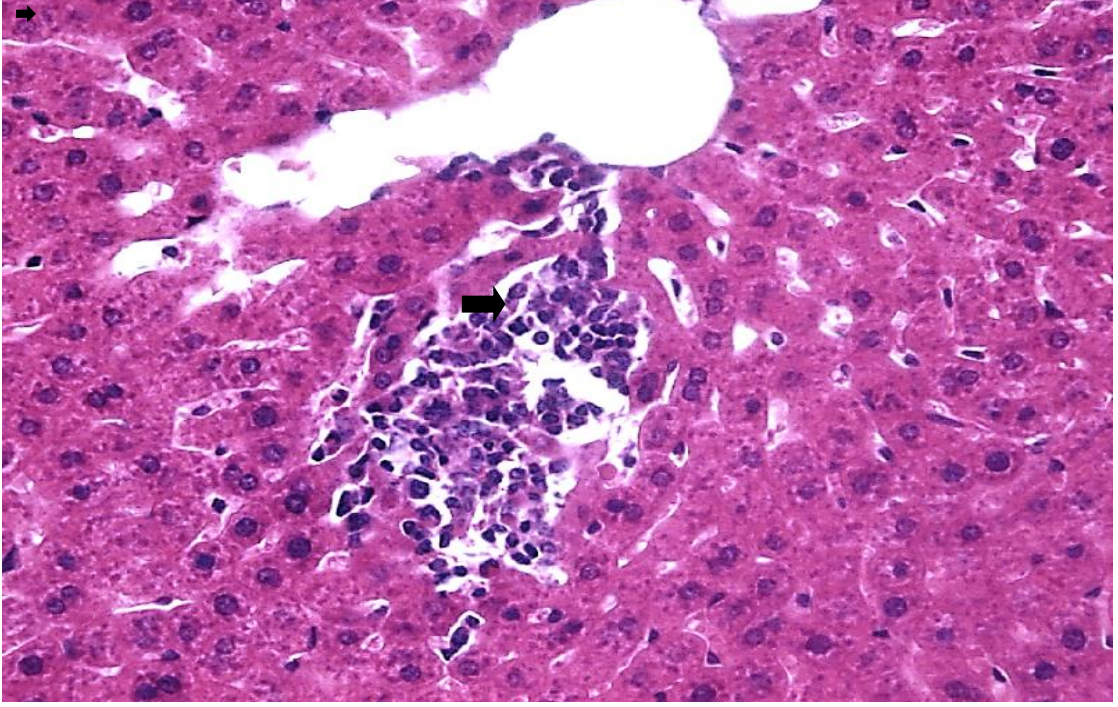
Şekil 4.4. Negatif kontrol grubunda (Testosteron propiyonat) karaciğerde merkezi vende oluşan konjesyon (➡), ven çevresinde sayıca artmış uğramış hücreler (★) (H&E, X200)



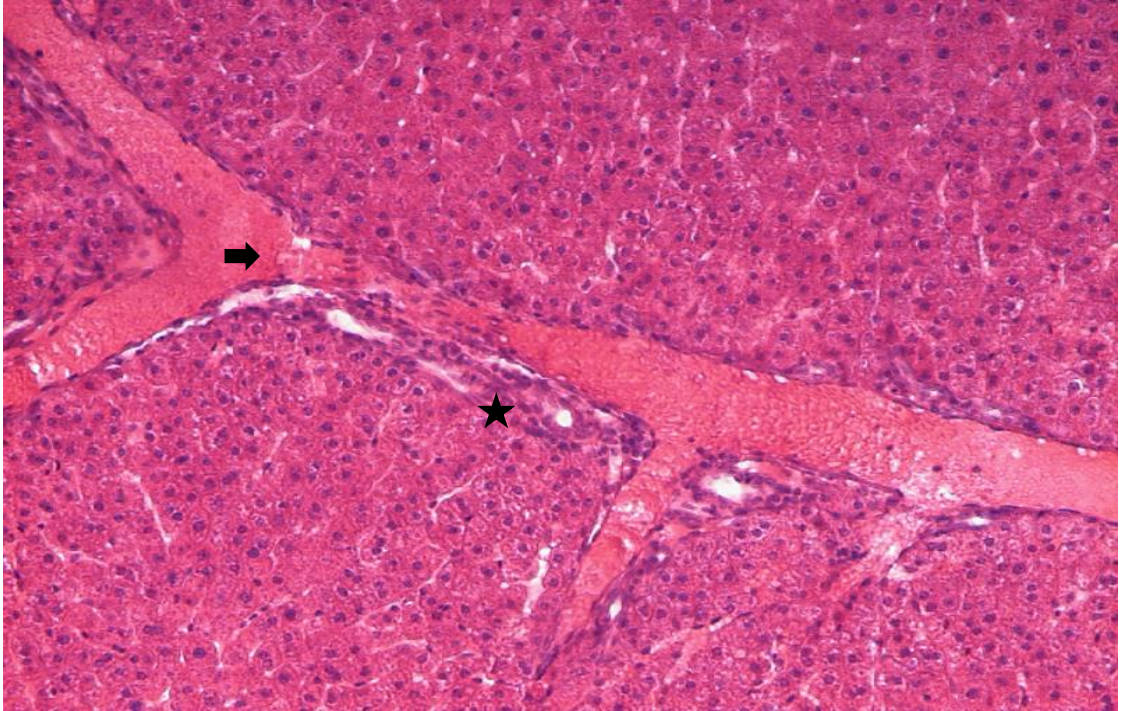
Şekil 4.5. Pozitif kontrol grubunda (FLU) karaciğerde oluşan minimal konjesyonlar (**→**) ve sinüzoidal genişleme (**→**) (H&E, X200)



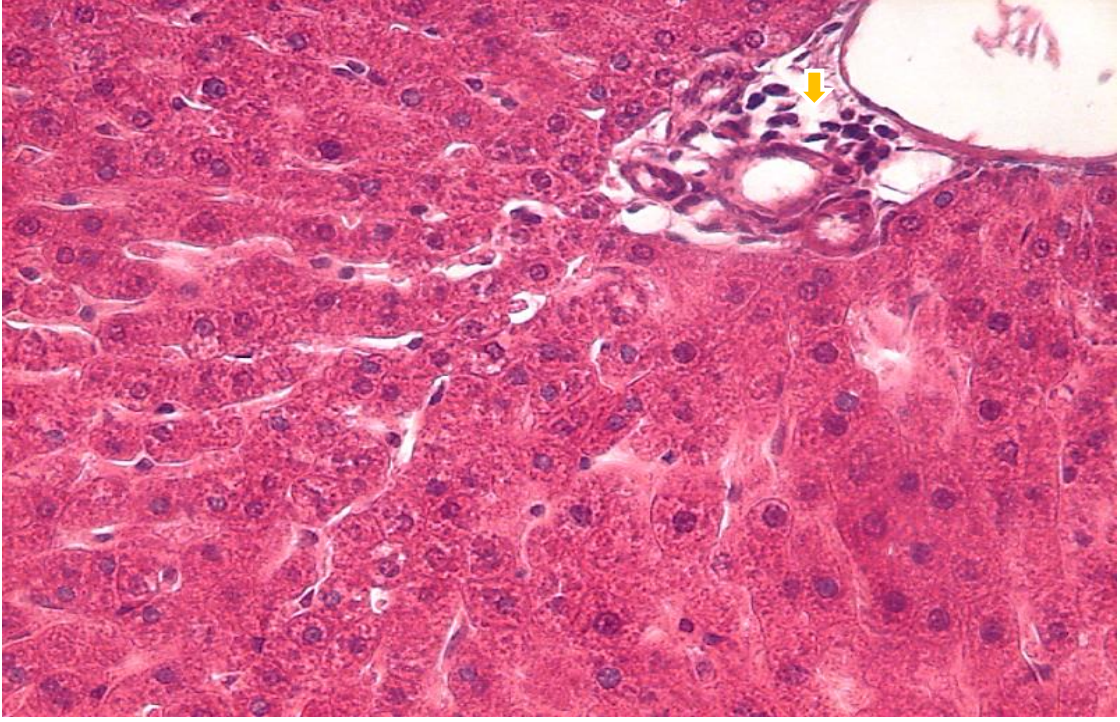
Şekil 4.6. 10 mg/kg/gün PP uygulama grubunda karaciğerde oluşan mononükleer hücre infiltrasyonu (**→**), konjesyon (**→**) ve hücresel dejenerasyon (**→**) (H&E, X200)



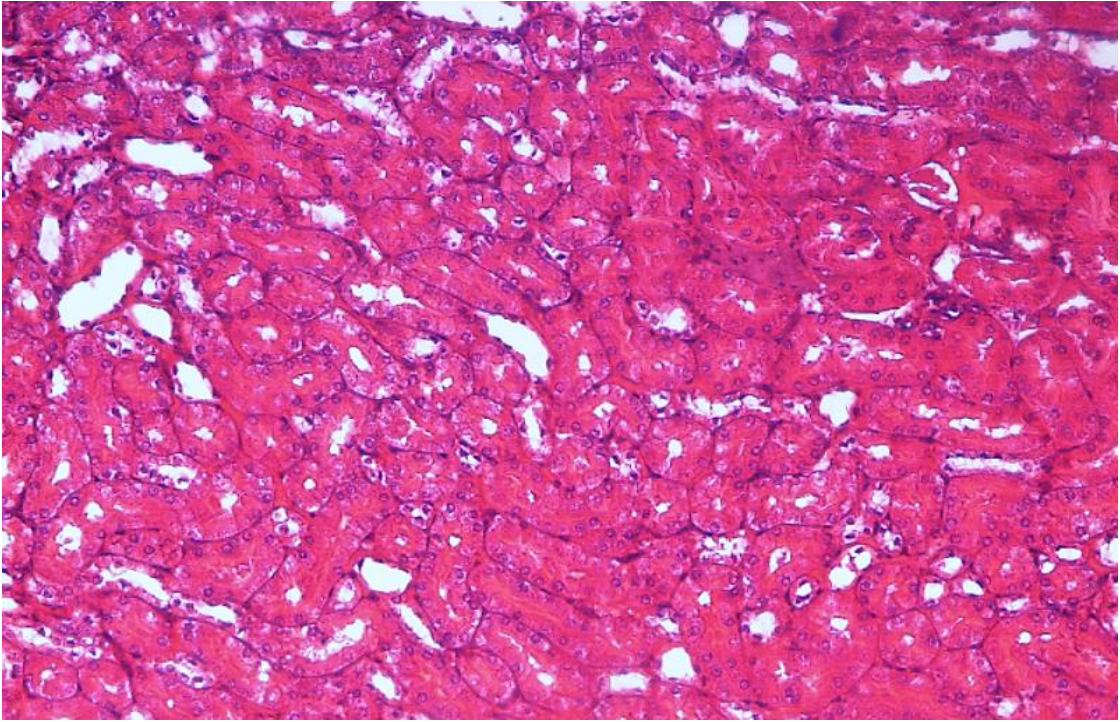
Şekil 4.7. 250 mg/kg/gün PP uygulama grubunda karaciğerde oluşan mononükleer hücre infiltrasyonu(➡) (H&E, X400)



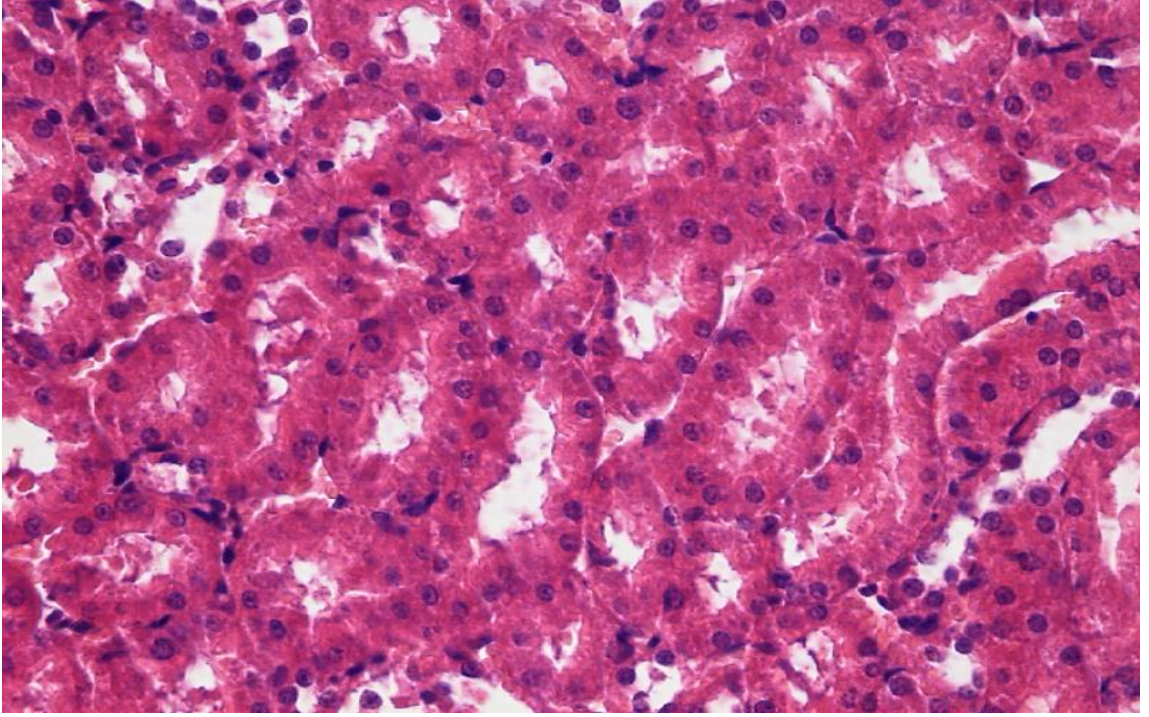
Şekil 4.8. 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda karaciğerde konjesyon (➡) ve damar etrafında mononükleer hücre infiltrasyonu(★) (H&E, X200)



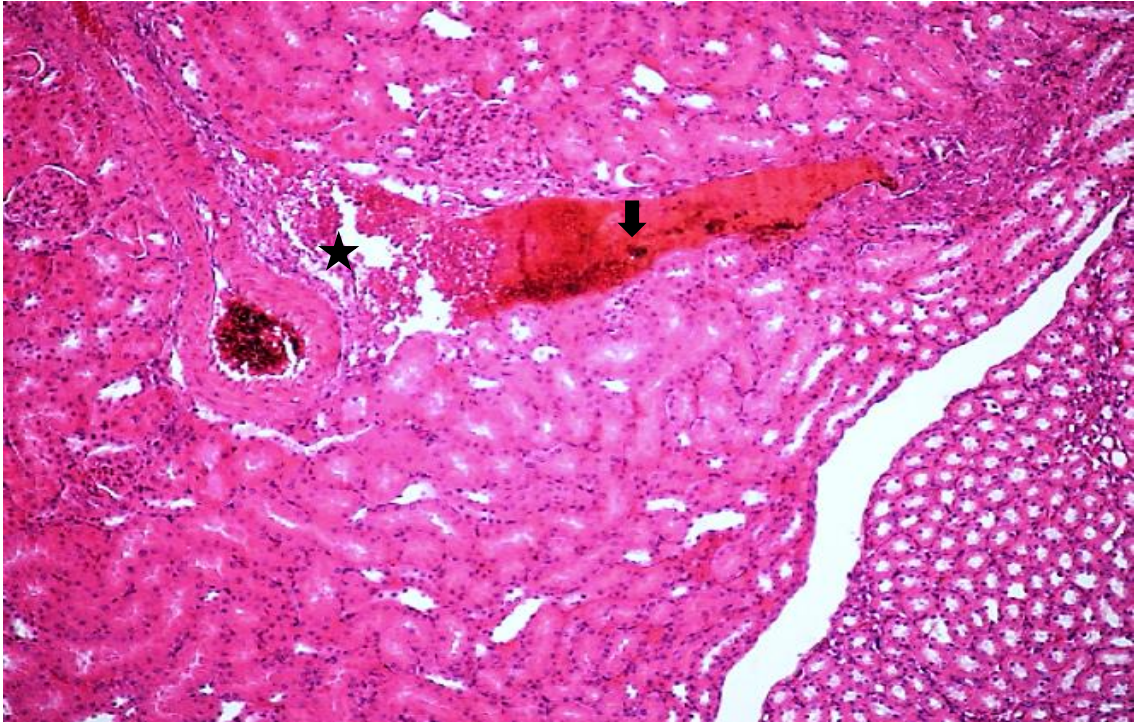
Şekil 4.9. 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda karaciğerde Kupffer hücrelerinin ven çevresinde çoğalması (➡) (H&E, X400)



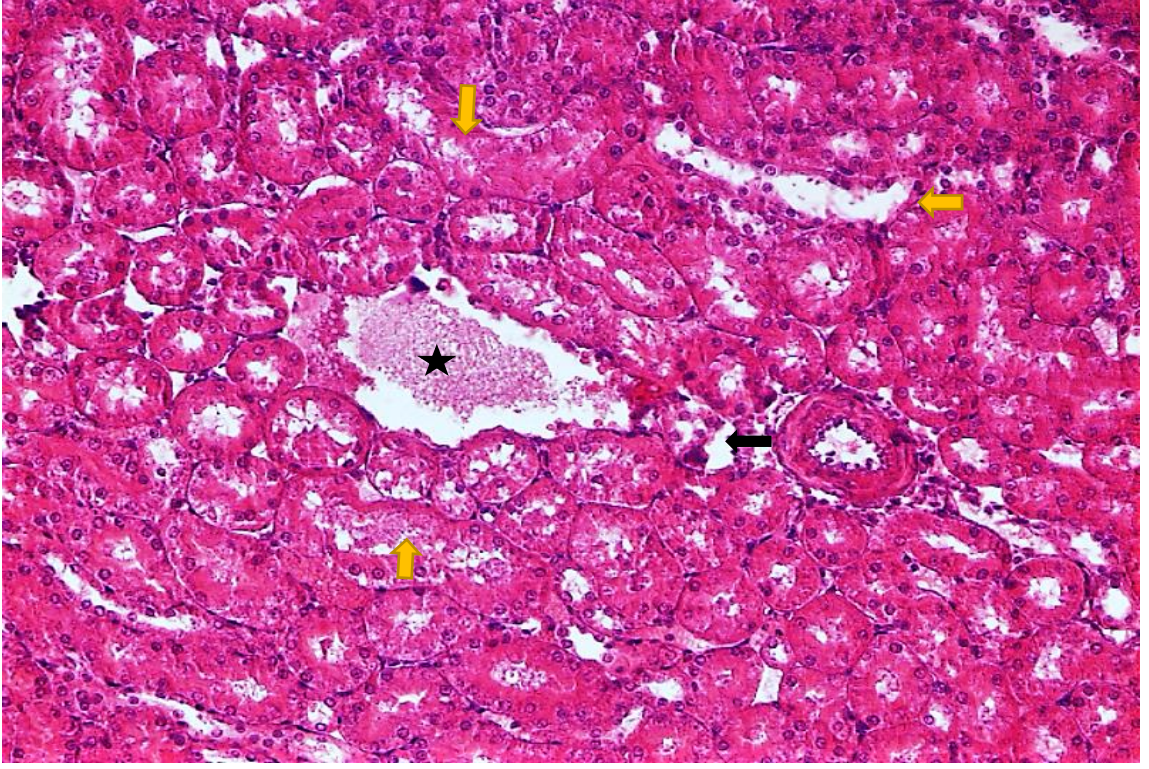
Şekil 4.10. Yağ kontrol grubunda böbrek dokusunun histolojik yapısı (H&E, X200)



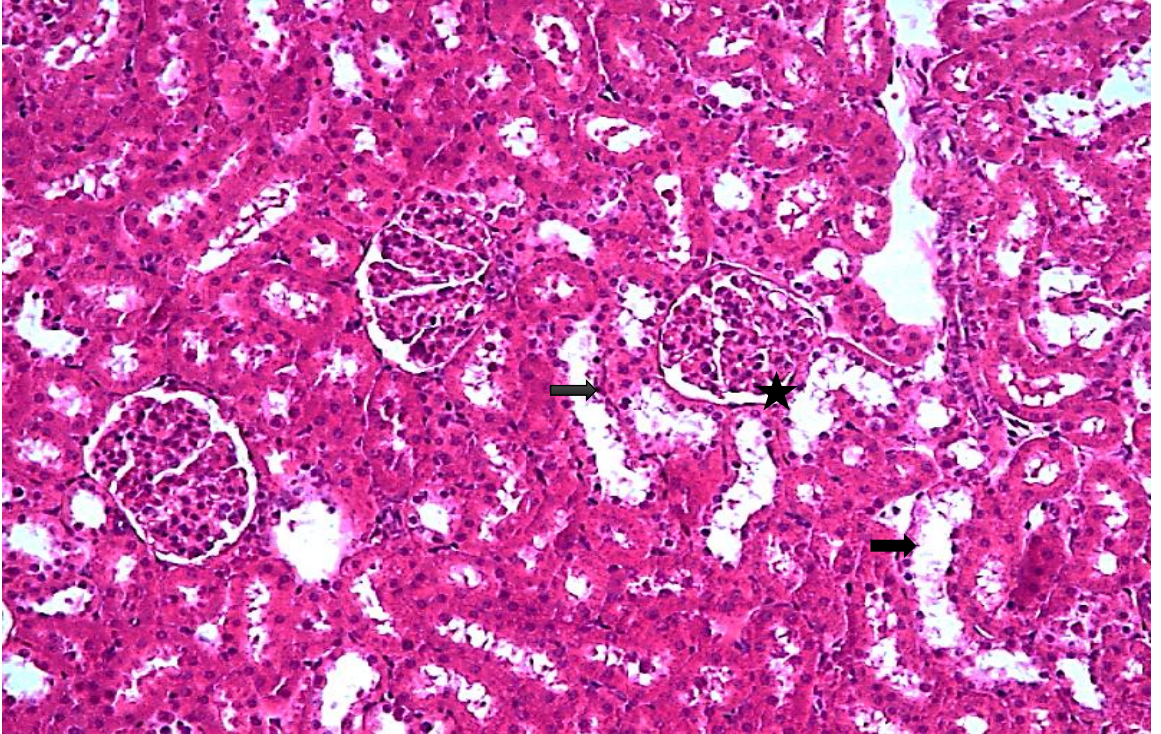
Şekil 4.11. Yağ kontrol grubunda böbrek dokusunun histolojik yapısı (H&E, X400)



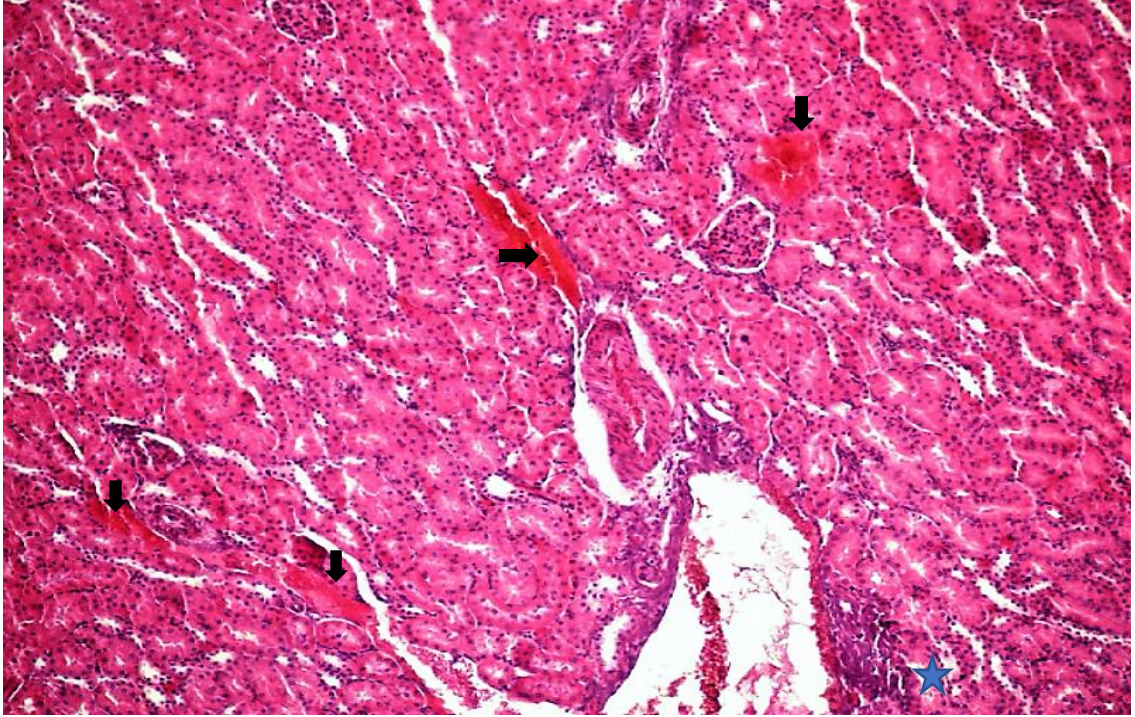
Şekil 4.12. Negatif kontrol grubunda (TP) böbrekte oluşan konjesyon (➡) ve hücresel dejenerasyon (★) (H&E, X100)



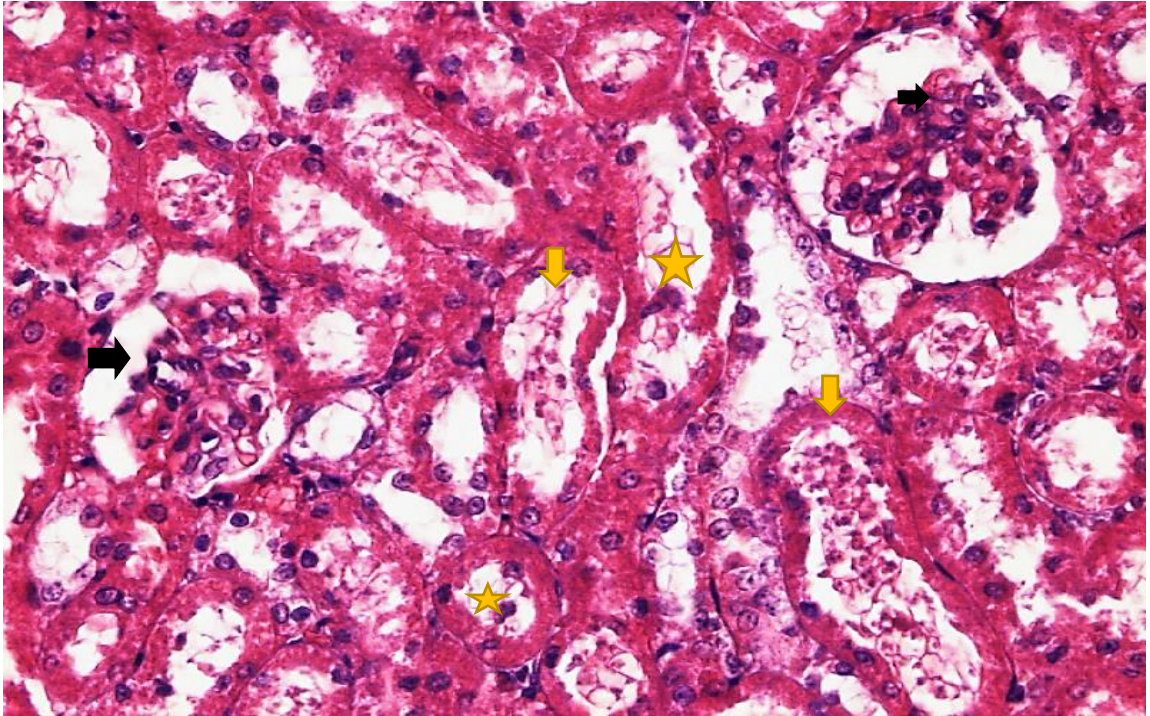
Şekil 4.13. Pozitif kontrol grubunda (FLU) böbrekte oluşan tübüler dejenerasyon (➡), ödem (★) ve proksimal tüp lümenine hücre atılması (➡) (H&E, X200)



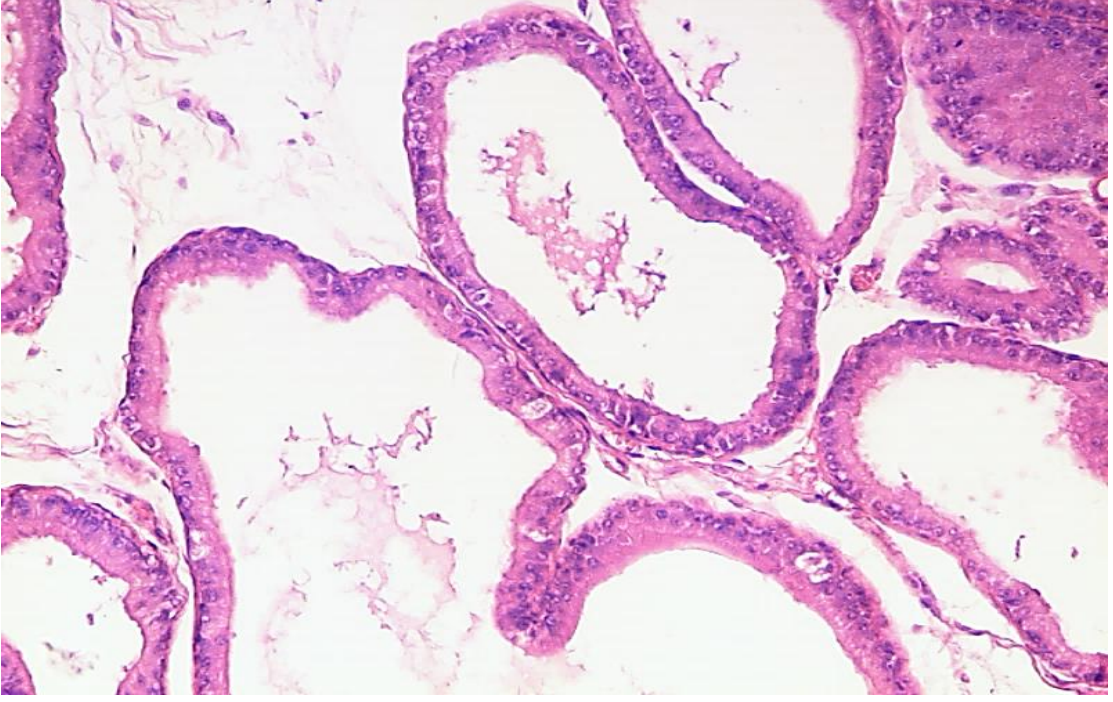
Şekil 4.14. 10 mg/kg/gün PP uygulama grubunda böbrekte oluşan tübüler dejenerasyon (➡) ve Bowman kapsülünde genişleme (★) (H&E, X200)



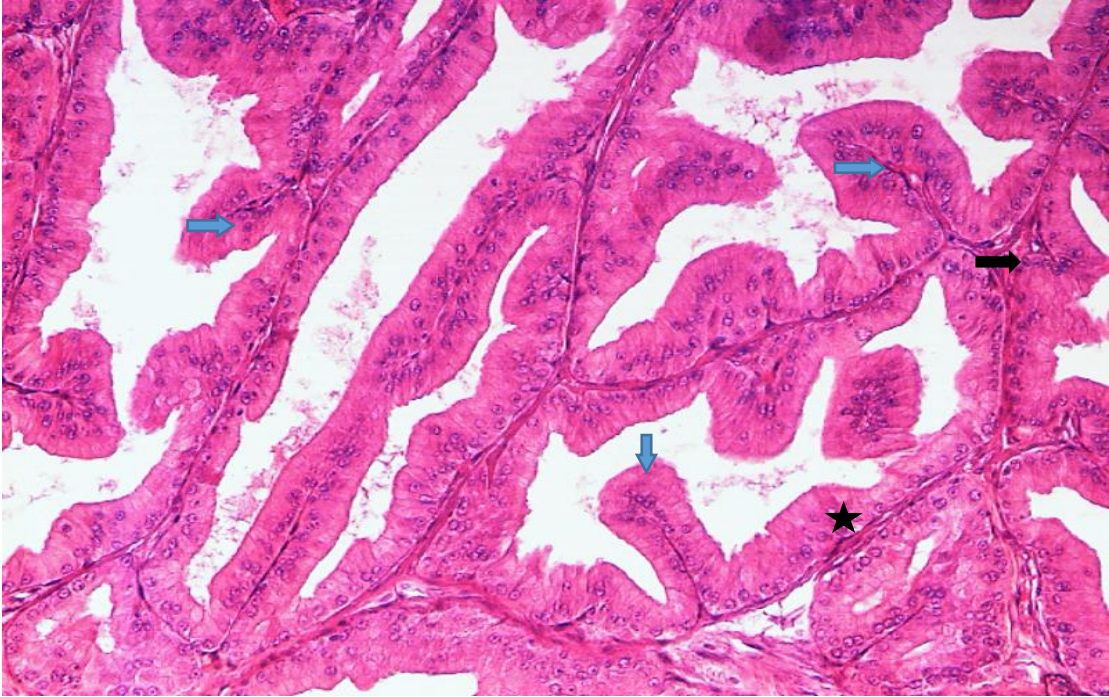
Şekil 4.15. 250 mg/kg/gün PP uygulama grubunda böbrekte oluşan konjesyon (➡) ve minimal derecede mononükleer hücre infiltrasyonu (★), (H&E, X100)



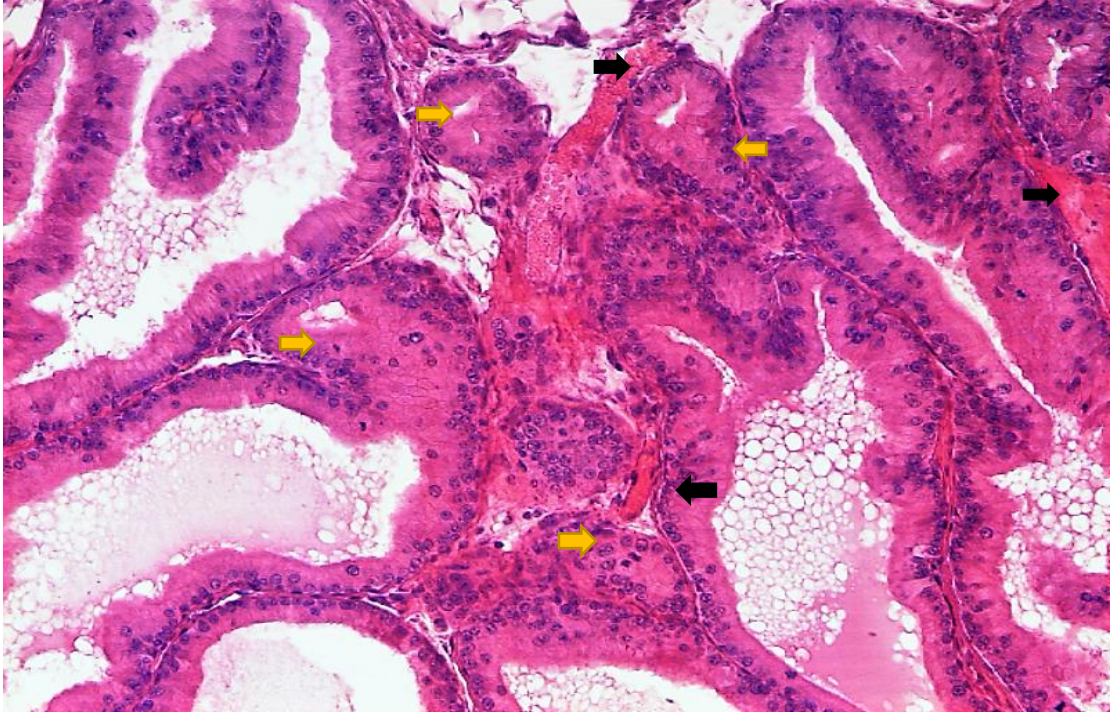
Şekil 4.16. 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda böbrekte oluşan Bowman kapsülünde genişleme (➡), tübüler dejenerasyon (➡) ve distal tüp lümene atılmış hücreler (★) (H&E, X400)



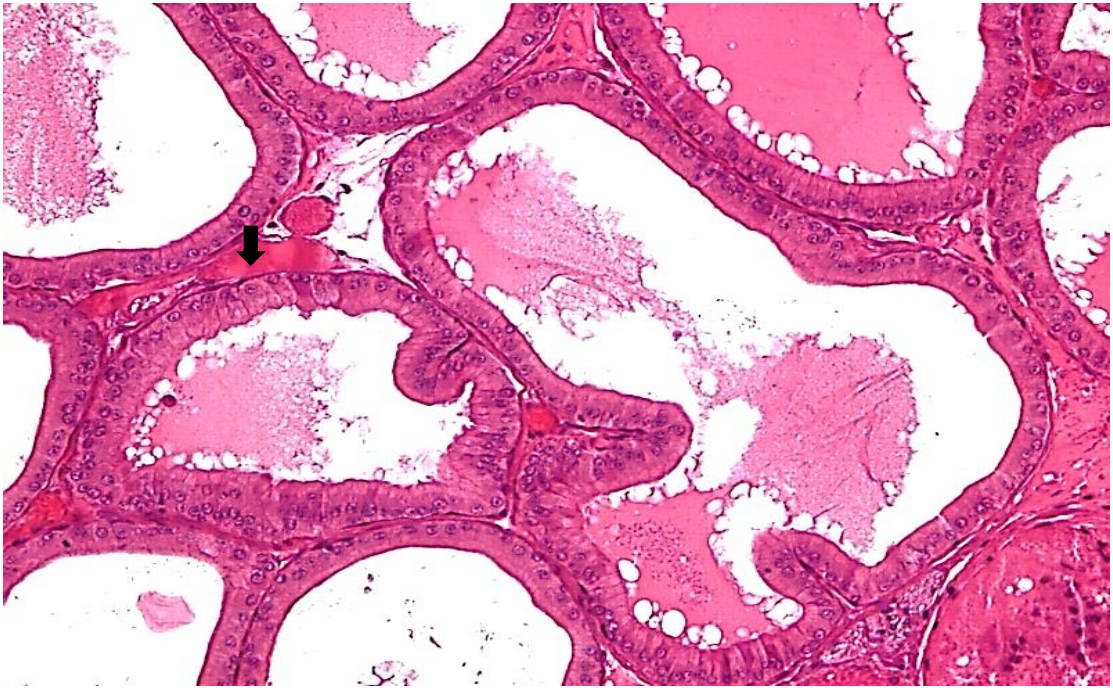
Şekil 4.17. Yağ kontrol grubu sıçanlarda ventral prostatın normal histolojik görüntüsü (H&E, X200)



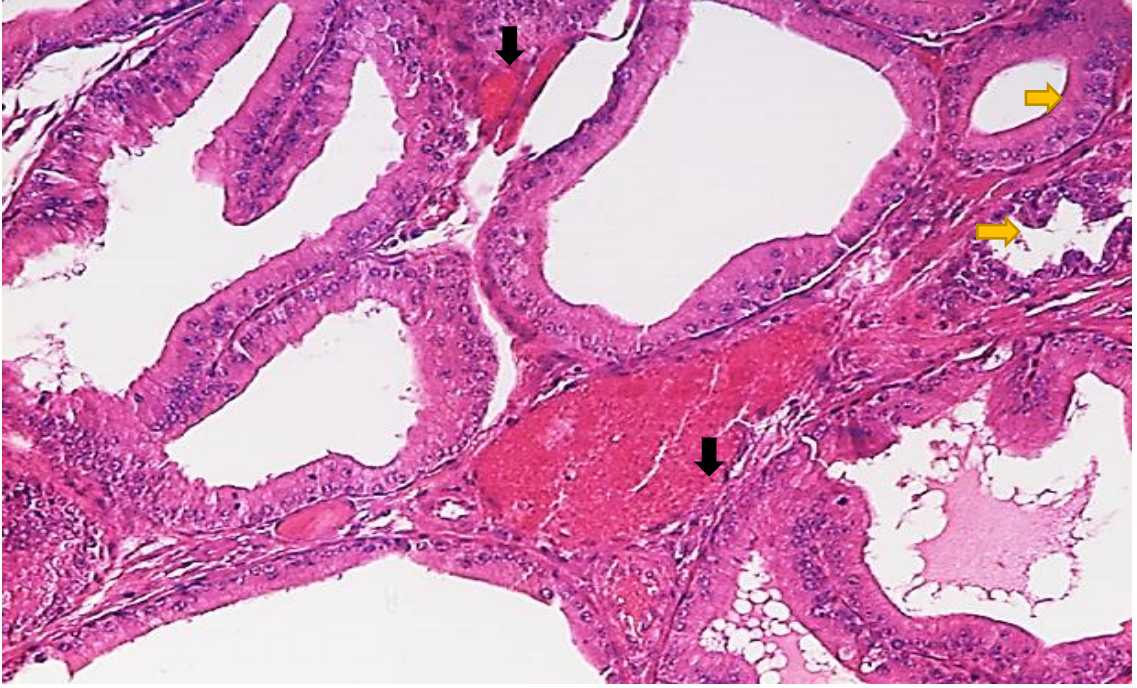
Şekil 4.18. Negatif kontrol grubunda (TP) ventral prostatta oluşan aşırı hiperplazik hücreler (büyümeye bağlı olarak lümene doğru polip oluşumu (→), epitel yüksekliğinde artış (★) ve minimal konjesyon (→)) (H&E, X200)



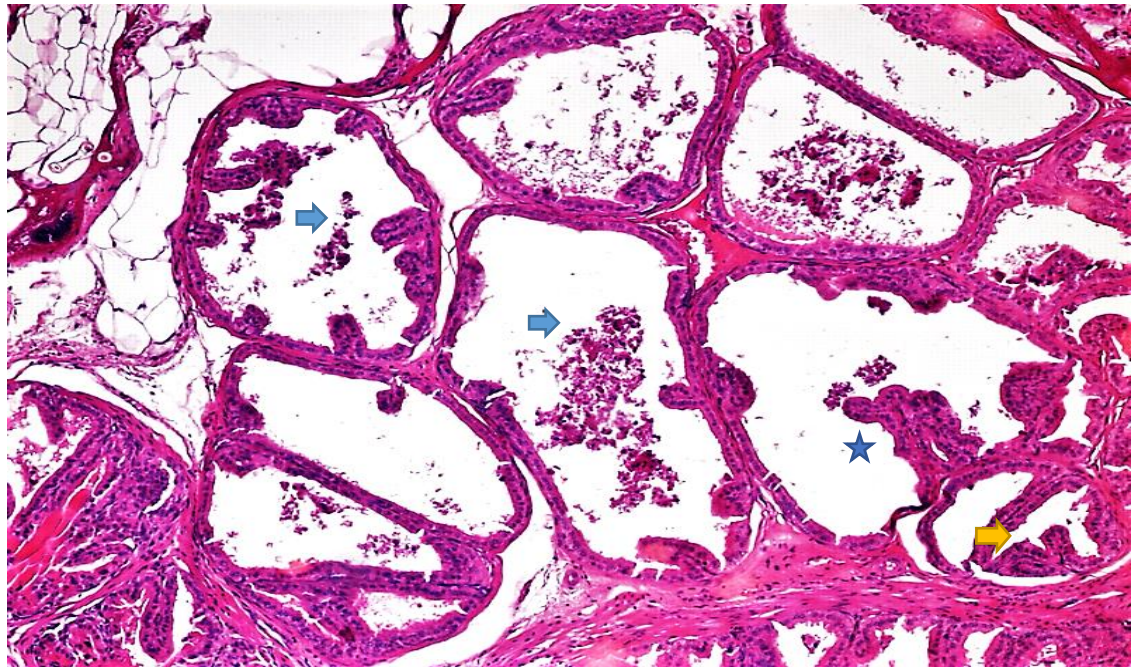
Şekil 4.19. Pozitif kontrol grubunda (FLU) ventral prostatta oluşan tübüler atrofi (→) ve konjesyon (→) (H&E, X200)



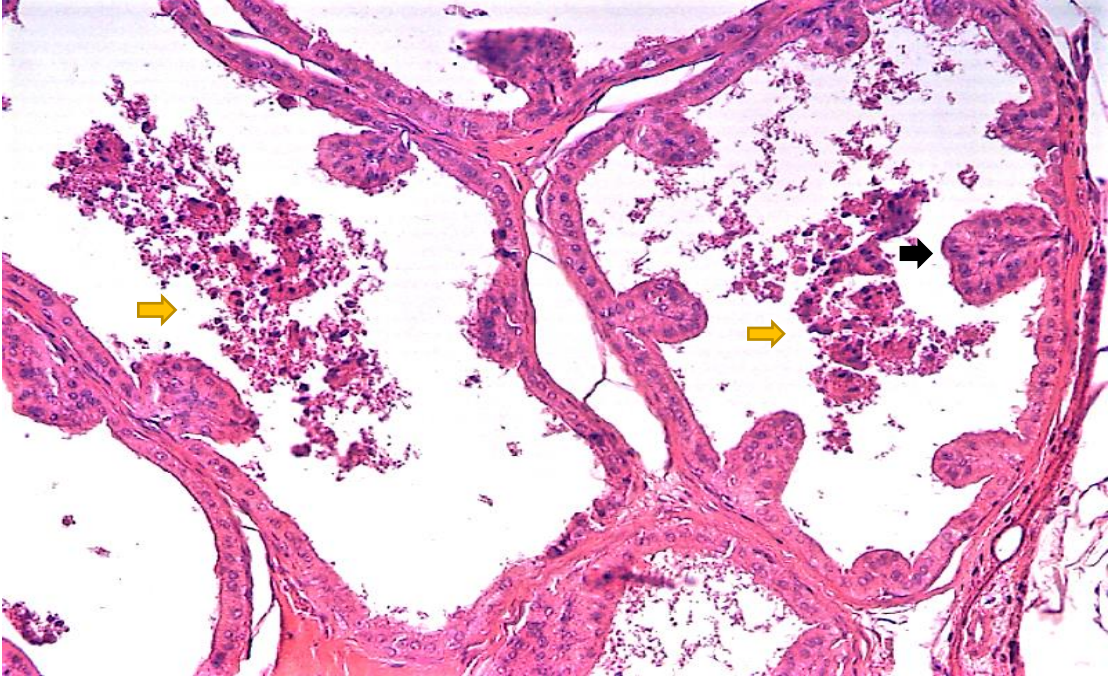
Şekil 4.20. 10 mg/kg/gün PP uygulama grubunda ventral prostatta görülen minimal konjesyon (→) (H&E, X200)



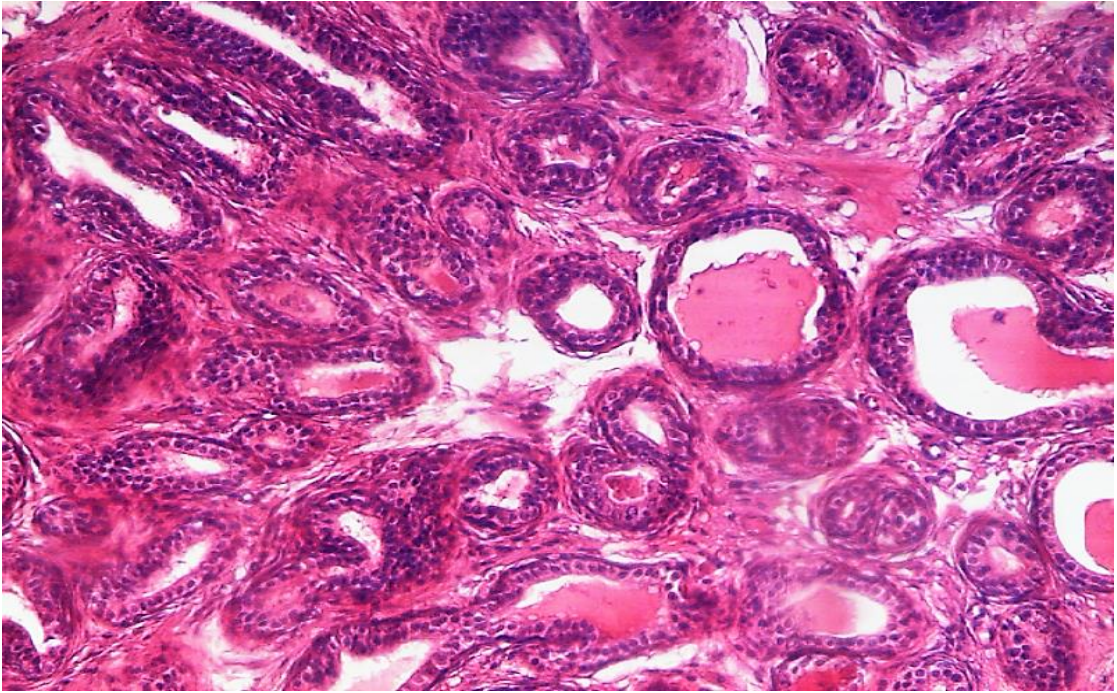
Şekil 4.21. 250 mg/kg/gün PP uygulama grubunda ventral prostatta görülen konjesyon (➡) ve tübüler aftrofi (➡) (H&E, X200)



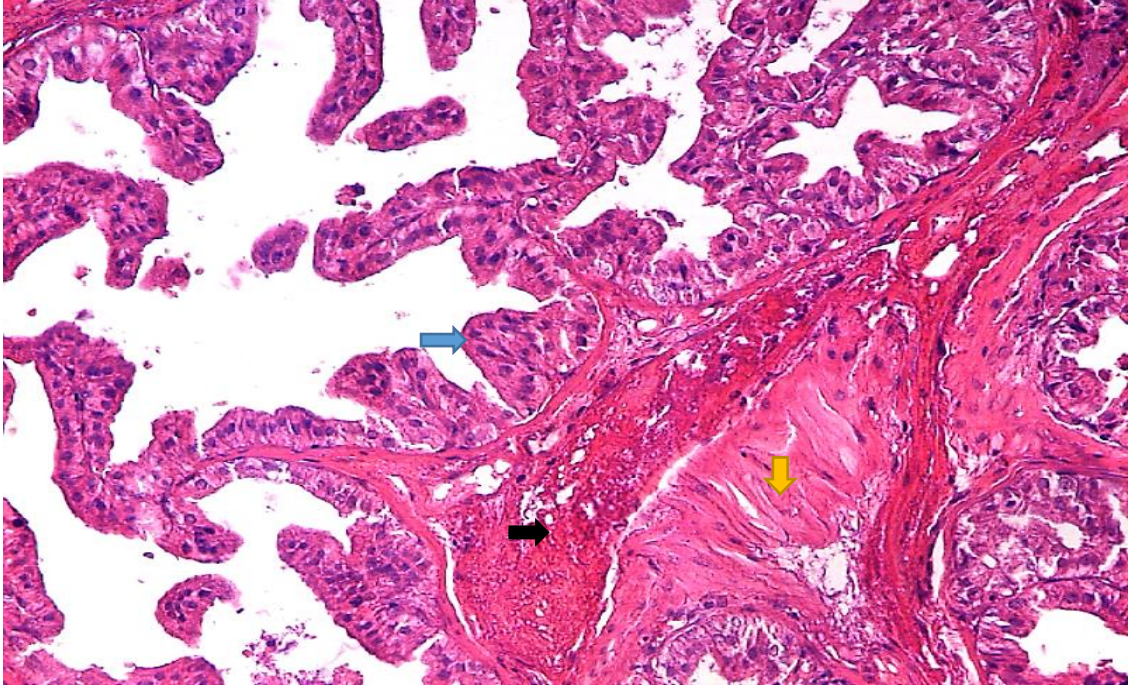
Şekil 4.22. 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda ventral prostatta lümene toplanmış hücreler (➡) lümene doğru polip oluşumu (★) ve tübüler atrofi (➡) (H&E, X100)



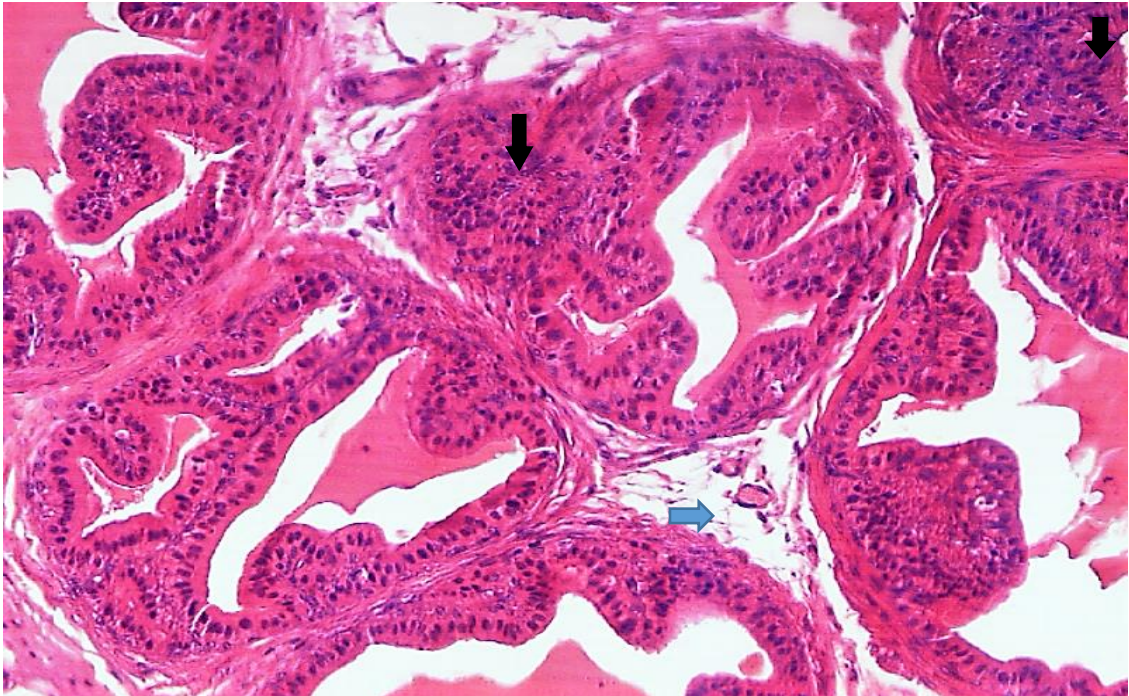
Şekil 4.23. 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda ventral prostat lümeninde görülen hücreler (→) ve nodülde polipleşme (→) (H&E, X200)



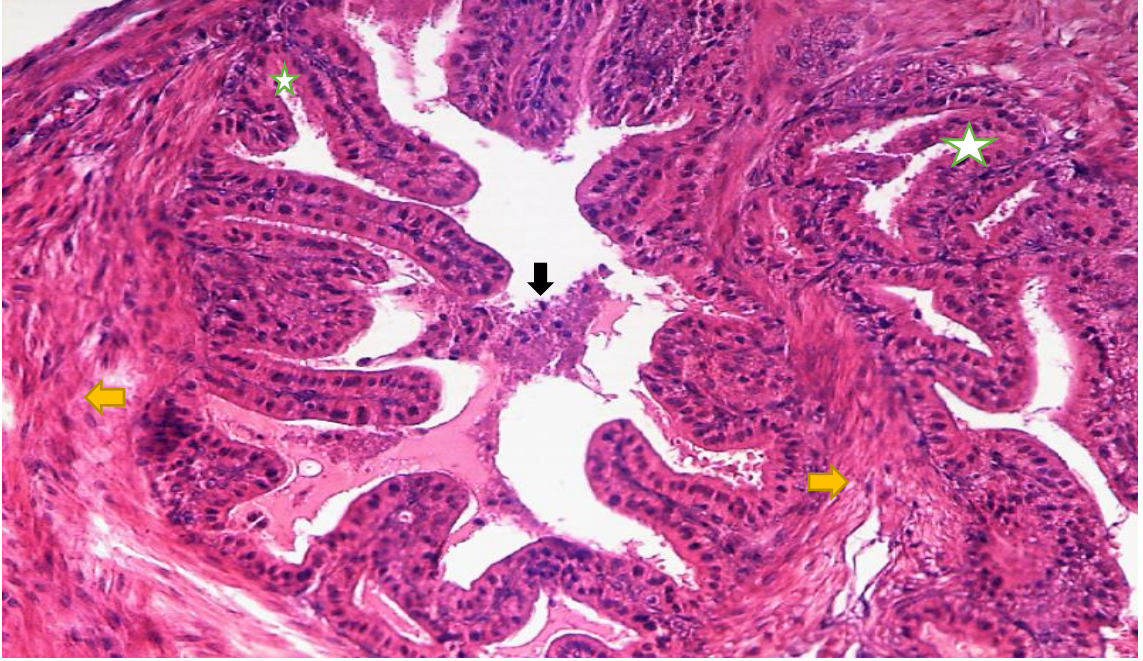
Şekil 4.24. Yağ kontrol grubu sıçanda seminal vezikül normal histolojik görüntüsü (H&E, X200)



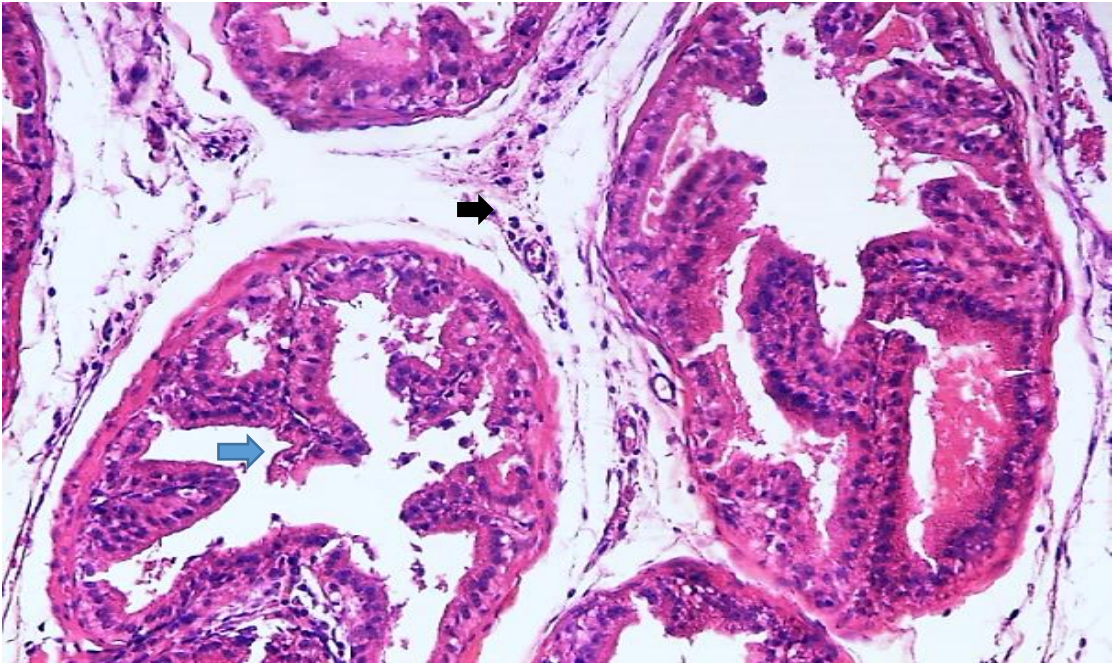
Şekil 4.25. Negatif kontrol grubu (TP) sıçanda seminal vezikülde oluşan konjesyon (**➡**), bezi çevreleyen fibromusküler stroma miktarında artış (**➡**) ve hiperplazi gösteren hücreler (**➡**) (H&E, 200X)



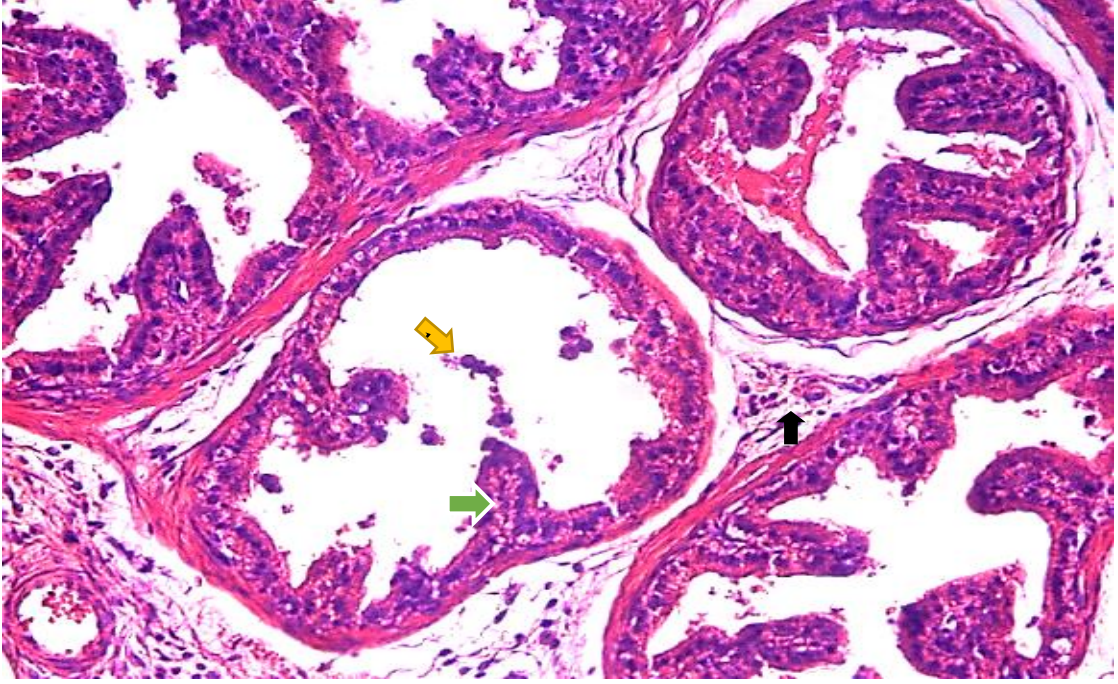
Şekil 4.26. Pozitif kontrol grubu (FLU) sıçanda seminal vezikülde hiyalinozis (**➡**) ve atrofik veziküller (**➡**) (H&E, X200)



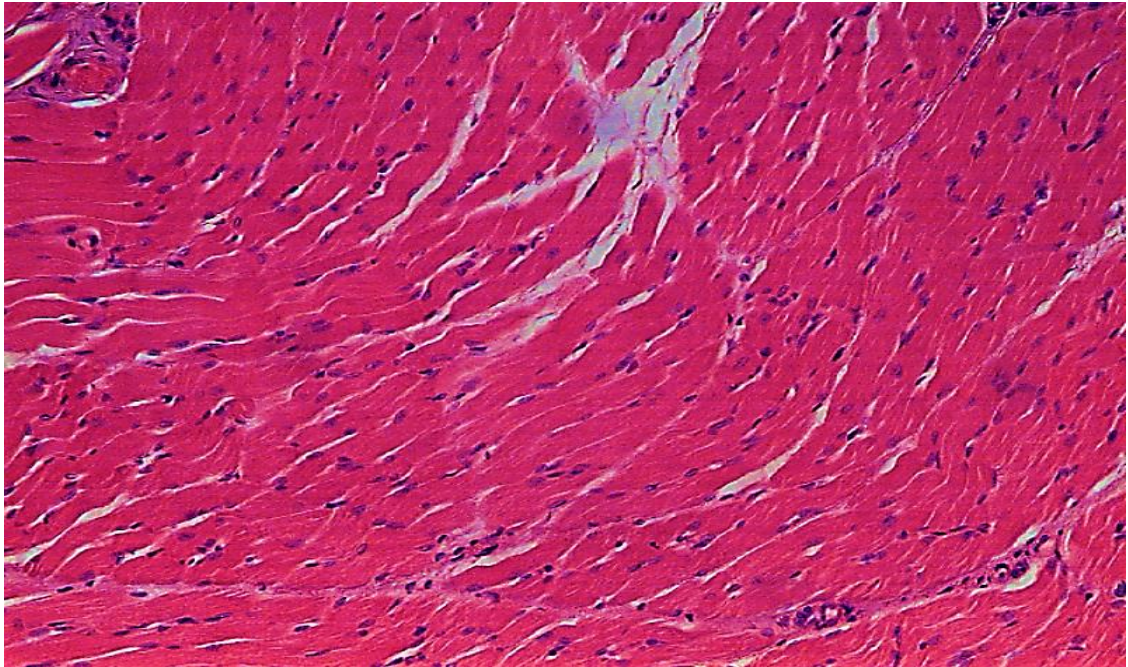
Şekil 4.27. 10 mg/kg/gün PP uygulama grubunda seminal vezikül lümeninde hücre birikimi (➡) bezi çevreleyen fibromusküler stroma miktarında artış (➡), atrofi gösteren veziküller (☆) (H&E, X200)



Şekil 4.28. 250 mg/kg/gün PP uygulama grubunda seminal vezikülde hiyalinozis (➡) ve anastomozlaşma (➡) (H&E, X200)



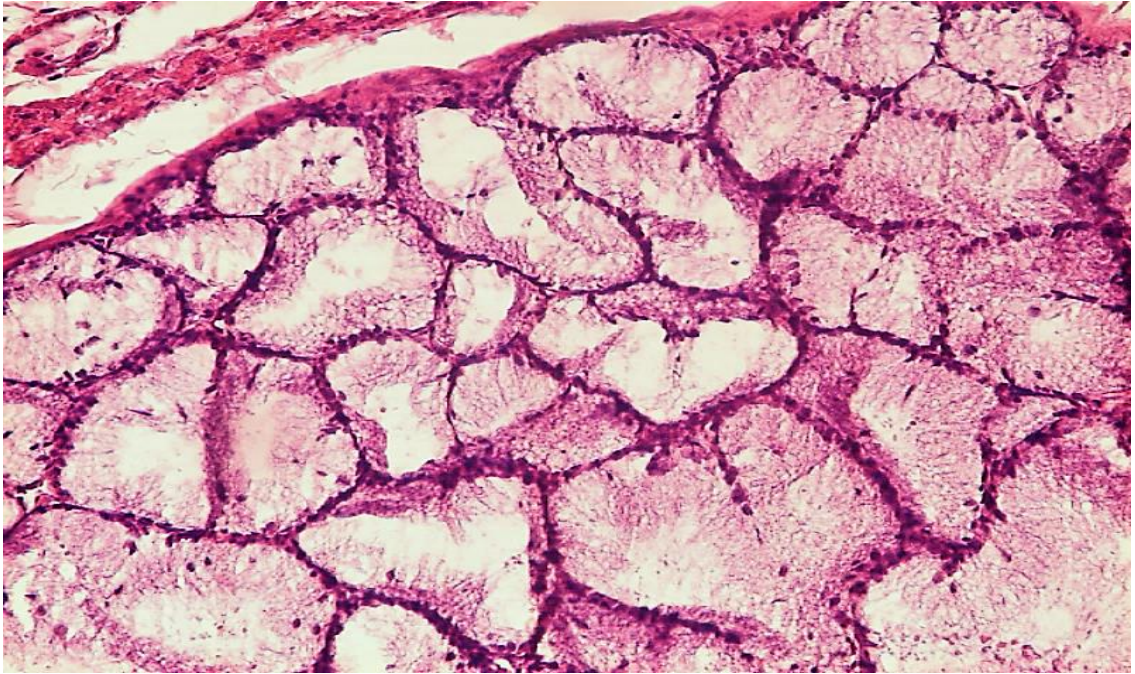
Şekil 4.29. 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda seminal vezikülde görülen hiyalinozis (➡), vezikül lümeninde hücre birikimi (➡), anastomozlaşma (➡) (H&E, X200)



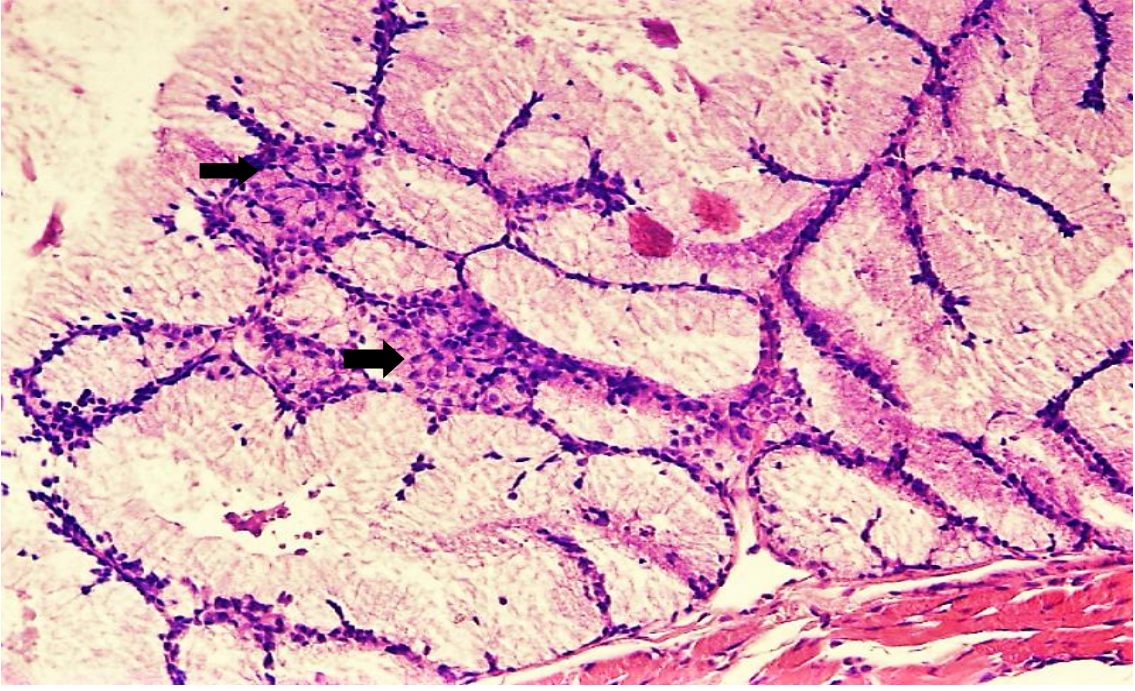
Şekil 4.30. Yağ kontrol grubunda LABC'nin genel görüntüsü (H&E, X200)



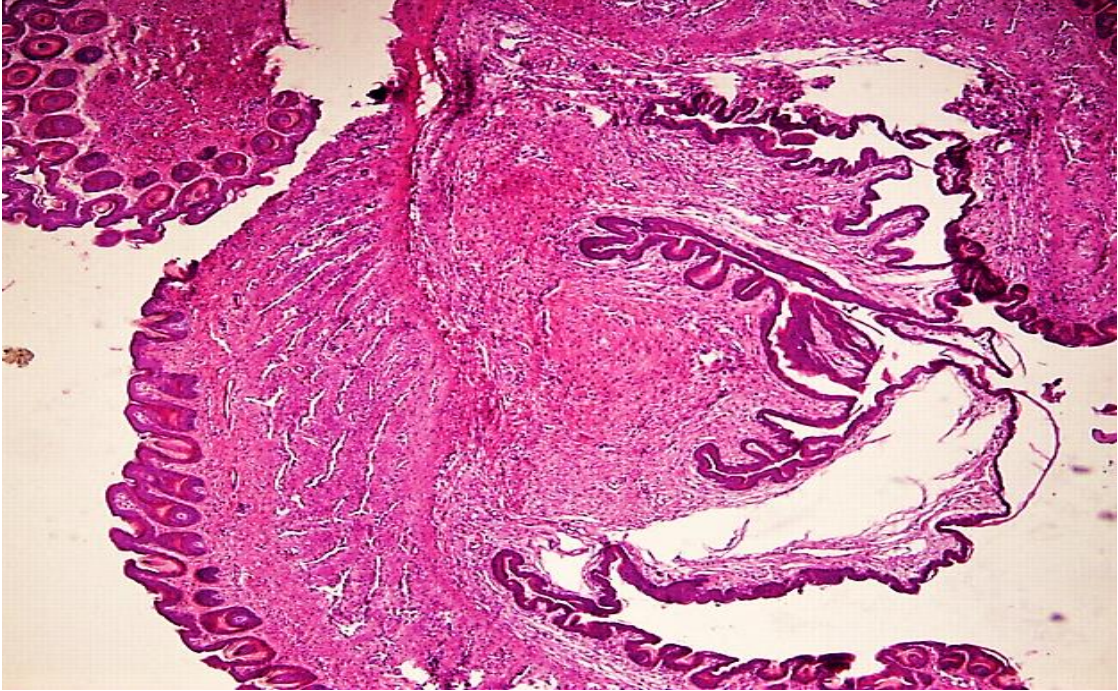
Şekil 4.31. 750 mg/kg/gün PP uygulama grubunda LABC’de kas fibrillerinin ayrılması (➔) (H&E, X200)



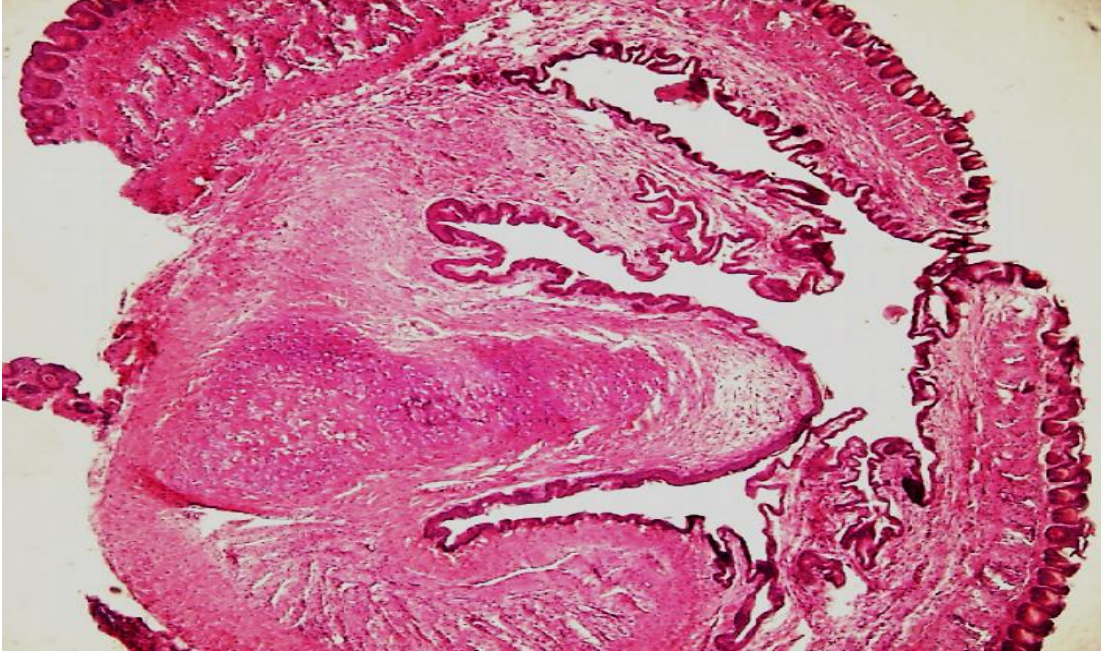
Şekil 4.32. Yağ kontrol grubunda Cowper bezinin genel histolojik görüntüsü (H&E, X200)



Şekil 4.33. 250 mg/kg/gün PP doz grubunda Cowper bezinde bazal hücrelerde görülen hipertorfi (➡) (H&E, X200)



Şekil 4.34. Yağ kontrol grubunda Glans penisin genel histolojik görüntüsü (H&E, X100)



Şekil 4.35. 750 mg/kg/gün PP doz grubunda Glans penisin görüntüsü (H&E, X100)

Çizelge 4.4. Deney gruplarına ait erkek sıçanların androjenik dokularda tespit edilen histopatolojik bulguların görülme sıklıkları

	Yağ Kontrol	Negatif Kontrol (TP)	Pozitif Kontrol (FLU)	PP 10 mg/kg/gün	PP 250 mg/kg/gün	PP 750 mg/kg/gün
<u>Ventral prostat</u>						
Konjesyon	1/6	5/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Hiperplazik polip oluşumu	0/6	6/6	0/6	3/6	1/6	1/6
Epitelde değişiklik	0/6	6/6	5/6	1/6	4/6	4/6
Tübüler atrofi	0/6	0/6	6/6	1/6	5/6	6/6
Lümeninde hücre toplanması	0/6	0/6	5/6	1/6	3/6	6/6
<u>Seminal vezikül</u>						
Konjesyon	1/6	6/6	6/6	5/6	6/6	6/6
Hyalinizasyon	0/6	0/6	6/6	1/6	6/6	6/6
Fibromusküler stroma miktarında artış	0/6	6/6	0/6	5/6	1/6	1/6
Hiperplazik nodül oluşumu	0/6	6/6	1/6	2/6	1/6	1/6
Atrofik vezikül	0/6	0/6	6/6	3/6	3/6	5/6
Lümeninde hücre toplanması	0/6	0/6	2/6	3/6	3/6	6/6
Anastomoz	0/6	1/6	3/6	1/6	4/6	5/6
<u>LABC</u>						
Kas fibrillerinde kopma	0/6	1/6	6/6	0/6	3/6	6/6
<u>Cowper bezi</u>						
Hipertrofik bazal hücreler	0/6	1/6	5/6	1/6	3/6	5/6

*Değerler değişiklik gözlenen sıçan sayısı/grupta bulunan toplam incelenen sıçan sayısı şeklinde verilmiştir.

Çizelge 4.5. Deney gruplarına ait erkek sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında tespit edilen histopatolojik bulguların görülme sıklıkları

	Yağ Kontrol	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	PP 10 mg/kg/gün	PP 250 mg/kg/gün	PP 750 mg/kg/gün
<u>Karaciğer</u>						
Sinüzoidal dejenerasyon	1/6	3/6	6/6	5/6	5/6	6/6
Konjesyon	1/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Mononükleer hücre infiltrasyonu	0/6	2/6	4/6	5/6	5/6	5/6
Kupffer hücre sayısında artış	0/6	2/6	3/6	2/6	4/6	6/6
Hüresel dejenerasyon	0/6	2/6	4/6	5/6	5/6	6/6
<u>Böbrek</u>						
Glomerulus dejenerasyonu	0/6	2/6	4/6	4/6	4/6	6/6
Tübüler dejenerasyon	1/6	2/6	5/6	4/6	4/6	6/6
Konjesyon	1/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Ödem	0/6	0/6	5/6	0/6	0/6	0/6
Lümen hücre atılması	0/6	0/6	6/6	2/6	2/6	6/6
Hüresel dejenerasyon	0/6	6/6	4/6	3/6	3/6	4/6

*Değerler değişiklik gözlenen sıçan sayısı/grupta bulunan toplam incelenen sıçan sayısı şeklinde verilmiştir.

4.3. Hormon Analiz Sonuçları

Deneyin sonunda sıçanlardan alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda FSH ve LH hormon seviyelerine bakılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.6. da gösterilmiştir. FSH ve LH değerleri en az negatif kontrol grubunda seyredilirken, en fazla FSH, LH değerleri pozitif kontrol grubunda tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Kontrol ve uygulama gruplarına ait FSH ve LH hormonu değerleri

mlU/L	Yağ Kontrol	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	Propil paraben (10mg/kg/gün)	Propil paraben (250 mg/kg/gün)	Propil paraben (750 mg/kg/gün)
LH	0,357±0,02 ^c	0,240±0,04 ^{c,d,e,f}	0,584±0,09 ^{a,b}	0,447±0,10 ^b	0,459±0,12 ^b	0,503±0,07 ^b
FSH	0,550±0,29 ^{b,d,e}	0,450±0,05 ^{a,c}	0,612±0,04 ^{b,d,e,f}	0,448±0,05 ^{a,c}	0,463±0,02 ^{a,c}	0,482±0,01 ^c

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Yağ kontrol grubundan farklı,

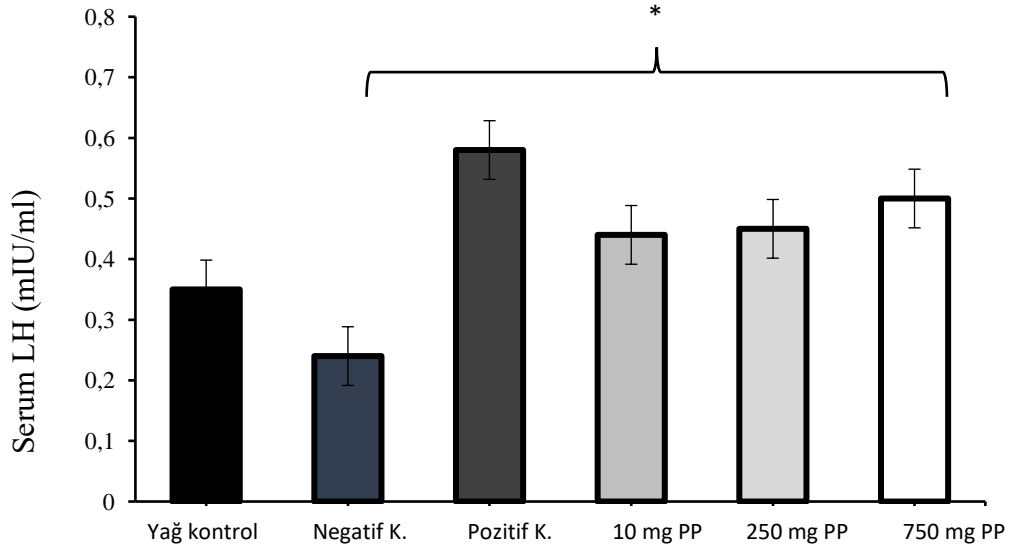
^b Negatif kontrol grubundan farklı,

^c Pozitif kontrol grubundan farklı,

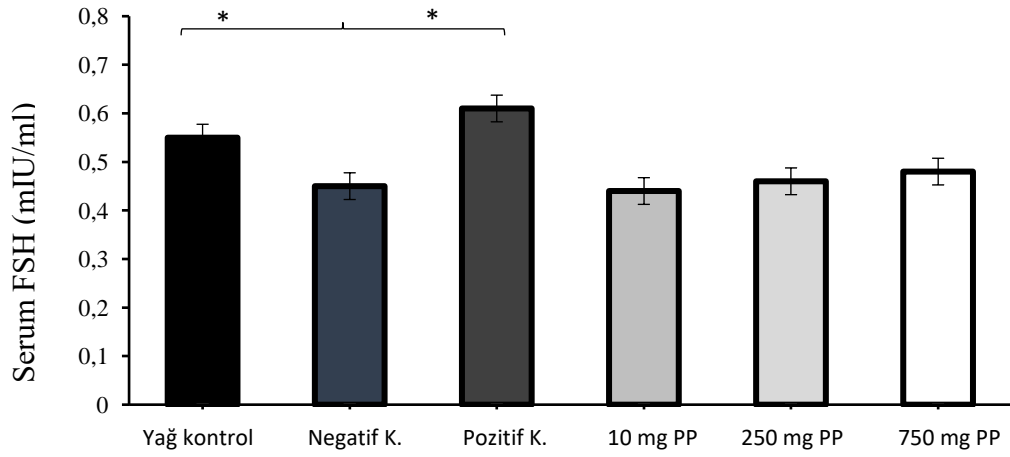
^d 10 mg/kg/gün doz grubundan farklı,

^e 250 mg/kg/gün doz grubundan farklı

^f 750 mg/kg/gün doz grubundan farklı (p≤0,05).



Şekil 4.36. Kısırlaştırılmış erkek sıçanlardan alınan serum örneklerinde LH değerleri * $p \leq 0.05$, negatif kontrol grubundan farklı



Şekil 4.37. Kısırlaştırılmış erkek sıçanlardan alınan serum örneklerinde FSH değerleri * $p \leq 0.05$, negatif kontrol grubundan farklı

4.4. Tam Kan Analizi Sonuçları

Diseksiyon sonrası sıçanların kalbinden alınan kanda yapılan tam kan analizlerinden elde edilen değerler Çizelge 4.7.'de verilmiştir. Hemogram değerleri karşılaştırmalı analizi sonucu beyaz kan hücresi (WBC) değerlerinde, yağ kontrol grubuna göre artış olarak farklılık gösteren sadece 250 mg/kg/gün propil paraben doz grubu olmuştur. Lenfosit (Lym%) değerleri pozitif kontrol ve 250-750 mg/kg/gün propil paraben grubunda yağ kontrole göre monosit artış gösterirken, negatif kontrol grubu azalma göstermiştir. Monosit (Mon %) değerlerinde yağ kontrol grubuna göre negatif kontrol grubu hariç tüm gruplar azalma göstermiştir. Kırmızı kan hücresi (RBC) ve hematokrit (Hct) değerleri için sadece negatif ve pozitif kontrol grupları değerlerde artma olarak farklılık gösterirken, MCV değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. MCHC değerleri yağ kontrol grubuna göre tüm gruplarda artış gösterirken, Hb değerleri farklılığı sadece pozitif kontrol grubunda artış olarak seyredilmiştir. Platelet değerleri pozitif kontrol grubu hariç tüm gruplarda istatistiksel olarak farklı belirlenmiş olup artmıştır.

Çizelge 4.7. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve propil paraben uygulama gruplarına ait sıçanların kan analiz sonuçları

Parametre	Yağ kontrol	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	Propil paraben (10 mg/kg/gün)	Propil paraben (250 mg/kg/gün)	Propil paraben (750 mg/kg/gün)
WBC	3,72±0,81 ^e	3,20±0,81 ^e	4,34±0,48 ^b	4±0,76 ^c	5,85±1,30 ^{a,b,d,f}	3,28±1,37 ^c
Lym%	80,58±7,27 ^{c,d,e,f}	85,07±5,37 ^{c,d,e,f}	68,2±4,9 ^{a,b,d,e,f}	83,10±7,1 ^{a,b,c}	80,98±6,8 ^{a,b,c}	87,11±4,41 ^{a,b,c}
Mon %	5,8±0,36 ^{c,d,e,f}	6,5±0,6 ^{c,d,e,f}	4,6±0,56 ^{a,b,d,e,f}	0,18±0,04 ^{a,b,c}	0,2±0,04 ^{a,b,c}	0,26±0,15 ^{a,b,c}
RBC	6,5±0,4 ^{b,c}	10,6±0,42 ^{a,d,e,f}	9,11±2,14 ^{a,d,e,f}	7,1±0,3 ^{b,c}	7,4±0,5 ^{b,c}	7±0,4 ^{b,c}
MCV	43,3±5,6	34,8±3,2	39,2±6,5	56,6±2,4	54,2±1,1	57±1,2
Hct	38,1±2,6 ^{b,c}	49,6±3,7 ^{a,c,d,e,f}	25,9±3,9 ^{a,b,d,e,f}	40,5±3,5 ^{b,c}	39,4±3,3 ^{b,c}	37,2±3,1 ^{b,c}
MCHC	18,4±0,9 ^{b,c,d,e,f}	40±2,8 ^{a,c,d,f}	31,2±1,3 ^{a,b,d,e}	35,6±0,3 ^{a,b,c}	37±1,5 ^{a,c}	35,1±4,2 ^{a,b}
Hb	13,4±0,8 ^c	14,6±1,6 ^c	10,2±2,3 ^{a,b,d,e,f}	14,6±1,3 ^c	14,2±0,4 ^c	13,9±1,2 ^c
Plt	900±54 ^{b,d,e,f}	933,5±257 ^{a,b,d,e,f}	948±200 ^{b,d,e,f}	963,2±230 ^{a,b,c}	1129±72 ^{a,b,c}	885,8±124,3 ^{a,b,c}

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. ^a Yağ kontrol grubundan farklı, ^b Negatif kontrol grubundan farklı, ^c Pozitif kontrol grubundan farklı, ^d 10 mg/kg/gün doz grubundan farklı, ^e 250 mg/kg/gün doz grubundan farklı, ^f 750 mg/kg/gün doz grubundan farklı (p≤0,05).

5. TARTIŞMA

Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerinde oluşturduğu tehditler ve bu alanda yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar doğrultusunda endokrin bozucu etkilere sahip olduğu ileri sürülen paraben, özellikle şampuan, sa kremi, nemlendirici krem, tonik, deodorant, parfüm, tıraş jeli, güneş koruyucusu ve diş macunu gibi kozmetik ürünlerde, ilaçlarda, hazır gıdalarda; meyve sularında, kahve karışımlarında, kurutulmuş ürünlerde, işlenmiş sebzelerde, pişmiş yiyeceklerde, oyuncaklarda ve ev temizlik malzemelerinde yaygın bir şekilde antimikrobial koruyucu madde olarak kullanılmaktadır [65].

Parabenlerin bilinen östrojenik etkilerinin yanı sıra antiandrojenik etkileri ilk olarak 1989 yılında incelenmeye alınmış ve insandan alınan sperm örneklerinden oluşan *in vitro* deney düzeneğinde yapılan çalışma sonucu 3mg/ml propil parabenin insan spermatozoası için güçlü bir spermisid etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [48]. Bu çalışmayı takiben 2002'de propil parabenin antiandrojenik toksisitesi ile ilgili Oishi ilk ayrıntılı çalışmayı literatüre sunmuştur. Bu çalışmasında; 20 günlük erkek Wistar sıçanlar üzerinde 4 haftalık propil paraben uygulaması gerçekleştirilmiş (10, 100 ve 1000 mg/kg) ve deney sonunda cauda epididimisteki sperm rezervi ve konsantrasyonlarında, testisteki günlük sperm üretiminde ve verimlilikte düşüşlerin olduğunu rapor etmiştir [3]. CHO-K1 hücre hattı ile gerçekleştirilen bir çalışmada ise propil parabenin antiandrojenik etkisinin ortaya çıkmaya başladığı doz değerinin Kabul Edilebilir Günlük Alım (ADI) (10 mg/kg/gün) değerinden daha düşük olduğu belirtilmiştir [66]. Diğer bir çalışmada ise kişisel bakım ürünlerinde bulunan paraben ve diğer fenol içerikli kk moleküllerin antiandrojenik özelliklerine bakılmış, çalışmada 10 μ M değerdeki propil paraben konsantrasyonunun testosteronun transkripsiyonal aktivitesini %33 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir [4]. 2010 yılında 60 sağlıklı erkekten alınan üre örnekleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmada maruziyet etkisine bakılan metil, etil, propil, btil ve benzil parabenin ürede buldukları sıklık sırasıyla: %98, %80, %98, %83 ve %7 olarak seyrederken, sadece metil ve propil paraben serum ve seminal plazma örneklerinde tespit edilmiştir [67]. 2012 yılında İsveç' de yürütülen bir başka çalışmada, propil parabenin günlük sperm üretimindeki değişimleri için bağıl risk karakterizasyon değerinin 1'den fazla çıktığı belirtilmiştir [68].

Tüm bu antiandrojenik etki gözlenen çalışmaların aksine 2013'de Gazin ve arkadaşları 24 günlük erkek Wistar sıçanlara 8 hafta süreyle oral yolla 3, 10, 100 ve 1000 mg/kg/gün dozlarında propil paraben uygulaması gerçekleştirmişlerdir. Oishi'nin çalışmasının aksine bu deney sonucunda üreme organı ağırlıklarında, testiküler spermatid sayısında ve daha önce bakılmamış olan LH, FSH ve testosteron seviyelerinde herhangi keskin bir düşüş gözlenmediği rapor edilmiştir [69].

Bu çalışmada amacımız, propil parabenin literatürde yetersiz olarak belirtilen erkek üreme sistemi üzerindeki araştırmalarına katkı sunmak ve çelişen sonuçlara ışık tutmaktır. Çalışmanın bu konudaki hassasiyetini arttırmak için propil parabenin antiandrojenik etkisinin belirlenmesi amacıyla daha önce yapılmamış olan Hershberger Yöntemi uygulanmıştır. Yöntem gereği uygulanan kısırlaştırma işlemi, erkek üreme sistemindeki testosteron mekanizmasını bloke ederek, dışarıdan sağlanan yapay testosteron replasmanı ile (testosteron propiyonat) deney düzeneği için stabil ve etkili bir zemin oluşturulmuştur. Bu yöntemde yapılan analizlere ek olarak, daha ayrıntılı sonuçlar elde etmek amacıyla yardımcı erkek üreme organlarının histopatolojik analizleri gerçekleştirilmiş olup deneyin bu alanda bilimselliği daha net olarak ortaya çıkartılması amaçlanmıştır.

Hershberger Yöntemi endokrin bozucuların potansiyel androjenik veya antiandrojenik etkilerini ölçmek amacıyla 1953 yılında tasarlanmıştır [70]. Gerekli görülen analizler ve hassas incelemeler adına, 1953'te ilk kez sunulan Hershberger protokolü, erkek üreme sisteminde bulunan androjenik kaslar (LABC) üzerindeki çalışmaları baz almış olup yıllara göre bazı modifikasyonlar geliştirilmiştir. 1960'larda, potansiyel androjen olduğu bilinen 700 maddenin androjenik tayini yapılmış olup son zamanlara doğru aynı tayinin antiandrojenik maddeler için de yapılması öngörülmüştür.

Yöntem gereği 6. haftalık iken kısırlaştırılan erkek sıçanlar 10 günlük uygulama sonucu disekte edilip, seminal vezikül, ventral prostat, LABC, Cowper bezi ve penis ucu dokuları hassasiyetle çıkarılmıştır. Bu yöntemin bilinen en büyük avantajı kısa süreli ve kolay bir gözleme yöntemine dayanmasıdır [71]. Hayvanların 6 haftalık seçilmesinin nedeni ise genç sıçanların olgun sıçanlara göre testosteron geri bildirim mekanizmasına daha hassas olmaları ve 6 hafta olarak belirtilen sürenin erkek sıçanlarda puberte başlangıcına karşılık gelmesi şeklinde belirtilmiştir [72]. Kısırlaştırma sonrası hayvanlara verilen 8 günlük

iyileşme periyodu Hershberger protokolünde 7 ila 11 gün arası olup, bu sürenin koşullara göre seçilebileceğini belirtmektedir [71].

Kabul edilen güncel Hershberger protokolü gereğince kimyasalların uygulanmasında genellikle oral gavaj yöntemi tercih edilmektedir. Çalışmada propil paraben ve flutamid oral gavaj yöntemi ile uygulanmış olup, testosteron propiyonat (TP) subkutanöz enjeksiyon yoluyla hayvana enjekte edilmiştir. Testosteron propiyonatın uygulanması için subkutanöz enjeksiyon yönteminin seçilmesi, testosteron propiyonatın etkinliğinin artırılması ve propiyonatın kısa bir yarı ömre sahip olması gibi nedenlerle seçilmiştir [73].

Çalışmada uygulanan doz miktarının belirlenmesi literatürde yer alan güncel veriler doğrultusunda yapılmıştır. Çizelge 5.1'deki değerler propil parabene ait güncel risk değerlendirme parametrelerini göstermektedir.

Çizelge 5.1. Propil parabenin erkek üreme sistemi üzerine risk değerlendirmesi [33]

ADI (Günlük Kabul Edilebilir Alınım)	0-10 mg/kg/gün
LOAEL (Yan etki gözlenen en düşük seviye)	10 mg/kg/gün
NOAEL (Test edilen en yüksek, hiçbir yan etki gözlenmeyen doz)	1000 mg/kg/gün
LD₅₀ (Deney hayvanlarına belirli koşullarda ve doğrudan uygulanan toksik maddenin, hayvan popülasyonunun %50'sini öldüren doz)	< 2-8 g/kg
Risk karakterizasyon değeri	>1

Etki derecesindeki artışı gözlemek adına, dozlar güncel risk değerlendirme çalışmalarına göre uyarlanmış olup 10, 250, 750 mg/kg/gün propil paraben dozları olarak belirlenmiştir. Ayrıca Hershberger protokolu gereği uygulanan en yüksek değer 1000 mg/kg/gün üst limit değerini aşmamasına özen gösterilmiştir.

10 günlük deney boyunca her gün uygulamadan önce hayvanların vücut ağırlıkları, kafes başına tükettikleri yem ve su miktarları kaydedilmiştir. Deney sürecinde hiçbir ölüm gerçekleşmemiş olup, flutamide bağlı olarak görülen ishal dışında sıçanlarda herhangi bilinmeyen bir fiziksel yan etkiye rastlanmamıştır. Çalışmamızda yağ kontrol, pozitif ve negatif kontrol uygulama gruplarındaki erkek sıçanların başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Propil paraben, FLU ve TP uygulanan grupları yağ kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda vücut ağırlıkları bakımından fark bulunmuştur. Çalışmada günlük vücut ağırlığı ve tüketilen günlük yem-su miktarının 750 mg/kg/gün propil paraben uygulama grubunda en düşük değerlerde seyrederken, TP'ın uygulandığı negatif kontrol grubunda bu değerler en fazla görülen değerler olarak kaydedilmiştir. Bu sonuca göre propil paraben uygulama gruplarında doz artışına bağlı olarak erkek sıçanlarda besin ve su tüketiminin etkilendiği, bu durumun vücut ağırlıklarında ciddi bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Oishi çalışmasında erkek sıçanlara uyguladığı 1000 mg/kg/gün propil paraben dozunda vücut ağırlıklarında azalma meydana geldiğini göstermiştir [3].

Deney sonunda kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların organ ağırlıkları arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol grubunun referans maddesi olan testosteron propiyonat 0,4 mg/kg/gün şeklinde 6 haftalık kısır sıçanlara uygulanmıştır. Testosteron propiyonat uygulamasının Hershberger Yöntemi kapsamında oldukça önemli bir işleve sahip olduğu bilinmektedir. Çalışmanın verimliliği ve deney ortamının stabil hale getirilmesi adına testosteron propiyonatin uygulanması (testosteron replasmanı) kısırlaştırılmış erkek sıçanların azalan endojen testosteron üretimine bir takviye olarak geliştirilmiştir.

Yapay bir androjen olan testosteron propiyonat daha önce yapılan Hershberger çalışmalarında 0,4 mg/kg/gün dozunda erkek üreme sisteminde üremeye yardımcı bezlerde ciddi bir ağırlık artışına neden olmaktadır [74]. Çalışmamızda sadece testosteron propiyonatin uygulandığı negatif kontrol grubunun (0,4 mg/kg/gün TP) diseksiyonu sonucunda elde edilen tüm androjenik dokular diğer gruplara göre en fazla organ ağırlığına sahip grup olarak tespit edilmiştir. Ayrıca serum LH ve FSH değerlerinde diğer gruplara göre ciddi bir düşüş meydana gelmiştir. Gözlenen bu düşüşün testosteron propiyonat replasmanının testosteronun negatif feed-back mekanizmasındaki regülasyonunu bozarak, FSH ve LH salınımını inhibe ettiği bilinmektedir [63].

Negatif kontrol grubunda gözlenen en önemli histopatolojik değişimlerden biri prostat bezi ve seminal vezikülde görülen hiperplazik nodül oluşumudur. Testosteron uygulamasının neden olduğu bu artış 1998'de yapılan bir çalışmada epitel hücre proliferasyonu ile bağdaştırılmaktadır [75]. Buna ek olarak seminal vezikülde fibromusküler stroma miktarında artış gözlenmiştir. Bu sonuç Eero tarafından kısır sıçanlara 30 gün boyunca uygulanan 1 mg/kg/gün testosteron propiyonat dozunun seminal vezikülde stromada artışa neden olması ile uyumluluk gösterdiği belirtilmektedir [76]. Ayrıca başka bir çalışmada erkek üreme sistemi aksesuar bezlerinde stroma miktarındaki artışın tümör gelişimini indüklediği ileri sürülmüştür [77]. Bütün bu bulgular ışığında negatif kontrol grubunun varlığı ve bunun neden olduğu sonuçlar (0,4 mg/kg/gün TP) Hershberger Yönteminin doğruluğunu kanıtlamaktadır.

Flutamid erkek üreme sistemi aksesuar bezlerinde, özellikle prostat ve seminal vezikülde androjen reseptörleri için DHT androjeni ile kompetitif olarak yarışmaktadır [28]. Flutamidin referans antiandrojenik madde olarak oral yolla uygulandığı pozitif kontrol grubunda (3 mg/kg/gün FLU + TP), androjenik doku ağırlıklarında negatif ve yağ kontrol gruplarına göre ciddi düşüşün meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu sonucun flutamidin 3 mg/kg/gün şeklinde uygulanmış androjenik doku ağırlıklarında görülen azalma (Hershberger çalışmaları) ile örtüştüğünü söyleyebiliriz [78].

Flutamidin gonadal steroidlerin negatif feed-back mekanizmasını inhibe ettiği için fazla FSH ve LH salınımına yol açtığı bilinmektedir [63]. Bu bilgi, çalışmamızda pozitif kontrol grubunda gözlenen serum LH ve FSH düzeylerindeki artış ile desteklenmektedir. Antiandrojenik bir madde olduğu bilinen flutamidin yarattığı etkileri gözlemek adına yapılan histopatolojik analizler sonucu seminal vezikül ve ventral prostatın epitel dokusunda atrofi görülmüş olup, seminal vezikülde fibril kaybına bağlı hiyalinizasyon meydana gelmiştir. Antiandrojenik toksisite incelemeleri esnasında seminal vezikül ve prostat bezinde yaygın olarak görülebilen çeşitli veziküler atrofiler dokuda boyut ve ağırlıktaki azalmayla sonuçlanmaktadır. Hiyalinizasyon olarak adlandırılan bulgu hiyalin oluşması yani bir maddenin normal yapısını kaybederek hiyalin haline dönüşmesidir. Elde edilen bu sonuçlar flutamidin 3 mg/kg/gün + testosteron propiyonat şeklinde uygulandığı sıçan çalışmalarında seminal vezikül ve prostatta benzer şekilde antiandrojenik etkiye bağlı atrofinin görüldüğü ve bu konuda yapılan çalışmalarla bulguların desteklendiği belirtilmektedir [79,80].

Flutamid de görülen bu antiandrojenik etkilerin bir benzeri propil parabenin özellikle 250 ve 750 mg/kg/gün doz grubunda karşımıza çıkmaktadır. Bu benzerlik Hershberger yönteminin karşılaştırmalı düzeneğinin ne kadar doğru ve gerekli olduğunu bir kez daha ortaya koymaktadır. Hershberger yöntemini doğrulayan bu bulgular propil paraben ve flutamid ile karşılaştırmalı bir tablo çizmekte, bu sebeple propil parabenin antiandrojenik etkisi hakkında bize detaylı bilgi vermektedir. Hershberger çalışmasının en büyük avantajlarından biri olarak doku ağırlıklarının karşılaştırılması AR-antagonistleri adına araştırmacılara büyük bir kolaylık sağlamaktadır.

Propil parabenin antiandrojenik etkileri kapsamında elde edilen sonuçlar uygulamanın bütün dozlarındaki organ ağırlıklarının sadece mısır yağının verildiği yağ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. Buna karşın testosteron propiyonatin uygulandığı (0,4 mg/kg/gün TP) negatif kontrol grubu sıçanlarda aksesuar bezlerin organ ağırlıklarının en yüksek değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda, testosteron propiyonat ile beraber verilen propil parabenin sadece testosteron propiyonatin uygulandığı negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması yapıldığında propil paraben grubunda organ ağırlıklarında düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre propil parabenin antiandrojenik bir etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Aynı şekilde, protokol gereği karşılaştırılması gereken bir diğer grup olan flutamidin uygulandığı pozitif kontrol grubu ile 250 mg/kg/gün ve 750mg/kg/gün propil paraben doz grupları arasında diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir benzerlik bulunmuş, dozların artışına bağlı olarak antiandrojenik etkide artış gözlenmiştir. Bu da seçilen 3 doz grubunun risk değerlendirmesi açısından uygunluğunu bizlere göstermektedir.

Negatif kontrol grubuna göre propil paraben uygulama gruplarında görülen doku ağırlıklarındaki azalma literatürde bazal membranın dejenerasyonu ve hücre proliferasyonunun azalması ile ilişkilendirilmiştir [81]. Histopatolojik analizler sonucu, 250 ve 750 mg/kg/gün propil paraben doz gruplarının ventral prostat ve seminal vezikül dokularında atrofi ve lümeninde hücreler görülmüş olup, seminal vezikülde anastomozlaşmalar (uçların birleşmesi) meydana gelmiştir. Bu sonuçlar yukarıda bahsedilen flutamid uygulamasının antiandrojenik etkisinin ortaya konulduğu çalışmalarla büyük bir benzerlik göstermektedir [78].

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, antiandrojenik özelliklere sahip olduğu bilinen bir maddenin maruziyeti sonucu LABC kaslarında büyük fibril kopmalarının olduğu görülmüş, bu bulgunun çalışmamızda tespit ettiğimiz LABC hasarları ile histopatolojik olarak benzer olduğu saptanmıştır [82].

Çalışmamızda penis ucu diğer androjenik dokulara göre en az etkinin gözlendiği doku olmuş, gruplar arası herhangi bir histopatolojik farklılık tespit edilememiştir. Bu bilgi ve diğer dokularda gözlenen antagonistlere karşı olan etki ilgileri Çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Androjenik dokuların antagonist cevaba verdikleri etki yüzdeleri [5]

Androjenik cevap veren doku adı	Antiandrojenik etki yüzdesi
Seminal vezikül	40%
Ventral prostat	40%
LABC	20%
Penis ucu	17%
Cowper bezi	35%

Androjenik dokulara ek olarak incelenen karaciğer ve böbrek dokuları çalışma düzeneğinin hassasiyetini büyük ölçüde arttırmaktadır. Flutamid ve 250-750 mg/kg/gün propil paraben uygulamasında görülen sinüzoidal genişleme, mononükleer hücre infiltrasyonu, minimal konjesyonlar ve Kupffer hücre sayısının artması karaciğer dokusu için birtakım komplikasyonları işaret etmektedir. Bu komplikasyonlar genelde Kupffer hücrelerinin artışına bağlı olarak oluşabilecek toksisitenin derecesi konusunda fikir vermektedir. Kupffer hücre aktivasyonları genellikle organ veya doku harabiyetine bağlı olarak savunma mekanizmasının aktivasyonundaki artışı göstermektedir [83]. Propil parabenin karaciğer üzerindeki benzer etkilerini kapsayan çalışmalardan biri, HepG2 karaciğer hücre hattı üzerinde 4,6 ng/ml dozunda propil parabenin uygulandığı çalışmadır. Bu çalışmada, doz miktarına bağlı olarak karaciğer hücrelerinde atrofi, nekroz ve vücudun antioksidan mekanizmasında ciddi bozukluklara yol açan superoksit anyon sentezinin gerçekleştiği belirtilmiştir [84].

Çalışmamızda böbrek dokuları toksik etkinin en az ortaya çıktığı doku olarak tespit edilmiş olup, böbrek organ ağırlıkları gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p < 0.05$). Buna karşın, detaylı histopatolojik incelemeler sonucunda, 250 ve 750 mg/kg/gün propil paraben uygulanan doz gruplarında oluşan glomerüller, tübüler dejenerasyon ve lümende toplanmış hücreler patolojik birer bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Hematolojik incelemelerde, lökosit, lenfosit, monosit, eritrosit, MCV, hematokrit, MCH, MCHC, hemoglobin ve trombosit gibi önemli parametreler istatistiksel olarak yorumlanmıştır. Eritrositlerde bulunan hemoglobin molekülü dokulara oksijen sağlamaktadır. Vücutta oluşan solunum işlevi bozukluklarında kandaki düşük oksijen değerlerini kompanse etmek için kırmızı kan hücreleri hemoglobin üretimini artırır. Çalışmada eritrosit ve hematokrit değerleri negatif ve pozitif kontrol gruplarında artış göstermektedir. MCV değerleri ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, MCHC değerleri yağ kontrol grubuna göre tüm gruplarda artış göstermiştir. Hemoglobin değerleri ise sadece pozitif kontrol grubunda artış göstermiştir. Herhangi olası bir enfeksiyon durumunda artan ve vücut savunmasında görev alan lökosit, lenfosit ve monosit değerleri incelendiğinde, lenfosit değerleri pozitif kontrol ve 250-750 mg/kg/gün propil paraben grubunda yağ kontrole göre artış gösterirken, negatif kontrol grubunda azalma gösterdiği saptanmıştır. Monosit değerleri yine aynı şekilde yağ kontrol grubuna göre tüm gruplarda azalma göstermiştir. 250 mg/kg/gün propil paraben doz grubundaki lökosit değerleri ise yağ kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Karaciğer dokusunda görülen mononükleer hücre infiltrasyonları kandaki monosit değerlerini azalma yönünde etkilemiş olabilir. Ayrıca platelet değerleri pozitif kontrol grubu hariç diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak artış göstermiştir.

Üç yaş ve altı çocuklar için geliştirilen ürünler hariç, diğer ürünlerde hiçbir yasaklamanın bulunmadığı ve ürünlerdeki katkı oranının en fazla %0,4 olması gerektiği kabul edilen propil parabenin [60] antiandrojenik etkileri bu çalışma kapsamında detaylı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar konuyla ilgili daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile örtüşmekte ve anlamlı bulunmaktadır. Bununla birlikte çalışmamız, propil parabenin risk değerlendirmesinin yapıldığı Gazin'in çalışmasından elde edilen bulgular ile örtüşmemektedir [69]. Gazin, çalışmasında erkek Wistar sıçanlar üzerinde (PND 31) 3, 10, 100, ve 1000 mg/kg/gün dozlarındaki propil parabeni oral yolla 8 hafta

boyunca uygulamıştır. Çalışma sonucunda propil parabene ait hiçbir antiandrojenik etkinin ortaya çıkmadığını belirtmiştir. Propil parabenin kullanan üreticiler tarafından zararsız olduğu ileri sürülen yaygın görüşe rağmen, literatürdeki eksikliklerin ve çelişkilerin giderilmesini hedeflediğimiz deney düzeneğimizde, çalışmanın özgün değerini oluşturan kısırlaştırma işlemi, incelenecek parametreler için daha net sonuçlara olanak vermektedir. Gazin'in çalışmasında sadece testis ve epididimis üzerindeki histopatolojik etkilere bakılmış olup, çalışmamızda 5 androjenik yardımcı erkek üreme sistemi dokusu ile karaciğer ve böbrek dokularının incelemeleri gerçekleştirilmiştir.

Elde ettiğimiz bulgular propil parabenin antiandrojenik etkilerini inceleyen çalışmalarını destekleyici nitelikte olup, literatüre bu konuda büyük bir ışık tutmaktadır.

Son yıllarda propil parabenin antiandrojenik etkilerinin bu denli detaylı olarak incelendiği bir çalışmanın bulunmaması, bu deneyden elde edilen sonuçların önemini büyük ölçüde geçerli kılmaktadır. Buna ilave olarak, çalışma birçok ürün aracılığıyla maruz kaldığımız propil parabenin endüstrideki kullanımının tekrar gözden geçirilmesi gerektiğini şiddetle savunmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Nguyen, T., Clare, B., Guo, W., Martinac B., The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli.*, *Eur Biophys J.*, 34, 389–395, **2005**.
- [2] Neves, A.R., Schäfer, S., Phillips, A., Canejoc, J. ve Macedo, M.F., Antifungal Effect of Different Methyl and Propyl Paraben Mixtures on the Treatment of Paper Biodeterioration, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 267-272, **2008**.
- [3] Oishi, S., Effects of propyl paraben on the male reproductive system, *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1807–1813, **2002**.
- [4] Chen J., Ahn, K.C., Gee, N.A., Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221, 278–284, **2007**.
- [5] U.S. EPA, Endocrine disruptor screening program test guidelines OPPTS 890.1400: Hershberger Bioassay, EPA 740-C-09-008, Washington DC, **2009**.
- [6] Ross, M. H., Pawlina, W., *Histology: A text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, **2006**.
- [7] Kierszenbaum, A.L., Tyrosine protein kinases and spermatogenesis: truncation matters, *Molecular Reproduction and Development*, 73, 4, 399–403, **2006**.
- [8] Froesch, B., Takayama, S., BAG-1L Protein Enhances Androgen Receptor Function, *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 11660-11666, **1998**.
- [9] Palacios, A., Campfield, L.A., McClure, R.D., Steiner, B., Swerdloff, R.S., Effect of testosterone enanthate on hematopoiesis in normal men, *Fertil Steril.*, 40(1), 100-4, **1983**.
- [10] Turner, R.T., Differential effects of androgens on cortical bone histomorphometry in gonadectomized male and female rats, 8, 4, 612–617, **1990**.

- [11] Nishizawa, H., Shimomura, I., Androgens Decrease Plasma Adiponectin, an Insulin-Sensitizing Adipocyte-Derived Protein, *Diabetes*, 51(9), 2734-2741, **2002**.
- [12] Ronde, W., Jong, F., Aromatase inhibitors in men: effects and therapeutic options, *Reprod Biol Endocrinol.*, 9, 93, **2011**.
- [13] Alesci, S., Koch, C., Adrenal Androgens Regulation and Adrenopause, *Endocrine Regulations*, 35, 95-100, **2001**.
- [14] McEwan, I., Brinkmann, A., *Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders*, South Dartmouth (MA), **2000**.
- [15] Wickham, L.A., Gao J., Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye, *Acta Ophthalmol Scand.*, 78(2), 146-53, **2000**.
- [16] Hoberman, J.M., Yesalis, C.E., The history of synthetic testosterone, *Scientific American*, 272, (2), 76–81, **1995**.
- [17] PubChem, Open Chemistry Database, Compound Summary for CID 5995, **2017**
- [18] Bhasin, S., Effects of Testosterone Administration on Fat Distribution, Insulin Sensitivity and Atherosclerosis Progression, *Clinical Infectious Diseases*, 37(2), 142–9, **2003**.
- [19] Berrevoets, C.A., Umar A., Antiandrogens: selective androgen receptor modulators, *Mol. Cell Endocrinol.*, 30, 198, 97-103, **2002**.
- [20] Anderson, J., The role of antiandrogen monotherapy in the treatment of prostate cancer, *BJU Int.*, 91(5), 455-61, **2003**
- [21] Tammela, T., Endocrine treatment of prostate cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 92(4), 287-95, **2004**.
- [22] Singh, S.M., Gauthier, S., Labrie F., Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships, *Curr Med. Chem.*, 7(2), 211-47, **2000**.

- [23] Sciarra, F., Toscano, U., Concoliao, Q., Di Silverio, F., Antiandrogen Clinical applications, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 37, 349 – 354, **1990**.
- [24] Soloway, M.S., Chodak, G., Vogelzang, N.J., Zoladex versus orchiectomy in treatment of advanced prostate cancer: a randomized Trial, *Urology*, 37, 46–51, **1991**.
- [25] Tindall, D., French, J., Nayfeh, F.S., Estradiol-17 β inhibition of androgen uptake, metabolism and binding in epididymis of adult male rats in vivo: A comparison with cyproterone acetate, *Steroids*, 37, 257-257, **1981**.
- [26] Sawaya, M., Shalita, A.R., Androgen receptor polymorphisms in androgenetic alopecia, hirsutism and acne. *J Cutan Med Surg.*, 3, 9–15, **1998**.
- [27] PubChem, Open Chemistry Database, Compound Summary for CID 3397, **2017**.
- [28] Gulley, J.L., A randomized phase II study of flutamide with or without PSA-TRICOM in nonmetastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC), *J. Clin. Oncol.* 29, 7, 163, **2011**.
- [29] Wirth, M., Tyrrell, C., Delaere, K., Sanchez–Chapado, M., Ramon, J., Wallace, D.M., Bicalutamide (Casodex) 150 Mg plus standard care in early non-metastatic prostate cancer: Results from early prostate cancer trial 24 at a median 7 years' follow-up. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 10, 87–93, **2007**.
- [30] Neal, D.E., *Tumours in Urology*, Springer Science & Business Media, 233, **1994**.
- [31] Kojima, M., Hosoda, H., Clinical endocrinology and metabolism. Ghrelin, a novel growth-hormone-releasing and appetite-stimulating peptide from stomach, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 18(4), 517-30, **2004**.
- [32] Lintelmann, J., Katayama, A., Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 75(5), 631-681, **2003**.
- [33] Boberg, J., Taxvig C., Christiansen S., Hass U., Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites, *Reproductive Toxicology*, 30, 301–312, **2010**.

[34] Elder, D.P, Crowley, P.J., Antimicrobial Preservatives Part Two: Choosing a Preservative, *American Pharmaceutical Review*, **2012**.

[35] Allison, L., Parabens: A Review of Epidemiology, Structure, Allergenicity, and Hormonal Properties, *Dermatitis*. 16, 2, 57-66, **2005**.

[36] Greige, H., Kaissi, R., Magdalou, J., Reviewing the binding of a series of parabens to human serum albumin, 34, 3, 186–194, **2013**.

[37] Ozaki H., Sugihara K., Comparative study of the hydrolytic metabolism of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl-, heptyl- and dodecylparaben by microsomes of various rat and human tissues, *Xenobiotica*, 43, 12, 1064-1072, **2013**.

[38] Ali, Z., Ahmad, V. U., Zahid, M., & Tareen, R. B., Benzoic acid derivatives from *Stocksia brahuica*. *Phytochemistry*, 48(7), 1271-1273, **1998**.

[39] Eriksson, E., Andersen, H.E., Substance flow analysis of parabens in Denmark complemented with a survey of presence and frequency in various commodities, *J. Hazard Mater.*, 15, 156(1-3), 240-59, **2008**.

[40] Matthews, C., p-Hydroxybenzoic Acid Esters as Preservatives II.:Acute and Chronic Toxicity in Dogs, Rats, and Mice, *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*, Volume 45, 4, 260-267, **1956**.

[41] Hirose, M., The role of antioxidants in chemical carcinogenesis, *Jpn. J. Cancer Res.*, 78, 1011-1026, **1987**.

[42] Martín P., Peropadre A., Herrero O., Fernández Freire P., Labrador V., Hazen M.J., Oxidative DNA damage contributes to the toxic activity of propylparaben in mammalian cells, *Mutation Research*, 702(1), 86-91, **2010**.

- [43] Aubert, N., Ameller, T., Legrand, J., Systemic exposure to parabens: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration, *Food and Chemical Toxicology*, 50, 445–454, **2012**.
- [44] Lemini, C., Jaimez, R., Avila, M.E., Franco, Y., Larrea, F., Lemus, A.E., In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens, *Toxicology and Health*, 19, 69–79, **2013**.
- [45] Thuy, T.B., Kyung-Chul, C., Eui-Bae J., Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model, *Reproductive Toxicology*, 29, 306–316, **2010**.
- [46] Ashtarinezhad, A., Matin, B., Farshad, H. Shirazi, Parabens Effects on Estrogenic Receptors of C13 Cell Line, *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9 (3), 29- 36, **2013**.
- [47] Zhang, Z., Sun, L., Hu, Y., Jiao, J. ve Hu, J., Inverse antagonist activities of parabens on human oestrogen-related receptor γ (ERR γ): in vitro and in silico studies, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270,16–22, **2013**.
- [48] Song, B.L., Li, H.Y., Peng, D.R., In vitro spermicidal activity of parabens against human spermatozoa, *Contraception*, 39, 331–335, **1989**.
- [49] Song, B.L., Peng, D.R., Li, H.Y., Zhang, G.H., Zhang, J., Li, K.L., Evaluation of the effect of butyl p-hydroxybenzoate on the proteolytic activity and membrane function of human spermatozoa, *Jornal of Reproductive Fertil*, 91(2), 435–440, **1991**.
- [50] Meeker, J.D., Yang, T., Ye, X., Urinary Concentrations of Parabens and Serum Hormone Levels, Semen Quality Parameters, and Sperm DNA Damage, *Environmental Health Perspectives*, doi: 10.1289/ehp.1002238, **2010**.
- [51] Alam, M.S., Kurohmaru, M., Disruption of Sertoli cell vimentin filaments in prepubertal rats: an acute effect of butylparaben in vivo and in vitro, *Acta Histochemica*, 116(5),682-7, **2014**.

[52] Berenbaum, M.C., Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. A critical review, *Clin Exp Immunology*, 28(1), 1–18, **1977**.

[53] Nakgawa, Y., Moldeus, P., Mechanism of *p*-Hydroxybenzoate Ester-induced Mitochondrial Dysfunction and Cytotoxicity in Isolated Rat Hepatocytes, *Biochemical Pharmacology*, Volume 55, Issue, 11, 1907–1914, **1998**.

[54] Rasmussen, S.W., The meiotic prophase in *Bombyx mori* females analyzed by three-dimensional reconstructions of synaptonemal complexes, *Chromosoma (Berl.)* 54, 245–293, **1976**.

[55] PubChem, Ope Chemistry Database, Compound Summary for CID 7175, **2017**.

[56] Albero, B., Pérez, R.A., Sánchez-Brunete, C., Tadeo, J.L., Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain), *Journal of Hazard Mater*, 239–240, 48–55, **2012**.

[57] Furr, J.R. ve A.D. Russell, Some factors influencing the activity of esters of *p*-hydroxybenzoic acid against *Serratia marcescens*. *Microbios* 5, 189-198, **1972**.

[58] Hamilton, J.T., Zhou, Y., Gelb, A.W., Paraben preservatives but not succinylcholine are cerebral vasodilators in vitro, *Anesthesiology*. 73(6), 1252-7, **1990**.

[59] Kozarewicz P., Preservatives, are they safe?, European Medicines Agency, **2010**.

[60] Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). Clarification on Opinion SCCS/1348/10 in the light of the Danish clause of safeguard banning the use of parabens in cosmetic products intended for children under three years of age, **2011**.

[61] Berne, R.M., Levy, M.N., Koeppen, B.M., Stanton, B.A., Fizioloji, (çev: Türk Fiziyojik Bilimler Derneği), Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, **2008**.

[62] Anonim, Rat's Internal Systems, <http://www.tutorvista.com/content/biology-php>, **2017**.

[63] Tunçel, N., Aydın, S., Zeytinoğlu, M., İnsan Anatomisi ve Fiziyojisi, Açıköğretim Fakültesi Yayını no:702, Eskişehir, **2006**.

[64] The Editors of Encyclopædia Britannica, Bulbourethral gland, Encyclopaedia Britannica, **2017**.

[65] Jackson, E.M., Moisturizers of today, Journal of Toxicol-Cutaneous and Ocular Toxicology, 11,173–184, **1992**.

[66] Satoh, K., Nonaka, R., Ohyama, K., Androgenic and Antiandrogenic Effects of Alkylphenols and Parabens Assessed Using the Reporter Gene Assay with Stably Transfected CHO-K1 Cells, Journal of Health Science, 51, (5), 557-568, **2005**.

[67] Frederiksen, H., Jørgensen, N., Andersson A.M., Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology, 21, 262–71, **2011**.

[68] Purdel, C.N., Hanberg, A., Risk Assessment of parabens in child care products, Toxicology Letter, 211, **2012**.

[69] Gazin, V., Marsden, E., Marguerite, F., Oral Propylparaben Administration to Juvenile Male Wistar Rats Did Not Induce Toxicity in Reproductive Organs, Toxicological Science, doi:10.1093/toxsci/kft211, **2013**.

- [70] Hershberger, L., Shipley, E., Meyer, R., Mycotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine*. 83, 175-180, **1953**.
- [71] Gray, L. E., Endocrine Screening Methods Workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms, *Reprod. Toxicol.*, 11,719-750, **1997**.
- [72] Nazian, S.J. & Mahesh, V.B., Pituitary sensitivity to LH-RH in hyperprolactinaemia induced by perphanezine and renal pituitary transplants in female rats, *Biol. Reprod.*, 22, 486-487, **1980**.
- [73] Howell, CR., The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman GE, Kubicek CP, eds. *Trichoderma and Gliocladium*, 2, 173–184, **1998**.
- [74] Carol, S.S., Kristie, D.V., Nancy, M.K., GLP-compliant evaluation and standardization of the peripubertal castrate male rat Hershberger assay for oral exposure of test agents, *Reproductive Toxicology*, 35, 108– 116, **2013**.
- [75] Franck-Lissbrant, I., Haggstrom, S., Damber, J.E., Bergh, A., Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats, *Endocrinology*, 139, 451–456, **1998**.
- [76] Eero, H., Timo, H., Heikki, J.H., Testosterone Action on the Ventral Prostate Lobe of the Castrated Rat as Assessed with a Stereo-logic Morphometric Method, *Am. J. of Anat.* 165, 199-20, **1982**.
- [77] Yang, F., Chen, Y., Shen, T., Guo, D., Stromal TGF- β signaling induces AR activation in prostate cancer *Oncotarget.*, 5(21), 10854–10869, **2014**.
- [78] Freyberger, A., Hartman, E., Krötlinger, F., Evaluation of the Rodent Hershberger Bioassay Using Three Reference (Anti)Androgens, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 56, 131-139, **2005**.

[79] Ashby, et.al, Removal of AMPA receptors (AMPA receptors) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs, *J Neurosci.*, 24(22), 5172-6, **2004**.

[80] Tinwell, H., Santini, C., Evaluation of the Antiandrogenic Effects of Flutamide, DDE, and Linuron in the Weanling Rat Assay Using Organ Weight, Histopathological, and Proteomic Approaches, *Toxicological Sciences* 100(1), 54–65, **2007**.

[81] Srinivasan, N., Micheal, M., Govindarajulu, P., Sex steroid induced changes in collagen of the prostate gland and seminal vesicle of rats. *J. Androl.*, 7, 55-58, **1986**.

[82] Cristina, R.T., Hangau, F., Brezovan, D., Cytoarchitecture of steroid dependent target tissues after testosterone administration compared to nandrolone decanoate in castrated rats in the aim of Hershberger biotest. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, 55, 3,1143–1148, **2014**.

[83] Nakagawa, Y., Moldéus, P., Mechanism of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes, *Biochemical Pharmacology*, 55,1907–14, **1998**.

[84] Szelağ, S., Zabłocka, A., Trzeciak, K., Propylparaben-induced disruption of energy metabolism in human HepG2 cell line leads to increased synthesis of superoxide anions and apoptosis, *Toxicology in Vitro*, 31, 30–34, **2016**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Ecem Özdemir

Doğum Yeri : Denizli

Medeni Hâli : Bekar

E-posta : ecemdemiroz06@gmail.com

Adresi : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı

Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek lisans: Hacettepe Üniversitesi Zooloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : C1- IELTS Ortalama puan:6 (ileri)

Almanca : B2.2- TestDaf Ortalama puan:3 (ileri)

İş Deneyimi

2016- Pan Biyoteknoloji Organik atık geri dönüşümü- Arge elemanı

2015- DOKU Biyoteknoloji Rejeneratif cilt bakım ürünleri, Kök hücre terapileri,
Rekombinant protein içerikli ürünler- ARGE elemanı

Deneyim Alanları

Toksikoloji, histoloji, kozmetoloji

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi (-)

Tezden Üretilmiş Yayınlar (-)

Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

7. Kozmetik Üretimi, Kimyası ve Standardizasyonu Kongresi -2017 Antalya -Türkiye

3. Uluslararası Mühendislik ve Doğa Bilimleri Konferansı – 2017 (ICENS) - Budapeste-Macaristan

Kazanılan Ödüller

7. Kozmetik Üretimi, Kimyası ve Standardizasyonu Kongresi Akademik Poster Sunumu Birincilik Ödülü



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 05/07/2017

Tez Başlığı / Konusu: PROPİL PARABENİN OLGUNLAŞMAMIŞ ERKEK SIÇANLARDAKİ ANTIANDROJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 67 sayfalık kısmına ilişkin, 05/07/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: ECEM ÖZDEMİR
Öğrenci No: N13221929
Anabilim Dalı: BİYOLOJİ
Programı: ZOOLOJİ
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

05.07.2017

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Nurhayat Barlas

(Unvan, Ad Soyad, İmza)