

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDOKRİN BOZUCU BİLEŞİKLERİN
SIĞIR LUTEAL HÜCRE KÜLTÜRÜNDEKİ PROGESTERON
SENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ruhi KABAKÇI

**FİZYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT**

2017 – KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDOKRİN BOZUCU BİLEŞİKLERİN
SIĞIR LUTEAL HÜCRE KÜLTÜRÜNDEKİ PROGESTERON
SENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ruhi KABAĞÇI

**FİZYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT

**Bu tez projesi Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: 2015/129**

2017 – KIRIKKALE

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/04/2017

Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nesrin SULU
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Prof. Dr. Emel ERGÜN
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Prof. Dr. Hakan KALENDER
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Doç. Dr. Miyase ÇINAR
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	V
ŞEKİLLER.....	VIII
ÇİZELGELER.....	IX
ÖZET.....	X
SUMMARY.....	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. İneklerde Ovaryum Fizyolojisi	1
1.1.1.Ovaryum Üzerine Etkili Hormonlar.....	1
1.1.2.Östrus Siklusu ve Dönemleri	3
1.1.2.1. Proöstrus Dönemi.....	5
1.1.2.2. Östrus Dönemi	5
1.1.2.3. Metöstrus Dönemi.....	6
1.1.2.4. Diöstrus Dönemi	6
1.1.3.Oogenez ve Folikülogenez.....	7
1.1.3.1. Foliküler Dalgalanma.....	9
1.1.4.Korpus Luteum	11
1.1.4.1. Luteal Doku Oluşumu	11
1.1.4.2. Luteal Doku Hücreleri.....	12
1.1.4.3. Luteal Doku Regresyonu	13
1.1.5.Steroid Hormonlar.....	14
1.1.6.Progesteron Hormonu	14
1.1.7.Luteal Progesteron Sentezi.....	15
1.2.Endokrin Bozucu Bileşikler	17
1.2.1.Bisfenol A	22
1.2.1.1. Bisfeneol A'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	22
1.2.1.2. Bisfeneol A'nın Kullanıldığı Alanlar.....	23
1.2.1.3. Bisfeneol A'ya Maruziyet Yolları.....	24
1.2.1.4. Bisfeneol A'nın Toksik Etkileri.....	25
1.2.1.5. Bisfeneol A'nın Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri.....	27

1.2.2.Fitalatlar	29
1.2.2.1. Dietilheksil Fitalatın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	30
1.2.2.2. Dietilheksil Fitalatın Kullanıldığı Alanlar	31
1.2.2.3. Dietilheksil Fitalata Maruziyet Yolları	32
1.2.2.4. Dietilheksil Fitalatın Toksik Etkileri.....	33
1.2.2.5. Dietilheksil Fitalatın Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri.....	35
1.2.3.Polibromlu Difenileterler	38
1.2.3.1. Pentabromlu Difenileter 99'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	38
1.2.3.2. Pentabromlu Difenileter 99'un Kullanıldığı Alanlar	40
1.2.3.3. Pentabromlu Difenileter 99'a Maruziyet Yolları	40
1.2.3.4. Pentabromlu Difenileter 99'un Toksik Etkileri.....	41
1.2.3.5. Pentabromlu Difenileter 99'un Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri	43
2.GEREÇ ve YÖNTEM.....	46
2.1. Araç ve Gereçler	46
2.1.1. Kullanılan Cihazlar	46
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
2.2. Yöntem.....	47
2.2.1. Laboratuvar Ortamı ve Deney Düzeninin Hazırlanması.....	48
2.2.2. Uygun Dokunun Toplanması	48
2.2.3. Luteal Hücrelerin İzole Edilmesi	50
2.2.3.1. Dokunun İzolasyon İçin Hazırlanması.....	50
2.2.3.2. İzolasyon Medyumunun Hazırlanması ve Hücrelerin İzole Edilmesi	50
2.2.4. Hücre Sayımı ve Boyama	51
2.2.5. Hücrelere Uygulanacak Kimyasal Dozlarının Hazırlanması	52
2.2.6. Hücre Ekimi ve İnkübasyonu.....	53
2.2.7. Hormon Ölçümü	54
2.2.8. Verilerin İstatistiksel Analizi	55
3.BULGULAR	56
3.1.Mikroskobik Bulgular	56
3.2.Progesteron Düzeyleri.....	58
3.2.1. Luteal Progesteron Sentezi Üzerine Bisfenol A'nın Etkisi.....	58
3.2.2. Luteal Progesteron Sentezi Üzerine Dietilheksil Fitalatın Etkisi.....	59

3.2.3. Luteal Progesteron Sentezi Üzerine Pentabromlu Difenileter 99'un Etkisi.....	60
4.TARTIŞMA VE SONUÇ	61
KAYNAKLAR	69



ÖNSÖZ

İnsanların ve hatta tüm canlıların en büyük arzularından biri sağlıklı ve huzurlu bir yaşam sürmektir. Bu bağlamda canlıların içerisinde bulunduğu çevre ve yaşam alanlarının da yeri ve önemi oldukça büyüktür. Gün geçtikçe ilerleyen endüstriyel ve teknolojik gelişmeler sonucu meydana gelen kimyasal kontaminasyonla birlikte çevre kirliliği de insan ve hayvan sağlığı açısından tehdit olmaya başlamıştır. Bu tür gelişmeler, bir yandan canlıların hayatını kolaylaştırırken bir yandan da sağlıklı yaşamlarını tehdit etmektedir. Canlıların nesil ve soylarının devamlılığını sağlayan üreme sağlığı da, bu tehditlere maruz kalan önemli unsurlardan biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, endüstriyel gelişmeler sonucu çevreye yayılan ve endokrin bozucu bileşikler olarak adlandırılan kimyasal maddelerin, canlıların üreme ve hormon fizyolojileri üzerine etkilerinin olduğunu bildirmektedir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında son yıllarda gündeme gelen endokrin bozucu bileşiklerin, dişi üreme fizyolojisi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli Danışman Hocam Prof. Dr. A. Arzu YİĞİT e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca çalışma hayatım boyunca gerek akademik yönden gerekse sosyal yönden yardım ve desteklerini hiç esirgemeyen, başta Doç. Dr. Miyase ÇINAR olmak üzere, Prof. Dr. Hakan KALENDER'e, Doç. Dr. Serkan ERAT'a, araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve üzerimde emeği geçen diğer bütün hocalarıma ayrı ayrı teşekkür ederim. Yine bu zorlu süreçte dualarıyla beni hiç yalnız bırakmayan anneme, babama, tüm aileme ve dostlarıma teşekkürlerimi bir borç bilirim. Özellikle tezimin gerek uygulama gerekse yazım aşamasında geç saatlere kadar süren çalışmalarım da sabırlarla beni bekleyen, daima yanımda duran, verdiği moral ve motivasyonla beni gayrete getiren eşim Melek KABAĞÇI'ya çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

° C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre
3β –HSD	3β Hidroksi Steroid Dehidrojenaz
17β-HSD	17β Hidroksi Steroid Dehidrojenaz
BPA	Bisfenol A
BSA	Sığır Serum Albümini
Ca	Kalsiyum
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
KL	Korpus Luteum
cm ³	Santimetreküp
CO ₂	Karbondioksit
CYP11A1	Kolesterol Yanzincirini Kıran Enzim
CYP17A1	17α-Hidroksilaz Enzimi
CYP19A1	Östrojen Sentez/Aromataz Enzimi
DEHP	Dietilheksil Fitalat
DF	Dominant Folikül
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E2	Östrojen/Östradiol
EBB'ler	Endokrin Bozucu Bileşikler
EPA	Amerikan Çevre Koruma Ajansı

ER α	Östrojen Reseptör Alfa
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
g	Gram
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin Hormon
HCl	Hidroklorik Asit
HDL	Yüksek Yoğunluktaki Lipoprotein
HepG2	İnsan Karaciğer Hücre Hattı
HO-1	Hemoksijenaz-1
IGF-1	İnsülin Benzerin Büyüme Faktörü 1
ITS	İnsülin Transferrin ve Sodyum Selenit
kg	Kilogram
LDL	Düşük Yoğunluktaki lipoprotein
LH	Luteinleştirici Hormon
MA-10	Fare Leydig Tümör Hücre Hattı
MEHP	Mono Etilheksil Fitalat
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NCS	Yenidoğan Buzağı Serumu
Neuro-2a	Nöron Hücre Hattı
ng	Nanogram
O ₂	Oksijen
PBDE	Polibromlu difenileter

PBR	Preriferal Tip Benzodiazepin Reseptör
PBS	Fosfat Buffer Solüsyon
PGE ₂	Prostaglandin E2
PGF ₂ α	Prostaglandin F2 α
PKA	Protein Kinaz A
PKC	Protein Kinaz C
PVC	Polivinil Klorür
RIA	Radioimmunoassay
R2C	Ratlar Leydig Tümör Hücre Hattı
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
scc	Yan Zincir Bölünmesi
SCP-2	Sitozol Taşıyıcı Protein -2
StAR	Steroidojenik Akut Düzenleyici
TM4	Fare Sertoli Hücre Hattı
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Ovaryumun hormonal döngüsü	2
Şekil 1.2. Östrus siklusunun evreleri ve hormonal değişim.	4
Şekil 1.3. Oogenezis ve folikülogenezis süreci	8
Şekil 1.4. İki foliküler dalgalı östrus siklusu	10
Şekil 1.5. Üç foliküler dalgalı östrus siklusu	10
Şekil 1.6. Korpus hemorajikum	12
Şekil 1.7. Bazı steroid hormonlar ve kimyasal yapıları	14
Şekil 1.8. Luteal progesteron üretimi.....	16
Şekil 1.9. Bisfenol A'nın sentezi	22
Şekil 1.10. Dietilheksil ftalatın sentezi	30
Şekil 1.11. Pentabromlu difenileter 99'un sentezi.....	39
Şekil 2.1. Uygun ovaryum ve korpus luteumun dış (a) ve iç (b) görüntüsü.....	49
Şekil 3.1. Kontrol grubuna ait, inkübasyon öncesi (A) ve inkübasyonun 18. (B), 96. (C) ve 120. saatinde (D) 3β-HSD aktivitesi pozitif luteal hücreler (x20).	56
Şekil 3.2. 30 µM BPA (A), 30 µM DEHP (B) ve 0.3 µM PBDE 99 (C) grubunda, inkübasyonun 120. saatinde 3β-HSD aktivitesi pozitif luteal hücreler (x20)...	57
Şekil 3.3. İnek luteal hücrelerinin progesteron sentezi üzerine BPA'nın etkisi.	58
Şekil 3.4. İnek luteal hücrelerinin progesteron sentezi üzerine DEHP'in etkisi.....	59
Şekil 3.5. İnek luteal hücrelerinin progesteron sentezi üzerine PBDE 99'un etkisi. .	60

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Bisfenol A'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri.	22
Çizelge 1.2. Dietilheksil fitalatın fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	31
Çizelge 1.3. Pentabromlu difenileter 99'un fiziksel ve kimyasal özellikleri.	39
Çizelge 2.1. İneklerde östrus siklusu süresince ovaryum ve korpus luteumda gerçekleşen yapısal değişiklikler. KL: Korpus Luteum	49
Çizelge 2.2. Luteal hürelere uygulanan endokrin bozucu bileşikler ve dozları.	53



ENDOKRİN BOZUCU BİLEŞİKLERİN SIĞIR LUTEAL HÜCRE KÜLTÜRÜNDEKİ PROGESTERON SENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİ

ÖZET

Endüstriyel ve teknolojik gelişmelerle birlikte, yoğun bir şekilde çevreye yayılan endokrin bozucu bileşikler (EBB), canlıların başta üreme ve gelişme olmak üzere birçok hayati fonksiyonlarını tehdit eder hale gelmiştir. Günlük hayatta kullanılan plastik içerikli birçok ürünün yapısına katılan Bisfenol A (BPA), Dietilheksil Fitalat (DEHP) ve Pentabromlu difenileter 99 (PBDE 99), yaygın bir şekilde kullanılan ve canlıların üreme fizyolojileri üzerine etkilerinin olduğu bilinen EBB'lerdendir. Bu çalışmanın amacı, inek korpus luteumundan elde edilen luteal hücrelerin progesteron sentezi üzerine BPA, DEHP ve PBDE 99'un etkisini araştırmaktır.

Çalışmada kullanılan luteal hücreler, mezbahada kesilen sağlıklı ineklerin midluteal dönemdeki ovaryumlarından elde edildi. Korpus luteum enzimatik işlemlerden geçirilerek luteal hücreler ayrıştırıldı. Elde edilen hücreler her kuyucuğa 3×10^4 canlı hücre olacak şekilde içerisinde 2 mL kültür medyumu bulunan 6 kuyucuklu pleytlere dağıtıldı ve 120 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ilk 24 saatinde hücrelerin pleyt tabanına yapışması için yeni doğan buzağı serumu (NCS) dışında hücrelere herhangi bir uygulama yapılmadı. Daha sonra medyum, serum yerine ITS (İnsülin Transferrin, Sodyum Selenit) içeren ve belirli konsantrasyonlarda BPA (1, 3, 10 ve 30 μM), DEHP (1, 3, 10 ve 30 μM) ve PBDE 99 (0.1, 0.3, 1 ve 3 μM) içeren medyumla değiştirilerek, hücreler EBB'lere maruz bırakıldı. İnkübasyonun 96. ve 120. saatinde toplanan medyumlar progesteron ölçümü yapıncaya kadar $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Araştırma sonucunda inkübasyonun 96. saatinde kontrol grubuna göre BPA'nın tüm dozları, DEHP'in özellikle 3 ve 30 μM 'lık dozları, PBDE 99'un ise sadece en yüksek dozu (3 μM) progesteron düzeyini önemli oranda ($p < 0.05$) düşürdü. İnkübasyonun 120. saatinde ise BPA'nın 1 μM 'dan büyük tüm dozları (3, 10 ve 30

μM), DEHP'in tüm dozları ve PBDE 99'un 1 ile 3 μM 'lık dozları progesteron üretimini önemli oranda ($p<0.05$) baskıladı. Pentabromlu difenileter 99'un 0.1 ve 0.3 μM 'lık dozları hem 96. hem 120. saatlerde progesteron sentezini artırdı. İnkübasyon periyotlarına göre kıyaslandığında (96. ve 120. saatler arasında), BPA'nın sadece kontrol ve en yüksek doz grubunda (30 μM), DEHP'in kontrol dahil tüm dozlarında, PBDE 99'un ise 0.3, 1 ve 3 μM 'lık dozlarında 120. saatte 96. saate göre daha az progesteron üretimi oldu.

Ovaryumun hormonal dengesinin korunması sağlıklı bir üreme fizyolojisi için oldukça önemlidir. Çalışmanın bulguları EBB'lerden BPA ve DEHP'in inek luteal hücrelerinin progesteron üretimini azaltarak, PBDE 99'un da düşük dozlarda progesteron üretimini artırarak ve yüksek dozda azaltarak luteal steroidogenez sürecini etkilediğini ve ovaryumun hormonal dengesini bozduğunu ortaya koymuştur. Etkilenme süresi uzadıkça progesteron üretimini azaltıcı etkisi özellikle DEHP uygulanan grupta daha belirgin olmuştur. Zamana bağlı olarak BPA'nın yalnızca kontrol ve 30 μM 'lık en yüksek dozu, PBDE 99'un ise 0.3, 1 ve 3 μM 'lık dozlarının etkileri daha belirginleşmiştir. Sonuç olarak endüstriyel kirlenme sonucu maruz kalınan EBB'lerden BPA, DEHP ve PBDE 99'un progesteron sentezi üzerindeki olumsuz etkileriyle ineklerin östrus sikluslarında bozukluklara ve gebe kalmada sorunlara yol açarak hayvanın üreme verimini düşürebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: BPA, DEHP, EBB, İnek, Luteal Hücre, PBDE 99, Progesteron

**EFFECTS OF ENDOCRINE DISRUPTING COMPOUNDS
ON PROGESTERONE SECRETION BY CULTURED
BOVINE LUTEAL CELLS**

SUMMARY

Along with industrial and technological developments, endocrine disrupting compounds (EDCs), which spread intensely in the environment, have become a threat to many vital functions of living beings, especially reproduction and growth. Bisphenol A (BPA), Diethylhexyl phthalate (DEHP) and Pentabrominated diphenylether 99 (PBDE 99), which are involved in the structure of many products made by plastic used in everyday life, are EDCs that are widely used and known to have effects on the reproductive physiology of living beings. The aim of this study is to investigate the effects of BPA, DEHP and PBDE 99 on progesterone synthesis of bovine luteal cells.

Luteal cells used in the study were obtained from the midluteal ovaries of healthy cows slaughtered in the abattoir. Luteal cells were separated from the corpus luteum by enzymatic digestion. The isolated cells were seeded as 3×10^4 viable cells per well in the six well plates with 2 mL of medium and incubated for 120 hours. In the first 24 hours of incubation, any treatment was made to cells except the NCS to adhesion of cells to the bottom of the plate. Then, the medium was replaced with new medium containing ITS (Insulin Transferrin, Sodium Selenit) instead of NCS and different concentrations of BPA (1, 3, 10 and 30 μM), DEHP (1, 3, 10 and 30 μM) and PBDE 99 (0.1, 0.3, 1 and 3 μM). Media collected at hour 96 and hour 120 of incubation were stored at -20°C until progesterone measurement.

As the results of the study, all doses of BPA, particularly 3 and 30 μM doses of DEHP, and only the highest dose (3 μM) of PBDE 99 significantly reduced the progesterone level at the 96th hour of incubation compared to the control group ($p < 0.05$). At hour 120 of incubation, all doses higher than 1 μM of BPA (3, 10 and 30 μM), all doses of DEHP and doses of 1 and 3 μM of PBDE 99 significantly suppressed progesterone production ($p < 0.05$). Doses of 0.1 and 0.3 μM of PBDE 99 enhanced

progesterone synthesis at both 96 and 120 hours. When the incubation periods compared (between 96th and 120th hours), only the control and the highest dose group of BPA (30 μ M), and all doses of DEHP including control, and doses of 0.3, 1 and 3 μ M PBDE 99 had less progesterone production at 120 hours than at 96 hours.

The keeping of the hormonal balance of the ovary is very important for a healthy reproductive physiology. Findings of the study show that it was affected the luteal steroidogenesis process and disrupted the hormonal balance of the ovary by reducing the progesterone production of bovine luteal cells with BPA and DEHP and increasing progesterone production at low doses and decreasing at high dose of PBDE 99. As the exposure was longer, that suppressive effect became more evident, especially in the group of DEHP. The effects of only the control and the highest dose, 30 μ M, of BPA and the doses of 0.3, 1 and 3 μ M of PBDE 99 became more evident depending on the time. In conclusion, exposed EDCs, BPA, DEHP and PBDE 99 because of the industrial pollution have adverse effect on progesteron synthesis may decrease the reproductive efficiency of the animal by leading disorders in estrous cycle of cows and getting pregnant problems.

Key Words: BPA, Bovine, DEHP, EDCs, Luteal Cell, PBDE 99, Progesterone

1. GİRİŞ

1.1. İneklerde Ovaryum Fizyolojisi

Çiftlik hayvanlarında, üremenin ana hedeflerinden biri yıllık doğan yavru sayısını olabildiğince artırmaktır. Üreme faaliyetleri, sinir sistemi ve endokrin sistemin koordineli bir şekilde çalışmasıyla kontrol edilmektedir (Schatten ve Constantinescu 2007).

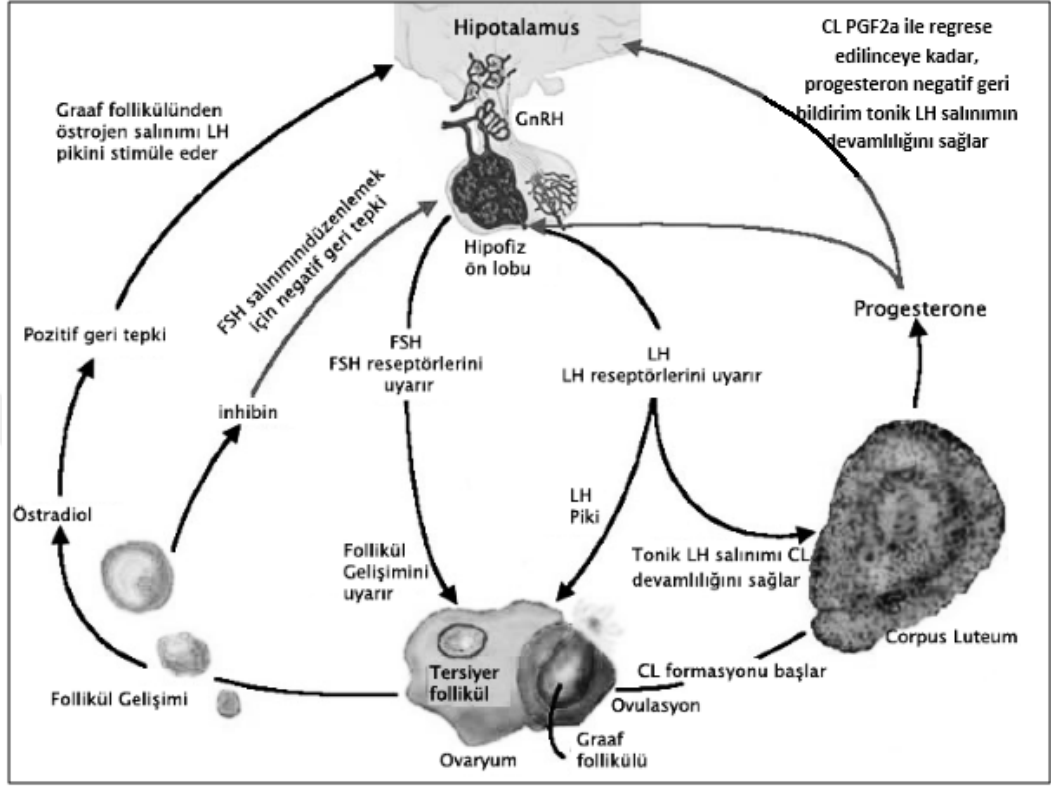
Dişi üreme fizyolojisi, hormonların, ovaryum, uterus ve meme bezlerini uyarmasıyla meydana gelen gebelik, doğum ve laktasyon gibi olayların oluşmasını ve düzenlenmesini kapsamaktadır. Ovaryum fizyolojisi ise, yine hormonların etkisiyle ovaryum üzerinde meydana gelen folikül gelişimi, oositlerin olgunlaşması, ovulasyonun meydana gelmesi, korpus luteum (KL) şekillenmesi, östrojen ve progesteron hormonlarının sentezlenmesi, KL'un gerilemesi gibi olayların tümüdür (Reece ve ark. 2015).

Ovaryum, dişilerde eşey hücrelerin üretildiği ve üreme kanalına atıldığı yer olması bakımından ekzokrin; steroidojenik aktiviteleri yani üreme hormonlarını sentezleme özelliğinden ötürü de endokrin yapıda bir dokudur. Ovaryumların dört ana görevi; dişi eşey hücresi üretmek, üreme hormonlarını sentezlemek, doğum sonrası büyümeyi ve ikincil cinsiyet karakterlerin ortaya çıkmasını düzenlemektir (Schatten ve Constantinescu 2007).

1.1.1. Ovaryum Üzerine Etkili Hormonlar

Ovaryum üzerine, hipotalamustan salınan ve aynı zamanda östrus siklusunu da kontrol eden gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) başta olmak üzere, adenohipofizden salınan folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH), ovaryumdan salınan progesteron, östradiol ve inhibin ile uterustan salınan prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) gibi hormonların doğrudan ya da dolaylı etkileri

bulunmaktadır (Kalkan ve Öcal 2015) (Şekil 1.1). Bu hormonların salınımının da ana kontrol noktasını hipotalamus ve buradaki sinir hücrelerinden salınan GnRH oluşturmaktadır (Reece ve ark. 2015).



Şekil 1.1. Ovaryumun hormonal döngüsü (Anonim 2016b).

Hipotalamustan salınan GnRH portal dolaşım ile hipofiz ön lobuna gelerek buradan gonadotropinler olarak adlandırılan FSH ve LH salınımını uyarır. Bu hormonlar da ovaryumdaki foliküllerin gelişimini, ovulasyonun şekillenmesini ve KL oluşumunu düzenlemektedir (Reece ve ark. 2015). Hipotalamustan salınan GnRH etkisiyle hipofizden salgılanan gonadotropinler dışarda ovaryumdan, östrojen, progesteron, inhibin, oksitosin, relaksin ve az miktarda testosteron sentezini uyarır. Bunların da GnRH salınımı üzerinde pozitif ve negatif geribildirim etkileri bulunmaktadır (Schatten ve Constantinescu 2007).

Folikül uyarıcı hormon ve LH hem birlikte hem de ayrı ayrı etki gösterirler. Folikül uyarıcı hormon, adından da anlaşıldığı gibi, ovaryumda foliküllerin gelişimini sağlamaktadır. Folikül gelişmeye devam ettikçe teka interna ve

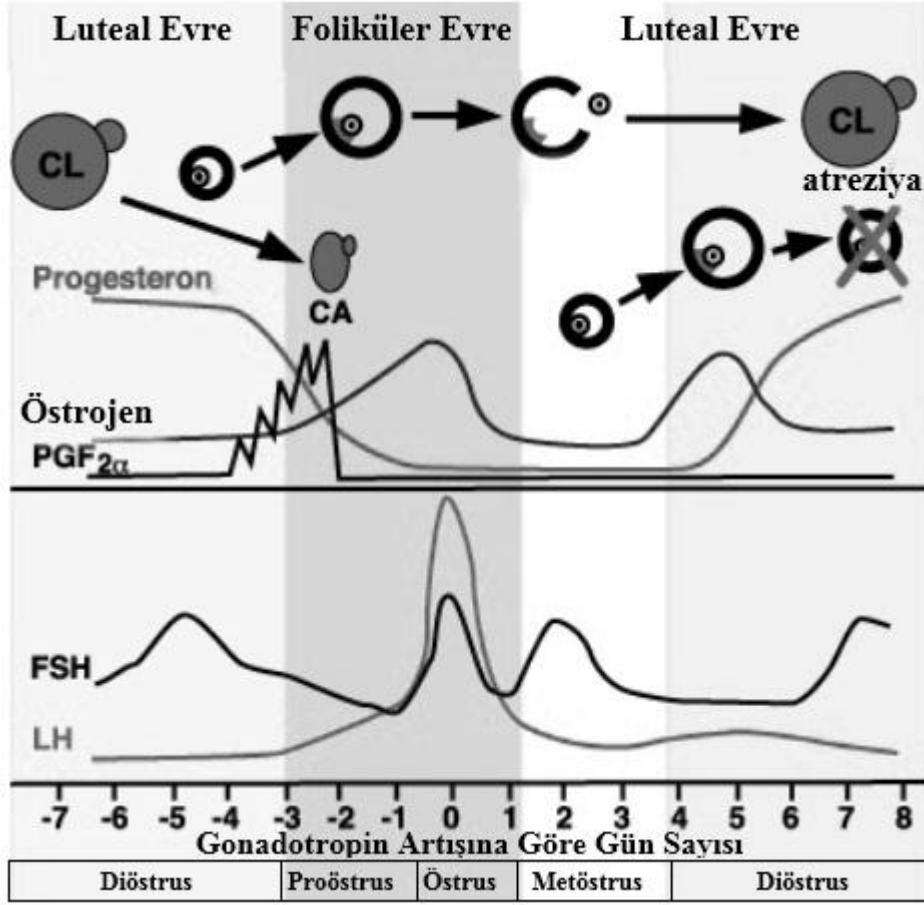
granuloza hücrelerinden östrojen hormonu salgılanır. Dolaşımında gittikçe artan östrojen seviyesi, folikülün LH reseptör sayısının artmasına sebep olmaktadır. Aynı zamanda hipotalamus üzerine yaptığı pozitif geribildirim ile de GnRH ve buna bağlı olarak LH salgılanmasına neden olarak, ovulasyonun gerçekleşmesine yol açmaktadır. Luteinleştirici hormon, dominant folikülün olgunlaşması ve ovulasyonun başlatılması için gereklidir. Ovulasyonla birlikte siklusun luteal evresi başlar ve bu sırada östradiol ve granuloza hücrelerinden salınan inhibinin negatif geri bildirimiyile FSH salınımı baskılanır. Kan östrojen seviyesi düşer ve patlayan folikülün yerinde korpus hemorajikum denilen, kan pıhtısı, damar ağı ve folikül hücreleri parçalarından oluşan geçici bir yapı şekillenir. Bu yapı, artan LH etkisi altında 3-4 gün sonra folikül duvarını oluşturan granuloza ve teka hücrelerinin luteal hücrelere dönüşmeye başlamasıyla korpus luteum halini alarak progesteron üretmeye başlar. Yaklaşık 14-18 gün aktif bir şekilde progesteron üreten KL, gebeliğin şekillenmesi ve devamlılığı veya bir sonraki siklusun başlayabilmesi için uygun ortamı sağlayarak, negatif geribildirim ile de GnRH, FSH ve LH salınımını baskılamaktadır. Ancak yine de bu sırada, ovulasyonla sonuçlanmayan folikül gelişimi dalgaları görülmektedir (Kalkan ve Öcal 2015).

Eğer gebelik şekillenmezse, uterustan salınan $PGF_{2\alpha}$ KL'un gerilemesine neden olur. Böylece progesteron düzeyi azalırken östrojen ve FSH seviyesi yükselir ve hayvan yeni bir östrus döngüsüne girer (Schatten ve Constantinescu 2007).

1.1.2. Östrus Siklusu ve Dönemleri

İki östrus (kızgınlık) dönemi arasında geçen zaman dilimine östrus siklusu denir. İnekler, yılın her döneminde östrus görülebilen, mevsime bağlı olmayan poliöstrik hayvanlardır (Reece ve ark. 2015).

Östrus siklusu ineklerde 18-24 (ortalama 21), düvelerde ise 17-25 gün civarında sürer. Siklusun uzunluğu genetik ve çevresel faktörlerin etkisine göre değişiklik gösterir. Özellikle siklus boyunca meydana gelen foliküler dalga sayısına göre siklusun uzunluğu ± 3 gün fark edebilir (Kalkan ve Öcal 2015).



Şekil 1.2. Östrus siklusunun evreleri ve hormonal değişim (Anonim 2016a).

Östrus siklusu ineklerde, kızgınlık belirtilerinin gözlemlendiği ve hayvanın çiftleşmeyi kabul ettiği östrus dönemiyle (0. gün) başlayıp, metöstrus (1-4. günler), diöstrus (5-18. günler) ve proöstrus (18-20. günler) olmak üzere 4 evrede incelenmektedir. Ovaryum üzerinde meydana gelen yapısal değişikliklere göre de, foliküler aktivitenin arttığı ve yaklaşık 4-6 gün süren, proöstrus ve östrus evreleri, proliferatif, östrojenik veya foliküler dönem olarak adlandırılırken; KL'un hâkim olduğu ve yaklaşık 14-18 gün süren, metöstrus ve diöstrus evreleri ise sekreterik, progesteratif veya luteal dönem olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.2). Foliküler dönemde, korpus luteumun lize olması, foliküllerin olgunlaşması ve Graaf folikülün ovulasyona uğrayarak, oositin üreme kanalına atılması gibi olaylar meydana gelmektedir. Östrus davranışları da foliküler fazın sonuna doğru görülmektedir. Luteal dönem ise, ovulasyonun ardından korpus hemorajikum ve

korpus luteumun oluşması, progesteron salgılanması ve KL'un gerilemesi gibi olayları içerir (Ball ve Peters 2007). Östrus siklusunun aşamaları ve hormonal değişimi Şekil 1.2'de gösterilmiştir.

1.1.2.1. Proöstrus Dönemi

Foliküler evrenin de başlangıcı olan bu dönem, luteal regresyonla birlikte progesteronun oldukça düşük seviyelere inmesini takiben luteal fazın bitiminden yaklaşık 48 saat sonra ve östrustan hemen önceki dönemde başlayıp, ortalama 2-3 gün süren bir evredir (Autumn P. Davidson ve Stabenfeldt 2007).

Bu dönemde ovaryum aktivitesi belirgin bir şekilde artmaktadır. Progesteron salınımının azalması hipotalamustan salgılanan GnRH'yı dolayısıyla da, adenohipofizden FSH ve LH salınımını başlatır. Ovaryuma gelen bu gonadotropinler foliküler gelişmeyi hızlandırmaktadır. Foliküller geliştikçe artan östrojen hormonu ise, hayvanın davranışlarında, huzursuzluk, hareketlilik, flehmen denilen dudağı yukarı büzme hareketi gibi birtakım değişikliklere neden olmaktadır (Kalkan ve Öcal 2015). Ayrıca, henüz çiftleşmenin kabul edildiği döneme girilmediği için, inekler başka hayvanların üzerine atlayabilir ancak kendi üzerine atlanıldığında altta durmazlar (Alaçam 2010).

1.1.2.2. Östrus Dönemi

Dişi hayvanın çiftleşmeyi kabul ettiği dönemdir. Bu dönem, ineklerde 12-18 saat gibi çok kısa bir zaman dilimini oluşturmaktadır. Proöstrusta görülen belirtiler daha da artar ve belirginleşir. En belirgin özelliği ise üzerine atlanıldığında östrustaki dişinin kaçmadan hareketsizce durmasıdır. Östrusta iştaktan süt verimine, vücut ısısından tükürük salgısına kadar birçok fizyolojik davranışlarda değişiklikler görülmektedir. Ayrıca, hayvan sürekli bağıırır ve vajinadan çara denilen yoğun kıvamlı, bulaşıcı, yapışkan ve renksiz bir sıvı akıntısı görülür. Östrus östrojenin pik yaptığı evredir. Ancak ineklerde ovulasyon, östrusun bitiminden hemen sonra

meydana gelmekte ve bu sırada östrojen seviyesi aniden düşüş göstermektedir (Alaçam 2010).

1.1.2.3. Metöstrus Dönemi

Hayvanın çiftleşme isteği, başka bir ifadeyle altta durma eğilimi bittiğinde, östrus dönemi bitmiş metöstrus dönemine girilmiş demektir. Luteinleştirici hormon pik seviyeye ulaştıktan 24-32 saat sonra veya östrus bitiminden 8-12 saat sonra metöstrus içerisinde ovulasyon gerçekleşmektedir. Ovulasyonu takiben aniden düşen östrojen seviyesi endometriyumda kanamalara neden olur. Ayrıca, folikül içindeki damarlar da yırtılarak folikülün arta kalan yerinde korpus hemorajikum denilen pıhtı benzeri bir yapı oluşur. Bu aşamada hem östrojen hem de progesteron seviyesi düşüktür. Birkaç gün sonra bu yapı yerini korpus luteuma bırakır. Diöstrus döneminin hazırlık aşaması olarak da nitelenen bu dönem östrus siklusunun 3-4 gününü kapsamaktadır (Ball ve Peters 2007).

1.1.2.4. Diöstrus Dönemi

Bu dönem, metöstrusun sonlarına doğru şekillenen KL'un aktif bir şekilde progesteron ürettiği evredir. Tamamen progesteron kontrolü altında olan diöstrus döneminde progesteronun ana hedefleri; hipotalamus, uterus ve meme bezleridir. Hipotalamusta gonadotropin salgılanmasını engelleyerek foliküllerin gelişimini baskılayan progesteron, uterusu hem kontraksiyonları önler hem de uterus sütü salgılanmasını uyarmaktadır. Yine doğum öncesi dönemde, meme bezlerini uyarak alveoler gelişmeyi tamamlatmakta ve hayvanı laktasyona hazır hale getirmektedir (Kalkan ve Öcal 2015).

Metöstrusla birlikte siklusun luteal fazını oluşturan diöstrus, ineklerde yaklaşık 12-16 gün sürmektedir. Siklusun 16-18. günlerinde maksimum büyüklüğüne ulaşan korpus luteum, eğer gebelik şekillenemezse, uterustan salınan

PGF_{2α} etkisiyle regrese olur. Böylece progesteron seviyesi düşer ve hipofizden salınan gonadotropinlerle yeni bir siklus dönemine girilir (Alaçam 2010).

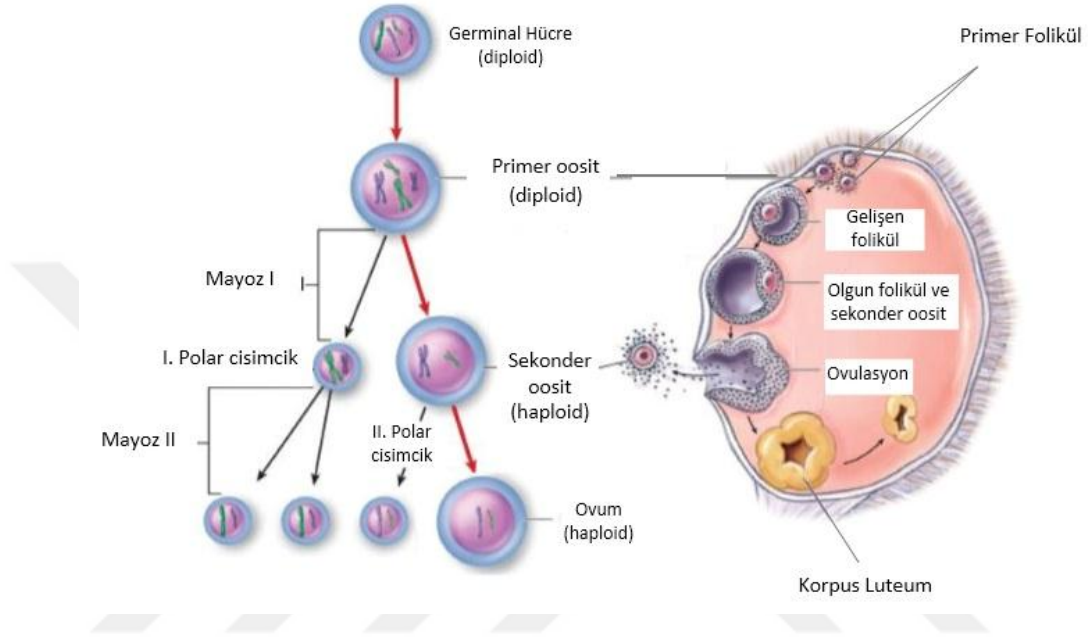
1.1.3. Oogenez ve Folikülogenez

Oogenez, dişi üreme hücresi olan oositin bölünerek çoğalma, büyüme, gelişme ve olgunlaşma evrelerini kapsayan bir dizi olaya verilen addır. Döllenmenin 19. gününden itibaren embriyonal endoderm tabakası etrafında primordiyal germ hücreleri görülmektedir. Çoğalma evresinde, bu hücreler, fetal hayat boyunca mitoz bölünmeyle çoğalarak oogoniumları oluşturmaktadırlar. Mitoz bölünmeyle çoğalmasını tamamlayan oogoniumlar, birinci mayoz bölünme evresine girerek primer oosit adını alırlar (Schatten ve Constantinescu 2007).

Doğuma yakın zamanda, birinci mayoz bölünmeye başlayan primer oositler profaz evresinde duraksayarak, pubertaya kadar beklemede kalırlar. Oogenez ve folikülogenez süreci aynı anda meydana gelmektedir. Oositlerin gelişimi ve beslenmesi için gerekli uygun ortamı sağlayan foliküller ovaryumların fonksiyonel yapılarıdır. Primer oositin etrafının, tek katlı yassı epitelle sarılmasıyla primordiyal folikül şekillenir. Ancak ruminantlarda folikülün ilk ne zaman oluşmaya başladığı tam olarak bilinmemektedir. Yeni doğan dişi buzağının her bir ovaryumunda hayatı boyunca ihtiyacı olandan çok daha fazla (yaklaşık 200-500 bin) primer oosit/primordiyal folikül bulunmaktadır. Ancak puberta öncesinden başlayarak her sıklusta azalmaya başlayan bu sayı, ergin bir inekte 60 bin civarına, yaşlı ineklerde ise birkaç bine kadar inmektedir (Ball ve Peters 2007).

Pubertayla birlikte, ineklerde ortalama 300 primordiyal folikül bilinmeyen intraovariyan bir faktör tarafından periyodik olarak, ovulasyona uğramak veya ovulasyona giderken gerileyerek yok olmak üzere büyümeye başlar ve primordiyal, primer, sekonder, preantral ve antral/tersiyer folikül aşamalardan geçerek olgunlaşır. Folikül büyüdükçe etrafındaki hücreler de katmanlar oluşturur; teka eksterna, teka interna ve granuloza hücreleri. Teka eksterna gevşek bağ dokudan ibarettir; folikülün etrafını dışardan sarmakta ve ona destek olmaktadır. Teka

interna LH'nın etkisiyle androjen üretmekte, granuloza hücreleri ise östrojen, inhibin ve folikül sıvısı gibi folikülün gelişmesi için gerekli diğer önemli materyalleri üretmektedir. Bu sırada folikülün ortasında antrum denen bir boşluk şekillenmeye başlar. Folikül bu evrede antral/tersiyer folikül adını almaktadır (Schatten ve Constantinescu 2007).



Şekil 1.3. Oogenezis ve folikülogenezis süreci (Anonim 2016c).

Ovulasyon yaklaştıkça östrojen ve FSH, granuloza hücreleri üzerinde LH reseptörlerinin şekillenmesini uyarmaktadırlar. Öte yandan FSH reseptörlerinde de bir gerileme söz konusudur. Böylece folikül LH hâkimiyeti altına girmekte ve Graaf folikül halini almaktadır (Autumn P. Davidson ve Stabenfeldt 2007). Ön hipofizden dalgalı bir şekilde salınan LH, enzimatik olarak folikül duvarını yıkımlayan çeşitli kollajenaz ve prostaglandinlerin miktarında artışa neden olmaktadır. Ardından LH salınımının aniden doruğa çıkmasıyla birlikte Graaf folikül ovulasyona uğrayarak patlar. Bu noktada, ovulasyona neden olan LH salınımı, aynı zamanda, oositin profaz evresinde bekleyen I. mayoz bölünmesini de tekrar başlatmış olur. Ovulasyondan hemen önce tamamlanan birinci mayoz bölünme sonucunda 2N kromozumlu sekonder oosit ile birinci kutup hücresi oluşmaktadır. Ovulasyon sırasında başlayan ikinci mayoz bölünme ise döllenme esnasında tamamlanarak 1N

kromozomlu oosit ile bir kutup hücresi daha meydana gelmektedir. Böylece oogenez sonucu bir primer oositten bir olgun oosit şekillenmektedir (Alaçam 2010) (Şekil 1.3).

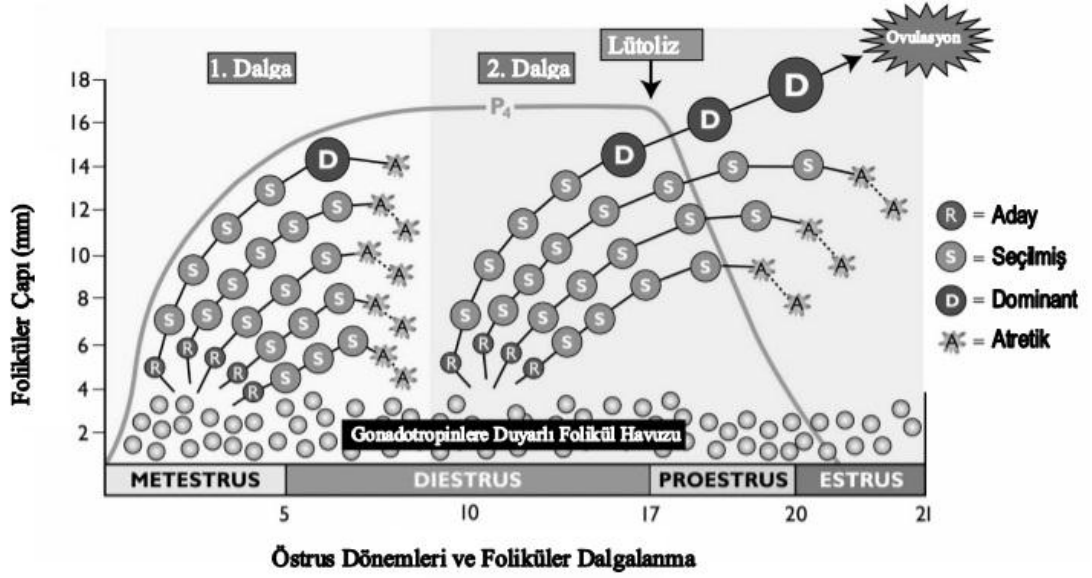
1.1.3.1. Foliküler Dalgalanma

İnek ovaryumlarında görülen foliküler gelişim doğum öncesi, ergenlik öncesi ve bazı hayvanlarda gebelik döneminde de devam etmektedir. Östrus siklusu boyunca foliküller, dalgalar halinde gelişmektedirler. Birden fazla folikülün aynı anda gelişmeye başlaması ve bu gelişimin dalgalar halinde şekillenmesinden dolayı bu sürece, foliküler dalga adı verilmektedir. Foliküler dalgaların her birinde gelişen foliküller bazı evrelerden geçmektedirler. Bunlar; aday, seçilme ve dominant folikül evreleri ile ovulasyon veya gerileyen folikül evreleridir (Schatten ve Constantinescu 2007) (Şekil 1.6).

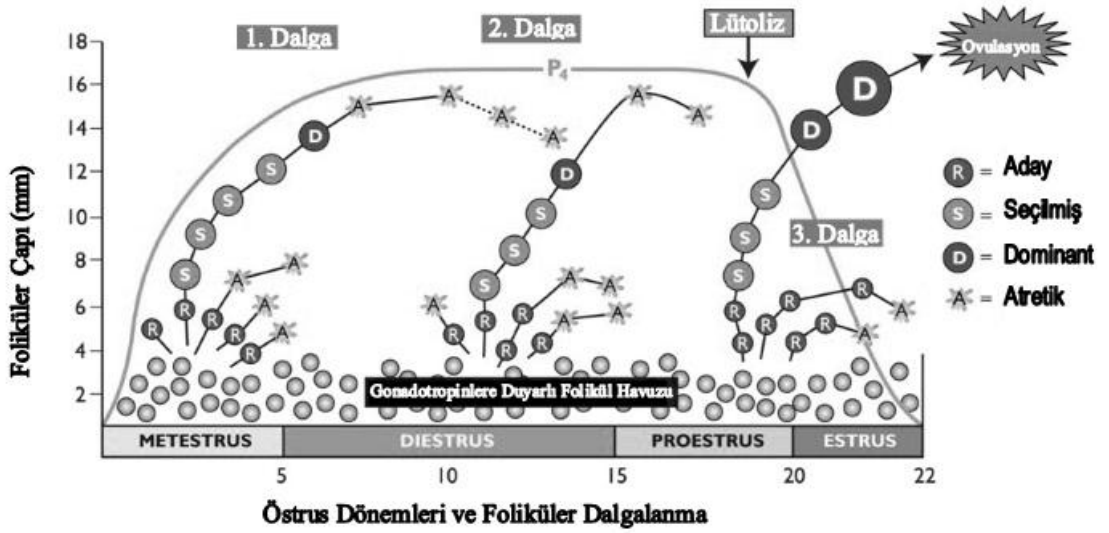
Östrus siklusu boyunca, kan FSH düzeyi yüksek ve LH düzeyi düşük seviyelerdeyken, bir grup (3-6 adet) 1-2 mm çaplarında seçilmiş folikülün gelişmeye başladığı, 10'ar günlük 2, veya 7'şer günlük 3 foliküler dalga hareketi oluşmaktadır (Şekil 1.4 ve 5). Başka bir ifadeyle, bir östrus siklusunda %95 oranında 2-3 adet, nadiren de (%5) 5 adet foliküler dalga görülmektedir. Foliküler dalga süreci de yine, hipotalamustan salınan GnRH kontrolünde hipofizden salgılanan FSH ve LH'nın etkisiyle meydana gelmektedir. Bir önceki foliküler dalganın Graaf folikülü ovulasyona uğrarken, her bir foliküler dalga başında artan FSH etkisiyle, o dalgaya katılan bir grup primer folikül büyümeye başlayarak (aday folikül evresi) yeni bir foliküler dalganın başlatılmasına neden olmaktadır. Büyüme devam ederken bu foliküller arasından, LH reseptörü diğerlerine göre fazla olan folikül, LH'nın etkisiyle gelişmesine devam ederek dominant folikül (DF) olarak seçilir (seçilme evresi), diğerleri de atreziye olur (Kalkan ve Öcal 2015).

Foliküler dalga ve sayısı yaş, mevsim, beslenme ve kan insülin, inhibin-A, IGF-1 ve FSH konsantrasyonlarından da etkilenebilmektedir (Kalkan ve Öcal

2015). Bu dalgalar ovulasyonlu (ovulatorik) veya ovulasyonsuz (anovulatorik) dalga olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Schatten ve Constantinescu 2007).



Şekil 1.4. İki foliküler dalgalı östrus siklusu (Kalkan ve Öcal 2015).



Şekil 1.5. Üç foliküler dalgalı östrus siklusu (Kalkan ve Öcal 2015).

Dominant folikül, salgıladığı östradiol ve inhibin nedeniyle FSH salınımı baskılayarak hem diğer foliküllerin gelişmesini hem de yeni bir foliküler dalga şekillenmesini engellemektedir. Ayrıca reseptör sayısı arttıkça DF ovulasyona

kadar LH'nın kontrolü altına girer. Ancak DF aktif bir KL varlığı ve yüksek progesteron seviyesinden dolayı, östrus belirtilerinin görülmesine ve preovulatör LH pikine neden olamaz. Dolayısıyla birinci dalgadaki DF ovulasyona gidemeyerek atreziye olmaktadır (anovulatorik-ovulasyonsuz dalga). Böylece, artan FSH ile yeni bir foliküler dalga başlamaktadır. Siklusun ortalarında başlayan bu ikinci foliküler dalgadan da bir DF seçilir. Burada, seçilen ikinci dominant folikülün mü, yoksa gelişecek üçüncü bir dominant folikülün mü ovulasyona uğrayacağı o aşamada gerilemekte olan bir KL varlığına bağlıdır. İki dalgalı sikluslarda bu seçilen DF, korpus luteumun gerilemesiyle birlikte ovulasyona kadar gitmektedir (ovulatorik-ovulasyonlu dalga) (Şekil 1.4). Ancak 3 dalgalı sikluslarda bu DF de atreziye olmakta ve 3. dalgadan seçilen DF Graaf folikül haline gelerek, luteolizisin ardından şekillenen LH pikiyle, ovulasyona uğramaktadır (Şekil 1.5) (Kalkan ve Öcal 2015).

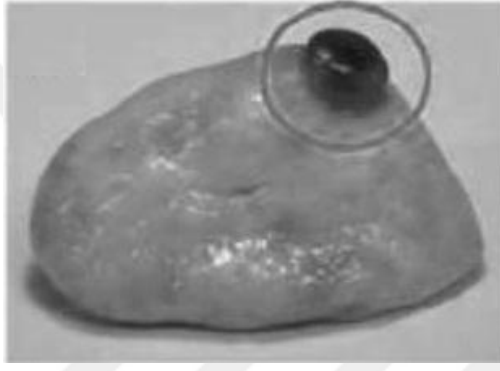
1.1.4. Korpus Luteum

Korpus luteum, erken gebeliğin oluşmasında ve sürdürülmesinde görev alan ve östrojen reseptörlerinin ekspresyonunu sağlayan geçici fakat oldukça önemli bir üreme bezidir (Romani ve ark. 2013). Korpus luteumun temel fonksiyonu, uterusu gebelik için hazırlayan ve aynı zamanda, embriyonun hayatta kalması, tutunması ve gebeliğin devamlılığını sağlayan progesteron hormonunu üretip salgılamaktır (Autumn P. Davidson ve Stabenfeldt 2007).

1.1.4.1. Luteal Doku Oluşumu

Foliküler dalga sonucu gelişen Graaf folikülün, preovulatör LH salınımını takiben ovulasyona uğraması sonucu, ovum foliküler sıvıyla birlikte üreme kanalına atılır. Folikülün ardında kalan boşluğa, granuloza ve teka hücrelerinin yanı sıra, bozulan bazal membran arasından kan damarları da yayılır ve boşluğu bol miktarda kan ile doldururlar (Reece ve ark. 2015). Ovulasyondan 2-3 gün sonrasına kadar ve KL'un

erken gelişim döneminde görülebilen bu yapıya korpus hemorajikum adı verilmektedir (Şekil 1.6). Ovulasyondan hemen sonra, LH'nın etkisiyle birkaç saat içerisinde luteinleşme sürecine giren granuloza hücreleri östrojen yerine progesteron üretmeye başlar (Autumn P. Davidson ve Stabenfeldt 2007). Luteinleşme süreci, hücre ebatı ve sayılarındaki artış ve bazı türlerde de sarı pigment oluşumu ile karakterizedir (Schatten ve Constantinescu 2007). Bu süreçte hiperplaziye uğrayan teka hücreleri küçük luteal hücelere; hipertrofiye uğrayan granuloza hücreleri de büyük luteal hücelere dönüşerek olgun korpus luteum oluşmaya başlar (Miyamoto ve ark. 2011).



Şekil 1.6. Korpus hemorajikum (Eun-Ji ve ark. 2013).

Lutenizasyonun başladığı ilk dönem metöstrus olarak adlandırılır. Ovaryum üzerinde birkaç gün varlığını sürdüren korpus hemorajikum büyüyüp sertleşerek ovaryumun dışına doğru taşar. Ovulasyondan 3-5 gün sonra büyüklüğü artan ve kanlı görünümü kaybolan KL'un, LH reseptör sayısı da olgunlaşma devam ettikçe artmaktadır. Buna paralel olarak progesteron salgısı da artar. Bu aşama ile hayvan diöstrus sürecine girer. İneklerde, ovaryum yüzeyine çıkıntı da verebilen KL olgunlaştığında 3 cm çapa ulaşabilmektedir (Reece ve ark. 2015).

1.1.4.2. Luteal Doku Hücreleri

İnek korpus luteumunun çeşitli hücre topluluklarından oluşan heterojen bir yapısı bulunmaktadır. Bu heterojen yapı, büyük ve küçük steroidojenik luteal hücreler

başta olmak üzere, çok sayıda damar hücresi, düz kas hücreleri, perisitler, fibrositler ve immün hücrelerden meydana gelmektedir (Miyamoto ve ark. 2011).

Korpus luteum temel yapısını oluşturan iki tip hücreden büyük luteal hücreler (25-30) granuloza hücrelerinden, küçük luteal hücreler (15-20 mm) ise teka hücrelerinden köken almaktadır. Luteal dokunun %90'nını küçük luteal hücreler oluştururken (Ball ve Peters 2007), bunlar zamanla büyük luteal hücrelere dönüşmektedirler. Büyük luteal hücreler, progesteronun yanı sıra oksitosin de salgılamaktadır (Alaçam 2010).

1.1.4.3. Luteal Doku Regresyonu

Evcil hayvanların birçoğunda korpus luteumun, gebelik şekillenmediği zaman regrese olması, bir an önce yeni fertil bir sıklusa girilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu yüzden korpus luteum östrus siklusunun 16-18. günlerinde nekrozis ve luteolizis sonucu regrese olmaya başlar (Alaçam 2010).

Diöstrusun sonlarına doğru KL'dan salınan oksitosin, $PGF_{2\alpha}$ 'nın salgılanmasını uyarır. Kana geçen $PGF_{2\alpha}$ 'nın neredeyse tamamı ruminantların akciğer endotel hücrelerinde yıkımlandığı için, sistemik dolaşıma katılmadan hemen önce ters akım mekanizmasıyla uterus venasından difüzyon yoluyla ovaryum arterine aktarılmaktadır (Autumn P. Davidson ve Stabenfeldt 2007).

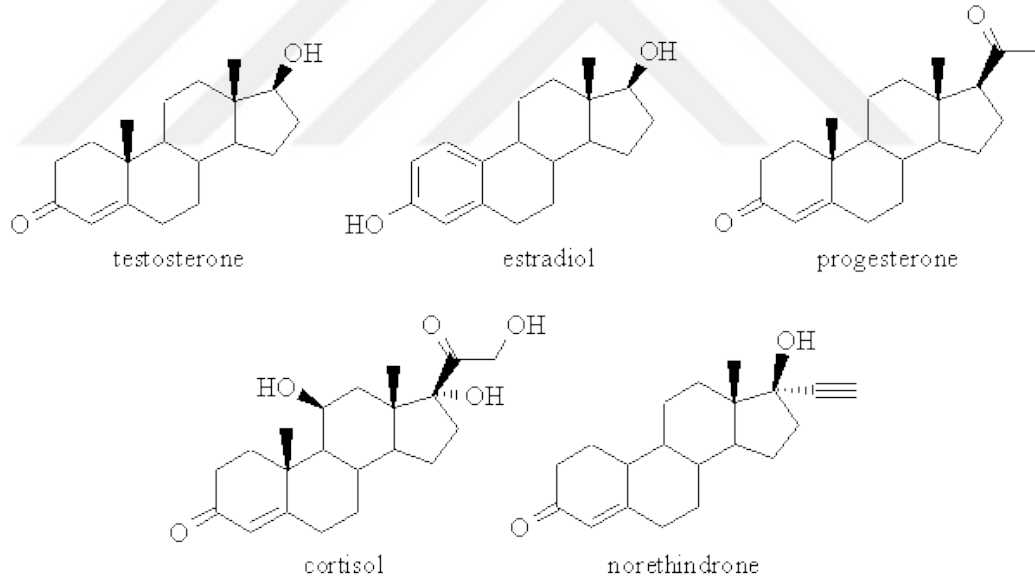
Ovaryuma gelen $PGF_{2\alpha}$, luteal hücrelerin sitoplazmalarındaki kalsiyum seviyelerini artırarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Ayrıca, o bölgedeki lokal damarları daraltarak luteal hücrelerin beslenmesine engel olmak, korpus luteumun adenilaz siklaz sistemindeki LH aktivasyonunu baskılayarak (Ball ve Peters 2007) progesteron üretimini engellemek, LH ile reseptöre bağlanma konusunda yarışmak ve LH'nin reseptöre bağlanma yerlerini bozmak (Alaçam 2010) gibi çeşitli mekanizmalarla luteal gerilemeyi başlatmaktadır.

Ayrıca, büyük luteal hücrelerden salınan oksitosin, küçük luteal hücrelerin progesteron sentezini engellemekte ve hücre içi kalsiyum düzeyini artırarak

apoptoza neden olmaktadır (Niswender ve ark. 2006). Böylece luteolizis gerçekleşmekte ve KL gerileyip parçalanarak kandaki progesteron seviyesi aniden düşmektedir. Luteolizis morfolojik olarak ise, kılcal damarların parçalanması ve sitoplazmada lizozomların artmasından ibarettir. Son aşamada bağ dokuyula yer değiştiren KL, korpus albicans olarak adlandırılmaktadır (Reece ve ark. 2015).

1.1.5. Steroid Hormonlar

Steroid hormonlar üreme sistemi üzerinde biyokimyasal olarak etkili olan en aktif hormonlardır. Bütün steroid hormonların temel ön maddesini kolesterol oluşturmaktadır. Üreme fizyolojisi üzerine etkili olan temel steroid hormonlar; androjenler, testosteron, östrojen ve progesterondur (Schatten ve Constantinescu 2007). Aşağıdaki şekilde bazı steroid hormonlar gösterilmiştir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Bazı steroid hormonlar ve kimyasal yapıları (Ian 2016).

1.1.6. Progesteron Hormonu

Progesteron, KL'un varlığı süresince, östrus siklusunun düzenlenmesi ve embriyonun uterus duvarına tutunmasında kritik bir role sahip olduğu için

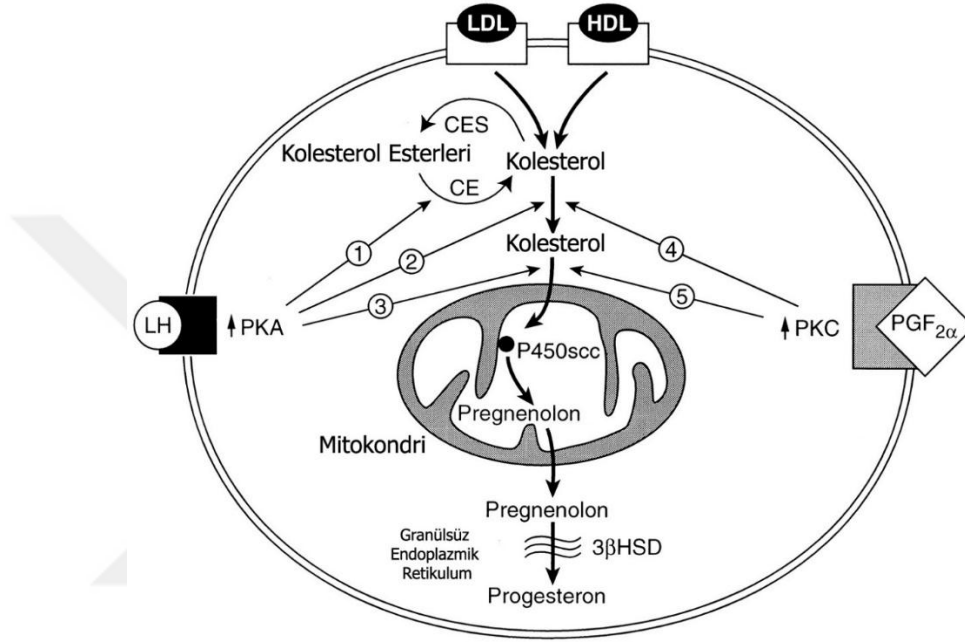
önemlidir. Vücudun ve özellikle üreme sisteminin önemli hormonlarından olan progesteron, başta korpus luteum ve plasenta olmak üzere, az miktarda da böbrek üstü bezinin korteksi, testis ve ovaryum foliküllerinde üretilmektedir. En önemli fonksiyonu uterusun kasılmasını önleyerek ve endometriyal dokunun gelişmesini uyararak, embriyonun tutunmasını ve gebeliğin devamlılığını sağlamaktır. Bunun yanı sıra ovaryumda ovumun atılmasına katkıda bulunmak, meme dokusunda süt sentezi için lobular ve alveoler yapının gelişmesini sağlamak ve doğum öncesi süt proteinleri üretimini baskılamak, beyinde cinsel davranışları kontrol eden sinyalleri düzenlemek gibi önemli etkileri de bulunmaktadır. Son yıllarda progesteronun kemik ağırlığını düzenlediğine dair bilgilere de ulaşılabilmektedir (Yılmaz 1999).

1.1.7. Luteal Progesteron Sentezi

Luteal doku steroid yapıda bir üreme hormonu olan progesteronun biyosentezinin meydana geldiği önemli bir merkezdir. Luteal dokunun progesteron üretimi için ihtiyaç duyduğu kolesterol, gıdalarla dışardan alınabildiği gibi, vücut içerisinde de, hem depo kolesterol esterlerinin hidrolize edilmesi, hem de yeniden kolesterol sentezlenmesi yoluyla karşılanmaktadır. Kolesterolün büyük bir kısmı karaciğerde sentezlenir ve bununla beraber steroidojenik hücreler de kolesterol sentezleme yeteneğine sahiptir. Luteal hücreler ise asetil ko-A'dan kolesterol üretmektedirler. Ancak luteal progesteron sentezinde kullanılan asıl kolesterol kaynağı plazma lipoproteinleridir; Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL) ve Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (HDL) (Niswender 2002). Membran reseptörleri aracılığı ile ve endositoz yoluyla hücre içine giren lipoproteinlerden, lizozomal enzimler aracılığıyla serbest hale gelen kolesteroler, ya hemen steroid sentezi için kullanılmakta veya granüller içerisinde depo edilmektedir (Autumn P. Davidson ve Stabenfeldt 2007).

Bütün steroid hormonların sentezi için kolesterolün önce mitokondri içine taşınması gerekir. Dolayısıyla progesteron biyosentezinin ilk aşaması da mitokondri içinde gerçekleşmektedir. Luteinleştirici hormon luteal hücre membranındaki ilgili reseptörü ile etkileşime girdiği zaman cAMP'ye bağımlı

protein kinaz A (PKA)'nın yolağını aktifleştirir. PKA kolesterol taşıyıcı protein olan StAR ve PBR'nin fosforilasyonuna neden olmaktadır. Böylece lipoproteinlerle hücre içine alınan veya hücrenin kendi sentezlediği kolesterol StAR proteinlere bağlanarak veya direk bir membran proteini olan PBR aracılığıyla mitokondri içine taşınmaktadır. Burada görev alan endozepin proteini yeni bir kolesterol taşıyabilmesi için PBR'ın yapısını değiştirmektedir (Niswender 2002).



Şekil 1.8. Luteal progesteron üretimi. LH ile PKA'nın aktive olması, kolesterol esteraz aktivitesinin (1), kolesterolün sitoplazma içinde (2) ve mitokondri içine taşınmasının artışına neden olur. Mitokondri içine alınan kolesterol P450scc ile pregnanolona dönüştürülerek sitoplazmaya bırakılır. Pregnanolon granülsüz endoplazmik retikulumda 3βHSD ile progesterona dönüştürülür. PGF_{2α} ile PKC'nin aktive edilmesi de kolesterolün sitoplazma içinde (4) ve mitokondri içine (5) taşınmasını azaltarak progesteron üretimini baskılar. LDL: Düşük dansiteli lipoprotein, HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein, CES: Kolesterol esterleri, CE: Kolesterol esteraz, LH: luteinleştirici hormon, PKA: Protein kinaz A, PKC: Protein kinaz C, PGF_{2α}: Prostaglandin F_{2α}, 3βHSD: 3β hidroksi steroid dehidrojenaz (Niswender ve ark. 2000).

Kolesterol mitokondri içine taşındıktan sonra progesteron sentezi de başlamış demektir. Mitokondrinin iç membranı sitokrom P450scc ile ilişkilidir ve bu enzim kolesterolden pregnanolon oluşumunu sağlamaktadır. Pregnanolonun son olarak endoplazmik retikulumda, 3β-HSD enzimi vasıtasıyla progesterona dönüştürülmektedir (Şekil 1.8) (Niswender 2002). Bu aşamadan sonra progesteronun difüzyonla hücre dışına atıldığı düşünülmektedir. Çünkü luteal dokuda depo edildiğine dair bir kanıt bulunmamaktadır (Niswender ve ark. 2000).

Korpus luteumda luteal progesteron sentezi ve sekresyonu, yapısal ve biyokimyasal açıdan iki farklı steroidojenik hücre tipi tarafından düzenlenmektedir. Küçük luteal hücreler LH ve cAMP'ye cevap vererek progesteron sentezini artırır. Büyük luteal hücreler ise LH reseptörlerine sahip olmasına rağmen, LH ve cAMP'ye tepki vermezler ancak, artan endojen endozepin miktarına bağlı olarak, bazal progesteron sentezinin %85 den fazlasını karşıladıkları için üretim zaten yüksektir (Niswender 2002, Miyamoto ve ark. 2011).

1.2.Endokrin Bozucu Bileşikler

Çevre kirliliği yüzyıllardır var olsa da, bugün bilinen kimyasal çevre kirliliği endüstri ve sanayi devrimiyle birlikte başlamıştır. Son yıllarda, üretimi, kullanımı ve atılımı, buna bağlı olarak kimyasalların çevredeki varlığı büyük bir oranda artmıştır. Dolayısıyla günümüzde, canlılar, geçmişte olduğundan çok daha yoğun bir şekilde kimyasal maddelere maruz kalmaktadırlar. Endokrin bozulma, yakın geçmişte ortaya çıkan ve yaklaşık son 20 yıldır güncelliği giderek artan bir araştırma alanıdır (Kabir ve ark. 2015).

Endokrin Bozucu Bileşikler (EBB'ler), Amerikan Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından, vücudun homeostasis başta olmak üzere, üreme, gelişme ve birtakım fizyolojik davranışlarını kontrol eden hormonların, sentezinden vücuttan atılımına kadarki birçok metabolik aşamasına müdahale eden ajanlar olarak tanımlanmıştır (Kavlock ve ark. 1996).

Geçmiş 1940'lara dayanmasına rağmen, endokrin bozucu bileşikler, 1991 yılında Wingspread Konferans Merkezinde düzenlenen bir toplantıdan sonra önem kazanmaya başlamıştır (Colborn ve Clement 1992). Ardından, 2002 yılının Mayıs ayından itibaren bu bileşikler, bir araştırma alanı olarak "endocrine disruptor" (endokrin bozucu) anahtar kelimesi ile Web of Science'ın arama indeksine girmiştir (Kabir ve ark. 2015). Bu ajanlar endokrin bozucu, endokrin düzenleyici, aktif hormonal ajanlar ve taklit hormonlar gibi diğer bazı bilimsel terimlerle de ifade edilmektedirler (Damstra ve ark. 2002).

Normal hormonal fonksiyonlara müdahil olan bu bileşikler çeşitli birçok kimyasal veya kimyasal gruplarını kapsamaktadır. Bunların arasında, genellikle evde, tarımsal alanlarda ve endüstride kullanılan pestisitler, plastikleştiriciler, alkil fenoller ve alev geciktiriciler yer almaktadır. (Kabir ve ark. 2015). EBB'ler Caliman ve Gavrilescu (2009) tarafından orijinlerine göre sınıflandırılarak dörde ayrılmıştır:

1. **Doğal ve suni hormonlar:** Fitoöstrojenler, omega-3 yağ asitleri, doğum kontrol hapları ve tiroit ilaçları
2. **Hormonal yan etkiye sahip ilaçlar:** Naproksen, metoprolol, klofibrat vb.
3. **Endüstri ve ev ortamında kullanılan kimyasallar:** Fitalatlar, alkilfenoletoksilat, alev geciktiriciler, plastikleştiriciler, çözücüler, 1-4 diklorobenzen ve poliklorlu bifeniller
4. **Diğer yan ürünler:** Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, dioksinler, pentaklorobenzen vb.

Günlük hayatta kullanılan birçok üründe değişik miktarlarda kullanılan bu kimyasallar, içerisinde buldukları ürünlerden kolayca ayrılarak çevreye ve doğaya yayılmaktadırlar. Sanayi bölgelerinin de potansiyel bir EBB kaynağı olduğu düşünülmektedir. Pestisit benzeri ürünler, bisfenol A ve fitalat içeren plastik ürünler, antimikrobiyaller içeren kişisel bakım ürünleri ve benzeri birçok ürün endüstriyel sanayilerde üretilmektedir. Bu tür fabrika ve sanayilerden EBB'ler kolayca çevreye yayılmakta, toprağa ve suya karışmaktadır (Gore ve ark. 2014).

Hayvanların EBB'lere maruz kalma yolları oldukça ciddi ve önemli sonuçlar doğurmaktadır. Çevreye yayılan EBB'ler, sahip oldukları uzun yarılanma ömürlerinden dolayı doğada yıllarca varlığını koruyabilir veya yıllar önce kullanılmış olsalar dahi halen doğada mevcut durumda olabilirler. Bu bileşiklerin birçoğu doğada, güneş ışığı, bakteriler ve çeşitli kimyasal süreçlerle ayrıştırılırlar. Daha sonra bu kimyasallar bakteri, alg gibi mikroorganizmalar ile bitkiler tarafından alınmakta ve oradan da hayvanlara geçmektedir (Kidd ve ark. 2012, Gore ve ark. 2014).

Birçok EBB'ler hayvanların yaşadıkları ortamlarda ve gıdalarında da kalıcı bir şekilde bulunmaktadır. Kimyasal özellikleri ve dayanıklılık sürelerine bağlı olmakla birlikte, hayvanlar, bu bileşiklere, hava, su, toprak ve topraktaki kalıntılar yollarıyla maruz kalmaktadırlar. En çok karşılaşılan maruziyet yolu ise su kaynaklarıdır (Kidd ve ark. 2012). Kontamine olmuş içme suyu, ırmak, dere, göl gibi duran ve akan su kaynaklarından su içen hayvanlar EBB maruz kalmaktadırlar. Çevreye yayılan ve çeşitli yollarla ayrıştırılan kimyasallar, toprağı da kontamine etmektedir. Buradan bakteri, alg gibi mikroorganizmalar ile bitkilere geçmektedir. Daha sonra kontamine olmuş toprakla temas eden, burada yetişen ot vb. gıdaları tüketen hayvanlar çok sayıda EBB'lere maruz kalmaktadırlar. Bu kimyasallar çok düşük konsantrasyonlarda bile toksik etkilere neden olabilmektedirler (Gore ve ark. 2014).

Birçoğu lipofilik yapıya sahip olan bu bileşikler yukarıda bahsedilen değişik yollarla hayvanların vücuduna alındıktan sonra, başta yağ dokular olmak üzere çeşitli dokularda biyobirikime uğrayarak organizmada yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedir. Uzun yarılanma ömürleri ve lipofilik yapıları da biyobirikimi kolaylaştıran faktörlerdir (Kidd ve ark. 2012).

Düşük düzeylerde dahi olsa EBB'ler maruz kalan gebe hayvanlarda plasentayı geçen bu kimyasallar direk gelişmekte olan fetüsü etkileyebilmektedir. Ayrıca yağ dokularında EBB birikmiş olan memeli hayvanlardan özellikle laktasyon sırasında sütle yavrulara da bu kimyasalların geçişi söz konusudur. Böylece hem anne hayvan hem de yavru yüksek dozlarda EBB'e maruz kalmaktadırlar (Barr ve ark. 2007).

EBB'ler çeşitli yollarla hormonların fonksiyonlarına müdahil olarak insan ve hayvan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır (Bergman ve ark. 2013).

Yapılan hayvan deneyleri sonucu, bu bileşiklerin,

- 1) Östrojen, androjen ve tiroit gibi vücudun doğal hormonlarını kısmen veya tamamen taklit ederek aşırı uyarılmaya neden oldukları;

- 2) Hormonların antagonisti olarak hareket ettikleri, böylece vücut içerisinde salgılanan hormonun hücredeki reseptörüne bağlanarak doğal ve gerekli yanıtların oluşmasını engelledikleri;
- 3) Doğal hormonlara veya reseptörlerine müdahil olarak aktivitelerini engelledikleri ortaya koyulmuştur (NIEHS 2010).

Bu kimyasallar, organizmanın fütal hayattaki gelişiminden başlayıp, büyüme, gelişme, üreme, cinsel gelişim ve cinsel davranışlar, stres yönetimi, insülin üretimi gibi birçok metabolik olayların kontrolünü sağlayan hormonal ve homeostatik sistemin fonksiyonlarını değiştirerek etkilerini göstermektedirler (Kabir ve ark. 2015). Böylece hayvanların üreme, gelişme, zorluklarla mücadele etme gibi birçok fizyolojik, hormonal ve davranışsal fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedirler (Preda ve ark. 2012). Endokrin bozucu bileşiklere maruz kalan fütal, pubertal ve yetişkin hayvanların üreme kontrolünü sağlayan hipotalamus-hipofiz-gonad yolları üzerinde olumsuz etkiler meydana gelmektedir (Fowler ve ark. 2012).

Endokrin bozucular birçok mekanizma aracılığıyla fertilitiyi de etkilemektedirler. Bu etkisini hipotalamus, hipofiz, üreme bezleri ve her iki cinsiyetin de üreme kanalları üzerine etki ederek göstermektedir. Bu bileşiklerin gonadal gelişim ve fonksiyonlarını düzenleyen fizyolojik mekanizmalar üzerine de direk etkileri bulunmaktadır (Fowler ve ark. 2012). Ayrıca gebeliğin erken dönemlerinde embriyo üzerine direk toksik etkiler meydana getirebilmektedirler (Foster ve ark. 2004). Yine bu kimyasalların sebep olduğu etkilerin genel doğurganlık oranının düşmesine de katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Petro ve ark. 2012).

Endokrin bozucu bileşikler, vücuttaki doğal hormonların reseptörlerine bağlanarak onları taklit edebilir veya etkilerini engelleyerek steroidogenezisi değiştirebilirler (Janošek ve ark. 2006). Böylece ovaryum steroidogenezisi üzerinde, oosit olgunlaşması, ovulasyonun şekillenmesi ve luteal fazın yeterliliği için ciddi sonuçlar doğurabilmektedir.

Son yıllarda, EBB'lerin başta insan olmak üzere birçok türün dişi üreme sisteminin gelişimine müdahale etme veya engel olma etkilerine sahip olduğu giderek daha da açık hale gelmiştir (Woodruff ve Walker 2008). İnsanların erken dönemlerdeki üreme fizyolojilerine benzerliği bakımından inekler, evcil hayvanlar içerisinde ayrı bir öneme sahiptir. Sadece gebelik süresi bakımından değil, ovaryum fonksiyonları ve oosit karakterleri açısından da her iki türün üreme fizyolojisi oldukça benzerlik göstermektedir (Campbell ve ark. 2003). Bu yüzden çiftlik hayvanlarının, fizyolojik hormon fonksiyonlarını bozan bir dizi doğal ve sentetik çevresel bileşiklere maruz kalması, buna bağlı olarak üreme sağlıkları ve immun sistemlerinde oluşan potansiyel olumsuz etkiler hakkında birtakım endişeler de gündeme gelmiştir.

Dişi çiftlik hayvanlarının üreme sağlığı iç ve dış kaynaklı birçok faktör tarafından etkilenebilmektedir. Bunlar ovaryumun doğuştan gelen folikül deposu, hormonal durum, yaş ve genetik gibi iç faktörler ile endokrin bozucu bileşikler, ağır metaller, ultraviyole ışıkları ve cinsel yolla bulaşan hastalıklar gibi dış faktörler olarak sayılabilir (Darwash 1999).

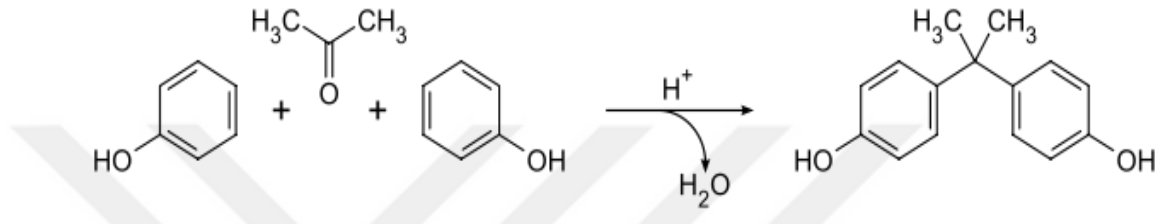
Üreme sistemi içerisinde, hormonla sıkı bir ilişkide olan ovaryumların EBB'lerin bir hedef organı olduğu düşünülmektedir (Petro ve ark. 2012). Bununla beraber uterus, ovaryum ve meme bezi hücreleri de EBB'lerin yıkıcı/bozucu etkilerine oldukça duyarlıdır (Sweeney 2002). Yaygın olarak görülen diğer üreme bozuklukları arasında; östrus siklusunun bozulması, ovulasyondaki gecikme ve yetersizlikler, erken gebelik şekillenmesi, embriyo tutunmasındaki yetersizlikler ve fetal malformasyonlar gibi anomaliler sıralanabilir (Darwash 1999).

Her ne kadar dişi çiftlik hayvanlarının üreme sorunlarında, bir artış ya da azalmanın olup olmadığını ileri sürmek için literatürde yeterli bilgi bulunamasa da, yüksek verimli süt ineklerinin doğurganlık oranında uluslararası düzeyde bir düşüş kaydedilmiştir (Darwash 1999). Bu düşüşün her geçen gün artan EBB maruziyetinin bir sonucu olarak meydana geldiği düşünülmektedir (Sweeney 2002).

1.2.1. Bisfenol A

1.2.1.1. Bisfenol A'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bisfenol A (BPA), adından da anlaşılacağı üzere iki mol eşdeğer fenol (Bisphenol) ile bir mol aseton (A) oluşan, yapısal olarak sentetik östrojene benzeyen, endokrin bozucu özelliğe sahip ve iki hidroksil molekülü içeren fenil grubu bileşiktir (Rykowska ve Wasiak 2006) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Bisfenol A'nın sentezi (Prokop ve ark. 2004'dan uyarlandı).

İlk defa Rus kimyager Alexander Dianin'in (1891) sentezlediği BPA, katı toz formda, hafif fenolik kokulu, beyaz-krem renkli ve kristal yapıda bir kimyasaldır. Sudaki çözünürlüğü düşüktür, ancak alkol, aseton, dimetilsülfoksit (DMSO) gibi organik solventlerdeki çözünürlüğü yüksektir (Harvey ve Johnson 2002). Çizelge 1.1'de BPA'nın diğer genel özellikleri verilmiştir.

Çizelge 1.1. Bisfenol A'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri (Pubchem 2016a).

Genel Adı	Bisfenol A (BPA)
IUPAC Adlandırılması	4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane
Diğer İsimleri	2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane
	p,p'-isopropylidenebisphenol,
	diphenylolpropane
CAS Numarası	80-05-7
EC Numarası	201-245-8
Moleküler Ağırlığı	228.291 g/mol
Kimyasal Formülü	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Yapısal Formülü	(CH ₃) ₂ C(C ₆ H ₄ OH) ₂
Dış Görüntüsü	Beyaz Toz /Kristal

Kokusu	Hafif Fenolik Koku
Yoğunluğu	1.20 g/ cm ³ 25 °C
Erime Noktası	150 - 159 °C
Buhar Basıncı	193 °C (1 atm basınçta)
Kaynama Noktası	220 °C
Alevlenme Noktası	227 °C
Kendiliğinden Tutuşma Sıcaklığı	600 °C
Sudaki Çözünürlüğü	120 – 300 mg/L (25 °C’de)

1.2.1.2. Bisfenol A’nın Kullanıldığı Alanlar

Bisfenol A keşfinin ardından 1930’lu yıllarda östrojen preparatları olarak kullanılıyordu (Dodds ve Lawson 1936). Ancak polimer uzmanlarının 1950’li yıllarda polikarbonat plastikleri polimerleştirmek için BPA kullanmaya başlamasıyla ticari üretime geçilmiş ve 1970’lerde BPA üretim hacmi oldukça yükselmiştir (Vogel 2009). Daha sonra özellikle polikarbonat plastiklerin ve epoksi reçinelerin yapımında kullanılmak üzere (Pivnenko ve ark. 2015) yıllık ticari olarak üretilen BPA miktarı 2003 yılında 2.7 milyon ton (Burrige 2003), 2011 yılında ise 5.4 milyon ton ile dünya çapında üretilen kimyasallar arasında en yüksek seviyeye sahip ulaşmıştır. BPA üretimi her geçen yıl ortalama %5 oranında artmaya devam etmektedir (Ritter 2011).

Şeffaf renkli ve kırılmaz (esnek) özelliklere sahip olan polikarbonat plastikler çeşitli birçok ürünlerin imalatında kullanılmaktadır. Bunlar arasında genellikle uzun ömürlü ve yeniden kullanılabilen su ve meşrubat şişeleri, biberonlar ve plastik yapılı saklama kapları bulunmaktadır (Halden 2010). Bunun yanı sıra spor malzemeleri, tıp ve diş hekimliği aletleri, dolgu malzemeleri, kompakt diskler, gibi evlerde ve günlük hayatta kullanılan çeşitli birçok ürün yapımında da polikarbonat plastikler kullanılmaktadır. Bisfenol A içeren epoksi reçineler ise neredeyse tüm yiyecek ve içecek kutularının iç yüzeyini kaplamak amacıyla kullanılmaktadır. Konserve kutuları, gıda paketleri, yiyecek ve içecek kutularının iç yüzeyleri ve su borularının iç yüzey astarlarının kaplanması, içerisinde BPA bulunan epoksi reçinelerden faydalanılmaktadır (Pivnenko ve ark. 2015). Bisfenol A, ayrıca monomer olarak katıldığı diş dolgu malzemelerinde, plastikleştirici bir katkı

maddesi olarak streç film gibi polivinil klorür (PVC) türü plastik ürünlerde, yazıcı mürekkepleri ile fiş, makbuz, fatura gibi karbonsuz termal kâğıtların yapımında, fungusit vb. pestisitlerin içerisinde, köpük/strafor ve paketleme sistemlerinde, çeşitli inşaat malzemeleri ve fiberglass üretiminde kullanılmaktadır (NTP-CERHR 2008).

1.2.1.3. Bisfeneol A'ya Maruziyet Yolları

Bisfenol A, yukarıda bahsedilen ve daha birçok çeşitli üründe kullanılmakta olan epoksi reçineler ve polikarbonat plastiklerdeki polimerlere bağlanmaktadır. Kararlı yapıdaki plastiklerin polimerleri ile BPA arasında kararlı olmayan kimyasal bağlar kurulmaktadır. Bu yüzden BPA, plastikler içerisinde bulunan yiyecek ve içecek türü gıdalara kolayca geçebilmektedir (NTP-CERHR 2008).

Polikarbonat plastik yapıdaki gıda saklama kapları, su şişeleri veya biberonlar tekraren ve sürekli kullanıldıkları için potansiyel bir BPA kontaminasyon kaynağı oluşturmaktadır (Nerín ve ark. 2003). Yapılan çalışmalar, polimerleşmesini tamamlamamış olan bu ürünlerin üretimi ve depolimerizasyonları sırasında, ısıtma veya sterilizasyon amacıyla uygulanan yüksek ısı sonucu (Markey ve ark. 2002) BPA'nın ürün içerisinde bulunan su, gıda, mama veya direk kullanım sırasında (biberon emziği gibi) tükürüğe geçtiğini ortaya koymuştur (Olea ve ark. 1996). Çünkü polikarbonat plastiklere ester bağlarıyla bağlanan BPA molekülleri ısı uygulandıkça hidrolize olarak serbest hale gelmektedirler (Bae ve ark. 2002). Asidik içerikler de BPA'nın yiyecek veya içecek içerisine geçmesini hızlandırmaktadır (Talsness ve ark. 2009). National Library of Medicine'in 2004 verilerine göre yıllık üretilen toplam BPA'nın %73'ü havaya, %24'ü toprağa ve %2.5'u suya karışmaktadır (TRI 2004).

BPA maruziyetinin büyük bir kısmı oral yolla meydana gelmektedir. BPA monomerlerini plastiklerdeki polimerlerle bağlayan ester bağları, hidrolize olmaya çok yatkındır. Bu gevşek bağlar nedeniyle yiyecek ve içeceklere BPA göçü kolaylaşır ve artar. Örneğin insanlarda, okul çağındaki ve daha küçük yaşlardaki

çocuklarda, BPA maruziyetinin %99.9'unun oral yolla gerçekleştiği bildirilmiştir (Vandenberg ve ark. 2009).

İnsanların üreme sistemine ait birçok doku ve sıvıda BPA tespit edilmiştir. Bunlar arasında foliküler sıvı (1.5 ila 2.4 ng/mL), amniyotik sıvı (1 ila 17 ng/mL), süt (0.28 ila 1.9 ng/mL) ve plasenta dokusu (11.2 ng/mL) bulunmaktadır (Ikezuki ve ark. 2002, Vandenberg ve ark. 2007). Çiftlik hayvanlarının üreme dokuları ve sıvılarında da benzer miktarlarda BPA ölçülmüştür (Kamarianos ve ark. 2003).

Diğer kara hayvanları gibi ruminantlar da bu tür kimyasal maddelere hava, su, gıda alımı ve derinin direkt teması sonucu absorpsiyon yoluyla maruz kalmaktadırlar. Ancak en yaygın maruziyet yolu olarak diyet (beslenme ve su) kabul edilmektedir (Norstrom 2002).

Araştırmalar, çöp toplama alanlarındaki/depolarındaki ürünlerden açığa çıkan BPA'nın yeraltı sularına geçtiğini, böylece içme suları başta olmak üzere ırmak, dere, çay gibi su kaynaklarının kontamine olduğunu göstermektedir (Vandenberg ve ark. 2007). Sedimentlerdeki BPA yoğunluğu sulardan çok daha fazladır. Çünkü sedimentasyon yoluyla yeryüzü sularına ulaşan kirletici miktarının atık sularla ulaşanlardan 700 kat daha fazla olduğu belirtilmektedir (Anonim 2016d).

Solunum yoluyla da BPA'ya maruziyet olasılığı yüksekken, deriden direk temas sonucu meydana gelen maruziyette BPA'nın yaklaşık %10 kadarının emilime uğradığı bildirilmiştir (NTP-CERHR 2008).

1.2.1.4. Bisfeneol A'nın Toksik Etkileri

Bisfenol A maruziyeti kardiyovasküler sistem dahil diyabet ve obezite ile üreme ve bağışıklık sistemi bozuklukları gibi çeşitli olumsuz etkilere neden olmaktadır (Liang ve ark. 2014). BPA'nın reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturarak böbrek, beyin, karaciğer ve testis gibi bazı organlarda doku hasarına neden olabildiği de bildirilmiştir (Kabuto ve ark. 2004). Gebelik sırasında farelerin düşük seviyelerde BPA'ya maruz kalması, yavrularının beyinlerinde kalıcı hasarlara neden olmuştur

(Rubin ve ark. 2006). Katoh ve ark. (2004), hipofiz bezi hücrelerinde BPA maruziyetinin büyüme hormonu salınımını baskıladığını göstermişlerdir. *In-vitro* ortamda kültüre edilen inek embriyolarının BPA'ya maruz bırakıldığında, kontrol grubuna göre, yüksek doz (44 μ M) BPA gruplarında glikoz tüketiminin arttığı gözlenmiştir (Choi ve ark. 2016). BPA uygulanan gebe ratların üç aylık yavrularına yüksek yağ içerikli diyet uygulaması kontrol grubuna kıyasla BPA gruplarında metabolik bozukluklara ve vücut ağırlığı-yag oranı ile karaciğer ağırlığında artışa neden olmuştur (Hahn-Townsend ve ark. 2016)

Bisfenol A'nın rat ve farelerde erkek ve dişi üreme organlarının gelişimi olumsuz üzerine etkilerinin olduğu da bilinmektedir (Soto ve ark. 2008). Üreme dokularında bulunan BPA da farelerde spermatogenezisin baskılanması, anöploidinin artması ve üreme faaliyetlerinin zayıflaması gibi negatif etkilere sebep olmaktadır. Örneğin, ratlara düşük dozlarda (20 μ g/kg-200 mg/kg) uygulanan BPA günlük sperm üretiminde azalmaya neden olmuştur (Sakaue ve ark. 2001). Anne karnındayken 2-20 μ g/ml/kg BPA'ya maruz kalan CF-1 farelerinin sperm üretiminde düşüş, epididimal ağırlıkta azalma ve prostat bezi ile prepüsyum ağırlığında artış görülmüştür (Vom Saal ve ark. 1998).

In-vitro ortamda 1-200 μ g/mL BPA'ya maruz bırakılan sığır spermatozoalarının, yüksek dozlarda (100 ve 200 μ g/mL) tüm inkübasyon sürelerinde (0-24 saat), düşük dozlarda (1-10 μ g/mL) ise inkübasyonun 4-6. saatleri arasında motilitesinde önemli azalma görülmüştür. Spermatozoaların mitokondriyal aktiviteleri ve hücre canlılığında ise 10 μ g/mL ve üzeri BPA dozlarında 6. saatten itibaren önemli derecede düşüş gözlenmiştir (Lukacova ve ark. 2015).

Fare Sertoli hücre hattıyla (TM4 cells) yapılan bir çalışmada BPA'nın 1-100 μ M dozlarının hücre canlılığında azalmaya neden olduğu bildirilirken (Ge ve ark. 2014), Iida ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada da, rat Sertoli hücresi kültürüne eklenen 0-200 μ M BPA'nın, doz ve zamana bağlı olarak hücrelerde apoptoza yol açan yapısal değişikliklere ve hücre canlılığında azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir.

İnsan, rat ve fare fetal Leydig hücrelerinin, 0.01-10 µM BPA'ya maruz bırakılması sonucu, insan fetal Leydig hücrelerinde testosteron üretimini önemli derecede azaltırken, rat ve fare fetal Leydig hücrelerinde sadece en yüksek (10 µM) BPA dozu testosteron sentezini önemli oranda baskılamıştır. inkübasyon süresi boyunca (1-3 gün) rat ve fare fetal Leydig hücrelerinde 0.1 µM ve altındaki düşük konsantrasyonların herhangi bir etkisi görülmemiştir (N'Tumba-Byn ve ark. 2012).

Gelişim süresince veya puberta öncesi dönemde 2 ay boyunca 3.5 mg/kg/2 hafta (Evans ve ark. 2004) ve 5 mg/kg/gün BPA'ya maruz kalan dişi koyunlarda LH salınımı baskılanmıştır (Savabieasfahani ve ark. 2006). Ratlarda da BPA maruziyeti sonucu serum LH seviyesinde azalma gözlenmiştir (Rubin ve ark. 2001).

1.2.1.5. Bisfenol A'nın Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Yapılan araştırmalar sonucunda, BPA maruziyeti nedeniyle ovaryumda yapısal ve işlevsel birçok değişiklikler meydana geldiği bildirilmiştir (Hunt ve ark. 2009).

Domuz granuloza hücreleriyle *in vitro* ortamda yapılan bir çalışmada, hücelere uygulanan 0.01 µM – 100 µM BPA'nın östrojen seviyesini önemli derecede azalttığı, 100 µM'lık dozun aynı zamanda bazal ve gonadotropin (FSH - LH) uyarımlı progesteron seviyesini önemli oranda baskıladığı bildirilmiştir (Mlynarčíková ve ark. 2005). Aynı hücre tipiyle yapılan başka bir çalışmada ise; hücelere 0.1-10 µM BPA uygulanmış, *in vitro* ortamda elde edilen sonuçlarda, dozlar arası fark görülmemekle birlikte uygulanan tüm konsantrasyonların progesteron salınımını azaltırken, sadece en yüksek iki dozun (1-10 µM) östrojen (E2) salınımını baskıladığı bildirilmiştir. Ayrıca uygulanan dozların hücre çoğalması üzerine de herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Grasselli ve ark. 2010).

In-vitro ortamda değişik dozlarda (0.1 – 100 µM) BPA'ya maruz bırakılan rat granuloza hücrelerinde, 1-100 µM'lık dozların CYP450arom mRNA ekspresyonu ve östradiol seviyesini önemli derecede azalttığı, 100 µM BPA dozunun ise hem

CYP450scc ekspresyonunu hem de progesteron sentezini dikkate değer bir şekilde baskıladığı tespit edilmiştir (Zhou ve ark. 2008).

Mansur ve ark. (2016)'nın insan granuloza hücrelerinde yaptıkları bir *in vitro* çalışmada, 20 mg/mL BPA konsantrasyonunun, 3 β -HSD, CYP450scc ve CYP450arom enzimlerinin ekspresyonunda ve östrojen sentezinde önemli oranda azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Progesteron sentezinin ise 2 mg/mL ve üzeri tüm BPA dozlarında azaldığı gözlenmiştir.

Fareler antral foliküllerine *in vitro* ortamda uygulanan 4.4 - 440 μ M BPA, 120 saatlik inkübasyonun ardından en yüksek iki dozda (44 ve 440 μ M) başta progesteron olmak üzere östron, testosteron, androstenedion, dehidroepiandrosteron, ve östradiol üretiminde önemli derecede azalmaya sebep olmuştur. Ayrıca bu dozlar hormonların sentezinde görev alan CYP450scc ve StAR proteinin ekspresyonunda da düşüşe neden olmuştur (Peretz ve ark. 2011). Peretz ve Flaws (2013)'in aynı deney modeliyle gerçekleştirdikleri sonraki bir çalışmada; 44 ve 440 μ M BPA'nın CYP450scc ekspresyonu ve progesteron seviyesi üzerindeki baskılayıcı etkisinin, kültürün 24-96 saatleri arasında, StAR ekspresyonu ve diğer hormonların (androstenedion, testosteron ve östradiol) seviyeleri üzerindeki azaltıcı etkisinin ise, 72-96 saatleri arasında meydana geldiği tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan en düşük dozun (4.4 μ M BPA) ise enzim ekspresyonunda değişikliğe neden olmadığı, sadece inkübasyonun 24. saatinde progesteron seviyesini önemli derecede düşürdüğü belirlenmiştir.

In vitro ortamda oosit maturasyonu (olgunlaşması) boyunca BPA'ya maruz kalan inek oositleri, mayozis sürecinde azalma ve kromozom anomalilerinde artış dolayısıyla oosit kalitesinde düşüş olup olmadığı yönünden araştırılmıştır. Oositlerin muamele edildiği 65 nM BPA grubunda önemli bir farklılık gözlenmezken, 130 nM BPA uygulanan oositlerin %57.4'ünün olgunlaşma sürecinin metafaz II (MII) aşamasına ulaşamadığı ve dikkate değer oranda kromozom anomalilerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Ferris ve ark. 2015). Bir diğer oosit çalışmasında ise; *in vitro* ortamda fertilize edilen inek oositleri 8 hücreli aşamaya ulaştıktan sonra, ayrı bir kültür ortamına alınıp 96 saat (akut) süreyle 4.4 ve 44 nM BPA ve E2'ye maruz bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda 44 nM BPA

ve E2 uygulanan grupta kontrol grubuna göre blastosit aşamasına ulaşan embriyo yüzdesi önemli oranda azalmıştır ($p<0.05$; $p=0.05$ sırasıyla). Kalite açısından değerlendirildiğinde BPA'nın düşük dozu ve kontrol grubuna kıyasla E2'nin her iki dozu ve BPA'nın yüksek dozu uygulanan gruplarda, transfer edilebilir blastosit oranında yaklaşık %10 azalma ($p<0.05$) tespit edilmiştir (Choi ve ark. 2016).

Romani ve ark. (2013) insan luteal hücrelerine 0.001 – 1 μM arasında değişen konsantrasyonlarda BPA uygulamışlardır. Deneysel inkübasyonun süresinin (24 saat) ardından 0.1 μM ve 1 μM BPA'nın bazal P4 üretimini önemli derecede azalttığı, insan koryonik gonadotropini (hCG) uyarımlı progesteron üretiminin ise, sadece en yüksek doz BPA ile baskılandığı belirlenmiştir. Ayrıca, en düşük doz hariç kullanılan diğer bütün BPA dozlarının prostaglandin E₂ (PGE₂) ve PGF_{2a} salınımını da önemli oranda azalttığı gözlenmiştir.

Gebe ratlara suyla oral yoldan verilen BPA, doğan dişi yavruların yaklaşık %80'inde pubertedan sonra düzensiz östrus sikluslarına, hatta bazı yavrularda kalıcı diöstruslara neden olmuştur. Ayrıca histolojik incelemede bu yavrulara ait korpus luteumların, bazofilik, küçük ve iğ şeklinde luteal hücrelerden oluştuğu, uterusun luminal ve glandular epitelyumlarının ise önemli oranda kalınlaştığı ve bu hücrelerdeki östrojen reseptör alfa (ER α)'nın önemli derecede down regule olduğu belirlenmiştir (Mendoza-Rodríguez ve ark. 2011).

Anneye uygulanan 0.05 – 5 mg/kg BPA ile doğum öncesi periyotta BPA'ya maruz kalan koyunların östrus siklusu sırasında gerçekleşen LH pikinin zamanında ve foliküler dalga dinamiğinde bozulmalara neden olduğu rapor edilmiştir (Veiga-Lopez ve ark. 2014).

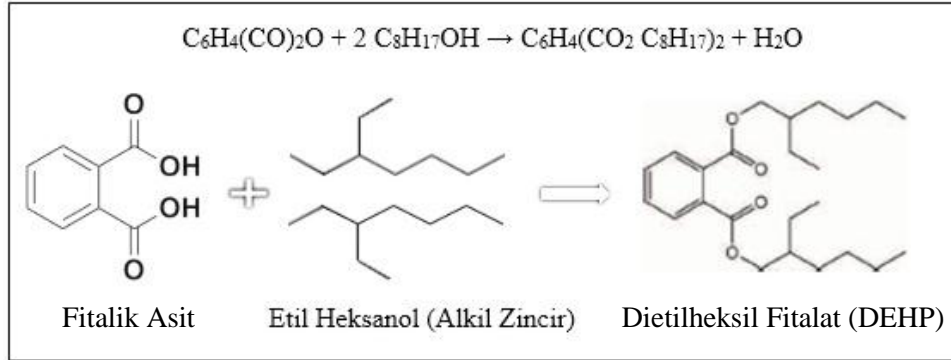
1.2.2. Fitalatlar

Fitalatlar, polivinil klorür (PVC) plastikleri gibi sert yapılı malzemelere esneklik katmak için, yaygın bir şekilde kullanılan sentetik kimyasal maddelerdir (Andrade ve ark. 2006). Fitalik asidin alkil diesterlerinden oluşan bu sentetik kimyasallar, sahip oldukları alkil zincirlerinin değişken uzunluklarına göre, Dietilheksil Fitalat

(DEHP), Dibutil Fitalat (DBP), Dietil Fitalat (DEP), Butil Benzil Fitalat (BBP), Diisobutil Fitalat (DIBP), Diisononil Fitalat (DINP) gibi farklı isimler alırlar (Hannon ve Flaws 2015). Bu fitalatlar arasında en çok kullanılan tür, dioktil grubuna ait olan DEHP'tir (ATSDR 2002).

1.2.2.1. Dietilheksil Fitalatın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Dietilheksil fitalat (DEHP), plastikleştirici olarak kullanılan fitalatların en yaygın bulunan alt sınıfıdır. Fitalik asit ile dallanmış iki etilheksanolün reaksiyona girerek diester bağıyla bağlanmaları sonucu oluşan DEHP (Şekil 1.10), yüksek lipofilik özelliğe sahip, ancak renksiz, kokusuz ve suda çözünürlüğü düşük olan, yağlı sıvı yapısında bir kimyasaldır (Hannon ve Flaws 2015, Ceresana 2016).



Şekil 1.10. Dietilheksil fitalatın sentezi (NTP-CERHR 2006'dan uyarlandı).

Bis (2-etilheksil) fitalat, Di- oktil fitalat gibi isimlerle de anılan DEHP, 390.56 g/mol molekül ağırlığına sahiptir ve kimyasal olarak $\text{C}_8\text{H}_4(\text{C}_8\text{H}_{17}\text{COO})_2$ şeklinde formülize edilmektedir. DEHP ile ilgili diğer bazı özellikler Çizelge 1.2'de verilmiştir (Ceresana 2016).

Çizelge 1.2. Dietilheksil fitalatın fiziksel ve kimyasal özellikleri (Pubchem 2016b).

Genel Adı	Bis(2-ethylhexyl) phthalate
IUPAC Adlandırılması	Bis(2-ethylhexyl) benzene-1,2-dicarboxylate
Diğer İsimleri	DEHP (Diethylhexylphthalate)
	Di-sec octyl phthalate
	Octyl phthalate
CAS Numarası	117-81-7
EC Numarası	204-211-0
Moleküler Ağırlığı	390.56 g/mol
Kimyasal Formülü	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
Yapısal Formülü	C ₆ H ₄ (COOC ₈ H ₁₇) ₂
Dış Görüntüsü	Renksiz, yağlı sıvı
Kokusu	Hafif kokulu
Yoğunluğu	0.99 g/mL (20°C)
Erime Noktası	-50 °C
Buhar Basıncı	20°C'de (<0.01 mm/Hg)
Kaynama Noktası	385 °C
Alevlenme Noktası	216 °C
Sudaki Çözünürlüğü	2.70x10 ⁻¹ mg/L (25 °C)

1.2.2.2. Dietilheksil Fitalatın Kullanıldığı Alanlar

Dünya genelinde yılda 3 milyon tondan fazla üretilmekte olan fitalatlar arasında, başta PVC türü plastik ürünler olmak üzere oyuncak, kozmetik ve ilaç sanayi gibi çeşitli ürünlerde plastikleştirici olarak kullanılan DEHP, yıllık üretim hacminin yaklaşık 2 milyon ton olmasıyla, en yaygın bulunan fitalat sınıfını oluşturmaktadır (NTP-CERHR 2006). DEHP 2010 yılında da %54'lük pazar payı ile en yüksek üretim hacmine sahip kimyasal olmuştur (Ceresana 2016).

Uygun özellikleri ve düşük maliyetinden ötürü, DEHP, PVC'den elde edilen ürünlerin imalatında plastikleştirici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tür plastikler ürünler %1 ila %40 oranında DEHP içerebilmektedir (Lorz ve ark. 2007). Masa örtüleri, mobilya ve yer döşemeleri, duş perdeleri, bahçe hortumları, yağmurluk, plastik bebek ve oyuncaklar, ayakkabı, tıbbi tüpler ve yüzme havuzları da DEHP'in kullanıldığı ürünler arasında yer almaktadır (ATSDR 2002).

Tıbbi sahada da birçok ürün içerisinde bulunan DEHP, intravenöz tüpler ve kateterler, kan torbaları ve transfüzyon tüpleri, nazogastrik tüpler, diyaliz torbaları ve tüpleri ve inhalasyon tüpleri gibi tıbbi malzemeleri daha yumuşak ve esnek yapmak için kullanılmaktadır (MHRA 2015).

Dietilheksil fitalat, ayrıca, kayganlaştırıcılar, yapıştırıcılar ve köpük gidericilerde de sıklıkla kullanılmakla beraber, parfüm ve saç spreylere gibi kozmetik ürünlerin, ahşap kaplamaların ve pestisit türü ilaçların yapısına çözücü ve matris (kalıp) olarak katılmaktadır (NTP 1998)

1.2.2.3. Dietilheksil Fitalata Maruziyet Yolları

Endüstriyel gelişim ve sentetik kimyasalların çevreye bırakılması ile birlikte son yıllarda, insan ve hayvanların endüstriyel kaynaklı kimyasal maddelere ve pestisit türü ilaçlara potansiyel olarak sürekli maruz kalması giderek artan bir endişe konusu haline gelmiştir (Grossman ve ark. 2012).

Plastiklere kovalent olmayan bağlarla bağlanan fitalatlar, bu tür ürünlerden hava, toprak ve tarım arazileri, doğal ve atık su kaynakları ve tortular (sedimentler) gibi çevresel ortamlara geçmektedir/sızmaktadır. Havaya geçen fitalatların toz parçacıklarına bağlanarak tekrar yere indiği bildirilmektedir (ATSDR 2002). Yapılan araştırmalar sonucunda, kentsel (0.01-30.1 mg/kg) ve tarımsal topraklarda (0.02-264 mg/kg), tatlı, tuzlu ve endüstriyel su kaynaklarında (0.29 ila 1.24 mg/l) ve sedimentlerde (0.01-115 mg/kg) değişen oranlarda fitalat bulunduğu tespit edilebilmiştir. Kentlerdeki kanalizasyon atık suları da başka bir fitalat birikim kaynağıdır (Berge ve ark. 2013). Farklı sığır çiftliklerinde yapılan bir çalışmada, çiftlik etrafında bulunan toprak, su, gübre ve silajda değişen oranlarda DEHP tespit edildiği, bunların sindirim yoluyla vücuda alındığı belirtilmiştir (Fierens ve ark. 2012).

Yaygın bir şekilde kullanılması ve çevrede uzun süreler varlığını koruması nedeniyle, insanlar ile evcil ve yabani hayvanların fitalatlara maruz kalması kaçınılmaz hale gelmektedir (Heudorf ve ark. 2007). İnsan ve çiftlik hayvanları,

günlük hayatları içerisinde sindirim, solunum ve deri teması yoluyla potansiyel olarak bu bileşiklere maruz kalmaktadırlar (Grossman ve ark. 2012). Çeşitli maruziyet yollarıyla vücuda alınan DEHP, karaciğer, bağırsak ve kandaki esterase enzimleri tarafından hızla, fitalik asit diesterlerine ve fitalatların biyolojik olarak aktif formları olan mono esterlerine hidrolize edilirler (Lyche ve ark. 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kan, idrar ve anne sütü gibi bazı vücut sıvılarında DEHP tespit edilmiştir (Hines ve ark. 2009). Sığırlardan alınan aynı vücut sıvılarında da DEHP bulunduğu bildirilmiştir (Kalo ve ark. 2015).

1.2.2.4. Dietilheksil Fitalatın Toksik Etkileri

Farklı yer ve zamanlarda yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla, DEHP ve onun birincil metaboliti olan monoetilheksil fitalat (MEHP) başta üreme fizyolojisi olmak üzere kalp, karaciğer, böbrek beyin gibi hayati organlarda da çeşitli hasarlara neden olduğu ortaya konmuştur (Erkekoglu ve ark. 2012, Posnack ve ark. 2012, Aung ve ark. 2014, Erkekoglu ve ark. 2014)

Yeni doğmuş ratlardan elde edilen kalp kası hücrelerine *in vitro* ortamda 72 saat boyunca uygulanan 128 ve 256 μM DEHP'in hücrelerde metabolik hasara neden olduğu belirtilmiştir (Posnack ve ark. 2012). Kültüre edilen böbrek epitel hücrelerinde ise, MEHP'in 0.1-500 μM arasındaki konsantrasyonları doza bağımlı olarak hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur (Rothenbacher 1998). Yine böbrek ve karaciğerde DEHP'in oksidatif strese bağlı hasara da sebep olduğu bildirilmektedir (Erkekoglu ve ark. 2012, Erkekoglu ve ark. 2014). Fare beyninden izole edilen bir nöron hücre hattına (Neuro-2a cells), değişik konsantrasyonlarda (1, 10 ve 100 μM) muamele edilen DEHP'in, 24 saatlik inkübasyonun ardından 100 μM dozda, oksidatif stresle ilişkili bir enzim olan hemoksijenaz-1 (HO-1)'in artan ekspresyonuyla ilişkili olarak, kaspas 3 bağımlı apoptozisi uyardığı belirtilmiştir (Aung ve ark. 2014).

In vitro ortamda rat osteoblast hücreleriyle yapılan bir çalışmada, hücrelere uygulanan 10-1000 μM doz DEHP, hücrelerin farklılaşmasını ve hücre matriksinin

mineralizasyonunu olumsuz yönde etkilerken, inkübasyonun 24. saatinde 100 ve 1000 μM dozlar, 48. saatte ise sadece en yüksek doz hücre canlılığını önemli derecede azaltmıştır (Bhat ve ark. 2013). Fare miyoblast hücre hattının kullanıldığı bir araştırmada, hücrelere uygulanan 10-1000 $\mu\text{g/mL}$ DEHP, MyoD ve myogenin gibi miyojenik düzenleyici faktörlerin baskılanması yoluyla miyogenik farklılaşmayı bozduğu, dolayısıyla DEHP'in miyogenez sürecini de etkileyen bir endokrin bozucu olduğu ortaya konmuştur (Chen ve ark. 2013).

Gebe ratlara 10 gün boyunca uygulanan 100 mg/kg DEHP'in, doğan erkek yavruların 21 ve 35. günlerde ölçülen serum LH ve testosteron düzeyini önemli derecede düşürdüğü belirlenmiştir. Aynı ekibin prepubertal ratlarda yaptığı deneyde 1-200 mg/kg gavaj yoluyla 14 gün uygulanan DEHP, bazal ve LH uyarımlı testosteron üretimini 100 ve 200 mg/kg dozda önemli derecede baskılamıştır (Akingbemi ve ark. 2001). Başka bir çalışmada ise, ratlara puberta zamanında uygulanan yüksek dozdaki DEHP'in, pubertanın gecikmesine, testosteron üretiminin düşmesine ve androjene bağımlı gelişimin inhibe edilmesine neden olduğu belirtilmiştir (Noriega ve ark. 2009). Yetişkin ve immatur ratlardan izole edilen Leydig hücrelerine *in vitro* ortamda 10-250 μM arası dozlarda MEHP uygulanmıştır. Sonuçlar, en yüksek dozun, steroidogenez sürecine katılan StAR protein ekspresyonunda ve testosteron üretiminde önemli derecede (yaklaşık %60 oranında) azalma meydana geldiğini göstermiştir (Svechnikov ve ark. 2008).

Fare Leydig tümör hücre hattı olan MA-10 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle 1-1000 μM DEHP ve MEHP uygulanmış; ilk inkübasyon periyodunun ardından (24 saat) hücre canlılığını sadece MEHP'in en yüksek dozu etkilerken (%30), 48. saat sonunda DEHP'in en yüksek iki dozu (100 ve 1000 μM) da sırasıyla %40 ve %60 oranında hücre canlılığını azaltmıştır. MEHP ise aynı inkübasyon süresinin sonunda yine sadece en yüksek dozda hücre canlılığını önemli derecede azaltmıştır (%85). Hücre canlılığının etkilenmediği 0.1-100 μM dozlarının steroid sentezi üzerine etkisi incelendiğinde, DEHP'in uygulanan tüm dozları (yaklaşık %45) MEHP'in ise sadece en yüksek dozunun (%30) progesteron sentezini önemli derecede düşürdüğü belirlenmiştir (Piche ve ark. 2012). Ratların Leydig tümör hücre hattı (R2C cell line) ve MA-10 cell ile yapılan bir diğer çalışmada da

hücrelere uygulanan 1-100 μM MEHP'in testosteron üretimini önemli oranda azalttığı tespit edilmiştir (Balbuena ve ark. 2013).

1.2.2.5. Dietilheksil Fitalatın Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Dişi üreme sistemi, üreme ve soyun devamlılığı için büyük önem taşımaktadır. Yavruların sağlığı/soyun devamlılığı fertilitenin korunmasıyla ilişkilidir. DEHP hayvanların üreme fizyolojisi üzerinde çeşitli toksik etkilere neden olmaktadır (Li ve ark. 2012).

Fitalatların dişi üreme sistemi üzerindeki etkileriyle ilgili araştırmalar öncelikle deney hayvanları ve çiftlik hayvanlarındaki fertilitenin korunmasıyla ilişkilidir. DEHP hayvanların üreme fizyolojisi üzerinde çeşitli toksik etkilere neden olmaktadır (Li ve ark. 2012).

Deneysel olarak yapılan bir araştırmada, farelere gavaj yoluyla 16 hafta boyunca 125-2000 mg/kg DEHP uygulanmış. Sonuçlara göre, 500 ve 2000 mg/kg DEHP uygulanan grubun farelerinde, serum progesteron düzeyi önemli derecede azalırken, uygulanan dozların östrojen ve testosteron seviyesi üzerine önemli bir etkisi görülmemiştir. Ayrıca yüksek doz DEHP uygulanan bu iki grupta, östrus fazında önemli bir değişiklik olmaksızın siklus süresinde dikkate değer bir uzama ve apoptotik granuloza hücrelerinde artış gözlenmiştir (Li ve ark. 2012).

Gebelik sırasında DEHP'e maruz kalınmasının, prematüre doğum, düşük doğum ağırlığı ve fetal kayıp oranlarında artışla sonuçlanan plasental büyüme ve gelişmede bozulmalara neden olduğu bildirilmektedir (Lin ve ark. 2013). Kültür ortamında 125-500 μM MEHP uygulanan fare fetal oositlerinde 24 saatlik inkübasyonun ardından 250 ve 500 μM dozlarının hücre canlılığını önemli derecede azalttığı görülmüştür (Bonilla ve del Mazo 2010). Yeni doğan farelerin ovaryumlarına kültür ortamında 72 saat boyunca 10-100 μM DEHP uygulanmış. Sonuçlar, germ hücre havuzunda kalmaya devam eden oosit sayısında artış, primordiyal folikül sayısında ise dikkate değer azalma olduğunu göstermiştir.

Ayrıca apoptotik oosit sayısında da önemli derecede artış gözlenmiştir (Zhang ve ark. 2014).

İn-vitro ortamda muamele edilen DEHP (1-100 µg/mL) ve MEHP (0.1-100 µg/mL)'in değişik dozları fare antral folikülünün büyümesini baskılamıştır. Her iki kimyasalın da 72. saatte başlayan baskılayıcı etkisi, kültürün 96. saatine kadar devam etmiştir. Burada baskılayıcı etkinin oksidatif stres kaynaklı atreziye olduğu düşünülmektedir. Özellikle DEHP'in 10 µg/mL dozda MEHP'in ise 1-100 µg/mL dozda foliküllerdeki ROS seviyesini önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir (Wang ve ark. 2012a, Wang ve ark. 2012b).

Dişi ratların ovaryumlarından elde edilen antral foliküller ise, folikül gelişimi ve östradiol seviyesi üzerine, değişik konsantrasyonlardaki DEHP (2.77-277 µM) ve MEHP (0.34-34 µM)'in etkisini araştırmak için 96 saat süreyle kültüre edilmiştir. İnkübasyonun 48. saatinden itibaren DEHP'in, 72. saatinden itibaren de MEHP'in tüm dozları folikül gelişimini önemli derecede olumsuz etkilemiştir. Ayrıca toplam inkübasyon süresinin sonunda DEHP ve MEHP in yüksek dozlarının östradiol seviyesini önemli oranda azalttığı belirtilmiştir (Gupta ve ark. 2010).

Rat granuloza hücrelerine *in vitro* ortamda 24 saat boyunca uygulanan MEHP, 100 µM dozda, hücrelerin FSH uyarımlı cAMP birikimini %40 oranında azaltmış ve doza bağlı olarak progesteron üretimini düşürmüştür (Treinen ve ark. 1990). Aynı hücre tipiyle yapılan başka bir çalışmada, MEHP (0-400 µM)'in 48 saatlik inkübasyonun ardından FSH-cAMP yolağından bağımsız olarak östradiol üretimini baskıladığı tespit edilmiştir (Davis ve ark. 1994b).

İmmatur/prepubertal dönemdeki 20 günlük dişi ratlara uygulanan 500 mg/kg/10 gün DEHP, kontrol grubuna göre serum progesteron seviyesini 2 kat, östrojen düzeyini 5 kat azaltırken, LH seviyesini artırmıştır. Ayrıca bu ratlardan elde edilen ve *ex-vivo* olarak kültüre edilen granuloza hücrelerinde de, gonadotropin uyarımlı progesteron üretiminin önemli oranda (%30) azaldığı ve kolesterolün mitokondri içine taşınmasının baskılandığı belirlenmiştir (Svechnikova ve ark. 2007).

Pubertadaki dişi ratlara oral gavaj yoluyla 28 gün boyunca uygulanan 150-250 mg/kg DEHP, korpus luteum sayısında azalmaya neden olmuştur (Ma ve ark. 2011). Yetişkin ratlara uygulanan 300-600 mg/kg DEHP de korpus luteum sayısını düşürmüştür (Xu ve ark. 2010). Dişi yetişkin ratlara oral gavaj yoluyla uygulanan 2g/kg/12 gün DEHP, östrus siklusunun uzamasına neden olmuştur. Ayrıca 8 günün üzerindeki maruziyetler, serum östrojen seviyesinin önemli derecede azalmasına, bu da FSH seviyesinde artışa neden olmuştur. Yüksek FSH düzeyi tonik LH dalgasının şekillenmesini baskıladığı için DEHP uygulanan ratlarda ovulasyonun gecikmesine veya engellenmesine neden olmuştur (Davis ve ark. 1994a).

Deney hayvanlarının yanı sıra, çiftlik hayvanları üzerinde de yapılan bazı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur. Örneğin, dişi koyunlar ile yapılan *in vivo* bir çalışmada kas içi enjeksiyonla 2 ay boyunca uygulanan 25 ve 50 mg/kg DEHP'in luteal fonksiyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, kontrol grubuna göre DEHP uygulanan koyunlarda, doza bağlı olarak korpus luteumun gelişim oranında azalma ve gerileme hızında ise artış meydana geldiğini göstermiştir. Buna bağlı olarak daha küçük bir korpus luteum ve dikkate değer oranda kısalmış östrus siklusu gözlenmiştir (Herreros ve ark. 2013). İneklere sondayla 3 gün su içerisinde 100 mg/kg DEHP verildiğinde, DEHP'in ovaryum fizyolojisi ve oosit olgunlaşmasında olumsuz etkilere sebep olduğu belirlenmiştir. Özellikle DEHP uygulanan grupta, foliküler sıvıdaki östrojen düzeyinde azalma ve foliküler gelişim süreci ile korpus luteum oluşumunda ve regresyonunda önemli hasarların meydana geldiği belirtilmiştir (Kalo ve ark. 2015)

İn vitro ortamda FSH ile olgunlaştırılan domuz kumulus-oosit kompleksi çeşitli konsantrasyonlarda DEHP ile muamele edildiğinde, 1 µM DEHP konsantrasyonunun 44 saatlik inkübasyon sonucunda progesteron üretimini artırdığı tespit edilmiştir (Mlynarčíková ve ark. 2009). Ancak at oositleriyle yapılan başka bir *in vitro* çalışmada, 0.12 - 1200 µM DEHP'in oosit maturasyonunu önemli oranda baskıladığı, granuloza hücrelerinde ROS (reaktif oksijen türleri) seviyesinin ve apoptozisin artışına neden olduğu belirlenmiştir (Ambruosi ve ark. 2011). Kültür ortamında inek oositlerine olgunlaşma süresince uygulanan 0, 25, 50 ve 100 µM DEHP ve onun birincil metaboliti olan MEHP, kontrol grubuna kıyasla, 50 µM

dozda nükleer olgunlaşmaya ulaşmış oosit sayısında önemli derecede azalmaya, apoptozise uğrayan oosit sayısında ise önemli oranda artışa neden olmuştur. Ayrıca hem DEHP hem de MEHP'in fertilizasyon sonrası hücrelerin bölünme hızında ve embriyonun blastosit aşamaya ulaşma oranında düşüşe neden olduğu belirtilmiştir (Grossman ve ark. 2012). İnek granuloza ve luteal hücreleriyle yapılan başka bir çalışmada, hücrelerin 72 saat boyunca 0.1-10 ng/mL DEHP ve MEHP'e maruz kalması oksitosin üretim miktarını önemli derecede artırmıştır (Wang ve ark. 2010).

1.2.3. Polibromlu Difenileterler

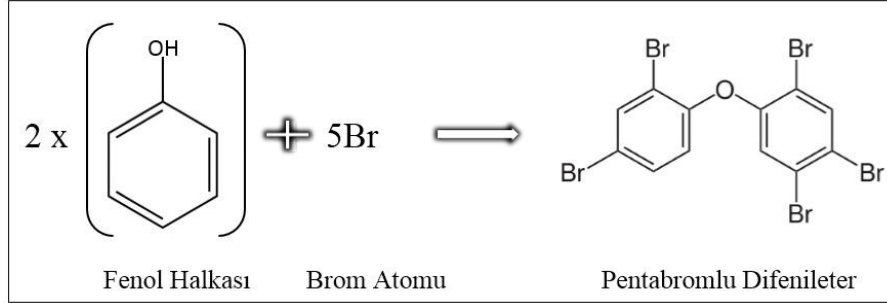
Polibromlu difenileterler (PBDE) bromlu alev geciktiricilerin en önemli gruplarından biridir. Bu ürünler genellikle hazır yapım plastik ürünlerde bulunurlar. PBDE'ler dünya genelinde büyük miktarlarda kullanılmakta ve çevrede uzun süre varlığını korumaktadırlar (Darnerud ve ark. 2001).

Yaklaşık 209 maddeden oluşan PBDE ailesinin her bir üyesi "congener"/türdeş ifade edilen 10 gruba ayrılmıştır. Bunlarda sahip oldukları brom atomu sayısına göre mono-, di-, tri-, ..., octa-, nona-, decabromlu difenil eter biçiminde adlandırılırlar (Harley ve ark. 2010). Ancak brom atomu sayısı 4'ün altında olan PBDE'lerin ticari üretimleri pek yoktur (Darnerud ve ark. 2001). Polibromlu difenileterler içerisinde bir türdeş/"congener" grup oluşturan pentabromlu difenileterler arasında önemli bir yeri bulunan ve en yaygın kullanılan PBDE türü 2,2',4,4',5-Pentabromlu difenileter yani PBDE 99'dur (La Guardia ve ark. 2006).

1.2.3.1. Pentabromlu Difenileter 99'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Pentabromlu difenileter (PBDE 99), polibromlu difenileterler (PBDE) grubuna ait ve 5 brom atomuna sahip bir alev geciktiricidir. Piyasada ticari olarak bulunan PBDE-99'lar beyaz renkli toz/kristal şeklinde, kokusuz ve suda çözünürlüğü düşük

kimyasallardır. Ancak fiziksel, kimyasal ve biyolojik bozunmaya karşı oldukça dirençli, lipofilik özelliğe sahip bir bileşiktir (Darnerud ve ark. 2001, Pubchem 2016c).



Şekil 1.11. Pentabromlu difenileter 99'un sentezi (Darnerud ve ark. 2001'dan uyarlandı).

İki fenol halkası ile beş brom atomunun reaksiyonu sonucu oluşan PBDE 99'in (Şekil 1.11), kimyasal formülü $\text{C}_{12}\text{H}_5\text{Br}_5\text{O}$ ve moleküler ağırlığı 564.691 g/mol'dür. PBDE 99'a ait bazı genel bilgiler aşağıda verilmiştir (Pubchem 2016c).

Çizelge 1.3. Pentabromlu difenileter 99'un fiziksel ve kimyasal özellikleri (Pubchem 2016c).

Genel Adı	Pentabromlu difenileter
IUPAC Adlandırılması	1,2,4-tribromo-5-(2,4-ibromophenoxy) benzene
Diğer İsimleri	BDE 99
	2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether
CAS Numarası	32534-81-9
EC Numarası	251-084-2
Moleküler Ağırlığı	564.691 g/mol
Kimyasal Formülü	$\text{C}_{12}\text{H}_5\text{Br}_5\text{O}$
Dış Görüntüsü	Beyaz toz veya katı kristal yapıda
Kokusu	Kokusuz
Yoğunluğu	2.25-2.28 g/mL
Erime Noktası	-5 °C
Buhar basıncı	3.50×10^{-7} mm Hg (25 °C)
Kaynama Noktası	200-300 °C
Sudaki Çözünürlüğü	0.0133 mg/L

1.2.3.2. Pentabromlu Difenileter 99'un Kullanıldığı Alanlar

PentaBDE 99 ticari olarak genellikle poliüretan köpeklerde ve plastik ürünlerde sadece alev geciktirici özellik katmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla, birçok farklı polimer, reçine ve dayanıklı polistren gibi yaygın plastik türü ürünlerin yapısına katkı maddesi olarak %5-30 oranı konsantrasyonlarda karıştırılmaktadır (UNEP 2007). PentaBDE 99 içeren ürünler arasında plastiklerin yanısıra, elektronik ve inşaat malzemeleri, bilgisayar ve TV setleri, tekstil ve değişik birçok ürün yer almaktadır (Darnerud ve ark. 2001).

Yıllık üretim hacmiyle ilgili yeterli ve güncel bilgi bulunamayan PBDE 99'un, 2000'li yılların başında, Brom Bilim ve Çevre Forumu tarafından dünya genelinde yıllık 7500 ton civarında üretimi yapıldığı bildirilmiştir (BSEF 2001).

1.2.3.3. Pentabromlu Difenileter 99'a Maruziyet Yolları

PentaBDE'ler ilave edildikleri polimerlere kovalent olmayan bağlarla bağlandıkları için, bu tür ürünlerin üretimi, kullanımı ve atılması/uzaklaştırılması gibi süreçlerde çevreye yayılabilmektedirler (Sjödın ve ark. 2001). Dolayısıyla, son yıllarda, çevreye yayılan ve burada bulunan polibromlu difenileterlerin konsantrasyonlarında ciddi bir artış meydana geldiği düşünülmektedir (Gregoraszcuk ve ark. 2012).

Çeşitli ürünlerde alev geciktirici olarak kullanılan PBDE'ler, bu tür ürünlerin atıklarından da çevreye yayılıp, etrafı kontamine etmektedirler. Çünkü bu atıklar genellikle çöp toplama alanlarında depolanmakta veya yakılarak imha edilmektedir. Burada içerisinde bulunduğu ürünlerden ayrılarak çevreye yayılan PBDE 99 hava, su, toprak, gıda, tortu, çamur ve toz parçacıkları gibi çevresel faktörlerin içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunabilmektedir. Yakarak imha işleminin de PBDE'lerin çevreye yayıldığı önemli yollarından biri olduğu düşünülmektedir (UNEP 2007).

PentaBDE'lerin suda çözünürlüğü düşüktür; ancak, çevredeki partiküllere bağlanma konusunda oldukça yüksek affiniteye sahiptirler. Böylece sedimentler içerisinde birikebilirler. Ayrıca yüksek lipofilik özelliğe sahip olmaları ve bozunmaya karşı oldukça dirençli olmaları nedeniyle çevrede uzun süre varlıklarını koruyabilirler (Darnerud ve ark. 2001).

İnsanlar sindirim ve solunum yoluyla düşük konsantrasyonlarda PBDE'e maruz kalıyor olsa da, PBDE'lerin anne sütü, kan ve yağ dokularında biyolojik birikime uğradığı bildirilmektedir. Özellikle insan ve evcil hayvanlarda bulunan bazı PBDE türevlerinin seviyeleri, bu konudaki endişeleri de artırmıştır. Dolayısıyla, geri dönüşüm tesisleri ve PBDE içeren ürünlerin tamir edildiği yerlerde çalışan insanların sağlığı açısından biyobirikim durumu ayrı bir önem arz (Picard ve Favaro 2015).

Farelerde yapılan bir çalışmada (Darnerud ve Risberg 2006), deneysel olarak uygulanan PBDE 99'un, karaciğer, beyin, adrenal korteks ve ovaryum gibi yağlı organlarda lokalize olduğunu gösterilmiştir. Ratların serum ve yağ dokusunda tespit edildiği bildirimleri de bulunmaktadır (Faass ve ark. 2013).

1.2.3.4. Pentabromlu Difenileter 99'un Toksik Etkileri

Pentabromlu difenileterlerin sinir sistemi üzerinde, motor davranış bozuklukları, öğrenmeyi azaltma ve hafıza sürecinde düşüş gibi etkileri bulunduğu bildirilmektedir (Branchi ve ark. 2003). Bir nöroglial hücre tipi olan insan astrositoma hücre hatlarında, 25-100 μ M PBDE 99 konsantrasyonlarının, doza bağlı olarak DNA kırıklarını artırarak apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (Mada ve ark. 2004). Belles ve ark. (2010)'ı yetişkin ratlara uyguladıkları tek doz 0.6 ve 1.2 mg/kg PBDE 99'un beyinde özellikle de serebellumda oksidatif strese bağlı hasara yol açtığını belirtmişlerdir.

Rat adrenal medulla hücre hatlarına 48 saatte bir medyum değiştirerek 6 gün boyunca 10-50 μ M PBDE 99 uygulanmış ve tüm konsantrasyonlarda doza bağlı

olarak DNA miktarı ve hücre sayısında azalma olduğu gözlenmiştir (Slotkin ve ark. 2013).

Yapılan çalışmalarda PBDE 99'un böbrek ve karaciğer üzerine de etkili olduğu görülmüştür. Yetişkin erkek ratlara oral gavaj yoluyla uygulanan PBDE 99'un oksidatif stres artışına bağlı olarak uygulama grubunda karaciğer ve böbrek hasarı oluştuğunu göstermiştir (Albina ve ark. 2010). İnsan karaciğer hücre hattıyla (HepG2) yapılan bir çalışmada ise, hücreler 0.5-25 µM PBDE 99 ile 24 ve 48 saat süre muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PBDE 99'un HepG2 hücrelerinde proliferasyonu baskılayıp, canlılığı azalttığı, hücrelerde ROS birikimine neden olduğu, ayrıca, apoptoz belirteçlerinden kaspas 3 ve 9 aktivasyonu ile DNA kırılmalarını uyardığı belirtilmiştir (Souza ve ark. 2013). Holovac (2015) HepG2 hücrelerini 5 ve 20 µM PBDE 99 ile muamele ettiğinde, hücrelerde yağlanma meydana geldiğini gözlemlemiş ve PBDE 99'un alkole bağımlı olmayan karaciğer yağlanma hastalığı riskini artırabileceğini ileri sürmüştür.

PentaBDE 99'un üreme sistemi üzerinde oldukça etkili olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Kuzey Amerika'da yapılan bir çalışmada, çevresel düzeyde PBDE'ye maruz kalan yaşlı erkeklerde spermatogenezisin bir işareti olan serum inhibin-B düzeyinin önemli oranda azaldığı, FSH seviyesinin ise arttığı belirlenmiştir. Ayrıca yaş ilerledikçe bu ikisi arasındaki dengenin de azaldığı dikkat çekmiştir (Makey ve ark. 2016). Gebe ratlara gavajla verilen tek doz 0.06 ve 3 mg/kg PBDE 99 doğan erkek yavrularda testis ve epididimis ağırlığını azaltırken, günlük sperm üretimini ve spermatid sayısını da doza bağlı olarak önemli derecede azaltmıştır (Kuriyama ve ark. 2005).

Anne karnındayken PBDE 99'a maruz kalan erkek yavrularda, doğumdan sonraki 21. ve 160. günlerde serum testosteron seviyesinin doza bağlı olarak önemli derecede azaldığı ve yavrularda anogenital mesafenin kısaldığı gözlenmiştir (Lilienthal ve ark. 2006). Hakk ve ark. (2002) ise, erkek ratlara oral yolla 8 mg/kg PBDE 99 vermiş ve ardından ratlar 3, 6 ve 12. günlerde sakrifiye edilmiştir. Yapılan hormon ölçümü sonucunda, 3 ve 6 günlerde serum testosteron düzeyinin yaklaşık iki kat arttığı, 12. günde ise bu değer kontrol seviyesine düştüğü belirtilmiştir. Yine yetişkin erkek ratlara oral gavaj yoluyla uygulanan tek doz 0.6 ve 1.2 mg/kg

PBDE 99'un etkileri 45 gün sonra incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PBDE 99'un serum progesteron ve testosteron düzeyini önemli derecede azalttığı belirlenmiştir (Alonso ve ark. 2010).

1.2.3.5. Pentabromlu Difenileter 99'un Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Gregoraszcuk ve ark. (2008a, 2008b) yaptıkları çalışmalarda PBDE'ler için ovaryumun birincil hedef organ olduğu gösterilmiştir.

İçerisinde PBDE 99 da bulunan PBDE karışımından 0.06-60 mg/kg uygulanan ratların ovaryumlarında, preantral ve antral folikül sayılarının yaklaşık bir buçuk kat arttığı gözlenmiştir. Aynı zamanda bu foliküllerin çapları ve antrumları da artmış, granuloza ve teka katmanları önemli derecede kalınlaşmıştır. Ayrıca, diğer steroid enzimler etkilenmezken, CYP17A1 enzimi önemli oranda down regule olmuştur. Bununla beraber serum LH ve pregnanolon düzeyi azalırken, FSH ve progesteron seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Lefèvre ve ark. 2015).

Gebe ratlarla yapılan bazı çalışmalarda da doğan dişi yavruların üreme fonksiyonlarının ve özellikle ovaryumlarının etkilendiği gözlenmiştir. Gebelik sırasında tek doz 60 ve 300 µg/kg PBDE 99'a maruz kalan ratların dişi yavrularda, ovaryumların epitelyal katmanında hasar, buradaki hücrelerin organellerinde ise çözünme, şişerek genişleme ve dejenerasyona bağlı nekroz meydana geldiği tespit edilmiştir (Talsness ve ark. 2005). Anne sıçana gebeliğin 10-18 günleri arasında deri altı enjeksiyonla 1 ve 10 mg/kg PBDE 99 uygulandığında, dişi yavrularının primordiyal, primer ve sekonder folikül sayısında düşüş ve puberta başlangıç zamanında gecikme meydana geldiği gözlenmiştir (Lilienthal ve ark. 2006). Aynı deney modeliyle yapılan başka bir çalışmada, BDE 99 ile dişi yavruların hipotalamuslarındaki progesteron reseptörü mRNA ekspresyonunun azaldığı, östrojen reseptörü alfanın mRNA ekspresyonunun önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Öte yandan, PBDE 99'un deneyde kullanılan her iki dozu da, dişi yavrularda düzensiz östrus sikluslarının artmasına neden olmuştur (östrus veya

diöstrus sürelerinde artış görülmüştür. Ayrıca bu hayvanlarda kontrol grubuna göre, kur yapma, sıçrama, tırmanma ve lordozis gibi seksüel davranışların önemli derecede azaldığı bildirilmiştir (Faass ve ark. 2013).

Domuz ovaryumlarından elde edilen foliküller 0.25, 10, 17.5 ng/ml PBDE 99 ile 24 saat inkübe edilmiş, PBDE 99'un kullanılan tüm dozları progesteron, androstenedion ve testosteron üretimini önemli oranda artırırken, östrojen düzeyi ile steroid enzimlerin (CYP17A1, CYP19A1 ve 17 β -HSD) aktivitesini ve ekspresyonunu etkilemediği görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlarla PBDE99'un progesteron sentezinin daha önceki aşamalarında görev alan Star, CYP11A1 ve 3 β -HSD gibi enzimlerin aktivitesi üzerine ekili olabileceği ileri sürülmüştür (Karpeta ve ark. 2011).

Domuz granuloza ve teka hücrelerinin ko-kültüre edildiği bir çalışmada, hücreler içerisinde PBDE 99 da bulunan bir karışım ile 24 ve 48 saat süreyle muamele edilmiştir. İlk inkübasyon periyodunun ardından (24 saat) karışımın sadece düşük dozu östrojen, progesteron ve testosteron düzeylerini artırmıştır. İnkübasyonun 48. saatinden sonra ise karışımın düşük ve orta dozunun östrojen ve testosteron seviyesini artırırken, yüksek dozunun düşürdüğü belirlenmiştir. Ancak progesteronun her üç konsantrasyonda da önemli derecede arttığı gözlenmiştir (Karpeta ve Gregoraszcuk 2010).

Domuz luteal hücrelerine toplam 48 saat süreyle 50-500 ng/mL PBDE 99 uygulanan bir araştırmada (Gregoraszcuk ve ark. 2012), inkübasyonun 24. saatinde 3 β -HSD aktivitesindeki artışa bağlı olarak tüm dozlarda progesteron üretiminde önemli derecede (2 kat) artış olduğu, ancak 48. saatte önemli bir fark olmadığı ve PBDE 99 uygulanan gruplarda apoptozis markırlarından olan kaspas 3, 8 ve 9 aktivitesinde de artış meydana geldiği gözlenmiştir.

Araştırmanın konusu olan EBB'ler, üreme, gelişme ve birtakım fizyolojik davranışları kontrol eden hormonların, sentezinden vücuttan atılımına kadarki tüm metabolizmasına müdahale edebilmektedirler (Kavlock ve ark. 1996). Yakın zamanda, EBB'lerin insan ve birçok türün dişi üreme sisteminde olumsuz etkilere yol açtığı da ortaya koyulmuştur (Gregoraszcuk ve ark. 2012, Petro ve ark. 2012,

Romani ve ark. 2013). Ancak yapılan literatür taramasında EBB'lerin inek korpus luteumu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmaların çok sınırlı olduğu anlaşılmış ve luteal progesteron sentezi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya da rastlanılamamıştır. Bu nedenle tez çalışmasının amacı; modern hayatın içinde insan ve hayvanların maalesef pek çok yerde maruz kaldığı EBB'lerden BPA, DEHP ve PBDE 99'un, gıda sektörü ve ülke ekonomisi açısından önemli bir yere sahip olan sığırların siklus kontrolünde görev alan progesteron sentezi üzerine etkisini araştırmaktır. Bu amaçla sığır luteal hücreleri üzerine adı geçen EBB'lerin farklı dozları uygulanmış ve progesteron sentezi üzerine etkileri araştırılmıştır.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Araç ve Gereçler

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

1. Biyolojik hava kabini (Esco Class II BSC)
2. İverted mikroskop (Olympus, CKX41)
3. Masa üstü buharlı sterilizatör (Systec, 2540EL)
4. Paketleme cihazı (Euroseal, 2001 Plus)
5. Hava filtrasyon cihazı (Light Prossess, UV-FAN M2/55P-H-JON)
6. Distile ve ultra saf su cihazı (Millipore, Elix-5, Synergy 185)
7. Etüv (Nüve, EN 055)
8. Hassas terazi (Sartorius, CP225D)
9. Vorteks (Stuart, SA8)
10. Santrifüj cihazı (Hettich, EBA 21)
11. Mini santrifüj (Eppendorf, MiniSpin Plus)
12. Karbondioksitli inkübatör (Binder, CB 150)
13. Çalkalamalı su banyosu (Julabo, SW23)
14. Gamma sayacı (Mini-assay type 6.20)
15. Isıtmalı manyetik karıştırıcı (IKA-RET, Basic)

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Dulbecco's Modified Eagles Medyum/Nutrient mixture F-12 HAM (Sigma D8437, USA)
2. 22(R)-Hidroksikolesterol (Sigma H9384, USA)
3. 5 β -Androstan-3 β -ol-17-one (Steroloids A3670, Newport)
4. ITS Premiks (Sigma I3146, USA)
5. Antibiyotik/Antimikotik Solüsyon (Sigma, A5955, ABD)
6. Sığır Serum Albumin (Sigma, A9418, ABD)

7. Yeni Doğmuş Buzağı Serumu (Sigma, N4637, ABD)
8. Beta-Nikotinamid Adenin Dinukleotid Hidrat (Sigma, N7004, ABD)
9. Nitro Blue Tetrazolium (Sigma, N5514, ABD)
10. Trypan Blue Solüsyonu (Sigma, T8154, ABD)
11. Fosfate Buffer Solusyon Tabletleri (Sigma, P4417, ABD)
12. Sigmacote (Sigma, SL2, ABD)
13. Deoksiribonükleaz (Sigma, D4527, ABD)
14. Kollajenaz tip IA (Sigma, C2674, ABD)
15. Dimetil sülfoksit (Sigma, D2650, ABD)
16. %70 etanol
17. Bisfenol A (Sigma, 42088, ABD)
18. Bis (2-etilheksil) Fitalat (Sigma, 67261, ABD)
19. Pentabromlu difenileter 99 (MCAT GmbH, MC 9861, Almanya)
20. Paraformaldehit (Sigma, P-6148, ABD)
21. Progesteron RIA kiti (Beckman Coulter, IM1188, ABD)

2.2. Yöntem

Araştırmada endokrin bozucu bileşiklerden BPA, DEHP ve PBDE 99'un luteal hücrelerde sentezlenen progesteron hormonu üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla izolasyon işleminden sonra luteal hücreler, endokrin bozucu bileşiklerin farklı dozlarına maruz bırakılarak uygun besi yeri ortamında inkübe edildi. İnkübasyonun belirli zaman aralıklarında toplanan medyumlar hormon analizi yapılınca kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Daha sonra radioimmunoassay (RIA) yöntemiyle ticari progesteron RIA kiti (Beckman Coulter, IM1188) kullanılarak hormon ölçüm yapılarak sentezlenen progesteron düzeyindeki değişiklikler değerlendirildi.

Luteal hücrelerin izolasyonu O'shaughnessy ve Wathes (1985)'in daha önce geliştirdikleri metodda bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. Araştırma yürütülürken; laboratuvar ortamı ve deney düzeninin hazırlanması, uygun dokunun toplanması, luteal hücrelerin izole edilmesi, hücre sayımı ve boyama, hücrelere

muamele edilecek kimyasal dozlarının hazırlanması, hücre ekimi ve inkübasyonu ve hormon ölçümü basamakları izlendi.

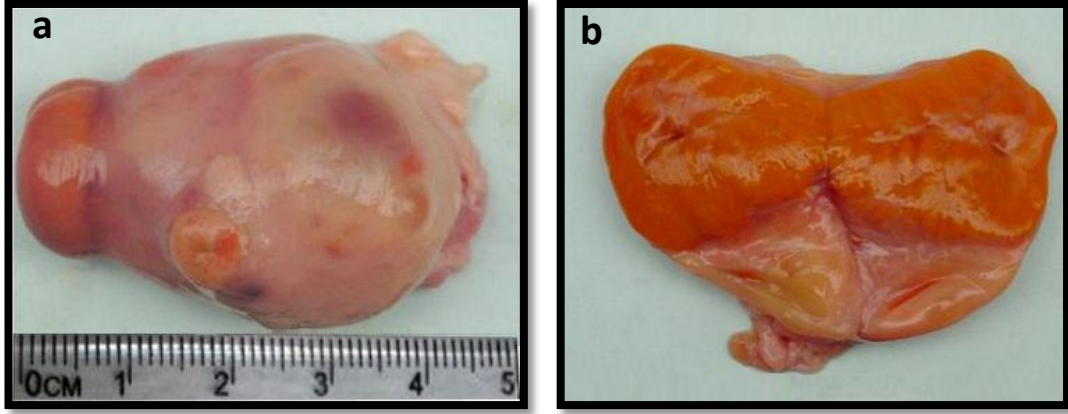
2.2.1. Laboratuvar Ortamı ve Deney Düzeninin Hazırlanması

Araştırmada kullanılan pastör pipeti, erlenmayer, huni vb. bazı cam malzemelerin iç yüzeyini pürüzsüzleştirmek amacıyla bu malzemeler önce Sigmacote (Sigma SL2, USA) adlı kimyasal bir solüsyondan sonra da birkaç defa distile sudan geçirildi. Bütün malzemeler sterilizasyon için tek tek paketlenerek otoklava konuldu ve 120 °C'de, 20 dakika sterilize edildi. Plastik malzemeler de tek kullanımlık ve steril olanlardan seçildi.

Deneyden bir gün önce laboratuvar dezenfekte edildi ve deneyden en az 2-3 saat önce de hava filtrasyon cihazı çalıştırıldı. Bu sırada biyolojik kabine alınan malzemeler 15 dakika boyunca ultra viole (UV) ışınına maruz bırakıldı.

2.2.2. Uygun Dokunun Toplanması

Çalışmada *in vitro* deney modeli olarak tercih edilen luteal hücrelerin kaynağı olan inek ovaryumları yerel mezbahalardan temin edildi. Kesilen hayvanlardan alınan ovaryumlar oldukça hızlı bir şekilde, steril şartlarda ve soğuk zincir altında laboratuvara taşındı. Ovaryumlar üzerinde bulunan korpus luteum dokuları Ireland ve ark. (1980) tarafından daha önceden belirlenmiş olan kriterlere göre (Çizelge 2.1.) incelenerek midluteal dönem içerisinde bulunan korpus luteumu barındıran en uygun ovaryum deneyde kullanılmak üzere ayrıldı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Uygun ovaryum ve korpus luteumun dış (a) ve iç (b) görüntüsü.

Çizelge 2.1. İneklerde östrus siklusu süresince ovaryum ve korpus luteumda gerçekleşen yapısal değişiklikler. KL: Korpus Luteum (Ireland ve ark. 1980).

Korpus Luteumun	Östrus Siklusunun Aşamaları			
	1. (1-4)	2. (5-10) Midluteal	3. (11-17) Midluteal	4. (18-20)
Dış görünümü	Renk: Kırmızı Ovulasyon: Henüz şekillenmiş Ovulasyon Noktası: Epitel doku tarafından daha örtülmemiş	Renk: KL'un tepe noktası kırmızı / kahverengi Ovulasyon Noktası: Epitel doku tarafından örtülmüş	Renk: Turuncu / hafif kahverengi	Renk: Açık sarı / beyaz
İç görünümü	Renk: Kırmızı nadiren kanla dolu, doku gevşek yapılı	Renk: KL'un tepe noktası kırmızı / kahverengi kalan kısmı turuncu	Turuncu	Turuncu / sarı
Çapı	0.5 - 1.5 cm	1.6 - 2 cm	1.6 - 2 cm	1 cm'den küçük
Yüzeyindeki damarlaşma durumu	Görülmez	Daha çok periferle sınırlı	Başlangıcında periferde, süreç ilerledikçe tepe noktasına doğru seyretmekte	Görülmez
10 mm ve daha büyük folikül	Görülmez	Görülür	Kesin olmamakla birlikte, bazen görülebilir	Görülür

2.2.3. Luteal Hücrelerin İzole Edilmesi

2.2.3.1. Dokunun İzolasyon İçin Hazırlanması

Çalışma için kriterlere en uygun olan ovaryum belirlendikten sonra, yüzey dezenfeksiyonunu sağlamak için, ovaryum önce %70'lik alkolden sonra da steril fizyolojik tuzlu sudan geçirildi ve biyolojik hava kabini içindeki plastik petri kabına koyuldu. Ovaryum üzerindeki korpus luteum dokusu makas yardımıyla açıldı. Ardından eğik uçlu cerrahi makasla kapsulaya taşmadan, dokunun iç kısmından alınan luteal doku başka bir plastik petri kabına aktarıldı ve tek tarafı keskin jilet ile daha küçük parçalara ayrıldı. Kan hücrelerini uzaklaştırmak için, parçalanmış doku, huni üzerine yerleştirilen bir süzgeç (100 µm) içerisine alındı ve medyumla yıkandı. Yıkanan doku, başka bir cam huni yardımıyla ağzı vida kapaklı erlenmayere aktarılarak izolasyon medyumuna kadar +4 °C'ye kaldırıldı (O'shaughnessy ve Wathes 1985).

2.2.3.2. İzolasyon Medyumunun Hazırlanması ve Hücrelerin İzole Edilmesi

İzolasyon sırasında kullanılan medyumun bileşiminde, bağ dokuyu sindirecek ve açığa çıkan serbest hücrelerin beslenmesini sağlayacak gerekli kimyasal maddeler bulunmaktadır. Bağ dokuyu sindirerek hücrelerin tek tek açığa çıkmasını, medyuma ilave edilen kollajenaz enzimi sağlamaktadır. Bu sırada parçalanmış bağdokularından açığa çıkan DNA'nın, luteal hücrelerin birbirine yapışmasına ve kümeleşmesine neden olduğu için, ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. İzolasyon medyumuna eklenen DNA'az enzimi ortamdaki bu DNA kalıntılarını parçalayarak hücre yapışması sorunu önlemektedir. Ayrıca izolasyon işlemleri süresince hücrelerin yeteri düzeyde beslenebilmesi için, hazırlanan medyuma sığır serum albümini (BSA) eklendi. Muhtemel bakteri ve mantar kontaminasyon risklerini en aza indirmek için antibiyotik-antimikotik karışımı da ilave edildi.

Enzimatik sindirim esnasında luteal doku tek seferde bütün hücrelerine ayrılmadığı için kimyasal ayrıştırma işlemi 4-8 defa tekrarlandı. İzolasyon medyumunu hazırlanırken öncelikle 60 ml 15 mM HEPES içeren DMEM/F12 üzerine 2.5 mg/mL BSA, 0.04 mg/mL DNA'az ve %1 oranında antibiyotik-antimikotik solüsyonu ilave edildi. Bu karışımın 10 mL'si üzerine 2 mg kollajenaz eklendi. Ardından %95 saflıktaki oksijenle 2 dakika boyunca oksijenlenen medyum 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek cam erlenmayer içinde bulunan luteal dokunun üzerine aktarıldı. Ağzı sıkıca kapatılan erlenmayer, dokunun enzimatik olarak parçalanması için, 30 dakika boyunca 37 °C'deki çalkalamalı su banyosuna kaldırıldı. İlk 30 dk. tamamlandığında dokudan ayrılan ve süpernatant içinde bulunan hücreler cam pastör pipeti yardımıyla dikkatlice toplanarak steril bir falkon tüpe aktarıldı. Yeterli sayıda hücre elde etmek için enzimatik sindirim işlemi 4-8 defa tekrarlandı. Ancak ilk 30 dakikalık birinci inkübasyondan sonra diğer tüm inkübasyonlar 15 dk. arayla yapıldı. Inkübasyonlar arasında 15 mL'lik falkonlara toplanan süpernatantlar, sindirilmemiş doku artıklarını uzaklaştırmak için porları 100 µm olan steril filtreden süzülerek 50 mL'lik falkon tüpe birleştirildi. Elde edilen bu süspansiyonu enzimlerden (kollajenaz ve DNA'az) arındırmak için, tüpün boş kalan kısmı medyumla tamamlanarak 300 g/5 dk. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstte kalan sıvı kısım atıldı ve dipteki pellet dikkatlice pipetlenerek homojenize edildi. Sonra üzeri tekrar medyumla tamamlanarak santrifüj edilip yıkandı. Bu işlem üç kez tekrarlandı. En son tüpün dibinde toplanan hücreler ağzı geniş başka bir erlenmayere aktarıldı ve bir miktar medyum ile süspansiyon edildi. Ardından iki ayrı mikrotüpe belirli miktarlarda bu süspansiyondan alınarak hücre sayma işlemine geçildi (O'shaughnessy ve Wathes 1985).

2.2.4. Hücre Sayımı ve Boyama

Hücre canlılık oranının tespiti için trypan blue solüsyonu kullanıldı. Trypan blue canlılığını yitirmiş olan hücrelerin zarlarından içeri girerek hücreyi maviye boyamaktadır. Ancak Trypan blue canlı hücre membranından geçemediği için hücreler saydam-sarımsı-beyaz bir renkte gözükmektedir. Trypan blue ile canlı hücre oranını belirleyebilmek için; 50 µl hücre süspansiyonu üzerine 50 µl de trypan blue solüsyonu

eklendi. Yaklaşık 5 dk. bekledikten sonra hücre + trypan blue karışımından 10 µl alınıp Neubauer lamı üzerinde mavi renk alan hücreler ölü, boya almayan ve sarımsı-saydam renkte görülen hücreler ise canlı kabul edilerek hücreler sayıldı ve 1 ml'deki canlı hücre sayısı belirlendi. Araştırmada canlılık oranını %80 ve üstü olan izolasyonlar başarılı olarak kabul edildi.

İnkübasyon boyunca hücrelerin büyüme ve gelişmelerini takip edebilmek için pleytte boyama gerçekleştirildi. İnkübasyonun 18. ve 96. saatlerinde kontrol grubu boyama pleytlerine, deney sonlandırıldığında (120. saat) ise, kontrol dâhil kimyasal madde uygulanan bütün grupların pleytlerine boyama yapıldı. Bunun için; öncelikle pleytin kuyucuklarındaki medyum boşaltıldı ve kuyucuklar PBS ile bir defa yıkandı ve üzerine 2 mL %1'lik paraformaldehit solüsyonu eklenerek, hücreler 20 dakika tespit edildi. Daha sonra 2 defa daha PBS ile yıkanan pleyt tabanındaki hücrelerin üzerine 800 µl özel boyama solüsyonundan (PBS içerisinde; %0.1 BSA + 1.5 mM NAD + 0.25 mM Nitro blue tetrazolium +0.2 mM 5β-androstan-3β-ol-17 one) ilave edildi. Alüminyum folyoya sarılan pleytler 37 °C'de 4 saat inkübe edildi (Bao ve ark. 1995). Bu sürelerin sonunda koyu mavi renge boyanan luteal hücrelerin yapışma, büyüme, gelişme ve dallanmaları mikroskopta çekilen fotoğraflarla görüntülendi.

2.2.5. Hücrelere Uygulanacak Kimyasal Dozlarının Hazırlanması

Hücrelere uygulanacak EBB'ler için öncelikle, 2.28 mg BPA 1 mL %70 etanolde, 3.9 mg DEHP 996.1 µl DMSO'da ve 5.64 mg PBDE 99 1 mL DMSO'da çözdürülerek 10^4 µM stok solüsyonlar hazırlandı. Daha sonra bu stoklar belli oranlarda sulandırılarak alt dozlar elde edildi. Elde edilen bu dozlar pleyt kuyucuklarındaki 2 mL'lik kültür medyumlarına eklendiğinde 100 kat daha seyreltilerek çalışmada kullanılan asıl dozlar elde edilmiş oldu.

Çalışmada kullanılan asıl dozları elde etmek için, mikrotüp içerisine konan 234 µl ve 900 µl medyumların üzerine, 10^4 µM olarak hazırlanan stok BPA solüsyonundan 100'er µl eklenerek 3000 ve 1000 µM alt dozlar elde edildi. Daha sonra 1000 µM'lık

dozdan alınan 100'er µl BPA solüsyonu mikrotüp içerisindeki 234 ve 900 µl medyumun üzerine ilave edilip sulandırılarak 300 ve 100 µM'lık alt dozlar elde edildi. Çalışmalarda kullanılan her doz için iki kuyucuk ayrıldı ve her kuyucuğa da 2 ml medyum konuldu. Daha önce hazırlanmış olan 100, 300, 1000 ve 3000 µM'lık her bir dozdan 20 µl kuyucuklardaki medyuma ilave edilerek 1, 3, 10 ve 30 µM'lık uygulama dozlarına ulaşıldı. Çözücü etkisini ortadan kaldırmak için kontrol grubuna da en yüksek dozda bulunan çözücü miktarı kadar %70 etanol (%0.1) ilave edildi. DEHP ve PBDE 99'un DMSO ile hazırlanan 10⁴ µM stok dozları da aynı miktarlarda medyum ile sulandırılarak DEHP için; 1, 3, 10 ve 30 µM ve PBDE 99 için; 0.1, 0.3, 1, 3 µM'lık uygulama dozları elde edildi (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Luteal hücrelere uygulanan endokrin bozucu bileşikler ve dozları.

BPA	DEHP	PBDE 99
1 µM	1 µM	0.1 µM
3 µM	3 µM	0.3 µM
10 µM	10 µM	1 µM
30 µM	30 µM	3 µM

2.2.6. Hücre Ekimi ve İnkübasyonu

İzole edilen luteal hücreler 6 kuyucuktan oluşan plastik hücre kültürü pleytlerine ekilerek inkübe edildi. Bu işlem için öncelikle inkübasyon boyunca hücrelerin temel ihtiyaçlarını karşılayacak besi yeri medyumunu hazırlandı. Kullanılacak pleyt sayısına göre kuyucuk başına 2 mL kültür medyumunu gelecek şekilde bir ön hesaplama yapıldı.

İhtiyaca göre hesap edilen besi ortamını hazırlamak için, 15 mM HEPES içeren Dulbecco's Modified Eagle's ve HAM's F-12 (v/v) medyumunu üzerine %10 oranında yeni doğmuş buzağı serumu (NCS) ve %1 oranında antibiyotik-antimikotik solüsyonu eklendi ve iyice karıştırıldı. Daha sonra karışım pleytlerin her bir kuyucuğuna 2 mL pipetlendi. Öte yandan, izolasyon sonucu elde edilen ve mililitresindeki hücre sayısı bilinen süspansiyon ihtiyaca göre medyumla sulandırılarak her kuyucuğuna 100'er µl

ilave edildi ve homojen bir dağılım olması için pleytler hafifçe çalkalandı. Ardından inkübasyon için 37 °C'ye ayarlanmış karbondioksitli etüve kaldırıldı.

Deney protokolüne göre hücreler toplam 120 saat boyunca inkübe edildi. Medyuma eklenen NCS yardımıyla hücrelerin pleytin tabanına yapışması için ilk 24 saatlik sürede hücrelere herhangi bir kimyasal madde uygulanmadı. On sekizinci saatte yapılan pleyt boyaması ile hücrelerin yapışma durumu incelendi. Hücre sayısı ve yapışma oranının yeterli olduğu görüldükten sonra, içerisinde NCS yerine %1'lik ITS premiksi bulunan ve daha önceden dozları ayarlanmış EBB (BPA, DEHP ve PBDE 99) içeren taze medyum hazırlandı. Yine hazırlanan bu besi ortamına steroid sentezi için luteal hücrelerin ihtiyaç duyacağı kolesterol (22R hidroksikolesterol) de 10 µg/ml olarak eklendi.

İnkübasyonun 24. saatinde pleytlerdeki eski medyum toplanıp atıldı, yerine her kuyucuğa 2'şer mL olacak şekilde, yeni hazırlanmış ve EBB eklenmiş medyum karışımı konuldu ve 37 °C'deki CO₂'li inkübatöre kaldırılarak 48 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda (96. saat) ortamdaki medyum hormon analizi yapmak üzere mikro tüplere toplandı ve -20 °C saklandı. Pleytteki hücrelere 2'şer mL EBB içeren taze hazırlanmış medyum ilave edilerek hücreler yeniden 48 saatlik inkübasyona kaldırıldı. Son inkübasyonun ardından (120. saat) pleytlerdeki tüm medyumlar mikro tüplere toplandı. Böylece luteal hücreler, 48 saat arayla iki kez BPA, DEHP ve PBDE 99'a maruz bırakılmış oldu. Denemeler aynı protokolle her bir EBB için 4 kez tekrarlanarak, toplanan tüm medyumlar hormon analizi yapılincaya kadar -20 °C'de saklandı.

2.2.7. Hormon Ölçümü

Hormon ölçümlerini yapmak için ticari progesteron kiti ile çalışan gama sayacı (Mini-Assay Type 6-20) kullanıldı. Ölçüm işlemlerinde progesteron RIA kiti (Beckman Coulter, Katalog no: IM1188) kullanıldı. Numunelerdeki mevcut hormon miktarının, kitin ölçüm aralığında olması için gerekli sulandırma oranları ön denemelerle

belirlendi. Her bir örnek çift çalışıldı. Hormon ölçümünden elde edilen sayısal değerlerin ng/ml dönüştürülmesi için AssayZap (Biosoft/United Kingdom) adlı bilgisayar programı kullanıldı.

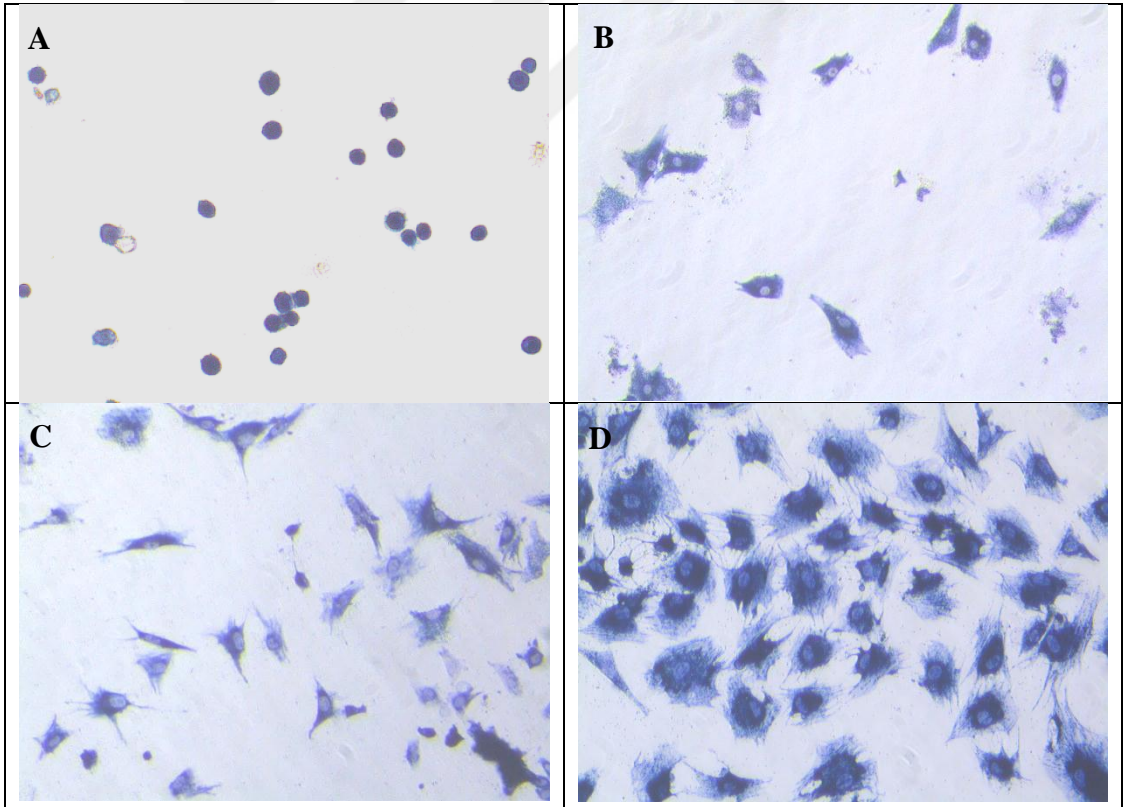
2.2.8. Verilerin İstatistiksel Analizi

Verilerin istatistiksel analizi Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA) paket programı ile gerçekleştirildi. İnkübasyonun 96. ve 120. saatlerinde elde edilen progesteron hormonunun ortalama değerleri arasındaki farklılığın hesaplanmasında tekrarlı ölçümlerde varyans analizi, farkın anlamlı olduğu gruplar arasındaki önemliliğin kontrolü için ise Tukey testi kullanıldı.

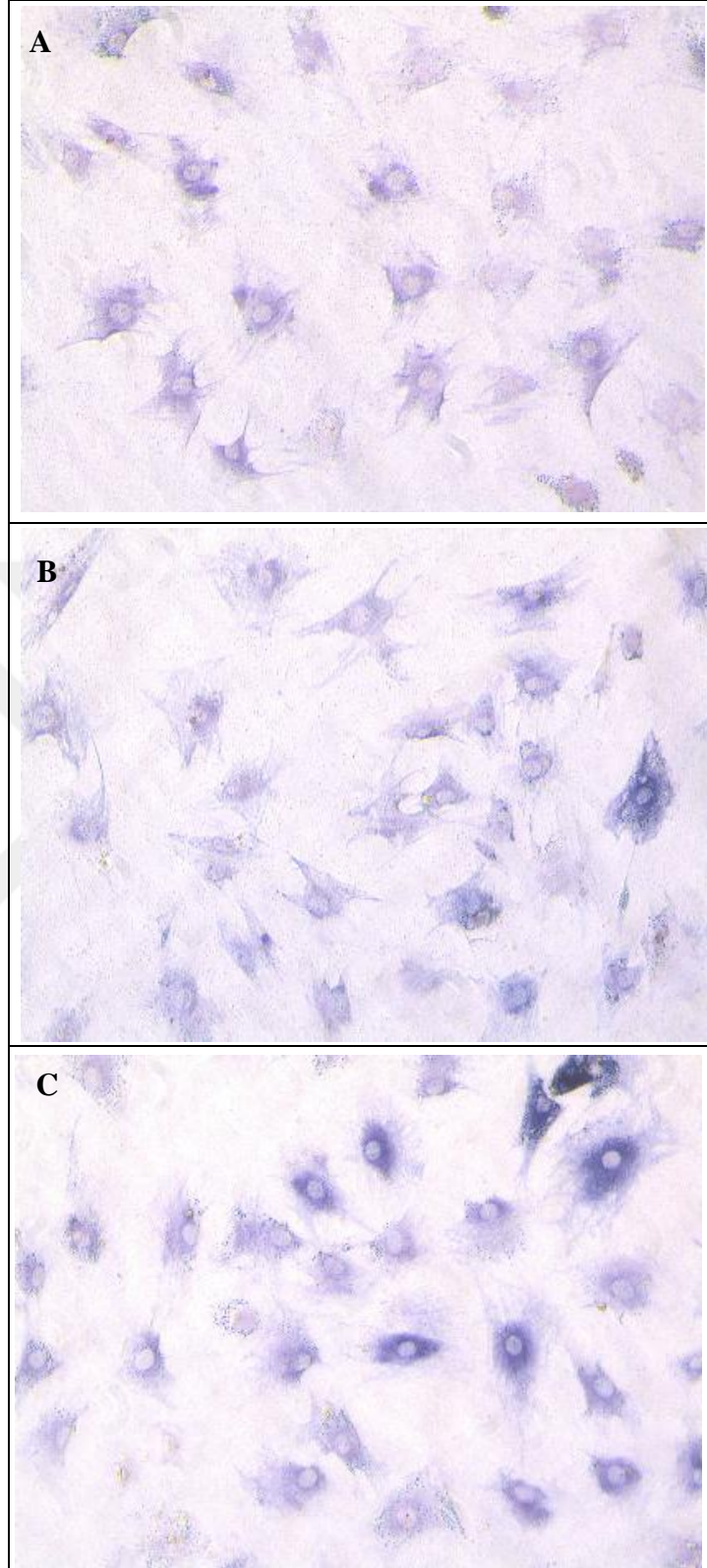
3. BULGULAR

3.1. Mikroskopik Bulgular

İnkübasyon öncesi ile inkübasyonun 24. saatinde steroidojenik aktiviteye sahip olan ve mavi-mor boyanan luteal hücrelerin şekil 3.1'deki gibi, membran bütünlüğüne sahip, yuvarlak, düzgün ve 3β -HSD yönünden aktif oldukları gözlemlendi. İnkübasyon sürecinde ise, luteal hücrelerin pleyt tabanına yapışarak, büyüyüp geliştiği, etrafına kollar attığı ve çevresindeki diğer luteal hücrelerle iletişim kurduğu görüldü (Şekil 3.1). Değişik konsantrasyonlarda EBB uygulanan gruplarda ise, hücrelerin büyümesi ve yoğunluğu yeterli düzeyde olmasına rağmen, kontrol grubuna kıyasla daha açık renkte boyandıkları gözlemlendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Kontrol grubuna ait, inkübasyon öncesi (A) ve inkübasyonun 18. (B), 96. (C) ve 120. saatinde (D) 3β -HSD aktivitesi pozitif luteal hücreler (x20).



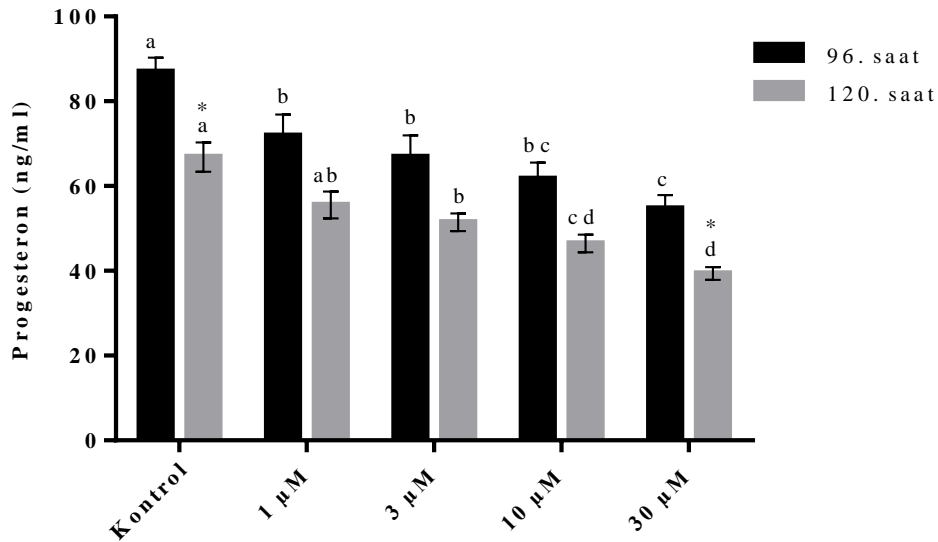
Şekil 3.2. 30 μM BPA (A), 30 μM DEHP (B) ve 0.3 μM PBDE 99 (C) grubunda, inkübasyonun 120. saatinde 3 β -HSD aktivitesi pozitif luteal hücreler (x20).

3.2. Progesteron Düzeyleri

Çalışmada midluteal dönemdeki inek ovaryumlarından elde edilen luteal hücelere, BPA, DEHP ve PBDE 99'un farklı dozlarının uygulanması sonucu sentezledikleri progesteron düzeyleri şekil 3.3 – 3.5 arasında verildi.

3.2.1. Luteal Progesteron Sentezi Üzerine Bisfenol A'nın Etkisi

Şekil 3.3'de de görüldüğü gibi, giderek artan dozlarda uygulanan BPA'nın hemen hemen tüm dozlarının (1, 3, 10 ve 30 μ M) hem 96. saatte hem de 120. saatte progesteron üretimini kontrole kıyasla önemli derecede ($p < 0.05$) azalttığı belirlendi (120. saatte 1 μ M'lık dozdaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı). İnkübasyonun 96. saatinde 1, 3 ve 10 μ M dozların progesteron sentezini baskılayıcı etkileri arasında istatistiksel bir fark gözlenmezken, 30 μ M'lık dozda 1 ve 3 μ M dozlara göre belirgin oranda ($p < 0.05$) azalma gözlemlendi. Yüz yirminci saatte ise, 1 μ M BPA uygulanan gruptaki progesteron düzeyi kontrole yakın bulunurken, 3, 10 ve 30 μ M BPA dozlarında progesteron seviyesinin giderek azaldığı belirlendi.



Şekil 3.3. İnek luteal hücrelerinin progesteron sentezi üzerine BPA'nın etkisi.

a, b, c, d: 96. ve 120. saatlerde farklı harfleri gösteren gruplar arasındaki fark önemlidir,

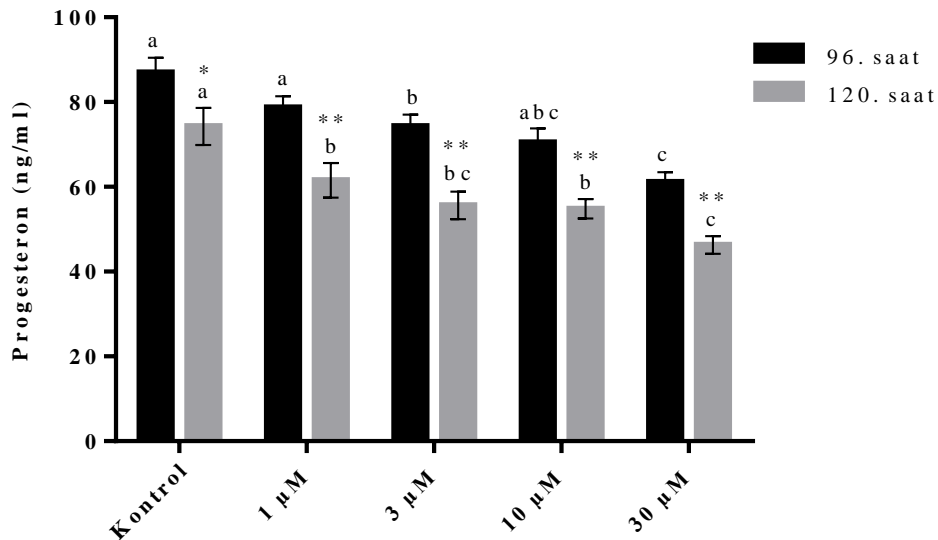
*: 96. ve 120. saatler arasındaki fark önemlidir.

Doksan altıncı ve 120. saatlerdeki progesteron seviyesi incelendiğinde, 1, 3 ve 10 μM BPA uygulanan gruplarda 96. saate kıyasla bir fark gözlenmezken, kontrol ve 30 μM dozda önemli derecede ($p<0.05$) bir azalma görüldü (Şekil 3.3).

3.2.2. Luteal Progesteron Sentezi Üzerine Dietilheksil Fitalatın Etkisi

Şekil 3.4'te dietilheksil fitalatın farklı dozlarının (1, 3, 10 ve 30 μM) luteal hücrelerdeki progesteron sentezi üzerine etkileri gösterildi. Araştırma sonucuna göre DEHP'in progesteron sentezini azaltıcı etkisi 96. saate kontrole kıyasla, yalnızca 3 ve 30 μM 'lık dozlarda görülürken, 120. saate bu etkinin en düşük dozdan itibaren (1 μM) daha belirgin olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). İnkübasyonun 120. saatinde meydana gelen progesteron seviyesindeki azalma 1, 3 ve 10 μM 'lık dozlarda benzer oranlardayken, 30 μM 'lık dozda gözlenen azalma oldukça belirgindi ($p<0.001$).

Luteal hücrelerin progesteron üretimi 96. ve 120. saatler arasında karşılaştırıldığında, 120. saate kontrol dahil DEHP uygulanan bütün gruplardaki progesteron sentezinin 96. saate kıyasla önemli oranda azaldığı gözlemlendi.

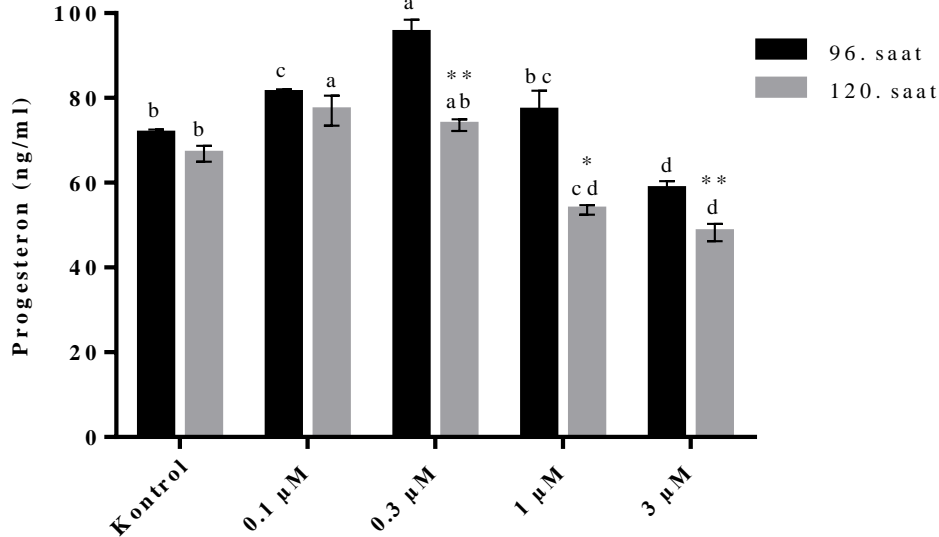


Şekil 3.4. İnek luteal hücrelerinin progesteron sentezi üzerine DEHP'in etkisi. a, b, c, d: 96. ve 120. saatlerde farklı harfleri gösteren gruplar arasındaki fark önemlidir, *: 96. ve 120. saatler arasındaki fark önemlidir.

3.2.3. Luteal Progesteron Sentezi Üzerine Pentabromlu Difenileter 99'un Etkisi

Pentabromlu difenileter 99'un luteal hücrelerdeki progesteron düzeyine etkilerini gösteren Şekil 3.5 incelendiğinde, inkübasyonun 96. saatinde hücrelere uygulanan 0.1 ve 0.3 μM PBDE 99'un progesteron düzeyini önemli derecede ($p<0.001$) artırdığı görüldü. Aynı inkübasyon saatinde PBDE 99'un 1 μM dozunda ölçülen progesteron seviyesi kontrole benzer düzeydeyken, 3 μM 'lık dozda istatistiksel olarak önemli oranda azalma belirlendi ($p<0.001$). Yüz yirminci saatte meydana gelen progesteron sentezindeki artış kontrol grubuna kıyasla 0.3 μM dozda istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, en yüksek progesteron üretimi 0.1 μM 'lık dozda gözlemlendi ($p<0.05$). Aynı inkübasyon periyodunda 1 ve 3 μM PBDE 99'un ise progesteron üretimini hem kontrole hem de 0.1 ve 0.3 μM 'lık dozlara oranla önemli derecede ($p<0.001$) azalttığı belirlendi (Şekil 3.5).

Luteal hücrelerdeki progesteron seviyesi 96. ve 120. saatler arasında karşılaştırıldığında, 0.3, 1 ve 3 μM PBDE 99 uygulanan hücre gruplarının 120. saatteki düzeylerinin 96. saate kıyasla önemli oranda ($p<0.05$) azaldığı gözlemlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. İnek luteal hücrelerinin progesteron sentezi üzerine PBDE 99'un etkisi.

a, b, c, d: 96. ve 120. saatlerde farklı harfleri gösteren gruplar arasındaki fark önemlidir,

*: 96. ve 120. saatler arasındaki fark önemlidir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dişi üreme fizyolojisi, tür, soy ve üremenin devamlılığı açısından büyük bir öneme sahiptir (Li ve ark. 2012). Üzerinde oositer ve foliküler gelişimin meydana gelmesi, ovulasyon ve korpus luteum şekillenmesi, üremeye ilgili bazı steroid hormonların sentezlenip salınması gibi çeşitli olayları kapsayan ovaryum fizyolojisinde, geçici endokrin bir bez olan korpus luteumun rolü oldukça büyüktür (Schatten ve Constantinescu 2007, Romani ve ark. 2013). Vücudun ve özellikle de üreme sisteminin en önemli hormonlarından biri olan progesteron, korpus luteum ve plasenta başta olmak üzere, adrenal korteks, testis ve ovaryumun foliküler hücrelerinde üretilmektedir (Yılmaz 1999).

Bilimsel, teknolojik ve endüstriyel gelişmelerin insanların günlük hayatına sunduğu kolaylık ve avantajlar, birtakım sorunları da beraberinde getirmiştir. Sürekli talep edilen ürün açığını kapatmak için başvurulan yollar, bu sırada ortaya çıkan kimyasal maddelerin, hava, su ve toprak gibi çevresel etmenleri kontamine ederek doğadaki tüm canlıların hem kendileri hem de gelecek nesilleri için ciddi tehditler oluşturmaktadırlar (Talsness ve ark. 2005).

Yapılan literatür taramasında, araştırmada tercih edilen EBB'lerden BPA, DEHP ve PBDE 99'un luteal hücreler üzerine etkileriyle ilgili insan (Romani ve ark. 2013, Romani ve ark. 2014), koyun (Herrerros ve ark. 2013, Veiga-Lopez ve ark. 2014), tavşan (Parillo ve ark. 2014), rat (Xu ve ark. 2010, Ma ve ark. 2011, Mendoza-Rodríguez ve ark. 2011) ve domuz (Gregoraszcuk ve ark. 2012)'larda gerçekleştirilen bazı *in vivo* ve *in vitro* araştırmalara rastlanılmasına rağmen, ineklerde sadece DEHP'in plazma progesteron (Kalo ve ark. 2015), ve luteal oksitosin hormonu seviyesine etkilerinin incelendiği (Wang ve ark. 2010) çalışmalar dışında herhangi bir bilgiye ulaşılamadı. Bu yüzden deney materyali olarak progesteron üretiminin en yüksek olduğu midluteal dönemdeki inek korpus luteumlarından elde edilen luteal hücreler tercih edildi. İneklerin üreme fizyolojisi sadece gebelik süresi bakımından değil, ovaryum fonksiyonları açısından da insanlarla önemli benzerlik göstermektedir (Campbell ve ark. 2003). Çalışmanın *in vitro* deney modeli olarak tasarlanması ve

lokal mezbahalar yardımıyla, deney materyalinin kolay temin edilmesi sığırcı çalışmalarının önünü açmaktadır. Ayrıca sığırcıların insan sağlığı ve ekonomi açısından önemi de bilinen bir gerçektir. Sığırcıların doğurganlık oranlarındaki düşüşün, artan EBB maruziyetiyle ilişkili olduğunun düşünülmesi ve endokrin sistemle sıkı bağı bulunan ovaryumların EBB'lerin hedef organları arasında olduğunun ileri sürülmesinden dolayı çalışmada inek luteal hücreleri kullanıldı.

Literatür taramasından elde edilen bilgiye göre, *in vitro* ortamda değişik hücre modelleri üzerinde yapılan daha önceki çalışmalarda (Mlynarčiková ve ark. 2005, Karpeta ve Gregoraszcuk 2010, Gregoraszcuk ve ark. 2012, Grossman ve ark. 2012, Piche ve ark. 2012, Romani ve ark. 2013, Souza ve ark. 2013, Aung ve ark. 2014, Ge ve ark. 2014) kullanılan dozlar göz önüne alınarak ve çalışma kapsamında yapılan ön denemeler sonucunda, çalışmada BPA ve DEHP için 1, 3, 10, 30 μM , PBDE 99 için de 0.1, 0.3, 1 ve 3 μM dozların kullanılması kararlaştırıldı. Deneysel çalışmalar ve istatistiksel analizler sonucu elde edilen veriler, BPA ve DEHP'in doz ve zamana paralel olarak progesteron sentezini azalttığını, PBDE 99'un ise düşük dozlarda progesteron düzeyini artırırken, yüksek dozlarda azalttığını gösterdi. Hormon analiziyle elde edilen bu sonuçlar, inkübasyonun 120. saatinde $3\beta\text{-HSD}$ aktivitesi azalan ve daha soluk boyanan ve Şekil 3.2'de gösterilen hücre görüntüleriyle de desteklendi.

Mevcut çalışmada luteal hücrelere uygulanan 1, 3, 10 ve 30 μM BPA konsantrasyonlarının hem 96. hem de 120. saatte progesteron sentezini kontrole kıyasla azaltması BPA'nın progesteron sentezi üzerine baskılayıcı etkisini ortaya koymuş olup, bu bulgular Romani ve ark. (2013)'nin insan luteal hücrelerine uyguladıkları 0.1 ve 1 μM 'lık BPA'nın etkileri ile oldukça benzerdir. Bununla birlikte, Mansur ve ark. (2016)'nin insan granuloza hücrelerine uyguladıkları 2 ve 20 $\mu\text{g/mL}$, Peretz ve Flaws (2013)'in fare antral foliküllerine uyguladıkları 4.4–440 μM ve Grasselli ve ark. (2010)'nin domuz granuloza hücrelerine uyguladıkları 0.1-10 μM BPA'nın progesteron üretimini azaltması, araştırmamızda görülen sonuçlarla uyum içerisinde olsa da, *in vitro* ortamda rat granuloza hücrelerine uygulanan 0.1-10 μM BPA (Zhou ve ark. 2008) ve domuz granuloza hücrelerine uygulanan 10 μM BPA'nın (Mlynarčiková ve ark. 2005) progesteron düzeyini artırdığını bildiren araştırma

bulguları da mevcuttur. Özellikle Grasselli ve ark. (2010) ile Mlynarčiková ve ark. (2005)'nin domuz granuloza hücrelerinde yaptıkları çalışmaların aynı dozlarda birbirine zıt etki yapması, bu dozlardaki etkinin granuloza hücrelerindeki güvenilirliğini düşündürücü niteliktedir. Ayrıca deneysel çalışmalarda kullanılan hayvan türü ve hücre tipi, uygulanan dozlar ve maruziyet süreleri gibi farklılıklar, elde edilen sonuçların birbirleriyle çelişmesine neden olabildiği de bilinmektedir (Craig ve ark. 2011).

Düşük dozlardaki (0.1-10 μM) BPA'nın rat granuloza hücrelerinde progesteron sentezini artırdığını bildiren Zhou ve ark. (2008) ile domuz granuloza hücrelerinde 10 μM BPA dozunda aynı sonuca ulaşan Mlynarčiková ve ark. (2005)'nin yaptıkları çalışmalarda, her ikisi de 100 μM BPA konsantrasyonunun progesteron seviyesini önemli derecede ($p < 0.05$) azalttığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, araştırmamızda da luteal hücrelerle muamele edilen ve en yüksek doz olan 30 μM 'lık BPA'nın, hem 96. hem de 120. saatte hücrelerden salınan progesteron seviyesini azaltma düzeyi bir yandan 10 μM 'lık dozun etkisine benzerken, diğer yandan da kontrole göre etkisi en belirgin olan grup oldu. Bu bulgular, 10 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ BPA uygulanan fare antral folikülleri ile 2 ve 20 $\mu\text{g/mL}$ BPA uygulanan insan granuloza hücrelerinden elde edilen sonuçlarla da uyum içerisindedir (Peretz ve ark. 2011, Peretz ve Flaws 2013, Mansur ve ark. 2016).

Kontrol grubunda 96. saate kıyasla 120. saatte görülen progesteron düzeyindeki azalmanın, kültür ortamındaki sağlıklı hücrelerin progesteron üretmek için kullandıkları kolesterolün yetersiz kalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. En yüksek dozda görülen (30 μM) inkübasyon süreleri (96. ve 120. saat) arasındaki farkın da, bu dozun luteal hücreler üzerindeki toksik etkisinin zamana bağlı olarak artmış olmasından kaynaklanabileceği (Mlynarčiková ve ark. 2005, Zhou ve ark. 2008) ve bu yüzden progesteron üretiminin zamana bağlı olarak azaldığı düşünülmektedir.

Bisfenol A'ya maruz kalan hücrelerde, progesteron sentezindeki azalmaya steroidogenez sürecinde görev alan bazı enzimlerin (Star, CYP11A1 ve $3\beta\text{-HSD}$) ekspresyonundaki düşüşün de eşlik ettiği bildirilmektedir (Zhou ve ark. 2008, Peretz

ve ark. 2011, Peretz ve Flaws 2013, Mansur ve ark. 2016). Luteal hücreler, ovulasyonun ardından folikül hücrelerinin (granuloza ve teka) girdiği luteinleşme sürecini tamamlamasıyla oluşmaktadır (Miyamoto ve ark. 2011). StAR kolesterolün mitokondri içine taşınmasını, CYP11A1 (Sitokrom P450_{scc}) kolesterolün, progesteron ön maddesi olan pregnanolona dönüşümünü, 3 β -HSD ise pregnanolonun progesterona dönüşümünü sağlayan enzimlerdir (Niswender 2002). Bu enzim aktivitelerinin/ifadelerinin azalması steroid hormon sentezinin baskılanmasına neden olmaktadır. Folikül hücrelerinde meydana gelen steroidogenez süreci luteal hücrelerdekine benzemektedir (Ohara ve ark. 1987). Dolayısıyla granuloza hücrelerinde steroidojenik enzim aktivitesini düşüren BPA, luteal hücrelerde de benzer etkiye sebep olabilir. Bu bağlamda tez çalışmada kullanılan 1-30 μ M BPA'nın luteal progesteron sentezini düşürmesinin altında yatan mekanizmanın steroidojenik enzim aktivitesindeki azalmayla ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Araştırmamızdan elde edilen bulgularda, DEHP'in 96. saatte 3, 10 ve 30 μ M'lık konsantrasyonlarda, 120. saatte ise bütün dozlarda, luteal progesteron sentezini kontrol grubuna göre belirgin düzeyde azaltması ($p < 0.05$) daha önce yapılan bazı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda da benzerlik göstermektedir (Treinen ve ark. 1990, Svechnikova ve ark. 2007, Li ve ark. 2012, Parillo ve ark. 2014, Romani ve ark. 2014, Guerra ve ark. 2016). İnsan granuloza hücrelerinde 167 μ M'ın altındaki dozlarda DEHP'in birincil metaboliti olan MEHP'in progesteron sentezine bir etkisinin olmadığını belirten (Reinsberg ve ark. 2009), domuz kumulus oosit kompleksinde 1 μ M DEHP'in (Mlynarcikova ve ark. 2009) ve rat sekonder folikülünde MEHP'in 30 ve 100 μ M dozlarının (Inada ve ark. 2012) progesteron sentezini artırdığını bildiren bazı çalışmalar bulunmasına rağmen, 0.001-0.1 μ M DEHP'in insan granuloza hücrelerinde hCG uyarımlı (Guerra ve ark. 2016), 0.1 ve 1 μ M DEHP'in ise insan luteal hücrelerinde hem bazal hem de hCG uyarımlı (Romani ve ark. 2014) progesteron üretimini azalttığını rapor eden araştırmalar da bulunmaktadır. *In vitro* ortamda değişik konsantrasyonlarda (10-277 μ M) DEHP uygulanarak tavşan luteal hücreleri (Parillo ve ark. 2014), rat granuloza hücreleri (Treinen ve ark. 1990) ve fare antral folikülü (Gupta ve ark. 2010) ile tümör Leydig hücrelerinde (Piche ve ark. 2012) gerçekleştirilen bazı çalışmaların bulguları araştırmamızda kullanılan 10 ve 30 μ M

dozlardan elde edilen bulgularla oldukça benzerdir. Bu bulgular ayrıca, fare (Li ve ark. 2012), rat (Svechnikova ve ark. 2007) ve tavşan (Parillo ve ark. 2014)'larda *in vivo* olarak uygulanan DEHP'in plazma/serum progesteron düzeyini düşürdüğünü rapor eden çalışmalarla da desteklenmektedir. Ancak Herreros ve ark. (2013)'nın koyunlara kas içi ve damar içi yolla uygulanan 25 ve 50 mg/kg DEHP'in korpus luteumun küçülmesine ve luteal fazın kısılmasına sebep olurken, plazma progesteron düzeyinin yükseldiğini rapor etmişlerdir. Yazar ve ekibi korpus luteumdaki yapısal değişikliğe rağmen progesteron düzeyinde gözlenen bu artışı DEHP'in progesteron klerensini düşürmesinden kaynaklanabileceğini ileri sürmektedirler.

Doz gruplarının 96. ve 120. inkübasyon saatinde meydana gelen progesteron üretimleri karşılaştırıldığında, 120. saatte kontrol dahil tüm gruplarda progesteron sentezinin azalması, DEHP'in inkübasyon süresi uzadıkça granuloza hücrelerinde progesteron sentezini azaltıcı etkisinin arttığı bildirimiyle uyum içerisinde. Ayrıca kontrol grubu luteal hücrelerde de progesteron üretiminin zamana bağlı olarak azaldığı belirtilmiştir (Gregoraszcuk ve ark. 2012, Guerra ve ark. 2016). Bu azalmanın da ortama ilave edilen kolesterolün zamana bağlı olarak çoğalan hücrelerin progesteron sentezlemesi için yetersiz kalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Korpus luteumun DEHP maruziyeti ile morfolojik olarak hasara uğradığını ve östrus siklusunun luteal fazının kısaldığını bildiren çalışmaların (Xu ve ark. 2010, Ma ve ark. 2011, Herreros ve ark. 2013) yanı sıra, DEHP'in *in vitro* steroidogenez sürecini olumsuz etkilediğini rapor eden araştırmalar da mevcuttur. Tavşan luteal hücreleri (Parillo ve ark. 2014), rat granuloza (Treinen ve ark. 1990) ve Leydig hücreleri (Svechnikov ve ark. 2008) ile fare Leydig hücrelerinde (Piche ve ark. 2012) yapılan bazı çalışmalarda DEHP'in östrojen, progesteron ve testosteron gibi steroid hormonların üretim mekanizmasında rol alan cAMP, StAR, CYP11A1, 3 β -HSD enzim ve proteinlerinin aktivitesinde ve mRNA ekspresyonunda azalmaya neden olduğu bildirilmektedir. Farklı hücrelerde meydana gelmiş olsa da, kolesterolden en alt basamaktaki östrojenin üretime kadar gerçekleşen steroidogenez sürecinde görev alan enzim ve proteinlerin aynı olduğu bilinmektedir. Araştırmamızda 1-30 μ M konsantrasyonlarında kullanılan DEHP'in progesteron sentezini azaltmasının, literatürden edinilen bu bilgiler doğrultusunda, DEHP'in luteal steroidogenez

sürecinde bu enzim basamaklarından bir veya birkaçına müdahale etmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Ancak luteal hücreler üzerine yapılmış olan çalışmaların yetersizliği nedeniyle ileride yapılacak araştırmalarla sonucun desteklenmesinin gerektiği de düşünülmektedir.

Bisfenol A ve DEHP'in aksine, PBDE 99'un düşük dozlarda (0.1 ve 0.3 μM), 96. ve 120. saatlik inkübasyonlarda progesteron üretimini uyarıcı etki yaptığı, ancak bu etkinin zamanla azaldığı, yüksek dozlarda ise (1 ve 3 μM) progesteron sentezini baskıladığı bulgusu, Gregoraszcuk ve ark. (2012) domuz luteal hücrelerinde, 50–500 ng/mL (yaklaşık olarak 0.1–1 μM) PBDE 99'un, kısa süreli inkübasyon periyodunda (24 saat) progesteron sentezini artırdığını, ancak 48. saatte bu etkinin ortadan kalktığını ileri sürdüğü çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir.

Domuz ovarian folikülleri üzerine tek başına (Karpeta ve ark. 2011) ve bir PBDE karışımı içerisinde (Karpeta ve Gregoraszcuk 2010) 0.25-17.5 ng/mL dozlarında uygulanan PBDE 99'un, progesteron sentezini artırdığını bildiren çalışmaların yanı sıra, *in vivo* serum progesteron düzeyini düşürdüğü (Alonso ve ark. 2010) de rapor edilmiştir. Bununla birlikte $\leq 1 \mu\text{M}$ PBDE 99'un steroidogenez sürecinin basamaklarında yer alan diğer cinsiyet hormonlarının (östrojen, testosteron ve androstenedion) sentezi üzerine de uyarıcı etki yaptığı bildirilmektedir (Gregoraszcuk ve ark. 2008b, Karpeta ve Gregoraszcuk 2010, Karpeta ve ark. 2011).

Polibromlu difenileterlerin ekstrinsik (kaspas 8) ve intrinsik/mitokondriyal (kaspas 9) yollarla apoptozu uyarıcı bir etkiye sahip olması, PBDE 99'un korpus luteum üzerinde apoptoz uyarıcı etkisinin olabileceğini göstermektedir. Nitekim luteal hücrelerde kısa süreli PBDE 99 maruziyetinin hem kaspas -8 ve -9 aktivitesini hem de progesteron seviyesini artırdığını rapor edilmiştir (Gregoraszcuk ve ark. 2012). Daha önce yapılan başka bir çalışmada da apoptoz başladıktan sonraki birkaç saat içerisinde progesteron sekresyonunun arttığını bildirilmiştir (Keren-Tal ve ark. 1995). Apoptoz sinyallerinin birincil hedefi mitokondrilerdir. Dolayısıyla mitokondrinin hasar görmediği durumlarda steroidogenezis ve apoptozis aynı hücrede total hücre ölümü gerçekleşene kadar görülebilir (Amsterdam ve ark. 2003). Gregoraszcuk ve ark. (2012) kısa süreli inkübasyon periyotlarında efektör kaspas-3'ün artmadığını yani

mitokondriyal bütünlüğün bozulmadığını göstermiştir. Ayrıca yine kısa süreli inkübasyonlarda artan kaspas -8 ve -9 aktivitesine bağlı olarak çekirdeğe yaklaşan mitokondri, kolesterolün pregnanolona dönüşümünden sorumlu olduğu süreçte steroidojenik aktivitenin bozulmadığı anlaşılabilir. Dahası apoptotik hücrelerdeki lipit damlacıkları ve mitokondrinin çekirdek çevresinde kümeleşmesi steroidojenik olayların etkinliğini dolayısıyla progesteron sentezini artırabilir. (Gregoraszcuk ve ark. 2012). Karpeta ve Gregoraszcuk (2010) da domuz granuloza ve teka hücrelerinden salınan steroid hormonlarının enzim aktivitesi hakkında bilgi veren progesteron/testosteron oranının PBDE 99 maruziyetine bağlı olarak artmasını, 3 β -HSD enzim aktivitesindeki artıştan ileri gelebileceğini ileri sürmüşlerdir. Luteal hücrelerde de pregnanolonun progesterona dönüşümünü 3 β -HSD enzimi gerçekleştirmektedir (Niswender 2002). Dolayısıyla araştırmada görülen düşük dozlardaki (0.1 ve 0.3 μ M) PBDE 99'un progesteron sentezini artırmasının, PBDE 99'un oluşturduğu apoptozisin kısa dönem maruziyette mitokondriyal bütünlüğün korunarak steroidogenezis sürecini bozmadığını, hatta bu olayın lipit damlacıkları ve mitokondri kümeleşmesine neden olarak kolesterolün pregnanolona, dolayısıyla progesterona dönüşümünü artırmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Gregoraszcuk ve ark. (2012) PBDE 99'un maruziyet süresi uzadıkça progesteron sentezi azalırken, luteal hücrelerdeki önemli apoptoz belirteçlerinden olan kaspas-3 aktivitesinde de artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Kaspas-3 aktivitesindeki artış ile mitokondrinin apoptozdan etkilendiği ve steroidogenez sürecinin bozularak progesteron seviyesinde azalmanın görüldüğünü öne sürmüşlerdir. Bu bilgiler, 96. saate nazaran 120. saatte 0.3, 1 ve 3 μ M'lık PBDE 99'un progesteron seviyesini düşürmesini açıklayıcı niteliktedir. Korpus luteumun normal süresini tamamladıktan sonra luteal hücrelerin apoptoza uğraması olağan bir durumdur. Ancak midluteal dönemde EBB'lere maruziyetine bağlı meydana gelebilecek bir apoptozun progesteron sentezini düşürmesi (Gregoraszcuk ve ark. 2012) veya progesteron üretiminin azalmasına bağlı gerçekleşecek apoptoz süreci (Rueda ve ark. 2000) siklusun normal seyrini aksatacak ve başta infertilite olmak üzere birçok üreme problemlerine neden olacaktır. Bu nedenle PBDE 99'un düşük dozlarda luteal progesteron sentezi üzerine uyarıcı etki yaptığı ve bu etkinin doz ve zaman bağlı

olarak azaldığını, hatta yüksek dozlarda progesteron sentezini baskılayıcı etkisinin olduğunu ortaya koyan araştırma sonuçlarımız oldukça önemlidir. Ancak ileride yapılacak çalışmalarla PBDE 99'un uyarıcı etkisinin steroidogenez sürecinin hangi basamağında ortaya çıktığı ve uzun süreli maruziyette apoptozise neden olup olmadığının gösterilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, yaygın kullanım alanlarından ötürü insan ve hayvanların içerisinde bulunduğu çevre ve yaşam ortamlarında yoğun miktarda bulunan EBB'lerden BPA ve DEHP'in çeşitli dozlarının ineklerde steroidogenez sürecini bozarak luteal progesteron sentezini düşürdüğü; PBDE 99'un ise düşük dozlarının (0.1 ve 0.3 μM) progesteron sentezini artırırken, 30 μM 'lık dozunun azalttığı gösterilmiştir. Üreme fizyolojisi açısından ovaryumun hormonal dengesinin önemi oldukça büyüktür. Yapılan denemelerle ortaya çıkan sonuçlar, daha önce belirtilen ovaryumun EBB'ler için hedef organ olduğu bilgisini desteklerken, progesteron sentezini dolayısıyla hormonal dengeyi de olumsuz bir şekilde etkilediğini göstermiştir. Ayrıca araştırmanın ineklerde yapılmış olması da ayrı bir öneme sahiptir. Çünkü inek luteal hücreleriyle daha önce yapılmış benzeri bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu yönüyle orijinallik arz eden çalışma, sığırların ülke ekonomisindeki yeri de düşünüldüğünde, EBB'lerin bu hayvanların üreme sağlığı üzerine etkilerini ortaya koyması açısından da önemli katkılarda bulunabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, *in vitro* ortamda ortaya konan bu sonuçların, mevcut konuyla ilgili yapılmış çalışmaları da göz önüne alınarak, inek, koyun, keçi gibi ekonomik ve besin değeri açısından önem arz eden çiftlik hayvanlarında, *in vivo* olarak da desteklenmesi, canlı üzerindeki gerçek etkilerini açıklayabilecek araştırmaların yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, çevre kirliliği ve üreme sağlığı konuları titizlikle ele alınarak, son yıllarda üretimi ve tüketimi artan bu tür endüstriyel kimyasalların kullanımının en aza indirilmesi veya bilinçli bir şekilde kullanılması ve usulünce ortadan kaldırılması için hem toplumsal bilinçlenmenin sağlanması hem de bazı resmi politikalar izlenmesinin faydalı olabileceği görünen bir gerçektir. Aksi takdirde sadece hayvanlarda değil, doğadaki tüm canlılarda neslin devamını sağlayan üreme sağlığının bundan olumsuz etkilenebileceği açıktır.

KAYNAKLAR

- AKINGBEMI BT, YOUKER RT, SOTTAS CM, GE R, KATZ E, KLINEFELTER GR, ZIRKIN BR ve HARDY MP (2001) Modulation of rat leydig cell steroidogenic function by di (2-ethylhexyl) phthalate. *Biol. Reprod.*, 65, 1252-1259.
- ALAÇAM E (2010) EVCİL HAYVANLARDA DOĞUM ve INFERTİLİTE. 7.baskı Medisan, Ankara.
- ALBINA ML, ALONSO V, LINARES V, BELLES M, SIRVENT JJ, DOMINGO JL ve SANCHEZ DJ (2010) Effects of exposure to BDE-99 on oxidative status of liver and kidney in adult rats. *Toxicology*, 271, 51-56.
- ALONSO V, LINARES V, BELLES M, ALBINA ML, PUJOL A, DOMINGO JL ve SANCHEZ DJ (2010) Effects of BDE-99 on hormone homeostasis and biochemical parameters in adult male rats. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 2206-2211.
- AMBRUOSI B, URANIO MF, SARDANELLI AM, POCAR P, MARTINO NA, PATERNOSTER MS, AMATIF ve DELL'AQUILA ME (2011) In vitro acute exposure to dehp affects oocyte meiotic maturation, energy and oxidative stress parameters in a large animal model. *PLoS One*, 6, e27452.
- AMSTERDAM A, KEREN-TAL I, AHARONI D, DANTES A, LAND-BRACHA A, RIMON E, SASSON R ve HIRSH L (2003) Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. *Steroids*, 68, 861-867.
- ANDRADE AJ, GRANDE SW, TALSNESS CE, GERICKE C, GROTE K, GOLOMBIEWSKI A, STERNER-KOCK A ve CHAHOUD I (2006) A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology*, 228, 85-97.
- ANONİM (2016a) Estrous cycle. Accessed 28.12.2016. http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lab/lab7/lab7_2003/cycle.html.
- ANONİM (2016b) İneklerde reproduktif fizyoloji. Accessed 24.12.2016. <http://www.hormonuzmani.com/reproduction-cattle/hormonal-regulation.asp>.
- ANONİM (2016c) Structure and function of animals, 9. Reproduction. Accessed 28.12.2016. <http://biology4isc.weebly.com/1-human-reproduction.html>.
- ANONİM (2016d) Su kirlenmesi - sediment kökenli kirleticiler Accessed 25.10.2016. https://www.turkcebilgi.org/kimya/cevre-kimyasi/su-kirlenmesi-51007_7.html.
- ATSDR (2002) Atsdr - toxfaqs™: Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). Erişim adresi: [https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/TF.asp?id=377&tid=65], Erişim tarihi: 13.12.2016.
- AUNG KH, WIN-SHWE TT, KANAYA M, TAKANO H ve TSUKAHARA S (2014) Involvement of hemoxygenase-1 in di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced apoptosis of neuro-2a cells. *J. Toxicol. Sci.*, 39, 217-229.
- AUTUMN P, DAVIDSON ve STABENFELDT GH (2007) Reproduction and lactation, TEXTBOOK OF VETERINARY PHYSIOLOGY, CUNNINGHAM JG ve KLEİN BG, 4th ed, Saunders, an imprint of Elsevier Inc, St. Louis, MO, section 35, pp. 465-474.
- BAE B, JEONG J ve LEE S (2002) The quantification and characterization of endocrine disruptor bisphenol-a leaching from epoxy resin. *Water Sci. Technol.*, 46, 381-387.
- BALBUENA P, CAMPBELL J, CLEWELL HJ ve CLEWELL RA (2013) Evaluation of a predictive in vitro leydig cell assay for anti-androgenicity of phthalate esters in the rat. *Toxicol. In Vitro*, 27, 1711-1718.
- BALL PJH ve PETERS AR (2007) REPRODUCTION IN CATTLE. 3rd ed Blackwell Publishing Ltd, England.

- BAO B, THOMAS M, GRIFFITH M, BURGHARDT R ve WILLIAMS G (1995) Steroidogenic activity, insulin-like growth factor- α production, and proliferation of granulosa and theca cells obtained from dominant preovulatory and nonovulatory follicles during the bovine estrous cycle: Effects of low-density and high-density lipoproteins. *Biol. Reprod.*, 53, 1271-1279.
- BARR DB, BISHOP A ve NEEDHAM LL (2007) Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. *Reprod. Toxicol.*, 23, 260-266.
- BELLES M, ALONSO V, LINARES V, ALBINA ML, SIRVENT JJ, DOMINGO JL ve SANCHEZ DJ (2010) Behavioral effects and oxidative status in brain regions of adult rats exposed to BDE-99. *Toxicol. Lett.*, 194, 1-7.
- BERGE A, CLADIERE M, GASPERI J, COURSIMAULT A, TASSIN B ve MOILLERONR (2013) Meta-analysis of environmental contamination by phthalates. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 20, 8057-8076.
- BERGMAN Å, HEINDEL JJ, JOBLING S, KIDD KA, ZOELLER RT, WORLD HEALTH O ve UNITED NATIONS ENVIRONMENT P (2013) State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012: An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the united nations environment programme (UNEP) and who.
- BHAT FA, RAMAJAYAM G, PARAMESWARI S, VIGNESH R, KARTHIKEYAN S, SENTHILKUMAR K, KARTHIKEYAN G, BALASUBRAMANIAN K, ARUNAKARAN J ve SRINIVASAN N (2013) Di 2-ethyl hexyl phthalate affects differentiation and matrix mineralization of rat calvarial osteoblasts–in vitro. *Toxicol. In Vitro*, 27, 250-256.
- BONILLA E ve DEL MAZO J (2010) Dereglulation of the sod1 and nd1 genes in mouse fetal oocytes exposed to mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP). *Reprod. Toxicol.*, 30, 387-392.
- BRANCHI I, CAPONE F, ALLEVA E ve COSTA LG (2003) Polybrominated diphenyl ethers: Neurobehavioral effects following developmental exposure. *Neurotoxicology*, 24, 449-462.
- BSEF (2001) Major brominated flame retardants volume estimates: Total market demand by region in 2001. Brom Bilim ve Çevre Forumu, www.bsef.com.
- BURRIDGE E (2003) Bisphenol A: Product profile. *Eur Chem News*, 17, 14-20.
- CALIMAN FA ve GAVRILESCU M (2009) Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment—a review. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 37, 277-303.
- CAMPBELL BK, SOUZA C, GONG J, WEBB R, KENDALL N, MARSTERS P, ROBINSON G, MITCHELL A, TELFER EE ve BAIRD DT (2003) Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reproduction*, 429-443.
- CERESANA (2016) Plasticizers – study: Market, analysis, trends | ceresana. Erişim adresi: [<http://www.ceresana.com/en/market-studies/chemicals/plasticizers/>], Erişim tarihi: 13.12.2016.
- CHEN SS, HUNG HT, CHEN TJ, HUNG HS ve WANG DC (2013) Di-(2-ethylhexyl)-phthalate reduces myod and myogenin expression and inhibits myogenic differentiation in c2c12 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 38, 783-791.
- CHOI B-I, HARVEY AJ ve GREEN MP (2016) Bisphenol a affects early bovine embryo development and metabolism that is negated by an oestrogen receptor inhibitor. *Sci. Rep.*, 6.
- COLBORN T ve CLEMENT C (1992) CHEMICALLY-INDUCED ALTERATIONS IN SEXUAL AND FUNCTIONAL DEVELOPMENT: THE WILDLIFE/HUMAN CONNECTION. 1st Ed. Princeton Scientific Pub. Co., Amerika.
- COLLINS MD, SCOTT WJ, MILLER SJ, EVANS DA ve NAU H (1992) Murine teratology and pharmacokinetics of the enantiomers of sodium 2-ethylhexanoate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 112, 257-265.
- CRAIG ZR, WANG W ve FLAWS JA (2011) Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: Effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction*, 142, 633-646.
- DAMSTRA T, BARLOW S, BERGMAN A, KAVLOCK R ve VAN DER KRAAK G (2002) Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. *Geneva: World Health Organization*.

- DARNERUD PO, ERIKSEN GS, JOHANNESSON T, LARSEN PB ve VILUKSELA M (2001) Polybrominated diphenyl ethers: Occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environ. Health Perspect.*, 109 Suppl 1, 49-68.
- DARNERUD PO ve RISBERG S (2006) Tissue localisation of tetra- and pentabromodiphenyl ether congeners (BDE-47, -85 and -99) in perinatal and adult c57bl mice. *Chemosphere*, 62, 485-493.
- DARWASH A (1999) The potential for identifying heritable endocrine parameters associated with fertility in post-partum dairy cows. *Anim Sci*, 68, 333-347.
- DAVIS B, MARONPOT R ve HEINDEL J (1994) Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 128, 216-223.
- DAVIS B, WEAVER R, GAINES L ve HEINDEL J (1994) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of fsh-camp stimulation in rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 128, 224-228.
- DIANIN AP (1891) Condensation of ketones with phenols. *Zhurnal Russkago Fiziko-Khimicheskago Obshchestva*, 23, 488-517.
- DODDS E ve LAWSON W (1936) Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*, 137, 996.
- ERKEKOGLU P, GIRAY BK, KIZILGÜN M, RACHIDI W, HININGER-FAVIER I, ROUSSEL A-M, FAVIER A ve HINCAL F (2012) Di (2-ethylhexyl) phthalate-induced renal oxidative stress in rats and protective effect of selenium. *Toxicol. Mech. Methods*, 22, 415-423.
- ERKEKOGLU P, ZEYBEK ND, GIRAY BK, RACHIDI W, KIZILGÜN M, HININGER-FAVIER I, FAVIER A, ASANE ve HINCAL F (2014) The effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on rat liver in relation to selenium status. *Int. J. Exp. Pathol.*, 95, 64-77.
- EUN-JI S, YONG-SEUNG L, SANG-HEE L, HAN-JUN Y, JOUNG-JUN P, HEE-TAE C, BOO-KEUN Y ve CHOON-KEUN P (2013) Change of protein patterns in granulosa cells and corpus luteum during the ovarian cycle in cows. *Reprod. Dev. Biol.*, 37, 149-154.
- EVANS NP, NORTH T, DYE S ve SWEENEY T (2004) Differential effects of the endocrine-disrupting compounds bisphenol-a and octylphenol on gonadotropin secretion, in prepubertal ewe lambs. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 26, 61-73.
- FAASS O, CECCATELLI R, SCHLUMPF M ve LICHTENSTEIGER W (2013) Developmental effects of perinatal exposure to PBDE and pcb on gene expression in sexually dimorphic rat brain regions and female sexual behavior. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 188, 232-241.
- FERRIS J, FAVETTA LA ve KING WA (2015) Bisphenol a exposure during oocyte maturation in vitro results in spindle abnormalities and chromosome misalignment in bos taurus. *Cytogenet Genome Res*, 145, 50-58.
- FIERENS T, VAN HOLDERBEKE M, WILLEMS H, DE HENAUW S ve SIOEN I (2012) Phthalates in belgian cow's milk and the role of feed and other contamination pathways at farm level. *Food Chem. Toxicol.*, 50, 2945-2953.
- FOSTER WG, NEAL MS ve YOUNGLAI EV (2004) Endocrine disrupters and ovarian function, International Congress Series, pp. 126-132.
- FOWLER PA, BELLINGHAM M, SINCLAIR KD, EVANS NP, POCAR P, FISCHER B, SCHAEGLICH K, SCHMIDT J-S, AMEZAGA MR ve BHATTACHARYA S (2012) Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 355, 231-239.
- GE L-C, CHEN Z-J, LIU H, ZHANG K-S, SU Q, MA X-Y, HUANG H-B, ZHAO Z-D, WANG Y-Y ve GIESY JP (2014) Signaling related with biphasic effects of bisphenol a (BPA) on sertoli cell proliferation: A comparative proteomic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840, 2663-2673.
- GORE AC, CREWS D, DOAN LL, LA MERRILL M, PATISAUL H ve ZOTA A (2014) Introduction to endocrine disrupting chemicals(EDCs) – a guide for public interest organizations and policy-makers. *Endocrine Society*.

- GRASSELLI F, BARATTA L, BAIONI L, BUSSOLATI S, RAMONI R, GROLLI S ve BASINI G (2010) Bisphenol a disrupts granulosa cell function. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 39, 34-39.
- GREGORASZCZUK EL, MILCZAREK K, WÓJTOWICZ AK, BERG V, SKAARE JU ve ROPSTAD E (2008) Steroid secretion following exposure of ovarian follicular cells to three different natural mixtures of persistent organic pollutants (POPs). *Reprod. Toxicol.*, 25, 58-66.
- GREGORASZCZUK EL, RAK A, KAWALEC K ve ROPSTAD E (2008) Steroid secretion following exposure of ovarian follicular cells to single congeners and defined mixture of polybrominateddibenzoethers (PBDEs), p, p'-ddt and its metabolite p, p'-dde. *Toxicol. Lett.*, 178, 103-109.
- GREGORASZCZUK EL, SIEMBIDA M, GRZYB D ve RAK-MARDYŁA A (2012) Polybrominated diphenylethers (PBDEs) act as apoptotic factors in the corpus luteum in addition to having a short-term stimulatory effect on progesterone secretion by luteal cells. *Toxicol. Mech. Methods*, 22, 131-138.
- GROSSMAN D, KALO D, GENDELMAN M ve ROTH Z (2012) Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Cell Biol. Toxicol.*, 28, 383-396.
- GUERRA MT, FURLONG HC, KEMPINAS WG ve FOSTER WG (2016) Effects of in vitro exposure to butylparaben and di-(2 ethylhexyl) phthalate, alone or in combination, on ovarian function. *J. Appl. Toxicol.*
- GUPTARK, SINGHJM, LESLIE TC, MEACHUMS, FLAWS JA ve YAO HH (2010) Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 242, 224-230.
- HAHN-TOWNSEND CK, VARDE PA, MOHANKUMAR PS ve MOHANKUMAR SM (2016) Metabolic dysfunction induced by prenatal exposure to bisphenol-A and diethyl hexyl phthalate: Exacerbation by high fat diet. *The FASEB Journal*, 30, 1293.1296-1293.1296.
- HAKK H, LARSEN G ve KLASSON-WEHLER E (2002) Tissue disposition, excretion and metabolism of 2, 2', 4, 4', 5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in the male sprague-dawley rat. *Xenobiotica*, 32, 369-382.
- HALDEN RU (2010) Plastics and health risks. *Annu. Rev. Public Health*, 31, 179-194.
- HANNON PR ve FLAWS JA (2015) The effects of phthalates on the ovary. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 6, 8.
- HARLEY KG, MARKS AR, CHEVRIER J, BRADMAN A, SJODIN A ve ESKENAZI B (2010) PBDE concentrations in women's serum and fecundability. *Environ. Health Perspect.*, 118, 699-704.
- HARVEY PW ve JOHNSON I (2002) Approaches to the assessment of toxicity data with endpoints related to endocrine disruption. *J. Appl. Toxicol.*, 22, 241-247.
- HERREROS MA, GONZALEZ-BULNES A, IÑIGO-NUÑEZ S, CONTRERAS-SOLIS I, ROS JM ve ENCINAS T (2013) Toxicokinetics of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and its effects on luteal function in sheep. *Reprod. Biol.*, 13, 66-74.
- HEUDORF U, MERSCH-SUNDERMANN V ve ANGERER J (2007) Phthalates: Toxicology and exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 210, 623-634.
- HINES EP, CALAFAT AM, SILVA MJ, MENDOLA P ve FENTON SE (2009) Concentrations of phthalate metabolites in milk, urine, saliva, and serum of lactating north carolina women. *Environ. Health Perspect.*, 117, 86-92.
- HOLOVAC EA (2015) Evaluation of BDE-47 and-99 lipid modulating effects in HEPG2 human carcinoma cells, Honors Program at the University of Rhode Island, Rhode Island, 5-2015.
- HUNT PA, SUSIARJO M, RUBIO C ve HASSOLD TJ (2009) The bisphenol a experience: A primer for the analysis of environmental effects on mammalian reproduction. *Biol. Reprod.*, 81, 807-813.
- IAN H (2016) Steroids (ch26). Erişim adresi: [<http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch26/ch26-5-1.html>], Erişim tarihi: 30.12.2016.

- IIDA H, MAEHARA K, DOIGUCHI M, MÖRI T ve YAMADA F (2003) Bisphenol a-induced apoptosis of cultured rat sertoli cells. *Reprod. Toxicol.*, 17, 457-464.
- IKEZUKI Y, TSUTSUMI O, TAKAI Y, KAMEI Y ve TAKETANI Y (2002) Determination of bisphenol a concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum. Reprod.*, 17, 2839-2841.
- INADA H, CHIHARA K, YAMASHITA A, MIYAWAKI I, FUKUDA C, TATEISHI Y, KUNIMATSU T, KIMURAJ, FUNABASHI H ve MIYANOT (2012) Evaluation of ovarian toxicity of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (mehp) using cultured rat ovarian follicles. *J. Toxicol. Sci.*, 37, 483-490.
- IRELAND JJ, MURPHEE R ve COULSON P (1980) Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J. Dairy Sci.*, 63, 155-160.
- JANOŠEK J, HILSCHEHOVÁ K, BLÁHA L ve HOLOUBEK I (2006) Environmental xenobiotics and nuclear receptors—interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicol. In Vitro*, 20, 18-37.
- KABIR ER, RAHMAN MS ve RAHMAN I (2015) A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 40, 241-258.
- KABUTO H, AMAKAWA M ve SHISHIBORI T (2004) Exposure to bisphenol a during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sci.*, 74, 2931-2940.
- KALKAN C ve ÖCAL H (2015) Üreme fizyolojisi, ÇİFTLİK HAYVANLARINDA DOĞUM ve JİNEKOLOJİ, SEMACAN A, KAYMAZ M, FINDIK M, RIŞVANLI A ve KÖKER A, 2.baskı, Medipres Matbaacılık Yayıncılık Ltd. Şti., Malatya, pp. 735.
- KALO D, HADAS R, FURMAN O, BEN-ARI J, MAOR Y, PATTERSON DG, TOMEY C ve ROTH Z (2015) Carryover effects of acute DEHP exposure on ovarian function and oocyte developmental competence in lactating cows. *PLoS One*, 10, e0130896.
- KAMARIANOS A, KARAMANLIS X, GOULAS P, THEODOSIADOU E ve SMOKOVITIS A (2003) The presence of environmental pollutants in the follicular fluid of farm animals (cattle, sheep, goats, and pigs). *Reprod. Toxicol.*, 17, 185-190.
- KARPETA A ve GREGORASZCZUK EL (2010) Mixture of dominant PBDE congeners (BDE-47, -99, -100 and -209) at levels noted in human blood dramatically enhances progesterone secretion by ovarian follicles. *Endocr. Regul.*, 44, 49-55.
- KARPETA A, RAK-MARDYLA A, JERZAK J ve GREGORASZCZUK E (2011) Congener-specific action of PBDEs on steroid secretion, cyp17, 17 β -hsd and cyp19 activity and protein expression in porcine ovarian follicles. *Toxicol. Lett.*, 206, 258-263.
- KATOH K, MATSUDA A, ISHIGAMI A, YONEKURA S, ISHIWATA H, CHEN C ve OBARA Y (2004) Suppressing effects of bisphenol a on the secretory function of ovine anterior pituitary cells. *Cell Biol. Int.*, 28, 463-469.
- KAVLOCK RJ, DASTON GP, DEROSA C, FENNER-CRISP P, GRAY LE, KAATTARI S, LUCIER G, LUSTER M, MAC MJ ve MACZKA C (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the us epa-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.*, 104, 715.
- KEREN-TAL I, SUH B-S, DANTES A, LINDNER S, OREN M ve AMSTERDAM A (1995) Involvement of p53 expression in camp-mediated apoptosis in immortalized granulosa cells. *Exp. Cell Res.*, 218, 283-295.
- KIDD KA, BECHER G, BERGMAN Å, MUIR DC ve WOODRUFF TJ (2012) Human and wildlife exposures to EDCs, STATE OF THE SCIENCE OF ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS-2012, BERGMAN Å, HEINDEL JJ, JOBLING S, KIDD KA ve ZOELLER RT, UNEP, Switzerland, section 3, pp. 189-250.
- KURIYAMA SN, TALSNESS CE, GROTE K ve CHAHOUD I (2005) Developmental exposure to low-dose PBDE-99: Effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring. *Environ. Health Perspect.*, 113, 149-154.

- LA GUARDIA MJ, HALE RC ve HARVEY E (2006) Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 6247-6254.
- LEFÈVRE PL, BERGER RG, ERNEST SR, GAERTNER DW, RAWN DF, WADE MG, ROBAIRE B ve HALES BF (2015) Exposure of female rats to an environmentally-relevant mixture of brominated flame retardants targets the ovary, affecting folliculogenesis and steroidogenesis. *Biol. Reprod.*, biolreprod. 115.134452.
- LI N, LIU T, ZHOU L, HE J ve YE L (2012) Di-(2-ethylhexyl) phthalate reduces progesterone levels and induces apoptosis of ovarian granulosa cell in adult female icr mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 869-875.
- LIANG Q, GAO X, CHEN Y, HONG K ve HONG-SHENG W (2014) Cellular mechanism of the nonmonotonic dose response of bisphenol a in rat cardiac myocytes. *Environ Health Perspect (Online)*, 122, 601.
- LILIENTHAL H, HACK A, ROTH-HÄRER A, GRANDE SW ve TALSNESS CE (2006) Effects of developmental exposure to 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual development, and sexually dimorphic behavior in rats. *Environ. Health Perspect.*, 114, 194-201.
- LIN M-L, WANG D-C ve CHEN S-C (2013) Lactational exposure to DEHP induced adrenocortical hypertrophy and anxiety-like behavior in rats. *The FASEB Journal*, 27, 936.915-936.915.
- LORZ PM, TOWAE FK, ENKE W, JÄCKH R, BHARGAVA N ve HILLESHEIM W (2007) Phthalic acid and derivatives. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*.
- LUKACOVA J, JAMBOR T, KNAZICKA Z, TVRDA E, KOLESAROVA A ve LUKAC N (2015) Dose- and time-dependent effects of bisphenol A on bovine spermatozoa in vitro. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 50, 669-676.
- LYCHE JL, GUTLEB AC, BERGMAN A, ERIKSEN GS, MURK AJ, ROPSTAD E, SAUNDERS M ve SKAARE JU (2009) Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J. Toxicol. Environ. Health. B Crit. Rev.*, 12, 225-249.
- MA M, ZHANG Y, PEI X ve DUAN Z (2011) Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure on reproductive development and ppars in prepubertal female rats. *Wei Sheng Yan Jiu*, 40, 688-692, 697.
- MADIA F, GIORDANO G, FATTORI V, VITALONE A, BRANCHI I, CAPONE F ve COSTA LG (2004) Differential in vitro neurotoxicity of the flame retardant PBDE-99 and of the PCB aroclor 1254 in human astrocytoma cells. *Toxicol. Lett.*, 154, 11-21.
- MAKEY CM, MCCLEAN MD, BRAVERMAN LE, PEARCE EN, SJÖDIN A, WEINBERG J ve WEBSTER TF (2016) Polybrominated diphenyl ether exposure and reproductive hormones in north american men. *Reprod. Toxicol.*, 62, 46-52.
- MANSUR A, ADIR M, YERUSHALMI G, HOURVITZ A, GITMAN H, YUNG Y, ORVIETO R ve MACHTINGER R (2016) Does BPA alter steroid hormone synthesis in human granulosa cells in vitro? *Hum. Reprod.*, 31, 1562-1569.
- MARKEY CM, RUBIN BS, SOTO AM ve SONNENSCHNEIN C (2002) Endocrine disruptors: From wingspread to environmental developmental biology. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 83, 235-244.
- MENDOZA-RODRÍGUEZ CA, GARCÍA-GUZMÁN M, BARANDA-AVILA N, MORIMOTO S, PERROT-APPLANAT M ve CERBÓN M (2011) Administration of bisphenol a to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring. *Reprod. Toxicol.*, 31, 177-183.
- MHRA (2015) Guidance DEHP phthalates in medical devices. Medicines & Healthcare products Regulatory Agency, Erişim adresi: [<https://www.gov.uk/government/publications/DEHP-phthalates-in-medical-devices/DEHP-phthalates-in-medical-devices>], Erişim tarihi: 24.01.2016.
- MIYAMOTO A, KSHIRASUNA T, BOLLWEIN H ve SCHAMS D (2011) Regulation of corpus luteum development and maintenance: Specific roles of angiogenesis and action of prostaglandin f2 α . *Reprod Domest Anim*, 289.

- MLYNARČÍKOVÁ A, KOLENA J, FICKOVÁ M ve SCSUKOVÁ S (2005) Alterations in steroid hormone production by porcine ovarian granulosa cells caused by bisphenol a and bisphenol a dimethacrylate. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 244, 57-62.
- MLYNARCIKOVA A, NAGYOVA E, FICKOVA M ve SCSUKOVA S (2009) Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicol. In Vitro*, 23, 371-377.
- MLYNARČÍKOVÁ A, NAGYOVÁ E, FICKOVÁ M ve SCSUKOVÁ S (2009) Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicol. In Vitro*, 23, 371-377.
- N'TUMBA-BYN T, MOISON D, LACROIX M, LECUREUIL C, LESAGE L, PRUD'HOMME SM, POZZI-GAUDIN S, FRYDMAN R, BENACHI A ve LIVERA G (2012) Differential effects of bisphenol a and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PLoS One*, 7, e51579.
- NERÍN C, FERNÁNDEZ C, DOMEÑO C ve SALAFRANCA J (2003) Determination of potential migrants in polycarbonate containers used for microwave ovens by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5647-5653.
- NIEHS (2010) Endocrine disruptors. National Institute of Environmental Health Sciences, www.niehs.nih.gov, pp. 4.
- NISWENDER G, DAVIS T, GRIFFITH R, BOGAN R, MONSER K, BOTT R, BRUEMMER J ve NETTT (2006) Judge, jury and executioner: The auto-regulation of luteal function. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 64, 191-206.
- NISWENDER GD (2002) Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, 123, 333-339.
- NISWENDER GD, JUENGEL JL, SILVA PJ, ROLLYSON MK ve MCINTUSH EW (2000) Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.*, 80, 1-29.
- NORIEGA N, HOWDESHELL KL, FURR J, LAMBRIGHT CR, WILSON VS ve GRAY LE (2009) Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production and inhibits reproductive tract development in male sprague-dawley and long-evans rats. *Toxicol. Sci.*, kfp129.
- NORSTROM RJ (2002) Understanding bioaccumulation of pops in food webs. Chemical, biological, ecological and environmental considerations. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 9, 300-303.
- NTP-CERHR (2006) Ntp-cerhr monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). U.S. Department of Health and Human Services,, National Toxicology Program and CfTEoRtH Reproduction, NIH Publication.
- NTP-CERHR (2008) NTP-cerhr monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. U.S. Department of Health and Human Services,, National Toxicology Program and CfTEoRTH Reproduction, NIH Publication.
- NTP (1998) Report on carcinogens. National Toxicology Program, Research Triangle Park.
- O'SHAUGHNESSY P ve WATHES D (1985) Characteristics of bovine luteal cells in culture: Morphology, proliferation and progesterone secretion in different media and effects of lh, dibutyryl cyclic amp, antioxidants and insulin. *J. Endocrinol.*, 104, 355-361.
- OHARA A, MORI T, TAI S, BAN C ve NARIMOTO K (1987) Functional differentiation in steroidogenesis of two types of luteal cells isolated from mature human corpora lutea of menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65, 1192-1200.
- OLEA N, PULGAR R, PÉREZ P, OLEA-SERRANO F, RIVAS A, NOVILLO-FERTRELL A, PEDRAZA V, SOTO AM ve SONNENSCHHEIN C (1996) Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.*, 104, 298.
- PARILLO F, MARANESI M, BRECCIA G, GOBBETTI A, BOITI C ve ZERANI M (2014) In vivo chronic and in vitro acute effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on pseudopregnant rabbit corpora lutea: Possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Biol. Reprod.*, 90, 41.

- PERETZ J ve FLAWS JA (2013) Bisphenol a down-regulates rate-limiting cyp11a1 to acutely inhibit steroidogenesis in cultured mouse antral follicles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 271, 249-256.
- PERETZ J, GUPTA RK, SINGH J, HERNÁNDEZ-OCHOA I ve FLAWS JA (2011) Bisphenol a impairs follicle growth, inhibits steroidogenesis, and downregulates rate-limiting enzymes in the estradiol biosynthesis pathway. *Toxicol. Sci.*, 119, 209-217.
- PETRO E, LEROY J, VAN CRUCHTEN S, COVACI A, JORSSSEN E ve BOLS P (2012) Endocrine disruptors and female fertility: Focus on (bovine) ovarian follicular physiology. *Theriogenology*, 78, 1887-1900.
- PICARD A ve FAVARO A (2015) Common foods laced with chemical. Bell Globemedia Publishing Inc., Erişim adresi: [<http://www.rense.com/general63/cmmon.htm>], Erişim tarihi: 20.12.2016.
- PICHE CD, SAUVAGEAU D, VANLIAN M, ERYTHROPEL HC, ROBAIRE B ve LEASK RL (2012) Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and four of its metabolites on steroidogenesis in ma-10 cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 79, 108-115.
- PIVNENKO K, PEDERSEN GA, ERIKSSON E ve ASTRUP TF (2015) Bisphenol a and its structural analogues in household waste paper. *Waste Manag*, 44, 39-47.
- POSNACK NG, SWIFT LM, KAY MW, LEE NH ve SARVAZYAN N (2012) Phthalate exposure changes the metabolic profile of cardiac muscle cells. *Environ. Health Perspect.*, 120, 1243.
- PREDA C, UNGUREANU MC ve VULPOI C (2012) Endocrine disruptors in the environment and their impact on human health. *Environmental Engineering and Management Journal*, 11, 1697-1706.
- PROKOP Z, HANKOVÁ L ve JEŘÁBEK K (2004) Bisphenol a synthesis–modeling of industrial reactor and catalyst deactivation. *Reactive and Functional Polymers*, 60, 77-83.
- PUBCHEM (2016a) Bisphenol a | (CH₃)₂C(C₆H₄OH)₂ - pubchem. PUBCHEM OPEN CHEMISTRY DATABASE, Erişim adresi: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol_A#section=UN-Number], Erişim tarihi: 11.10.2016.
- PUBCHEM (2016b) DEHP | C₂₄H₃₈O₄ - pubchem. PUBCHEM OPEN CHEMISTRY DATABASE, Erişim adresi: [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dehp#section=Top>], Erişim tarihi: 09.12.2016.
- PUBCHEM (2016c) PBDE 99 | C₁₂H₅Br₅O - pubchem. PUBCHEM OPEN CHEMISTRY DATABASE, Erişim adresi: [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36159>], Erişim tarihi: 19.12.2016.
- REECE WO, (2015) DUKES' PHYSIOLOGY of DOMESTIC ANIMALS. REECE WO, ERICKSON HH, GOFF JP ve UEMURA EE, 13th ed., Am Vet Med Assoc: USA, 763.
- REINSBERG J, WEGENER-TOPER P, VAN DER VEN K, VAN DER VEN H ve KLINGMUELLER D (2009) Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on steroid production of human granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 239, 116-123.
- RITTER S (2011) Debating BPA's toxicity. *Chem. Eng. News*, 89, 14-19.
- ROMANI F, TROPEA A, SCARINCI E, DELLO RUSSO C, LISI L, CATINO S, LANZONE A ve APA R (2013) Endocrine disruptors and human corpus luteum: In vitro effects of phenols on luteal cells function. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, 31, 170-180.
- ROMANI F, TROPEA A, SCARINCI E, FEDERICO A, RUSSO CD, LISI L, CATINO S, LANZONE A ve APA R (2014) Endocrine disruptors and human reproductive failure: The in vitro effect of phthalates on human luteal cells. *Fertil. Steril.*, 102, 831-837.
- ROTHENBACHER KP (1998) Nephrotoxic effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) hydrolysis products on cultured kidney epithelial cells. *Hum. Exp. Toxicol.*, 17, 336.
- RUBIN BS, LENKOWSKI JR, SCHAEBERLE CM, VANDENBERG LN, RONSHEIM PM ve SOTO AM (2006) Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol a. *Endocrinology*, 147, 3681-3691.

- RUBIN BS, MURRAY MK, DAMASSA DA, KING JC ve SOTO AM (2001) Perinatal exposure to low doses of bisphenol a affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma lh levels. *Environ. Health Perspect.*, 109, 675.
- RUEDA BR, HENDRY IR, HENDRY III WJ, STORMSHAK F, SLAYDEN O ve DAVIS JS (2000) Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells 1. *Biol. Reprod.*, 62, 269-276.
- RYKOWSKA I ve WASIAK W (2006) Properties, threats, and methods of analysis of bisphenol a and its derivatives. *Acta chromatographica*, 16, 7.
- SAKAUE M, OHSAKO S, ISHIMURA R, KUROSAWA S, KUROHMARU M, HAYASHI Y, AOKI Y, YONEMOTO J ve TOHYAMA C (2001) Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *Journal of Occupational Health*, 43, 185-190.
- SAVABIEASFAHANI M, KANNAN K, ASTAPOVA O, EVANS NP ve PADMANABHAN V (2006) Developmental programming: Differential effects of prenatal exposure to bisphenol-a or methoxychlor on reproductive function. *Endocrinology*, 147, 5956-5966.
- SCHATTEN H ve CONSTANTINESCU GM (2007) COMPARATIVE REPRODUCTIVE BIOLOGY. 1st ed. Wiley Online Library.
- SJÖDIN A, CARLSSON Ha, THURESSON K, SJÖLIN S, BERGMAN Å ve ÖSTMAN C (2001) Flame retardants in indoor air at an electronics recycling plant and at other work environments. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 448-454.
- SLOTKIN TA, CARD J, INFANTE A ve SEIDLER FJ (2013) BDE99 (2, 2', 4, 4', 5-pentabromodiphenyl ether) suppresses differentiation into neurotransmitter phenotypes in pc12 cells. *Neurotoxicol. Teratol.*, 37, 13-17.
- SOTO AM, VANDENBERG LN, MAFFINI MV ve SONNENSCHN C (2008) Does breast cancer start in the womb? *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 102, 125-133.
- SOUZA AO, PEREIRA LC, OLIVEIRA DP ve DORTA DJ (2013) BDE-99 congener induces cell death by apoptosis of human hepatoblastoma cell line - hepg2. *Toxicol. In Vitro*, 27, 580-587.
- SVECHNIKOV K, SVECHNIKOVA I ve SÖDER O (2008) Inhibitory effects of mono-ethylhexyl phthalate on steroidogenesis in immature and adult rat leydig cells in vitro. *Reprod. Toxicol.*, 25, 485-490.
- SVECHNIKOVA I, SVECHNIKOV K ve SÖDER O (2007) The influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats. *J. Endocrinol.*, 194, 603-609.
- SWEENEY T (2002) Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals? *Domest. Anim. Endocrinol.*, 23, 203-209.
- TALSNESS CE, ANDRADE AJ, KURIYAMA SN, TAYLOR JA ve VOM SAAL FS (2009) Components of plastic: Experimental studies in animals and relevance for human health. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 364, 2079-2096.
- TALSNESS CE, SHAKIBAEI M, KURIYAMA SN, GRANDE SW, STERNER-KOCK A, SCHNITKER P, DE SOUZA C, GROTE K ve CHAHOUDI (2005) Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicol. Lett.*, 157, 189-202.
- TREINEN KA, DODSON WC ve HEINDEL JJ (1990) Inhibition of fsh-stimulated camp accumulation and progesterone production by mono (2-ethylhexyl) phthalate in rat granulosa cell cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 106, 334-340.
- TRI (2004) Toxnet-bisphenol a. Toxics Release Inventory, National Library of Medicine (NIH).
- UNEP (2007) Commercial pentabromodiphenyl ether. Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the work of its third meeting. Risk management evaluation on commercial pentabromodiphenyl ether, POPR Committee, United Nations Environment Programme.

- VANDENBERG LN, HAUSER R, MARCUS M, OLEA N ve WELSHONS WV (2007) Human exposure to bisphenol a (BPA). *Reprod. Toxicol.*, 24, 139-177.
- VANDENBERG LN, MAFFINI MV, SONNENSCHNEIN C, RUBIN BS ve SOTO AM (2009) Bisphenol-a and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr. Rev.*, 30, 75-95.
- VEIGA-LOPEZ A, BECKETT E, SALLOUM BA, YE W ve PADMANABHAN V (2014) Developmental programming: Prenatal BPA treatment disrupts timing of lh surge and ovarian follicular wave dynamics in adult sheep. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 279, 119-128.
- VOGEL SA (2009) The politics of plastics: The making and unmaking of bisphenol a "safety". *Am. J. Public Health*, 99, S559-S566.
- VOM SAAL FS, COOKE PS, BUCHANAN DL, PALANZA P, THAYER KA, NAGEL SC, PARMIGIANI S ve WELSHONS WV (1998) A physiologically based approach to the study of bisphenol a and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol. Ind. Health*, 14, 239-260.
- WANG W, CRAIG ZR, BASAVARAJAPPA MS, GUPTA RK ve FLAWS JA (2012) Di (2-ethylhexyl) phthalate inhibits growth of mouse ovarian antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 258, 288-295.
- WANG W, CRAIG ZR, BASAVARAJAPPA MS, HAFNER KS ve FLAWS JA (2012) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces oxidative stress and inhibits growth of mouse ovarian antral follicles. *Biol. Reprod.*, 87, 152.
- WANG X, SHANG L, WANG J, WU N ve WANG S (2010) Effect of phthalate esters on the secretion of prostaglandins (f2 α and e2) and oxytocin in cultured bovine ovarian and endometrial cells. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 39, 131-136.
- WOODRUFF TK ve WALKER CL (2008) Fetal and early postnatal environmental exposures and reproductive health effects in the female. *Fertil. Steril.*, 89, e47-e51.
- XU C, CHEN J-A, QIU Z, ZHAO Q, LUO J, YANG L, ZENG H, HUANG Y, ZHANG L ve CAO J (2010) Ovotoxicity and ppar-mediated aromatase downregulation in female sprague-dawley rats following combined oral exposure to benzo [a] pyrene and di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Lett.*, 199, 323-332.
- YILMAZ B (1999) HORMONLAR ve ÜREME FIZYOLOJISI. 1.baskı Feryal Matbaacılık, Ankara.
- ZHANG T, LI L, QIN XS, ZHOU Y, ZHANG XF, WANG LQ, FELICI M, CHEN H, QIN GQ ve SHEN W (2014) Di-(2-ethylhexyl) phthalate and bisphenol a exposure impairs mouse primordial follicle assembly in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.*, 55, 343-353.
- ZHOU W, LIU J, LIAO L, HAN S ve LIU J (2008) Effect of bisphenol a on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 283, 12-18.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Ruhi

Soyadı: KABAKÇI

Doğum Yeri ve Tarihi: Amasya-1988

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Evli

Adres: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Yahşihan,
71451, KIRIKKALE.

Telefon: 0318 357 42 42/ 6530

E-posta: ruhikabakci@gmail.com, ruhikabakci@kku.edu.tr

II- Eğitimi

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2011

Yabancı Dili: İngilizce

III- Unvanları

Veteriner Hekim, 2011

Araştırma Görevlisi, 2012

III- Mesleki Deneyimi

2012-2013 yıllarında, Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevliliği

2013 ve sonrasında, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevliliği

IV- Bilimsel İlgi Alanları

Projeleri:

1. ARIKAN S, SIMSEK O, KALENDER H, ESSİZ D, ATMACA N, KABAKCI R, BILMEN FS. "İnsektisid, Fungusid ve Herbisidlerin Luteal Progesteron Sentezi Üzerine Etkilerinin İn vitro Araştırılması" TÜBİTAK Projesi.
2. SIMSEK O, ATMACA N, GUNER B, KABAKCI R, BILMEN FS. "Halep Keçilerinde bazı hematolojik ve biyokimyasal kan parametreleri" BAP Projesi. Projede Araştırmacı. Tamamlandı
3. YİĞİT AA, KABAKÇI R. "Endokrin Bozucu Bileşiklerin İnek Luteal Hücre Kültüründeki Progesteron Sentezi Üzerine Etkilerinin Araştırılması." BAP Projesi. Projede Araştırmacı. Devam ediyor
4. ERAT S, KABAKCI R. "Ankara Kedilerinin Çiftleşme Davranışlarının Araştırılması" BAP Projesi. Projede Araştırmacı. Devam ediyor
5. ÇINAR M, YILDIRIM E, DURU Ö, EKİCİ H, KABAKÇI R. Akut ve Subkronik Bakır Zehirlenmesi Oluşturulan Ratlarda Gingko Biloba'nın, Oksidatif Stres, DNA Hasarı, Sitokinler, Biyokimyasal ve Hematolojik Parametreler Üzerine Etkisi. BAP Projesi. Projede Araştırmacı. Devam ediyor
6. YİĞİT AA, ÇINAR M, MACUN HC, ÖZGENÇ E, KABAKÇI R, YAZICI E, KALENDER H. Laktasyonun farklı dönemlerindeki inek ve manda sütlerinin total oksidan ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. BAP Projesi. Projede Araştırmacı. Tamamlandı.

V- Yayınları

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. SIMSEK O, ATMACA N, GUNER B, KABAKCI R, BILMEN FS. Sağlıklı Halep keçilerinde bazı hematolojik ve biyokimyasal kan parametreleri. Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi, 1-2: 86-92, 2015. 91

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. ATMACA N, YILDIRIM E, GUNER B, KABAKCI R, BILMEN FS (2014). Effect of Resveratrol on Hematological and Biochemical Alterations in Rats Exposed to Fluoride. *BioMed Research International*, 2014, 698628, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/698628>.
2. ATMACA N, SIMSEK O, ARIKAN S, KABAKCI R (2014) Evaluation of Some Electrocardiographic Parameters of Kitten and Adult Angora Cats. *Research Journal for Veterinary Practitioners* 2 (6): 113 – 116.
3. ATMACA N, CINAR M, GUNER B, KABAKCI R, GAZYAĞCI AN, ATMACA HT, CANPOLAT S (2015) Evaluation of oxidative stress, hematological and biochemical parameters during *Toxoplasma gondii* infection in gerbils. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3 (62).
4. Effects of selected fungicides on steroid synthesis by bovine luteal cells. Nurgul Atmaca, Şevket Arıkan*, Dinç Eşsiz, Hakan Kalender, Özkan Şimşek, Fatih Sultan Bilmen, Ruhi Kabakçı. *Acta Physiologica*, 2016, Volume: 217 Pages: 79-79.
5. Effect of the Incubation Time and High Dose Lead Application on Steroidogenic Luteal Cell Numbers. Fatih Sultan Bilmen, Ruhi Kabakçı, Şevket Arıkan, Özkan Şimşek. *Acta Physiologica*, 2016, Volume: 218 Page: 60.
6. Time- and Dose-dependent Effects of Lead on the Number of Cultured Granulosa Cells Showing Steroidogenic Activity. Fatih Sultan Bilmen, Özkan Şimşek, Ruhi Kabakçı, Şevket Arıkan. *Acta Physiologica*, 2016, Volume: 218 Page: 58.
7. In vitro Effects of Linuron Progesterone Synthesis. Fatih Sultan Bilmen, Şevket Arıkan, Özkan Şimşek, Nurgul Atmaca, Hakan Kalender, Dinç Eşsiz, Ruhi Kabakçı. *Acta Physiologica*, 2016, Volume: 218 Page: 49.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. ATMACA N, CINAR M, GUNER B, KABAKCI R, BILMEN FS. Sıçanlarda Florid Toksikasyonu ile Olusan Hematolojik ve Biyokimyasal Degisiklikler Üzerine Resveratrolün Etkisi. 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014.
2. Effect of the Incubation Time and High Dose Lead Application on Steroidogenic Luteal Cell Numbers. Fatih Sultan Bilmen, Ruhi Kabakçı, Şevket Arıkan, Özkan Şimşek. *Acta Physiologica*, 2016, Volume: 218 Page: 60.
3. Time- and Dose-dependent Effects of Lead on the Number of Cultured Granulosa Cells Showing Steroidogenic Activity. Fatih Sultan Bilmen, Özkan Şimşek, Ruhi Kabakçı, Şevket Arıkan. *Acta Physiologica*, 2016, Volume: 218 Page: 58.
4. In vitro Effects of Linuron Progesterone Synthesis. Fatih Sultan Bilmen, Şevket Arıkan, Özkan Şimşek, Nurgul Atmaca, Hakan Kalender, Dinç Eşsiz, Ruhi Kabakçı. *Acta Physiologica*, 2016, Volume: 218 Page: 49.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. SIMSEK O, ATMACA N, GUNER B, KABAKCI R, BILMEN FS. Selected Hematological and Biochemical Parameters in Healthy Damascus Goats. Joint meeting of the FEPS and the Baltic Physiological Societies, Kaunas, Lithuania, 2015.
2. ARIKAN S, SIMSEK O, KALENDER H, ESSİZ D, ATMACA N, KABAKCI R, BILMEN FS. “Effects of Selected Insecticides on Progesterone Synthesis by Bovine Luteal Cells” 1st International Congress On Applied Biological Sciences, Macedonia. p: 37,2015
3. Effects of selected fungicides on steroid synthesis by bovine luteal cells. Nurgul Atmaca, Şevket Arıkan*, Dinç Eşsiz, Hakan Kalender, Özkan Şimşek, Fatih Sultan Bilmen, Ruhi Kabakçı. *Acta Physiologica*, 2016, Volume: 217 Pages: 79-79.