



**FRUKTOZ VE BİSFENOL A 'NIN EŞ ZAMANLI UYGULANMASI İLE DUCTUS
EPİDİDİMİS VE SPERM MORFOLOJİSİNDE OLUŞACAK OLASI HASARA
MELATONİNİN ETKİSİ**

Saadet Özen AKARCA DİZAKAR

**DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EKİM 2017

Saadet Özen AKARCA DİZAKAR tarafından hazırlanan “Fruktoz ve Bisfenol A ’nın Eş Zamanlı Uygulanması ile Ductus Epididimis ve Sperm Morfolojisinde Oluşacak Olası Hasara Melatoninin Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından **OY BİRLİĞİ** ile Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

Histoloji ve Embriyoloji Dalı, Gazi

Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan : Prof. Dr. Belgin CAN

Histoloji ve Embriyoloji Dalı, Ankara

Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Meryem ÇAM

Histoloji ve Embriyoloji Dalı, Düzce

Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Tuncay PEKER

Anatomi Anabilim Dalı, Gazi

Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

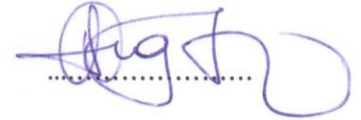


Üye : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

Histoloji ve Embriyoloji Dalı, Gazi

Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 23 /10 /2017

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


S. Özen AKARCA DİZAKAR

(23/10/2017)

FRUKTOZ VE BİSFENOL A 'NIN EŞ ZAMANLI UYGULANMASI İLE DUCTUS EPİDİDİMİS VE SPERM MORFOLOJİSİNDE OLUŞACAK OLASI HASARA MELATONİNİN ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Saadet Özen AKARCA DİZAKAR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ekim 2017

ÖZET

Günümüzde yüksek fruktoz içerikli gıda tüketiminin ve endokrin bozucu olarak bilinen kimyasal maddelere çevresel ve oral yollarla etkin kalmanın artışına paralel olarak metabolik sendrom (MetS) ve ilişkili klinik durumların görülme sıklığındaki artış dikkat çekmektedir. Son dönemlerde fruktozun beslenmedeki yeri artmış ve yüksek fruktoz tüketimi ile ilgili olarak, dislipidemi, insülin direnci, hipertansiyon ve hiperürisemi de artış görülmüştür. BPA' nın östrojen benzeri aktivite göstererek üreme organlarında toksisiteye neden olduğu, spermatogenezi baskıladığı, sperm üretimi ve fertilite oranını düşürdüğü çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda Sprague Dawley cinsi 42 tane, erişkin, erkek sıçan kullanıldı ve 7 gruba ayrıldı. Grup 1: (n=6) Kontrol, Grup 2: (n=6) Fruktoz uygulanan grup, Grup 3: (n=6) BPA uygulanan grup, Grup 4: (n=6) Fruktoz ve BPA'nın eşzamanlı uygulandığı grup, Grup 5: (n=6) Fruktoz ve Melatonin uygulanan grup, Grup 6: (n=6) BPA ve Melatonin uygulanan grup, Grup 7: (n=6) Fruktoz+BPA+Melatonin uygulanan grup şeklinde düzenlendi. Deney sonunda alınan epididimis dokusu histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak; sperm örnekleri ise sayım, motilite ve canlılık tayin yöntemleri ile incelendi ve güçlü bir antioksidan olduğu bilinen melatoninin bu deneysel sürece olan etkileri araştırıldı. BPA, Fruktoz ve her ikisinin eşzamanlı uygulamasının epididimis dokusunda ve sperm örneklerinde hasara yol açtığı, melatonin uygulamasının ise bu hasarı önlemede kısmen de olsa başarılı olduğu görülmüştür.

Bilim Kodu : 1033

Anahtar Kelimeler : Bisfenol A, fruktoz, melatonin, metabolik Sendrom, epididimis, sperm

Sayfa Adedi : 166

Danışman : Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

THE EFFECTS OF MELATONIN ON POSSIBLE DAMAGE WILL BE OCCUR ON
DUCTUS EPIDIDYMIS AND SPERM MORPHOLOGY WITH THE
COADMINISTRATION OF FRUCTOSE AND BISPHENOL A

(Ph. D. Thesis)

Saadet Özen AKARCA DİZAKAR

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

October 2017

ABSTRACT

Nowadays, it is notable that the increase in the incidence of metabolic syndrome (MetS) and related clinical cases correlated with the increased of fructose rich food consumption and environmental and oral exposure to chemical substances known as endocrine disruptors. Fructose feed has recently increased and higher fructose consumption has associated with the increased of diseases such as dyslipidemia, insulin resistance, hypertension and hyperuricemia. BPA exhibits estrogen-like activity that cause toxicity in reproductive organs suppresses spermatogenesis, decreases sperm production and fertility rates. According to information given above, we used 42 adults, male Sprague Dawley rats that were divided into 7 groups. The groups were arranged as follows, Group 1: (n=6) Control, Group 2: (n=6) Rats were treated with fructose, Group 3: (n=6) Rats were treated with BPA, Group 4: (n=6) Rats were treated with fructose and BPA contemporaneously, Group 5: (n=6) Rats were treated with fructose and Melatonin, Group 6: (n=6) Rats were treated with BPA and Melatonin, Group 7: (n=6) Rats were treated with fructose and BPA and melatonin. At the end of the experiment, epididymal tissue was removed and analyzed by using histochemical and immunohistochemical procedure. Sperm samples were counted and sperm motility and viability were investigated. Furthermore, we examined the effects of strong antioxidant melatonin on this experimental process. We found that administration of BPA, fructose, and concurrently both of these causes damaged to epididymal tissue and sperm samples on the other hand melatonin was partially successful in preventing this damage.

Science Code : 1033

Key Words : Bisphenol A, fructose, melatonin, metabolic syndrome, epididymis, sperm

Page Number : 166

Advisor : Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemeyen, hoşgörü ve sabrı ile yanımda olan sevgili hocam, danışmanım sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na, Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL başta olmak üzere tüm doktora eğitimim boyunca bilimsel birikimleri ve destekleri ile katkıları olan, çok değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a ve Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU'na, doktora tezimdeki katkılarından dolayı Anatomi Anabilim Dalı'ndan sayın Prof. Dr. Tuncay Veysel PEKER'e ,

Tez çalışmam boyunca, birlikte çalışmaktan keyif aldığım, her zaman her koşulda bana göstermiş oldukları yardım, destek ve güler yüzleri ile bu şehri anlamlı kılan çok değerli arkadaşlarım Dr. Neslihan COŞKUN AKÇAY' a, Arş. Gör. Sanem SARIBAŞ' a, Arş. Gör. Perihan Yalçinkaya' ya ve Dr. Bahar KARTAL' a,

Deney sürecindeki yardım ve katkılarından dolayı Arş. Gör. İsmail TÜRKOĞLU' na ve anabilim dalımızda görev alan tüm çalışma arkadaşlarıma ve personelimize,

Tüm yaşamım boyunca her koşulda yanımda olan, kilometrelerce uzakta da olsalar desteklerini ve sevgilerini hep hissettiren, sevgili babam Emin AKARCA' ya, annem Nükhet AKARCA' ya ve kardeşim Özben AKARCA' ya; her zaman sonsuz desteği ve anlayışı ile yanı başımda olan sevgili eşim Şerif DİZAKAR'a ve tezimin deney aşamasında içimde atan kalbi ile, yazım aşamasında ise klavyemdeki parmakları ile yanımda olan canım oğlum Ege' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	ix
RESİMLERİN LİSTESİ	x
HARİTALARIN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Erkek Genital Sistem.....	3
2.2. Testis Gelişimi, Anatomisi ve Histolojisi	3
2.2.1. Testis gelişimi	3
2.2.2. Testis anatomisi	5
2.2.3. Testis histolojisi.....	6
2.3. Epididimis.....	11
2.3.1. Epididimis gelişimi.....	11
2.3.2. Duktus epididimis anatomisi.....	14
2.3.3. Duktus epididimis fizyolojisi.....	16
2.3.4. Duktus epididimis histolojisi.....	17
2.3.5.Kan-epididim bariyeri.....	20
2.4. Hücresel Bağlantı Kompleksleri.....	22

Sayfa

2.5. Fruktöz.....	26
2.5.1. Fruktözün besinsel kaynakları.....	27
2.5.2. Fruktöz Metabolizması.....	29
2.5.3. Fruktöz ve egzersiz.....	32
2.5.4. Fruktözün uzun dönem etkileri.....	32
2.5.5. Fruktöz ve metabolik sendrom ilişkisi.....	37
2.6. Metabolik Sendrom.....	37
2.6.1. Metabolik sendromun etiyolojisi.....	38
2.6.2. Metabolik sendrom tanısı.....	38
2.6.3. Metabolik sendromun prevalansı.....	39
2.6.4. Metabolik sendrom patofizyolojisi.....	40
2.7. Bisfenol A (BPA).....	43
2.7.1. Bisfenol-A'nın tarihçesi, fiziksel ve kimyasal yapısı.....	44
2.7.2. Bisfenol A'nın üretimi ve kullanım alanları.....	44
2.7.3. BPA metabolizması.....	46
2.7.4. BPA'nın gıda ve içeceklere geçişi.....	46
2.7.5. BPA'nın sağlık üzerine etkileri.....	49
2.8. Melatonin.....	54
2.8.1. Melatonin biyosentezi, fizyolojisi ve metabolizması.....	55
2.8.2. Melatonin taşınımı, metabolitleri ve reseptörleri.....	57
2.8.3. Melatoninin etkileri.....	58
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	65
3.1. Deneysel Yöntem.....	65
3.2. Işık Mikroskopik Yöntemler.....	67
3.2.1. Doku takibi ve gömme.....	67
3.1.2. Kesit alma.....	67

	Sayfa
3.2.3. Hematoksilen-Eozin (HE) boyama yöntemi.....	67
3.2.4. Masson's Trikrom üçlü boyama yöntemi	68
3.2.5. Retiküler lifler için gümüş impregnasyon boyama yöntemi.....	69
3.2.6. İmmunohistokimyasal analizler.....	70
3.3. Sperm Morfolojisi ve Viabilitesi Değerlendirme Yöntemleri.....	71
3.3.1. Sperm eldesi.....	71
3.3.2. Sperm RAPI-DIFF II boyama yöntemi.....	72
3.3.3. Sperm Eosin- Nigrosin (viabilite) boyama yöntemi.....	72
3.4. Duktus epididimis ve Sperm Hücrelerinin Apoptozis Düzeyinin	
Annexin V- FITC ve Propidium Iodide (PI) ile Belirlenmesi.....	73
3.5. Üç Boyutlu Modelleme Yöntemi.....	73
3.6. İstatistiksel Analizler.....	73
4. BULGULAR	75
4.1. Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	75
4.2. Vücut Kitle İndeksinin (VKİ) Değerlendirilmesi.....	76
4.3. Duktus epididimis Ağırlığının Değerlendirilmesi.....	77
4.4. Duktus epididimis ve Spermde Annexin-V-FITC ve Propidium	
Iodide (PI) Boyaması Sonucu Apoptotik Hücre Bulguları.....	78
4.5. Işık Mikroskopik Bulgular.....	80
4.5.1. Hematoksilen-Eosin bulguları.....	80
4.5.2. Masson' s Trichrome bulguları.....	84
4.5.3. Gümüş impregnasyon bulguları	85
4.5.4. İmmunohistokimyasal bulgular.....	86
4.6. Spermioqram Bulguları.....	86
4.6.1. Sperm sayısı.....	87
4.6.2. Sperm motilitesi.....	87

	Sayfa
4.6.3. Sperm viabilitesi.....	88
4.6.4 Sperm baş, boyun ve kuyruk anomalileri.....	89
4.7. Üç Boyutlu Modelleme Bulguları.....	90
5. TARTIŞMA.....	115
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	126
KAYNAKLAR	127
EKLER.....	157
EK-1. Etik Kurul Onayı	158
EK-2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	159
ÖZGEÇMİŞ	160

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Çeşitli gıdaların fruktoz içerikleri	28
Çizelge 2.2. Su, gıda, vücut sıvısı ve çeşitli dokulardaki BPA düzeyleri.....	48
Çizelge 4.1. Zonula Okludens, okludin ve klaudin-1 proteinlerine ait immunreaktivite skorlaması.....	86

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Rat epididimal epitel farklılaşması ve epiteli oluşturan hücre tipleri	12
Şekil 2.2. Epididimis anatomisi	15
Şekil 2.3. Epididimisindeki major hücre tiplerinin şematik organizasyonu	17
Şekil 2.4. Kan- epididim bariyerinin şematik diyagramı	21
Şekil 2.5. Okludin yapısı şematik gösterimi	25
Şekil 2.6. Klaudin yapısı	25
Şekil 2.7. Fruktoz, glukoz ve sukrozun kimyasal formülleri	27
Şekil 2.8. İnce bağırsakta glikoz, galaktoz ve fruktoz emilimi	29
Şekil 2.9. Karaciğerde fruktoz ile glukoz metabolizmasının karşılaştırılması	30
Şekil 2.10. Karaciğerde fruktoz metabolizması	31
Şekil 2.11. Fruktoz kaynaklı dislipideminin olası mekanizmaları	33
Şekil 2.12. Fruktoz kaynaklı insülin direncinin olası mekanizması	35
Şekil 2.13. Fruktozdan ürik asit oluşumu	36
Şekil 2.14. Metabolik sendrom ve bileşenleri	40
Şekil 2.15. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı	44
Şekil 2.16. BPA ile indüklenen kronik hastalıklarda hücrel ve moleküler mekanizmalar	49
Şekil 2.17. Melatonin kimyasal yapısı	55
Şekil 2.18. Melatonin sentezi	57
Şekil 2.19. Melatonin ve dişi üreme sistemi	61
Şekil 2.20. Erkek üreme sisteminde melatoninin düzenleyici rolü	62
Şekil 4.1. Deney gruplarına ait vücut ağırlıklarının ortalama $\pm$ SD grafiği	76

Şekil	Sayfa
Şekil 4.2. Deney gruplarına ait epididimis ağırlıklarının ortalama $\pm$ SD grafiği.....	78
Şekil 4.3. Annexin-V-FITC pozitif epididimal hücre yüzdeleri ortalama $\pm$ SD grafiği.....	79
Şekil 4.4. Annexin-V-FITC pozitif sperm hücre yüzdeleri ortalama $\pm$ SD grafiği	80
Şekil 4.5. Toplam sperm sayılarına ait ortalama $\pm$ SD grafiği.....	87
Şekil 4.6. Deney gruplarına ait sperm motilite yüzdeleri ortalama $\pm$ SD grafiği	87
Şekil 4.7. Deney gruplarına ait sperm viabite yüzdeleri ortalama $\pm$ SD grafiği	88
Şekil 4.8. Deney gruplarına ait anomalili sperm sayılarının ortalama $\pm$ SD grafiği.....	90

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti.	91
Resim 4.2. Fruktoz grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti.	92
Resim 4.3. BPA grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti.	93
Resim 4.4. BPA+Fruktoz grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti.....	94
Resim 4.5. Fruktoz+Melatonin grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti.....	95
Resim 4.6. BPA+Melatonin grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti.	96
Resim 4.7. BPA+Fruktoz+Melatonin grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti.....	97
Resim 4.8. A,B. Kontrol grubu, C,D. Fruktoz grubu, E,F. BPA grubu, G,H. Fruktoz+ BPA grubuna ait gümüşleme ve Masson'un üçlü boyaması yapılmış duktus epididimis dokusu	98
Resim 4.9. A,B. Fruktoz+Melatonin grubu, C,D. BPA+Melatonin grubu, E,F. Fruktoz+BPA+Melatonin grubuna ait gümüşleme ve Masson'un üçlü boyaması yapılmış sıçan duktus epididimis dokusu.	99
Resim 4.10. Kontrol grubu, B. Fruktoz grubu, C. BPA grubu, D.Fruktoz+BPA grubuna ait ZO-1 immunreaktivitesi.....	100
Resim 4.11. Fruktoz+Melatonin grubu, B. BPA+Melatonin grubu, Fruktoz+BPA+Melatonin grubuna ait ZO-1 immunreaktivitesi	101
Resim 4.12. A. Kontrol grubu, B. Fruktoz grubu, C. BPA grubu, D.Fruktoz+BPA grubuna ait okludin immunreaktivitesi.....	102
Resim 4.13. A. Fruktoz+Melatonin grubu, B. BPA+Melatonin grubu, C. Fruktoz+BPA+Melatonin grubuna ait okludin immunreaktivitesi	103
Resim 4.14. A. Kontrol grubu, B. Fruktoz grubu, C. BPA grubu, D.Fruktoz+BPA grubuna ait klaudin 1 immunreaktivitesi.....	104
Resim 4.15. A. Fruktoz+Melatonin grubu, B. BPA+Melatonin grubu, C. Fruktoz+BPA+Melatonin grubuna ait klaudin-1 immunreaktivitesi	105
Resim 4.16. Kontrol grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.....	106
Resim 4.17. Fruktoz grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.....	107

Resim	Sayfa
Resim 4.18. BPA grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri	108
Resim 4.19. BPA+Fruktoz grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.....	109
Resim 4.20. Fruktoz+Melatonin grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.....	110
Resim 4.21. BPA+ Melatonin grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.....	111
Resim 4.22. Fruktoz +BPA+ Melatonin grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri	112
Resim 4.23. Deney gruplarına ait sperm hücrelerinin viabilite tayini.....	113
Resim 4.24. Farklı sperm yapılarının duktus epididimis lümeninde üç boyutlu görüntülenmesi.	114

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
cm	Santimetre
dk	Dakika
dL	Desilitre
dm^3	Desimetreküp
g	Gram
K	Potasyum
kDa	Kilo dalton
kg	Kilogram
m^2	Metrekare
m^3	Metreküp
mg	Miligram
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mmHg	Milimetre civa
Na	Sodyum
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
pg	Pikogram
sn	Saniye
$\Delta\Psi\text{m}$	Mitochondrial membrane potential

Kısaltmalar	Açıklamalar
[V]-ATPaz	Vakuole adenosin Trifosfataz
A.	Arter
AACE	Amerikan Klinik Endokrinologlar Birliği
AA-NAT	N-asetil-transferazı
ABP	Androjen-bağlayıcı protein
AMH	Anti-Müllerian hormon
AMP	Adenosin monofosfat
ATII	Angiotensin II
ATP III	Yetişkin Tedavi Paneli III
ATPaz	Adenosin Trifosfataz
BH4	Tetrahidrobiopterin
BPA	Bisfenol A
BPAS	BPA-sülfat
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CAS	Chemical Abstracts Service
ChREBP	Karbonhidrat yanıt elementini bağlayan protein
CRP	C-reaktif protein
DGAT	Diaçilgliserol açıl transferaz
DHT	Dihidrotestosteron
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
eNOS	Endotelial enzim nitrik oksit sentaz
FFA	Free fatty acid
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Frk.	Fruktoz
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GC- MS	Gas chromatography–mass spectrometry
GH	Growth hormon
GLUT2	Glucose transporter 2
GLUT5	Glucose transporter 5
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
H	Hidrojen

Kısaltmalar	Açıklamalar
hCG	Human chorionic gonadotropin
HDL	High Density Lipoprotein
H&E	Hematoksilen-Eosin
HIOMT	Hidroksiindol-O-metiltransferaz
Hoxa10	Homeobox A10
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IFN-γ	Interferon gamma
IgG	İmmunoglobulin G
IL-6	İnterlökin 6
IL-8	İnterlökin 8
IRS-I	İnsülin reseptör substratı-1
JAMs	Junctional adhesion molecules
KAH	Koroner arter hastalığı
LH	Luteinizan hormon
LH	Luteinizan hormon
LPL	Lipoprotein lipaz
MAGuK	Membrane associated guanylate kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MetS	Metabolik Sendrom
METSAR	Türkiye Metabolik Sendrom Araştırması
MT1	Melatonin 1
MT2	Melatonin 2
MT3	Melatonin 3
NAT	N-asetiltransferaz
NCEP	Ulusal Kolesterol Eğitim Programı
NEFA	Non-esterifiye yağ asitlerine
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NO	Nitrik oksit
OH	Hidroksil
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1,
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitör-1

Kısaltmalar	Açıklamalar
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDZ	Postsynaptic density 95/disc-large/zona occludens
PGH	Primordial germ hücreleri
pH	Power of hydrogen
PI	Propidium Iodide
PI3K/AKT	Phosphatidylinositol 3-kinase/ Protein Kinase B
PVC	Polivinil klorür
RAAS	Renin angiotensin aldosterone system,
RAS	Renin anjiyotensin sistemi
RIA	Radioimmunoassay
ROS	Reactive oxygen species
SGLT1	Sodium-glucose linked transporter
SNS	Sympathetic nervous system
SREBP	Sterol düzenleyici element bağlayan protein
SRY	Sex-determining region Y
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SY.	Susam yağı
TDF	Testis belirleyici faktör
TEKHARF	Türk erişkinlerinde kalp hastalıkları ve risk faktörleri
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TG	Trigliserid
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TNF-α	Tümör nekrozis faktör- α
V.	Ven
VKİ	Vücut kitle indeksi
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ZO	Zonula okludens
ZP	Zona pellusida

1. GİRİŞ

Metabolik sendrom genetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşim sonucu oluşan, insülin direnci, visseral yağlanma, aterojenik dislipidemi, endotel disfonksiyon ve yüksek kan basıncı, hiperkoagülasyon ve kronik stres gibi çeşitli faktörleri içeren bir sendromdur [1]. Toplumda giderek artan şekilde yaygınlaşması ve içerdiği sistemik bozukluklar nedeni ile literatürde hızla artış gösteren araştırmalarla her geçen gün daha fazla önem kazanmaktadır [2].

Obezite ve insülin direncinin yanı sıra yaşlanma, proinflamatuvar durum, hormonal değişiklikler gibi diğer faktörler metabolik sendromun nedeni olarak ifade edilse de metabolik sendromun mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır [3].

Fakat günümüzde yüksek fruktoz içerikli gıda tüketiminin ve yanı sıra endokrin bozucu olarak bilinen kimyasal maddelere çevresel ve oral yollarla etkin kalmanın artışına paralel olarak Mets ve ilişkili klinik durumların görülme sıklığındaki artış dikkat çekmektedir. Bu endokrin bozucuların başında ise son yıllarda yapılan araştırmalarda, insan sağlığı üzerine olumsuz etkilerinden dolayı ilgi odağı haline gelen bisfenol A (BPA) gelmektedir [4, 5].

BPA üretimi, endüstriyel kullanım alanları ve miktarı tüm dünyada her geçen gün artmaktadır. Polivinil karbonattan, pedodontiye, metal konserve kutularının iç yüzeyinden, oyuncak, biberon ve emzikler gibi bebek ürünlerine, CD, DVD ve elektronik cihazları içeren plastiklerde, endüstride köpük ve paketlenme sistemlerinde, kozmetik ve hatta diş macunu gibi kişisel bakım ürünlerinde BPA sıkça kullanılmaktadır [6-9].

BPA'nın endokrin sistem fonksiyonu üzerindeki etkileri, östrojen-17- β estradiol benzer ksenoöstrojenik bir bileşik olması ile ilgilidir. Klasik nükleer, non-klasik membran östrojen reseptörlerine bağlanarak ya da non-genomik yollara entegre olarak beyin, ovaryum, meme bezi gibi östrojen ile ilişkili organlarda değişikliklere yol açmakta ve endokrin sistem üzerinde etki göstermektedir. Bunun yanı sıra oksidatif strese neden olarak mitokondriyel fonksiyonu ve antioksidan enzimleri olumsuz yönde etkilediği de bilinmektedir [10]. Östrojen benzeri aktivite göstererek üreme organlarında toksisiteye neden olduğu, testosteron sentezini inhibe ettiği ve ratlarda yapılan çalışmalarda spermatogenezi baskıladığı, testiküler ve epididimal ağırlıklarda azalmaya neden olduğu,

sperm üretimi ve fertilité oranını düşürdüğü çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [11]. Mesleki olarak BPA' ya etkin kalan erkeklerde, yüksek úriner BPA düzeyi ile ilişkili sperm sayısı ve motilitesinde azalma gözlemlenmiştir [12, 13].

Fruktoz, yapısal olarak 6 karbona sahip, ağırlıklı olarak meyve ve az miktarda sebze içeriğinde de yer alan bir polihidroksikentondur [14, 15]. Son dönemlerde fruktozun beslenmedeki yeri artmış ve yüksek fruktoz tüketimi ile ilgili olarak, dislipidemi, insülin direnci, hipertansiyon ve hiperúrisemi de artış görölmüştür [16, 17]. Araştırmalarda aşırı fruktoz tüketiminin MetS ve etkileri yoluyla erkek úreme sistemini olumsuz etkilediğı gösterilmiştir. [18, 19]. MetS bileşenlerinden obezitenin hipotalamik-pituiter- gonadal aksı bozarak skrotal sıcaklığı artırdığı ve sperm gelişimini, morfolojisi ve fonksiyonunu etkilediğı bildirilmiştir [20]. İnsülin direnci endokrin fonksiyonuna etki ederek semen parametrelerinin değışimine ve erektile disfonksiyona yol açmaktadır [21, 22].

Melatonin epifiz tarafından úretilen, sirkadiyen ritmin düzenlenmesi, kemik metabolizması, úreme, mevsimsel değışimlerin modúasyonu, gıda alımı, retina fizyolojisi ve immün sistem regúasyonunu da içeren birçok fizyolojik role sahip; antioksidan, onkostatik, antienflamatuar ve antikonvúlsan etkileri bulunan bir biyomoleküldür [23-28].

Literatürde melatoninin farklı yollarla ile erkek úreme sistemini etkilediğı, gonadotropin ve testosteron sekresyonuna etki ederek sperm kalitesini artırdığına yönelik çeşitli bilgiler mevcuttur [29]. Son çalışmalarda, melatoninin Bisfenol A ile indüklenmiş oksidatif toksisiteye karşı testis ve sperm kalitesini apoptosis sürecini kontrol ederek koruduğı bildirilmektedir. Fakat literatürde BPA ve fruktoz eş zamanlı uygulanması ve melatonin arasındaki ilişkinin, duktus epididimis ve sperm üzerindeki etkileri açıklanmamıştır [30, 31].

Bu bilgiler doğırtusunda, çalışmamızda erkek sıçanlara oral yolla yüksek doz fruktoz ve BPA uygulanmış, bu maddelerin duktus epididimis dokusuna ve sperm morfolojisine olan etkileri değışlendirilerek, melatoninin bu süreçteki olası etkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Genital Sistem

Erkek genital sistem spermatozoa veya sperm üretiminden, beslenmesinden, depolanmasından, androjenlerin sentez ve sekresyonundan sorumlu olan, kompleks bir sistemdir. Topografik ve gelişimsel olarak iç ve dış genital organlar olmak üzere iki bölümde incelenir [32]. Erkek üreme sistemini oluşturan yapılar:

- Testis
 - Tubuli rekti
 - Rete testis
- Dış genital kanallar
 - Duktuli efferentes testis
 - Duktus epididimis
 - Duktus deferens
 - Ductus ejaculatorius
- Üretra
- Yardımcı bezler
 - Vezikula seminalis
 - Prostat
 - Bulboüretral bez (Cowper bezleri)
- Penis

2.2. Testis Gelişimi, Anatomisi ve Histolojisi

2.2.1. Testis gelişimi

Embriyonun cinsiyeti genetik açıdan döllenme sürecinde belirlenmiş olmasına rağmen, gonadlar gelişimin 7. haftasına kadar erkek veya dişi morfolojik özellikleri açısından farklılık göstermezler ve farklanmamış gonad olarak isimlendirilirler [33, 34].

Testisler, karın arka duvarını döşeyen mezotel, altında bulunan mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve ilkel germ hücreleri (ilkel cins hücreleri) olarak 3 farklı kaynaktan köken alır [33, 34].

Gonad gelişimi embriyonal gelişimin 5. haftasında mezonefrozun medialinde mezotelin kalınlaşması ile başlar. Mezodermal epitelin proliferasyonu ile birlikte altındaki mezenşim çoğalarak yoğunlaşır, sağda ve solda mezonefrozun medialinde genital veya gonadal sırt biçimlenir [33, 34].

Gonadların over ve testise farklanmasında indükleyici etkiye sahip olan ve epiblastan köken alan primordiyal germ hücreleri (PGH), embriyonun katlanmasıyla birlikte epiblastan primitif çizgi boyunca göç ederek 3. haftada yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler. 4. hafta ile son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca göç etmeye devam ederler ve 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır, 6. haftada genital sırtlara yerleşirler. Primordial germ hücrelerinin bu göçü ve çoğalması c-kit reseptörü ile hücre membran ligandı olan kök hücre faktörünün etkileşimine bağlıdır [33-35].

Gonadların erkek ya da dişi yönünde farklılaşmaları XX ve XY kromozom kompleksine bağlıdır ve embriyonal gelişimin 7. haftasında belli olmaktadır. XY kromozomuna sahip embriyoda, Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki cinsiyet belirleyici bölgesinde bulunan SRY (sex-determining region Y) geninin kodladığı testis belirleyici faktör (TDF) tarafından kontrol edilerek; medulla testise farklanırken, korteksi bir takım kalıntılar dışında tamamen dejenere olmaktadır. Primer seks kordonları, çoğalmaya devam ederek medullanın derinlerine doğru ilerlerler ve testis veya medullar kordonları yaparlar [34]. Kordonlar gonadların hilusuna doğru ağ şeklinde birbirleri ile anastomoz yaparak, rete testis tübüllerini oluştururlar. Daha ileri evrelerde primer seks kordonlarının yüzey epiteli ile olan bağlantısı tunica albuginea denilen kalın fibröz kapsülün araya girmesi ile son bulur [33, 34].

Gelişimin 12. haftasında testis kordonları at nalı şeklini alır ve uçları birleşerek, ince bir kanal olan tubuli rektiye, tubuli rektelerde rete testise açılır. Testis kordonları sadece primordiyal germ hücreleri ve testisin yüzey epitelinden gelişen Sertoli hücrelerini (destek hücreleri) içerirler [34]. Testis kordonları arasında, genital sırtın mezenşiminden köken

alan interstisiyel Leydig hücreleri bulunur. Embriyonik gelişimin 8. haftasında, testosteron hormonu etkisiyle şekillenirler. Wolff kanalı testis içi genital kanallar yönünde farklılaşırken (duktus epididimis, duktus deferens, vesicula seminalis), dış genital organlar dihidrotestosteron etkisiyle sinüs ürogenitalisten gelişirler [33, 34].

Puberteye kadar testis kordonları kapalı (solid) halde iken, puberte ile birlikte kordonların lümenleri açılır ve seminifer tübüller biçimlenir. Kanalize olan seminifer tübüller rete testis tübülleriyle birleşir duktuli rekti ve duktuli efferenteslere açılırlar. Bunlar da tek bir kanal olan duktus epididimis ile duktus deferensle birleşirler.

Testisler gestasyonun yaklaşık 12. haftasında inguinal bölgeye gelmekte, inguinal kanaldan 28. haftada geçmekte ve skrotuma 33. haftada ulaşmaktadır.

2.2.2. Testis anatomisi

Sperm ve androjenlerin üretiminden sorumlu olan testisler, ilk olarak karın boşluğunda gelişen ve fetal gelişim sırasında scrotum' a inerek, vücut boşluğunun dışında scrotum'un içerisinde yer alan, sıkı ve elastik özelliğe sahip, 4-5 cm uzunluğunda ve yaklaşık 3 cm kalınlığında, oval şekilli organlardır. Sol testis genellikle sağ testise göre daha büyüktür. Her bir testisin extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere iki ucu vardır. Testis yanlardan basık ve önde dar margo anterior, arkada ise margo posterior ile birleşen facies lateralis ve facies medialis olmak üzere iki yüzü bulunmaktadır. Testisler scrotum' da oblik olarak uzanırlar.

Testisler dıştan içe doğru tunica vaginalis testis, tunica albuginea ve tunica vasculosa olmak üzere üç katman ile çevrelenmiştir. Üst kısmında, Müller kanalının embriyolojik kalıntısı olan appendix testis bulunmaktadır. Tunica vaginalis; lamina parietalis (periorchium) ve lamina visseralis (epiorchium) olmak üzere iki katman içerir. Tunica albuginea' dan çıkan çok sayıda septula testis ise, testisi yaklaşık 250-300 arasında değişen lobuli testise ayırmaktadır ve yakınlaşıp birleşerek mediastinum testisi oluşturmaktadır. Her bir lobül içerisinde 1-4 arasında tubuli seminiferi contorti (seminifer tübül) bulunmaktadır. Bu kıvrımlı kanallar giderek düzleşir ve tubuli seminiferi recti olarak devam eder ve mediastinum testise uzanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve rete testisi

oluştururlar. Rete testis her biri yaklaşık 20 cm olan ductuli efferentes testis ile ductus epididimise bağlanır.

Testisler aorta' dan çıkan ve epididimis'e bir dal veren arteria testicularis ile beslenirler. Arteria testikularis, a. ductus deferentis ve testis kılıflarını besleyen a. cremasterica ile anastomoz yapar. Scrotum ise a. pudenda interna' nın dallarından beslenir. Testis' deki kan plexus pampiniformis' e ve v. testicularis dextra ile v. cava inferior' a ve v. testicularis sinistra ile sol v. renalis' e dökülür.

Plexus coeliacus' tan gelen sempatik sinir lifleri testisleri ve epididimisi besleyen arterlere eşlik etmektedir.

Testislerin lenfi nodi lumbales' e, testis kılıfları ve scrotumun lenfi ise nodi lymphoidei inguinales' e dökülmektedir [36, 37].

2.2.3. Testis histolojisi

Testisler, erkek üreme hücresi olan spermiyumların üretimini kapsayan ekzokrin fonksiyona ve testosteron gibi androjenlerin sentezi, depolanması ve salınımını içeren endokrin işleve sahip birleşik tübüler bir bezdir. Testisin dış katmanı olan tunica vaginalis, seröz bir zardır ve testisin ön ve yan kısımlarında tunica albuginea'yı örter [32, 35, 38, 39].

Tunica albuginea ise yoğun fibroelastik bağ doku özelliğinde, düzensiz yerleşmiş kollagen demetler ve düz kas lifleri içeren katmandır [32, 35, 38].

Tunica vasculoza tunica albuginea 'nın iç yüzünde yer alan ve vaskülerize yapılarca zengin gevşek bağ dokusu yapısındaki iç katmandır.

Seminifer tübül duvarı, germinal ya da seminifer epitel olarak adlandırılan çok katlı epitel özelliğindedir ve Sertoli (destek) hücrelerinin yanı sıra ve spermatogenik hücre serisini oluşturan hücreleri içermektedir [38-40].

Sertoli hücreleri kan-testis bariyeri ile spermatosit ve spermatidlerin otoimmün yanıtıtan korunmasını sağlama, spermatogenik hücrelerin desteklenmesi ve beslenmesi, spermiyogenezisin sonunda, spermatidler tarafından atılan fazla hücre bölümlerini

fagositoz yoluyla elimine etme, spermlerin spermiyasyon sürecinde, seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırma, Androjen-bağlayıcı protein (ABP), Anti-Müllerian hormon (AMH), inhibin ve transferrin sentezi gibi fonksiyonlara sahip hücrelerdir [37-40]. Spermatogenik seriye ait hücreler bazaldan lümeneye doğru spermatogonyumlar, spermatositler, spermatidler ve spermatozoidlerdir.

Spermatogonium

Spermatogonyumlar bazal kompartmanda lokalize, bazal lamina ile direkt ilişkide olan diploid yapıda spermatogenik hücrelerdir. Spermatogoniyal kök hücreden köken alırlar ve pubertede başlayan mitotik bölünmeler geçirirler. Koyu A tipi, açık A tipi ve B tipi olmak üzere üç farklı spermatogoniyal hücre bulunmaktadır [38, 39].

Koyu-A tipi spermatogonyumlar küçük hücreler olup, çekirdekleri oval ve heterokromatiktir. Mitozla bölünüp, çoğalarak yeni koyu ve açık A tipi spermatogonyumları meydana getirirler [37-40].

Açık-A tipi spermatogonyumlar ökromatik çekirdeklere sahip, mitotik aktivite göstererek çoğalarak B-tipi spermatogonyumları meydana getiren hücrelerdir [38, 39].

B-tipi spermatogonyum, merkezi lokalizasyona sahip, küre çekirdeklere sahiptirler ve mitoz bölünmeler geçirerek primer spermatositleri oluştururlar [35-40].

Spermatositler

B tipi spermatogonyumların mitoz bölünmesi sonucu oluşan hücreler primer spermatositlerdir. Spermatogenik serinin en büyük hücreleri olup, kan-testis bariyerinin devamlılığına yardım ederler. Oluştuktan kısa süre sonra mayoz başlamadan önce DNA' larını replike ederek, 46 kromozom (44+XY) ve 4d DNA içeriğine sahip olurlar [36-40]. Mayoz I ile kromozom sayıları azalırken DNA miktarı haploid duruma gelir. Sekonder spermatositler, haploid kromozom (n) sayısı ve 2d DNA ile karakterizedir.

Sekonder spermatositler daha küçük hücrelerdir ve interfazda çok kısa süre kalan ve hemen ikinci mayoz bölünmeye giren bu hücrelere seminifer epitelde rastlamak zordur. 2d

DNA içeren sekonder spermatositler, kromozomlarını replike etmezler ve hızla 2. mayotik bölünmeye girerek iki haploid spermatid oluştururlar.

Spermatidler

Spermatidler yaklaşık 8 µm çapında, yuvarlak, DNA içeriği bakımından haploid küçük hücrelerdir. Seminifer tübül lümenine yakın adluminal bölgede lokalizedirler. Bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum, çok sayıda mitokondriyum ve iyi gelişmiş bir Golgi kompleksine sahiptirler. Bölünme olmadan; Golgi fazı, kep fazı, akrozom fazı ve olgunlaşma (maturasyon) fazlarını içeren spermiyogenezis süreci ile spermatozoaya farklılırlar.

Golgi Fazı

Granüllü endoplazmik retikulumda hidrolitik enzimler oluşur ve Golgi aparatında modifiye edilip preakrozom granülleri olarak paketlenir. Bu veziküller, daha sonra akrozom vezikülünü oluştururlar. Akrozomal vezikül, gelişen spermatozoanın ön kutbunu meydana getirir. Akrozomun oluşumu sırasında, sentrioller nukleus evresinden ayrılarak, flagellar aksonem yapısına katılırlar.

Kep (Şapka) Fazı

Akrozomal vezikül, yoğunlaşarak nukleusun ön yarısı üzerinde yayılarak akrozomal kep adını alır. Akrozomal kepin altında lokalize nuklear zarf bölümü porlarını kaybederek kalınlaşır ve nuklear içerik yoğunlaşır.

Akrozom Fazı

Bu fazda spermatid morfolojisinde birçok değişiklik söz konusudur. Akrozom; hyaluronidaz, asit fosfataz, nöraminidaz ve tripsin benzeri proteaz olan akrozin gibi hidrolitik enzimleri içerir. Spermatid kendini tekrar hizalayarak ve başı Sertoli hücrelerine gömülü şekilde, bazal laminaya yönelmiştir. Nukleus yoğunlaşır, uzar ve mitokondriyonyon ile yer değiştirir ve nukleus yassılaşarak özel morfolojisini kazanır. Mikrotübüller, akrozomun arka kenarından spermatidin arka kutbuna uzanan silindirik bir kılıf olan manşeti oluşturmak üzere bir araya gelirler. Sentrioller nukleusun arka bölümüne

taşınarak spermin boyun bölümünü oluşturmak için değişime uğrarlar. Plazma membranı flagellumu sarmak için posterior kısma hareket ederken manşet kaybolur ve mitokondriyonlar göç ederler. Bu bölge sperm kuyruğunun orta parçası olarak adlandırılır. Orta parçanın distalinde fibröz kılıf esas parçanın dokuz fiberini çevreler. Kuyruğun fibröz kılıfın distalinde kalan bu kısa segmenti son parça olarak isimlendirilir [32].

Maturasyon Fazı

Maturasyon fazı, spermatid sitoplazmasının atılması ile karakterizedir. Flagella çevresindeki rezidüel cisim adı da verilen fazla sitoplazma atılarak matür immotil özellikte spermatozoa oluşur. Spermatozoalar, Sertoli-spermatid bağlantı komplekslerinin ortadan kaldırıldığı ve spermatidlerin Sertoli hücrelerinden ayrıldığı spermiyasyon süreci ile seminifer tübül lümenine salınırlar [38, 39].

Matür Spermatozoa Yapısı

Spermatozoalar, nukleusun yerleştiği bir baş ve uzunluğunun büyük bir kısmını oluşturan; boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört bölüm içeren kuyruk kısmından oluşmaktadır. Matür bir insan spermi yaklaşık 65 µm uzunluğundadır [37].

Baş

Sperm başı yassılaşmış olup, sivri 4,5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındadır. 22 otozom + Y kromozomu veya 22 otozom + X kromozomu içeren elektron yoğun nukleus ve akrozomdan meydana gelmektedir. Akrozom nörominidaz, hyaluronidaz, asit fosfataz ve akrozin gibi tripsin benzeri proteaz içermektedir ve özel bir lizozom olarak kabul edilmektedir. Spermatozoanın zona pellusidanın (ZP) ZP3 molekülü ile etkileşimi akrozomal reaksiyonunu tetiklemektedir. Akrozomal enzimlerin salınması ile sperm penetrasyonu ve fertilizasyon süreci kolaylaştırılır [35-39].

Kuyruk (flagellum)

Boyun, orta, esas ve son parça olmak üzere dört temel bölgeden oluşur. Boyun kısmı yaklaşık 5 µm uzunluğundadır ve başı geri kalan kuyruk kısmına bağlar. Sentriyolleri içermektedir [38].

Orta parça yaklaşık 7 µm uzunluğundadır, boyun ve esas parça arasında yer almaktadır. Kuyruğun hareketi ile için gerekli olan enerjiyi sağlamakla yükümlü mitokondriyonlar ile karakterizedir. Sarmal olarak düzenlenim gösteren mitokondriyonların oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış kalın lifler adı verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz uzamına seyreden kolonlardan oluşur. Orta parçanın alt sınırı mitokondriyonel sarmalın annulusta sonlanmasıyla belirgindir.

Esas parça yaklaşık 45 µm uzunluğu ile sperm kuyruğunun en uzun bölümüdür. Annulusdan son parçaya kadar uzanan kısımdır. Yedi dış yoğun lif tarafından sarılı, merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıf, spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan proteinler olan keratin içerir.

Son parça, yaklaşık 5 µm uzunluğundadır ve plazmalemma tarafından çevrelenen merkezi bir aksonem yapısından oluşmaktadır [35].

İnterstisyel doku

Seminifer tübüller arasında ise bağ dokusu ve hücreleri, sinirler, kan ve lenf damarlarından ve androjenlerin üretiminden sorumlu Leydig (İnterstisiyel) hücrelerinden oluşan interstisyel bağ dokusu bulunmaktadır. Leydig hücreleri, tek tek veya gruplar halinde bulunabilen, yuvarlak ya da poligonal morfolojide, merkezi bir çekirdek ile küçük lipid damlacıklarından zengin ve Reinke kristalleri ile karakterize eozinofilik bir sitoplazmaya sahiptirler [34-40].

Spermatogenez

Sperm üretiminin gerçekleştiği kompleks süreç, spermatogenez olarak adlandırılmaktadır. Hipofizden gonadotropin hormon seviyelerinin puberte sonrası artışı ile başlar ve tüm

yaşam süresince devam etmektedir. Testosteron, Luteinizan hormon (LH), Folikül uyarıcı hormon (FSH), östrojenler ve GH (Growth, büyüme hormonu) spermatogezisi uyaran faktörlerdir. Birbirinden farklı olayları içeren üç farklı alt bölümden oluşmaktadır.

Spermatogonyal faz, spermatogonyumların mitoz bölünme sonrası primer spermatositlere farklılaşacak olan spermatogonyum popülasyonunu oluşturur [35-38].

Spermatosit fazında primer spermatositler iki mayotik bölünme sonucu haploid spermatidleri oluşturur. Spermiyogenez fazında spermatidler matür sperm hücrelerine farklılaşırlar.

Spermiasyon adı verilen bir diğer süreç ise spermatogenez sonrasında spermatidlerin son olgunlaşma fazı olarak gerçekleşmektedir [33, 34].

2.3. Epididimis

2.3.1. Epididimis gelişimi

Epididimisin prenatal gelişimi

Memelilerde, Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktör (TBF) için SRY geni, farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişiminde anahtar fonksiyon görmektedir. Bu faktörün etkisi altında, gonadal kordonlar seminiferöz kordonlara farklılaşırlar [33, 34].

7. haftadan önce gonadların görünümü, her iki cinsten de birbirine benzerdir ve farklılaşmamış gonadlar olarak isimlendirilir.

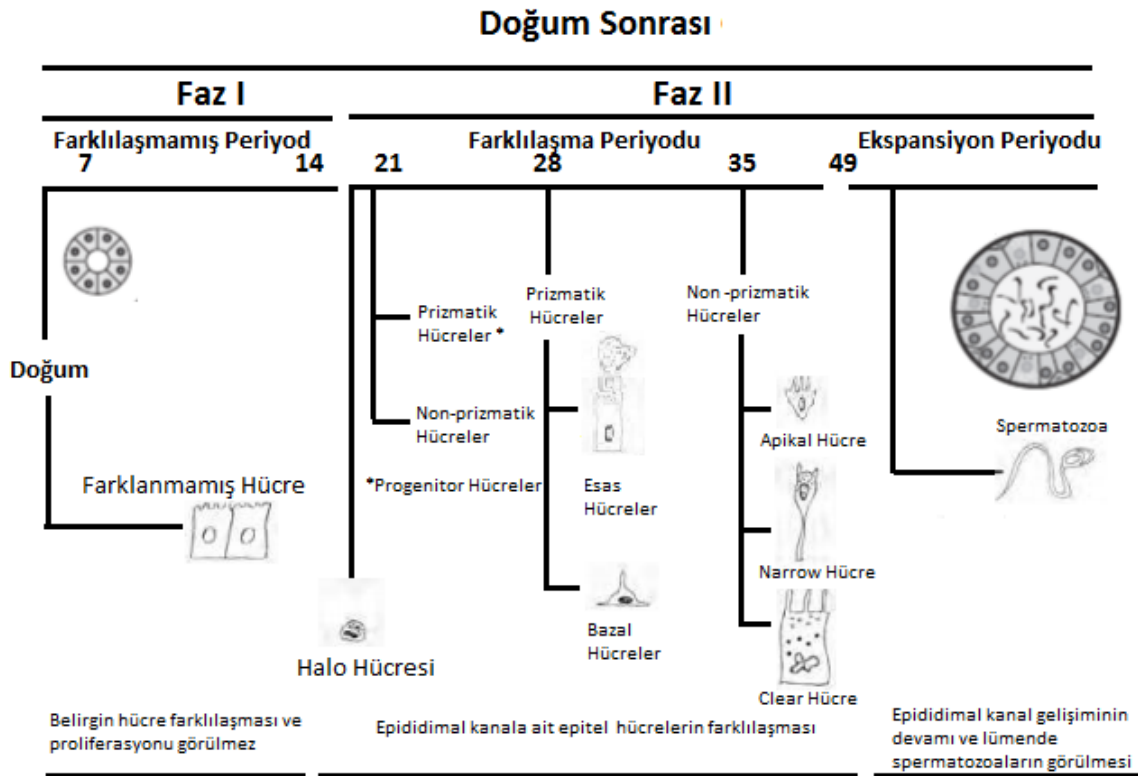
Fetal testisler maskulinizan hormonlar-testosteron ve Müllerian inhibitör faktör üretirler. Sertoli hücreleri, Müllerian inhibitör faktör üretimine, 6.- 7. haftada başlar. İnterstisyel hücreler, testosteron salgılamaya 8. haftada başlarlar. Testosteron üretimi, insan koryonik gonadotropik hormonu (Hcg) tarafından stimüle edilir. Testosteron, erkeklerde mezonefrik (Wolffian) kanallardan erkek genital kanalların oluşumunu uyarırken, Müllerian inhibitör faktör paramezonefrik (Müllerian) kanalın epitelyal- mezenşimal dönüşümü ile kaybolmasına neden olur. 8. haftada fetal testislerin tarafından üretilen testosteronun etkisiyle her bir mezonefrik kanalın proksimal kısımları kıvrıntılı hal alır ve epididimis

oluşur. Mezonefroz dejenere olduğunda mezonefrik kanallardan bazıları varlıklarını sürdürür ve efferent duktulileri (=duktuli efferentes) oluştururlar. Bu duktuliler duktus epididimise açılırlar. Epididimisin distalinde mezonefrik kanal kalın bir düz kas tabakası kazanır ve duktus deferens oluşur [33].

Epididimisin postnatal gelişimi

Prenatal gelişim sırasında, Wolffian kanalındaki hücre proliferasyonu, androjenlerin ve mezenşimal faktörlerin varlığına bağlıken, postnatal gelişim sırasında testisler tarafından üretilen lumikrin faktörler ek rol oynamaktadır [41].

Androjenler, büyüme faktörleri ve enzimler gibi lumikrin faktörler epididimisin epitelyal hücre sekresyon aktivitesini ve epididimide spermatozoa maturasyon sürecini direkt olarak etkilemektedir [42, 43]. Genel olarak epididimis postnatal gelişim süreci üç periyoddan oluşan iki faz içermektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Rat epididimal epitel farklılaşması ve epiteli oluşturan hücre tipleri [43]

Faz- I

Doğumla birlikte, ilk segment, kaput ve korpusun olası bölümleri epididimal kauda ile karşılaştırıldığında oldukça kıvrımlıdır. Doğumdan sonraki birkaç gün içerisinde, epididimide anatomik segmentasyon başlar ve kanalın gelişmesiyle devam eder. Epitel bu dönemde hala farklılaşmamış prizmatik hücrelerle karakterizedir. Halo hücrelerinin görünümü ile birlikte olan erken döneme kadar histolojik farklılıklar henüz başlamamıştır [43, 44]. Faz-I farklılaşmamış periyod ile devam ederek Halo hücreleriyle tanımlanan farklılaşmış periyodun ilk olayı ile son bulur.

Faz- II

Bu dönemde epididimal epitelyum esas, bazal, apikal, kısa ve clear hücrelerden oluşan pseudostratifiye epitele farklanır. Puberte sürecinde, epitelyal hücre farklılaşması hücre bölünmesinin en yüksek düzeyde görülmesi ile tamamlanır. Bu periyod kanal gelişiminin devam etmesi ve epididimal lümende spermatozoaların görülmesi ile tanımlanır. Lokalize protein sekresyonu, anatomik epididimal segmentasyonun bütün olarak oluşmasını sağlamaktadır. Bu süreç testiküler maturasyon, Leydig hücrelerinin steroidojenik aktivitesi, epididimisin androjen bağıllığı ve lumikrin faktörlerle ilişkilidir. Faz-II, Halo hücrelerinin farklılaşması ile başlamaktadır ve pubertede sonlanmaktadır [45, 46].

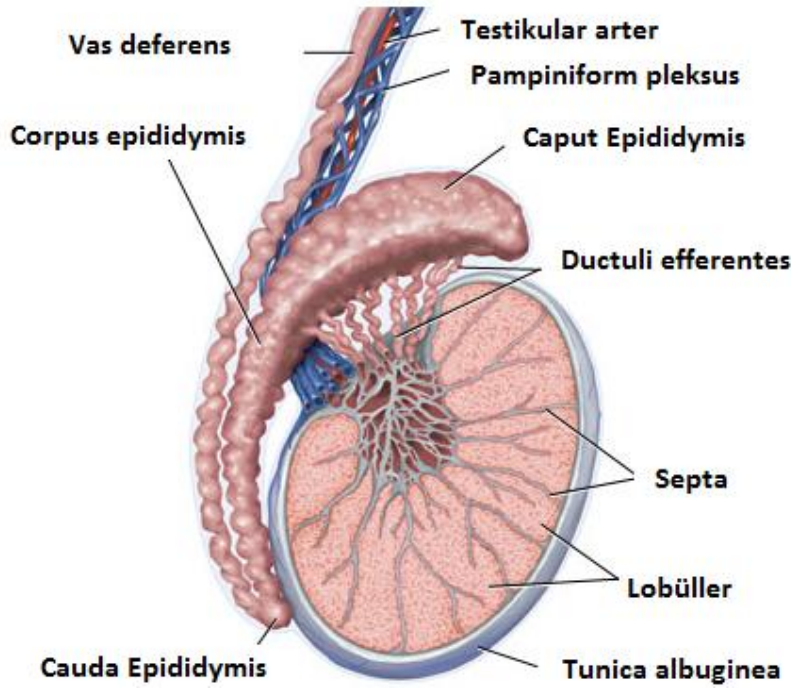
Testis ve epididimide görülen embriyolojik artıklar

Embriyonal hayatta testislerin oluşması sırasında, ductuli efferentes testisleri oluşturan mezonefrik kanalcıkların bazılarının bir tarafta rete testis, diğer tarafta Wolff kanalı ile birleşmeleri eksik kalabilir. Bu birleşme eksikliği, bazen kanalın sadece bir ucunda, bazen de her iki ucunda olabilir. Bu gibi durumlarda testis veya her tarafı kapalı, kist şeklinde küçük cisimcikler oluşur. Bu tür embriyolojik artıklara ductuli aberrantes denilir. Bu tür artıklardan birisi testisin üst ucunda ve epididimisin baş kısmının hemen altında bulunur. Appendix testis (Morgagni kisti) denilen bu cisim, küçük sapsız bir kist şeklinde olup, Müller kanalının üst ucunun embriyolojik bir artığıdır. Epididimisin baş kısmında da appendix epididymidis denilen küçük saplı bir kist bulunur. Bazen çift de olabilen bu kist, ductus deferensden ayrılmış bir bölüm olarak kabul edilir. Epididimisin kuyruk kısmında ductus epididymidisden ayrılan ve birçok kıvrımlar yaparak epididimisin başına kadar

uzanan kör bir kanal bulunur. Ductulus aberrans inferior denilen bu oluşum, epididimide görülen en büyük embriyolojik artıktır. Bazen epididymisin baş kısmında rete testisten çıkan daha kısa bir kör kanal bulunur. Bu embriyolojik artığa da ductulus aberrans superior denilir [47].

2.3.2.Duktus epididimis anatomisi

Duktus epididimis testislerin üst bölümünün arka-dış yüzünde oturan, testiste üretilen spermiumları ductus ejaculatorius' a götüren iletim yolunun başlangıç bölümüdür. Kendi üzerine kıvrılmış yaklaşık 4 cm uzunluğunda, kanal sisteminden oluşmuştur. Kanal sistemi açıldığında uzunluğu 6 metreyi geçmektedir. Dıştan, kısmen tunica vaginalis ile örtülüdür. Tunica vaginalis, epididimis ile testis dış yüzü arasında, sinüs epididimis denilen bir çıkmaz oluşturur. Baş kısmına caput epididymidis, gövdesine corpus epididymidis ve kuyruk kısmına da cauda epididymidis adı verilir. Testisten çıkan ductuli efferentes testisler caput epididimise girer ve burada duktus epididimise açılırlar (Şekil 2.2). Bu nedenle caput epididimis, daha kalındır, testise yapışıktır ve caudaya doğru gittikçe incilir. Cauda epididimis, bir periton yaprağı ile testise tutunur. Epididimisin baş ve kuyruk kısımlarının dış yüzleri peritonla örtülüdür. Gövde kısmının ise, arkada dar bir şerit şeklindeki bölümü hariç olmak üzere, her tarafı peritonla kaplıdır. Epididimis, testisin arka kenarının medial kısmına bir periton plikası ile bağlıdır. Bu nedenle corpus epididimis ile testis arasında açıklığı dış tarafa bakan bir çıkmaz oluşur. Sinüs epididymidis denilen bu çıkmazı yukarıdan lig. epididimis inferius sınırlar. Sonunda tek bir borucuktan oluşan duktus epididimis, duktus deferens' i oluşturur [47-50].



Şekil 2.2. Epididimis anatomisi [49]

Duktus epididimisin kanlanması, innervasyonu ve lenf drenajı

Testis ve epididimis, başlıca aorta abdominalis' in dalı olan a. testicularis ile, ayrıca bu arterin anastomoz yaptığı diğer arterlerle de (a. ductus deferentis, a. cremasterica, aa. scrotales anteriores ve aa. scrotales posteriores) beslenir.

Testisten ve epididimisten başlayan venler, plexus pampiniformis denilen bir venöz ağ yaparlar. Duktus deferensin önünde yer alan bu ağın, üst ucundan başlayan v. testicularis, sağda v. cava inferior' a, solda ise v. renalis sinistra' ya dökülür. Testiküler venlerin kapakları vardır.

Testis ve epididimisin sinirleri, a. testicularis' in çevresindeki plexus testicularis' ten, sempatikler; testis' e T10-11' den, epididimise ise T11-12' den gelir. Sempatik sinirler bu yapıların duyusunu, N. genitofemoralis' in genital dalı da testislerin duyusunu taşır.

Testis ve epididimisin lenf damarları, başlıca lateral aortik lenf düğümlerine ve kısmen preaortik lenf düğümlerine gider [48].

2.3.3. Duktus epididimisin fizyolojisi

Spermatozoaların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik olarak değişikliğe uğradığı duktus epididimis içerisindeki süreç, birçok faktörün kombinasyonuna bağlıdır. Epididimal maturasyon sırasında, spermatozoaların kanallar boyunca hareketi epitel hücrelerince absorbe edilen ve salgılanan androjenler ve testisler tarafından üretilen lumikrin faktörlerle ilişkilidir [51].

Androjenler, erkek üreme sistemine ait testis, epididimis, vas deferens, seminal vezikül, prostat ve penis gibi organların gelişiminde kritik rol oynamaktadırlar. Özellikle puberte, erkek fertilitesi ve seksüel fonksiyonlarda androjenler önemli faktörler olarak değerlendirilmektedir.

Epididimis formasyonu ve fonksiyonu androjen bağımlıdır. Temel androjen testosteron özellikle epididimis, vas deferens ve seminal vesikülü de kapsayan Wolffian kanal sisteminden gelişen internal üreme organlarının gelişimi için oldukça önemlidir [52].

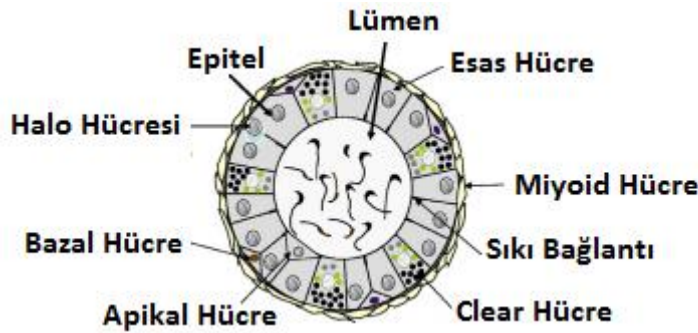
Dihidrotestosteron (DHT), (5α - reduktaz ile testosterondan dönüşümünden), prostat ve dış genital organların gelişiminde yer almaktadır. Testosteron epididimisin postnatal gelişiminin ilk aşamasında ağırlıklı olarak aktif androjen olmasına rağmen, olgun epididimide epididimal sıvıda DHT önemli bir etkiye sahiptir. DHT, epididimisin esas hücreleri tarafından lokal olarak üretilir ve primer olarak kanalın başlangıç segmentinde bulunur [53-55].

Testisten epididimise giren yeni üretilen spermier duktus epididimis boyunca geçişleri sırasında motilite ve oositi fertilize etme yeteneği kazanarak matür hale gelirler. Bu androjen bağımlı maturasyon sürecinde sperm başı, yüzey ilişkili dekapasitasyon faktörünü içeren epididimal sıvı glikokonjugatlarının eklenmesiyle modifiye edilir. Dekapasitasyon olarak adlandırılan bu süreç spermin fertilize etme yeteneğini geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Yüzey- ilişkili dekapasitasyon faktörü sonradan dışı üreme kanalında fertilizasyondan hemen önce meydana gelen kapasitasyon sırasında salıverilir. Epididimide maturasyondan sonra, spermier haploid DNA içeriklerini ovuma aktarabilirler ve kapasitasyondan sonra ovumun zona pellusidasının üzerindeki sperm

reseptörlerine bağlanabilirler. Bu bağlanma, spermin oositin dış kılıfına penetre olmak için akrozomal enzimlerini kullandığı akrozom reaksiyonunu tetikler [32].

2.3.4. Duktus epididimisin histolojisi

Testisin superior ve posterior yüzeyleri boyunca uzayan epididimis, duktuli efferentesten, duktus epididimiden ve ilişkili düz kaslardan, damarlardan ve bağ dokusundan oluşmaktadır. Duktus epididimisin yalancı çok katlı epitelindeki esas hücreler stereosilyalar ile karakterizedirler. Boşaltım kanal sisteminin büyük bölümü gibi duktus epididimis de yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Epididimal epitel farklı fonksiyonlara sahip esas hücreler, bazal hücreler, apikal hücreler, narrow hücreleri, clear (berrak, şeffaf) hücreler ve halo hücre tiplerini içermektedir (Şekil 2.3) . Duktuli efferentes tarafından geri emilemeyen sıvının çoğu epididimisin proksimal parçasından geri emilir. Epitelyal hücreler, Sertoli hücreleri tarafından ortadan kaldırılmamış reziduel cisimcikleri ve kanalda dejenere olmuş spermleri de fagosite ederler.



Şekil 2.3. Epididimisdeki major hücre tiplerinin şematik organizasyonu [43]

Duktus epididimisin düz kas örtüsünün kalınlığı kademeli olarak artar ve kuyrukta üç tabakalı olur. Epididimisin baş kısmında ve gövdesinin büyük kısmında düz kas örtüsü, duktuli efferentesinkine benzer şekilde ince bir sirküler düz kas tabakasından oluşmaktadır. Kuyrukta buna iç ve dış longitudinal tabakalar eklenir. Buradaki üç tabaka daha sonra boşaltım kanalı sisteminin bir sonraki bileşeni olan duktus deferensin üç düz kas tabakası ile devam eder.

Düz kas fonksiyonu, morfolojik değişiklikler ile uyumludur. Duktus epididimisin baş ve gövde bölümündeki spontan, ritmik, peristaltik kasılmaları spermin kanal boyunca

taşımasını sağlar. Olgun spermin esas depo bölgesi olan epididimis kuyruğunda daha az peristaltik kasılma olur. Burada depolanan sperm, ejakulasyon için uygun nöral stimulasyondan sonra üç düz kas tabakasının şiddetli kasılmaları ile duktus deferense geçmeye zorlanırlar [32].

Epididimal hücre tipleri

Esas hücreler

Epididimiste bulunan ana hücre tipi olarak ifade edilirler. Epididimal hücrelerin ilk segmentte yaklaşık % 80' nini oluştururlar ve kauda da yaklaşık % 65' e kadar azalırlar. Tüm kanal boyunca bulunan bu hücreler yapısal farklılıklar gösterebilirler. Epididimisin baş kısmında yaklaşık 80 µm yükseklikte iken, kuyruk bölgesinde yaklaşık 40 µm yüksekliktedir. Luminal yüzeylerinde stereosilyalar uzanır ve uzunlukları baş kısımda 25 µm kuyruk kısmında ise yaklaşık 10 µm uzunluğundadırlar. Esas hücrelerin salgı özellikleri vardır ve bazal yerleşimli çekirdeğe sahiptirler. Bulundukları segmente göre yapısal ve fonksiyonel değişimler sergilerler. Bu değişimler granüllü endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı ve sekretuar granüller gibi yapılarda ve endozomlar, multivesiküler cisimcikler ve lizozomlar gibi endositik organellerde de gözlenir. Ayrıca korpus epididimisteki esas hücrelerde lipit damlacıkları bulunmaktadır [32, 44]. Esas hücreler epididimisin luminal komponenti açısından önemli çok sayıda protein salgılamaktadır ve luminal protein konsantrasyonundan sorumludurlar. Glikokalikse ve steroidlere ek olarak spermin maturasyonuna yardımcı olan gliserofosfokolin, siyalik asit ve glikoproteinleri salgırlar. Bazaldeki nukleusun etrafını çevreleyen çok sayıda GER sisternasına ve belirgin bir şekilde büyük Golgi aygıtına sahiptirler. Düz endoplazmik retikulum ve GER kesitleri apikal sitoplazmada da bulunmaktadır. Birbirleriyle sıkı bağlantılar oluşturarak kan- epididim bariyerini oluştururlar [51-58].

Bazal hücreler

Bazal hücreler yarı küresel, üçgen veya düz görünümlü, kanal lümeni ile doğrudan ilişkisi olmayan, bazalde lokalize hücrelerdir. Epididimal epitel hücre popülasyonunun yaklaşık %15-20' sini oluşturan ikinci baskın hücre tipidir. Uzun ve yuvarlak şekilli çekirdekleri vardır ve sitoplazmik uzantıları ile esas hücreler ve diğer bazal hücrelerle bağlantı sağlarlar

[44, 51]. Bazal hücreler, ekstrasübüler orijindir ve bazı bulgular lokal epitelial immün sistem sürecinde ve esas hücre elektrolitlerinin regülasyonunda rolleri olduğunu desteklemektedir. Ancak bu hücrelerin kesin fonksiyonları tam olarak açıklanamamıştır [56].

Apikal hücreler

Apikal hücreler, özellikle ilk segment ve ara zonda bulunmasına rağmen diğer bölgelerde de yer almaktadır. İlk segment hücre popülasyonunun yaklaşık % 10' unu oluştururken kauda % 1' lik kısmı içerir. Karakteristik olarak apikal stoplazmada lokalize küresel çekirdek ve mitokondriyon içerirler. Yüzeylerinde birkaç mikrovillus bulunabilir. Protein ekspresyonları bakımından narrow ve esas hücrelerden oldukça farklıdır. Özgün işlevleri tam olarak bilinmemekle beraber sperm hareketsizliği ve lümen pH' ı ile ilişkili karbonik anhidraz ailesine ait enzimler içerdikleri gözlemlenmiştir [59].

Narrow hücreler

Epididimal ilk segmentte hücre popülasyonunun % 3' nü, korpus da ise % 6' sını oluştururlar. Narrow hücreler ince, uzun hücrelerdir. Çok sayıda küçük C-şekilli vezikül ile mitokondriyon ve de hücre stoplazmasının üst yarısında düzleşmiş çekirdek içerirler. Apikallerinde yer alan ve lümene H⁺ iyonları salgılama fonksiyonuna sahip çok sayıda vezikül ile karakterizedirler. Esas hücrelere göre daha dardır ve bazal membrana ulaşan ince bölgeye sahiptirler. Apikal hücrelerde de olduğu gibi narrow hücrelerin bu yapısal özellikleri bu hücrelerin lümen ve epitelial hücreler arasındaki intrasellüler transporta, spesifik proteinlerin degradasyonuna aracılık ettiğini göstermektedir. Narrow hücreler, apikal hücrelerden morfolojik görünüm, dağılım ve protein ekspresyonu bakımından oldukça farklıdır. S-transferaz ve lizozomal enzimler gibi bölgeye spesifik proteinleri eksprese etmeleri yönünden de esas hücrelerden farklılık gösterirler [60-62].

Clear (şeffaf, berrak) hücreler

Clear hücreler Halo hücreleri ile birlikte epitel hücre popülasyonunun yaklaşık % 5' lik kısmını oluştururlar. Epididimisin kaput, korpus ve kauda bölgelerinde lokalizedirler. Koyu boyanan çekirdekleri ve soluk boyanan sitoplazmaları ile büyük, aktif, endostatik

hücrelerdir [63, 64]. Apikallerinde vezüküller, endozomlar multiveziküler cisimcikler ve lizozomlar ile karakterizedirler. Bazalde çekirdek ve yağ damlacıkları yer alır. Özellikle kauda bölgesinde esas hücelere göre daha etkin endositik aktivite gösterirler. Clear hücreler spermatozoalar tarafından salınan sitoplazmik damlacıkların kanaldan geçişini sağlar. Bu hücreler çeşitli deneysel koşullarda anormal derecede büyük lizozomlarla dolarak, testis ve epididimis fizyolojisini bozabilirler [65-70]. Luminal sıvının asidifikasyonuna clear (şeffaf, berrak) hücreler ve narrow hücreler ile birlikte katkıda bulunurlar. Bu işlem için, anahtar proteinler olan H^+ -adenozintrifosfat ([ATPaz] ya da vakuole ait [V]-ATPaz), karbonik anhidraz II ve çözünebilir adenilat siklaz bu hücrelerde lokalizedir. Ayrıca voltaj- kapılı CIC klorür kanal ailesinin bir üyesi olan CIC-5' de clear hücrelerde eksprese edilir [71, 72].

Halo hücreleri

Halo hücreleri epididimal epitel boyunca bulunan, küçük ve dar, bazal membranla ilişkisi olmayan hücrelerdir. Genellikle, bazalde bulunurlar ve çok sayıda granül içerirler. B- ve T-lenfositler ve monositlerin bir kombinasyonu şeklinde immun sistemde oluşurlar [53, 55].

2.3.5. Kan-epididimis bariyeri

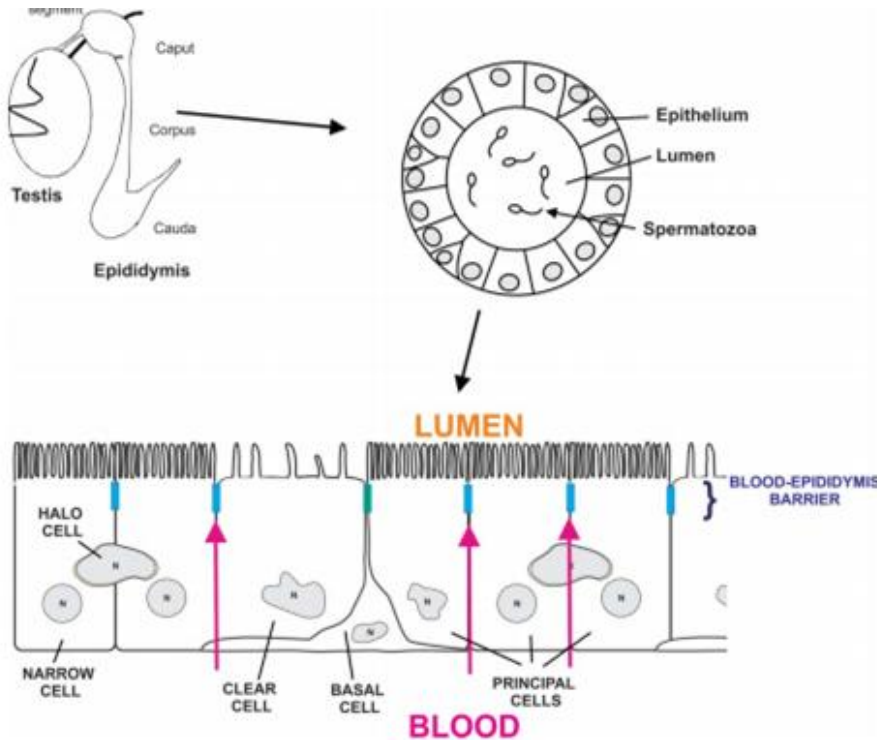
Kan-epididimis bariyerinin ilk olarak 1972' de Friend ve Gilula tarafından esas hücreler arasındaki sıkı bağlantıların varlığı ile tanımlanmıştır [73].

Epididimide bulunan sıkı bağlantı kompleksleri testislerdeki kan- testis bariyerinde olduğu gibi, fonksiyonel kan- epididim bariyerini oluşturmaktadır. Epididimal esas hücreler arasındaki bağlantı kompleksleri apikalde lokalize gap junction, adherens ve sıkı bağlantılardan oluşur. Esas hücreler arasındaki sıkı bağlantıların luminal yüzeyleri kan-epididim bariyerini meydana getirir ve gap junctionlar esas hücreler arasındaki iletişime izin verir [59, 74, 75]. Sıkı bağlantılar Wolffian kanalının farklılaşması sırasında oluşmaya başlarlar ve ratlarda hemen hemen postnatal 21. günde tamamlanır [59, 75].

İlk segmentte sıkı bağlantılar ve birkaç desmozom apikal plazma membranı boyunca uzanmakta ve kaudaya doğru devam ederken bir düşüş göstermektedir. Fakat desmozomlar apikal bölgelerde artış gösterirler [59, 74, 75].

Kan- epididim bariyerinin fonksiyonları

Epididimal lümen sıvı içeriği, kan plazmasından oldukça farklılık göstermektedir. Kan-epididimis bariyeri, bu iki sıvıyı birbirinden ayırır ve iyonlar, çözücüler ve makromoleküllerin epididimal epitele geçişini sınırlandırarak sperm maturasyonu için gerekli olan luminal mikroçevrenin sürekliliğini sağlar (Şekil 2.4). Kan-epididim bariyeri, mikroçevrenin kontrolünü sağlayarak epididimisin her segmentinde spermatozoa için uygun ortamı sağlamaktadır. Kan – testis bariyerinin bir uzantısı şeklinde işlev gören kan-epididim bariyeri, spermilerin yüzeylerindeki proteinler nedeni ile immunojenik olarak algılamasını önlemektedir [45, 46, 63].



Şekil 2.4. Kan- epididim bariyerinin şematik diyagramı [74,76]

Kan- epididim bariyerinin spermatozoaların zararlı etkenlerden koruma fonksiyonu tam olarak açıklanamamıştır. Bu bariyer, epitelial hücreler arasındaki spermatozoa geçişini önlemektedir, fakat spermatozoaların sellüler elementleri epitel hücrelerince alınabilir. Yetişkinlerde, bazı epididimal epitelial hücrelerin antijen sunan hücre özelliğinde olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. Bariyerin spermatozoaları toksik maddelerden ve immunoglobulinlerden koruduğuna dair sınırlı bilgi mevcuttur. Yaşlanma gibi stres

koşulları altında bariyer fonksiyonları bozularak sperm fonksiyonları ve fertilite üzerine olumsuz etkileri olmaktadır [46, 77].

2.4. Hücresel Bağlantı Kompleksleri

Hücre bağlantı kompleksleri yapısal ve fonksiyonel olarak üç ana başlık altında incelenmektedir.

- Tıkayıcı (sıkı) bağlantılar
- Sabitleyici (tutundurucu) bağlantılar
- İletişim bağlantıları (oluklu bağlantılar)

Tıkayıcı bağlantılar, geçirgen olmayan ve epitel hücrelerinin bariyer gibi işlev görmelerini sağlayan bağlantı tipidir. İlk olarak 1960' larda Farquar ve Palade tarafından bir intramembran multiprotein kompleksi olarak tanımlanmıştır [78]. Sıkı bağlantı (tight junction) olarak da adlandırılırlar ve komşu hücreler arasında primer interselüler diffüzyon bariyerini oluştururlar. Suyun ve diğer moleküllerin interselüler geçişini sınırlandırarak doku bileşenlerinin fizikokimyasal ayrımının devamlılığını sağlarlar. Epitel hücrelerinin arasında en apikal noktada yer almalarından dolayı sıkı bağlantılar, lipidlerin ve özelleşmiş membran proteinlerinin apikal ve lateral yüzeyler arasındaki göçünü engellerler ve bütünlüğü korurlar. Ayrıca, sıkı bağlantılar çeşitli sinyal moleküllerini hücre yüzeyine toplarlar ve bunları hücre iskeletinin aktin filamentlerine bağlarlar [79].

Sabitleyici (tutundurucu) bağlantılar, bir hücrenin hücre iskeletini komşu hücre iskeletine bağlayarak epitel hücrelerine mekanik stabilite sağlayan bağlantı tipidirler. Bu bağlantılar, epitelin yapısal bütünlüğünü sağlama ve sürdürmede önemlidirler. Sabitleyici (tutundurucu) bağlantılar, hem aktin hem de ara (intermediyer) filamentler ile etkileşirler. Sadece hücre lateral yüzeyinde değil, aynı zamanda epitel hücresinin bazal bölgesinde de bulunabilirler. Sinyal aktarabilme yetenekleri sayesinde sabitleyici (tutundurucu) bağlantılar, hücre- hücre tanınmasında, morfogenezde ve farklılaşmada da önemli rol oynamaktadırlar.

İletişim bağlantıları, komşu hücreler arasında iyonlar, aminoasitler, şekerler, nükleotidler, ikincil mesajcılar metabolitler gibi <1200 daltondan küçük moleküllerin diffüzyonu ile

direkt iletişime olanak sağlamaktadırlar. Bu tip interselüler iletişim, organ homeostazının sürdürülmesinde önemli olan koordine hücrel aktiviteye izin verir [79].

Tıkayıcı (Sıkı) Bağlantılar

Sıkı bağlantılar, epitel ve endotel hücreleri arasındaki bağlantı kompleksinin en apikal komponentidir. Hücrede apikal bölgeyi bazolateral bölgeden ayırarak epitel hücrelerine kutuplaşma özelliği kazandırmaktadırlar. Ayrıca epitel hücre tabakaları boyunca maddelerin serbest geçişini engeller. Tıkayıcı bağlantılar integral membran ve sitoplazmik proteinleri içermektedirler. Okludin, tricellulin, marvelD3 ve 27 üyeden oluşan klaudin sitosolde bulunan N- ve C- terminallerine ve iki ekstrasellüler halkaya sahiptirler. Okludin, tricellulin ve marvelD3 bir MARVEL (MAL- related proteins for vesicle trafficking and membrane link) domaini içerirken, klaudinler bu domaini içermezler. Junctional adhesion molecules (JAMs), bağlantı adezyon molekülleri iki immunoglobulin G (IgG) benzeri motif içeren membran proteinleridir [80-82].

Sıkı bağlantının transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelemesi, dar bir alanda komşu hücrelerin plazma membranlarının interselüler boşluğu mühürlemek üzere sıkı temasa geçtiğini göstermektedir. Yüksek çözünürlükte, zonula okludens devamlı bir mühürlenme olarak görünmez, hücreler arasında fokal füzyonlar olarak görünür. Bu fokal füzyonlar, komşu hücrelerin transmembran proteinlerinin interselüler alanda bağlanmaları ile oluşturulmaktadır. Bu proteinlerin mühür oluşturmak üzere düzenlenmesi en iyi dondurup kırma tekniği ile gösterilmektedir. Plazma membranı zonula okludens bölgesinden kırıldığında bağlantı proteinleri membranın P- yüzünde kabartı şeklinde yapılar olarak gözlenirler. Kırılan membranın karşı yüzeyi olan E- yüzünde, karşı yüzdeki protein partiküllerinin ayrılmasından kaynaklanan tamamlayıcı oyuklar bulunur. Kabartılar ve oyuklar birbirleri ile partikül dizilerinden oluşan anastomozlaşan ağ ve böylece interselüler alanda fonksiyonel bir mühür oluştururlar. Dizilerin sayısı ve anastomozlaşma derecesi farklı hücrelerde değişkenlik göstermektedir.

Sitoplazmik adaptör proteinleri, Zonula okludens dizileri, transmembran protein dizilerinin yerleşim noktalarına karşılık gelmektedirler ve ZO-1, ZO-2 VE ZO-3 den oluşmaktadırlar. Bu proteinler aktin hücre iskeleti ile bağlantılı membran proteinleri ile ilişkilidir [78, 83].

ZO proteinleri

ZO-1 (TJP1), sıkı bağlantı proteini olarak tanımlanan ilk proteindir ve daha sonra co-immunopresipitasyon çalışmaları ile ZO-2 ve -3 proteinleri tanımlanmıştır. ZO proteinleri çok yönlü protein olan MAGuK (membrane associated guanylate kinase) protein ailesinin üyesidirler ve üç postsynaptic density 95/disc-large/zona occludens (PDZ) domaini, bir Src homology (SH3) ve GuK domaininden oluşurlar [84-86].

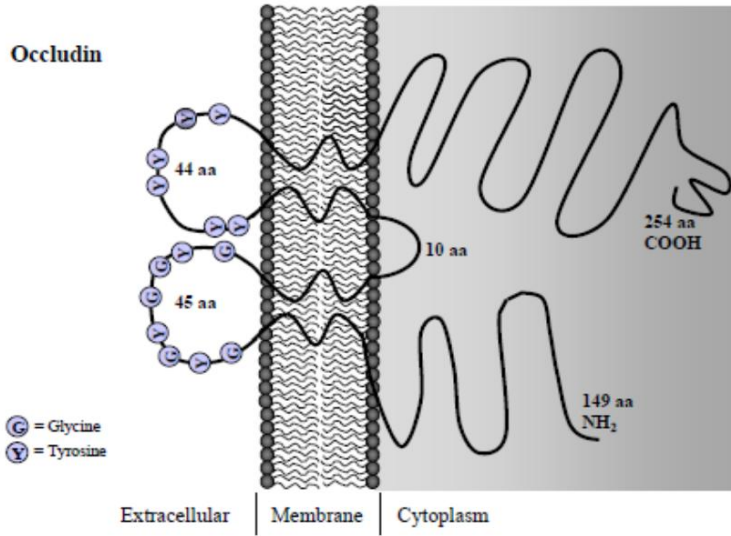
ZO-1 ve ZO-2 bağlantı oluşumu ve permeabilite için kritik rol oynamaktadırlar ve bu iki proteinin yokluğunda sıkı bağlantıların oluşumu gerçekleşmemektedir. ZO-1 ve -2 knockout farelerde, apoptoz ve vitellüs kesesindeki anjiyogenezis ve proliferasyonun azalması sonucu embriyonik ölümler gerçekleşmektedir [87-89].

Zonula okludensde okludin, klaudin ve bağlantı adhezyon molekülleri olmak üzere üç ana transmembran protein grubu bulunmaktadır.

Okludin

Okludin, ilk olarak kuşlara ait dokularda Furuse ve arkadaşları tarafından ratlarda hazırlanan anti-civciv okludin antiserumu kullanılarak keşfedilmiştir. Okludin sıkı bağlantılarda dinamik bir proteindir. Yaklaşık 65 kilodalton ağırlığındadır ve epitelyal ve endotelyal sıkı bağlantılarda ilk integral membran sıkı bağlantı proteini olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.5) [90]. Komşu hücreler arasındaki, apikal ve lateral bölgeler arasındaki bariyerin devamlılığını sağlamada katkı sağlar. Okludin ZO-1, ZO-2, ZO-3, 7H6, AF-6, vinkulin ve cingulin proteinleri ile ilişkilidirler [91, 92].

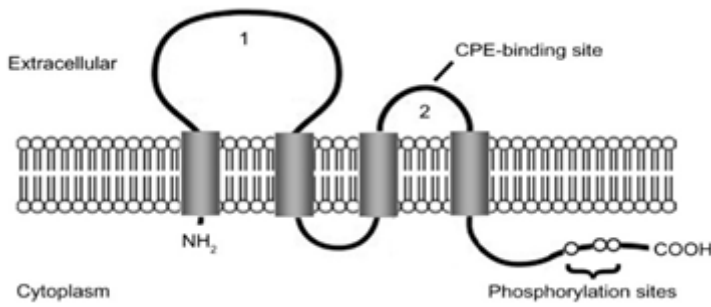
Okludinin overekspresyonu küçük moleküllerin permeabilitesini artırır. Okludin- null farelerde postnatal büyüme geriliği, kompakt kemik incilmesi, beyinde kalsifikasyon, testiküler atrofi, erkeklerde infertilite, tükürük bez epitelinde sitoplazmik granül kaybı, dişilerde süt verememe ve gastrik inflamasyon ve hiperplazi gözlenmiştir [93]. Okludin birçok tıkayıcı bağlantıda bulunmaktadır ancak bazı epitel tiplerinin dizilerinde okludin bulunmamaktadır, fakat bu hücreler iyi gelişmiş ve tamamen fonksiyonel zonula okludenslere sahiptirler.



Şekil 2.5. Okludin yapısı şematik gösterimi [94]

Klaudinler

Klaudinler, (Lat. Claudere, kapatmak), ilk olarak Shoichiro Tsukita ve ekibi tarafından 1998 yılında bir sıkı bağlantı proteini olarak tanımlanmıştır [95]. Son dönemde zonula okludens dizisinin tamamlayıcı komponenti olarak tanımlanan bir protein ailesini oluşturmaktadırlar. Klaudinler, 207 ila 305 aminoasite sahiptirler ve moleküler ağırlıkları 21-24 kDa arasında değişir [96]. Dört transmembran domaini ve 2 ekstrasellüler loop içermektedir. –N ve C terminalleri sitoplazmada lokalizedir (Şekil 2.6) [97].



Şekil 2.6. Klaudin yapısı [97]

Günümüze kadar klaudin ailesinin yaklaşık 24 farklı üyesi karakterize edilmiştir [96, 98-100]. Klaudinler, her dizinin omurgasını oluştururlar, ayrıca iyonların ve diğer küçük moleküllerin paraselüler geçişi için ekstrasellüler su kanalları oluşturma yeteneğine

sahiptirler. Özellikle böbrek epiteli, gastrointestinal sistem ve karaciğer gibi epiteliyal dokular için seçici geçirgenlikte rol oynamaktadır [101, 103].

Klaudinler, sadece her bir zonula okludens dizisinin omurgasını oluşturmazlar, aynı zamanda ekstraselüler su kanallarının oluşumundan da sorumludurlar dolayısıyla her bir zonula okludens dizi çiftindeki klaudinlerin okludinlere ve bulunan diğer proteinlere karışma oranları ve kombinasyonları, hücreler arasındaki mührün sıklığını ve geçirgenliğini belirler [79].

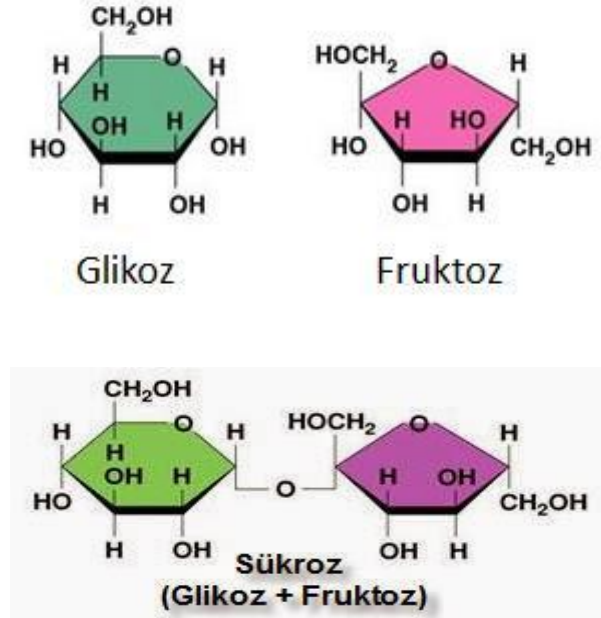
Hücre-hücre adezyon kaybı, karsinogenezde hücresel bazda değişim, endotelial mezenkimal değişim ve metastatik potansiyele yol açabilmektedir. Bununla birlikte klaudin protein ailesinin karsinom gelişimi gibi bir dizi patofizyolojik olayda rol oynadığı yeni çalışmalarla gösterilmiştir. Klaudinler ayrıca inflamatuvar barsak hastalığı, retinopati, maküler dejenerasyon ve hepatit gibi patolojik durumlarda da eksprese olmaktadır [101,104].

Epididimide epitel oluşturulan hücre tiplerinden biri olan esas hücreler arasında kan-epididim bariyerini oluşturan sıkı bağlantılar bulunmaktadır ve farklı klaudin tipleri içermektedir [105,106]. Özellikle klaudin-1, androjenleri ve testikular faktörleri regule etmektedir [106]. Klaudin-16, epididimis initial segmentinde kan- epididim bariyerinin magnezyum ve/ veya potasyum düzeylerinin sürdürülmesinde ve lümenal mikroçevrenin korunmasında önemlidir. Klaudin-3 ve -4' ün de bariyer oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir [107].

2.5. Fruktoz

Fruktoz, yapısal olarak 6 karbona sahip, ağırlıklı olarak meyve ve az miktarda sebze içeriğinde de yer alan bir polihidroksikentondur. Kimyasal formül bakımından glukoz ile aynı yapıyı gösterebilir de yapısal olarak farklıdır. Glukoz altılı halka yapısından oluşur ve ilk karbonunda aldehit grubu taşımaktadır. Fruktoz ise beşli halka yapısındadır ve karbon zincirinin ikincisinde bir keton grubuna sahiptir. Bir molekül glukoz ve bir molekül fruktozun α -1, 4 glukozit bağı ile bağlanmasıyla da sukroz (sakkaroz) oluşmaktadır ve fruktoz sukrozda da bulunmaktadır (Şekil 2.7). Fruktoz ayrıca, mısır ve buğdaydan elde edilen ve çeşitli gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılan glukoz-fruktoz şuruplarında da

kullanılır. Saf ve kuru haldeki fruktoz, tatlı, beyaz, kokusuz ve kristalize yapıdadır. Tatlılık ve suda kolay çözünme özellikleri nedeniyle tatlandırıcı olarak da kullanılır [14, 15, 108].



Şekil 2.7. Fruktoz, glukoz ve sukrozun kimyasal formülleri [109]

2.5.1. Fruktozun besinsel kaynakları

Meyve ve sebzelerde monasakkarit şeklinde bulunan fruktoz, glukoz ile birleşerek sükroz adı verilen disakkaritte de bulunur [110]. Özellikle şeker kamışı ve şeker pancarı, yüksek oranda sükroz içeriğinden dolayı ticari sükroz üretiminde kullanılırlar ve son ürün olarak da şeker türleri, gıda ve alkolsüz içeceklerin üretimi gerçekleştirilir [111]. Fruktozun bir başka kaynağı mısır nişastasından enzimatik hidroliz yolu ile üretilen, sakkaroz alternatif sıvı bir tatlandırıcı olan yüksek fruktozlu mısır şurubudur [112]. Sakkarozdan daha ekonomik olması ve bazı gıdalara tatlandırıcı gibi bazı özellikler kazandırmasından dolayı gazlı ve meyveli içecekler, kek, çikolata, marmelat, şekerleme, reçel ve jöle gibi birçok işlenmiş üründe yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. 1970 yılından bu yana yüksek fruktozlu mısır şurubu tüketimi önemli derecede artmıştır. Günümüzde kullanılan toplam tatlandırıcılar içinde yaklaşık % 40'lık bir paya sahip olmuştur [113, 114].

Doğal tadın korunmasının ve orta düzeyde tatlılığın istenildiği gıda ve konservelede %42'lik; alkolsüz içecekler, dondurma ve tatlılarda %55'lik ve yüksek şeker tadının istendiği gıdalarda %90'lık fruktoz şurubu kullanılmaktadır (Çizelge 2.1). Tadını

fruktozdan alan yiyecek ve içecekler doyma hissini geciktirmekte, daha çok tüketilmesine neden olmakta ve ikinci acıkma hissini öne çıkarmaktadır [115]. Özellikle, uzun süre yüksek fruktozlu mısır şurubu bakımından zengin diyetle beslenme obezite, kardiyovasküler hastalıklar ve metabolik sendromun diğer bileşenlerinin görülme sıklığını artırabilmektedir [116].

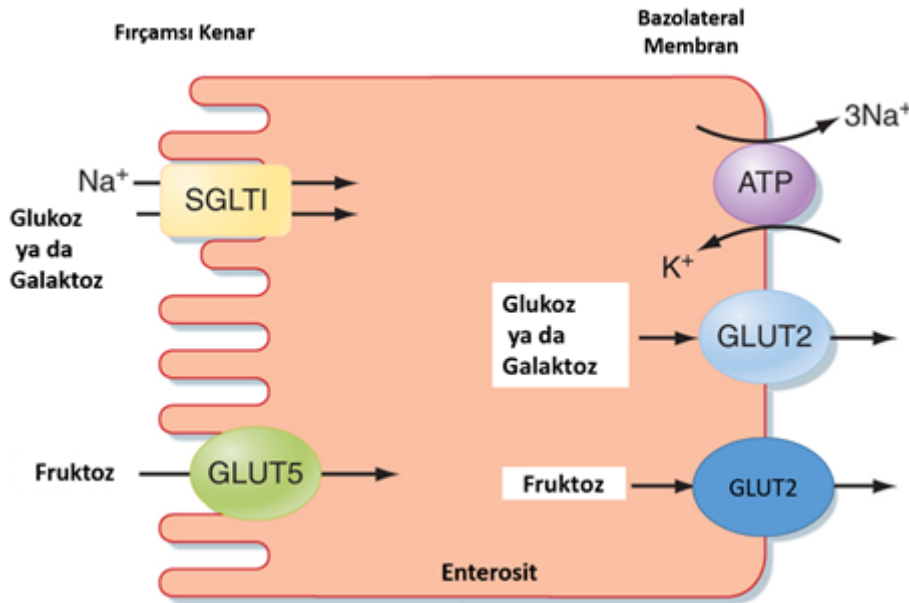
Besin (g/100 gr)	<u>Glukoz</u>	<u>Fruktoz</u>	<u>Sukroz</u>	Toplam Şeker
Meyveler (Çiğ)				
Elma	2,3	7,6	3,3	13,3
Muz	4,2	2,7	6,5	15,6
Kiraz	8,1	6,2	0,2	14,6
Üzüm	6,5	7,6	4,4	18,1
Ananas	2,9	2,1	3,1	11,9
Karpuz	1,6	3,3	3,6	9,0
Sebzeler				
Havuç	1,0	1,0	3,6	6,6
Mısır	0,5	0,3	1,5	2,6
Soğan	2,4	0,9	1,3	6,2
Bezelye	0,2	0,1	4,8	5,8
Domates	1,1	1,4	0	2,8
Baklagiller				
<u>Fasulye</u>	1,6	1,4	4,3	8,3
Nohut	0,1	0,1	1,2	4,8
Mercimek	0	0,1	0,5	1,8
Soya Fasulyesi	0,2	0	3,8	4,3
Tatlılar				
Mısır Şurubu	14,9	1,2	2,2	37,0
Bal	33,8	42,4	1,5	81,9
Pekmez	7,4	7,9	26,9	42,8
Esmer Şeker	5,2	0,4	84,3	89,9
İşlenmiş Gıdalar				
Portakal Suyu	5,3	4,6	0,7	10,6
Ekmek	1,8	1,5	0,1	3,9
Kola	4,0	4,4	2,1	10,6

Çizelge 2.1. Çeşitli gıdaların fruktoz içerikleri [117]

2.5.2. Fruktoz Metabolizması

Bağırsaktaki fruktoz absorpsiyonu ve metabolizması

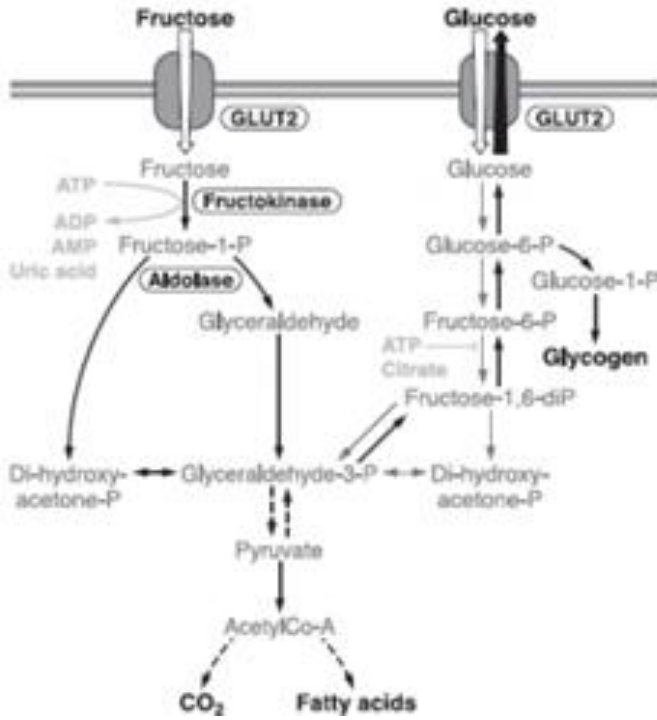
Fruktozun insanlarda açlık kan düzeyi genel olarak 1 mg/dL' dir. Fruktoz enterositlerin apikalinde lokalize olan glukoz taşıyıcı Glucose transporter -5 (GLUT5) taşıyıcısı ile ince bağırsaklardan emilir (Şekil 2.8). Fruktoz enterositlerin bazolateral membranlarında lokalize olan Glucose transporter 2 (GLUT2) molekülü ile kan damarlarına diffüze olur [14, 118, 119]. Glukoz ile karşılaştırıldığında fruktoz absorpsiyonu kantitatif olarak daha sınırlıdır. Bazı yetişkinler düşük kapasitede fruktozu absorbe edebilirler ve fruktoz yüklemesinden sonra ishal ve gaz septomları gelişebilir [120, 121]. Fruktoz absorpsiyonunun yaşlı ratlarda yapılan çalışmalarda, yaşlanma ile azaldığı bildirilmiştir [122]. Fruktoz transportu non- karbonhidat içeren diyetle modüle edilmektedir. Bu nedenle, doymuş yağ asitleri içeren bir diyet intestinal fruktoz absorpsiyonunu arttırmaktadır [123]. Enterosit içinde fruktozun bir kısmı laktata dönüşmekte ve bir bölümü de trioz fosfatlar üzerinden glukozla çevrilmektedir [124].



Şekil 2.8. İnce bağırsakta glikoz, galaktoz ve fruktoz emilimi (SGLT1: Sodium-glucose linked transporter- Sodyum bağımlı glukoz taşıyıcı-1) [125]

Hepatik fruktoz metabolizması

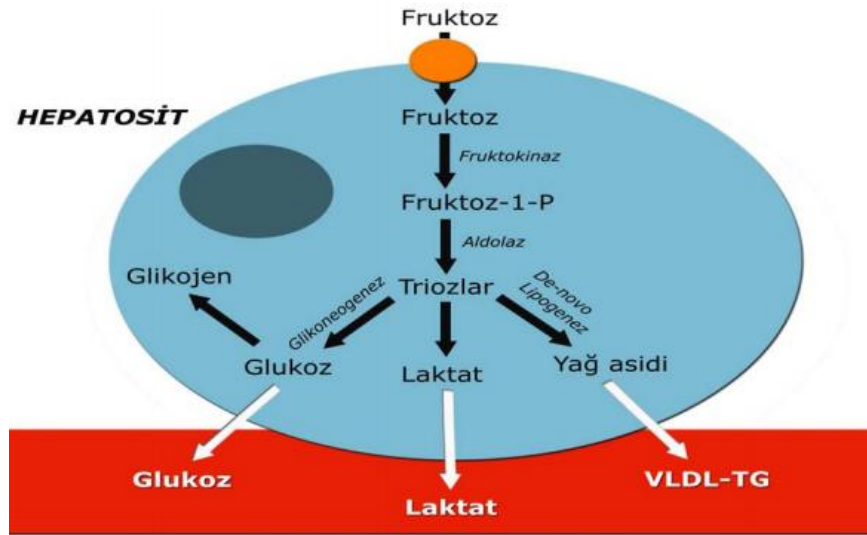
Fruktoz kana diffüze olduktan sonra portal sisteme geçer ve hepatositler tarafından GLUT2 taşıyıcısıyla alınarak metabolize edilir [126-128]. Fruktoz ve glukozun karaciğer metabolizması arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Glukozun aksine bu süreç sodyum bağımlı değildir ve ATP hidrolize edilmez. Ayrıca fruktoz fruktokinaz enzimi ile fosforile edilerek karaciğerde fruktoz-1-fosfata dönüştürülür. Bu molekülden gliseraldehit, dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat üretilir. Bu üç karbonlu moleküller, glukoneogenez ile glukozu veya de novo trigliserid (TG) sentezine yönlendirilir. Fruktoz metabolizması bu özelliği ile glukoz metabolizmasından farklılık göstermektedir (Şekil 2.9) [14, 129].



Şekil 2.9. Karaciğerde Fruktoz ile Glukoz metabolizmasının karşılaştırılması [14]

Glukozdan TG üretilme süreci, glukozdan glikojen üretimi, üç karbonlu glikoliz ürünlerinden glukoneogenez ile tekrar glukoz sentezlenmesi ve metabolik yolun fosfofruktokinaz enzimi ile kontrol edilmesini kapsamaktadır. Fruktozdan fruktoz-1-fosfatın oluşumu, fosfofruktokinaz enziminin bağımsızdır ve fruktoz kaynaklı üç karbonlu moleküller gliserol ve yağ asiti sentezi için kullanılarak TG oluşumuna neden olur. Fruktoz metabolizmasında fosfofruktokinaz basamağının atlanması, insulin ile regüle

edilen glikojen ve yağ depolanmasını etkiler [130]. Trigliseridler karaciğer tarafından çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) olarak paketlenir ve kana verilir. VLDL kanda bulunduğu süre içerisinde lipoprotein lipaz tarafından non-esterifiye yağ asitlerine (NEFA) ve monaasil gliserole hidrolize edilir. Yağ dokusu bu ara ürünleri alarak yeniden TG sentezler ve depo eder (Şekil 2.10). Bu metabolik süreç aracılığıyla yüksek düzeyde fruktoz tüketimi kan yağ asiti düzeylerini yükseltir ve insülin bağımsız yağ depolanmasına neden olarak obeziteye yol açar [115, 131]. Fruktozun sağlık üzerindeki potansiyel zararlı etkileri arasında obezite dışında, yaşlanmada hızlanma, insülin direnci, diabetes mellitus ve nefropati, retinopati, nöropati gibi komplikasyonları, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, hipertrigliseridemi, hiperürisemi, kronik ishal ve ürtiker gibi hastalıklar bulunmaktadır [132].



Şekil 2.10. Karaciğerde Fruktoz metabolizması [115]

Ekstrahepatik metabolizma

Fruktoz alınımından sonra plazmadaki fruktoz konsantrasyondaki mikromolar orandaki artış, hepatic ekstraksiyonun % 100' e yakın olduğunu göstermektedir. Bunun sonucu olarak, fruktoz metabolizması normal koşullar altında ekstrahepatik hücrelerde gerçekleşmemektedir. Fruktoz parenteral olduğunda sistemik fruktoz konsantrasyonu 1-2 mM değerine yükselmektedir. Bu koşullar altında dahi, ekstrahepatik hücreler fruktokinaz eksprese etmedikleri için, ekstrahepatik fruktoz metabolizması oldukça azdır. İntestinal fruktoz transportu olan GLUT 5 böbrek, adipoz doku, iskelet kası, testis ve beyin gibi

ekstrahepatik dokularda da eksprese edilmektedir. Kateterizasyon çalışmaları, plazma fruktoz oranının 3 mM' a yükseldiği, yüksek doz fruktoz infuzyonu sırasında böbrek fruktoz metabolizmasının toplam fruktoz metabolizmasının % 20 ' sini oluşturduğunu göstermiştir. Bu tür ekstrahepatik fruktoz alımının normal fizyolojik şartlarda gerçekleşmesi mümkün değildir [133-136].

2.5.3. Fruktoz ve egzersiz

Fiziksel egzersiz, kasların çalışması sürekli bir enerji desteğine ihtiyaç duymakta ve kas kontraksiyonu kas glukoz oksidasyonunu artırmaktadır. Fruktoz egzersiz sırasında metabolize edilebilir. Orta şiddette bir egzersiz sırasında, fruktozun % 80' ni splanknik dokularda metabolize edilerek, glukoz, pirüvat ve laktat serbest bırakılır. Geri kalan % 20' lik kısım ise direkt olarak çalışan ve dinlenen iskelet kasında metabolize edilir [137]. Oral glukoz ve fruktoz içeceklerin oksidasyonu, orta şiddette egzersiz sırasında karşılaştırıldığında, fruktoz oksidasyon hızı daha düşüktür [121, 138, 139]. Spor içeceklerinin amacı glisemiye önlemek ve kasların çalışması için ekzojen glukozu sağlamaktır. Ancak oral glukoz alındığı zaman, ekzojen glukoz metabolizması maksimum 1,0- 1,1g/ dk ile sınırlıdır [140]. Glukoz ve fruktoz karışımı birlikte alındığında ise total karbonhidrat oksidasyonu % 40 daha yüksektir [138, 141-143]. Spor içeceklerinde fruktoz kullanımı bir avantaj olarak görülse de, egzersiz sırasında fruktoz kullanımı ile ilgili endişelerden biri de, bağırsakta tam olarak absorbe edilememesi ve intestinal bakteriler tarafından fermente edilmesidir [144].

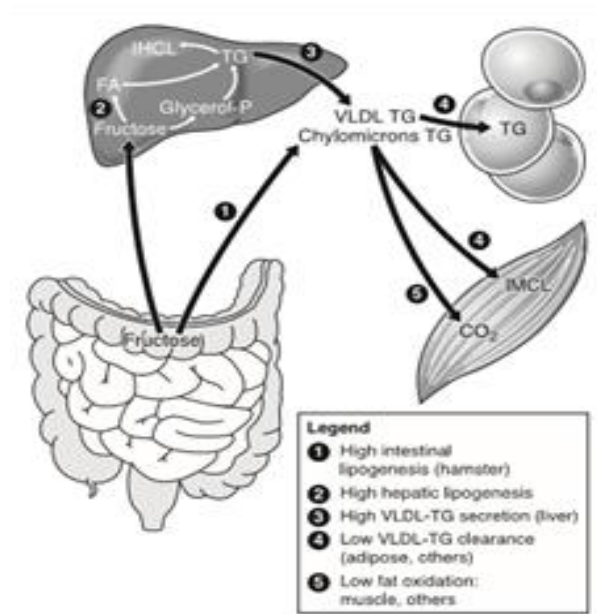
2.5.4. Fruktozun uzun dönem etkileri

Yüksek fruktoz ve yüksek sakkaroz alımı, dislipidemi, insülin direnci, hipertansiyon, hiperürisemi ve kilo alımı gibi birçok olumsuz metabolik ve kardiovasküler etkilere neden olmaktadır [16, 17].

Dislipidemi

Fruktozun indüklediği dislipidemi mekanizmasının altta yatan nedenleri tam olarak açıklanamamıştır. Plazma trigliserid kinetiği yüksek sukroz, glukoz ve fruktoz ile beslenen ratlarda ölçülmüştür ve çalışmalarda hem trigliserid üretiminin arttığı ve hem de

klirensinin azaldığı gösterilmiştir (Şekil 2.11) [14, 145]. Fruktoz yağ asitlerinin sentezinin prekürsörleri olan hepatik trioz-fosfatı sağlaması açısından oldukça lipojeniktir. Yapılan birçok çalışmada akut fruktoz alınımından sonra bazı lipojenik genlerin aktivasyonu ve lipogenez yolağının düzenlediği ve dolaşımdaki lipid seviyelerinin arttığı gösterilmiştir [146, 147]. Ayrıca fruktozun karaciğerdeki önemli lipojenik enzimlerin ekspresyonlarını da artırabileceği bildirilmiştir. Hepatik lipogenesisin düzenlenmesinden sorumlu transkripsiyon faktörü olan sterol düzenleyici element bağlayan protein (SREBP)'in ekspresyonunu indüklemektedir [148, 149]. Fruktoz ayrıca hepatik yağ asit sentaz ve asetil-CoA karboksilaz ekspresyonunu upregule eden, karbonhidrat yanıt elementini bağlayan protein (ChREBP) hepatik transkripsiyon faktörü aktive etmektedir [150, 151]. Yüksek fruktoz içerikli bir beslenme hekzos monofosfat yolağının ilk enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ekspresyonunu artırır [151].



Şekil 2.11. Fruktoz kaynaklı dislipidemisinin olası mekanizmaları [14]

Karaciğerde ve İskelet Kasında Ektopik Lipid Birikimi

Fruktoz, plazma lipid profilinin değişiminin yanı sıra, hücre içi lipid birikimini de modüle edebilir. Endokrin hücreler, kas lifleri ve hepatositler gibi yağ doku dışındaki hücrelerin sitoplazmalarındaki trigliserid birikimleri ektopik lipidler olarak adlandırılır. Ektopik lipidler gibi karaciğer ve iskelet kasındaki birikimler dokuya özgün insülin direnci ile ilişkilidir [152].

İnsanlarda fruktoz alımı sonrası intrahepatik yağ birikimi, çalışmalarda daha az gösterilmiştir. Sağlıklı erkek gönüllülerde yapılan 1,5 g.kg dozundaki yüksek fruktoz diyetinde karaciğerdeki yağ içeriği ve kasda belirgin değişimlerin olmadığı gösterilmiştir. Ancak bu doz 2 katına çıkarıldığında sadece 7 günde hepatik ve intramyosellüler yağ içeriğinde belirgin bir artışı indüklediği görülmüştür [153]. İntrahepatik yağ içeriğindeki artış VLDL-TG artışı ile ilişkilidir. İlginç bir şekilde, intrahepatik yağ içeriğinde plazma VLDL-TG artışı, tip 2 diabetli hastaların diabetli olmayan çocuklarında gösterilmiştir. Bu sonuçlar da fruktozun metabolik etkilerinin genetik çevreye bağlı olabileceğini düşündürmektedir [153].

Fruktoz ile ilişkili Bozulmuş Glukoz Homeostazı ve İnsülin Direnci

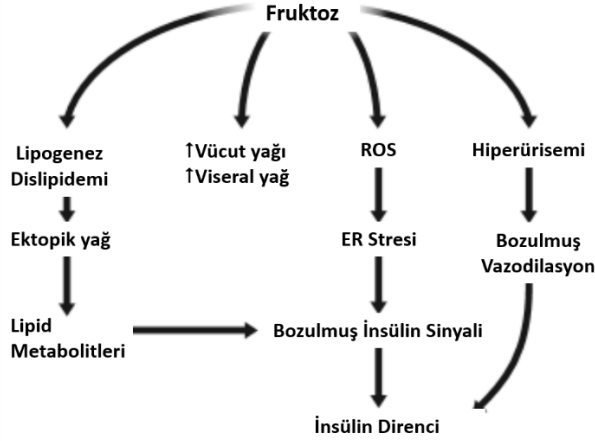
Lipid metabolizması ve insülin direnci arasındaki ilişki 1960'larda Sir Philip Randle tarafından başlatılmıştır. İlk başlarda lipid kaynaklı insülin direncinde, başlıca faktörlerin esterleşmemiş yağ asitleri konsantrasyonu olduğu düşünülse de daha sonra hem esterleşmemiş yağ asitlerinin hem de yüksek plazma trigliserid konsantrasyonlarının insülin direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [154, 155].

Birçok çalışmada, fruktozun glukoz metabolizması ve insülin duyarlılığı üzerinde olumsuz etkileri olduğu belirtilmiştir. Lipojenik olan fruktozun tüketimi sonucunda, ektopik lipid birikimine ve diaçilgliserol, yağ açıl-CoA, seramitler gibi toksik lipid türevlerinin oluşumuna neden olur (Şekil 2.12). Bu metabolitlerin hücre içindeki varlığının, insülinin sinyalizasyonunda görev alan insülin reseptör substratı-1 (IRS-I)'in normalden daha fazla fosforilasyonuna ve buna bağlı olarak insülin sinyalinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir [155].

Yüksek fruktoz diyeti uygulanan ratlarda, ürik asit seviyesini düşüren ajanlar kullanıldığında plazma insülin seviyelerinin azaldığı ve insülin duyarlılığının geliştiği gözlemlenmiştir [14, 156]. İnsanlarda yapılan çalışmalarda, fruktoz tüketiminin hepatik insülin direncine yol açtığı bildirilmiş, fakat farklı dokulardaki insülin direnci etkisi henüz kanıtlanmamıştır [17, 116, 147].

Fruktoz ve yağ ya da toplam enerji alımı arasındaki etkileşimlerin değerlendirilmesi gerekmektedir. Fruktoz ve insülin direnci arasındaki olası mekanizma tabloda

özetlenmiştir. Ayrıca fruktoz, ürik asit üretimini artırarak endotelial fonksiyonu bozabilir ve insülin direncine preresseptör olarak katkıda bulunur.



Şekil 2.12. Fruktoz kaynaklı insülin direncinin olası mekanizması [146]

Fruktoz ve Ürik Asit Metabolizması

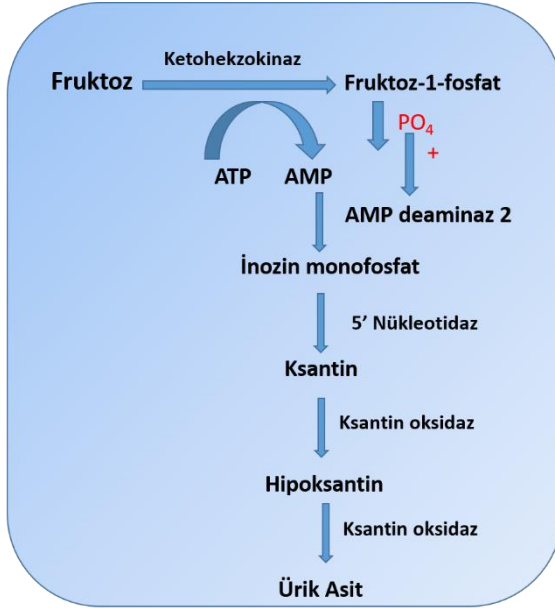
Fruktoz alımı, karaciğerde fruktoz 1-fosfata fosforilasyonundan dolayı ATP hidrolizini stimüle eder ve AMP (adenozin monofosfat) artışına neden olur ve ürik asit sentezi gerçekleşir (Şekil 2.13). Yapılan çalışmalarda, yüksek kan basıncına sahip hastalarda, yüksek fruktoz diyetinin plazma ürik asit seviyesini artırdığı bildirilmektedir [158, 159]. Ayrıca fruktoz tüketimi, ürik asit metabolizması ile ilişkili olan gut hastalığı ve böbrek taşı oluşumu ile de ilgilidir [160, 161].

Hiperürisemi metabolik sendromlu kişilerde sık karşılaşılan ve Reaven tarafından ‘X Sendromu’ ya da ‘İnsülin direnci sendromu’ tanısında küçük bir kriter olmuştur. İnsülin direnci ve hiperürisemi arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamasına rağmen, serum ürik asit konsantrasyonu tip-2 diabetin oluşumunda bir risk faktörü olarak görülmektedir [14, 162, 163].

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, fruktoz alımı, hiperürisemi ve insülin direnci arasındaki ilişki ile ilgili yeni bir hipotez önerilmiştir. Bu hipoteze göre, insülin kaynaklı glukoz kullanımı yalnızca insülin-duyarlı hücrelerin metabolik yolağının uyarılmasını değil, iskelet kası gibi insülin duyarlı dokularda kan akışı ve dolaşımını da artırmaktadır

[164]. İnsülinin bu etkisi, endotelial enzim nitrik oksit sentazın (eNOS) aktivasyonu üzerinden gerçekleşmektedir [165].

Renal tübüllerde eksprese olan SLC2A9 (GLUT9) fruktoz taşıyıcılarının da ürisemi ile ilişkili olduğu ve renal ürik asit atılımının düzenlenmesinde görevli oldukları düşünülmektedir [166].



Şekil 2.13. Fruktozdan ürik asit oluşumu [167]

Yüksek Kan Basıncı

Ratlarda yapılan çeşitli çalışmalarda, yüksek fruktoz diyeti ve hipertansiyon arasında ilişki saptanmıştır [168, 169]. Literatürde fruktozun etki mekanizması üzerine farklı mekanizmalar sunulmuştur. Yüksek fruktoz diyeti ile ilişkili olarak gelişen insülin direnci ve ardından gelen hiperinsülinemi yüksek kan basıncı ile ilişkilidir [170]. Hiperinsülinemi ayrıca böbrekdeki sodyum geri emilimini artırarak kan basıncını artırabilmektedir [171]. Yüksek fruktoz alımı, bir reaktif olan metilglioksala dönüşebilme özelliğindeki hücre içi gliseraldehit ve dihidroksiaseton fosfat birikimine yol açmaktadır [172].

Fruktoz alımı ve yüksek kan basıncı arasındaki ilişkiye dair kemirgenlerde birçok çalışma bulunmasına rağmen, insanlarda yapılan çalışmalar çok net değildir.

2.5.5. Fruktoz ve metabolik sendrom ilişkisi

Son yıllarda artan yüksek fruktoz tüketimiyle birlikte MetS görülme sıklığı da artış göstermektedir. Yapılan çeşitli araştırmalarda fruktozun çeşitli mekanizmalarla MetS bileşenlerinden olan obeziteye neden olduğu rapor edilmiştir [173, 174].

Fruktoz içeren diyetlerde, fruktoz fosfofruktokinaz aracılığıyla karaciğer lipid metabolizmasına etki etmektedir. Aşırı fruktoz alımı sonucunda metabolik hormon konsantrasyonu ve plazma ürik asit seviyesinde değişimler meydana gelir [175]. Özellikle deneysel hayvan çalışmalarında MetS modeli oluşturmak amacı ile araştırmacılar tarafından yüksek fruktoz içerikli (%35-72) diyet ya da (%10-20) içme suyu kullanılmaktadır [14, 15, 176-179].

Kemirgenlerde, diyetle aşırı fruktoz tüketimi sonucunda; hipertansiyon, dislipidemi, insülin direnci ve bozulmuş glukoz toleransı metabolik sendrom belirtileri ortaya çıkmaktadır [180].

2.6. Metabolik Sendrom

Metabolik sendrom, toplumda giderek yaygınlaşan, içerdiği sistemik bozukluklar nedeni ile gün geçtikçe önem kazanan ve literatürde de artan araştırmalarla geniş yer bulan bir hastalık tipidir [2].

Metabolik sendrom; sendrom-X, insülin direnci sendromu, polimetabolik sendrom, ölümcül dörtlü ve uygarlık sendromu gibi farklı terimlerle de ifade edilmektedir [181, 182].

İlk kez 1988'de Reaven, çeşitli risk faktörlerinin sıklıkla birarada bulunduğu dikkat çekmiş ve sendrom-X olarak adlandırdığı bu beraberliğin kardiyovasküler hastalıkların gelişme riskini arttırdığını belirtmiştir [170].

Metabolik sendrom, insülin direnciyle birlikte başlayan, glukoz intoleransı, abdominal obezite veya diabetes mellitus, hipertansiyon, koroner arter hastalığı (KAH) ve dislipidemi gibi sistemik bozuklukların eşlik ettiği ölümcül bir endokrinopati olarak da değerlendirilmektedir [183].

2.6.1. Metabolik sendromun etiyolojisi

Metabolik sendromun mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, başlıca obezite ve insülin direncinin yanı sıra yaşlanma, proinflamatuvar durum, hormonal değişiklikler gibi diğer faktörler de metabolik sendromun nedeni olarak ifade edilmektedir. Öne sürülen farklı hipotezler söz konusu olup bazı hipotezlere göre primer neden, insülin direnci olarak tanımlanmıştır. Bazı hipotezler ise hormonlarla ilişkili olarak abdominal obezitenin de metabolik sendroma neden olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda genetik faktörler metabolik sendromun tetikleyiceleri arasında sayılmaktadır [3].

Bu bilgiler doğrultusunda metabolik sendromun etiyolojisi genel olarak obezite ve yağ dokusu bozuklukları, insülin direnci ve vasküler, hepatik ve immünolojik kökenli moleküller gibi bağımsız faktörler olarak üç kategoride incelenebilir. Modern şehir yaşamının getirdiği rutin yaşam şartları ve yüksek kalorili beslenme, postmenapozal dönem, sigara içme, düşük gelir düzeyi, yüksek karbonhidrat diyeti, fiziksel inaktivite de metabolik sendrom sıklığını arttıran diğer nedenlerdir [184-186].

2.6.2. Metabolik sendrom tanısı

Metabolik sendrom tanısı için; Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Ulusal Kolesterol Eğitim Programı-Yetişkin Tedavi Paneli III (NCEP-ATP III), Amerikan Klinik Endokrinologlar Birliği (AACE) ve Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) tarafından kullanılan çeşitli tanı kriterleri tanımlanmıştır [187, 188].

Dünya Sağlık Örgütü 1998 yılında metabolik sendromu, diyabet, bozulmuş açlık glukozu, bozulmuş glukoz toleransı veya insülin direnciyle birlikte hipertansiyon ($> 160/90$ mmHg), hiperlipidemi, santral obezite ve mikroalbuminüriden en az ikisinin olması olarak tanımlarken, Ulusal Kolesterol Eğitim Programı Erişkin Tedavi Paneli (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel; NCEP-ATP III) 2001 yılında yetişkinlerde, metabolik sendrom tanısı için beş kriterden üçünün varlığının yeterli olduğunu bildirmiştir [189].

2.6.3. Metabolik sendromun prevalansı

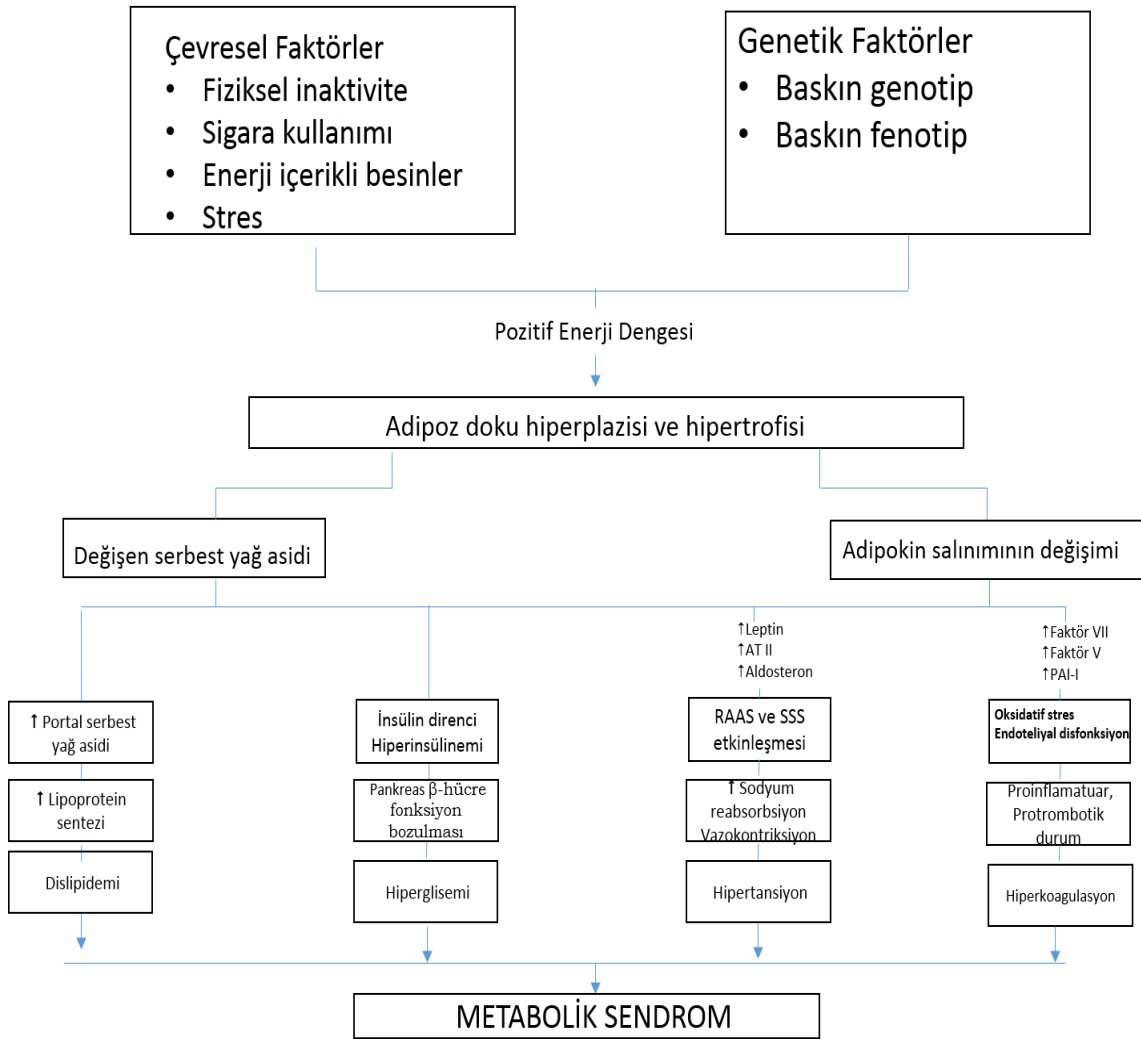
Metabolik sendrom dünya çapında prevalansı <% 10 ‘dan %84’ e kadar değişen, kentsel ya da kırsal çevreye bağlı olarak bölgelere, nüfus, cinsiyet, yaş, ırk ve etnisiteye göre farklılık gösteren bir sendromdur [190, 191].

Genel olarak, Uluslararası Diabet Federasyonuna göre dünya yetişkin nüfusunun dörtte biri metabolik sendromludur [1]. Yüksek sosyoekonomik düzey, hareketsiz yaşam tarzı ve yüksek vücut kitle indeksi önemli ölçüde metabolik sendrom ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca genetik geçmiş, beslenme alışkanlığı, fiziksel aktivite düzeyleri, sigara kullanımı, aile diabetes öyküsü ve eğitim de hastalığın prevalansını etkileyen faktörlerdir. Metabolik sendrom Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırmaları anketine göre (National Health and Nutrition Examination Survey- NHANES) normal kilolu kişilerin % 5’inde, yüksek kilolu kişilerin % 22’sinde, obezlerde ise % 60’ ında metabolik sendrom tespit edilmiştir [185]. Bu durum yaşla birlikte (20-29 yaş arası yetişkinlerde % 10, 40-49 yaş arası yetişkinlerde % 20, 60-69 yaş arası yetişkinlerde % 45 oranında) artmaktadır. Metabolik sendrom prevalansı dünya çapında NCEP-ATP III kriterleri, 2001 verilerine göre erkeklerde % 8’ den % 43’ e, kadınlarda ise % 7’den % 56’ ya kadar değişiklik göstermektedir [1, 185, 192, 193].

Türkiye genelinde yapılan Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri (TEKHARF) çalışmasına göre, 2000 yılı itibariyle 30 yaş ve üzerindeki 9.2 milyon kişide metabolik sendrom tespit edilmiştir ve KAH geliştiren bireylerin % 53’ü aynı zamanda metabolik sendrom hastasıdır. Türkiye’ de metabolik sendrom görülme sıklığı, erkeklerde % 28, kadınlarda ise % 40 gibi yüksek değerlerdedir. Ülkemizde, 2004 yılında yapılan METSAR (Türkiye Metabolik Sendrom Araştırması) sonuçlarına göre 20 yaş ve üzerindeki erişkinlerde metabolik sendrom sıklığı % 35 olarak bulunmuştur. Kadınlarda % 41.1, erkeklerde % 28.8 oranı kadınlardaki metabolik sendrom sıklığının erkeklere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. 2010 yılında yapılan Metabolik Sendrom Derneği Türkiye Sağlık Çalışması (PURE TÜRKİYE; Prospective Urban Epidemiological Study)’nda 4057 kişiyle yaptığı çalışmada, bel çevresi erkeklerde > 94 cm, kadınlarda ise > 80 cm olarak kabul edilmiş; kadınlarda metabolik sendrom sıklığı %43.5, erkeklerde ise %41.4 olarak belirtilmiştir [184, 186, 193-195].

2.6.4. Metabolik sendrom patofizyolojisi

Metabolik sendrom, genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimin sonucu oluşan düşük dereceli kronik bir inflamasyon durumudur (Şekil 2.14). İnsülin direnci, visseral yağlanma, aterojenik dislipidemi, endotel disfonksiyonu, genetik yatkınlık, yüksek kan basıncı, hiperkoagülasyon durumu ve kronik stres gibi çeşitli faktörleri içeren bir sendromdur [1].



Şekil 2.14. Metabolik sendrom ve bileşenleri (FFA: free fatty acid, ATII: angiotensin II, PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1, RAAS: renin angiotensin aldosterone system, SNS: sympathetic nervous system) [1]

Abdominal Obezite

Obezite salgını temel olarak yoğun kalorili yiyecek tüketimi ve düşük fiziksel aktivite sonucu oluşmaktadır. Yağ dokusu adipositlerden, stromal preadipositlerden, immun hücrelerden ve endotelyumdan oluşan ve leptin, rezistin, adiponektin ve aynı zamanda TNF α (Tümör nekrozis faktör- α), IL-6, IL -8 gibi sitokinleri salgılayan, endokrin organ özelliği taşıyan, heterojen bir dokudur. Hipertrofi ve hiperplazi ile besinsel değişikliklere hızlı ve dinamik bir yanıt vermektedir [196].

Obezite ve artan adiposit yayılımı ile birlikte, obezite ile ilişkili hipoksi gelişmektedir. Hipoksi adiposit dokuda nekrosis ve makrofaj infiltrasyonuna neden olarak, yağ dokuda adipositokinler olarak bilinen gliserol, serbest yağ asitleri, proinflamatuvar mediatörler (TNF α ve IL-6), plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ve C-reaktif protein (CRP) gibi aktif metabolitlerin aşırı üretimine yol açmaktadır [197].

Ülkemizdeki obezite oranına bakıldığında ise, Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması (TURDEP) sonuçlarına göre 20 yaş ve üzerindeki kişilerin %34'ünde abdominal obezite görülmektedir. Abdominal obezite insülin direncinin en önemli göstergesidir. Her obez hasta metabolik sendrom açısından taranmalıdır [189].

İnsülin Direnci

Metabolik sendromun önemli bileşenlerinden biri de endojen ve ekzojen insüline karşı oluşan, biyolojik yanıtsızlık olarak da değerlendirilebilen insülin direncidir [189]. Bazı araştırmacılara göre, insülin direnci ve kompensatuar hiperinsülinemi metabolik sendromu oluşturan kriterlerin temelindeki en önemli mekanizma olup ve Sendrom-X' de kardiyovasküler hastalıklar için ciddi bir risk faktörüdür [198]. Genetik faktörler, fetal beslenmenin yetersizliği, fiziksel inaktivite, obezite ve ileri yaş insülin direncine neden olmaktadır. Genellikle hiperinsülinemiyle birlikte görülen bu durum, her zaman insülin direncinin ileri evresi olan hiperglisemi ile birlikte seyretmemektedir [199].

İnsülin direnci ile endokrin bozucular arasındaki ilişkiye bakıldığında ise, BPA gibi endokrin bozucularla yapılan çalışmalarda, kemirgenlerde serum BPA düzeyi ile beta

hücrelerinin glukoza aşırı duyarlılığı ve periferik insülin direnci arasında ilişki gösterilmiştir [200].

Dislipidemi

Metabolik sendromda kardiyovasküler morbidite ve mortalitenin artışından sorumlu mekanizmalardan biri de dislipidemi [199]. Metabolik sendromda trigliserid ve küçük-yoğun LDL yüksek, HDL-kolesterol düşük iken, LDL-kolesterol genellikle artış göstermemektedir. İnsülin direncinin ilerlemesi ile birlikte, trigliserid düzeyleri yükselmekte, HDL düşmektedir [189].

Hipertansiyon

Esansiyel hipertansiyon obezite, glukoz intoleransı ve dislipidemi gibi metabolik anormallikler ile ilişkilidir [201]. Hem hiperglisemi, hem de hiperinsülinemi anjiyotensinojen-II (AT-II) ve AT-I reseptörlerin ekspresyonlarını artırarak Renin anjiyotensin sistemi (RAS) aktive eder ve insülin direnci olan hastalarda hipertansiyona yol açar [202]. İnsülin direnci ve hiperinsülinemi sempatik sinir sisteminin aktivasyonuna neden olur, böbrekten sodyum reabsorpsiyonu ve kardiyak atımı artırır ve arterler vazokonstriksiyon ile hipertansiyon oluşturur [203].

Bozulmuş Endotelial Fonksiyon

Endotel bağımlı vazodilatasyon, azalmış arteriyel uyum ve ateroskleroz sürecinin hızlanması ile karakterizedir. Oksidatif stres, hiperglisemi, inflamatuvar sitokinler ya da adipokinler endoteliumun normal fizyolojik mekanizmasını etkilemektedir. Nitrik oksit (NO) indirgenmesi endotelial homeostatisde düzenleyici role sahiptir ve reaktif oksijen türlerindeki artış bozulmuş endotelial işlev ile sonuçlanmaktadır. Metabolik sendromun klinik belirtileri ortaya çıkmadan önceki dönemlerde endotel disfonksiyon geliştiği gösterilmiştir [1, 205, 206].

Hiperkoagülabilité

İnsülin direnci; plazminojen aktivatör inhibitör-1, faktör-VII, faktör-VIII ve Von-Willebrand faktör gibi koagulan sistem bileşenleri, fibrinojen ve Plasminogen activator

inhibitor-1 (PAI-1) düzeylerini yükselterek endotelial disfonksiyonu ve makrovasküler hastalık riskini artırır [1, 206].

Kronik Stres ve Glukokortikoid Aksiyon

Stres mediatörlerinin kronik hipersekresyonu sonucunda kronik hiperkortikolizmi, düşük büyüme hormonu sekresyonu ve hipogonadizmin sonucu olarak visseral yağ birikimi artış gösterebilmektedir [207]. Glukokortikoidler, yağ asit sentaz enzimlerini ve lipoproteinlerin sentezini artırır ve hepatik glikoneojenez yolağı indükler. Vücut yağ kütlesinin artışına yol açan preadipositlerin adipositlere farklılaşmasına neden olur [208]. Lipoliz ve lipid oksidasyonunun artışına bağlı olarak periferik insülin direnci ortaya çıkar [209].

Yapılan çalışmalarda, plazma kortikol düzeyleri, total üriner glukokortikoid metabolitleri ve metabolik sendromlu hastalar arasında korelasyon gözlemlenmiştir. Hormonal değişimler dislipidemi, hipertansiyon ve tip 2 diabetes mellitus ile sonuçlanan reaktif insülin hipersekresyonuna ve visseral obezitede artışa neden olarak metabolik sendromun temelini oluşturabilmektedir [210].

2.7. Bisfenol A (BPA)

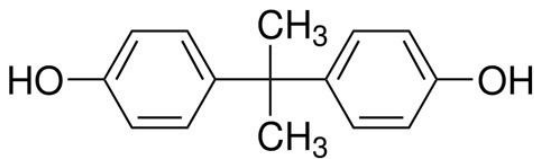
Dışarıdan alınarak organizmanın endokrin fonksiyonlarını ve gelişimini etkileyen, doğal ya da sentetik madde veya madde karışımlarına endokrin bozucular adı verilir. Endokrin bozucular ile hormonlar arasında agonist ve/veya antagonist etki bulunur. Bu etkiler, hormon üretimi, transportu, yıkımı ve vücuttan atılımları ile ilişkilidir [4, 5]. Avrupa Birliği'nin yayınladığı endokrin bozucular ile ilgili raporda, çevre ve insan sağlığına zararı açık olarak belirtilmiş kimyasal maddeler arasında bisfenol A (BPA) da yer almaktadır [211].

2.7.1. Bisfenol-A'nın tarihçesi, fiziksel ve kimyasal yapısı

Bisfenol A (BPA), (4,4'-isopropilidendifenol; 2,2-bis(4-hidroksifenil) –propan)) ilk kez 1891 yılında Rus Kimyacı Alexander P. Dianin tarafından tanımlanmıştır (Şekil 2.15). 1905 yılında Thomas Zincke tarafından da asit katalizaz reaksiyonu sonucu doymamış 2 fenol halkasının aseton ile birleşmesiyle oluşturulmuştur. 1930' lu yıllarda sentetik östrojenik olarak sentezlenmiştir [212]. 1953 yılında PVC olarak bilinen polivinil klorür teknolojisinin gelişmesiyle plastik ürünlerin yapısında kullanılmaya başlanmıştır ve günümüzde de yıllık üretim kapasitesi giderek artış göstermektedir.

10 Haziran 2011'de ülkemizde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın 'Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddeleri ile Temasta Bulunan Plastik Madde ve Malzemeler' Tebliği'nde yaptığı değişiklik yürürlüğe girmiştir. Tebliğ uyarınca, referans numarası "13480" olan "2,2-Bis(4-hidroksifenil) propan", Türk Gıda Kodeksi (TGK)-Bebek Formülleri ve TGK-devam Formülleri Tebliği'nde bebek olarak tanımlanan tüketici grubu için kullanılan, polikarbonat madde ve malzemelerin üretiminde kullanılmaması gerektiği belirtilmiştir [211, 213].

Kimyasal formülü $(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$ şeklindedir. Bisfenol A üzerinde yer alan bu 'OH grupları moleküle reaktif özellik kazandırmaktadır. BPA (CAS No. 80-05-7) katı, fenolik kokulu, krem-beyaz renkte ve kristal yapıdadır. Molekül ağırlığı 228.9g/mol, erime sıcaklığı ise 153-156 °C derece arasındadır. Kaynama sıcaklığı 220 °C ' dir [214].



Şekil 2.15. Bisfenol A'nın Kimyasal Yapısı [215]

2.7.2. Bisfenol A' nın üretimi ve kullanım alanları

Bisfenol A dünyada yaygın olarak üretilen ve kullanılan kimyasallardan biridir. 2011 yılı itibariyle BPA üretimi bir önceki yıla oranla % 5,25 artarak 4,4 milyon tonu bulmuştur. 2012 de üretim 372,000 ton artarak 4,6 milyon tonu aşmıştır. Asya genel üretimde % 53'

lük oranla liderken, onu Kuzey Amerika ve Avrupa takip etmektedir. ABD, Tayvan, Güney Kore, Çin ve Japonya da BPA üreticisi ülkeler arasında yer almaktadır. Önümüzdeki yıllarda BPA üretim hacminin dünya çapında 5,4 milyon tonu aşacağı düşünülmektedir [216].

BPA' nın kullanım alanlarına bakıldığında ise %95 oranında endüstride plastik yapımında, polikarbonata dayanıklılık ve sağlamlık kazandırmasından dolayı %71 oranında polikarbonat reçine ve %29 oranında epoksi reçine yapımında yer aldığı görülmektedir [217]. Paketleme uygulamalarında 7 çeşit plastik kullanılmaktadır ve 1 ile 7 arasında geri dönüşüm kodu ile ifade edilmektedirler. Bu plastiklerden geri dönüşüm kodu 1-6 olanlar polimerizasyon ya da paketleme formunda bisfenol A içermedikleri için, gıda ve içeceklerle BPA geçmesi söz konusu değildir. Geri dönüşüm kodu 3 olan plastiklerde BPA bulunur. Ancak geri dönüşüm kodu 7 olan plastikler “diğer” sınıf olarak değerlendirilirler ve polikarbonat ve epoksi gibi maddeler içermektedir. Bu grupta yer alan ürünler BPA momonerinden yapılmaktadır [218].

- Polivinil karbonat,
- Dişleri çürükten koruma amacıyla pedodontide yaygın olarak kullanılan fissür örtücü ve kompozit rezin dolgu maddelerinin yapısında,
- Diş dolgu malzemeleri
- Metal konserve kutularının iç yüzeyinde,
- Oyuncak, biberon ve emzik gibi bebek ürünlerinde,
- Yiyecek saklama kapları,
- Su şişeleri ve şişe kapakları,
- Kozmetik ürünlerde,
- Gözlük camları, optik lensler
- CD, DVD ve elektronik cihazları içeren plastiklerde,
- Karbonsuz kopya kağıtlarında ve termal kağıtlarda renk geliştirici olarak,
- Su boruların yüzeylerinde
- Fungusit ve pestisitlerin üretiminde
- Sanayide köpük ve paketleme sistemlerinde
- Plastik film yapımında oldukça sık kullanılmaktadır [6-8].

2.7.3. BPA metabolizması

BPA 'ya etkin kalma, BPA içeren besinlerin tüketilmesiyle, inhalasyon ve deriden emilimi yoluyla olmaktadır. Oral yolla alınan BPA, etkin kalmanın ana kaynağını oluşturmaktadır [219, 220]. BPA, epoksi ya da polikarbonat gibi plastiklerle temas halindeki gıdaların tüketilmesiyle bağırsak ve karaciğerde CYP2C18 ve daha az olarak CYP2C19 ve CYP2C9 enzimleri ile metabolize edilir suda çözünür metaboliti olan bisphenol A-glucuronide'e çevrilir [221]. Bir miktar da sülfat konjugasyonuna uğrar ve minor metabolit BPA-sülfat (BPAS) oluşur. Ortalama altı saatlik bir yarılanma ömrü vardır ve yaklaşık 42 saatte tamamına yakını idrarla atıldığı gösterilmiştir. Bu atılım yaşa, cinsiyete, maruz kalma dozuna bağlı olarak değişim göstermektedir [222, 223]. Vücutta idrar dışında kanda, adipoz dokuda, semende, anne sütünde, amniyotik sıvıda, plasenta ve fetusta, kolostrumda, umbilikal kord kanında ve tükürükte de BPA bulunabileceği belirtilmektedir [12, 224, 225]. Günümüzde Bisfenol A insan plazması, idrar, ter, salya gibi örneklerde ve çeşitli dokularda HPLC, LC-MS/MS ile GC- MS, ELISA, RIA gibi metodlarla analiz edilebilmektedir [226].

2.7.4. BPA' nın gıda ve içeceklere geçişi

BPA içeren maddelerin gıda ve içeceklerle temas etmesi halinde az miktarda BPA' nın gıda ve içeceklere geçmesi mümkündür. Zarar görmüş plastiklerde ise gıdalara geçişi artmaktadır. Özellikle gıdaların paketlenmesi sırasındaki ısı işlemler ve pH düşüşü gibi uygulamalar da BPA' nın kimyasal bağlarını bozarak alım hızını ve miktarını artırır [222].

Polimerizasyon reaksiyonunun tam olarak tamamlanmamış olması monomerlerin temel yapıdan ayrılarak BPA' nın gıda maddelerine kolaylıkla geçmesine neden olur [227].

BPA diffüzyonla ve hidroksit tarafından katalizlenerek farklı ürünlere geçebilir. Özellikle saklanma süresi, ortam sıcaklığı ve besin türü de BPA' nın geçişini etkilemektedir.

Yapılan araştırmalarda 40 ile 95 °C arasında değişen sıcaklıklarda su, biberonlara koyulmuş, BPA konsantrasyonları sırasıyla 0,03 ile 0,13 µg/dm³ bulunmuştur. Altı ay süreyle kullanılan biberonlarda ise bu oran sırasıyla 0,18 ile 18,47 µg/dm³ olarak tespit edilmiştir [228]. Başka bir çalışmada ise suda çözünmüş deterjanın, biberonlardan BPA

salınımını etkilediği ve deterjanlı su ile yapılan yıkama, fırçalama ve ıslatma işlemlerinin polimerden BPA geçişini geciktirdiği belirtilmiştir [229].

Çevresel BPA Maruziyeti

Atmosfer

BPA' nın, ağırlıklı olarak sanayi faaliyetlerinin sonucunda yılda yaklaşık olarak 100 ton atmosfere salındığı düşünülmektedir. Analizler atmosferde farklı konsantrasyonlarda BPA olduğunu ortaya koymaktadır. Berkner ve arkadaşlarının Almanya'nın Bavyera eyaletinin 3 farklı lokalizasyonunda yaptıkları araştırmada BPA konsantrasyonu 5' den 15 pg/m³' e değişirken, başka bir çalışmada, Japonya' da bu oran 10 ila 1920 pg/m³ arasında bulunmuştur [230, 231].

Gıda ve İçme Suyu

Gıda, BPA maruziyetinin en önemli kaynağıdır. İnsan sindirim kanalı, her gün tüketilen gıdalar yoluyla alınan BPA' ya 0,48 ile 1,6 µg/kg/vücut ağırlığı/gün oranında maruz kalmaktadır [10]. Et ürünlerinde (0,49-56 µg/kg), balıkta (7,1-102,7 µg/kg), sebze ve meyvelerde (11,0-95,3 µg/kg) ve tahıllarda (1,0-3,8 µg/kg) belli konsantrasyonlarda BPA belirlenmiştir [232-235]. Ayrıca konservelenmiş gıdalardaki BPA oranı taze gıdalara göre belirgin olarak daha yüksektir. Süt örneklerinde yapılan analizlerde de BPA' ya rastlanmıştır (Çizelge 2.2) [236, 237].

Matriks	Düzey
Musluk Suyu	0,099–0,317µg/dm ³
Şişe Su	0,07–4,21µg/dm ³
Tahıl	1–3,8µg/kg
Et	0,49–56µg/kg
Balık	7,1–102,7µg/kg
Sebze ve Meyve	11–95,3µg/kg
Konserve Deniz ürünleri	1–99,9µg/kg
Konserve Sebze ve Meyve	3,7–265,6µg/kg
Konserve içecekler	0,032–4µg/kg
Süt	1,32–176µg/kg
İdrar	4,50µg/dm ³
Ter	10–82µg/dm ³
Anne Sütü	1,1–3,4µg/dm ³
Kan	0,2–20ng/dm ³
Plasenta	1,0–104µg/kg
Adipoz Doku	3,19µg/kg

Çizelge 2.2. Su, gıda, vücut sıvısı ve çeşitli dokulardaki BPA düzeyleri [219]

Mesleki BPA Maruziyeti

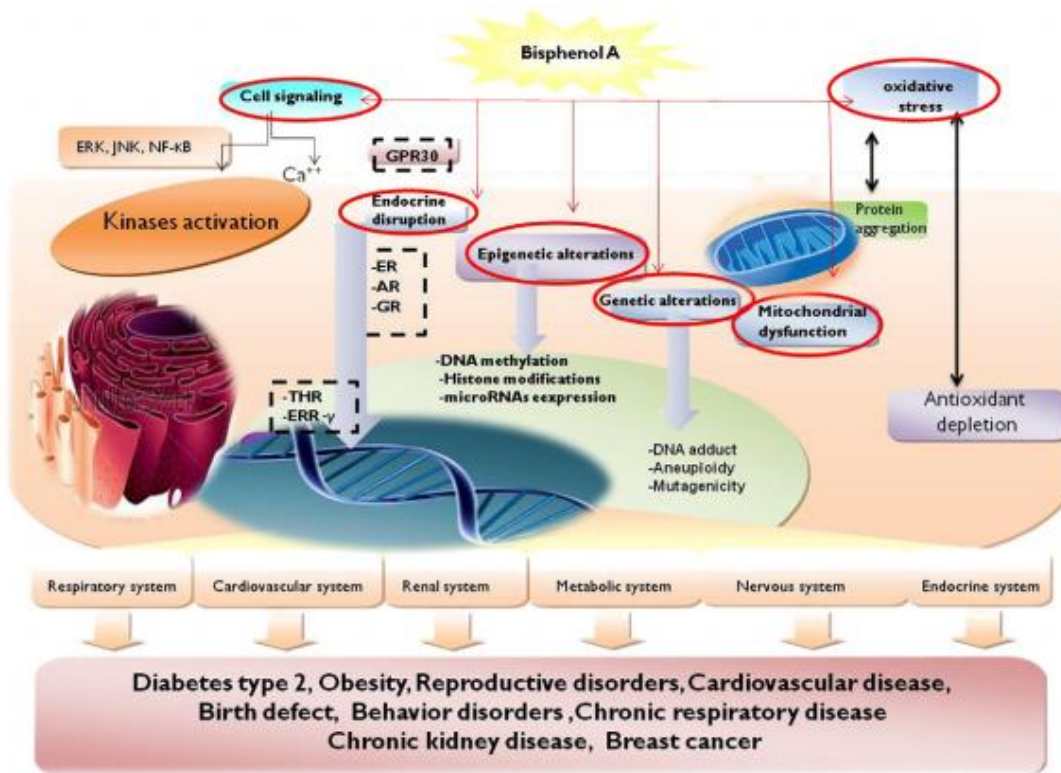
Mesleki olarak BPA' ya etkin kalma genellikle BPA ve epoksi reçinelerinin sentezinde ve inşaat ile ilişkili alanlarda çalışan kişilerde gözlenir. İnhalasyon ve dermal kontakt yolu ile BPA' ya maruz kalan kişilerde genellikle idrarda BPA konsantrasyonunda artış gözlenir [238].

BPA 'ya maruz kalan işçi sayısı düşük olsa da, uygunsuz çalışma koşulları ve adaptasyon eksikliği özellikle az gelişmiş ülkelerde sağlık üzerinde alerjik reaksiyonlar, kontakt dermatit ve cinsel işlev bozukluğu gibi olumsuz etkilere neden olmaktadır [239, 240].

2.7.5. BPA' nın sağlık üzerine etkileri

Yapılan araştırmalarda BPA' nın östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojeni taklit ettiği ve sentetik ksenoöstrojenler arasında olduğu bildirilmiştir [241]. Bunun yanı sıra hipometilasyon aktivitesinden dolayı oksidatif ve mutajenik potansiyele sahiptir [219].

BPA'ya etkin kalmanın insan sağlığı üzerindeki etkileri, son dönemde dikkat çeken önemli bir araştırma konusudur. Özellikle BPA toksisitesinin endokrin ve kardiovasküler sistem, obezite, diyabet, hepatik, nöral ve immünotoksisite, mutojenite, karsinojenite ve teratojenite ile ilişkili olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. BPA ile indüklenen kronik hastalıklarda hücresel ve moleküler mekanizmalar [220]

BPA ve endokrin sistem üzerine etkileri

BPA, endokrin sistemin işlevlerini bozan, östrojen-17-β estradiole benzer ksenoöstrojenik bir bileşiktir [10, 242]. Nukleustaki, membrandaki östrojen reseptörlerine bağlanarak ya da non-genomik yollara entegre olarak beyin, ovaryum, meme bezi gibi östrojenin ilgili

organlarında değişikliklere yol aarak endokrin sistem üzerinde etki göstermektedir. Ayrıca oksidatif strese neden olarak mitokondriyal işlevleri ve antioksidan enzimleri olumsuz etkilediği bilinmektedir.

BPA' nın hayvanlar üzerindeki östrojenik aktivitesi birçok çalışmada gösterilmiştir. Farelerde prostat ağırlığında artışa neden olduğu, gebe farelerde evresel BPA' ya etkin kalmanın erken vajinal açıklığa ve ilk östrus siklusunun daha erken başlamasına yol aatığı belirtilmiştir [243]. Başka bir çalışmada hormon ve nörohormon reseptörlerini etkileyerek beyinde yapısal ve işlevsel değişikliklere yol aatığı gösterilmiştir. BPA' nın aynı zamanda reproduktif organlarının gelişimini, testosteron salınımını ve sperm üretimini engellediği hayvan araştırmalarında ortaya koyulmuştur. Gözlemlenen bu değişiklikler beyin-gonadlar-hipofiz aks fonksiyonunun BPA' dan etkilenmesinden kaynaklanmaktadır [244].

İnsanlarda BPA' nın, hormon düzeyleri üzerinde negatif etkisi olduğu gösterilmiştir. İnfertilite kliniğindeki 167 erkek üzerinde yapılan araştırmada idrar BPA konsantrasyonlarının östradiol: testosteron oranı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir. Bir başka çalışmada, BPA' nın östrojen ve androjen sentezinden sorumlu gen ekspresyonunu etkilediği belirtilmiştir [13, 245].

Yapılan başka bir çalışmada, idrardaki yüksek BPA düzeyi ve triiyodotironin düzeyi ile azalan tiroid uyarıcı hormon seviyesi arasındaki ilişki gösterilmiştir [246].

BPA, obezite, diabet ve kardiyovasküler hastalıklar

Östrojen düzeylerindeki artış yetişkinlerde, kilo kaybı ile ilişkili iken, östrojen salınımının azalması genelde kilo alımını tetiklemektedir. Östrojen, leptin-östrojen etkileşimi sonucu adipositlerde yağ depolanmasını inhibe etmektedir. Adipositler, aromataz enzimi aracılığıyla testosteronu östrojene dönüştürüp sekresyonunu sağlamaktadır. Farklı dokuların aromataz aktivitesi prostoglandinler, glukokortikoidler, androjen ve östrojenik bir kimyasal olan Bisfenol A'dan etkilenmektedir [226]. Yapılan alışmalarda, Bisfenol A uygulamasının adiposit sayısını azalttığı ve hacimlerini arttırdığı ve bunun da obezite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Perinatal dönemde düşük dozlardaki BPA uygulamasının vücut ağırlığında artışa neden olduğu rapor edilmiştir. PPAR gama, C/EBPAİfa, LPL (lipoprotein lipaz), GLUT4, Cyp19 (aromataz) ve DGAT (diagiİlglicerol açıl transferaz)

adiposit farklılaşması ve obezite ile ilişkili genlerdir. Yetişkin ratlarda 70 µg/kg/gün BPA uygulaması abdominal adiposit sayısını; PPAR gama, C/EBPA α , LPL gen ekspresyonunu arttırmıştır [247]. Carwile ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, obez kişilerin idrar BPA konsantrasyonlarının artış gösterdiğini belirtmiştir [248]. Oral veya intravenöz olarak düşük doz BPA verilen erişkin farelerde, BPA'nın adipositlerde ve pankreas beta hücrelerinde bulunan östrojen reseptörlerine bağlanması sonucu hiperinsülinizm ve insülin direnci geliştiği gösterilmiştir [249]. BPA'nın insan adipoz dokusundan adiponektin salınımını azalttığı bildirilmiştir [250]. Lipolizi uyaran, insülin duyarlılığını azaltan, adiposit farklılaşmasını ve lipid homeostazını etkileyen enflamatuar sitokinlerin uyarılması olası başka bir mekanizma olarak ileri sürülmektedir. Ayrıca, 3967 kişi ile yapılan başka bir çalışmada da idrar BPA düzeylerinin artmış diabetes mellitus riski ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [251, 211].

Son yıllarda BPA'nın kardiyovasküler sistem ile olan ilişkisini araştırmak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. İnsanda idrarda yüksek BPA atılımının hipertansiyon, kalp krizi, koroner ve periferik arteriyel hastalıklar gibi farklı tipteki kardiyovasküler hastalıklarla ilgisi olduğunu göstermektedir. Akut dozda BPA'ya etkin kalmanın dişi kemirgenlerde aritmiye, kronik maruziyetinin ise ateroskleroz ve bozulmuş kan basıncına neden olduğu yönünde çalışmalar mevcuttur. Bunun altında yatan mekanizmanın BPA tarafından indüklenmiş kardiyak Ca^{+2} tutulumu, iyon kanalı inhibisyonu/aktivasyonu, oksidatif stres ve genomik modifikasyonlar olabileceği düşünülmektedir. Dişi ratlarda düşük dozda BPA uygulaması kardiyomiyositlerde protein kinaz A, kalsiyum bağımlı protein kinaz II sinyalizasyon yolu gibi farklı sinyal yollarını uyarmaktadır. Akut dozda BPA uygulaması cAMP düzeylerini arttırmış, protein kinaz A'yı uyarmış, ryadin reseptörlerini fosforillemiştir [226, 252].

BPA ve hepatotoksisite

BPA, oksidatif stres yoluyla hepatositlere zarar vermektedir. Ratlarda yapılan çalışmalarda antioksidan enzimleri ve glutatyon S-transferaz aktivitesini belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir. 50 mg/kg BPA'nın karaciğer enzimlerinin biyokimyasal düzeylerini ve karaciğer dokusundaki antioksidan gen aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir [253, 254]. Ayrıca düşük konsantrasyonlardaki BPA'nın hepatik hücrelerde oksijen oranını, ATP üretimini azalttığı ve mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu bildirilmiştir [255].

BPA ve nörotoksisite

İn vitro çalışmalar BPA' nın sinir sistemi hücrelerinde toksik olabileceğini göstermiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki (100 µm üzeri) BPA' nın hipokampal nöronal hücrelerde kalsiyum ve ROS düzeylerini artırarak ve kaspaz 3 ve MAPK ' yı aktive ederek apoptozu indüklediği rapor edilmiştir [256]. Ratlarda yapılan bir diğer çalışmada ise embriyonik beyin hücrelerinde, hücre siklusunda S fazı ve G2/M fazını durdurduğu ve apoptotik hücre oranını artırdığı gösterilmiştir [257].

BPA, kanser ve teratojenite

BPA ve kanser ilişkisini aydınlatmak için yapılan çalışmalar, her geçen gün artmaktadır. Hematopoetik, prostat, ovaryum, meme kanser türlerinin ve testis tümörlerinin gelişiminde etkili olduğu ve STAT3, MAPK ve PI3K/AKT gibi pek çok onkogenik yolağa etki ettiği gösterilmiştir [258, 259]. İnsanlarda apoptotik ve nekrotik değişiklikler, olası intrauterin gelişme geriliği, prematürite ve düşüğe yol açabileceği düşünülmektedir [260].

BPA ve dişi üreme sistemi

Son yıllarda yapılan araştırmalarda kadınlarda BPA' ya etkin kalmanın üreme yeteneğini azalttığı, gebeler üzerinde de etki göstererek idrardaki konsantrasyonu ile spontan ve tekrarlayan düşükler arasında ilişki olabileceği belirtilmektedir [6, 11, 227, 261, 262]. Hayvan modelleri ve kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarda BPA 'nın ovaryan bir toksik madde olduğu, mayoz başlangıcında olumsuz etki gösterdiği ve oosit kalitesini etkilediği ifade edilmiştir. Uterusda endometrial hücre proliferasyonuna zarar verdiği, uterin reseptivitesini etkilediği ve Hoxa10 gibi çeşitli gen ekspresyonlarını değiştirerek implantasyon başarısızlığını artırdığı deney hayvanları ile yapılan çeşitli çalışmalarda ifade edilmiştir [263-265].

Yüksek doz BPA'ya etkin kalan ratlarda ovaryum ve uterus ağırlıklarında azalmanın yanı sıra; uterus lümen çapında anormal morfolojik değişimler gözlenmiştir [266].

BPA' nın polikistik over sendromu ile ilişkisine bakıldığında ise kadınlar üzerinde yapılan bir çalışmada, PKOS hastalarında serum BPA düzeyleri, normal ovulasyonu olan ve

hiperandrojenemisi olmayan kişilere göre obeziteden bağımsız şekilde daha yüksek olarak saptanmıştır [267].

BPA ve erkek üreme sistemi

BPA, östrojen benzeri aktivite göstererek üreme organlarında toksisiteye neden olmakta ve testosteron sentezini inhibe etmektedir. Ratlarda yapılan çalışmalar BPA'nın spermatogenezi baskıladığını, testiküler ve epididimal ağırlıkta düşme ile karakterize, sperm üretimi ve fertilitede azalma olduğunu ortaya koymuştur [11]. BPA'ya etkin kalmanın insan sperm kalitesi üzerine olan etkileri ile ilgili çalışmalar literatürde sınırlıdır. Mesleki olarak BPA'ya etkin kalan erkeklerde yüksek üriner BPA düzeyi ile ilişkili sperm sayısı ve motilitesinde azalma gözlemlenmiştir [12, 13]. Başka bir çalışmada ise BPA konsantrasyonunun, semen parametrelerini etkilemediği, fakat serbest testosteron belirteçleri ile BPA düzeylerinin ilişkili olduğu bulunmuştur [265, 268].

Günlük 20 mg/kg BPA uygulanan erişkin farelerde ise günlük sperm üretimlerinde, sperm sayılarında ve serum testosteron düzeylerinde azalma; prostat ve seminal vezikül ağırlıklarında düşme olduğu; ancak testis veya epididimis ağırlıklarında değişme olmadığı bildirilmiştir [269]. Maternal düşük doz BPA ile karşılaşma sonrası doğan erkek fare yavrularında prostat hiperplazisi, artmış anogenital uzaklık ve azalmış epididimal ağırlık saptanmıştır. Hücre üzerindeki östrojen ile reseptörü prostat hiperplazisi ilişkili bulunmuş ve bu etki antiöstrojenlerle bloke edilmiştir [270, 271].

Prepubertal sıçanlarla yapılan çalışmada ise, farklı dozlarda 6 hafta oral BPA uygulamasından sonra sıçanlarda spermatogenezisin etkilendiği, hücreler arası bağlantı ve germ hücrelerinde kayıpla karakterize seminifer tübül epitel hasarının artan dozlara bağlı olarak geliştiği görülmüştür. Ayrıca bu hayvanların seminifer tübüllerin lumeninde atrofiye bağlı olarak olgunlaşmamış germ hücreleri ve hücre debris oluşumlarını ve sperm üretiminde ve fertilitede azalmaya neden olabileceğini rapor etmişlerdir [272].

Galloway ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada artmış üriner BPA konsantrasyonu ve artmış serum testosteron düzeyleri arasında bir ilişki saptanmışken, östradiol seviyesinde böyle bir ilişki gözlenmemiştir [273].

Mendiola ve arkadaşları, üriner BPA düzeyi ile azalmış serbest androjen indeksi ve serbest androjen indeksinin luteinize hormonuna oranı, serbest testosteron oranının luteinize hormonuna oranı arasında ilişki rapor etmişlerdir [268].

Meeker ve ekibi ise yüksek BPA konsantrasyonunu azalmış inhibin B düzeyi ve östradiolun testosterona oranı ile ilişkili bulmuşlardır [13].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, anogenital mesafenin, intrauterin hayatta endokrin bozuculara maruziyetten etkilendiği gösterilmiştir. Bu konu ile ilgili bir araştırmada, ebeveynlerinin mesleki ve doza bağımlı BPA maruziyeti ile doğan erkek nesillerde anogenital mesafenin kısaldığı gösterilmiştir [274]. İlginç olarak, kordon kanındaki BPA konsantrasyonları ile kriptorşidizm arasında bir bağlantı gösterilememiştir [275].

Çeşitli hayvan çalışmalarında BPA' ya etkin kalmanın anogenital mesafeyi etkilemediği ancak testislerin inişini etkilediği bildirilmiştir [265, 276].

BPA' nın erkek üriner yollarına etkisi ile ilgili literatürde sınırlı çalışma bulunmaktadır. Yetişkin ratlarda yapılan çalışmalarda, düşük ve yüksek doz BPA'nın prostatta klusterin düzeyini ve aromataz ekspresyonunu arttırdığı, tip 1 ve 2 5 α -redüktaz düzeyini azalttığı bildirilmiştir [277- 279].

Düşük ve yüksek doz BPA prostatta steroidojenik yolları, morfolojik değişiklikleri düzenleyerek homeostazda ve patogeneze önemli yer tutmaktadır [265]. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda BPA uygulamanının prostat patogenezinde rol oynadığı, neonatal dönem düşük dozda BPA' ya etkin kalmanın ileri dönemlerde prostat kanseri öncülü olan intraepitelial neoplaziyi artırdığı gösterilmiştir [280]. Wu ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada yüksek doz BPA'nın ventral ve dorsalateral prostat lobullerinde epitelial hücre yüksekliğini artırdığını belirtmişlerdir [281].

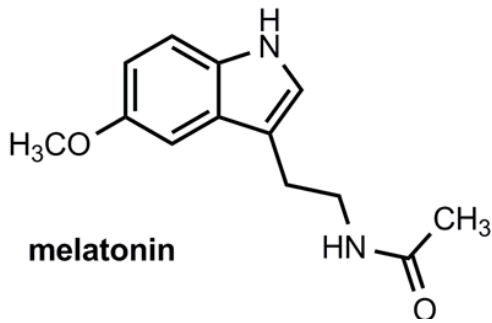
2.8. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin- $C_{13}H_{16}N_2O_2$) molekül ağırlığı 232,3 g/mol olan, pineal bez tarafından üretilen ve salgılanan, fonksiyonları memelilerden bakterilere kadar birçok canlı türünde yaygın olarak çalışılan endojen bir biyomoleküldür [282, 283]. 1958

yılında Aeron B. Lerner tarafından sığır epifiz bezinde keşfedilmiştir [284]. Keşfinden sonraki dört yıl içinde de bir nörohormon olarak kabul edilmiştir [285, 286].

Melatonin sirkadiyen ritmin düzenlenmesi, ruh hali, uyku, vücut ısısı, kemik metabolizması, üreme, mevsimsel değişimlerin modülasyonu, gıda alımı, retina fizyolojisi ve immün sistem regulasyonunu da içeren birçok fizyolojik role sahiptir. Antioksidan, onkostatik, antienflamatuar ve antikonvülsan etkileri bulunmaktadır [23-28]. Pineal beze spesifik bir hormon olarak kabul edilmesine rağmen, retina, beyin (serebral korteks, rafe çekirdek), mide ve ince bağırsakları içeren gastrointestinal sistem, testis, ovaryum, medulla spinalis, lenfosit, lens, kohlea ve deride ve hatta pirinç, arpa gibi bitkilerde de varlığı gösterilmiştir [287, 288].

Pineal bez (Pineal cisim, epiphysis cerebri), günlük vücut ritmini düzenleyen nöroendokrin bir bezdir. Diensefalon tavanının posteriyor parçasının nöroektoderminden gelişir. Beynin orta hattında üçüncü ventrikülün posterior duvarında yer alır. 5-8 mm yüksekliğinde ve 3-5 mm çapındadır ve 100-200 mg ağırlığındadır. Pineal bez, pinealositler ve interstisyel (gliyal) hücreler olmak üzere iki tip parankimal hücre içermektedir. Bu iki hücre tipine ek olarak insan pineal bezi corpora arenacea ya da beyin kumu adı verilen kalsifiye yapılar ile karakterizedir [289].



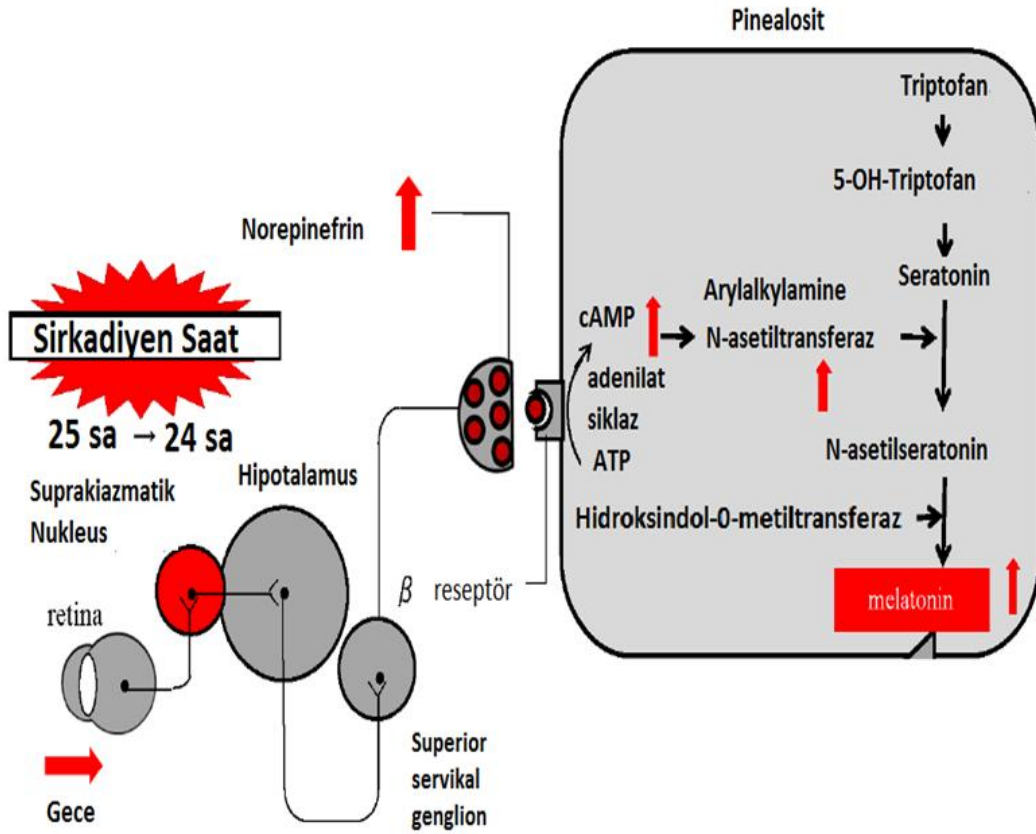
Şekil 2.17. Melatonin kimyasal yapısı [290]

2.8.1. Melatonin biyosentezi, fizyolojisi ve metabolizması

Melatonin triptofandan sentezlenen bir indolamindir. İlk aşamada esansiyel bir aminoasit olan triptofan dolaşımdan pinealosit içerisine alınır ve hücre içerisinde triptofan hidroksilaz ile bir ara metabolit olan ve kan – beyin bariyerini geçebilen, 5-hidroksitriptofana (5-OH-Triptofan) hidroksillenir (Şekil 2.17) [291]. Tetrahidrobiopterin

(BH₄) ve O₂ triptofan hidroksilaz enzimi tarafından kofaktör olarak, B6 vitamini de reaksiyonda koenzim olarak kullanılır [292, 293]. 5- Hidroksitriptofan L-aromatik aminoasit dekarboksilaz (=dopa dekarboksilaz) ile karboksil grubunu kaybederek, kan-beyin bariyerini geçemeyen bir nörotransmitter olan 5-hidroksitriptamin'e (serotonin) dönüştürülür. Serotonin de N-asetiltransferaz (NAT) ile asetillenip, N-asetilserotonin'e ve son olarak N-asetilserotonin, hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonin'e dönüştürülmektedir [294-296].

Sentez yolu arilalkilamin N-asetil-transferazı (AA-NAT) kapsayan, sempatik sinir sisteminden, suprakiazmatik nukleusa gelen adrenerjik girdi ile düzenlenir (Şekil 2.18). Işık retinaya düştüğü zaman suprakiazmatik çekirdekten pineal beze giden sempatik yollar etkinleşir ve AA-NAT baskılanır ve sonuç olarak melatonin sentez ve salgısı azalır ve karanlığa kadar eski düzeyine ulaşamaz. Işıkla birlikte olan engellenme, karanlıkta ortadan kalkar ve melanositlerin melatonin salgılaması tekrar artar. En etkin saat 23:00–05:00 arasında melatonin salgılanması en yüksek noktaya ulaşır ve kandaki konsantrasyon düzeyi 3-10 kat artar [297]. Melatonin salınımının spesifik bir sirkadiyen ritmi bulunmaktadır. Akşam 21.00-22.00 saatlerinde artmaya başlar, 02.00-04.00 saatlerinde en üst seviyeye ulaşır. Sabah 05.00-07.00'de azalmaya başlar ve 07.00'den sonra bazal seviyelere düşer. Melatoninin kan konsantrasyonu gündüz saatlerinde yaklaşık 0-20 pg/dl düzeylerinde iken, gece saatlerinde 0-200 pg/dl düzeylerine yükselir. Gece boyunca ortalama 30 mg melatonin sentezlenir [285, 297-300].



Şekil 2.18. Melatonin sentezi [301]

2.8.2. Melatonin taşınımı, metabolitleri ve reseptörleri

Melatonin düzeyinin yaklaşık %60-70'i kanda albumine bağlı olarak dolaşır ve yarı ömrü 3 ila 45 dakika arasında değişir [302]. Melatonin, primer olarak karaciğerde metabolize edilir ve idrardaki başlıca metaboliti 6-hidroksimelatonin sülfattır. Melatonin metabolitlerinin %50-80'i sülfat ve %5-30'u glukuronid konjugantları şeklinde idrar yoluyla atılmaktadır. Melatoninin değişmeden atılan bölümü ise, yaklaşık olarak % 1'lik kısımdır [298, 303, 304].

Melatoninle ilgili olarak pineal bezden melatonin hormonunun sirkadiyen salınımı ile ilişkili olan, G-protein bağlı, MT1 ve MT2 olmak üzere iki farklı reseptör tanımlanmıştır. MT1 reseptörleri hipofizin pars tuberalis bölümünde ve hipotalamusun suprakiazmatik nukleusunda bulunurken, MT2 reseptörü ise retinada yer almaktadır. Ayrıca MT1 ve MT2 reseptörlerinin serebellumda, retinal yollarda ve ganglion hücrelerinde de bulunduğu bildirilmiştir [305, 306].

2.8.3.Melatoninin etkileri

Melatonin, uyku ve sirkadiyen ritim

Uyku ile ilişkili olarak, ışık ve karanlığa olan etkin kalmanın melatoninin uyku üzerindeki etkilerine yönelik çalışmaları artırmıştır.

Işığa etkin kalma retinadan hipotalamik alana kadar olan yolak üzerinden, suprakiazmatik nükleusun tüm vücut üzerinde etkin olan uyku veya uyanıklılık hissini de kontrol eden sinyalleri düzenleyen, bir saat gibi fonksiyon görmesine yol açar. Karanlık saatlere kadar pineal bezin inaktif olması ile, uyku ile ilişkili melatonin benzeri hormonların salınımı baskılanır [298, 302]. Karanlıkla beraber melatonin salınımı inhibe eden sinyaller ortadan kalkarak pineal bez uyarılır ve melatonin üretimi başlar. Melatonin konsantrasyonunun artmasıyla daha az uyarı algılanır ve uyku hissi artar. Yapılan birçok çalışmada melatonin haplarının uykuya dalma, uyku süresi ve kalitesinin üzerinde yardımcı etkileri olduğu gösterilmiştir [307-309].

Melatonin “jet lag” (=eş zamanlama bozukluğu) olarak da isimlendirilen biyolojik saatin korunması ve ritminin düzenlenmesinde ayrı bir öneme sahiptir. Yeterli miktarda veya düzensiz şekilde salgılanması sonucu oluşan jet lag durumunda yorgunluk hissi, uykusuzluk, iştahsızlık, psikolojik problemler, zaman algılanmasında problem ve terleme gibi durumlar söz konusu olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda melatoninin jet lag’ın üzerinde tedavi edici özelliği üzerinde durulmaktadır [310].

Melatonin ve termoregülasyon

Melatonin, merkezi vücut ısını azaltarak ve periferik cilt ısını artırarak termoregülasyonda önemli bir role sahiptir [302]. Isının düzenlenmesi hipotalamusun ön bölümündeki preoptik alanda gerçekleşir ve burada lokalize nöronların melatonin reseptörleri içermesinden dolayı melatoninin hormonunun termoregülasyon ile olan ilişkisi güçlenmiştir [302, 311].

Yaşlanma ve melatonin

Yaş ile ilişkili olarak melatonin salgılanması kişilere göre farklılık göstermektedir. Çocuklarda, yetişkinlere oranla daha yüksek miktarda melatonin salgılanır ve ilerleyen yaşla birlikte bu oran azalır [299, 312]. Doğumdan sonraki 6 ve 8. haftalar arasında melatonin düzeyleri belirgin miktarda artar [313]. Gençlik döneminde yetişkin düzeylerine ulaşır ve 35-40 yıl kadar bu düzeyler sabit kalır ve ileri yıllarda melatonin düzeyleri yavaşça düşmeye başlar. Artan yaşla birlikte pineal bezin ritminin bozulmasından dolayı sentezlenmesi azalır. Fakat melatonin düzeyleri geceleri artmasını sürdürür [312, 314, 315].

Yaşlanma ile pinealosit membranı üzerinde yer alan β -adrenerjik reseptör sayısındaki azalmanın, pineal bezdeki melatonin sentezinin azalmasına neden olduğu düşünülmektedir. Yaşlılıkla birlikte gözlenen, çoğu nörodejeneratif bozukluklarda serbest radikal hasar artışının, melatonin uygulaması ile azaldığı gösterilmiştir. Yaşlanma sürecinde, geceleri melatonin düzeylerinin kademeli olarak azalması, bu dejenerasyonun göstergesidir [316].

Melatonin ve apoptoz

Melatonin ve apoptoz arasındaki ilişki; immün hücrelerdeki apoptozu indükleyici fonksiyonu, nöronal apoptozu önleme ve kanser hücrelerindeki apoptozu artırmadaki rolü olmak üzere farklı şekillerde ele alınmaktadır. Melatoninin apoptoz üzerinde modülatör etkisi olduğu düşünülmektedir [317].

Kanser ve Melatonin

Melatoninin, kemoterapotik ajanlara benzer etki göstererek, mitotik aktiviteyi engelleyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu durdurduğu belirtilmiştir [298]. Yapılan çalışmalar, melatoninin meme kanseri hücrelerinde hem sitostatik hem de sitotoksik özellik gösterdiği yönündedir. Aynı zamanda p38 MAPK yolağı gibi birçok yolağı inhibe ederek antimetastatik ve antiinvazif özelliğe sahip olduğu ve epitel-mezenkimal geçişi baskıladığı gösterilmiştir [318].

Melatonin ve immün sistem

Yapılan araştırmalarda, melatoninin immün sistemde immünomodülatör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Dalak hücrelerinde melatonin reseptörleri gösterilmiş, MT2 reseptörleri aracılığıyla ekzojen melatonin uygulamasının dalak hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı ifade edilmiştir [305, 319, 320, 321]. Yardımcı T hücre aktivitesi ve endojen opioidlerinde de artışa neden olduğu belirtilmiştir [322]. Strese bağlı immün baskılanmayı ya da immün yetersizlikleri önleyebilen IL-2, IL-6, IFN- γ , IL-1 ve IL-12 gibi sitokinlerin monositlerinden salınımı yine melatonin uygulaması ile artmaktadır. [323, 324].

Melatonin ve psikiyatrik hastalıklar

Melatonin hormonunun psikiyatri ile ilgili birçok hastalıkla ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. Depresyonda olan kişilerde ve bipolar bozukluğu olan hastalarda, melatonin düzeyinin genel anlamda düşme eğiliminde olduğu saptanmıştır [325-327]. Ayrıca şizofreni hastalarında yapılan çalışmalarda sirkadiyen ritimde bozukluğa ve düşük serum melatonin düzeyine rastlanmıştır [328].

Melatoninin antioksidan etkisi

Melatoninin, yapılan çeşitli çalışmalarda çok önemli bir antioksidan olduğu gösterilmiştir. Özellikle kan- beyin bariyerini geçebilmesi antioksidan özelliğini artırmaktadır [329]. İleri yaşla birlikte, toksik maddelere maruziyet ve stres artışıyla meydana gelen serbest radikal oluşumunu engelleyen antioksidan özelliğinin azalması, yaşlanma sonucu ortaya çıkan melatonin azalışı ile paralellik göstermektedir [329]. Melatoninin koruyucu özelliği; antioksidan enzimleri aktive etmesinden veya pro-oksidatif enzimlerin inhibisyonunu gerçekleştirmesinden kaynaklanır [330]. Melatoninin indol nukleusunun yan zincirinde metoksi ve asetil grupları yer alır ve bu nedenle oksidatif stresin oluşturduğu reaktif oksijen türlerinden radikallerden hidroksil (OH) radikali nötrale edilerek ortadan kaldırılır.

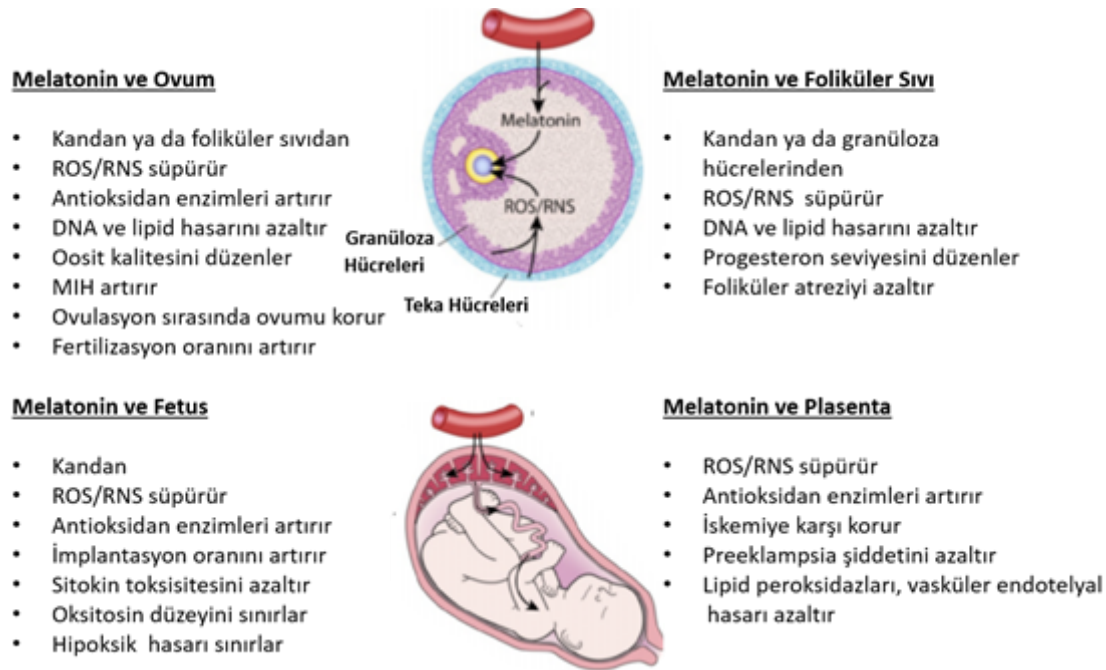
Ayrıca hücre içi H₂O₂ konsantrasyonunun azalmasında melatoninin rolü bulunmaktadır [331, 332].

Melatonin, pro-oksidatif aktivitesi olmayan ve kolayca oksitlenmeyen bir molekül oluşunun yanı sıra, redoks döngüsüne ve radikal üreten reaksiyonlara girmemesi ve OH radikalini nötralize etme yeteneğinin glutatyondan 5 kat, peroksit radikal giderme özelliğinin ise E vitamininden 2 kat daha fazla oluşu, DNA' yı oksidatif hasardan korur ve tümör oluşumunu baskılar [333].

Melatoninin antioksidan enzimleri uyardığı, lipid peroksidasyonunu engellediği ve beyin dokusunu oksijen kaynaklı serbest radikallerinden koruduğu saptanmıştır [300].

Melatonin ve üreme sistemi

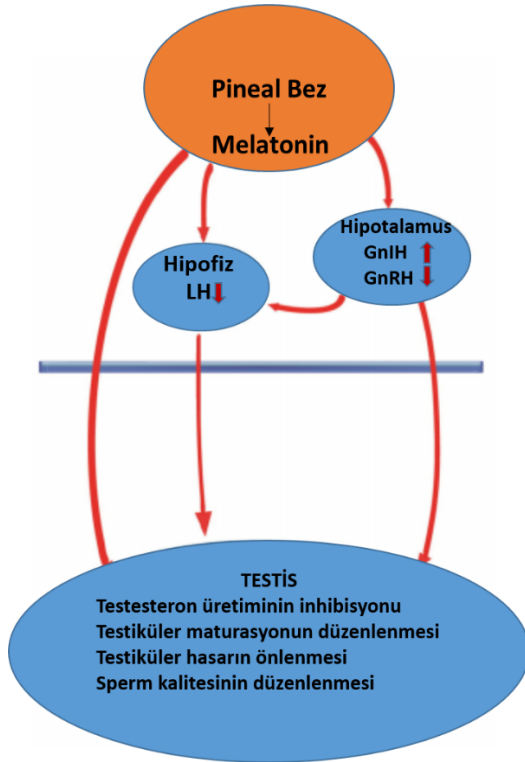
Son yıllarda yapılan çalışmalarda pineal bez ve pineal bezden salgılanan önemli hormonlardan biri olan melatoninin üreme sistemi üzerindeki düzenleyici etkisi oldukça önem kazanmaktadır. Dişi ratlarda melatoninin uygulamasının ovaryum gelişimini inhibe ettiği ve puberteyi geciktirdiği, erkek ratlarda eksojen melatonin uygulamasının ise testis boyutunu azalttığı gösterilmiştir (Şekil 2.19) [334-336].



Şekil 2.19. Melatonin ve dişi üreme sistemi [26]

Melatonin erkek üreme sistemini üç temel yolla etkilemektedir (Şekil 2.20). İlk yol, anahtar iki nörohormon olan GnRH ve LH sekresyonunu düzenleme ile. İkinci

mekanizma, testosteron sentezinin ve testikular maturasyonun melatonin tarafından düzenlenmesidir. Üçüncüsü ise, çevresel toksinlerin ve inflamasyonun neden olduğu testikular hasarı önleyen, hem lipofilik hem de hidrofilik özelliğinden dolayı melatoninin güçlü bir serbest radikal süpürücü olmasıdır. Literatürde melatoninin sperm kalitesini artıran gonadotropin ve testosteron sekresyonunu etkilediği yönünde bilgiler mevcuttur [29].



Şekil 2.20. Erkek Üreme Sisteminde Melatoninin Düzenleyici Rolü [29]

Melatonin ve metabolik sendrom

Metabolik sendrom; obezite, insülin direnci, hipertansiyon, dislipidemi ve diyabet ile karakterizedir. Metabolik sendromun patofizyolojik mekanizması ile ilişkili birçok biyokimyasal ve fizyolojik düzenleyici mevcuttur. Metabolik sendromlu hastalarda aterojenik dislipidemi adı verilen HDL düşüklüğü ve LDL yüksekliğinin görüldüğü lipid profili ortaya çıkmaktadır ve melatoninin anti-hiperlipidemik özelliği bu durumu iyileştirmektedir. Yapılan deneysel hayvan çalışmalarda melatoninin yağlanmayı ve vücut ağırlığını azalttığı aynı zamanda obezitenin indüklediği metabolik değişiklikler üzerinde antioksidatif etkileri olduğu gösterilmiştir [331].

Pankreatik beta hücrelerinde yer alan MT1 ve MT2 melatonin reseptörleri aracılığıyla insülin salınımı inhibe edilir. Yüksek yağ ve yüksek sukroz diyeti ile beslenen hayvanlarda da melatoninin insülin duyarlılığını ve glukoz toleransını artırdığı belirtilmiştir.

Melatoninin metabolik sendromlu hastaların tedavisinde güçlü bir antioksidan olarak kullanılabileceğine dair umut veren çalışmalar halen devam etmektedir [337].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneysel Yöntem

Deneysel çalışma, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' nun G.Ü.ET-15.030 kod numaralı onayı ile gerçekleştirilmiştir. Litaratüre uygun olarak, fruktoz ve bisfenol A 'nın eş zamanlı uygulanması ile duktus epididimis ve sperm morfolojisinde oluşacak olası hasara melatoninin etkisi araştırmak amacıyla Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden (GÜDAM), yetişkin 42 adet Sprague- Dawley türü, ağırlıkları 150-200 gr arasında değişen, erkek sıçan temin edilmiştir. Deney süresince laboratuvar sıcaklığı ortalama 22 °C, nisbi nem %50 olarak ayarlanmış, sıçanlar için özel kafesler kullanılmıştır. Kafeslere düzenli olarak bakım yapılmıştır. Deneklere 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık dönemlerde serbest içme suyu ve standart yem sağlanmıştır.

Deney hayvanları her biri altı sıçan içeren yedi farklı gruba ayrılmıştır.

Grup 1: (n=6) Kontrol Grubu

Grup 2: (n=6) Fruktoz Grubu

Grup 3: (n=6) BPA Grubu

Grup 4: (n=6) Fruktoz+BPA Grubu

Grup 5: (n=6) Fruktoz+Melatonin Grubu

Grup 6: (n=6) BPA+Melatonin Grubu

Grup 7: (n=6) Fruktoz+ BPA+Melatonin Grubu

Grupların oluşturulması

Grup 1: (n=6) Kontrol grubu

Birinci günden itibaren 8 hafta (60 gün) boyunca 25 mg/kg vücut ağırlığı dozda susam yağı ve 20 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozda %0,1'lik etanol çözeltisi gavaj yolu ile uygulanacaktır.

Grup 2: (n=6) Fruktoz grubu

Birinci günden itibaren 8 hafta (60 gün) boyunca içme sularına %10' luk D-Fruktoz çözeltisi eklenerek ad-libitium olarak beslenecektir.

Grup 3: (n=6) BPA grubu

Birinci günden itibaren 8 hafta (60 gün) boyunca 25 mg/kg vücut ağırlığı dozda BPA susam yağında çözüldükten sonra gavaj ile uygulanacaktır.

Grup 4: (n=6) Fruktoz + BPA grubu

Birinci günden itibaren 8 hafta (60 gün) boyunca içme sularına % 10' luk D-Fruktoz çözeltisi eklenecek ve 25 mg/kg vücut ağırlığı dozda BPA susam yağında çözüldükten sonra gavaj ile uygulanacaktır.

Grup 5: (n=6) Fruktoz + melatonin grubu

Birinci günden itibaren 8 hafta (60 gün) boyunca içme sularına % 10' luk D-Fruktoz çözeltisi eklenecek ve gavajla 20 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozunda melatonin melatonin %0,1'lik etanol çözeltisinde çözüldükten uygulanacaktır.

Grup 6: (n=6) BPA + melatonin grubu

Birinci günden itibaren 8 hafta (60 gün) boyunca 25 mg/kg vücut ağırlığı dozda BPA susam yağında çözüldükten sonra gavaj ile uygulanacak ve 20 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozunda melatonin % 0,1'lik etanol çözeltisinde çözüldükten yine gavajla uygulanacaktır.

Grup 7: (n=6) Fruktoz +BPA+melatonin grubu

Birinci günden itibaren 8 hafta (60 gün) boyunca içme sularına % 10' luk D-Fruktoz çözeltisi eklenecek, 25 mg/kg vücut ağırlığı dozda BPA susam yağında çözüldükten sonra ve 20 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozunda melatonin % 0,1' lik etanol çözeltisinde çözüldükten yine gavajla uygulanacaktır.

Deney sırasında kullanılan, Bisphenol A (BPA) $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Lot: MKBH2096V, St. Louis ABD) 0,5 ml susam yağında; 20 mg/kg/gün vücut ağırlığı doz Melatonin powder (TLC) $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Lot: SLBC 7539V, St. Louis ABD) % 0,1' lik etanolde çözüldü. Melatonin, sirkadiyen ritim dikkate alınarak her gün saat 16.00'da, BPA ile eş zamanlı olarak uygulandı. % 10'luk D-Fruktoz $\geq 99\%$ (Merck, Lot: 1.04007.1000, Darmstadt, Almanya ve DaeJung, Lot: F0043ME, Korea) içme sularına eklenerek uygulandı. Sekiz hafta süren deney boyunca, bütün gruptaki ratların iki haftada bir kez ağırlıkları ve vücut kitle indeksini hesaplamak amacıyla burun ucundan anüse kadar olan mesafe ölçülerek boyları belirlendi.

3.2. Işık Mikroskopik Yöntemler

3.2.1. Doku takibi ve gömme

- Doku örnekleri, ışık mikroskopik inceleme için % 10' luk nötral formaldehit solüsyonunda 72 saat tespit edildi.
- Doku örnekleri, tespit işleminin ardından 24 saat akarsuda yıkandı.
- Dokular fazla suyun uzaklaştırılması için artan derecelerde etil alkol serilerinden (% 70, % 80, % 90, % 96, % 100) geçirildiler.
- Dokular bunu izleyerek ksilolde şeffaflandırılıp, parafine gömüldüler.

3.2.2. Kesit alma

- Işık mikroskopik incelemeler için parafin bloklardan mikrotom ile (Leica SM 2000, Germany) 4µm kalınlığında kesitler alınarak, 37 °C su banyosunda kesitlerin açılması sağlandı.

- Rodajlı ve polilizinli lamalar üzerine kesitler alınarak kuruma işleminden sonra ksilolle parafinden uzaklaştırma işlemi gerçekleştirildi ve preparatlar uygun histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamalar için hazır hale getirildi.

3.2.3. Hematoksilen-Eozin (HE) boyama yöntemi

- Deney gruplarına ait duktus epididimis bloklarından 4 µm kalınlığında kesitler alındı.
- Lamlara alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için, 37 °C'lik etüvde bir gece kaldıktan sonra deparafinizasyonun devamında etüv ısısı 57 °C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi.
- Deparafinizasyon işlemini tamamlamak için kesitler 3 kez 20'ser dakika ksilolde bırakıldı.
- Rehidratasyon için sırasıyla % 100, % 90, % 80, % 70 ve % 50 etil alkol serilerinde 10'ar dakika tutuldu.
- Kesitler havada kurutularak 10 dakika akan musluk suyu ile yıkanarak alkol uzaklaştırıldı.
- 10 dakika Harris hematoksilen boya solüsyonunda tutuldu. Daha sonra akan musluk suyu altında 10 dakika yıkandı.
- Kesitler glasiyel asetik asit ile alkol karışımı olan solüsyona 2-3 kez batırılıp çıkarılarak akan musluk suyu altında 10 dakika yıkandı.
- 10 dakika Eosin boya solüsyonunda tutuldu. Sonra 10 dakika akan musluk suyu ile yıkandıktan sonra dehidratasyon işlemi için sırasıyla % 50, % 70, % 80, % 90 ve % 100 'lük artan etil alkol serilerinden hızlıca geçirilerek 45 dakika ksilolde bekletildi ve lamalar entellan ile kapatıldı.
- Hazırlanan kesitlerden Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda elde edilen görüntüler, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi.

3.2.4. Masson's Trikrom üçlü boyama yöntemi

- Deney gruplarına ait duktus epididimis bloklarından alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler deparafinizasyon işlemi için, 37 °C'lik etüvde bir gece kaldıktan sonra deparafinizasyonun devamında etüv ısısı 57 °C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi.
- Daha sonra kesitler, 2 kez 5' er dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları sonlandırıldı.

- 2 kez 3 dakika % 100'lük etil alkolden geçirildikten sonra sırasıyla % 90, % 80, % 70 ve % 50 azalan etil alkol serilerinden geçirildi.
- Kesitler, akan musluk suyunda yıkanarak boyamaya hazır hale getirildi. Kesitlere Atom Scientific BIOSTAIN Masson Trichrome Stain Kit – Methly Blue (Code : RRSK20-100) kiti uygulandı.
- Haematoxylin Weigert's A ve Haematoxylin Weigert's B solüsyonları eşit miktarda karıştırılarak Weigert Hematoksilen hazırlandı. Kesitler sudan geçirildi.
- Weigert' s Demirli Hematoksilen ile 20 dk çekirdek boyaması yapıldı.
- Kesitler, % 1'lik asit alkol solüsyonu içeren suda yıkandı.
- Ponceau Fuchsin solüsyonunda 5 dk boyama yapıldı ve deiyonize suda yıkandı. Kesitler % 1' lik Fosfotungustik asit solüsyonu ile 10 dk mordantlaştırıldı.
- % 2,5' lik asetik asit - % 2' lik Metil Blue Solüsyonu ile 5 dk boyandı ve suda yıkandı.
- Alkol serilerinden geçirilerek ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.
- Sonuç olarak nukleuslar mavi-siyah; sitoplazma ve kas kırmızı; kollajenler maviye boyandı.

3.2.5. Retiküler lifler için gümüş impregnasyon boyama yöntemi

- Deney gruplarına ait duktus epididimis bloklarından alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler deparafinizasyon işlemi için, 37°C'lik etüvde bir gece kaldıktan sonra deparafinizasyonun devamında etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi.
- Daha sonra kesitler 2 kez 5' er dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları sonlandırıldı. İki kez 3 dakika % 100'lük etil alkolden geçirildikten sonra sırasıyla % 90, % 80, % 70 ve % 50 azalan etil alkol serilerinden geçirildi.
- Kesitler daha sonra distile suda yıkanarak boyamaya hazır hale getirildi.
- Kesitlere Bio- Optica Silver Impregnation for reticulum (Code: W01030799) kiti uygulandı.
- Potasyum permanganat ile asit aktivasyon tampon solüsyonları karıştırılarak kesitler 5 dakika bekletildi.
- Distile su ile yıkama yapıldıktan sonra 3 dk oksalik asit solüsyonu uygulandı.
- İki kez distile su ile yıkandıktan sonra kesitler, 3 dk ferrik amonyum sülfat solüsyonuna etkin bırakıldı.

- Tekrar distile su ile yıkama yapıldı ve amonyaklı gümüş solüsyonu ile 3 dk muamele edildi.
- Distile su ile solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra kesitler nötral formalin solüsyonuna alındı ve 5 dk bekletildi.
- Distile sudan sonra sodyum hiposülfid fiksativ ile 5 dk muamele edildi.
- Kesitler akan musluk suyunda 5dk yıkandıktan sonra alkol serileri ile dehidrasyon işlemi gerçekleştirildi. Ksilolden sonra kapama mediumu ile kapatıldı.

3.2.6. İmmünohistokimyasal analizler

- İmmünohistokimyasal boyamalar için epididimis bloklarından polilizinli lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı.
- Kesitler, 37 °C’ deki etüvde bir gece bırakılarak, daha sonra deparafinizasyonu hızlandırmak için ısı 57 °C’ ye çıkarılan etüvde 1 saat bekletildi.
- Deparafinizasyonu sonlandırmak için 2 kez 20’şer dakika ksilolde bırakıldı. Ardından 10’ar dakika olmak üzere sırasıyla % 100, % 96, % 90, % 80 ve % 70’lik olmak üzere artan alkol serilerinden geçirildi.
- Dehidrate edilen dokular alkolden uzaklaştırılmak için 2 kez 5’er dakika distile sudan geçirildi.
- Daha sonra, dokulara sitrat tamponu (pH 6,0) (Cat: AP-9003-500, Lot: 9003LT13610, Lab Vision, Fremont, USA) ile mikrodalga fırında retrieval işlemi uygulandı. Mikrodalgada retrieval işleminden sonra kesitler dışarıda 20 dakika soğumaya bırakıldı.
- Dokular sitrattan arındırılmak için 2 kez 5’er dakika distile sudan geçirildi.
- Dokuların çevresi PAP-pen ile çevrilerek nemli ortam olmasına dikkat edilen immünohistokimya barına dizildi.
- Dokular 3 kez 3’er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (Ph:7,4) ile yıkandı. Daha sonra, 15 dakika %3’lük hidrojen peroksit (Cat: AP-9003-500, Lot: 9003LT13610, Lab Vision, Fremont, USA) ile etkin bırakıldı. İşlem sonrasında PBS ile lamlar yıkandı.
- Yıkanan lamlara 5 dakika UltraV block (Lot: PHL150128, Lab Vision, Thermo Scientific) uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemten sonra dokular yıkanmadan primer antikör aşamasına geçildi.
- Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, 1/100 oranında hazırlanan Occludin (Bioss, bs-1495R), Claudin-1 (SantaCruz, sc-166338), ZO-1 (Bioss, bs-1329R)

primer antikörlerine etkin bırakıldı ve primer antikör uygulanan kesitler +4 derecede 1 gece inkübe edildi.

- Primer antikörden sonra lamalar 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı.
- Yıkamanın ardından 10 dakika biotinli sekonder antikör (Cat:TP-125-BN, Lot:PBN100121, Lab Vision, Thermo Scientific) uygulandı.
- Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra dokular 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim (Cat: TS-125-HR, Lot:SHR100406, Lab Vision, Thermo Scientific) kompleksine etkin bırakıldı. İşlem sonrasında dokular yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı.
- Diaminobenzedin içeren (DAB) substratı (Cat: DABS-125, Lot: 90824B, Spring Bioscience) içeren kromojen DAB (Cat: DABC-004, Lot: HD25395, Spring Bioscience) eklenerek yaklaşık 5-10 dakika bekletildi ve gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı.
- Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksilin'i kullanıldı.
- DAB ile boyanan lamalar azalan alkol serilerinden geçirildi. 20 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatılan kesitler bilgisayar destekli DM 4000 Leica Germany görüntülü analiz sisteminde incelenerek değerlendirildi.

3.3. Sperm Morfolojisi ve Viabilitesi Değerlendirme Yöntemleri

Fruktoz ve BPA'nın eş zamanlı uygulanması ile sperm morfolojisinde oluşacak değişimleri ve melatoninin bu sürece etkilerini gözlemleyebilmek için tüm deneklerden elde edilen epididimal spermler Makler Counting Chamber ile mikroskop altında Kruger Strict kriterlerine göre değerlendirilerek sayımı yapılmış, motilite analizleri yapılmıştır.

3.3.1. Sperm eldesi

- 8 haftalık (60 gün) deney süreci sonunda deneklerden sol kauda epididimis yağ dokudan ayrılarak diseke edildi.
- Alınan örnekler Washing/ Insemination medium (SİL-Select Plus TM Fertil-Pro NV LOT: FP15FL05) sperm yıkama solüsyonuna alınarak kauda epididimisten steril 0.5 mL insülin enjektör iğne ucu yardımı ile sperm eldesi sağlandı.
- Spermler, 1 saat 37 °C' de inkübe edildi.
- Sonrasında sperm sayımı ve motilitesi için Makler Counting Chamber ile değerlendirildi ve mikroskop altında sayım yapıldı.

- Sperm morfolojisi ve viabilitesi için Rapi-Diff II ve Eosin- Nigrosin boyama yöntemleri uygulandı.

3.3.2. Sperm RAPI-DIFF II boyama yöntemi

- Preparatlar hazırlanarak kurumaya bırakıldı. A Solüsyonu; Methanol - Thiazine boyasında (Code:RRSP133-D) 5 sn boyandı.
- Durulama veya kurulama olmadan, B Solüsyonu olan Fosfat tamponu-Eosin Y' de (Code: RRSP1134-D) 5 saniye süre daldırma-çıkarma yapıldı.
- Fazla boya kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı.
- C solüsyonu Fosfat tamponu-Polychromed Methylene Mavisine (Code: RRSP135-D) 5 sn süre ile daldırma-çıkarma yapıldı.
- Fosfat tampon çözeltisi (pH 6,8) ile durulandı ve kuruduktan sonra mikroskop altında incelemeye alındı.

3.3.3. Sperm Eosin- Nigrosin (viabilite) boyama yöntemi

- Sperm viabilitesi VitalScreen™ (FertiPro) (LOT: FP14VI06) kiti kullanılarak değerlendirildi.
- 50 µL sperm örneği steril test tüpünde 2 damla ajan 1- % 1 Eosin Y ile karıştırıldı. 30 sn sonunda, ajan 2- % 5 Nigrosin' den 30 damla eklendi ve 30 sn karıştırıldı. Sperm-boya karışımından bir damla alındı ve lama yayıldı. Kurumadan mikroskop altında inceleme yapıldı.
- Sonuç olarak renksiz spermatozoalar canlı, kırmızı boyanan spermatozoalar cansız olarak değerlendirildi. Her gruptan 200 sperm hücresi sayıldı. % 58 ve fazlası canlı sperm oranı normal olarak kabul edildi.

3.4. Duktus epididimis ve Sperm Hücrelerinin Apoptozis Düzeyinin Annexin V-FITC ve Propidium Iodide (PI) ile Belirlenmesi

Epididimis ve sperm hücreleri için apoptotik hücre yüzdeleri Annexin V-FITC ve Propidium Iodide (PI) boyaması yapılarak analiz edildi. FITC etiketlemesi direk olarak akım sitometride çalışılabilmesine olanak vermektedir. Hücreler, 195 µl'lik hücre süspansiyonunun içersine 2,5 µl Annexin V-FITC (eBioscience, BMS500FI) eklenmiştir. Hücreler bu şekilde dikkatlice vortekslenmiş ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Hücreler tekrar yıkanmış ve 190 µl'lik bağlayıcı tampon içersine alınmışlardır. Akım sitometri analizlerinden hemen önce 5 µl PI bu süspansiyona ilave edilmiştir. Örnekler Cell Quest software (Becton-Dickinson, San Jose, CA) kullanılarak analiz edilmişlerdir. Annexin-V pozitif hücreler apoptotik sayılmıştır.

3.5. Üç Boyutlu Modelleme Yöntemi

Deney gruplarına ait epididimis ve sperm örneklerinin histolojik değerlendirilmesi sonucu elde edilen bulgular Cinema 4D Release 17 (Maxon computer, USA) adlı modelleme ve animasyon programı kullanılarak 3 boyutlu hale getirildi. Elde edilen görüntülerden HDRI ve global illumination ile 800x600 dpi şeklinde tiff formatında render'lar alınarak, elde edilen histolojik görüntüler üç boyutlu olarak görselleştirildi.

3.6. İstatistiksel Analizler

Tüm istatistiksel analiz ve hesaplamalar IBM SPSS 20 Windows İstatistik programı ile yapıldı. Elde edilen tüm sayısal verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile belirlenerek; $p < 0,05$ ise nonparametrik testler, $p > 0,05$ ise parametrik testler uygulandı ve gruplar arası karşılaştırmalar sağlandı. Normal dağılıma uygun değişkenlerde ortalama $\pm$ standart sapma değeri; normal dağılıma uygun olmayan değişkenlerde ise ortanca (çeyrekler arası genişlik) değerleri belirlendi. Gruplar arası çoklu karşılaştırmalar ise One-way ANOVA sonrası post hoc çoklu karşılaştırma testlerinden olan TUKEY HSD ve Bonferroni ile gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler sonucunda $p \leq 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

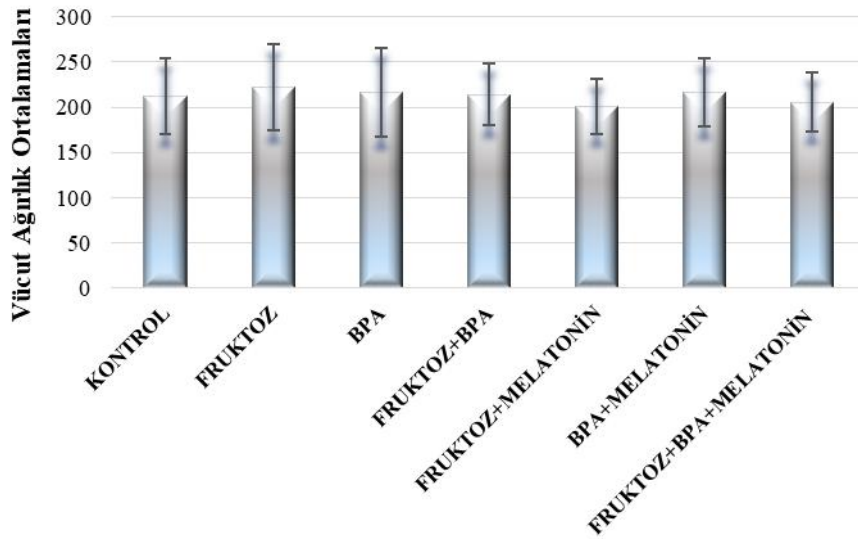
4.1.Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Sıçanların deney başlangıcından itibaren, deney sonuna kadar her hafta ağırlıkları ölçülerek, deney sürecindeki ağırlık değişimleri takip edildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak yorumlandı. İstatistiksel değerlendirme sonucu tüm gruplara ait ağırlık ortalamaları sırasıyla; $210,93 \pm 32,45$; $222,10 \pm 42,86$; $215,97 \pm 31,87$; $213,07 \pm 36,16$; $200,36 \pm 28,65$; $215,38 \pm 32,72$; $205,22 \pm 27,58$ olarak saptandı (Şekil 4.1).

Deney gruplarının belli periyodlarla ölçülen vücut ağırlıklarının zaman içerisindeki değişimlerini değerlendirmek amacıyla istatistiksel yöntem olarak (Shapiro-Wilk testine göre; $p=0,110$) Repeated Measure testi uygulandı. Tüm gruplara ait ardışık 7 ölçüm kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu grupların kendi içerisinde anlamlı bir kilo artışı olduğu belirlendi ($p=0,001$).

Bu artışı alt gruplar arasında birbiriyle karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak herhangi bir ilişki olmadığı görüldü ($p=0,408$).

Gruplar arasında ağırlık artışı değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmese de yapılan değerlendirme sonucu kontrol grubuna göre, fruktoz ve BPA'nın tek başına ve beraber uygulandıkları gruplarda kilo artışı gerçekleştirdiği, ancak melatonin uygulanan grupta ise kilo artışının dikkat çekmediği ve kontrol grubuna yaklaşık değerlerde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Deney gruplarına ait vücut ağırlıklarının ortalama $\pm$ SD grafiği

4.2. Vücut Kitle İndeksinin (VKİ) Değerlendirilmesi

Deney gruplarına ait sıçanların deney başlangıcından deney sonuna kadar, belli periyodlarla yapılan ağırlık ve boy ölçümleri göz önünde bulundurularak, VKİ değerleri hesaplandı.

Obezite tayini için kullanılan VKİ ölçümü aşağıdaki formülle belirlendi;

- $VKİ = \text{vücut ağırlığı (g)} / \text{boy uzunluğu}^2 (\text{cm}^2)$

Sağlıklı sıçanlar için $VKİ = 0.72 \text{ g/cm}^2$ iken obez sıçanlarda $VKİ$ değeri $VKİ \geq 1.00 \text{ g/cm}^2$ olarak kabul edildi.

İstatistiksel olarak yapılan analizlerde her deney grubuna ait hesaplanan VKİ değerlerinin ortanca (çeyrekler arası genişlik) değerleri sırasıyla; 0,70 (0,17); 0,80 (0,23); 0,75 (0,18); 0,78 (0,25); 0,65 (0,15); 0,70 (0,16); 0,70 (0,22) olarak belirlendi (Şekil 4.9).

Tüm gruplara ait ardışık 7 ölçüm kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu zaman içerisinde istatistiksel olarak anlamlı bir VKİ değerinde artışı olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$). Gruplar arası VKİ'ne ait farklılıkları istatistik olarak değerlendirmek için (Shapiro-Wilk testine göre; $p = 0,025$) Kruskal-Wallis testi uygulandı. Kruskal-Wallis

Testine göre gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=0,346$).

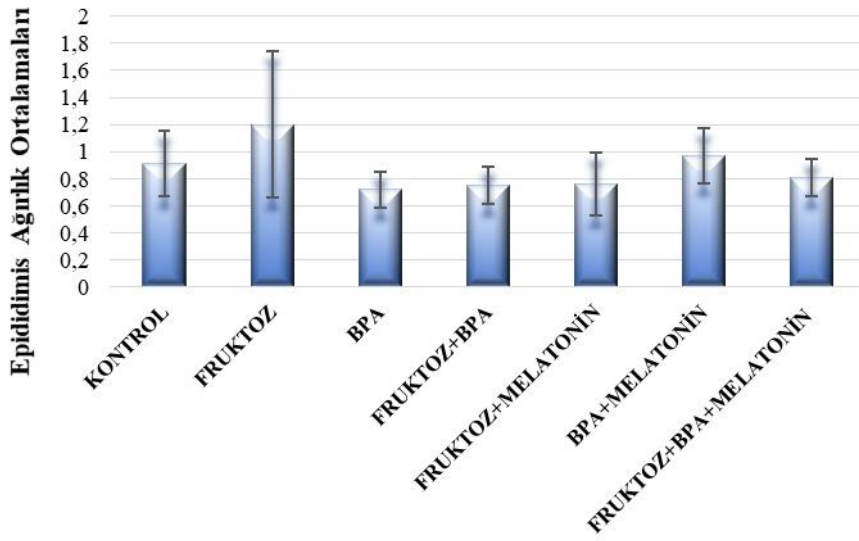
Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemesine rağmen veriler değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre VKİ artışını değerlendirildiğinde, Fruktoz ve BPA uygulamasının hem tek hem de birlikte uygulandığı gruplarda VKİ değerinde artışa neden olduğu, Fruktoz ve BPA uygulanmış gruplara melatonin uygulandığında VKİ artışının kontrol grubuna yaklaşık değerlerde olduğu gözlemlendi.

VKİ değerleri incelendiğinde kontrol grubu ve melatonin uygulanmış grupların sağlıklı durumda olduğu ve Fruktoz uygulanmış grupta daha belirgin olmak üzere fruktoz ve BPA'nın hem ayrı hem de birlikte uygulandığında ise deneklerin obeziteye doğru gittiği gözlemlenmiştir.

4.3. Duktus epididimis Ağırlığının Değerlendirilmesi

Deney sonunda tüm deney gruplarına ait sıçanların epididimis dokuları tartılarak elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmede her gruba ait epididimis dokusuna ait ağırlık ortanca (çeyrekler arası genişlik) değerleri sırasıyla; 0,81 (0,29); 1,40 (0,60); 0,66 (0,27) ; 0,70 (0,29) ; 0,75(0,54); 1,03 (0,20) ; 0,83 (0,15) olarak saptandı.

Deney grupları arasındaki duktus epididimis dokusuna ait ağırlık farklılıklarını istatistiksel olarak değerlendirmek için Shapiro- Wilk testine göre ($p<0,001$) Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizi kullanıldı. İkili karşılaştırmaları yapıldığında ise gruplar arası duktus epididimis ağırlık değerlerinde bir anlamlılık saptanmadı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Deney gruplarına ait epididimis ağırlıklarının ortalama±SD grafiği. Deney gruplarına ait duktus epididimis ağırlıklarının ortalama ve standart sapma değerlerinin grafiksel karşılaştırılması

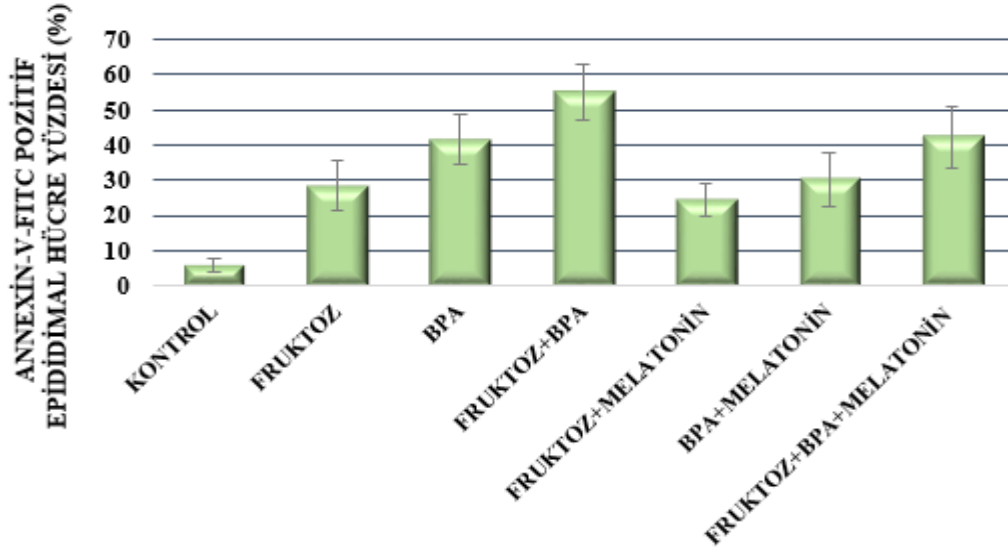
4.4. Duktus epididimis ve Spermde Annexin-V-FITC ve Propidium Iodide (PI) Boyaması Sonucu Apoptotik Hücre Bulguları

Tüm deney gruplarında uygulanan ajanların ve antioksidanın apoptoz üzerine etkilerini göstermek için duktus epididimis dokuları ve sperm hücreleri Annexin V-FITC/PI ile boyanıp akım sitometri yöntemi ile analiz edildiler. Duktus epididimis dokusuna ait veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde her bir gruba ait Annexin-V-FITC pozitif hücre yüzde ortalamaları sırasıyla; $6,04 \pm 1,85$; $28,48 \pm 7,09$; $41,64 \pm 7,18$; $55,10 \pm 7,92$; $24,54 \pm 4,75$; $30,26 \pm 7,67$; $42,32 \pm 8,68$ olarak saptandı (Şekil 4.3).

Gruplar arası duktus epididimis dokusuna ait apoptotik hücre yüzdesi farklılıkları One-Way ANOVA Tukey Posthoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; kontrol grubuna ait apoptotik hücre yüzdesinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu belirlendi (Tüm gruplar için, $p < 0,001$).

BPA uygulanan grup ile Fruktöz uygulanan grup arasında BPA uygulanan grupta apoptotik hücre yüzdesinin daha fazla olmasından kaynaklanan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görüldü ($p < 0,001$).

Fruktoz+BPA ve Fruktoz+BPA+Melatonin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında melatonin uygulamasının apoptotik hücre yüzdesini azaltmasına bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi ($p<0,037$).



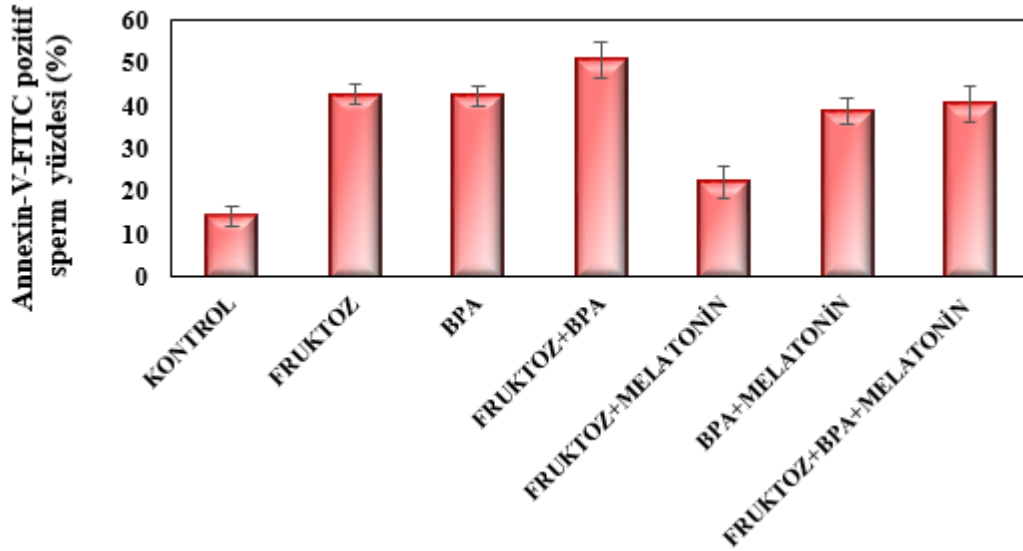
Şekil 4.3. Annexin-V-FITC pozitif epididimal hücre yüzdeleri ortalama $\pm$ SD grafiği

Tüm deney gruplarına ait sperm hücreleri Annexin V-FITC/PI ile boyanıp akım sitometri yöntemi ile analiz edildiler. Sperm hücrelerine ait veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde her bir gruba ait Annexin-V-FITC pozitif hücre yüzde ortalamaları ortanca (çeyrekler arası genişlik) değerleri sırasıyla; 14,15 (2,35); 42,57 (2,33); 42,20 (2,20); 50,68 (4,10); 22,18 (3,75); 38,70 (3,20) ve 40,32 (4,05) olarak saptandı.

Gruplar arası sperm hücrelerine ait apoptotik hücre yüzdesi farklılıklarını istatistiksel olarak değerlendirmek için Shapiro- Wilk testine göre ($p<0,001$) Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizi kullanıldı. Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi ile post-hoc ikili karşılaştırmaları yapıldığında; kontrol grubuna ait apoptotik hücre yüzdesinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu belirlendi ($p=0,004$).

Fruktoz ve BPA grupları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmese de ($p= 0,422$) BPA uygulanan gruptaki apoptotik sperm yüzdesinin daha fazla olduğu görülmüştür. Fruktoz ve fruktoz+Melatonin grupları karşılaştırıldığında ise melatonin uygulanan grupta apoptotik sperm yüzdesinin düşmesinden kaynaklanan

istatistiksel bir anlamlılık mevcuttur ($p= 0,004$). BPA ile BPA+Melatonin uygulanan grup ($p=0,006$) ve Fruktoz+BPA ile Fruktoz+BPA+Melatonin uygulanan grup karşılaştırıldığında ise ($p= 0,04$) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiş; bu farklılığın melatonin uygulamasının Annexin-V-FITC pozitif sperm yüzdesinde azalmaya sebep olmasından kaynaklandığı görülmüştür (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Annexin-V-FITC pozitif sperm hücre yüzdeleri ortalama $\pm$ SD grafiği

4.5. Işık Mikroskopik Bulgular

4.5.1. Hematoksilen-Eosin bulguları

Kontrol grubu

Kontrol grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun Hematoksilen-Eosin ile boyanmış enine kesitlerinde, küçük büyültmede, epididimis dokusuna ait kauda kısmında yer alan kanalların dairesel düzenlenim göstererek, histolojik olarak oval, normal karakteristik yapıda olduğu ve intraluminal sperm varlığı gözlemlendi. Intertubuler alanda, vaskülerize oluşumlar içeren intersitisiyel bağ dokusunun varlığı ayırt edildi (Resim 4.1). Aynı grubun büyük büyültmesinde, tüm kanal yapılarına ait epitel dokusunun stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel özelliğinde olduğu izlendi. Dokunun kauda bölümüne ait olması nedeni ile kanalları döşeyen epitel boyunun yüksek olmadığı dikkati çekti. Yalancı çok katlı epitel görünümünü yansıtan, epiteli oluşturan temel hücre hücre tipleri esas hücreler

ve bazal hücreler olarak gözlemlendi. Aralarda açık renk sitoplazmaları ile ayırt edilen şeffaf (berrak) hücreler izlendi. Çok sayıda esas hücrenin, alçak prizmatik görünümde hücre şekline uygun olarak çekirdek içerdiği ayırt edildi. Esas hücrelerin apikal yüzeylerinden lümene doğru uzanan uzun, yüzey farklılaşmaları olan stereosilyalar izlendi. Epitelde yer alan ve esas hücrelere arasında dağılım gösteren bazal hücreler ise, bazale yakın yerleşim gösteren nukleusları ve apikal yüzeye ulaşamayan, az miktarda sitoplazmaları ile ayırt edildi (Resim 4.1). Aynı büyültmede peritubular alanda, fusiform çekirdekleri ile ayırt edilen sirküler düzenlenimde düz kas lifleri saptandı (Resim 2). Aynı gruba ait bir diğer büyük büyültmede ise ductuslar arasındaki intersitisyel bağ dokusunda kollajen lif demetleri, demetler arasında fibroblast ve diğer bağ doku hücrelerine ait hücre çekirdekleri ile vaskülerize yapılar ayırt edildi (Resim 4.1).

Fruktoz grubu

Fruktoz grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun Hematoksilen-Eosin ile boyanmış enine kesitlerinde, küçük büyültmede, epididimis dokusuna ait kauda kısmına ait kanal yapıları ile bütünlüğü bozulmuş intertubuler bağ dokusu ayırt edildi. Kanalları çevreleyen sirküler kas dokusunda yer yer ayrılmalar olduğu dikkati çekti. Aynı grubun H&E ile boyanmış enine kesitinde büyük büyültmede kanalları döşeyen epitelde alçak prizmatik ya da prizmatik yapıda stereosilyalı hücreler ile çekirdekleri bazale yakın lokalize ve apikale ulaşamayan bazal hücreler izlendi. Bazı epididimal kanalları döşeyen epitele ait esas hücrelerin apikal yüzeylerindeki stereosilyaların boylarının yer yer azalarak kayba uğradığı dikkati çekti. Bazı şeffaf hücrelerde hiperplazi saptandı. İntraluminal sperm varlığının yanı sıra kanalları çevreleyen sirküler kas dokusunda yer yer bütünlük kaybı olduğu ayırt edildi. İntersitisyel bağ dokusunda ise az sayıda bağ doku hücre çekirdeği ile kollajen lifler izlendi, ancak intersitisyel bağ dokusunun kontrol grubuna göre karakteristik yapısının korunamadığı ve daha az sayıda vaskülerize oluşum içerdiği dikkati çekti (Resim 4.2).

BPA grubu

BPA grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun Hematoksilen-Eosin ile boyanmış enine kesitlerinde, küçük büyültmede, epididimal kanalların kontrol ve fruktoz grubuna göre oval şekillerini kaybederek daha kıvrıntılı hale geldiği, ductuslar arasındaki interstisyel bağ dokusu yapısının bozulmuş olduğu dikkati çekti (Resim 4.3).

Aynı grubun H&E ile boyanmış enine kesitinde büyük büyültmede, yalancı çok katlı stereosilyalı epiteli oluşturan prizmatik şekilli ve merkezi yerleşimli nukleusa sahip olan esas hücrelerin arasında çekirdek ve sitoplazma sınırları net olarak ayırt edilemeyen, yer yer kribriform görünüm alan hücrelerin varlığı saptandı. Esas hücrelerin apikal yüzeylerinde bulunan stereosilyaların boylarının kontrol ve fruktoz grubuna göre daha kısa ve küt hale geldiği, bazı alanlarda seyrekleştiği ve kayba uğradığı dikkati çekti. Bazı kanallarda luminal sperm yokluğu izlendi. İntraduktal olarak dejenere germ hücresi ve debris olduğu düşünülen oluşumlara rastlandı. Epididimal kanalları çevreleyen ince sirküler kas düz kas tabakasının yer yer düzensizleştiği ve ductuslar arasındaki interstisyel bağ dokusunda ileri derecede kayıp olduğu gözlemlendi (Resim 4.3).

Fruktoz + BPA grubu

Fruktoz + BPA grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun Hematoksilen-Eosin ile boyanmış enine kesitlerinde, küçük büyültmede, epididimal kanalların kontrol grubuna göre normal şekil ve yapılarını kaybetmiş oldukları dikkati çekti. Kontrol grubunda düzenli, oval şekilli olarak görülen kanalların kıvrıntılı hale geldiği, bazı kanallarda yer yer kanalı döşeyen epitel dokusunun incelendiği ve kayba uğradığı dikkati çekti. Bazı epididimal kanallarda sperm yoğunluğunda ileri derecede azalma olduğu görüldü. Kanallar arasındaki intersitisyel bağ dokuda bütünlük kaybı izlendi (Resim 4.4).

Aynı grubun H&E ile boyanmış enine kesitinde büyük büyültmede, bazı kanallarda epitel boyunun azaldığı ve epiteli oluşturan hücre yapılarının farklılık gösterdiği ve kribriform görünüm sergiledikleri dikkati çekti. Epiteli oluşturan esas hücrelerin apikallerinde stereosilyalarda seyrekleşme ve yer yer kayıp gözlemlendi. İntersitisyel bağ dokusunda ileri derecede kayıp saptandı. Periduktal sirküler düz kas tabakasında bazı alanlarda ayrılmalar olduğu ve epitel yapısı ile aralarında boşlukların oluştuğu izlendi (Resim 4.4).

Fruktoz +Melatonin grubu

Fruktoz +Melatonin grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun Hematoksilen-Eosin ile boyanmış enine kesitlerinde, küçük büyültmede, epididimal kanalların bazılarının normal oval yapılarını korurken, bazı kanalların kıvrıntılı yapılarını sürdürdükleri gözlemlendi. Peritubuler sirküler düz kas tabakasının epitel dokudan yer yer ayrıldığı, bazı kanallarda ise bütünlüğün korunduğu izlendi. Ekstratubuler alandaki intersitisiyel bağ dokusunun sadece fruktoz uygulanan gruba göre histolojik yapısını koruduğu gözlemlendi. Kontrol grubuna göre intraluminal sperm yoğunluğundaki azalma dikkati çekti. Aynı grubun H&E ile boyanmış enine kesitinde büyük büyültmede, epididimal kanalları döşeyen stereosilyalı yalancı çok katlı epitel oluşturan ve alçak prizmatik şekilleri, apikal yüzeylerinde stereosilya içermeleri ile karakterize esas hücreler ayırt edildi. Esas hücreler arasında dağılım gösteren ve apikal yüzeye ulaşamayan bazal hücreler gözlemlendi. Fruktoz grubunda izlenen, epitel hücreleri arasında rastlanan kribriiform özellikte olan hücre yoğunluğunun bu grupta azaldığı saptandı. Intraluminal sperm yoğunluğu bazı kanallarda normal durumda iken, bazı kanallarda yoğunluğun yer yer azaldığı gözlemlendi. Intraduktal alandaki interstisiyel bağ dokusunda, yalnızca fruktoz uygulanan gruba göre bağ doku kaybının azaldığı ve vaskülerize oluşumların yoğunluğunun artarak bütünlüğünü koruduğu dikkati çekti. Periduktal alandaki sirküler düz kas tabakasının yer yer karakteristik histolojik yapısını kaybettiği dikkati çekti (Resim 4.5).

BPA + Melatonin grubu

BPA + Melatonin grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun Hematoksilen-Eosin ile boyanmış enine kesitlerinde, küçük büyültmede, epididimal kanalların ve intersitisiyel bağ dokusunun yalnızca BPA uygulanan gruba kıyasla, histolojik yapısının korunmuş olduğu gözlemlendi. Bazı kanallardaki sperm yoğunluğundaki azalma bu bulgulara eşlik etmekteydi (Resim 4.6).

Aynı grubun H&E ile boyanmış enine kesitinde büyük büyültmede, epitel oluşturan temel hücreler olan esas hücrelerin çekirdek ve sitoplazma yapılarının normal özellikte olduğu ve apikal yüzey farklılaşmaları olan stereosilyaların yalnızca BPA uygulanan grupla karşılaştırıldığında daha düzenli seyrettiği, fakat halen kısa ve küt özellik gösterdiği ayırt edildi. Intraluminal sperm yoğunluğu değerlendirildiğinde ise, sadece BPA uygulanan gruba

göre artış gösterdiği dikkati çekti. Epitel hücre içeriğinde yer alan, esas ve bazal hücreler arasında yayılım gösteren ve kribriform yapıda olan diğer hücrelerin ise BPA uygulanan gruba göre azaldığı gözlemlendi. Kanalları çevreleyen sirküler düz kas dokusu fusiform özellikteki çekirdekleri belirgin olarak ayırt edilirken, düzenli görünüm sergiledikleri izlendi. İnterduktal kanallar alandaki intersitisiyal bağ dokunun yalnızca BPA uygulanan gruba göre bağ doku hücre çekirdekleri ve kollajen liflerin yoğunluğu ve düzenlenimi açısından daha normal yapıda olduğu ve vaskülarize oluşumlar içerdiği gözlemlendi (Resim 4.6).

Fruktoz + BPA + Melatonin grubu

Fruktoz + BPA + Melatonin grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun Hematoksilen-Eosin ile boyanmış enine kesitlerinde, küçük büyültmede, yalnızca BPA+fruktoz uygulanan epididimal kanalların daha oval ve yuvarlak görünümleri ile daha düzenli olduğu gözlemlendi. Ekstraduktal alandaki intersitisiyal bağ dokusunun yalnızca BPA+fruktoz uygulanan gruba göre düzenli yapılanmaya başladığı dikkati çekti. Yalnızca BPA+fruktoz uygulanan grupta bazı ductuslarda ileri derecede sperm kaybı mevcutken bu grupta intralüminal sperm yoğunluğunun daha homojen hala geldiği ancak bazı ductuslarda ise sperm yokluğunun mevcut olduğu fokal alanlar görüldü.

Aynı grubun H&E ile boyanmış enine kesitinde büyük büyültmede, ductusları döşeyen epitel hücre yüksekliğinin yalnızca BPA+fruktoz uygulanan gruba göre arttığı gözlemlendi. Epiteli oluşturan esas hücrelerin apikal kısımlarında bulunan stereosilya yapılarının kontrol grubuna göre yoğunluk ve yükseklik açısından normalden daha uzak bir yapılanma gösterdiği dikkati çekti. Bu yapılanmanın fruktoz ve BPA grubuna göre daha ileri düzeyde olduğu ayırt edildi. Esas ve bazal hücreler arasında dağılım gösteren kribriform özellikteki hücreler ayırt edildi. Periduktal sirküler düz kas tabakasının epitel dokusu ile arasında olan ayrılımların bu grupta gözlenmediği ve bütünlüğün sürdüğü dikkati çekti. İnterduktal alandaki intersitisiyal bağ dokusundaki kollajen yoğunluğunun ve çeşitli bağ doku hücre tiplerinin dağılımının BPA+fruktoz grubuna göre histolojik olarak daha iyi bir yapı gösterdiği ayırt edildi (Resim 4.7).

4.5.2. Masson' s Trichrome bulguları

Tüm gruplara uygulanan Masson's trichrome boyama yöntemi değerlendirildiğinde, hücre çekirdeklerinin mavi-siyah, sitoplazma ve kas dokusunun kırmızı, kollagen liflerinin ise Anilin blue boyasını alarak mavi renkte boyandıkları gözlemlendi.

Kontrol grupları ve diğer deney grupları incelendiğinde, anilin blue ile mavi renkte boyanan kollagen lifler ile mavi-siyah boyanan bağ doku hücre çekirdeklerinin, özellikle BPA uygulanan grupta intertubuler bağ dokusuna bağlı olarak daha az yoğunlukta olduğu dikkati çekti (Resim 4.8) .

Melatonin uygulanan gruplarda intertubuler bağ dokusunun yeniden yapılanmasına bağlı olarak kollagen lif ve bağ doku hücre çekirdeklerinin yoğunluğunda artış olduğu izlendi (Resim 4.9).

4.5.3. Gümüş impregnasyon bulguları

Tüm gruplarda retiküler liflerin ve retiküler lamina tabakasını içermesinden dolayı bazal membranın siyah renkte, bağ dokusu elemanlarının ise kahverengi boyanma özelliği gösterdiği dikkati çekti.

Uygulanan gümüş impregnasyon yöntemi değerlendirildiğinde, kontrol grubu ve diğer deney gruplarında, siyah olarak ayırt edilen; intertubuler alandaki bağ dokuda ve bazal membranın retiküler lamina katındaki retiküler liflerin dağılımı değişik yoğunluklarda gözlemlendi. Özellikle, BPA, BPA+Melatonin ve BPA+Fruktoz+Melatonin gruplarında bazal membranın içeriğindeki retiküler lif boyanmasının diğer gruplara göre daha yoğun olduğu izlendi. Fruktoz+BPA grubunda Hemaktoksilen –Eosin boyamasında da ayırt edildiği üzere, intertubuler alandaki kayıp gümüşleme tekniğinde de izlenmiş, retiküler lif yoğunluğundaki azalmanın bu bulgulara paralel olarak varlığı dikkati çekmiştir. Sonuç olarak duktus epididimis dokusunda retiküler liflerin, intertubuler bağ dokusu yapısı ile bazal membranın retiküler lamina katına ait olduğu, preparatlarda izlenmiştir (Resim 4.8, 4.9).

4.5.4. İmmunohistokimyasal bulgular

Epididimisin esas hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, kan-epididimis bariyerinin yapısal oluşumu ve sürekliliğinin sağlanmasında oldukça önemlidir [340]. Zonula okludens 1, okludin ve klaudin -1 epididimide yer alan sıkı bağlantı proteinleridir. Çalışmamızın amaçlarından biri de BPA, fruktoz ve melatonin uygulamasının bu sıkı bağlantı proteinleri üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

Her deney hayvanına ait rastgele seçilen 6 farklı alanda değerlendirme yapılarak, Zonula Okludens, Okludin ve klaudin-1 immunreaktivite semikantitatif yöntemle aşağıda belirtilen skor tablosuna göre değerlendirildi (Resim 4.11-4.15) (Çizelge 4.1.).

Antikor	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
ZO-1	+++	+++	++	++	+++	++	++
Okludin	++++	+++	++	++	+++	++	+++
Claudin 1	++++	+++	++	++	+++	++	+++

Çizelge 4.1. Zonula Okludens, okludin ve klaudin-1 proteinlerine ait immunreaktivite skorlaması +: Zayıf; ++:Orta; +++:Kuvvetli; ++++: Çok kuvvetli

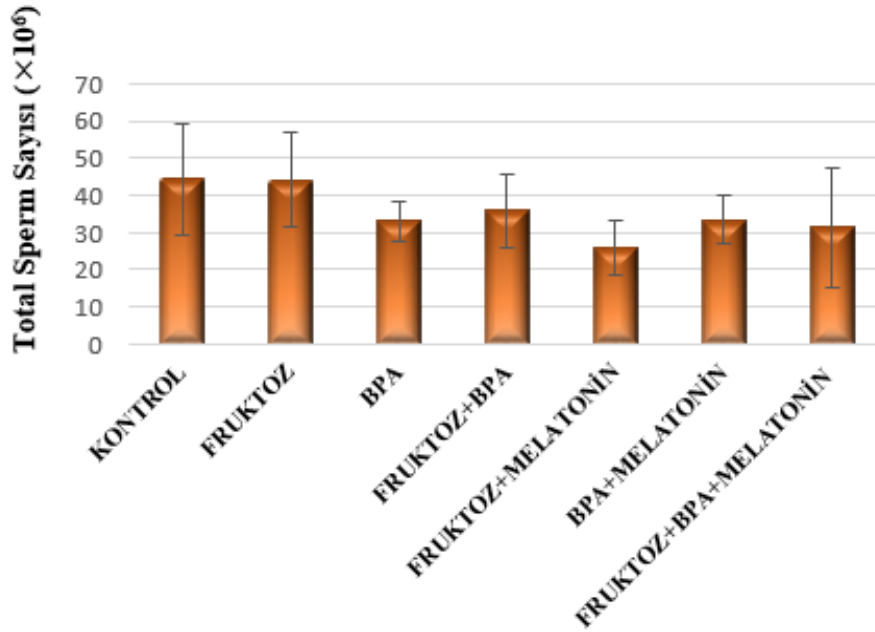
4.6. Spermioqram Bulguları

Tüm deneklerden elde edilen epididimal spermler Rapi-Diff II boyama yöntemi ile boyanarak mikroskop altında Kruger Strict kriterlerine göre değerlendirilmiştir [338, 339]. (Resim 4.16-4.22)

Sperm viabilitesi için ise Sperm Eosin- Nigrosin boyama yöntemi kullanılarak her gruba ait 200 sperm hücresi sayılmıştır (Resim 4.23).

4.6.1. Sperm sayısı

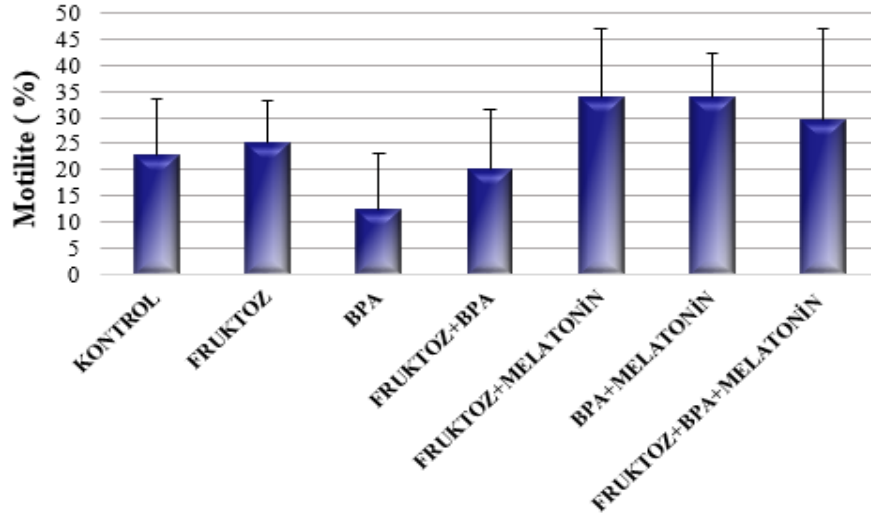
Deney gruplarına ait tüm deneklerin sperm sayımları yapılmış, sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda gruplara ait sperm sayılarının ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla $44,33 \pm 15,10$; $44,16 \pm 12,85$; $33,00 \pm 5,47$; $36,33 \pm 9,97$; $25,83 \pm 7,41$; $33,32 \pm 6,50$; $31,33 \pm 16,26$ şeklinde saptandı. Sperm sayıları gruplar arasında farklılık dikkati çekse de, istatistiksel olarak bir anlamlılık göstermemiştir ($p=0,069$) . Ancak BPA ve BPA+ Fruktöz uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre sperm sayısında azalma gözlenirken, Melatonin uygulanan gruplarda ise anlamlı olmayan bir düşüş izlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Toplam sperm sayılarına ait ortalama $\pm$ SD grafiği

4.6.2. Sperm motilitesi

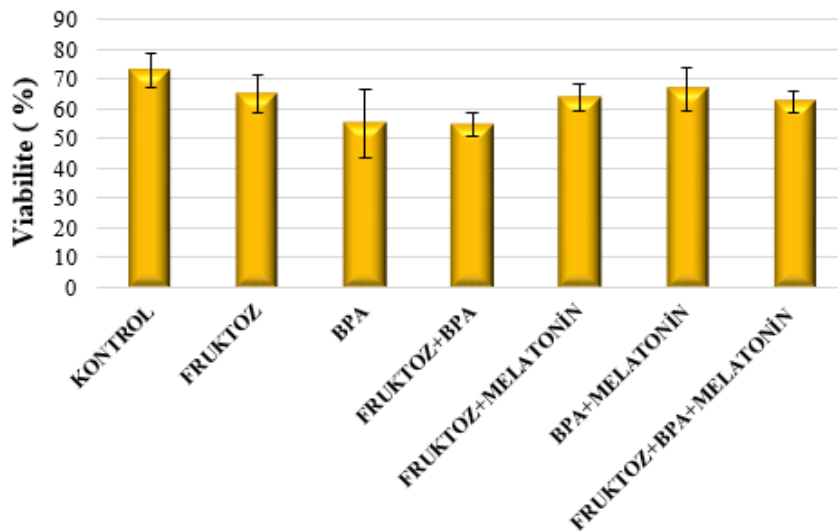
Tüm deney gruplarından elde edilen sperm motilite yüzde değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde her deney grubuna ait sperm motilite yüzdelерinin ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla; $22,66 \pm 10,96$; $25,16 \pm 8,23$; $12,50 \pm 10,78$; $20,00 \pm 11,54$; $34,00 \pm 12,91$; $34,00 \pm 8,39$; $29,50 \pm 17,66$ olarak saptandı. BPA+Melatonin uygulanan grupta, BPA uygulanan gruba göre anlamlı bir artış söz konusudur ($p= 0, 049$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Deney gruplarına ait sperm motilite yüzdeleri ortalama $\pm$ SD grafiği

4.6.3. Sperm viabilitesi

Eosin- Nigrosin boyaması sonucunda değerlendirilen spermier arasındaki viabilite yüzdeleri istatistiksel olarak karşılaştırılmış, ortalama ve standart sapma değeri sırasıyla $73,00 \pm 5,79$; $65,16 \pm 6,36$; $55,16 \pm 11,47$; $54,66 \pm 3,77$; $63,83 \pm 4,66$; $66,50 \pm 7,25$ ve $62,50 \pm 3,67$ olarak izlendi. Kontrol grubu viabilite yüzdesi, BPA ve BPA+ Fruktoz grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ($p=0,001$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark gözlenmese de, ortalama değere bakıldığında viabilite yüzdeleri farklılık göstermektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Deney gruplarına ait sperm viabilite yüzdeleri ortalama $\pm$ SD grafiği

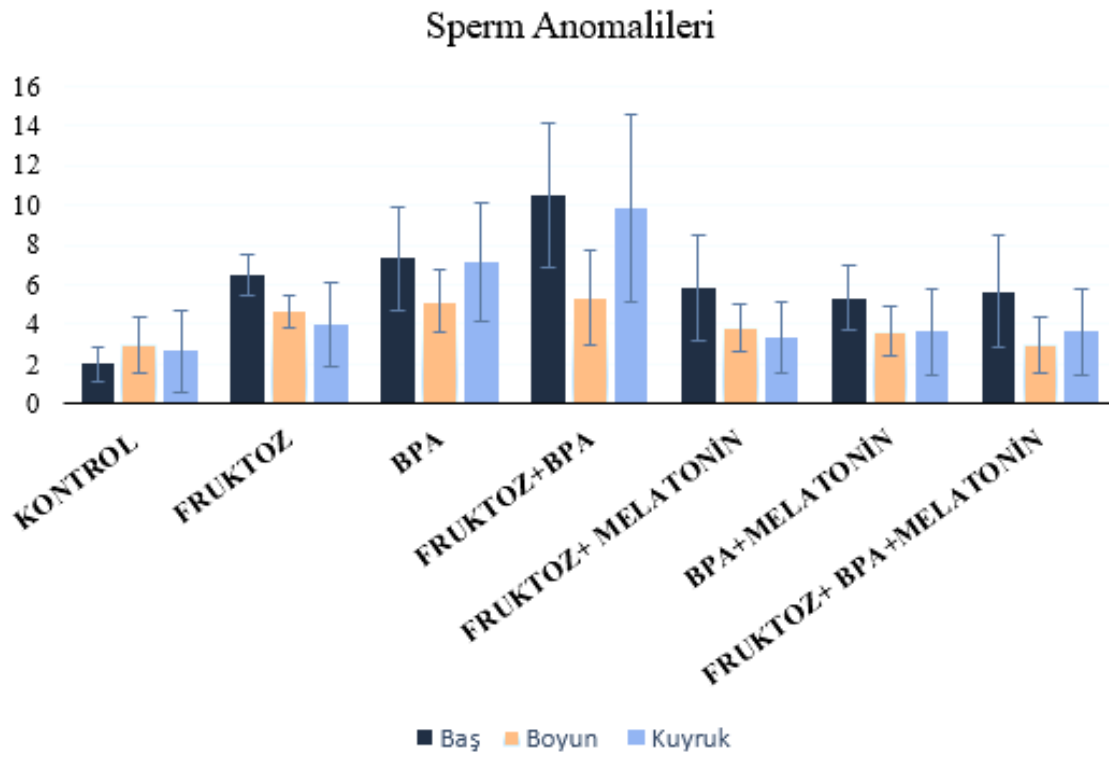
4.6.4. Sperm baş, boyun ve kuyruk anomalileri

Her deney grubuna ait baş, boyun ve kuyruk anomalilerine sahip sperm sayıları sayılıp gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Baş anomalili spermlere ait ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla; $2,00 \pm 0,89$; $6,5 \pm 1,04$; $7,33 \pm 2,58$; $10,00 \pm 3,61$; $5,83 \pm 2,63$; $5,33 \pm 1,63$ ve $5,66 \pm 2,80$ olarak saptandı. Baş anomalisine sahip sperm sayısı kontrol grubunda Fruktöz, BPA ve BPA+Fruktöz gruplarına göre anlamlı olarak düşük olduğu tespit edildi (Sırasıyla; $p=0,033$; $p=0,007$ ve $p=0,000$). BPA+ Fruktöz grubunda ise BPA+Fruktöz+ Melatonin grubuna göre baş anomalili sperm sayısı anlamlı olarak yüksek izlenmiştir ($p=0,018$) (Şekil 4.8).

Boyun anomalisine sahip sperm sayıları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ortanca (çeyrekler arası genişlik) değerleri sırasıyla 3,00 (2,50); 4,50 (1,25); 5,00 (1,25); 5,00 (4,00); 4,00 (2,25); 3,50 (2,25); 3,00 (0,25) olarak saptandı. Boyun anomalisine sahip sperm sayısında gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p=0,062$) (Şekil 4.8).

Kuyruk anomalili sperm sayılarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda ortanca (çeyrekler arası genişlik) değerleri sırasıyla 2,50 (4,25); 3,50 (4,25); 7,50 (5,00); 9,50 (8,50); 2,50 (3,25); 3,00 (1,50); 3,00 (1,50) olarak saptandı. Kuyruk anomalili sperm sayısı ise BPA ve BPA+Fruktöz gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiştir (sırasıyla; $p=0,020$, $p=0,013$). BPA+ Fruktöz grubunda ise BPA+Fruktöz+ Melatonin grubuna göre kuyruk anomalili sperm sayısı anlamlı olarak yüksek izlenmiştir ($p=0,020$) (Şekil 4.8).

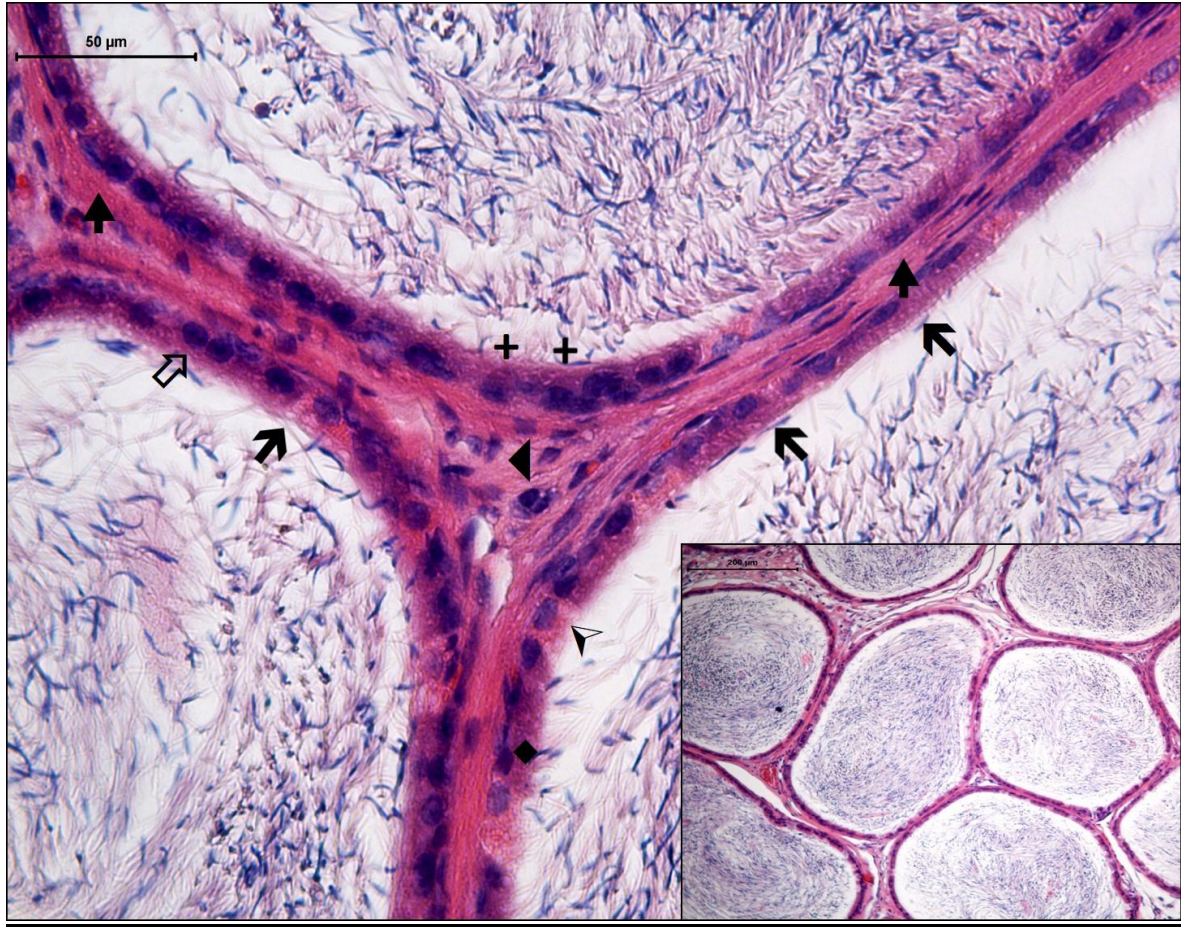


Şekil 4.8. Deney gruplarına ait anomalili sperm sayılarının ortalama $\pm$ SD grafiği

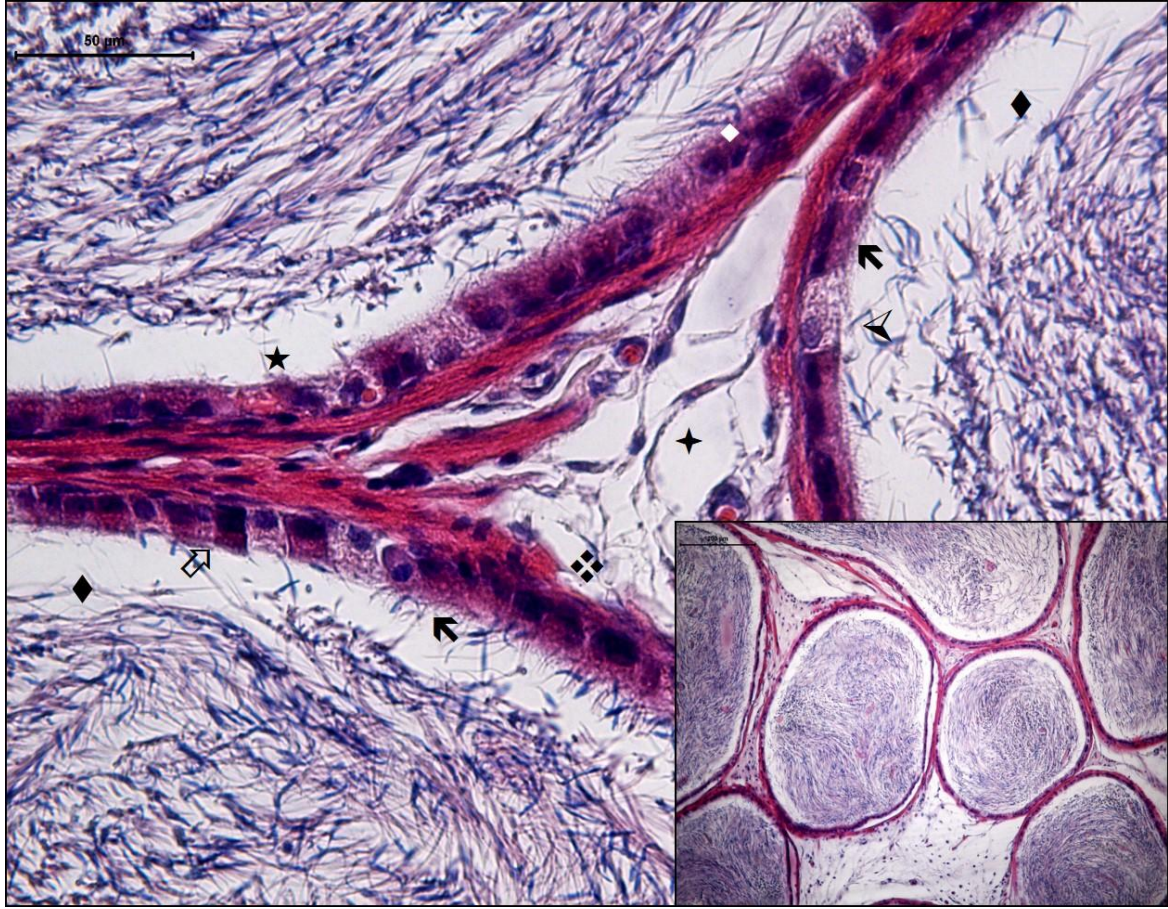
4.7. Üç Boyutlu Modelleme Bulguları

Normal ve patolojik yapıların görsel olarak daha iyi sunulması açısından, ışık mikroskopik görüntülerden elde edilen bulgular üç boyutlu hale getirilerek uzaysal anlamda bir derinlik kazandırıldı. Üç boyutlu görüntüler, tüm gruplara ait duktus epididimis ve sperm morfolojik bulgularını göstermektedir (Resim 4.24).

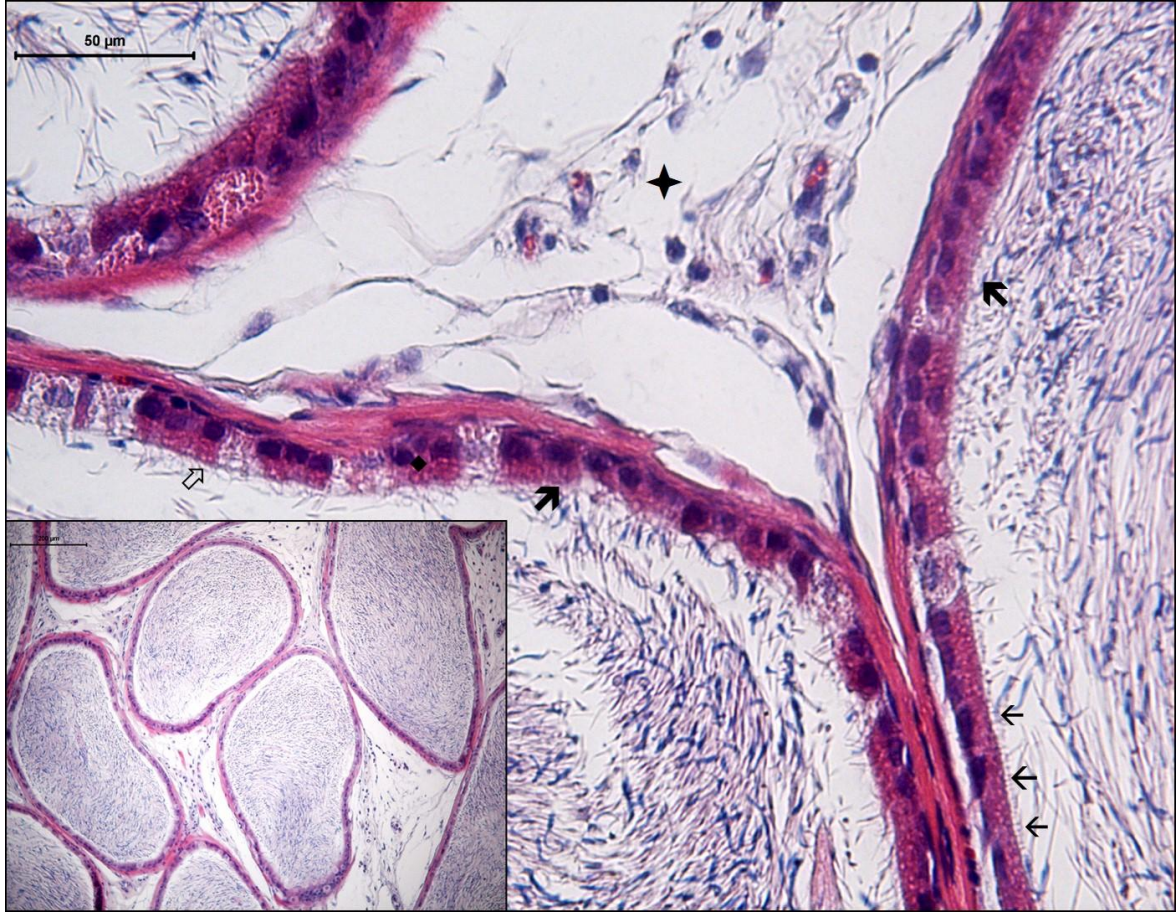
Resimler



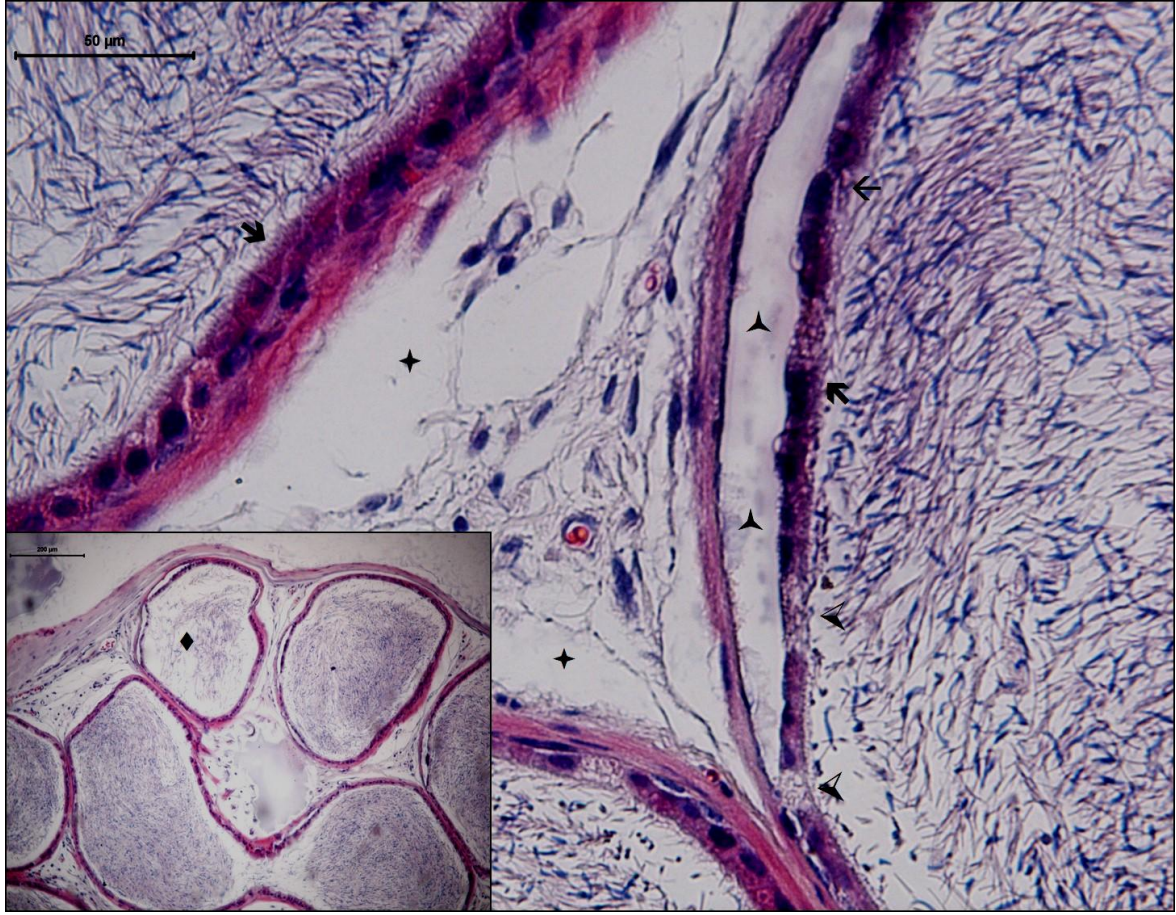
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti. Stereosilyalı yalancı çok prizmatik epitel (↗), stereosilyalar (+), esas hücreler (◇), bazal hücre (◆), şeffaf hücre (▲), luminal sperm içeriği, sirküler düz kas lifleri (↗) ve kollagen lifler (◆) izlenmekte (H&E, x400)



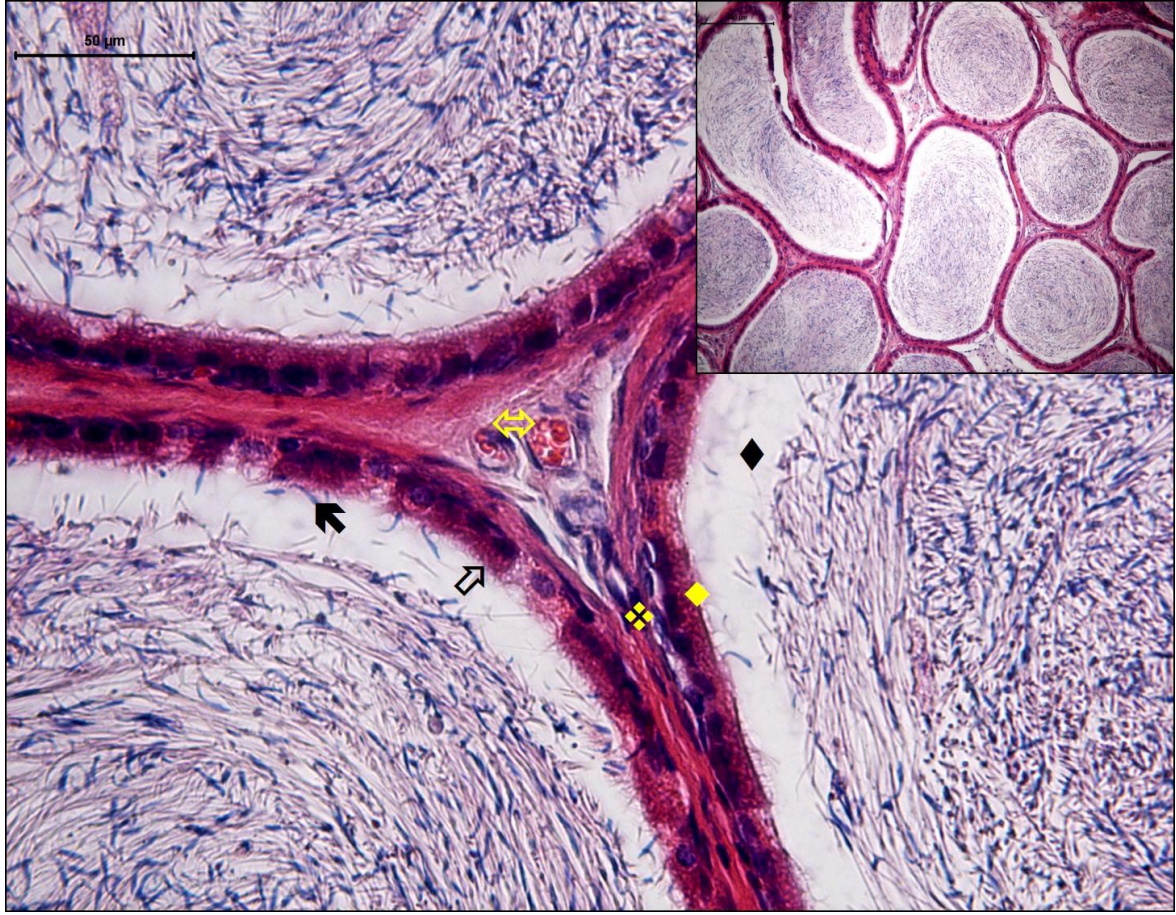
Resim 4.2. Fruktoz grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti. stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel (↗), stereosilya kaybı (★), esas hücreler (⬠), bazal hücre (◈), şeffaf hücrelerde hiperplazi (↘), luminal sperm içeriğinde kayıp (◆), düz kas lif bütünlüğünde bozulma (⬠) ve intertubuler bağ dokuda kayıp (✱) izlenmekte (H&E, x400)



Resim 4.3. BPA grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti. stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel (↗), stereosilyalarda kütleleşme (↖), esas hücreler (↗), bazal hücre (◆), şeffaf hücrelerde hiperplazi (↖), luminal sperm içeriğinde kayıp (◆), düz kas lif bütünlüğünde bozulma (↖) ve intertubuler bağ dokuda kayıp (✱) izlenmekte (H&E, x400)



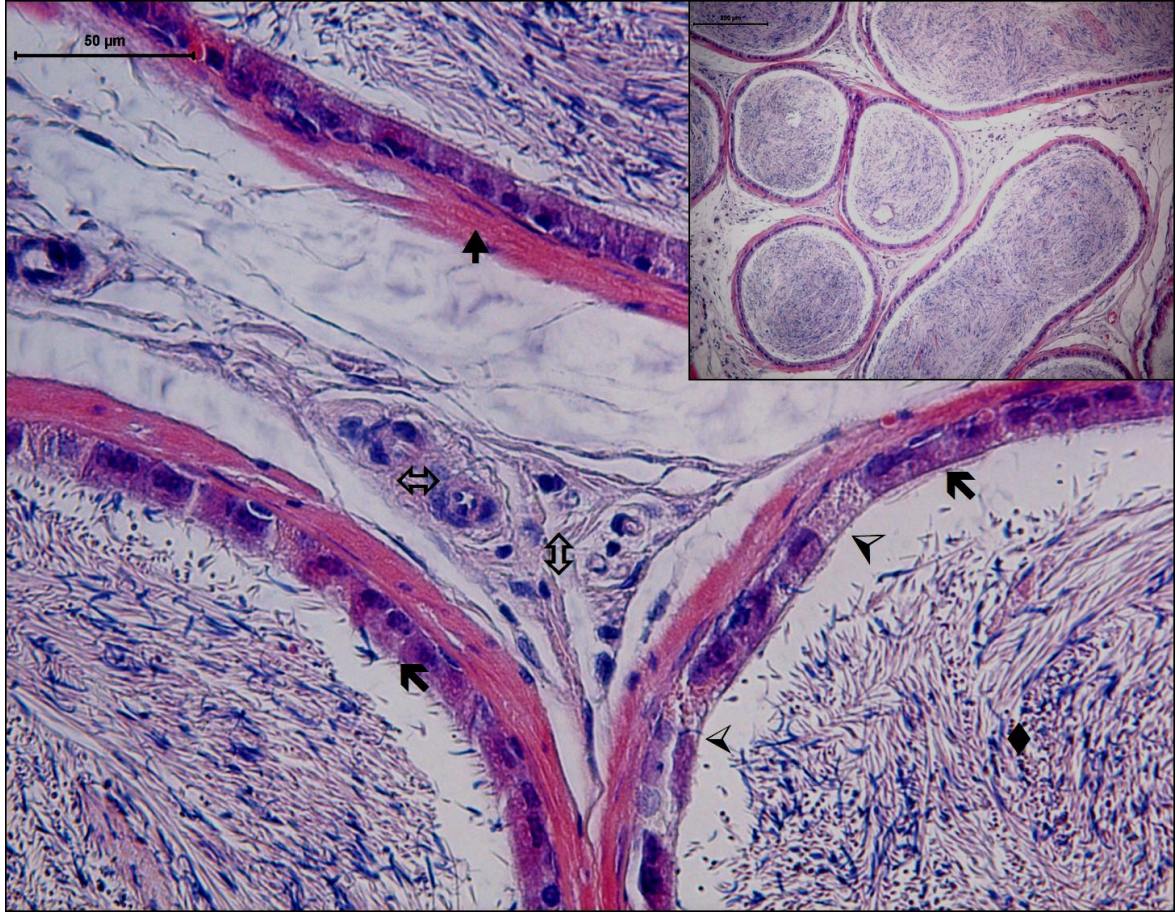
Resim 4.4. BPA+Fruktoz grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti. Stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel (↗), epitel dokuda kayıp (↖), sirküler düz kas tabakası ve epitelde ayrılma (▲) , şeffaf hücrelerde hiperplazi (◈), luminal sperm içeriğinde kayıp (◆) ve intertubuler bağ dokuda kayıp (✦) izlenmekte (H&E, x400)



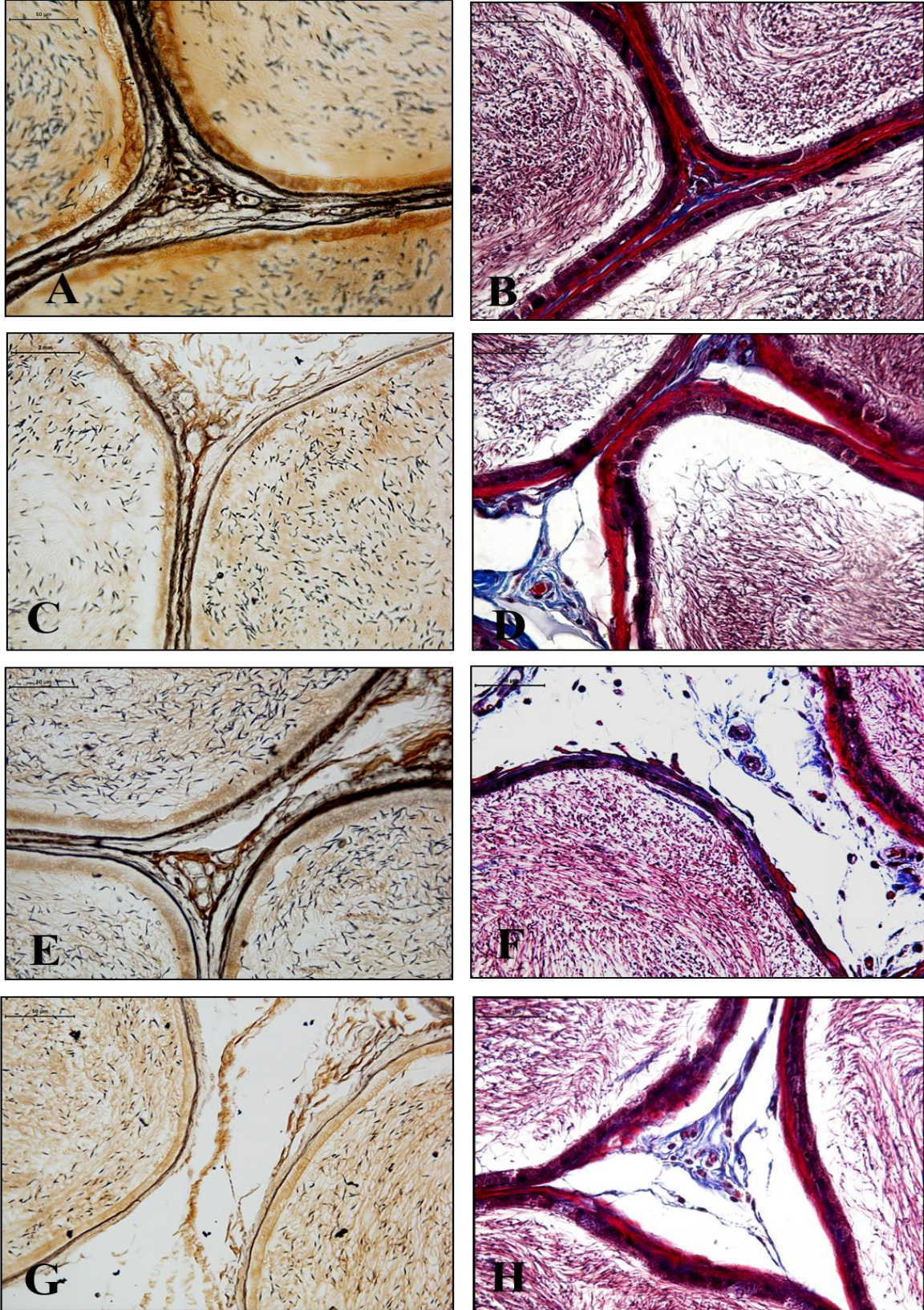
Resim 4.5. Fruktöz+Melatonin grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti. Stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel (↗), esas hücreler (↘), bazal hücre (◆), luminal sperm içeriğinde kayıp (◆), vaskülarize oluşumlar (↔) ve düz kas lif bütünlüğünde bozulma (❖) izlenmekte (H&E, x400)



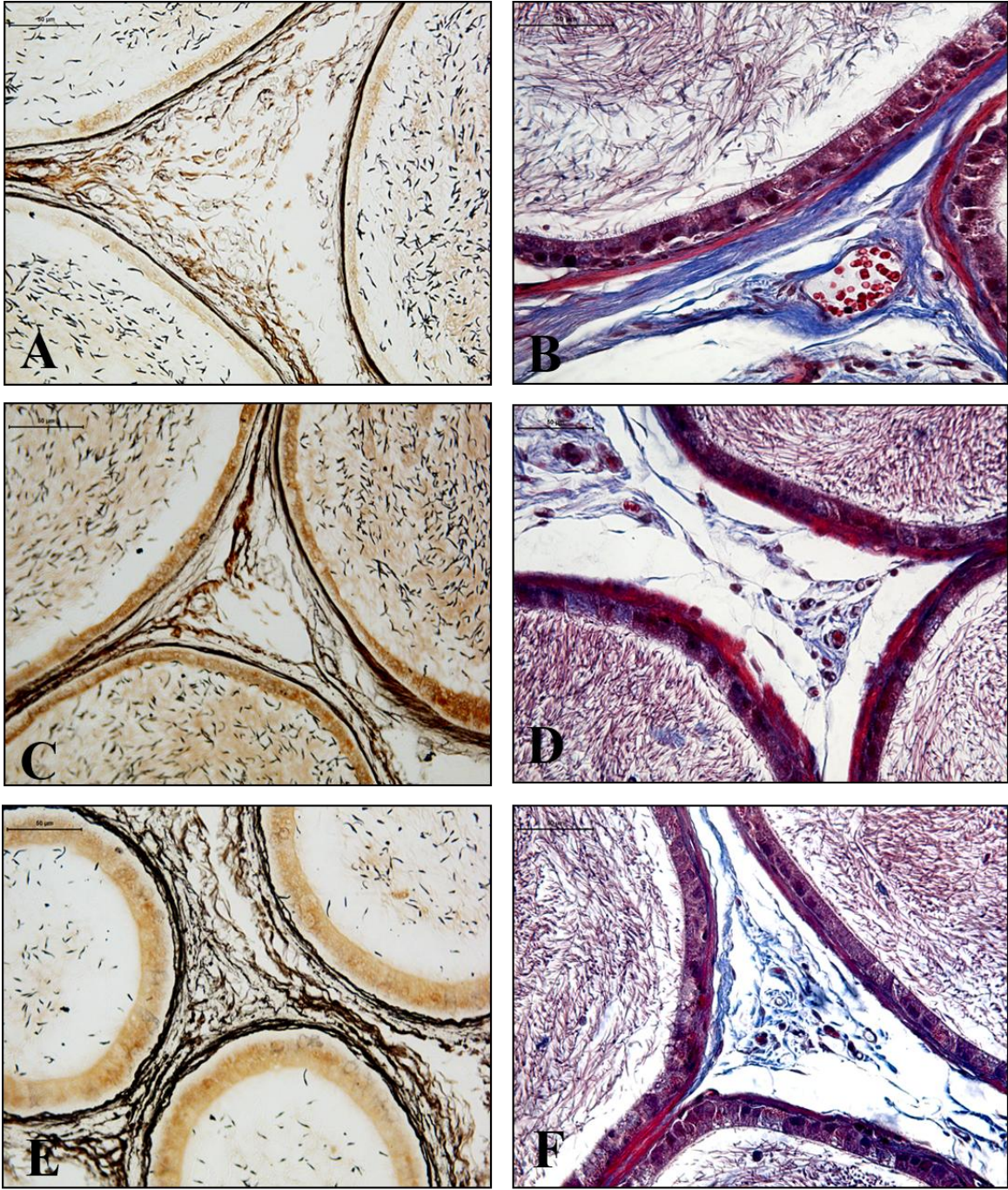
Resim 4.6. BPA+Melatonin grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti. Stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel (↗), esas hücreler (↘), bazal hücre (◆), luminal sperm içeriğinde kayıp (◆), şeffaf hücrelerde hiperplazi (↖), vaskülarize oluşumlar (↔) izlenmekte (H&E, x400)



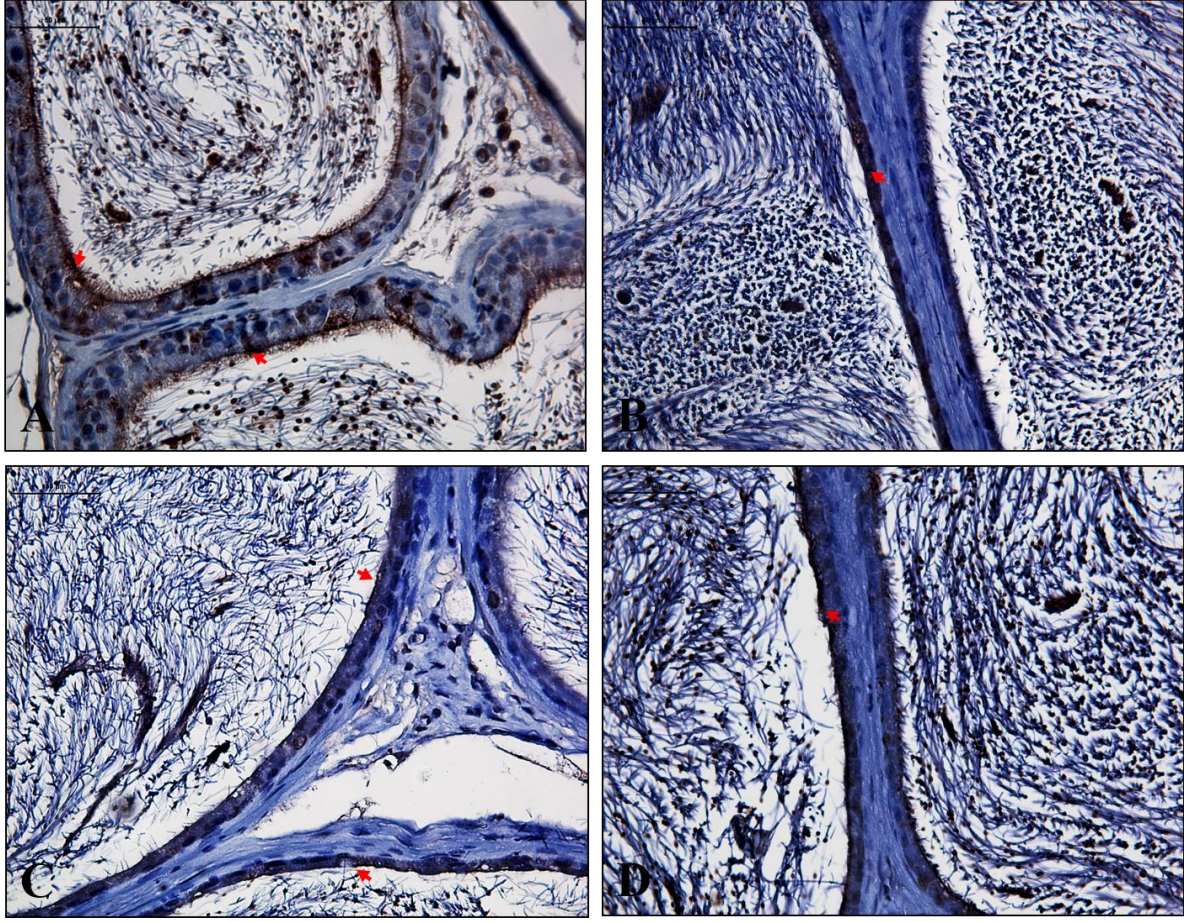
Resim 4.7. BPA+Fruktoz+Melatonin grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunun H&E ile boyanmış enine kesiti. Stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel (↗), sirküler düz kas lifleri (↑), yapılanmaya başlayan intertubuler bağ doku (⇔), luminal sperm içeriği(◊), şeffaf hücrelerde hiperplazi (◁), vaskülarize oluşumlar (⇔) izlenmekte (H&E, x400)



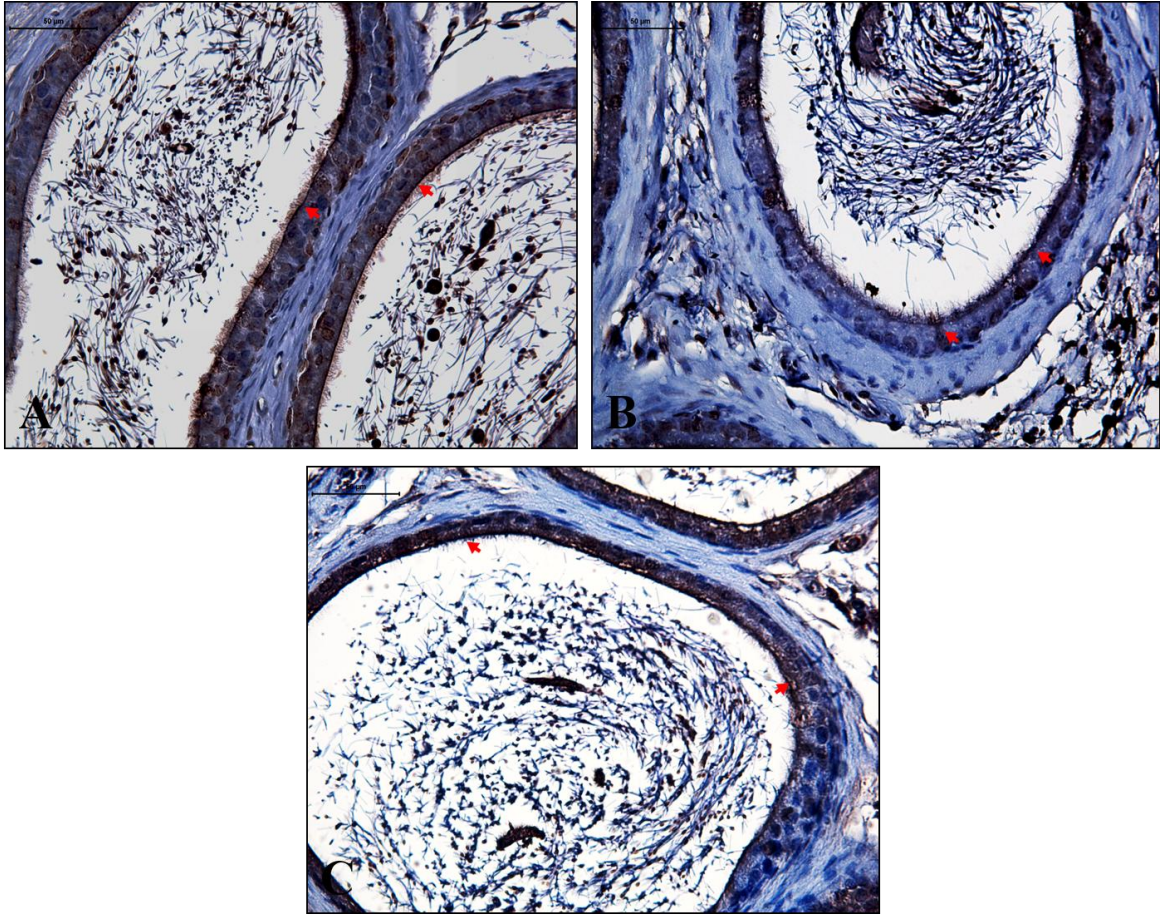
Resim 4.8. A,B. Kontrol grubu, C,D. Fruktöz grubu, E,F. BPA grubu, G,H. Fruktöz+BPA grubuna ait gümüşleme ve Masson'un üçlü boyaması yapılmış duktus epididimis dokusu. (Gümüşleme A,C,E,G; Masson'un üçlü boyaması, B,D,F,H x400)



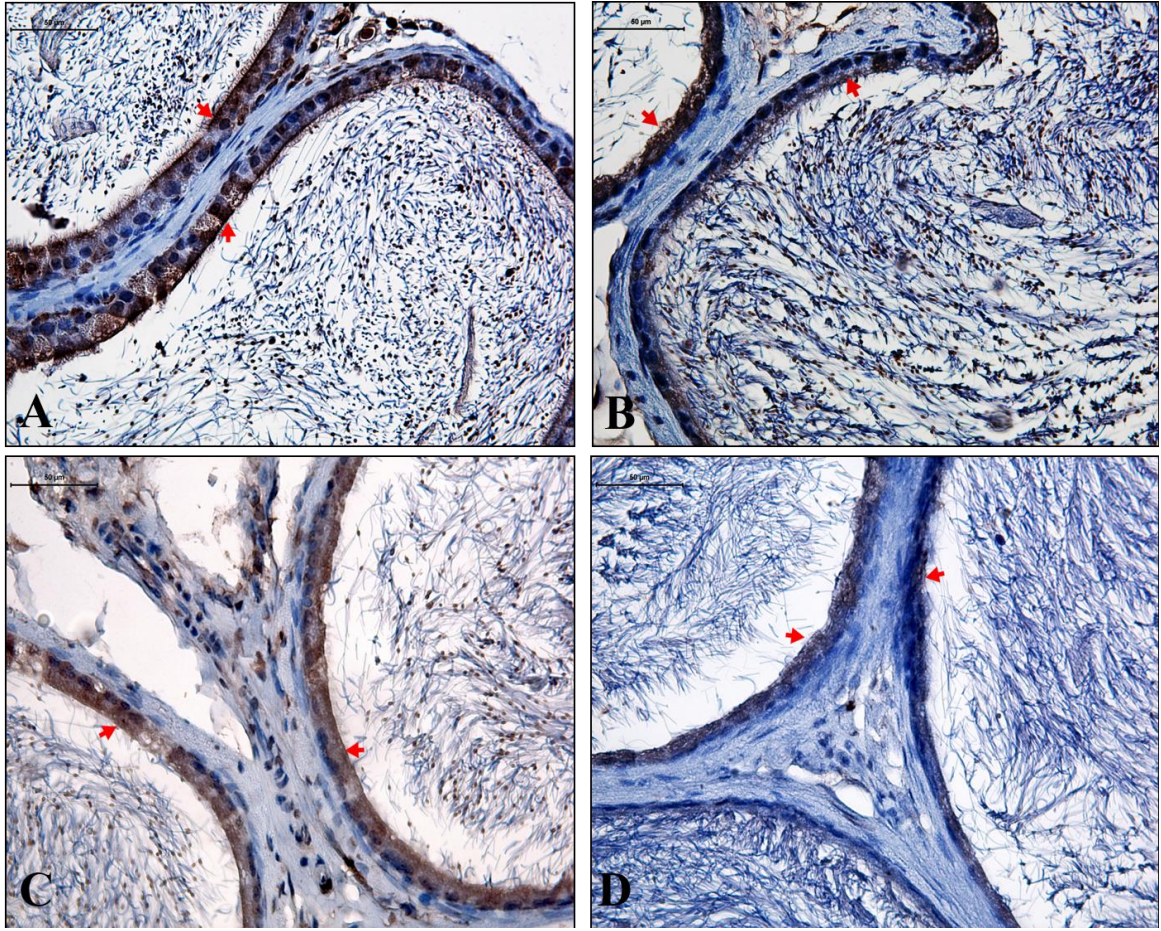
Resim 4.9. A,B. Fruktoz+Melatonin grubu, C,D. BPA+Melatonin grubu, E,F. Fruktoz+BPA+Melatonin grubuna ait gümüşleme ve Masson'un üçlü boyaması yapılmış sıçan duktus epididimis dokusu. (Gümüşleme A,C,E; Masson'un üçlü boyaması, B,D,F x400)



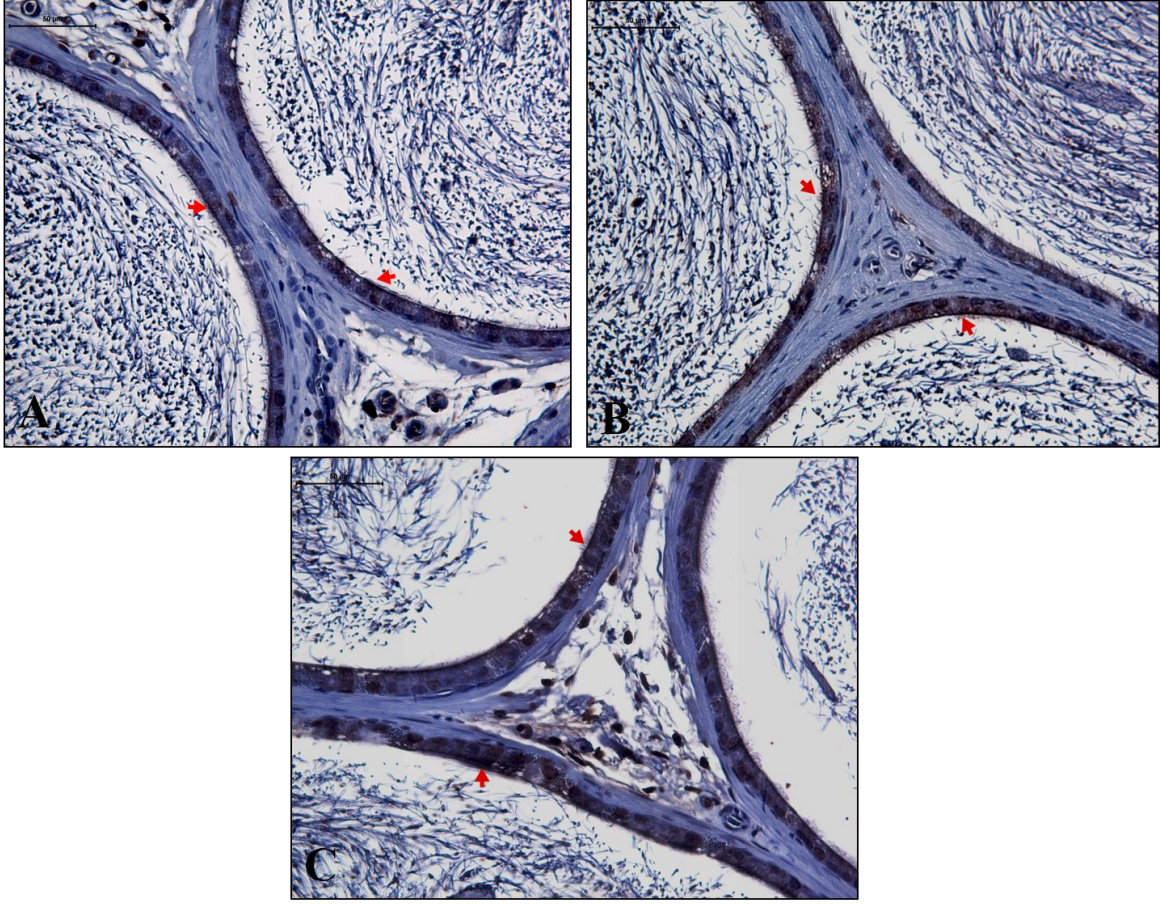
Resim 4.10. A. Kontrol grubu, B. Fruktöz grubu, C. BPA grubu, D.Fruktöz+BPA grubuna ait Z0-1 immunreaktivitesi. Fruktöz, BPA ve Fruktöz+BPA gruplarında kontrol grubuna göre immunreaktivite yoğunluğunun (kırmızı ok) azaldığı dikkati çekti. (DAB & Hematoksilen, x400)



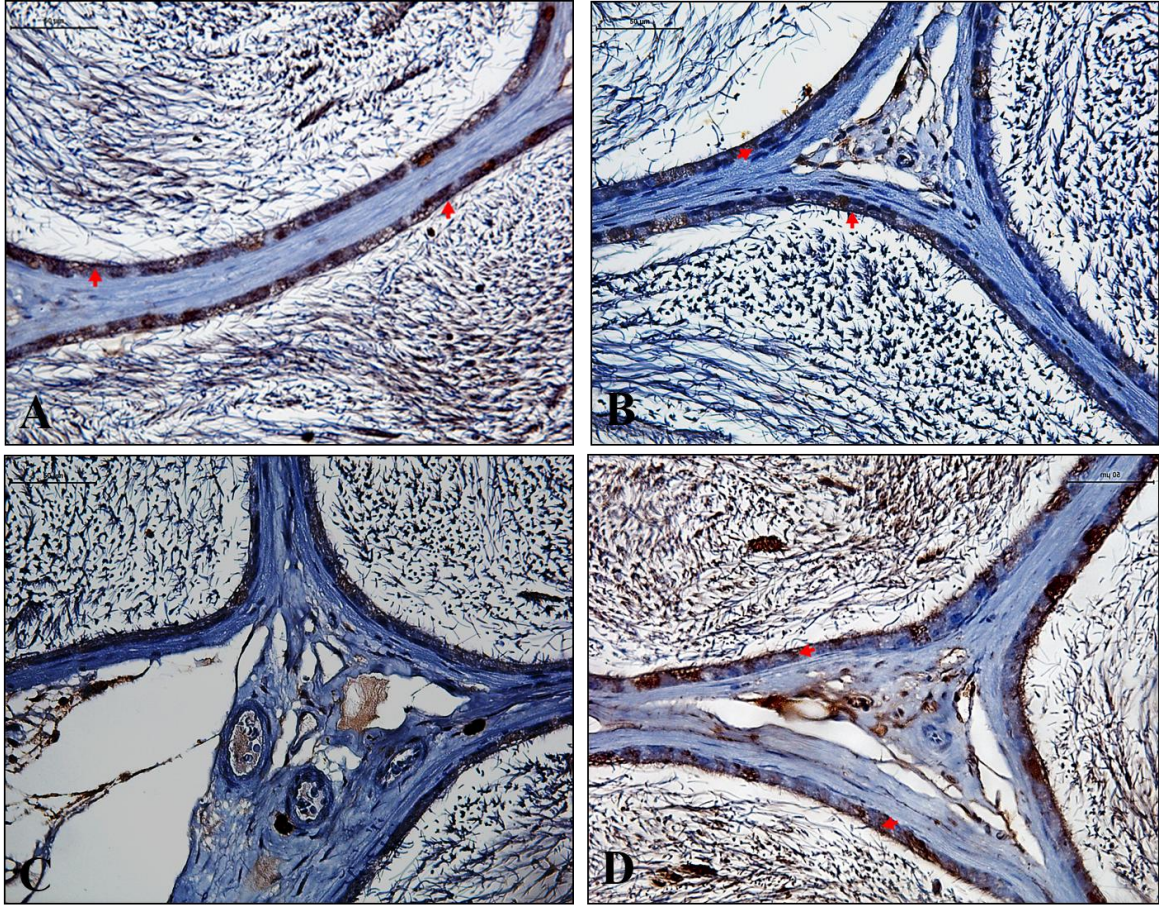
Resim 4.11. A. Fruktoz+Melatonin grubu, B. BPA+Melatonin grubu, C. Fruktoz +BPA +Melatonin grubuna ait ZO-1 immunreaktivitesi (kırmızı ok). (DAB & Hematoksilen, x400)



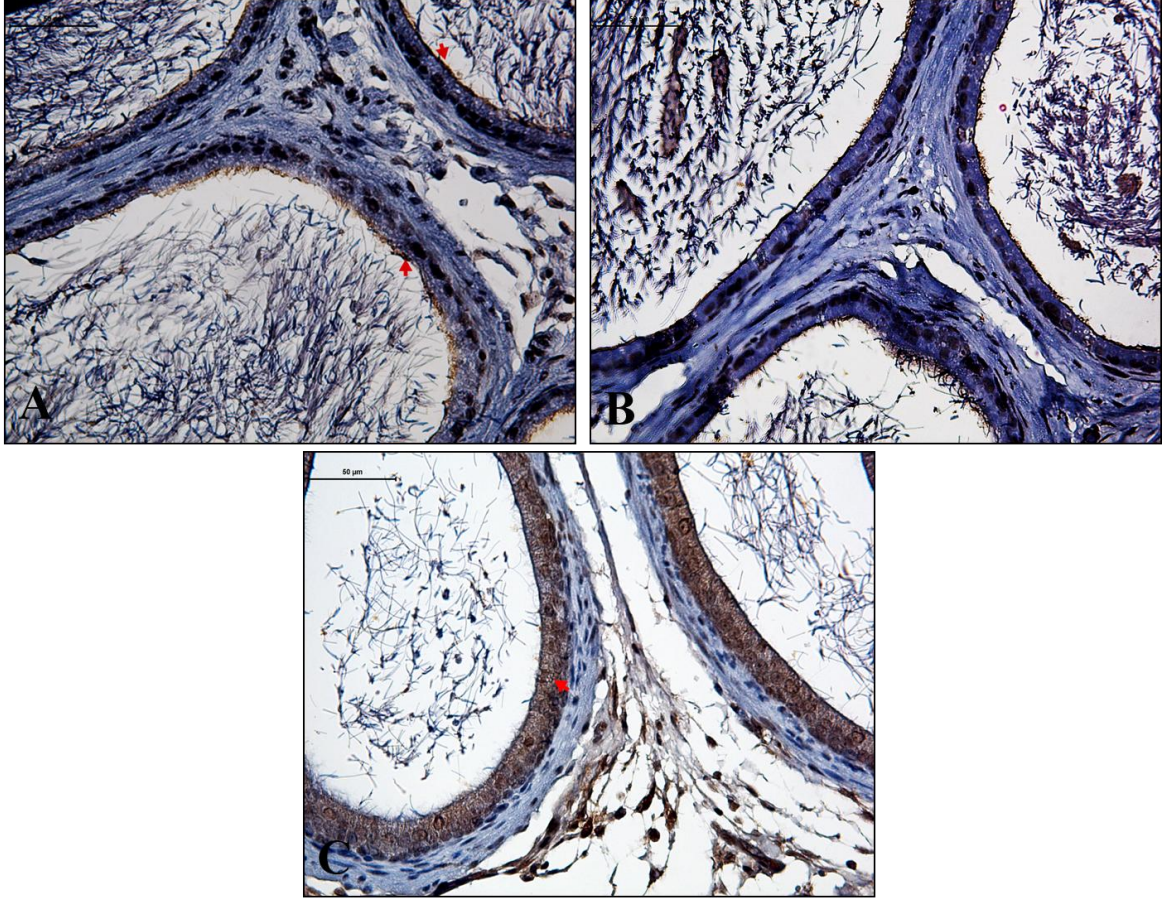
Resim 4.12. A. Kontrol grubu, B. Fruktöz grubu, C. BPA grubu, D.Fruktöz+BPA grubuna ait okludin immunreaktivitesi. Fruktöz, BPA ve Fruktöz+BPA gruplarında kontrol grubuna göre immunreaktivite yoğunluğunun (kırmızı ok) azaldığı dikkati çekti. (DAB & Hematoksilen, x400)



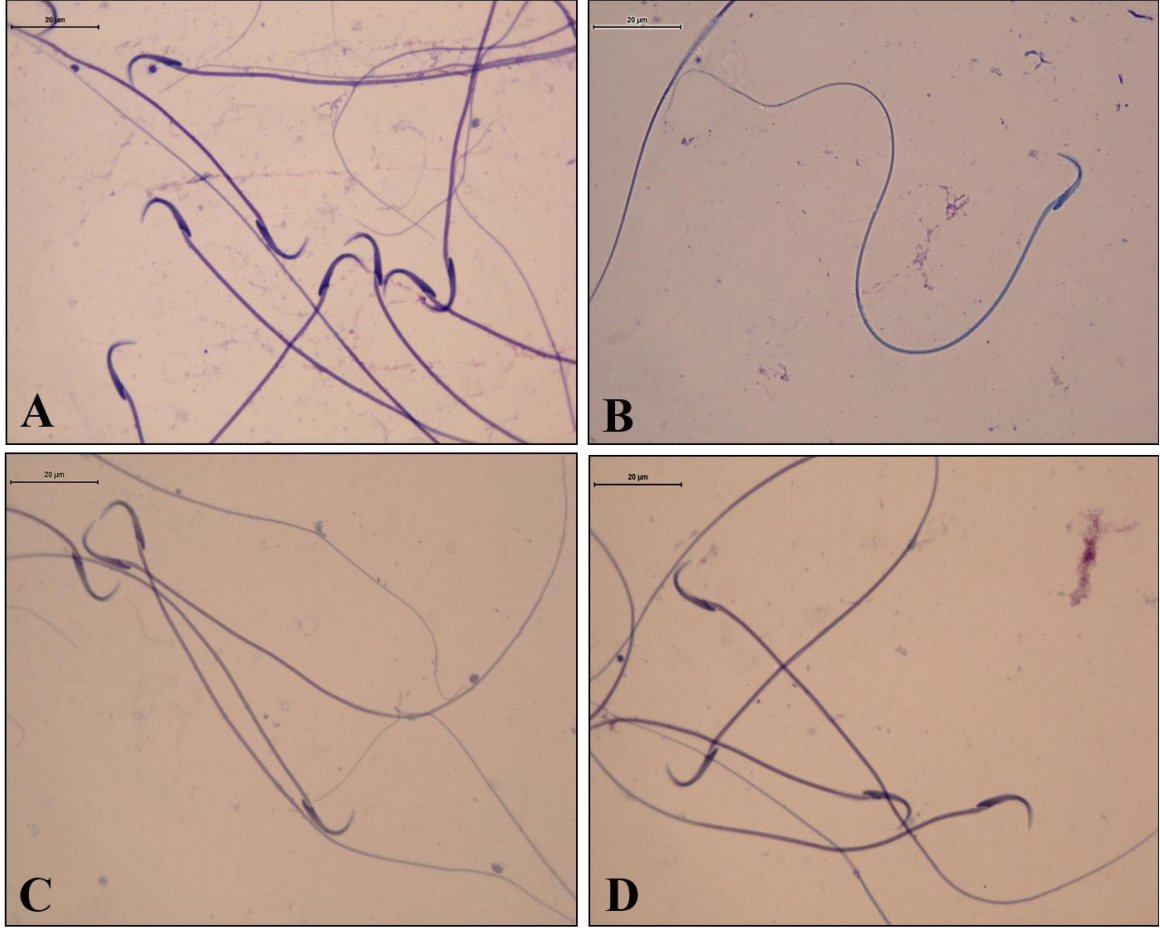
Resim 4.13. A. Fruktoz+Melatonin grubu, B. BPA+Melatonin grubu, C. Fruktoz+BPA+Melatonin grubuna ait okludin immunreaktivitesi (kırmızı ok) (DAB & Hematoksilen, x400)



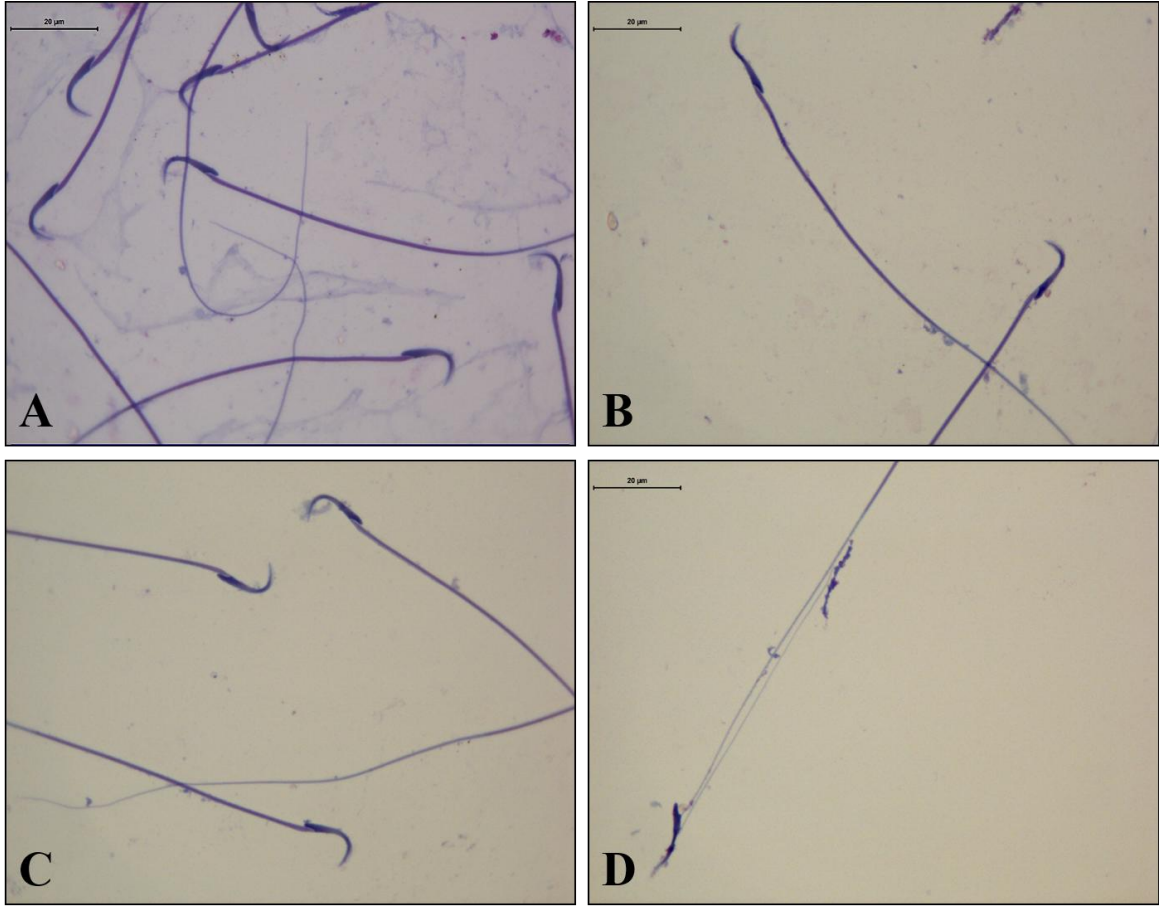
Resim 4.14. A. Kontrol grubu, B. Fruktöz grubu, C. BPA grubu, D.Fruktöz+BPA grubuna ait klaudin 1 immunreaktivitesi. Fruktöz, BPA ve Fruktöz+BPA gruplarında kontrol grubuna göre immunreaktivite yoğunluğunun (kırmızı ok) azaldığı dikkati çekti. (DAB & Hematoksilen, x400)



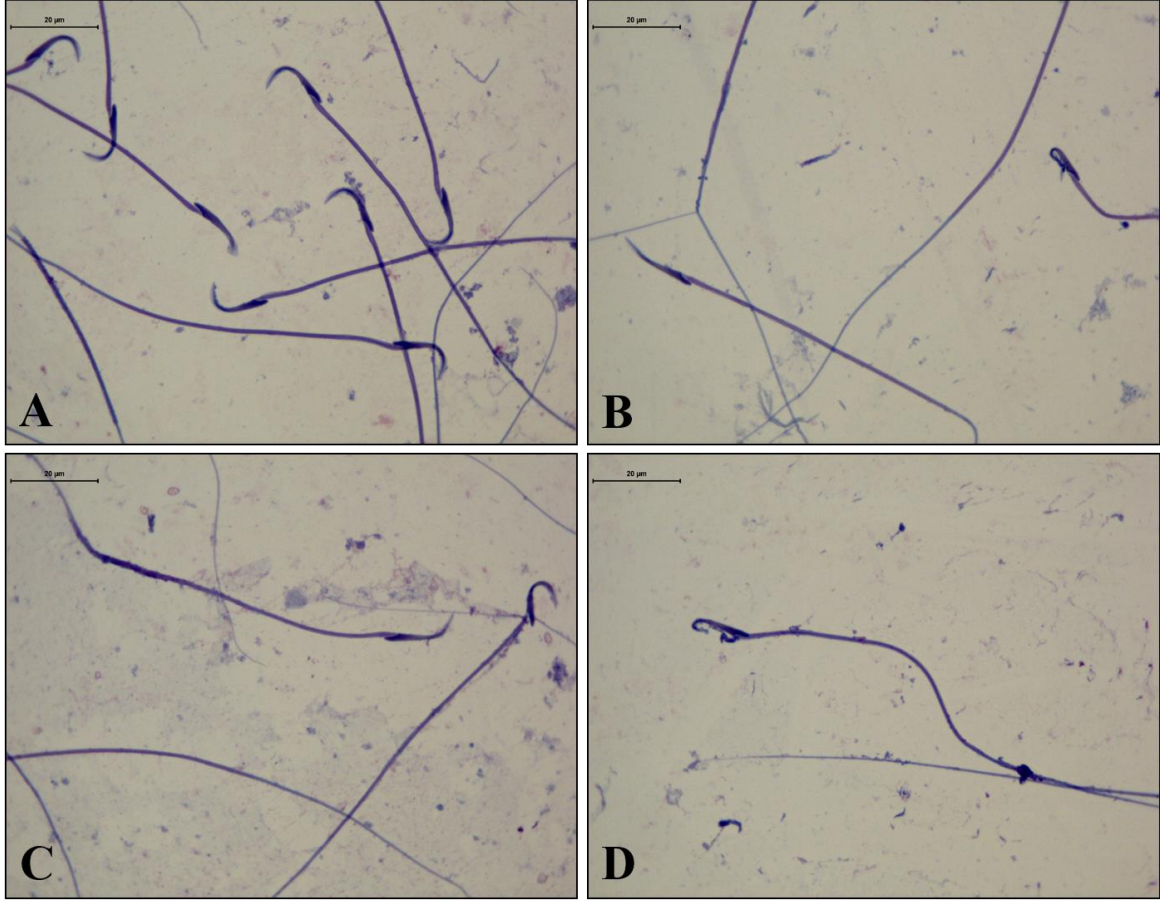
Resim 4.15. A. Fruktoz+Melatonin grubu, B. BPA+Melatonin grubu, C. Fruktoz+BPA+Melatonin grubuna ait klaudin-1 immunreaktivitesi (kırmızı ok) (DAB & Hematoksilen, x400)



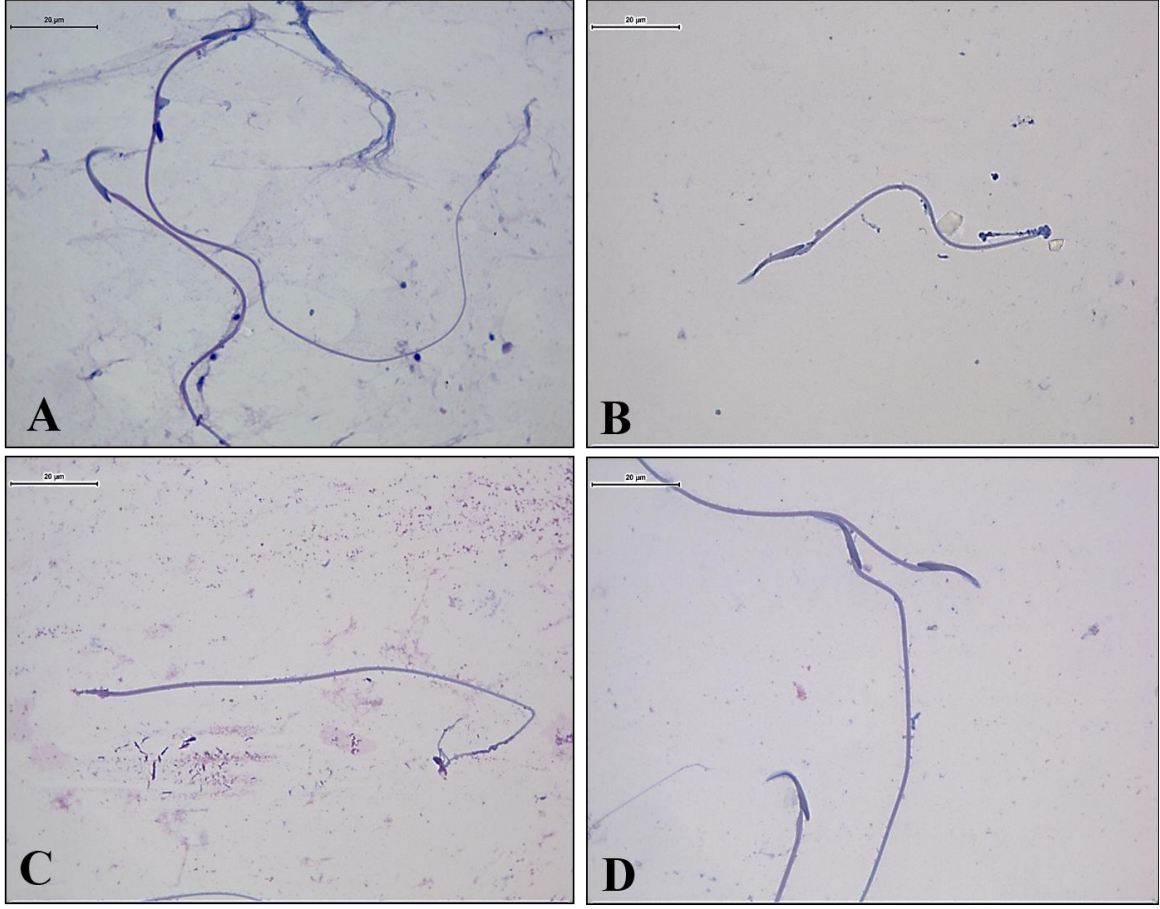
Resim 4.16. Kontrol grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (Diff-quick, x100)



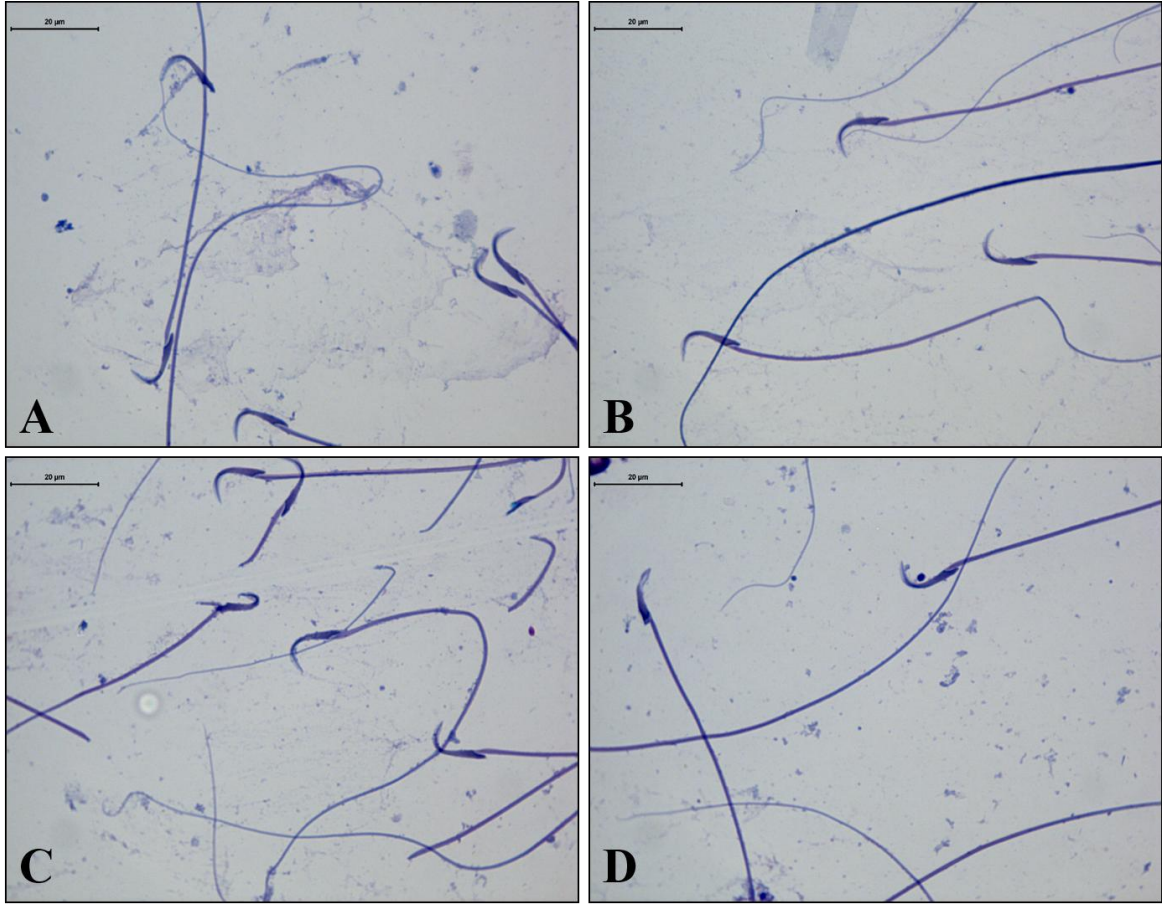
Resim 4.17. Fruktoz grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (Diff-quick, x100)



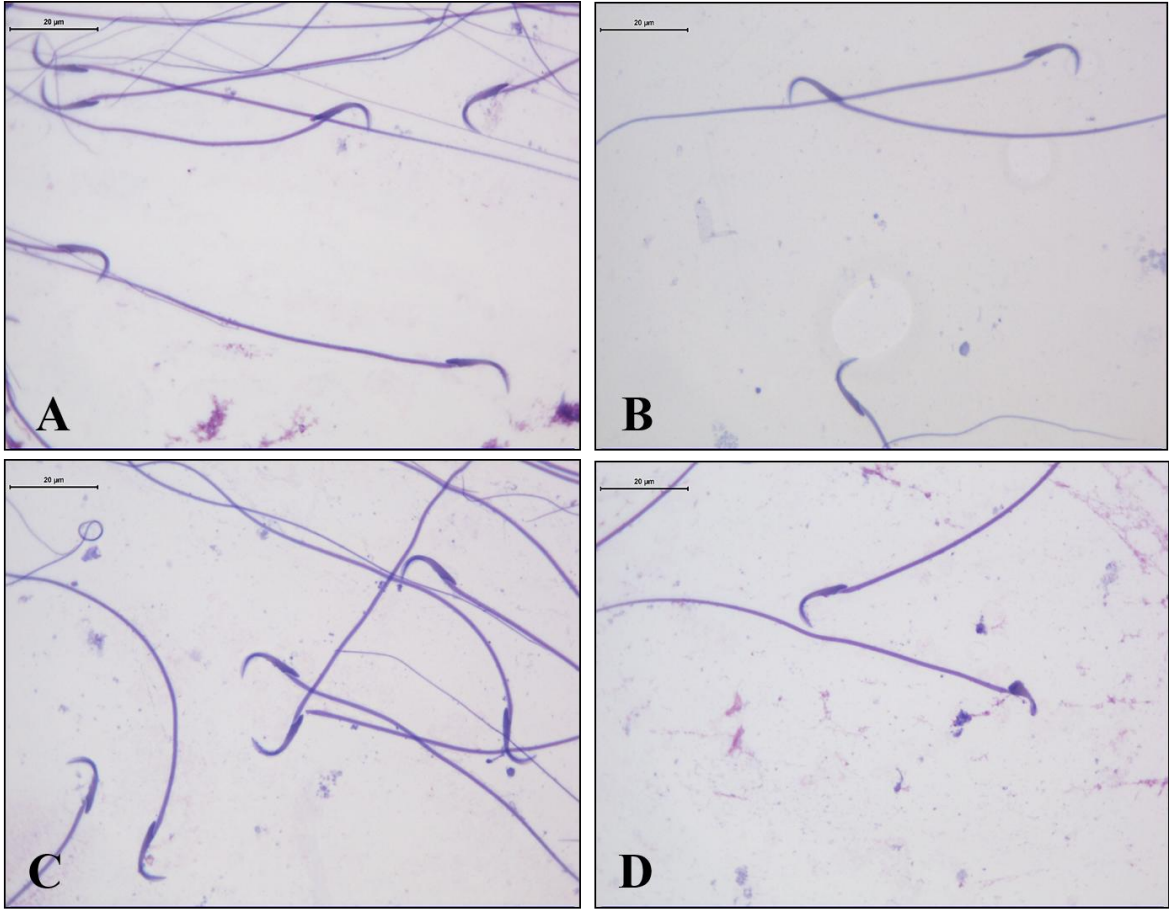
Resim 4.18. BPA grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (Diff-quick, x100)



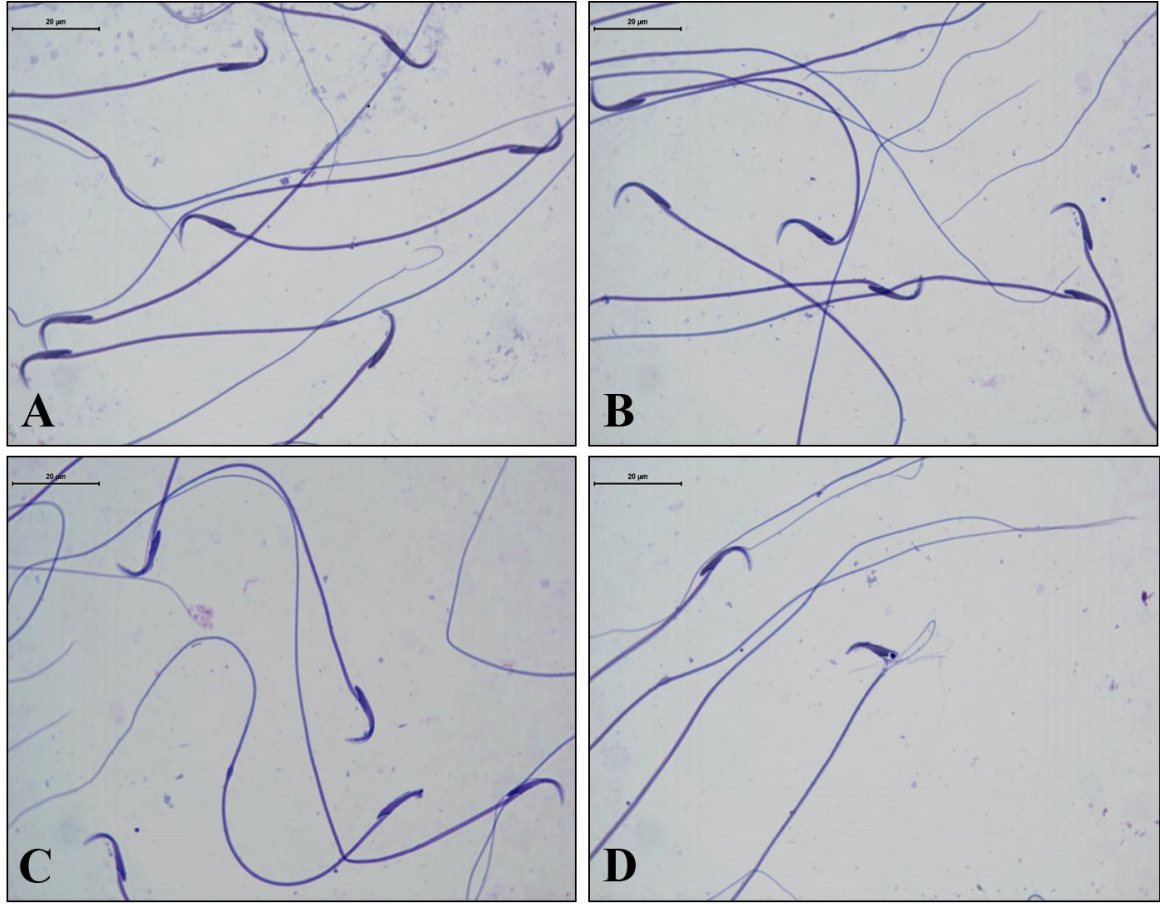
Resim 4.19. BPA+ Fruktoz grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (Diff quick, x100)



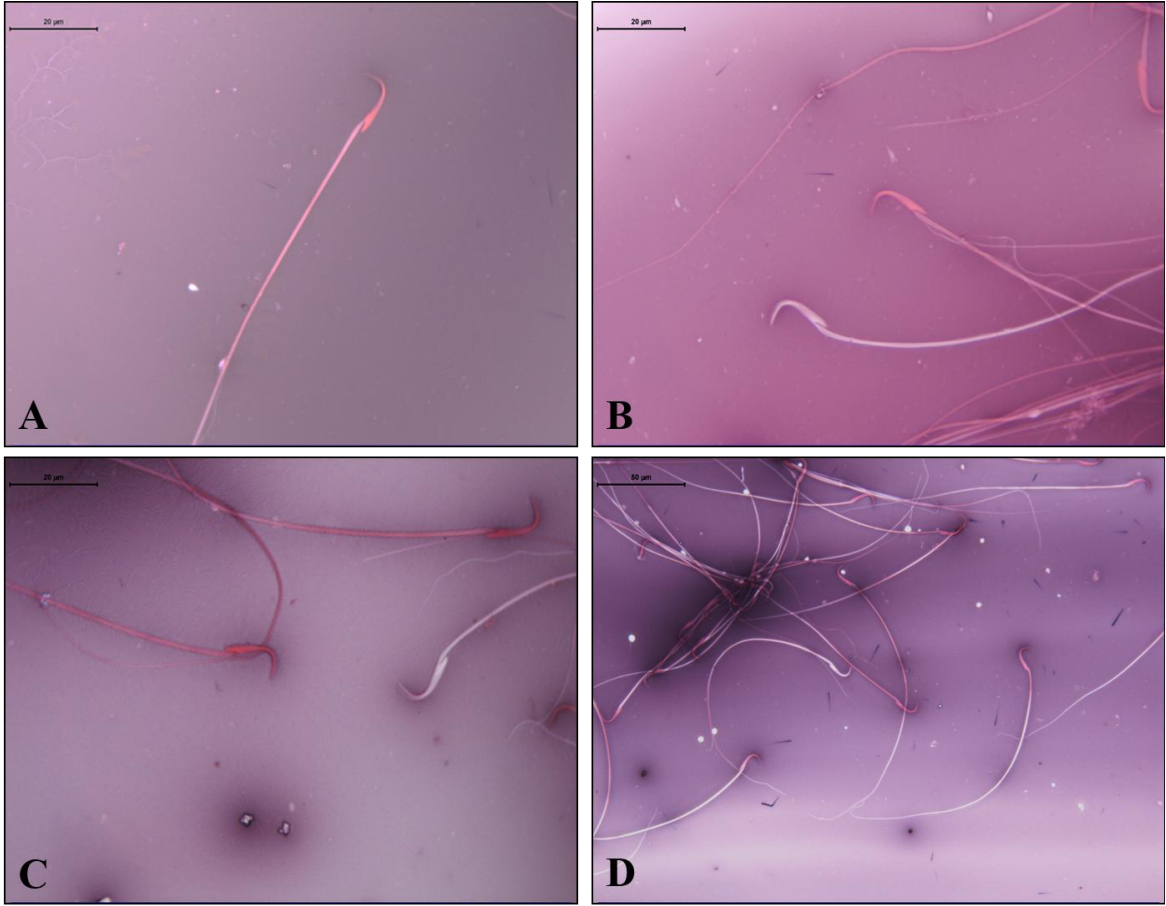
Resim 4.20. Fruktoz+ Melatonin grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (Diff-quick, x100)



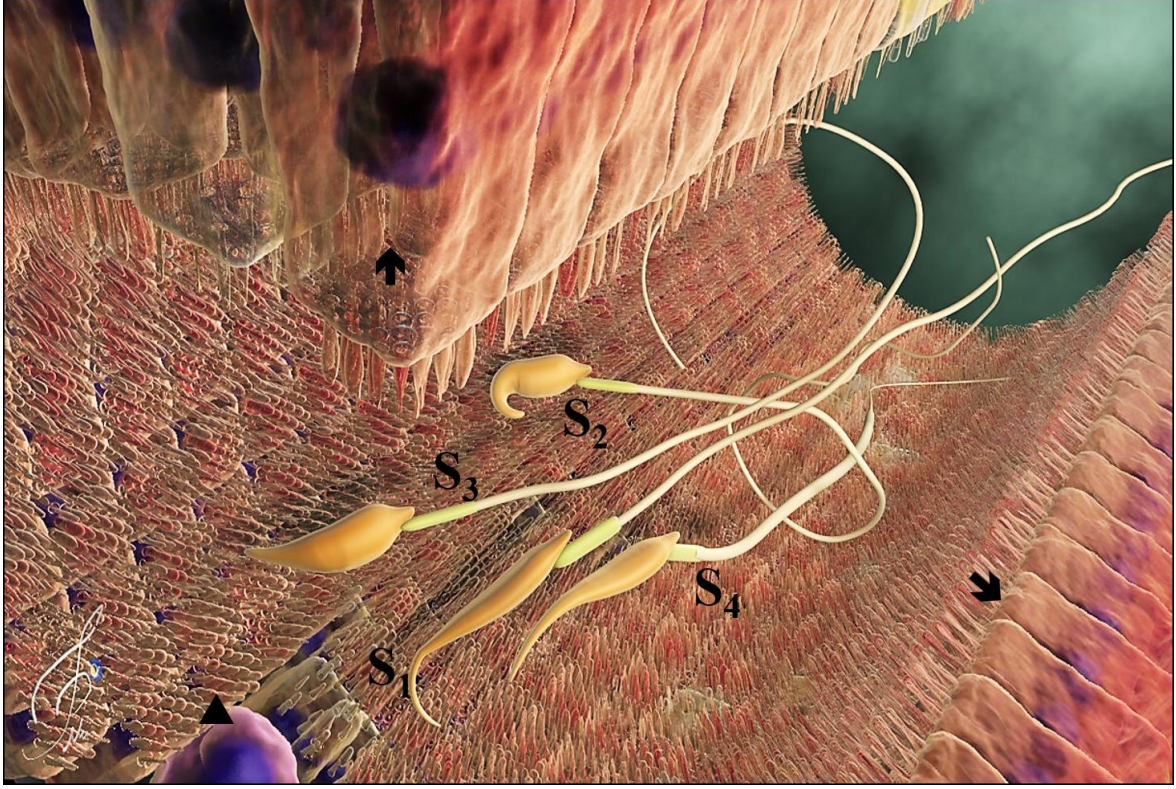
Resim 4.21. BPA+ Melatonin grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (Diff-quick, x100)



Resim 4.22. Fruktoz +BPA+ Melatonin grubuna ait sperm hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (Diff-quick, x100)



Resim 4.23. Deney gruplarına ait sperm hücrelerinin viabilite tayini; Kırmızı sperm (cansız), beyaz sperm (canlı) (Eosin- Nigrosin, A, B, C x100; D x40)



Resim 4.24. Farklı sperm yapılarının duktus epididimis lümeninde üç boyutlu görüntülenmesi. Duktus epididimise ait bazal membran üzerinde yerleşmiş stereosilyalı esas hücreler (↑), bazal hücreler (▲), lümen içerisinde normal morfolojik görünüme sahip sperm (S_1), baş ve kuyruk anomalisine sahip sperm (S_2 ve S_3), boyun anomalisine sahip sperm (S_4). (Üç boyutlu modeller Prof. Dr. Tuncay PEKER tarafından yapılmıştır)

5. TARTIŞMA

Günümüzde tüketimi giderek artan yüksek fruktoz içerikli gıdaların yanı sıra endokrin bozucu olarak bilinen çeşitli kimyasal maddelere çevresel veya oral yollarla etkin kalma Mets ve ilişkili klinik durumların görülme sıklığını da arttırmaktadır.

Son yıllarda obezite ve metabolik sendrom sıklığındaki belirgin artış sadece sedanter yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları ile açıklanamamakta, çevresel kimyasallara etkin kalma da, üzerinde düşünülmesi ve incelenmesi gereken bir neden haline gelmektedir. Özellikle işlenmiş gıda tüketim alışkanlığı ile bu tarz gıda maddelerinin muhafaza edilmesinde kullanılan plastiklerin üretildiği endokrin bozucu BPA, diabet, obezite, kardiyovasküler hastalıklar, tiroid işlev bozukluğu, gelişimsel bozukluklar, kanser gibi hastalıkların yanı sıra erkek üreme sistemi ile de yakından ilişkilidir [1, 2, 341]. Ayrıca toplum bazlı yapılan çalışmalarda BPA' nın metabolik sendrom bileşenleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [342-346].

Epidemiyolojik raporlar, BPA' nın serbest radikaller üreterek erkek ve dişi üreme sistemini olumsuz etkilediğini ve giderek artan çevresel BPA' ya etkin kalma ile erkek infertilite sıklığı arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir [347-350].

Metabolik sendromun seksüel disfonksiyon, hipogonadotropik hipogonadizm ve infertilite ile ilişkili olduğu belirtilmiş ve bazı çalışmalarda metabolik sendrom ve yüksek VKİ ya da bel çevresi arasındaki bağlantı araştırılmış, sperm kalitesinin olumsuz etkilendiği bildirilmiştir [351-357].

Metabolik sendrom ile ilişkili obezitenin hormon düzeylerinde değişikliklere neden olarak fertilitiyi olumsuz etkilediği ve sperm işlevleri üzerinde doğrudan değişiklikler yarattığına dair çeşitli kanıtlar bulunmaktadır [358]. Metabolik sendromlu erkek hastalarda sperm motilitesi ve morfolojisi ile metabolik sendrom komponentleri arasında negatif bağlantı olduğu gösterilmiş, sperm DNA fragmentasyonunda artış olduğu bildirilmiştir [358] .

Metabolik sendrom ve erkek fertilitesi arasındaki etki mekanizması tam olarak açıklanamasa da, spermatogenesis ve sperm özelliklerinin değişimlerinden sorumlu olduğu bilinmektedir ve bu konudaki çalışmalar giderek hız kazanmaktadır [357].

Literatürde yer alan bir çok çalışmada, fruktoz ile beslenen sıçanlarda, hiperinsülinemi, hipertrigliseridemi ve insülin direnci gibi metabolik sendrom bileşenlerini içeren ve insanlarla benzer profil gösteren metabolik sendrom geliştiği gösterilmiştir [169, 359].

Çalışmamızda tercih edilen melatonin ise sirkadiyen ritmin düzenlemesi işlevinin yanı sıra çeşitli fizyolojik rollere sahip, güvenli bir şekilde eksojen olarak alınabilen oldukça güçlü bir antioksidandır [360]. Melatonin yenidoğanlarda klinik terapötik uygulamalarda kullanılmaktadır. Çocuklar ve yetişkinler için de düzenleyici fizyolojik etkilere sahiptir. [361].

Melatoninin erkek üreme sistemi üzerine olan etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa bile, bu hormonun erkek üreme sağlığı için gerekliliği kaçınılmazdır. Özellikle toksik ajanların yol açtığı oksidatif hasar artışı ve sperm kalitesinin azalması gibi olumsuz etkileri önleyici özelliği ile gün geçtikçe ilgi odağı haline gelmekte ve araştırmalara konu olmaktadır [362-365].

Çalışmamızda duktus epididimis ve sperm üzerindeki fruktoz ve BPA'nın hem tek başına hem de kümülatif etkileri değerlendirilmiş, bu süreçte melatoninin rolü tartışılmıştır.

Deneyisel model içeriğinde BPA ve melatoninin insan vücuduna alım şekilleri göz önüne alınarak, iki madde uygulamaları gavaj yolu ile yapılmış, fruktoz ise %10'luk D-Fruktoz çözeltisi halinde 60 gün boyunca içme sularına eklenerek deneklere uygulanmıştır [366, 367].

Fruktoz içerikli diyet ya da fruktoz eklenmiş içme suyunun vücut ağırlık artışına yol açtığını bildiren çalışmalar olduğu gibi herhangi bir anlamlılığın saptanmadığı çeşitli araştırmalar da mevcuttur [14, 130, 367, 368].

Çalışmamızda tüm deney gruplarına ait vücut ağırlık ölçümleri değerlendirildiğinde deney süresince gruplar içerisinde istatistiksel olarak anlamlı bir kilo artışı olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$). Bu artış gruplar arasında karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık saptanmamıştır ($p=0,408$). Ancak ağırlık ortalama değerleri karşılaştırıldığında, fruktoz ve BPA'nın hem tek başına hem de birlikte uygulandığı gruplarda, kontrol grubuna

göre kilo artışının gerçekleştiği, buna karşılık fruktoz ve BPA uygulanmış gruplara melatonin uygulandığında ise kontrol grubuna yaklaşık değerlerde olduğu gözlenmiştir.

Deneklerin deney süresince belli periyodik aralıklarla yapılan ağırlık ve boy ölçümleri esas alınarak vücut kitle indeksleri değerlendirildiğinde ise gruplar içerisinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ($p<0,001$), gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı saptandı ($p=0,346$). Ancak ortalama ölçüm değerleri karşılaştırıldığında fruktoz ve BPA'nın hem tek başına hem de birlikte uygulandığı gruplarda kontrol grubuna göre VKİ'de artışa neden olduğu ve deneklerin obeziteye doğru gittiği izlenmiş, melatonin uygulandığında ise kontrol grubuna yaklaşık değerlere ulaştığı saptanmıştır.

Deney sonunda tüm deney gruplarına ait deneklerin epididimis dokuları tartılarak elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş, gruplar arası duktus epididimis ağırlık değerlerinde bir anlamlılık saptanmamıştır. Ancak yapılan ölçümler değerlendirildiğinde, en fazla ağırlık ortalama değerinin fruktoz uygulanan grupta olduğu gözlenmiştir. Melatonin uygulanan gruplarda ise kontrol ağırlık değerlerine yakın değerler izlenmiştir.

Literatürde yer alan önceki çalışmalarda 2 ve 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dozlarda BPA 'ya maruz bırakılan Wistar türü ratlarda, testis ve epididimis ağırlığında azalma ve sperm sayısı ile motilitede düşüş olduğu belirtilmiştir. Yine farklı bir çalışmada erkek farelerde 25 ve 100 ng/kg olmak üzere farklı dozlardaki BPA'ya etkin kalma vücut ağırlığı, testikular ve epididimal sperm sayısında belirgin azalmaya neden olmuştur [369, 370].

Çalışmamızda da en düşük epididimis ağırlığı BPA grubunda saptanmış, bu durumun azalmış luminal sperm içeriği ve epitelde doku kaybı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda yer alan vücut ve organ ağırlık ölçüm değerleri ve VKİ artışları göz önünde bulduğunda, BPA ve fruktozun hem tek hem de birlikte uygulanmasının obezite ve MetS arasındaki ilişkiyi destekler nitelikte olduğu görülmektedir.

İnsan yaşamını biyolojik, psikolojik ve sosyokültürel gibi çeşitli açılardan etkileyen başlıca sağlık sorunlarından biri infertilitedir ve bu vakaların yaklaşık % 50'si erkek üreme sağlığı ile ilişkilidir [371-373]. Erkek infertilitesine neden olan faktörler arasında, maruz kalınan

çevresel toksik maddeler gelmektedir [373-374]. Bisfenol A önemli çevresel kontaminantlardan biridir ve bilim dünyasında erkek üreme sistemi üzerine olan etkileri ile ilgili olarak, uygulama şekli ve dozu, etkin kalma ve yaş gibi değişen parametreler ile birlikte birçok çalışma yer almaktadır.

Ghazzawy ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 13-15 haftalık erkek albino ratlara 8 hafta boyunca mısır yağında çözölmüş 20 µg/kg BPA gavaj yolu ile uygulanmıştır. Epididimisin histolojik değerlendirilmesi sonucu, epitelde morfolojik değişimler izlenmiş, intertübüler alanda geniş boşluklara rastlanmıştır. Bazı hücrelerde sitoplazmik vakuolizasyona gözlenmiştir. Kaudal sperm sayısı ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak saptanmıştır [375].

Chitra ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise Wistar türü 45 günlük sıçanlara oral olarak 60 gün boyunca 0,2; 2 ve 20 µg/kg/gün dozlarında BPA uygulanmış epididimisin kaput, korpus ve kauda bölümlerinde epididimal epitelde dejenerasyonun yanı sıra sperm sayısında azalma gözlenmiştir. Bisfenol A, epididimal sperm viabilitesini önemli ölçüde değiştirmezken, buna karşın sperm motilitesi ve sayısını, kontrol gruplarına oranla doz bağımlı şekilde azaltmıştır [370].

Bu çalışmada da, BPA grubuna ait sıçan duktus epididimis dokusunda çeşitli histopatolojik değişimler izlenmiştir. Epididimal tübüllerde kontrol ve fruktoz grubuna göre morfolojik düzensizlikler, intertübüler alanda bağ dokusu yapısında ileri derecede bozulmalar olduğu dikkati çekmiştir. Masson' s trikrom boyaması sonucu yapılan değerlendirmede kollagen lif yoğunluğunun özellikle BPA uygulanan grupta azaldığı, melatonin uygulanan grupta ise kollajen lif yoğunluğundaki artış dikkati çekmiştir. Gümüş impregnasyon bulguları değerlendirildiğinde ise BPA grubunda retiküler lif düzenleniminin diğer gruplara göre daha yoğun olduğu izlenmiş, BPA grubundaki bazal membrandaki kalınlaşmanın bununla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. İntertübüler alandaki bağ doku kaybı bu histokimyasal yöntemde de izlenmiştir.

Yalancı çok katlı stereosilyalı epitel oluşturarak esas hücrelerin arasında çekirdek ve sitoplazma sınırları net olarak ayırt edilemeyen, yer yer kribriform görünüm alan hücrelerin varlığı saptandı. Stereosilyaların kontrol ve fruktoz grubuna göre daha kısa ve küt hale geldiği, bazı alanlarda seyrekleştiği ve bazı tubüllerde luminal sperm yokluğu

dikkat çeken bulgular arasındaydı. Fruktoz + BPA grubunda da benzer histopatolojik bulgulara rastlanmış, melatonin uygulanması ile birlikte BPA ve fruktoz uygulanan gruplara göre epididimal histolojik yapının korunmuş olduğu gözlenmiştir. Bazı tübüllerdeki sperm yoğunluğundaki azalma bu bulgulara eşlik etmekteydi. Ductus' ların dışındaki alanda intersitisiyel bağ dokusunun yalnızca BPA+fruktoz uygulanan gruba göre yapılanmaya başladığı, intraluminal sperm yoğunluğunun daha homojen hala geldiği ancak bazı ductus' larda ise sperm yokluğunun devam ettiği fokal alanlar gözlenmiştir.

Tüm deney gruplarında uygulanan ajanların ve antioksidanın apoptoz üzerine etkilerini göstermek için duktus epididimis dokuları Annexin V-FITC/PI ile boyanıp akım sitometri yöntemi ile analiz edildiğinde; kontrol grubuna ait apoptotik hücre yüzdesinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu gözlemlendi (tüm gruplar için $p < 0,001$).

BPA uygulanan grup ile Fruktoz uygulanan grup arasında BPA uygulanan grupta apoptotik hücre yüzdesinin daha fazla olmasından kaynaklanan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görüldü ($p < 0,001$). Fruktoz+BPA ve Fruktoz+BPA+Melatonin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ise melatonin uygulamasının apoptotik hücre yüzdesini azalmasına bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi ($p < 0,037$).

Spermin hem hareketlilik hem de fertilizasyon yeteneği kazandığı süreç olan epididimideki sperm maturasyonu erkek fertilitesi için kritik bir süreçtir Kan-epididimis bariyeri ise kan ile lümen arasındaki molekül alışverişini sınırlaması ile bu süreçte oldukça önemlidir. Bu bariyerin bileşenlerinden olan sıkı bağlantılar ve spesifik hücresel taşıyıcılar, uygun epididimal lümen düzenini oluşturarak ve luminal mikroçevrenin sürekliliğini sağlayarak sperm matürasyonuna katkı sağlamaktadır [376].

İnsanlarda, kan-epididimis bariyeri bileşenlerindeki değişimlerin fertilité ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Fertil ve azospermik infertil hastalardaki gen ekspresyonları karşılaştırıldığında Claudin 10 ve ZO-1 ekspresyonlarının değiştiği gösterilmiştir [377].

Literatürde BPA' nın epididimis üzerine olan etkilerini kan-epididimis bariyer bileşenlerinden olan sıkı bağlantı proteinleri açısından değerlendiren çalışmalara rastlanmamıştır.

Bu nedenle çalışmamızda zonula okludens proteinleri aracılığıyla, hücre iskeletine bağlı transmembran proteinlerden biri olan, epididimisin her segmentinde ekspresyonu ile dikkat çeken Claudin -1; sıkı bağlantı birimlerinin oluşumunda kritik fonksiyonel role sahip olan ZO-1 ve epididimide tanımlanan ilk sıkı bağlantı proteini olan okludinin immunreaktiviteleri değerlendirilmiştir [378-380].

İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda üç proteinin de immunreaktivite yoğunlukları deney grupları arasında benzerlik göstermiştir. Claudin-1 esas hücrelerin lateral plazma membranlarında; esas ve bazal hücreler arasında ve aynı zamanda bazal plazma membranında; ZO-1 ve okludinin ise esas hücrelerin apikal yüzeyinde lokalize olduğu görülmüştür [340].

Yapılan semikantitatif değerlendirmede üç proteinin immunreaktivitesi kontrol grubunda şiddetli/çok şiddetli izlenirken, BPA ve BPA+ Fruktöz gruplarında yoğunluğun azaldığı melatonin uygulaması ile ise immunreaktivitenin kısmen arttığı gözlenmiştir.

Cai ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, BPA benzeri bir endokrin bozucu olan ve üreme toksisitesi de dahil olmak üzere birçok olumsuz biyolojik role sahip poliklorlu bifenillerin fare duktus epididimisindeki sıkı bağlantı proteinleri üzerine olan etkileri araştırılmış, kaput epididimide Western Blot yöntemi ile ZO-1'in protein ekspresyonunun poliklorlu bifenil maruziyetinin ardından belirgin olarak azaldığı ve okludin ekspresyonunda ise anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca, histolojik kesitlerin immunohistokimyasal değerlendirmelerinde; ZO-1 ve okludin immunreaktivitelerinde önemli derecede farklılık olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak ZO-1 ekspresyonundaki azalışın, sıkı bağlantı geçirgenliğini etkileyebileceği bildirilmiştir [381].

Bu çalışmada özellikle BPA kaynaklı epididimal sıkı bağlantı proteinleri üzerindeki immunreaktivite azalışı, BPA'nın kan-epididimis bariyeri ile epitel hücreleri arasındaki düzenli mekanizmayı bozabileceğini ve luminal mikroçevrede meydana gelebilecek değişikliklerin sperm maturasyonunu etkileyebileceğini düşündürmüştür. Fakat ileri moleküler tekniklerle bu bilginin desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Yapılan birçok deneysel çalışmada BPA' nın sperm kalitesi üzerinde olumsuz etkileri olduğu gösterilmiş, ratlarda epididimal spermelerde oksidatif stresi indüklediği rapor edilmiştir [370, 382]. Sperm motilitesi, toplam sperm ve anormal sperm sayısı artan BPA konsantrasyonu ile ilişkili olarak azalmaktadır [12, 13, 373].

Çok düşük dozlarda bile BPA' ya etkin kalan işçilerde sperm sayısı azaldığı bildirilmiştir [383].

Wisniewski ve arkadaşları 5 ve 25 mg/kg/gün dozlarda BPA' ya etkin kalan yetişkin rat gruplarında total ve günlük sperm üretiminin % 50 oranında azaldığını bildirmişlerdir [11].

Bir başka çalışmada artan BPA konsantrasyonu ile birlikte anormal sperm oranı baş yokluğu ya da deformitesi şeklinde artış göstermiştir [384].

42 gün boyunca 200 mg/kg dozunda BPA'ya etkin bırakılan yetişkin Sprague- Dawley cinsi ratlarda sperm sayısı ve günlük sperm üretimi testislerde sırasıyla % 26.15 ve % 26.16 oranında azalırken, anormal spermatozoa oranı artmıştır [385].

Benzer şekilde Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada; 4 hafta boyunca 200 mg/kg BPA uygulanan rat deney gruplarında, deney sonunda oksidatif hasar düzeyleri, sperm parametreleri ve hormon düzeyleri ile histopatolojik değişimler değerlendirilmiştir. Vücut ağırlığı, sperm sayısı ve motilitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BPA' ya etkin bırakılan ratlarda 28 gün sonra azalmıştır [386].

Oral yolla 28 gün boyunca 50, 200 ve 600 µg/ kg dozlarda BPA' ya etkin bırakılan Wistar ratlar incelenmiş ve epididimal sperm sayısının 200 ve 600 µg/ kg doz gruplarında azaldığı görülmüştür. Sperm motilitesi, cansız sperm oranı ve baş ve kuyruk anomalili sperm sayıları BPA gruplarında kontrol gruplarına göre belirgin olarak artış göstermiştir [387].

50, 100 ve 200 mg/kg/gün oral yol ile 28 gün boyunca BPA' ya etkin kalan 28 günlük Wistar ratlarda vücut ağırlığında azalma gözlenmiş, testikular ağırlık 100 mg/kg/gün ve 200 mg/kg/gün dozlarına etkin kalan deneklerde azalmıştır. Bu durumun BPA 'nın spermatogenezisi inhibe ederek elonge sperm sayısını ve steroidogenik enzim aktivitesini azaltması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. 50 mg/ kg/ gün BPA grubunda ise sperm parametrelerinde ve testiste değişim gözlemlenmemiştir. Histolojik analizler sonucunda

tubul lümeninin çapı azalmış spermatogenik hücre serisine ait immatür hücreler ve makrofajlar izlenmiştir [388].

50 mg/ kg/gün ve US EPA tarafından daha düşük dozlarda BPA uygulamasının sperm kalitesini olumsuz etkilediği yönünde çalışmalar mevcuttur. Vom Saal ve Nagel tarafından yapılan çalışmalarda 20 ng/g doz ile beslenen gebe farelerin yavrularında sperm üretimi düşüş göstermiştir [247].

50 mg/kg BPA dozunda BPA 52 gün boyunca Sprague Dawley ratlara uygulanmış; vücut ağırlığı ve üreme organlarının ağırlıkları arasında fark gözlenmemiştir. Testiste spermatogonia, primer spermatosit, sekonder spermatosit ve spermatidlerin sayısında kontrol grubuna göre azalma olmuştur. BPA grubunda kaput epididimisin kanal çapında ve epitel boyunda belirgin azalma görülürken, kontrol grubunda ise epididimis ince pseudostratifiye stereosilyalı epitel ve spermatozoa ile dolu lümen görünümüyle normal morfoloji göstermiştir. BPA grubunda şekilsiz spermatozoa ile dolu lümen ile epitel kalınlığında azalma dikkati çekmiştir [389].

Erkek Wistar cinsi sıçanlara, ardışık 35 gün boyunca gavaj yolu ile farklı dozlarda (5, 25, and 125 µg/kg) BPA ve Nonylphenol (NP) uygulanmış, deney sonunda BPA ve NP' ye etkin kalma sonucunda testis ve prostat ağırlığının yanı sıra sperm sayısı ve motilitesinde de kontrol grubuna oranla belirgin düşüş gösterdiği görülmüştür. Her iki madde de doz bağımlı toksisiteye neden olmuştur [390].

Çalışmamızda da sperm yoğunluğu, motilitesi ve morfolojisinin fertilité için önemi yadsınamaz olduğundan, epididimal spermier bu parametreler yönünden değerlendirilmiştir. Düşük sperm sayısı (oligospermi), spermatozoa yokluğu (azoospermi) ve morfolojik anormallikler erkek infertilitesine katkıda bulunan başlıca faktörler arasındadır [391].

Bu patolojilerin moleküler mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır, ancak birçok çalışmada spermatogenez sırasında artmış germ hücresi ölümünün oligospermi ve azospermi hastalarında azalmış sperm sayısını açıklayabileceği belirtilmiştir. Spermatogenezis, germ hücrelerinde apoptozisi indükleyen çeşitli kimyasallar, radyasyon,

üreme ve somatik patolojiler, sıcaklık ve endokrin bozucular gibi etmenlerden etkilenmektedir [392].

Çalışmamızda total sperm sayılarında gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmese de gruplar arası ortalama değerlerde farklılık izlenmiştir ($p=0,069$) . BPA ve BPA+ Fruktöz uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre sperm sayısında belirgin azalma gözlenirken, melatonin uygulanan gruplarda ise anlamlı olmayan bir düşüş saptanmıştır.

Bir diğer parametre olan motilite, erkek ve dişi üreme sistemi yoluyla sperm taşınması için gerekli bir fonksiyondur. Önceki çalışmalarda BPA' nın ratlarda sperm motilitesini olumsuz etkilediği bildirilmiştir [393, 394]. Bu çalışmada tüm deney gruplarından elde edilen sperm motilite yüzde değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde BPA+Melatonin uygulanan grupta, BPA uygulanan gruba göre anlamlı bir artış söz konusudur ($p= 0,049$). En düşük motilite yüzdesi BPA grubunda izlenirken, fruktozun motiliteyi önemli ölçüde etkilemediği görülmüştür.

Çalışmamızda spermiyogramın bir diğer önemli bileşeni olan sperm viabilitesi (canlılık) Eosin- Nigrosin boyaması sonucunda değerlendirilmiş, kontrol grubu viabilite yüzdesinin, BPA ve BPA+ Fruktöz grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,001$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark gözlenmese de, ortalama değerlere bakıldığında canlılık yüzdeleri farklılık göstermektedir. Melatonin uygulaması ile birlikte viabilite yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir artışın olduğu saptanan bulgular arasındadır.

Canlılık değerlendirmesini başka bir teknikle desteklemek adına deney gruplarında BPA, fruktoz ve melatoninin apoptozis üzerine etkilerini göstermek için ise sperm hücreleri ayrıca Annexin V-FITC/PI ile boyanıp akım sitometri yöntemi ile analiz edildi.

Gruplar arası sperm hücrelerine ait apoptotik hücre yüzde farklılıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubuna ait apoptotik hücre yüzdesinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu belirlendi ($p=0,004$).

Fruktoz ve BPA grupları karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmese de ($p= 0,422$) BPA uygulanan gruptaki apoptotik sperm yüzdesinin daha fazla olduğu görülmüştür. Fruktoz ve Fruktoz+Melatonin grupları karşılaştırıldığında ise melatonin uygulanan grupta apoptotik sperm yüzdesinin düşmesinden kaynaklanan istatistiksel bir anlamlılık mevcuttur ($p= 0,004$). BPA ile BPA+Melatonin uygulanan grup ($p=0,006$) ve Fruktoz+BPA ile Fruktoz+BPA+Melatonin uygulanan grup karşılaştırıldığında ise ($p= 0,04$) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiş; bu farklılığın melatonin uygulamasının Annexin-V-FITC pozitif sperm yüzdesinde azalmaya sebep olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu bulgular, Othman ve arkadaşlarının belirtmiş oldukları, melatoninin BPA tarafından sperm hücrelerinde indüklenen apoptozisi azalttığı yönündeki bulguları destekler niteliktedir [31].

Sperm büyüklüğü ve şeklini tanımlayan sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik açıdan öneminin erkek infertilitesi ile ilişkisi tartışmalı olsa da yakın zamanda yapılan çalışmalarda morfolojik değerlendirme sonuçlarının fertilite için sensitif ve özgün olduğu gösterilmiştir [338, 395, 396].

Bu çalışmada, deney gruplarına ait baş, boyun ve kuyruk anomalilerine sahip sperm sayılıp gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Baş anomalisine sahip sperm sayısının Fruktoz, BPA ve BPA+Fruktoz gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, (Sırasıyla; $p=0,033$; $p=0,007$ ve $p= 0,000$) BPA+ Fruktoz grubu ile BPA+Fruktoz+ Melatonin grubu karşılaştırıldığında baş anomalili sperm sayısının anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p= 0,018$).

Boyun anomalisine sahip sperm sayısında gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p= 0,062$).

Kuyruk anomalili sperm sayılarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda ise kuyruk anomalili sperm sayısı BPA ve BPA+Fruktoz gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiştir (sırasıyla; $p= 0,020$, $p= 0,013$). BPA+ Fruktoz grubunda ise BPA+Fruktoz+ Melatonin grubuna göre kuyruk anomalili sperm sayısı anlamlı olarak yüksek izlenmiştir ($p= 0,020$).

Birçok çalışmada da belirtildiği şekilde, normal morfolojiye sahip sperm sayısı infertil hasta grubunda daha düşüktür ve bu durum sperm morfolojisinin erkek fertilitésinin değerlendirilmesinde önemli bir etken olduğunu göstermektedir [397]. Özellikle baş ve sarmal kuyruk anomalileri testikuler hasarda görülen tipik anomali tipleridir [398].

Normal baş morfolojisine sahip sperm gelişimi poligenetik faktörlerle kontrol edilmektedir. Çeşitli anomalilere sahip sperm sayısındaki artış ise BPA' nın germ hücreleri üzerinde etkili olan genotoksik etkisi ile ilişkilendirilebilir [399].

Bu çalışmada da BPA gruplarında kontrol grubuna göre artan baş ve kuyruk anomalilerine sahip sperm sayısı, yine aynı gruplarda görülen total sperm sayısının ve motilite yüzdesinin düşüklüğü ile korelasyon göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Eksojen endokrin bozucular ve günlük hayatta tüketimi giderek artan yüksek fruktoz içerikli gıdalar, üreme organları üzerinde çeşitli olumsuz etkilere sahiptir ve bu alandaki çalışmalar giderek hız kazanmaktadır. Bu çalışmada, eksojen endokrin bozucuların başında gelen BPA ve tüketim gıdalarının içeriğinde önemli bir yere sahip fruktozun epididimis histolojik yapısı ve sperm morfolojisi, sayısı ve canlılığı üzerinde olumsuz etkilere sebep olduğu izlenmiştir. Söz konusu etken maddelerin oluşturduğu histolojik ve yapısal değişimler ve ileriye dönük MetS gelişimine neden olabileceği göz önüne bulundurulduğunda, eksojen olarak uygulanan melatoninin oluşan etkileri kısmen önleyebildiği çeşitli yöntemlerle gösterilmiştir.

Çalışmada elde edilen immunohistokimyasal sonuçlar aynı belirteçlerin ileri moleküler teknikler kullanılmasıyla kantitatif olarak desteklenmelidir. Multidisipliner çalışmalar ile birlikte melatoninin sahip olduğu birçok önemli özelliğe ek olarak bu alandaki etkinliği ve infertilite ile ilgili sorunlarda kullanımına yönelik olarak önem kazanabilir.

KAYNAKLAR

1. Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice* , 2014:943162.
2. Isomaa, B. (2001). Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, 24, 683 -689.
3. Grundy, S.M. and Hansen, B. (2004). Clinic Management of the Metabolic Syndrome, Report of the American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute/American Diabetes Association Conference on Scientific Issues Related to Management. *Circulation*, 109, 551-556.
4. Bigsby, R., Chapin, R.E., Daston, G.P., Davis B.J., Gorski, J., Gray, L.E., Howdeshell, K.L., Zoeller, R.T. and vom Saal, F.S. (1999). Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environmental Health Perspectives*, 107, 613-8.
5. Lee, M.M. (2007). Endocrine Disrupters. *A Current Review of Pediatric Endocrinology*, 2007, 109-118.
6. Akyuz, S., Yarat, A. ve Egil, E. (2011). Bisfenol-A İçerikli Dental Materyallere Güncel Yaklaşım. *Journal Of Marmara University Institute Of Health Sciences*, 1(3): 190-195.
7. Quitmeyer, A. and Roberts, R. (2007). Babies, Bottles, and Bisphenol A: The Story of a Scientist-Mother. *PLOS Biology*, 5(7), e200.
8. Rosenfeld, C.S. (2015). Bisphenol A and phthalate endocrine disruption of parental and social behaviors. *Frontiers in Nutrition*, 9, 57.
9. Konduracka, E., Krzemieniecki, K. and Gajos, G. (2014). Relationship between everyday use cosmetics and female breast cancer. *Polish Archives of Internal Medicine*, 124(5), 264-9.
10. Vandenberg, L., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N. and Welshons, W. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 24, 139–177.
11. Wisniewski, P., Romano, R.M., Kizys, M.M.L., Oliveira, K.C., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M.I., Dias-da-Silva, M.R. and Romano, M.A. (2015) . Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic–pituitary–testicular axis. *Toxicology*, 329, 1–9.
12. Li, D.K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Wang, J., Ferber, J., Herrinton, L.J., Gao, E. and Yuan, W. (2011) . Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertility and Sterility*, 95, 625–630.
13. Meeker, J.D., Calafat, A.M. and Hauser, R. (2010) . Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environmental Science & Technology*, 44, 1458–1463.

14. Tappy, L. and Le, K.A. (2010). Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiological Reviews*, 90(1), 23-46.
15. Tran, L.T., Yuen, V.G. and McNeill, J.H. (2009). The fructose-fed rat: A review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 332, 145-159.
16. Bizeau, M.E. and Pagliassotti, M.J.(2005). Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 54, 1189–1201.
17. Havel, P.J. (2005). Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutrition Reviews*, 63, 133–157.
18. Kasturi, S.S. Tannir, J. and Brannigan, R.E. (2008). The metabolic syndrome and male infertility. *Journal of Andrology*, 29, 251-259.
19. Ozan, G., Kaya, N., Yılmaz, O.F. , Erdem, E. ve Ozan, E. (2014). Yüksek Fruktöz Diyeti ile Metabolik Sendrom Oluşturulan Ratların Testis Dokusunda Ghrelin Dağılımına Oleuropeinin Etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 28, 127–133.
20. Morrison, C.D. and Brannigan, R.E. (2015). Metabolic syndrome and infertility in men. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 29, 507-15.
21. Agbaje, I.M., Rogers, D.A., Mcvicar, C.M., McClure, N., Atkinson, A.B., Mallidis, C. and Lewis, S.E. (2007). Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Human Reproduction*, 22, 1871e7.
22. Morgante, G., Tosti, C., Orvieto, R., Musacchio, M.C., Piomboni, P. and De Leo, V. (2011). Metformin improves semen characteristics of oligo-terato-asthenozoospermic men with metabolic syndrome. *Fertility and Sterility*, 95, 2150-2.
23. Gitto, E., Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Barberi, I., Salpietro, C. and Reiter, R.J. (2013). Protective role of melatonin in neonatal diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 980374.
24. Maronde, E. and Stehle, J.(2007). The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. *Trends Endocrinology Metabolism*, 18, 142–149.
25. Pandi Perumal, S.R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J.M., Zisapel, N. and Cardinali, D.P. (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*, 85, 335–353.
26. Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Mayo, J.C. and Sainz, R.M. (2009). Melatonin and reproduction revisited. *Biology of Reproduction*, 81, 445–456.
27. Vriend, J. and Reiter, R.J. (2015). Melatonin feedback on clock genes: a The ory involving the proteasome. *Journal of Pineal Research*, 58, 1–11.

28. Manchester, L.C., Coto-Montes, A., Boga, J.A., Andersen, L.P.H., Zhou, Z., Galano, A. Vriend, J., Tan, D.X. and Reiter, R.J. (2015). Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *Journal of Pineal Research*, 59, 403–419.
29. Li, C. and Zhou, X. (2015). Melatonin and male reproduction. *Clinica Chimica Acta*, 15, 175-80.
30. Chengmin, W., Wenjuan, F., Chao, Q., Maosheng, Y., Changjiang, L., Suqin, Q. and Kedi, Y. (2014). The Role of Pten/Akt Signaling Pathway Involved in BPA-Induced Apoptosis of Rat Sertoli Cells. *Environmental Toxicology*, 30, 793-802.
31. Othman, A., Edrees, G.M., El-Missiry, M.A., Ali, D.A., Aboel-Nour, M. and Dabdoub, B.R. (2016). Melatonin controlled apoptosis and protected the testes and sperm quality against bisphenol A-induced oxidative toxicity. *Toxicology and Industrial Health*, 32, 1537-49.
32. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2011). *Histology A Text and Atlas*, (6.Edition). Lippincot Williams & Wilkins, 729-747.
33. Moore, K. L. and Persaud, T.V.N. (2009). *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. (Çev. H. Dalçık, M. Yıldırım) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, (Eserin orijinali 2008'de yayımlandı). 378-381.
34. Sadler, T.W. (2011). *Langman's Medikal Embriyoloji*. (Çev. A.Can Başaklar) Palme Yayınları, (Eserin orijinali 2009'da yayımlandı), 246-261.
35. Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. (Çev. Ramazan Demir). Ankara: Palme Yayınları. (Eserin orijinali 2002'de yayımlandı). 531-564.
36. Mitchell, T. R. and Larson, J. R. (1987). *People in organizations* (Third edition). New York: Mc Graw-Hill, 87,92.
37. Fritsch, H. and Kuehnel, W. (2013). *İnsan Anatomisi Renkli Atlası, İç Organlar* (Çev. Kopuz, C.) İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi. (Eserin orijinali 2008' de yayımlandı). 248-262.
38. Gartner, L.P. and Hiatt, J.L. (2007). *Color Textbook of Histology*, (3. Edition). USA: Elsevier's, 489-500.
39. Junqueira, L.C. and Carneiro, J. (2006) *Temel Histoloji*. (Çev. S. Solakoğlu ve Y. Aytekin). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. (Eserin orijinali 2003'te yayımlandı). 432-443.
40. Ovalle, W.K. and Patrick, C.N. (2009). *Netter Temel Histoloji*. (Çev. S. Müftüoğlu, P. Atilla ve F. Kaymaz). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri. 378-388.
41. Hinton, B.T., Galdamez, M.M., Sutherland, A., Bomgardner, D., Xu, B., Abdel-Fattah, R. and Yang, L. (2011). How Do You Get Six Meters of Epididymis Inside a Human Scrotum? *Journal of Andrology*, 32, 558-64.

42. Lan, Z.J., Labus, J.C. and Hinton, B.T. (1998). Regulation of Gamma-Glutamyl Transpeptidase Catalytic Activity and Protein Level in the Initial Segment of the Rat Epididymis by Testicular Factors: Role of Basic Fibroblast Growth Factor. *Biology of Reproduction*, 58, 197-206.
43. Robaire, B., Hinton, B.T. and Orgebin-Crist, M.C. (2006). *The Epididymis*. In: The physiology of reproduction New York: Elsevier, 1071-1148.
44. Robaire, B., Syntin, P. and Jervis, K. (2000). *The coming of age of the epididymis*. In: Testis, Epididymis and Technologies. New York: Springer, 229- 262.
45. Hinton, B.T. (1985). Physiological aspects of the blood– epididymis barrier. In *Male Fertility and its Regulation* (T. J. Lobl and E. S. E. Hafez, Eds.), pp. 371–382. MTP Press, Boston.
46. Hinton, B. T. and Palladino, M. A. (1995). Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microscopy Research and Technique*, 30, 67–81.
47. Arıncı, K. and Elhan, A. (2006). *Anatomi*, 1. cilt, 4. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 322-337.
48. Turgut, H. B. (Editör). (2014). *Anatomi Uygulama Kitabı*, Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, 132-136.
49. İnternet: Epididyme URL: <http://global.britannica.com/science/epididyme>. Son Erişim Tarihi: 18.03.2016
50. Ozan, H. (2014). *Premium Anatomi*, Ankara: Klinisyen Tıp Kitabevleri, 305-311.
51. Cornwall, G.A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction*, 15, 213-27.
52. Umar, A., Ooms, M.P., Luijck, T.M., Grootegeed, J.A. and Brinkmann, A.O. (2003). Proteomic Profiling of Epididymis and Vas Deferens: Identification of Proteins Regulated during Rat Genital Tract Development. *Endocrinology*, 144, 4637-47.
53. Dacheux, J.L., Castella, S., Gatti, L.J. and Dacheux, F. (2005). Epididymal cell secretory activities and the role of the proteins in boar sperm epididymis. *Theriogenology*, 63, 319-41.
54. França, L.R., Avelar, G.F. and Almeida, F.F.L. (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63, 300-18.
55. Robaire, B. and Henderson, N.A. (2006). Actions of 5 α -reductase inhibitors on the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250, 190-5.
56. Jégou, B., Pineau, C. and Saez, J.(Eds) . (2000). *The coming of age of the epididymis*. New York: Springer-Verlag, 229–262.

57. Kirchhoff, C. (2002). Specific gene expression in the human and non-human primate epididymis. In Robaire, B. , Hinton, B. T. (Eds.) *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum, 201–218.
58. Dacheux, J. L. and Dacheux, F. (2002). Protein secretion in the epididymis. In Robaire, B. , Hinton, B. T. (Eds.) *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum, 151–168.
59. Suzuki, F. and Nagano, T. (1978). Development of tight junctions in the caput epididymal epithelium of the mouse. *Developmental Biology*, 63, 321–334
60. Adamali, H. I. and Hermo, L. (1996). Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *Journal of Andrology*, 17, 208–222.
61. Serre, V. and Robaire, B. (1998). Segment specific morphological changes in the aging brown Norway rat epididymis. *Biology of Reproduction*, 58, 497–513
62. Hermo, L., Adamali, H. I. and Andonian, S. (2000). Immunolocalization of CA II and H⁺ V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *Journal of Andrology*, 21, 376–391.
63. Robaire, B. and Hermo, L. (1988). Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. In E. Knobil, , J. Neill, (Eds)*The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. 999–1080.
64. Hamilton, D.W. (1975). Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens in the rat. In R. O. Greep, E. B. Astwood, (Eds.), *Handbook of Physiology*. Washington, DC: American Physiological Society. 259–301.
65. Hermo, L., Dworkin, J. and Oko, R. (1988). Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *American Journal of Anatomy*, 183, 107–124.
66. Moore, H. D. M. and Bedford, J. M. (1979). Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anatomical Record Journal*, 193, 293–311.
67. Oko, R., Hermo, L., Chan, P. T., Fazel, A. and Bergeron, J. J. (1993). The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. *The Journal of Cell Biology*, 123, 809–821.
68. Flickinger, C. J., Herr, J. C. and Klotz, K. L. (1988). Immunocytochemical localization of the major glycoprotein of epididymal fluid from the cauda in the epithelium of the mouse epididymis. *Cell. Tissue Research*, 251, 603–610.
69. Vierula, M.E., Rankin, T.L. and Orgebin-Crist, M.C. (1995). Electron microscopic immunolocalization of the 18 and 29 kilodalton secretory proteins in the mouse epididymis: evidence for differential uptake by clear cells. *Microscopy Research and Technique*, 30, 24–36.

70. Jensen, L. J., Stuart-Tilley, A. K., Peters, L. L., Lux, S. E., Alper, S. L. and Breton, S. (1999). Immunolocalization of AE2 anion exchanger in rat and mouse epididymis. *Biology of Reproduction*, 61, 973–980.
71. Pastor-Soler, N., Beaulieu, V., Litvin, T. N., Da Silva, N., Chen, Y., Brown, D., Buck, J., Levin, L. R. and Breton, S. (2003). Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 49523–49529.
72. Isnard-Bagnis, C., Da Silva, N., Beaulieu, V., Yu, A. S., Brown, D., and Breton, S. (2003). Detection of ClC-3 and ClC-5 in epididymal epithelium: immunofluorescence and RT-PCR after LCM. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 284, 220–232.
73. Friend, D.S. and Gilula, N.B. (1972). Variations in tight junctions and gap junctions in mammalian tissues. *The Journal of Cell Biology*, 53, 758–776.
74. Cyr, D.G., Robaire, B. and Hermo, L. (1995). Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microscopy Research and Technique*, 30, 54–66.
75. Agarwal, A. and Hoffer, A. P. (1989). Ultrastructural studies on the development of the blood–epididymis barrier in immature rats. *Journal of Andrology*, 10, 425–431.
76. Gregory, M. and Cyr D.G. (2014). The blood-epididymis barrier and inflammation. *Spermatogenesis*, 4, e979619.
77. Qiu, J., Hales, B.F. and Robaire, B. (1992). Adverse effects of cyclophosphamide on progeny outcome can be mediated through post-testicular mechanisms in the rat. *Biology of Reproduction*, 46, 926–931.
78. Farquhar, M.G. and Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of Cell Biology*, 17, 375– 412.
79. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2011). *Histology A Text and Atlas*, (6.Edition). Lippincot Williams & Wilkins, 121-133.
80. Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. and Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, 156, 1099- 111.
81. Aaron Runkle, E. and Mu, D. (2013). Tight Junction Proteins: From Barrier to Tumorigenesis. *Cancer Letters*, 337, 41–48.
82. Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., and Tsukita, S. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family, *FEBS Letters*, 585, 606-12.
83. Van Meer, G., Gumbiner, B. and Simons, K. (1986). The tight junction does not allow lipid molecules to diffuse from one epithelial cell to the next. *Nature*, 322, 639–641.

84. Balda, M.S., Garrett, M.D. and Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *The Journal of Cell Biology*, 160, 423–432.
85. Gumbiner, B., Lowenkopf, T. and Apatira, D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 3460–3464.
86. Woods, D.F. and Bryant, P.J. (1993). ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. *Mechanisms of Development*, 44, 85–89.
87. Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation, *Cell*, 126, 741–754.
88. Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., Tsukita, S. and Tsukita, S. (2008) Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 2465–2475.
89. Xu, J., Kausalya, P.J., Phua, D.C., Ali, S.M., Hossain, Z. and Hunziker, W. (2008). Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Molecular and Cellular Biology*, 28, 1669–1678.
90. Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of Cell Biology*, 123, 1777–1788.
91. Aijaz, S., Balda, M.S. and Matter, K. (2006) . Tight junctions: molecular architecture and function. *International Review of Cytology Journal*, 248, 261–298.
92. Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. (Çev. Ramazan Demir). Ankara: Palme Yayınları. (Eserin orijinali 2002’de yayımlandı). 13-19.
93. Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular Biology of the Cell*, 11, 4131–4142.
94. Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B.E. (2003). Tight junction proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 81, 1– 44.
95. Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *Journal of Cell Biology*, 141, 1539–1550.
96. Günzel, D. and Yu, A.S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological Reviews*, 93, 525-69.

97. Ding, L., Lu, Z., Lu, Q. and Chen, Y.H. (2013). The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. *Cancer Management and Research*, 5, 367-75.
98. Coyne, C.B., Gambling, T.M., Boucher, R.C., Carson, J.L. and Johnson, L.G. (2003). Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285, 1166-78.
99. Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M. and Tsukita, S. (2003). Size- selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, 161, 653-60.
100. Soini, Y. (2005). Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology*, 46, 551-60.
101. Fritzsche, F.R., Oelrich, B., Johannsen, M., Kristiansen, I., Moch, H., Jung, K. and Kristiansen, G. (2008). Claudin-1 Protein Expression is a Prognostic Marker of Patient Survival in Renal Cell Carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 14, 7035-42.
102. Van Itallie, C.M. and Anderson, J.M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review Of Physiology Journal*, 68, 403–29.
103. Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A. and Balda, M.S. (2005). Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Current Opinion in Cell Biology*, 17, 453–8.
104. Demirpençe, Ö., Gündüz, Ş. and Yıldırım, M. (2015). An Important Member of Tight Junctions: Claudins. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 6, 583-586.
105. Cyr, D.G., Dufresne, J., Pillet, S. and Hermo, L. (2001). Immunolocalization and regulation of metallothionein in the rat epididymis. *Journal of Andrology*, 22, 124–135.
106. Cyr, D.G., Finnson, K.W., Dufresne, J. and Gregory, M. (2001). Cellular interactions and the blood–epididymal barrier. In: Robaire, B., Hinton, B.T., (eds). *The epididymis: From molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Press. 103–118.
107. Gregory, M. and Cyr, D.G. (2006) Identification of multiple claudins in the rat epididymis. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 580-8.
108. Lehninger, A., Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2005). *Lehninger's Principles of Biochemistry*. New York: W. H Freeman and Company, 235-239.
109. İnternet: URL:
<http://classes.midlandstecH&Edu/carterp/courses/bio210/chap02/chap02.html> Son
 Erişim Tarihi: 16.04.2017.
110. Park, K.Y. and Yetley, A.E. (1993). Intakes and food sources of fructose in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58, 737-747.

111. Kretchmer, N. and Hollenbeck, C.B. (Eds.) (1991). *Sugars and Sweeteners*. USA: CRC Press, Inc. 297.
112. Parker, K., Salas, M. and Nwosu, V.C. (2010) . High fructose corn syrup: Production, uses and publichealth concerns. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 5, 71 – 78.
113. Bocarsly, M.E., Powell, E.S., Avena, N.M. and Hoebel, B.G. (2010). High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97, 101-6.
114. Ross, A.P., Bartness, T.J., Mielke, J.G. and Parent,. M.B. (2009). A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 410–416.
115. Korkmaz, A. (2008). Fruktoz; Kronik Hastalıklar İçin Gizli Bir Tehdit. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 7(4), 343-346.
116. Lê, K.A. and Tappy, L. (2006). Metabolic effects of fructose. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 9, 469-475.
117. Hallfrisch, J. (1990). Metabolic effects of dietary fructose. *The FASEB Journal*, 4, 2652- 2660.
118. Corpe, C.P., Burant, C.F. and Hoekstra, J.H. (1999). Intestinal fructose absorption: clinical and molecular aspects. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 28, 364–374.
119. Douard, V. and Ferraris, R.P. (2008). Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 295, 227–237.
120. Kneepkens, C.M., Vonk, R.J. and Fernandes, J. (1984). Incomplete intestinal absorption of fructose. *Archives of Disease in Childhood*, 59, 735–738.
121. Ravich, W.J., Bayless, T.M. and Thomas, M. (1983). Fructose: incomplete intestinal absorption in humans. *Gastroenterology*, 84, 26–29.
122. Ferraris, R.P., Hsiao, J., Hernandez, R. and Hirayama, B. (1993). Site density of mouse intestinal glucose transporters declines with age. *American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology*, 264, 285–293.
123. Perin, N., Keelan, M., Jarocka-Cyrta, E., Clandinin, M.T. and Thomson, A.B. (1997). Ontogeny of intestinal adaptation in rats in response to isocaloric changes in dietary lipids. *American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology*, 273, 713–720.
124. Bjorkman, O., Crump, M. and Phillips, R.W. (1984). Intestinal metabolism of orally administered glucose and fructose in Yucatan miniature swine. *Journal of Nutrition*, 114, 1413–1420.

125. Koeppen, B.M. and Stanton, B.A. (2010). *Berne & Levy Physiology*, 6th Edition. USA: Mosby, 485-542.
126. Choi, Y.K., Johlin, F.C., Summers, R.W., Jackson, M. and Rao, S.S. (2003). Fructose intolerance: an under-recognized problem. *The American Journal of Gastroenterology*, 98, 1348-1353.
127. Macdonald, I., Keyser, A. and Pacy, D. (1978). Some effects in man, of varying the load of glucose, sucrose, fructose or sorbitol on various metabolites in blood. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 31, 1305-11.
128. Kolderup, A. and Svihus, B. (2015). Fructose Metabolism and Relation to Atherosclerosis, Type 2 Diabetes, and Obesity. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2015,823081.
129. Mayes, P.A. (1993). Intermediary metabolism of fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58, 754-65.
130. Rutledge, A.C. and Adeli, K. (2007). Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutrition Reviews*, 65,13-23.
131. Stanhope, K.L. and Havel, P.J. (2008). Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Current Opinion in Lipidology*, 19, 16-24.
132. Alan, R. and Gaby, M.D. (2005). Adverse Effects of Dietary Fructose. *Alternative Medicine Review*, 10, 294-306.
133. Tounian, P., Schneiter, P., Henry, S., Je'quier, E. and Tappy, L. (1994). Effects of infused fructose on endogenous glucose production, gluconeogenesis and glycogen metabolism in healthy humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 267, 710–717.
134. Corpe, C.P., Bovelander, F.J., Munoz, C.M., Hoekstra, J.H., Simpson, I.A., Kwon, O., Levine, M. and Burant, C.F. (2002) .Cloning and functional characterization of the mouse fructose transporter, GLUT5. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1576, 191–197.
135. Bjorkman, O., Gunnarsson, R., Hagstro'm, E., Felig, P. and Wahren, J. (1989). Splanchnic and renal exchange of infused fructose in insulin-deficient type 1 diabetic patients and healthy controls. *The Journal of Clinical Investigation*, 83, 52–59.
136. Litherland, G.J., Hajduch, E., Gould, G.W. and Hundal, H.S. (2004) .Fructose transport and metabolism in adipose tissue of Zucker rats: diminished GLUT5 activity during obesity and insulin resistance. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 261, 23–33.
137. Ahlborg, G. and Bjorkman, O. (1990). Splanchnic and muscle fructose metabolism during and after exercise. *Journal of Applied Physiology*, 69, 1244–1251.

138. Adopo, E., Peronnet, F., Massicotte, D., Brisson, G.R. and Hillaire Marcel, C. (1994). Respective oxidation of exogenous glucose and fructose given in the same drink during exercise. *Journal of Applied Physiology*, 76, 1014– 1019.
139. Jandrain, B.J., Pallikarakis, N., Normand, S, Pirnay, F. Lacroix, M., Mosora, F., Pachiaudi, C., Gautier, J.F., Scheen, A.J. and Riou, J.P. (1993). Fructose utilization during exercise in men: rapid conversion of ingested fructose to circulating glucose. *Journal of Applied Physiology*, 74, 2146– 2154.
140. Jeukendrup, A.E. (2004). Carbohydrate intake during exercise and performance. *Nutrition*, 20, 669–677.
141. Fujisawa, T., Mulligan, K., Wada, L., Schumacher, L., Riby, J. and Kretchmer, N. (1993). The effect of exercise on fructose absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58, 75-9.
142. Jentjens, R.L., Moseley, L., Waring, R.H., Harding, L.K. and Jeukendrup, A.E. (2004). Oxidation of combined ingestion of glucose and fructose during exercise. *Journal of Applied Physiology*, 96, 1277–1284.
143. Wallis, G.A., Rowlands, D.S., Shaw, C., Jentjens, R.L. and Jeukendrup, A.E. (2005). Oxidation of combined ingestion of maltodextrins and fructose during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 37, 426–432.
144. Mitsui, T., Shimaoka, K., Kanao, Y. and Kondo, T. (2001). Colonic fermentation after ingestion of fructose-containing sports drink. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 41, 121–123.
145. Kazumi, T., Vranic, M. and Steiner, G. (1986). Triglyceride kinetics: effects of dietary glucose, sucrose, or fructose alone or with hyperinsulinemia. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 250, 325–330.
146. Chong, M.F., Fielding, B.A. and Frayn, K.N. (2007). Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *American journal clinical nutrition citation*, 85, 1511–1520.
147. Parks, E.J., Skokan, L.E., Timlin, M.T. and Dingfelder , C.S. (2008) .Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. *Journal of Nutrition*, 138,1039–1046.
148. Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Tomita, S., Sekiya, M., Hasty, A., Nakagawa, Y., Sone, H., Toyoshima, H., Ishibashi S., Osuga, J. and Yamada, N. (2004). Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes*, 53, 560-9.
149. Shimomura, I., Bashmakov, Y. and Horton, J.D. (1999). Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two Mouse models of diabetes mellitus. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 30028–30032.
150. Denechaud, P.D., Dentin, R., Girard, J. and Postic, C. (2008). Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Letters*, 582, 68–73.

151. Koo, H.Y., Wallig, M.A., Chung, B.H., Nara, T.Y., Cho, B.H. and Nakamura, M.T. (2008). Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta Journal*, 1782, 341–348.
152. Unger, R.H. (2003). Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology*, 144, 5159–5165.
153. Le, K.A., Ith, M., Kreis, R., Faeh, D., Bortolotti, M., Tran, C., Boesch, C. and Tappy, L. (2009) .Fructose over consumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 1760–1765.
154. Randle, P., Garland, P., Hales, C. and Newsholme, E. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *The Lancet*, 1, 785–789.
155. Shulman, G. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 106, 171–176.
156. Johnson, R.J., Perez-Poro, S.E., Sautin, Y.Y., Manitius, J., Sanchez-Lozada, L.G., Feig, D.I., Shafiu, M., Segal, M., Glasscock, R.J., Shimada, M., Ronchal, C. and Nakagawa, T.(2009). Hypothesis: Could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocrine Reviews*, 30, 96-116.
157. Abdulla, M.H., Sattar, M.A. and Johns, E.J. (2011).The relation between fructose induced metabolic syndrome and altered renal haemodynamic and excretory function in the rat. *International Journal of Nephrology*, 2011, 934659.
158. Reiser, S. (1985). Effect of dietary sugars on metabolic risk factors associated with heart disease. *Nutrition and Health*, 3, 203–216.
159. Pietro, C., Sato, W., Reungjui, S., Heinig, M., Gersch, M., Sautin, Y., Nakagawa, T. and Johnson, R.J. (2006) . Uric Acid, the Metabolic Syndrome, and Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17, 165-168.
160. Choi, H.K. and Curhan, G. (2008). Soft drinks, fructose consumption, and the risk of gout in men: prospective cohort study. *British Medical Journal*, 336, 309–312.
161. Taylor, E.N. and Curhan, G.C. (2008). Fructose consumption and the risk of kidney stones. *Kidney International*, 73, 207–212.
162. Reaven, G.M. (1995). Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiological Reviews*, 75, 473–486.
163. Dehghan, A., van Hoek, M., Sijbrands, E.J., Hofman, A. and Witteman, J.C. (2008). High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 31, 361–362.
164. Baron, A.D., Steinberg, H.O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A. and Brechtel, G. (1995). Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation contributes to both insulin

- sensitivity and responsiveness in lean humans. *Journal of Clinical Investigation*, 96, 786–792.
165. Steinberg, H.O., Brechtel, G., Johnson, A., Fineberg, N. and Baron, A.D. (1994) .Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *Journal of Clinical Investigation*, 94, 1172–1179.
 166. Brandstatter, A., Kiechl, S., Kollerits, B., Hunt, S.C., Heid, I.M., Coassin, S., Willeit, J., Adams, T.D., Illig, T., Hopkins, P.N. and Kronenberg, F. (2008) .Sex-specific association of the putative fructose transporter SLC2A9 variants with uric acid levels is modified by BMI. *Diabetes Care*, 31, 1662–1667.
 167. Johnson, R.J., Nakagawa, T., Sanchez-Lozada, L.G., Shafiu, M., Sundaram, S., Le, M., Ishimoto, T., Sautin, Y.Y. and Lanaspá, M.A. (2013). Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes*, 62, 3307-15.
 168. Hwang, I.S., Ho, H., Hoffman, B.B. and Reaven, G.M. (1987). Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*, 10, 512–516.
 169. Hwang, I.S., Huang, W.C., Wu, J.N., Shian, L.R. and Reaven, G.M. (1989) .Effect of fructose-induced hypertension on the renin-angiotensin-aldosterone system and atrial natriuretic factor. *American Journal of Hypertension*, 2, 424– 427.
 170. Reaven, G.M. (1991) .Insulin resistance, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia in the etiology and clinical course of hypertension. *American Journal of Medicine*, 90, 7–12.
 171. Rocchini, A.P., Katch, V., Kveselis, D., Moorehead, C., Martin, M., Lampman, R. and Gregory, M. (1989). Insulin and renal sodium retention in obese adolescents. *Hypertension*, 14, 367–374.
 172. Vasdev, S., Longerich, L. and Gill, V. (2004) .Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. *Clinical Biochemistry*, 37, 1–9.
 173. Yudkin, J. (1967). Evolutionary and historical changes in dietary carbohydrates. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 20, 108–15.
 174. Jürgens, H., Haass, W., Castañeda, T.R., Schürmann, A., Koebnick, C., Dombrowski, F., Otto, B., Nawrocki, A.R., Scherer, P.E., Spranger, J., Ristow, M., Joost, H.G., Havel, P.J. and Tschöp, M.H. (2005). Consuming fructose sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obesity Research*, 13, 1146 –56.
 175. Basciano, H., Federico, L. and Adeli, K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism Journal*, 21, 5.
 176. Shapiro, A., Mu, W., Roncal, C., Cheng, K.Y., Johnson, R.J. and Scarpace, P.J. (2008). Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 295, 1370-5.

177. Stark, A.H., Timar, B. and Madar, Z. (2000). Adaptation of Sprague Dawley rats to long-term feeding of high fat or high fructose diets. *European Journal of Nutrition*, 39, 229-34.
178. Zarfeshani, A., Abd Mutalib, M.S. and Khaza'ai, H. (2012). Evaluating of High Fructose Diet to Induce Hyperglycemia and its Inflammatory Complications in Rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11, 21-6.
179. Nakagawa, T., Hu, H., Zharikov, S., Tuttle, K.R., Short, R.A., Glushakova, O., Ouyang, X., Feig, D.I., Block, E.R., Herrera-Acosta, J., Patel, J.M. and Johnson, R.J. (2006). A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *American Journal Physiology Renal Physiology*, 290, 625–31.
180. Miller, A. and Adeli, K. (2008) Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24, 204-209.
181. Alberti, K.G. and Zimmet, P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*, 15, 539-53.
182. Kaplan, N.M. (1989). The deadly quartet: upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Archives of Internal Medicine*, 149, 1514.
183. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection. Treatment of High Blood Cholesterol in, A. (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106, 3143-3421.
184. Şendur, M.A. and Güven, G.(2011). Metabolik Sendroma Güncel Bakış. *İç Hastalıkları Dergisi*, 18, 125-131.
185. Park, Y.W., Zhu, S., Palaniappan, L., Heshka, S., Carnethon, M.R. and Heymsfield, S.B. (2003). The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Archives of Internal Medicine*, 163, 427-36.
186. Balkan, F. (2013). Metabolic Syndrome. *Ankara Medical Journal*, 13, 85-90.
187. Grundy, S.M., Brewer, H.B., Cleeman, J.I., Smith, S.C. and Lenfant, C. (2004). American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, 109, 433-438.
188. Grundy, S.M., Cleeman, J.I., Merz, C.N., Brewer, H.B., Clark, L.T., Hunninghake, D.B., Pasternak, R.C., Smith, S.C. and Stone, N.J. (2004). Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 44, 720- 732.

189. Arslan, M. (2009). World Health Organization, Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). *Metabolik Sendrom Kılavuzu*, Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği.
190. Desroches, S. and Lamarche, B. (2007). The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 32, 23–32.
191. Kolovou, G.D., Anagnostopoulou, K.K., Salpea, K.D. and Mikhailidis, D.P. (2007). The prevalence of metabolic syndrome in various populations. *The American Journal of the Medical Sciences*, 333, 362–371.
192. Cameron, A.J., Shaw, J.E. and Zimmet, P.Z. (2004) . The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 33, 351–375.
193. Ford, E. S., Giles, W.H. and Dietz, W.H. (2002). Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of the American Medical Association*, 287, 356–359.
194. Kozan, Ö., Oğuz, A., Abacı, A., Erol, C., Öngen, Z., Temizhan, A. and Çelik, S. (2007). Prevalence of the metabolic syndrome among Turkish adults. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 548-53.
195. Oğuz, A., Altuntaş, Y., Karsidağ, K., Güleç, S., Temizhan, A. and Akalın, A.A. (2010). The prevalence of metabolic syndrome in Turkey. *Obesity Reviews*, 11, 486.
196. Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I. and Scherer, P.E. (2008). The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 37, 753–768.
197. Lau, D.C., Dhillon, B., Yan, H., Szmitko, P.E. and Verma, S. (2005). Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288, 2031-2041.
198. Isomaa, B. (2003). A major health hazard: the metabolic syndrome. *Life science*, 26, 2395-411.
199. İslamoğlu, Y., Koplay, M., Sunay, S. ve Açikel, M. (2008). Obezite ve metabolik sendrom. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6, 168 -174.
200. Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E. and Nadal, A. (2006). The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental Health Perspectives*, 114, 106-12.
201. Ferrannini, E. and Natali, A. (1991). Essential hypertension, metabolic disorders, and insulin resistance. *The American Heart Journal*, 121, 1274–1282.
202. Malhotra, A., Kang, B. P. S., Cheung S., Opawumi, D. and Meggs, L.G. (2001). Angiotensin II promotes glucose-induced activation of cardiac protein kinase C isozymes and phosphorylation of troponin I. *Diabetes*, 50, 1918–1926.

203. Morse, S.A., Zhang, R., Thakur, V. and Reisin, E. (2005). Hypertension and the metabolic syndrome. *The American Journal of the Medical Sciences*, 330, 303–310.
204. Kraemer-Aguiar, L.G., Laflor, C.M. and Bouskela, E. Skin microcirculatory dysfunction is already present in normoglycemic subjects with metabolic syndrome. *Metabolism*, 57, 1740–1746.
205. Hansson, G.K. (2005). Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, 352, 1685–1695.
206. Grundy, S.M. (2004). Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89, 2595–2600.
207. Charmandari, E., Tsigos, C. and Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*, 67, 259–284.
208. Wang, C. N., McLeod, R.S., Yao, Z. and Brindley, D.N. (1995). Effects of dexamethasone on the synthesis, degradation, and secretion of apolipoprotein B in cultured rat hepatocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15, 1481–1491.
209. Guillaume-Gentil, C., Assimacopoulos-Jeannet, F. and Jeanrenaud, B. (1993). Involvement of non-esterified fatty acid oxidation in glucocorticoid-induced peripheral insulin resistance in vivo in rats. *Diabetologia*, 36, 899–906.
210. Chrousos, G.P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5, 374–381.
211. Durmaz, E. ve Giray Koçer B. (2013). Çevresel bir endokrin bozucu: Bisfenol A ve toksik etkilerinin Değerlendirilmesi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 56, 192-199.
212. Dodds, E. and Lawson, W. (1936). Synthetic, oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*, 137, 996.
213. İnternet: 27960 sayılı Resmi Gazete, Tebliğ (10.06.2011). URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.resmigazete.gov.tr%2Feskiler%2F2011%2F06%2F20110610.htm&date=2015-01-04>, Son Erişim Tarihi: 30.07.2016
214. European Chemicals Bureau (ECB), (2003). *European Union Risk Assessment. European Union Risk Assessment Report: 4, 4'-Isopropylidenediphenol (Bisphenol A)*. European Union Risk Assessment Report - ECHA – Europa.
215. European Union Risk Assessment Report (2008). Updated European Risk Assessment Report 4,4'-Isopropylidenediphenol (Bisphenol-A) Part1-Environment. *JRC Scientific and Technical Reports*, EUR 24588 EN, 5-6.
216. İnternet: <http://www.prweb.com/releases/2014/04/prweb11761146.htm> Son Erişim Tarihi: 12.08.2017

217. Careghini, A., Mastorgio, A.F., Saponaro, S. and Sezenna, E. (2015). Bisphenol a, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 5711–41.
218. Sevensan, F. and Vaizoğlu, S.A. (2007). PET ve geri dönüşümü: *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6, 307-312.
219. Michalowicz, J. (2014). Bisphenol A-Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37, 738-758.
220. Rezg, R., El-Fazaa, S., Gharbi, N. and Mornagui, B. (2014). Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environmental International*, 64, 83-90.
221. Volkel, W., Colnot, T., Csanady, G.A., Filser, J.G. and Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chemical Research in Toxicology*, 15, 1281-7.
222. World Health Organization. (2009). Bisphenol A- Current State of Knowledge and Future Actions by WHO and FAO. *INFOSAN*, 5.
223. Larsson, K., Björklund, K.L., Palm, B., Wennberg, M., Kaj, L., Lindh, H., Jönsson B.A. and Berglund, M. (2014). Exposure determinants of phthalates, parabens, bisphenol A and triclosan in Swedish mothers and their children. *Environment International*, 73, 323–33.
224. Shelby, M.D. (2008). NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. *National Toxicology Program, U.S. Dept. of Health and Human Services*. (22):v, vii-ix, 1-64 passim.
225. Fernandez, M.F., Arrebola, J.P., Taoufik, J., Navalón, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., Vilchez, J.L. and Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive Toxicology*, 24, 259-264.
226. Otlu, G. ve Türköz, Y. (2016). Bisphenol A: Exposure Routes, Metabolism and Toxicity Bisfenol A: Maruziyeti, Metabolizması ve Toksik Etkileri. H. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5, 23-28.
227. Golub, M.S., Wu, K.L., Kaufman, F.L., Li, L.H., Moran-Messen, F., Zeise, L., Alexeeff, G.V. and Donald, J.M. (2010). Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 89, 441-466
228. Nam, S., Seo, Y. and Kim, M. (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere* 79, 949–952.
229. Maia, J., Cruz, J., Sendón, R., Bustos, J., Sanchez, J. and Paseiro, P. (2009). Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Research International*, 42, 1410–1414.

230. Berkner, S., Streck, G. and Hermann, R. (2004) . Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenol and bisphenol A in atmospheric samples. *Chemosphere*, 54, 575–584.
231. Matsumoto, H., Adachi, S. and Suzuki, Y. (2005). Bisphenol A in ambient air particulates responsible for the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells and its concentration changes over 6 months. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48, 459–466.
232. Shao, B., Han, H., Li, D., Ma, Y., Tu, X. and Wu, Y.(2007) . Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 105, 1236–1241.
233. Munguia-Lopez, E., Gerardo-Lugo, S., Peralta, E., Bolumen, S. and Soto-Valdez, H. (2005). Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food simulant and tuna fish. *Food Additives & Contaminants*, 22, 892–898.
234. Yoshida, T., Horie, M., Hoshino, Y. and Nakazawa, H. (2001). Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Additives & Contaminants*, 18, 69–75.
235. Niu, Y., Zhang, J., Wu, Y. and Shao, B. (2012). Analysis of bisphenol A and alkylphenols in cereals by automated on-line solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6116–6122.
236. Yonekubo, J., Hayakawa, K. and Sajiki, J. (2008). Concentrations of bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and their derivatives in canned foods in Japanese markets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2041–2047.
237. O'Mahony, J., Moloney, M., McCormack, M., Nicholls, I., Mizaikoff, B. and Danaher, M. (2013). Design and implementation of an imprinted material for the extraction of the endocrine disruptor bisphenol A from milk. *Journal of Chromatography B*, 931, 164–169.
238. Yonghua, HE., Maohua, M., Chunhua, WU., Wei, Y., Ersheng, G., Zhijun, Z. and De-Kun, L. (2009). Occupational exposure levels of bisphenol A among Chinese workers. *Journal of Occupational Health*, 51, 432–436.
239. Chu, C., Ponten, A., Sun, C. and Jee, S.(2006). Concomitant contact allergy to the resins, reactive diluents and hardener of a bisphenol A/F-based epoxy resin in subway construction workers. *Contact Dermatitis* 54, 131–139.
240. Li, D., Quing, D., Wu, T., Miao, M., Wang, J., Weng, X., Ferber, J., Herrinton, L., Zhu, Q., Gao, E., Checkoway, H. and Yuan, W. (2010). Occupational exposure to bisphenol A and risk of self-reported male sexual dysfunction. *Human Reproduction*, 25, 519–527.
241. Lee, H.S., Parka, E.J., Oha, J,H, Moona G, Hwanga MS, Kima SY, Shina MK, Koha YH, Suha, JH, Kanga HS, Jeon, J.H., Rheea, G.S. and Hong, J.H. (2014). Bisphenol A exerts estrogenic effects by modulating CDK1/2 and p38 MAP kinase activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78, 1371–5.

242. Flint, S., Markle, T., Thomson, S. and Wallace, E. (2012) . Bisphenol A exposure effects and policy; a wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*, 104, 19–34.
243. Markey, C., Coombds, M., Sonnenschein, C. and Soto, A. (2003). Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evolution & Development*, 1–9.
244. Richter, C., Birnbaum, L., Farabollini, F., Newbold, R., Rubin, B., Talsness, C., Vandenberg, J., Walser-Kuntz, D. and Saal, F. (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology*, 24, 199–224.
245. Melzer, D., Harries, L., Cipelli, R., Henley, W., Money, C., McCormack, P., Young, A., Guralnik, J., Ferrucci, L., Bandinelli, S., Corsi, A. and Galloway, T. (2011). Bisphenol A exposure is associated with in vivo estrogenic gene expression in adults. *Environmental Health Perspectives*, 119, 1788–1793.
246. Wang, T., Lu, J., Xu, M., Xu, Y., Li, M., Liu, Y., Tian, X., Chen, Y., Dai, M., Wang, W., Lai, S., Bi, Y. and Ning, G. (2013). Urinary bisphenol A concentration and thyroid function in Chinese adults. *Epidemiology*, 24, 295–302.
247. vom Saal, F.S., Nagel, S.C., Coe, B.L., Angle, B.M. and Taylor, J.A. (2012). The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 354, 74–84.
248. Carwile, J.L. and Michels, K.B. (2011). Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003–2006. *Environmental Research*, 111, 825–30
249. Alonso-Magdalena, P., Vieira, E. and Soriano, S. (2010). Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environmental Health Perspectives*, 118, 1243–1250.
250. Hugo, E.R., Brandebourg, T.D., Woo, J.G., Loftus, J., Alexander, J.W. and Ben-Jonathan, N. (2008). Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environmental Health Perspectives*, 116, 1642–1647.
251. Shankar, A. and Teppala, S. (2011). Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96, 3822–3826.
252. Gao, X. and Wang, H.S. (2014). Impact of bisphenol a on the cardiovascular system epidemiological and experimental evidence and molecular mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11, 8399–413
253. Zeinab, K., Hassan, Z., Elobeid, M., Virk, P., Omer, S., ElAmin, M., Daghestani, M., Ebtisam, M. and Al Olayan, E. (2012) . Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 194829.

254. Huc, L., Lemarie, A., Gueraud, F. and Helies-Toussaint, C. (2012). Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, 26, 709–717.
255. Moon, M., Kim, M., Jung, I., Koo, Y., Ann, H., Lee, K., Kim, S., Yoon, Y., Cho, B.J., Park, K., Jang, H. and Park, Y. (2012). Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *Endocrinology, Nutrition & Metabolism*, 27, 644–652.
256. Lee, S., Suk, K., Kim, I.K., Jang, IS., Park, JW., Johnson, V., Kwon, TK., Choi, B.J. and Kim, SH. (2008) . Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: role of calcium-induced reactive oxygen species mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor – KB. *Journal of Neuroscience Research*, 86, 2932–2942.
257. Liu, R., Xing, L., Kong, D., Jiang, J., Shang, L. and Hao, W. (2013). Bisphenol A inhibits proliferation and induces apoptosis in micromass cultures of rat embryonic midbrain cells through the JNK, CREB and p53 signalling pathways. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 76–82.
258. Huff, J. (2001). Carcinogenicity of Bisphenol-A in Fisher rats and B6C3F1 mice. *Odontology*, 89, 12-20.
259. Keri, R., Ho, S., Hunt, P., Knudsen, K., Soto, A. and Prins, G. (2007). An evaluation evidence for carcinogenic activity of bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, 24, 240–252.
260. Benachour, N. and Aris, A.(2009). Toxic effects of low doses of bisphenol-A on human placental cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 241, 322–328.
261. Caserta, D., Mantovani, A., Marci, R., Fazi, A., Ciardo, F., La Rocca, C., Maranghi, F. and Moscarini, M. (2011). Environment and women’s reproductive health. *Human Reproduction Update*, 17, 418-433.
262. Golub, M.S., Wu, K.L., Kaufman, F.L., Li, L.H., Moran-Messen, F., Zeise, L., Alexeeff, G.V. and Donald, J.M. (2010). Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. *Birth Defects Research Part B Developmental and Reproductive Toxicology*, 89, 441-466.
263. Berger, R.G., Shaw, J. and de Catanzaro, D. (2008). Impact of acute bisphenol-A exposure upon intrauterine implantation of fertilized ova and urinary levels of progesterone and 17 β -estradiol. *Reproduction Toxicology*, 26, 94–99.
264. Bromer, J.G., Zhou, Y., Taylor, M.B., Doherty, L. and Taylor, H.S. (2010). Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *FASEB Journal*, 24, 2273–2280.
265. Peretz, J., Vrooman, L., Ricke, W.A., Hunt, P.A., Ehrlich, S., Hauser, R., Padmanabhan, V., Taylor, H.S., Swan, S.H., Vande Voort, C.A. and Flaws, J.A. (2014). Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. *Environmental Health Perspectives*, 122, 775-86.

266. Hiyama, M., Choi, E.K., Wakitani, S., Tachibana, T., Khan, H., Kusakabe, K.T. and Kiso, Y. (2011). Bisphenol-A (BPA) affects reproductive formation across generations in mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73, 1211–1215.
267. Kandaraki, E., Chatzigeorgiou, A., Livadas, S., Palioura, E., Economou, F., Koutsilieris, M., Palimeri, S., Panidis, D. and Diamanti-Kandarakis, E. (2011). Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96, 480-4.
268. Mendiola, J., Jørgensen, N., Andersson, A.M., Calafat, A.M., Ye, X., Redmon, J.B., Drobnis, E.Z., Wang, C., Sparks, A., Thurston, S.W., Liu, F. and Swan, S.H. (2010). Are environmental levels of bisphenol A associated with reproductive function in fertile men? *Environmental Health Perspectives*, 118, 1286–1291.
269. Takahashi, O. and Oishi, S. (2003). Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1035-1044.
270. Timms, B.G., Howdeshell, K.L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C.A. and vom Saal, F.S. (2005). Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 7014-7019.
271. Gupta, C. (2000). Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 224, 61-68.
272. Gurmeet, K., Rosnah, I., Normadiah, M., Das, S. and Mustafa, A. (2014). Detrimental effects of bisphenol A on development and functions of the male reproductive system in experimental rats. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 13, 151-160.
273. Galloway, T., Cipelli, R., Guralnik, J., Ferrucci, L., Bandinelli, S., Corsi, A.M., Money, C., McCormack, P. and Melzer, D. (2010). Daily bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: results from the InCHIANTI adult population study. *Environmental Health Perspectives*, 118, 1603–1608.
274. Miao, M., Yuan, W., He, Y., Zhou, Z., Wang, J., Gao, E., Li, G. and Li, D.K. (2011). In utero exposure to bisphenol-A and anogenital distance of male offspring. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 91, 867–872.
275. Fenichel, P., Dechaux, H., Harthe, C., Gal, J., Ferrari, P., Pacini, P., Wagner-Mahler, K., Pugeat, M. and Brucker-Davis, F. (2012). Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Human Reproduction*, 27, 983–990.
276. Howdeshell, K.L., Furr, J., Lambright, C.R., Wilson, V.S., Ryan, B.C. and Gray, L.E. (2008). Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male Long Evans hooded rat. *Toxicological Sciences*, 102, 371–382.

277. Castro, B., Sánchez, P., Torres, J.M., Preda, O., del Moral, R.G. and Ortega, E. (2013). Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 α -reductase isozymes in rat prostate. *PLoS One*, 8, e55905.
278. De Flora, S., Micale, R.T., La Maestra, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., Camoirano, A., Davoli, S.A., Troglia, M.G., Rizzi, F., Davalli, P. and Bettuzzi, S. (2011). Upregulation of clusterin in prostate and DNA damage in spermatozoa from bisphenol A-treated rats and formation of DNA adducts in cultured human prostatic cells. *Toxicological Sciences*, 122, 45–51.
279. Sánchez, P., Castro, B., Torres, J.M., Olmo, A., del Moral, R.G. and Ortega, E. (2013). Bisphenol A modifies the regulation exerted by testosterone on 5 α -reductase isozymes in ventral prostate of adult rats. *BioMed Research International*, 2013, 629235.
280. Prins, G.S., Ye, S.H., Birch, L., Ho, S.M. and Kannan, K. (2011). Serum bisphenol A pharmacokinetics and prostate neoplastic responses following oral and subcutaneous exposures in neonatal Sprague-Dawley rats. *Reproductive Toxicology*, 31, 1–9.
281. Wu, J.H., Jiang, X.R., Liu, G.M., Liu, X.Y., He, G.L. and Sun, Z.Y. (2011). Oral exposure to low-dose bisphenol A aggravates testosterone-induced benign hyperplasia prostate in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 27, 810–819.
282. Hardeland, R., Cardinali, D.P., Srinivasan, V., Spence, D.W., Brown, G.M. and Pandi Perumal, S.R. (2011). Melatonin: a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology*, 93, 350–384.
283. Marseglia, L., D'Angelo, G., Manti, S., Aversa, S., Arrigo, T., Reiter, R.J. and Gitto, E. (2015). Analgesic, anxiolytic and anaesthetic effects of melatonin: new potential uses in pediatrics. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 1209–20.
284. Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H. and Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*, 80, 2587–2587.
285. Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, 12, 151–180.
286. Nawaz, M.A., Huang, Y., Bie, Z., Ahmed, W., Reiter, R.J., Niu, M. and Hameed, S. (2016). Melatonin: Current Status and Future Perspectives in Plant Science. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1230.
287. Hattori, A. (2007). The basic information for melatonin. *Modern Physician*, 27, 1053–1056.
288. Paredes, S.D., Korkmaz, A., Manchester, L.C., Tan, D.X. and Reiter, R.J. (2009). Phytomelatonin: a review. *Journal of Experimental Botany*, 60, 57–69.
289. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2011). *Histology A Text and Atlas*, (6.Edition). Lippincott Williams & Wilkins, 752–754.

290. İnternet: Melatonin URL:<http://cenblog.org/the-haystack/files/2011/06/melatonin.png> Son Erişim Tarihi: 15.07.2016.
291. Gomes, P. and Soares da Silva, P.(1999). L-DOPA transport properties in an immortalised cell line of rat capillary cerebral endothelial cells, *RBE 4. Brain Research*, 829, 143-150.
292. Bouchard, S. and Roberge, A.G. (1979). Biochemical properties and kinetic parameters of dihydroxyphenylalanine-5-hydroxytryptophan decarboxylase in brain, liver, and adrenals of cat. *Canadian Journal of Biochemistry*, 57, 1014-1018.
293. Amamoto, T. and Sarai, K. (1976). On the tryptophan-serotonin metabolism in manic-depressive disorders: changes in plasma 5-HT and 5-HIAA levels and urinary 5-HIAA excretion following oral loading of L-5HTP in patients with depression. *Hiroshima journal of medical sciences*, 25, 135-140.
294. Kus, İ. ve Sarsılmaz, M. (2002). Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 22, 221-226.
295. Ayar, A., Kutlu, S., Yilmaz, B. and Kelestimur, H. (2001). Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. *Neuroendocrinology Letter*, 22, 301-306.
296. Kelestimur, H. (1996). İnsanda pineal bezin fonksiyonları. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 10, 141-47.
297. Çam, A. ve Erdoğan, M.F. (2003). Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 56, 103-112.
298. Claustrat, B., Brun, J. and Chazot, G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews*, 9, 11-24.
299. Mollaoğlu, H. ve Özgüner, M.F. (2005). Yaşlanma sürecinde melatoninin rolü. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 12, 52-56.
300. Özçelik, F., Erdem, M., Bolu, A. ve Gülsün, M. (2013). Melatonin: Genel Özellikleri ve Psikiyatrik Bozukluklardaki Rolü. *Current Approaches in Psychiatry*, 5, 179-203.
301. Yoshikazu, Y., Hattori A., Tsutsui, K., Okawa, M. and Ishizuka, B. (2010). Effects of Melatonin: Basics Studies and Clinical Applications – Anti-Aging Medicine. *Japanese Society of Anti-Aging Medicine*, 7, 85-91.
302. Macchi, M.M. and Bruce, J.N. (2004). Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25, 177-195.
303. Cardinali, D.P. and Pévet, P. (1998). Basic aspects of melatonin action. *Sleep Medicine Reviews*, 2, 175-190.
304. Nowak, J.Z. and Zawilska, J.B. (1998). Melatonin and its physiological and therapeutic properties. *Pharmacy World & Science*, 20, 18-27.

305. Reppert, S.M. (1997). Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein coupled receptors. *Journal of Biological Rhythms*, 12, 528-531.
306. Sugden, D., Davidson, K., Hough, K.A. and Teh, M.T. (2004). Melatonin, melatonin receptors and melanophores: a moving story. *Pigment Cell Research*, 17, 454-460.
307. Touitou, Y. (2001). Human aging and melatonin: clinical relevance. *Experimental Gerontology*, 36, 1083-1100.
308. Rohr, U.D. and Herold, J. (2002). Melatonin deficiencies in women. *Maturitas*, 41, 85- 104.
309. Haimov, I., Lavie, P., Laudon, M., Herer, P., Vigder, C. and Zisapel, N. (1995). Melatonin replacement therapy of elderly insomniacs. *Sleep*, 18, 598-603.
310. Herxheimer, A. and Petrie, K.J. (2001). Melatonin for preventing and treating jet lag. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2, CD001520.
311. Nakahara, K., Kawana, T. and Shiota, K. (2003). Effect of microinjection of melatonin into various brain regions of Japanese quail on locomotor activity and body temperature. *Neuroscience Letters*, 345, 117-120.
312. Cornelissen, G., Halberg, F., Burioka, N., Perfetto, F., Tarquini, R. and Bakken, E.E. (2000). Do plasma melatonin concentrations decline with age? *American Journal of Medicine*, 109, 343-345.
313. Chen, Y.C., Tain, Y.L., Sheen, J.M. and Huang, L.T. (2012). Melatonin utility in neonates and children. *Journal of the Formosan Medical Association*, 111, 57-66.
314. Palaoğlu, S. ve Beşkonaklı, E. (1998). Pineal bez ve yaşlanma. *Turkish Journal of Geriatrics*, 1, 13-18.
315. Shigeta, H., Yasui, A., Nimura, Y., Machida, N., Kageyama, M., Miur, M., Menjo, M. and Ikeda, K. (2001). Postoperative delirium and melatonin levels in elderly patients. *The American Journal of Surgery*, 182, 449-454.
316. Reiter, R.J. (1994). Pineal function during aging; attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 54, 31-39.
317. Toubi, E. and Shoenfeld, Y. (2007). Protective autoimmunity in cancer. *Oncology Reports*, 17, 245- 251.
318. Hill, S.M., Belancio, V.P., Dauchy, R.T., Xiang, S., Brimer, S., Mao, L., Hauch, A., Lundberg, P.W., Summers, W., Yuan, L., Frasch, T. and Blask, D.E. (2015). Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 22, 183-204.
319. Drazen, D.L., Klein, S.L., Yellon, S.M. and Nelson, R.J. (2000). In vitro melatonin treatment enhances splenocyte proliferation in prairie voles. *Journal of Pineal Research*, 28, 34-40.

320. Prendergast, B.J., Yellon, S.M., Tran, L.T. and Nelson, R.J. (2001) . Photoperiod modulates the inhibitory effect of in vitro melatonin on lymphocyte proliferation in female Siberian hamsters. *Journal of Biological Rhythms*, 16, 224-233.
321. Çetin, E. (2005). Melatonin ve Bağışıklık Sistemi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 119-123.
322. Maestroni, G.J. (1995). T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 18, 84-89.
323. Garcia, M.S., Gonzalez, H.M.G., Calvo, J.R., Rafii, I.M., Sanchez, M.V., Goberna, R. and Guerrero, J.M. (1997) . Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN γ production by human circulating CD4⁺ cells: a possible nuclear receptor mediated mechanism involving T helper type. *The Journal of Immunology*, 15, 574-81.
324. Maestroni, G.J. (2001). The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 10, 467-476.
325. Lam, R.W., Bercowitz, A.L, Berga, S.L., Clark, C.M., Kripke, D.P. and Gillin, J.C. (1990). Melatonin suppression in bipolar and unipolar mood disorders. *Psychiatry Research*, 33, 129-134.
326. Şener, G. (2010). Karanlığın hormonu: melatonin. *Marmara Eczacılık Dergisi*, 14, 112- 120.
327. Khaleghipour, S., Masjedi, M., Ahade, H., Enayate, M., Pasha, G., Nadery, F. and Ahmadzade, G. (2012). Morning and nocturnal serum melatonin rhythm levels in patients with major depressive disorder: an analytical cross-sectional study. *Sao Paulo Medical Journal*, 130, 167-172.
328. Suresh Kumar, P.N., Andrade, C., Bhakta, S.G. and Singh, N.M. (2007). Melatonin in schizophrenic outpatients with insomnia: a double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Clinical Psychiatry*, 68, 237-241.
329. Reiter, R.J. (1997). Antioxidant actions of melatonin. *Advances in Pharmacology*, 38, 103-116.
330. Şahna, E., Deniz, E. ve Aksulu, H&E. (2006). Miyokardiyal iskemi-perfüzyon hasarı ve melatonin. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 6, 163-168.
331. Tan, D.X., Chen, L.D. and Poeggeler, B. (1993). Melatonin: A potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine Journal*, 1, 57-60.
332. Reiter, R.J. (1998). Cytoprotective properties of melatonin: presumed association with oxidative damage and aging. *Nutrition*, 14, 691-696.
333. Reiter, R.J. (1996). Functional diversity of the pineal hormone melatonin: its role as an antioxidant. *Experimental and Clinical Endocrinology*, 104, 10-16.
334. Kennaway, D.J. and Rowe, S.A. (1997). Controlled-release melatonin implants delay puberty in rats without altering melatonin rhythmicity. *Journal of Pineal Research*, 22, 107-116.

335. Edmonds, K.E. and Stetson, M.H. (1994). Photoperiod and melatonin affect testicular growth in the marsh rice rat (*Oryzomys palustris*). *Journal of Pineal Research*, 17, 86–93.
336. Edmonds, K.E. and Stetson, M.H.(1995). Pineal gland and melatonin affect testicular status in the adult marsh rice rat (*Oryzomys palustris*). *General and Comparative Endocrinology*, 99, 265–74.
337. Srinivasan, V., Ohta, Y., Espino, J., Pariente, J.A., Rodriguez, A.B., Mohamed, M. and Zakaria, R. (2013). Metabolic syndrome, its pathophysiology and the role of melatonin. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, 7, 11-25.
338. Erdemir, F., Fırat, F. ve Yusuf, G. (2011). Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi ve Klinik Önemi. *Türk Uroloji Seminerleri*, 2, 11-7.
339. Ward, M. (2005). Intracytoplasmic Sperm Injection Effects In Infertile azh Mutant Mice. *Biology Of Reproduction*, 73, 193-100.
340. Mital, P., Hinton, B.T. and Dufour, J. M. (2011) . The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of Reproduction*, 84, 851–858.
341. Menale, C., Mita, D.G., Diano, N. and Diano, S. (2016)., Adverse Effects of Bisphenol A Exposure on Glucose Metabolism Regulation. *Biotechnology Journal*, 10, 122-130.
342. Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B. and Melzer, D.(2008). Association of Urinary Bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Journal of the American Medical Association*, 11,1303–1310.
343. Newbold, R.R., Padilla-Banks, E. and Jefferson, W.N. (2009). Environmental estrogens and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304, 84–89.
344. Silver, M.K., O'Neill, M.S. and Sowers, M.R., Park, S.K. (2011). Urinary bisphenol A and type-2 diabetes in U.S. adults: data from NHANES, 2003–2008. *PLoS ONE*, 6(10), e26868.
345. Teppala, S., Madhavan, S. and Shankar, A. (2012). Bisphenol A and Metabolic Syndrome: Results from NHANES. *International Journal of Endocrinology*, 2012, 598180.
346. Rahman, M.S., Kwon, W.S., Lee, J.S., Yoon, S.J., Ryu, B.Y. and Pang, M.G. (2015). Bisphenol-A affects male fertility via fertility-related proteins in spermatozoa. *Scientific Reports*, 16, 9169.
347. Sato, E.F., Kobuchi, H., Edashige, K., Takahashi, M., Yoshioka, T., Utsumi, K. and Inoue, M. (1992). Dynamic aspects of ovar-ian superoxide dismutase isozymes during the ovulatory process in the rat. *FEBS Letters*, 303, 121–125.

348. Hunt, P.A., Koehler, K.E., Susiarjo, M., Hodges, C.A., Ilagan, A., Voigt, R.C., Thomas, S., Thomas, B.F. and Hassold, T.J. (2003). Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Current Biology*, 13, 546–553.
349. Kundakovic, M., Gudsruk, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R.L. and Perera, F.P. (2013). Champagne FA. Sex-specific epi-genetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 110, 9956–9961.
350. Zhang, M., Dai, X., Lu, Y., Miao, Y., Zhou, C., Cui, Z., Liu, H. and Xiong, B. (2017). Melatonin protects oocyte quality from Bisphenol A-induced deterioration in the mouse. *Journal of Pineal Research*, 62(3).
351. Eisenberg, M.L., Kim, S., Chen, Z., Sundaram, R., Schisterman, E.F. and Buck Louis, G.M. (2014). The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study. *Human Reproduction*, 29, 193–200.
352. Lotti, F., Corona, G., Colpi, G.M., Filimberti, E., Degli Innocenti, S., Mancini, M., Baldi, E., Noci, I., Forti, G., Adorini, L. and Maggi, M. (2011). Elevated body mass index correlates with higher seminal plasma interleukin 8 levels and ultrasonographic abnormalities of the prostate in men attending an andrology clinic for infertility. *Journal of Endocrinological Investigation*, 34, 336–342.
353. Fejes, I., Koloszar, S., Szöllosi, J., Závaczki, Z. and Pál, A. (2005). Is semen quality affected by male body fat distribution? *Andrologia*, 37, 155–159.
354. Lotti, F., Corona, G., Degli Innocenti, S., Filimberti, E., Scognamiglio, V., Vignozzi, L., Forti, G. and Maggi, M. (2013). Seminal, ultrasound and psychobiological parameters correlate with metabolic syndrome in male members of infertile couples. *Andrology*, 1, 229–239.
355. Corona, G., Mannucci, E., Fisher, A.D., Lotti, F., Petrone, L., Balercia, G., Bandini, E., Forti, G. and Maggi, M. (2008). Low levels of androgens in men with erectile dysfunction and obesity. *The Journal of Sexual Medicine*, 5, 2454–2463.
356. Corona, G., Rastrelli, G., Morelli, A., Vignozzi, L., Mannucci, E. and Maggi, M. (2011). Hypogonadism and metabolic syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*, 34, 557–567.
357. Marchiani, S., Vignozzi, L., Filippi, S., Gurrieri, B., Comeglio, P., Morelli, A., Danza, G., Bartolucci, G., Maggi, M. and Baldi, E. (2015). Metabolic syndrome-associated sperm alterations in an experimental rabbit model: relation with metabolic profile, testis and epididymis gene expression and effect of tamoxifen treatment. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 401, 12–24.
358. Palmer, N.O., Bakos, H.W., Fullston, T. and Lane, M. (2012). Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*, 2, 253–263.
359. Miller, A.W., Katakam, P.V. and Ujhelyi, M.R. (1999). Impaired endothelium-mediated relaxation in coronary arteries from insulin-resistant rats. *Journal of Vascular Research*, 36, 385–392.

360. Rocha, C.S., Rato, L., Martins, A.D., Alves, M.G. and Oliveira, P.F. (2015). Melatonin and male reproductive health: relevance of darkness and antioxidant properties. *Current Molecular Medicine*, 15, 299-311.
361. Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N. and Fougere, C. (2017). Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology*, 15, 434-443.
362. Game, C., Gagnon, M.M., Webb, D. and Lim, R. (2006). Endocrine disruption in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) inhabiting wetlands in Western Australia. *Ecotoxicology*, 15, 665-72.
363. Pant, N., Upadhyay, G., Pandey, S., Mathur, N., Saxena, D.K. and Srivastava, S.P. (2003). Lead and cadmium concentration in the seminal plasma of men in the general population: correlation with sperm quality. *Reproductive Toxicology*, 17, 447-50.
364. Kaur, F., Sangha, G.K. and Bilaspuri, G.S. (1997). Cyclophosphamide induced structural and biochemical changes in testis and epididymidis of rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35, 771-5.
365. Reiter, R.J., Carneiro, R.C. and Oh, C.S. (1997). Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Hormone and Metabolic Research*, 29, 363-72.
366. Wong, S.K., Chin, K.Y., Suhaimi, F.H., Fairus, A. and Ima-Nirwana, S. (2016). Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutrition & Metabolism*, 13, 65.
367. Sanchez-Lozada, L.G., Tapia, E., Jimenez, A., Bautista, P., Cristóbal, M., Nepomuceno, T., Soto, V., Avila-Casado, C., Nakagawa, T., Johnson, R.J., Herrera-Acosta, J. and Franco, M. (2007). Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 292, 423-9.
368. Aydin, S. Aksoy, A. Aydin, S. Kalayci, M. Yilmaz, M. Kuloglu, T. Citil, C. and Catak, Z. (2014). Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition*, 30, 1-9.
369. Al-Hiyasat, A.S., Darmani, H. and Elbetieha, A.M. (2002). Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *European Journal of Oral Sciences*, 110, 163-7.
370. Chitra, K.C., Rao, K.R. and Mathur, P.P. (2003). Effect of bisphenol A and co-administration of bisphenol A and vitamin C on epididymis of adult rats: a histological and biochemical study. *Asian Journal of Andrology*, 5, 203-8.
371. Cui, W. (2010) Mother or nothing: the agony of infertility. *Bull World Health Organ*, 88, 881-882.
372. Hamada, A., Esteves, S.C. and Agarwal, A. (2011). The role of contemporary andrology in unraveling the mystery of unexplained male infertility. *The Open Reproductive Science Journal*, 4, 27-41.

373. Manfo, F.P., Jubendradass, R., Nantia, E.A., Moundipa, P.F. and Mathur, P.P. (2014). Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 228, 57-82.
374. Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R. and Hardy, M.P. (2004). Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*, 145, 592–603
375. El Ghazzawy, I.F., Meleis, A.E., Farghaly, E.F. and Solaiman, A. (2011). Histological study of the possible protective effect of pomegranate juice on bisphenol-A induced changes of the caput epididymal epithelium and sperms of adult albino rats. *Alexandria Journal of Medicine*, 2, 125-137.
376. Gregory, M. and Cyr, D.G. (2014). The blood-epididymis barrier and inflammation. *Spermatogenesis*, 4, e979619.
377. Dube, E., Hermo, L., Chan, P.T. and Cyr, D.G. (2008). Alterations in gene expression in the caput epididymides of nonobstructive azoospermic men. *Biology of Reproduction*, 78, 342-51.
378. Furuse, M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, a002907.
379. Cyr, D.G., Hermo, L., Egenberger, N., Mertineit, C., Trasler, J.M. and Laird, D.W. (1999). Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. *Endocrinology*, 140, 3815-25.
380. Gregory, M., Dufresne, J., Hermo, L. and Cyr, D. (2001). Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology*, 142, 854-63.
381. Cai, J., Wang, C., Huang, L., Chen, M. and Zuo, Z. (2013). A novel effect of polychlorinated biphenyls: impairment of the tight junctions in the mouse epididymis. *Toxicological Sciences*, 134, 382-90.
382. Huang, X., Zhou, Y., Ma, J., Wang, N., Zhang, Z., Ji, J., Ding, Q. and Chen, G. (2012). Nitric oxide mediated effects on reproductive toxicity caused by carbon disulfide in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34, 679-87.
383. Jin, P., Wang, X., Chang, F., Bai, Y., Li, Y., Zhou, R. and Chen, L. (2013). Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *Journal of Biomedical Research*, 27, 135-44.
384. Aikawa, H., Koyama, S., Matsuda, M., Nakahashi, K., Akazome, Y. and Mori, T. (2004). Relief effect of vitamin A on the decreased motility of sperm and the increased incidence of malformed sperm in mice exposed neonatally to bisphenol A. *Cell and Tissue Research*, 315, 119-24.
385. Jiang, Z., Wang, J., Li, X. and Zhang, X. (2016). Echinacoside and Cistanche tubulosa (Schenk) R. wight ameliorate bisphenol A-induced testicular and sperm

- damage in rats through gonad axis regulated steroidogenic enzymes. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 321-328.
386. Wang, J., Chen, C., Jiang, Z., Wang, M., Jiang, H. and Zhang, X. (2016). Protective effect of Cordyceps militaris extract against bisphenol A induced reproductive damage. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 62, 249-57.
 387. Karnam, S.S., Ghosh, R.C., Mondal, S. and Mondal, M. (2015). Evaluation of subacute bisphenol - A toxicity on male reproductive system. *Veterinary World*, 8, 738-44.
 388. Li, J., Mao, R., Zhou, Q., Ding, L., Tao, J., Ran, M.M., Gao, E.S., Yuan, W., Wang, J.T. and Hou, L.F. (2016). Exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of ERK signal pathway. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26, 180-8.
 389. Jahan, S., Ain, Q.U. and Ullah, H. (2016). Therapeutic effects of quercetin against bisphenol A induced testicular damage in male Sprague Dawley rats. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 62, 114-24.
 390. Kazemi, S., Bahramifar, N., Moghadamnia, A.A. and Jorsarae, S.G. (2016). Detection of Bisphenol A and Nonylphenol in Rat's Blood Serum, Tissue and Impact on Reproductive System. *Electronic Physician Journal*, 25, 2772-2780.
 391. Lagos-Cabré, R. and Moreno, R.D. (2012). Contribution of environmental pollutants to male infertility: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. *Biological Research*, 45, 5-14.
 392. Tripathi, R., Mishra, D.P. and Shaha, C. (2009). Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways. *Journal of Reproductive Immunology*, 83, 31-35.
 393. Tiwari, D. and Vanage, G. (2013). Mutagenic effect of Bisphenol A on adult rat male germ cells and their fertility. *Reproductive toxicology*, 40, 60-8.
 394. Salián, S., Doshi, T. and Vanage, G. (2009). Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology*, 265, 56-67.
 395. van der Merwe, F.H., Kruger, T.F., Oehninger, S.C. and Lombard, C.J. (2005). The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 59, 86-91.
 396. Ambe, A.K., Mondragon, E.C. and Gonzales, S.E. (2008). Impact of spermatozoid head anomalies as predictor factor of nondetermined infertility. *Ginecologia Y Obstetricia De Mexico*, 76, 151-5.
 397. Oehninger, S. and Kruger, T. (1995). The diagnosis of male infertility by semen quality: Clinical significance of sperm morphology assessment. *Human Reproduction*, 10, 1037-1038.

398. Clegg, E.D., Perreault, S.D. and Klinefelter, G.R.(2001). Assessment of male reproductive toxicity. In: Hayes A.W, editor. *Principles and Methods of Toxicology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Taylor & Francis; 11263–1300.
399. Lizarraga, D., Vinardell, M.P., Noé, V., van Delft, J.H., Alcarraz-Vizán, G., van Breda, S.G., Staal, Y., Günther, U.L., Reed, M.A., Ciudad, C.J., Torres, J.L. and Cascante, M. (2011). A lyophilized red grape pomace containing proanthocyanidin-rich dietary fiber induces genetic and metabolic alterations in colon mucosa of female C57BL/6J mice. *Journal of Nutrition*, 141, 1597–1604.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 27/05/2015-63872



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



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Suna ÖMEROĞLU, Deniz ERDOĞAN, Mustafa KAVUTÇU, Tuncay PEKER, Saadet Özen AKARCA DİZAKAR, Neslihan COŞKUN, İsmail TÜRKOĞLU, Meriç Arda EŞMEKAYA ve Murat KOCABIYIK'tan oluşan, G.Ü.ET-15.030 kod numaralı ve "*Fruktoz ve Bisfenol A'nın Eş Zamanlı Uygulanması ile Duktus Epididimis ve Sperm Morfolojisinde Oluşacak Olası Hasara Melatoninin Etkisi*" adlı başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-15.030 and entitled "*The Effects Melatonin on Possible Damage Will be Occur on Ductus Epididymis and sperm Morphology With the Coadministration of Fructose and Bisphenol A*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

EK :
1 Liste

Ek-2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası



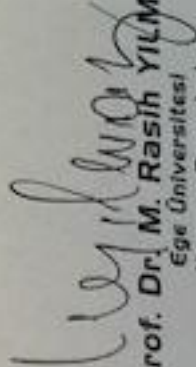
DENEY HAYVANI KULLANIM SERTİFİKASI

ÖZEN AKARCA

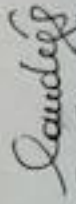
Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu ve
DeneySEL Cerrahi ve Araştırma Bilim Dalı Tarafından Düzenlenen
80 saatlik 'Deney Hayvanları Kullanım Kursu'nu ve sınavını
başarıyla tamamlamış ve sertifika almaya hak kazanmıştır.

15-26 Haziran - 2009

Ege Üniversitesi
İzmir



Prof. Dr. M. Rasih YILMAZ
Ege Üniversitesi
Hayvan Deneyleri
Yerel Etik Kurul Başkanı



Prof. Dr. Candegir YILMAZ
Ege Üniversitesi
Rektörü

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : AKARCA DİZAKAR, Saadet Özen
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 16.09.1985, İZMİR
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 03122026918
 e-mail : ozenakarca@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Ü./ Tıp Fakültesi/Histoloji ve Emb.	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Ege Ü. /Tıp Fakültesi/Histoloji ve Emb.	2011
Lisans	Ege Ü./Fen Fakültesi/Biyoloji	2008
Lise	İzmir Kız Lisesi	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012- devam ediyor	Gazi Üniversitesi Sağlık Bil. Ens.	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

SCI (Science Citation Index) ve SCI-E Tarafından Taranan Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Dernek, D., Ömeroğlu, S., Akçay, N.C., Kartal, B., Dizakar, S.Ö.A., Türkoğlu, İ. and Aydın V. (2017) Possible effects of melatonin against rat uterus exposure to bisphenol A during neonatal period. *Environ Sci Pollut Res Int.* doi: 10.1007/s11356-017-0187-8.

2. Aktug, H., Uysal, A., Yavasoglu, A., Oltulu, F., Akarca, S.O., Yilmaz-Dilsiz, O. and Oktem, G. (2013). The detrimental effects of diabetes on pluripotency determined by KLF4, SOX2, C-MYC and OCT4 immunoreactivity in rat testes. *Adv Clin Exp Med*, 22(3):327-35.
3. Aktuğ, H., Çetintaş, V.B., Uysal, A., Oltulu, F., Yavaşoğlu, A., Akarca, S.Ö. and Kosova, B. (2013). Evaluation of the effects of STZ-induced diabetes on in vitro fertilization and early embryogenesis processes. *Journal of Diabetes Research*, 2013:603813.
4. Aktug, H., Çetintaş, V.B., Kosova, B., Oltulu, F., Demiray, Ş.B., Çavuşoğlu, T., Akarca, S.Ö. and Yavaşoğlu A. (2012). Dysregulation of nitric oxide synthase activity and bcl-2 and caspase-3 gene expressions in renal tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Turk J Med Sci*, 42 (5): 830-838.
5. Akarca, S.Ö., Yavasoglu, A., Uysal, A., Oltulu, F., Dilsiz, O.Y., Köse, T. and Aktug, H. (2012). Investigation on the effects of experimental STZ induced diabetic rat model on basal membrane structures and gap junctions of skin. *International Journal of Diabetes in Developing Countries* 32,; 2, 82-89.

Ulusal Hakemli ve Diğer Bilimsel Dergilerde Yapılan Yayınlar

1. Demiray, S.B., Ayla, Ş., Oltulu, F., Çavuşoğlu, T., Akarca, Ö., Dilsiz, Ö.Y., Ergüven, M., Öktem, G. ve Bilir, A. (2011). MDAH- 2774 over kanser kök hücrelerinde kemoterapi sonrası apoptotik etkilerin incelenmesi. *Ege Tıp Dergisi*, 50(2):103-109.

Bildiriler

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildirileri

1. Celebi SB, Akarca Dizakar O, Omeroglu S, and Gokcinar Yagci B. (2017, 24–27 August). Combination of smooth muscle cells and fibroblasts differentiated from human umbilical cord vein CD146+ cells with human extracellular matrix proteins. 46th Annual Scientific Meeting of the ISEH - International Society for Experimental Hematology. Frankfurt, Germany.

2. Akarca Dizakar, S.Ö., Aktuğ, H., Oltulu, F., Öktem, G., Yavaşoğlu, A. , Açıkgöz, E., Yiğittürk, G., Demir, K. and Uysal, A. (2017, 18-21 May). *The effects of sunitinib on immunoreactivities of vimentin, E-cadherin and S100 in kidneys of the experimental Streptozotocin -induced mouse model*. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Turkey.
3. Keleş, Z., Göktaş, G., Erbaş, D., Demirel, H.A., Akarca Dizakar, S.Ö. and Elmas Ç. (2017, 18-21 May). *The Ultrastructural And Molecular Changes In Motor Cortex And Spinal Cord Ventral Horn Motor Neurons Of Rats Exposed To Chronic High Intensity-Intermittent Running Exercise*. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Turkey.
4. Dernek, D., Ömeroğlu, S., Coşkun Akçay, N., Kartal, B., Akarca Dizakar, S.Ö., Türkoğlu, İ. and Aydın V. (2017, 18-21 May). *Histopathologic Examination Of Possible Effects Of Melatonin Against The Alternation On Uterus Of Neonatal Exposure to Bisphenol A In Female Rats*. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Turkey.
5. Peker, T.V. , Ömeroğlu, S., Dizakar, S.Ö. and Türkoğlu I. (2017, 18-21 May). *Use of 3D medical modeling and animation in the Histology and Embryology*. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Turkey.
6. Türkoğlu, İ., Ömeroğlu, S., Kavutçu, M., Akarca Dizakar, S.Ö., Coşkun Akçay, N., Eşmekaya, M.A. and Kocabıyık M. (2017, 18-21 May). *The effects of melatonin on possible damage will be occur on adipocytokines and testis with the coadministration of fructose and bisphenol A*. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Turkey.
7. Demir Yarar, H., Ömeroğlu, S., Şen, İ., Coşkun Akçay, N., Akarca Dizakar, S.Ö., Bıçaklıoğlu, F. and Türkoğlu, İ. (2017, 18-21 May). *Comparative Investigation of Structure of Male Genital System of Duktus deferens*. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Turkey.

8. Aktug, H., Çetintaş, V.B., Kosova, B., Yavaşoğlu, A., Oltulu, F., Akarca, S.Ö. and Uysal, A. (2011, 10-13 September). *Evaluation of The Effects Of STZ-Induced Diabetes on In Vitro Fertilization and Early Embryogenesis Processes*. European Molecular Biology Organization (EMBO), Vienna, Austria.
9. Aktug, A., Uysal, A., Yavasoglu A., Oltulu, F., Akarca, O. and Oktem., G. (2011, April) *Reduced expression of induced pluripotent stem (IPS) cell markers in diabetic rat testes*. European Molecular Biology Organization (EMBO), Paris-France.
10. Akarca, S.Ö., Yavaşoğlu, A., Uysal, A., Oltulu, F., Yılmaz-Dilsiz, Ö., Köse, T., and Aktuğ, H. (2013). *Investigation on the effects of experimental stz-induced diabetic rat model on basal membrane structures and gap junctions of skin*. The 5th EMBO Meeting, Amsterdam.

Ulusal ve Uluslararası Katılımlı Bilimsel Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiri

1. Aktug, H., Uysal, A., Çetintaş, V.B., Oltulu, F., Yavaşoğlu, A., Akarca, Ö. ve Kosova, B. Deneyisel diabet ile bağlantılı infertiliteden ve erken embriyolojik yetmezlikten kim daha fazla sorumlu; diyabetik sıçan kaynaklı oosit ya da sperm hücresi? (2012). XI.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Cell &Tissue Biology Research. Sayfa 56, Volume/ Denizli, Türkiye.

Ulusal ve Uluslararası Katılımlı Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildiri

1. Keleş, Z., Göktaş, G., Erbaş, D., Demirel, H.A., Akarca Dizakar, S.Ö. and Elmas, Ç. (2016) The Ultrastructural And Molecular Changes In Motor Cortex And Spinal Cord Ventral Horn Motor Neurons Of Rats Exposed To Chronic High Intensity-Intermittent Running Exercise Cell & Tissue Biology Research Turkish Histology and Embryology Society Volume 5 / 2016 13th National Histology and Embryology Congress April 30-May 3, 2016 .İzmir , Turkey.
2. Oltulu, F., Yavaşoğlu, A., Aktuğ, H., Uysal, A., Turgan, N., Yavaşoğlu, K.Ü., Akarca, Ö. ve Öktem, G. (2012). Sıçan hipertiroidi modelinde ovaryum dokusunun histokimyasal, immunohistokimyasal ve moleküler olarak araştırılması. XI. Ulusal Histolojive

Embriyoloji Kongresi, Cell &Tissue Biology Research. Sayfa 73.Volume/ Supplement 2012. Denizli, Türkiye.

3. Oltulu, F., Yavaşoğlu, A., Aktuğ, H., Uysal, A., Turgan, N., Yavaşoğlu, K.Ü., Akarca, Ö. ve Öktem, G. (2012). Sıçan hipertiroidi modelinde testis dokusunun histokimyasal, immunohistokimyasal ve moleküler olarak araştırılması. XI. Ulusal Histolojive Embriyoloji Kongresi, Cell &Tissue Biology Research. Sayfa 72. Volume/ Supplement 2012, Denizli, Türkiye.

4. İncebeyaz, B., Ilgaz, C., Elmas, Ç., Take, G., Göktaş, G., Göktaş, T., Kaplanoğlu, İ., Saraç, G., Seymen, C.M., Akarca Dizakar, S.Ö., Ömeroğlu, S. ve Erdoğan, D. (2014, 27-30 May) Benzo(a)pirene Etkin Kalan Duktus epididimis ve Duktus deferens Dokularında Oluşan Değişikliklerde Curcuminin Etkisi. XII. National Histology And Embryology Congress Ankara University / Ankara, Türkiye.

5. Buluç, B., Erdoğan, D., Elmas, Ç., Take Kaplanoğlu, G., Göktaş, G., Göktaş, T., Kaplanoğlu, İ., Saraç, G.N., Seymen, C.M., Akarca Dizakar, S.Ö., Ömeroğlu, S. ve Ilgaz, C. (2014, 27-30 May) Benzo(a)piren Uygulanan Sıçanlarda Testis Dokusunda Oluşan Değişikliklere Bir Antioksidan Olan Curcumin'in Koruyucu Etkisi XII. National Histology And Embryology Congress, Ankara University / Ankara , Türkiye.

6. Ağaçkanlı, M.F., Ilgaz, C., Elmas, Ç., Take Kaplanoğlu, G., Göktaş, G., Göktaş, T., Kaplanoğlu, İ., Saraç, G.N., Akarca Dizakar, S.Ö., Sırav, B., Seyhan, N. ve Erdoğan, D. (2014, 27-30 May). Kronik Cep Telefonu Radyasyonunda Melatoninin Uygulamasının Tuba Uterina' ya Etkisi .XII. National Histology And Embryology Congress, Ankara University / Ankara , Türkiye.

7. Şahin, C., Elmas, Ç., Erdoğan, D., Take Kaplanoğlu, G., Göktaş, G., Göktaş, T., Kaplanoğlu, İ., Saraç, G.N., Akarca Dizakar, S.Ö., Sırav, B., Seyhan, N. ve Ilgaz C. (2014, 27-30 May). Cep Telefonu Radyasyonunun Uterusta Oluşturduğu Değişikliklere Melatonin Uygulamasının Etkisi. XII. National Histology And Embryology Congress, Ankara University / Ankara ,Türkiye.

Ödüller

15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2017) – Best Poster award in Second Prize; May, 18-21, 2017, Antalya, Turkey.

Hobiler

Puzzle, Seyahat, Sinema



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..