

**POLİETİLEN TEREFTALAT YAPILI NANOPLASTİKLERE
SUB-KRONİK MARUZİYETİNİN TESTİS VE SPERM
ÜZERİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ HASARIN FARE
MODELİNDE ARAŞTIRILMASI**

Oğuz Kaan TOMBUL

211503103

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nur KALUÇ

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Eylül, 2023

**POLİETİLEN TEREFTALAT YAPILI NANOPLASTİKLERE
SUB-KRONİK MARUZİYETİNİN TESTİS VE SPERM
ÜZERİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ HASARIN FARE
MODELİNDE ARAŞTIRILMASI**

Oğuz Kaan TOMBUL

211503103

ORCID: 0000-0002-4574-7904

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nur KALUÇ

İstanbul

T.C. Maltepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Eylül, 2023



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.



ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim sırasında ve çalışmanın yürütülmesi sırasında bana desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mehmet CINCIK ve Dr. Öğr. Üyesi Nur KALUÇ'a, nanoplastik üretimi için PET materyali temini için Sayın İbrahim Murat ÇAĞLAR'a, nanoplastiklerin karakterizasyonundaki desteği için ATOMİKA'ya, deney hayvanlarında bana tüm yardım ve imkanları sunan merkez müdürü Prof. Dr. Mustafa Erinç SİTAR, Veteriner Hekim Necdet Altınır'e ve Yüksel ACAR'a, ihtiyacım olduğunda bana laboratuvarını açan MÜKKAM merkez müdürü Prof. Dr. Ranan Gülhan AKDAŞ ve MÜKKAM ekibine, yazım ve yöntemlerde yardımcı tecrübesi ile bana yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Hale BAYRAM'a, deneyler sırasında yardımlarını asla esirgemeyen Arife Dilşad AKDAĞ ve Rana KIZILKAYA'ya, maddi ve manevi desteğini ile her zaman yanımda olan ve beni her koşulda dinleyip destekleyen Batuhan Ekin AKBULUT'a, her zaman maddi ve manevi olarak arkamda durarak beni destekleyen güvenen annem Yıldız TOMBUL'a teşekkürü borç bilirim.

Oğuz Kaan TOMBUL

Eylül, 2023

ÖZET

POLİETİLEN TEREFTALAT YAPILI NANOPLASTİKLERE SUB-KRONİK MARUZİYETİNİN TESTİS VE SPERM ÜZERİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ HASARIN FARE MODELİNDE ARAŞTIRILMASI

Oğuz Kaan Tombul

Yüksek Lisans Tezi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nur Kaluç

Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 2023

İnfertilite, 12 ay veya daha fazla düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrası gebelik elde edilememesi ile tanımlanan erkek veya dişi üreme organlarından kaynaklanan bir hastalıktır. Birçok genetik faktör ve yaşam tarzı faktörünün erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu düşünülür. Yaşam tarzı faktörlerinden biri olan mikro ve nanoplastiklere maruziyetin de infertilitede etkili olabileceği çalışmalarda bildirilmiştir.

Bu çalışmada sentetik yapılı polimerlerden biri olan polietilen tereftalat (PET) nanoplastiğinin erkek üreme sağlığı üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı. Beş haftalık 18 adet Balb-C türü fare rastgele seçilerek kontrol grubu, düşük doz PET-NP ve yüksek doz PET-NP uygulama grubu olarak üç gruba ayrıldı (n=6). 28 gün boyunca 100'er µL olacak şekilde sırası ile kontrol grubuna serum fizyolojik, düşük doz grubuna 0.1 mg/gün PET nanoplastiği ve yüksek doz grubuna 0.5 mg/gün PET nanoplastiği oral gavaj ile verildi.

Sub-kronik PET nanoplastiği uygulaması sonucunda deneklerin testis organ endekslerinde kontrole kıyasla anlamlı bir değişim görülmezken ($p>0.05$), hem düşük hem de yüksek doz uygulama gruplarının sperm sayımlarında kontrole kıyasla anlamlı azalmalar görüldü ($P<0.05$). Benzer bir şekilde hem düşük hem de yüksek doz uygulama gruplarında sperm morfolojileri incelendiğinde normal morfolojiye sahip sperm oranlarında anlamlı azalış görüldü ($p<0.05$). Ayrıca, yüksek doz PET nanoplastiklerine maruz kalan grupta, sperm boyun anomalilerinde kontrole kıyasla anlamlı artış görüldü ($P<0.01$). COMET analiz yöntemi ile belirlediğimiz DNA hasarı sonuçlarında ise, PET

nanoplastiklerine maruz kalan grupların sperm %kuyruk DNA miktarında anlamlı artış görüldü ($P<0.05$). Son olarak, testislerden alınan histolojik kesitlerin tübül yapıları Johnsen skorlaması ile değerlendirildiğinde, PET plastiğine maruz bırakılan her iki grupta da spermatogenezde kontrole kıyasla anlamlı bir değişim görüldü ($P<0.05$).

Sonuç olarak sub-kronik PET nanoplastik maruziyeti, sperm sayısını azaltmakta, sperm morfolojisinde bozulmalara neden olmakta, spermelerde DNA kırıkları meydana getirmekte ve spermatogenez aşamalarında negatif etkiler oluşturmaktadır. Tüm bu negatif etkiler neticesinde PET nanoplastiği erkek üreme sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir.

Anahtar Sözcükler: Polietilen tereftalat, nanoplastik, toksisite, infertilite, spermatozoa, sperm morfolojisi, sperm parametreleri

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SUB-CHRONIC POLYETHYLENE TEREPHTHALATE NANOPLASTIC EXPOSURE ON TESTES AND SPERM IN MICE

Oğuz Kaan Tombul

Master Thesis

Department of Histology and Embryology

Clinical Embryology Master's Programme with Thesis

Thesis Advisor: Assist. Prof. Nur Kaluç

Maltepe University Graduate School, 2023

Infertility, which is defined as the inability to achieve pregnancy after 12 months or more of regular unprotected sexual intercourse, is a disease arising from the male or female reproductive organs. Many genetic and lifestyle factors are thought to be associated with male infertility. It has been reported that exposure to micro and nanoplastics, which is among these lifestyle factors, may also be effective in infertility.

In this study, we aimed to investigate the effect of one of the synthetic polymers, polyethylene terephthalate (PET) nanoplastics, on male reproductive health. For this aim, eighteen five-week-old Balb-C type mice were randomly selected and divided into three groups as control group, low-dose PET-NP and high-dose PET-NP administration group (n=6). 100 µL of saline was given to the control group, 0.1 mg/day PET nanoplastic to the low dose group, and 0.5 mg/day PET nanoplastic to the high dose group for 28 days, by oral gavage.

Our data revealed that sub-chronic PET nanoplastics exposure did not result in a significant change in testes index compared to the control group ($p>0.05$), while there was significant decrease in sperm counts in both low and high dose groups compared to that of control group ($P<0.05$). Similarly, sperm morphologies of both low and high dose PET-NP exposed animals were significantly changed, while the percentages of sperms with normal morphology significantly decreased compared to that of untreated control ($p<0.05$). Furthermore, there was a significant increase in sperm neck anomalies in the group exposed to high-dose PET nanoplastics compared to the that of control group

($P < 0.01$). Also, there was a significant increase in the sperm % tail DNA of the groups exposed to PET nanoplastics, which were revealed by COMET analysis, indicating the DNA damage ($P < 0.05$). Lastly, Tubule structures of histological sections taken from testicles were evaluated by Johnsen scoring and a significant change in spermatogenesis was observed in both groups exposed to PET nanoplastic compared to that of control group ($P < 0.05$).

In conclusion, sub-chronic PET nanoplastics exposure led to decrease in sperm count, disruption in sperm morphology, induces DNA strand breaks and have a negative impact in the stages of spermatogenesis. As a result of these negative effects, PET nanoplastic negatively affects male reproductive health.

Keywords: Polyethylene terephthalate, nanoplastic, toxicity, infertility, spermatozoa, sperm morphology, sperm parameters

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
1.1 Problem.....	1
1.2 Amaç.....	2
1.3 Önem.....	3
1.4 Varsayımlar.....	3
1.5 Sınırlıklar	4
1.6 Tanımlar.....	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Mikroplastikler ve Nanoplastikler	6
2.2 PET-Nanoplastikler	8
2.3 İnfertilite	10
2.4 Testis Morfolojisi.....	12
2.5 Spermatogenez.....	13
2.6 Sperm Morfolojisi.....	14

2.7 DNA İplik Kırıkları	16
3. YÖNTEM	18
3.1 Araştırma Modeli	20
3.2 Evren ve Örneklem	20
3.3 Veriler ve Toplanması	20
3.4 Verilerin Çözümlemesi ve Yorumlanması	21
3.4.1 PET nanoplastiklerinin karakterizasyonu	21
3.4.2 Testis indeksinin hesaplanması.....	21
3.4.3 Sperm sayımı ve morfolojik açıdan incelenmesi.....	21
3.4.4 Testis dokusundan histolojik kesitlerin hazırlanması ve spermatogenezisin johnsen skorlaması ile değerlendirilmesi.....	22
3.4.5 DNA iplik kırıklarının alkali COMET analizi ile belirlenmesi	23
3.4.6 İstatistiksel Analiz.....	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	25
4.1 Bulgular	25
4.1.1 Testis ağırlıklarının değerlendirilmesi	25
3.4.2 Sperm sayısının denekler arasında değerlendirilmesi.....	26
3.4.3 Sperm morfolojisi	27
3.4.4 Sperm hücrelerinin COMET analizi ile DNA kırıklarının incelenmesi	31
3.4.5 Spermatogenezin Johnsen skorlaması ile incelenmesi	33
4.2 Tartışma	34
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	41

EKLER.....	64
Ek 1: Etik Onay Formu.....	64
Ek 2: Deney hayvanları kullanım sertifikası	65
ÖZGEÇMİŞ	66



TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. PET-NP Uygulama Protokolleri	19
Tablo 2. Çalışmada kullanılan PET nanoplastiklerine ait hidrodinamik çap, çoklu dağılım endeksi ve zeta potansiyali değerleri.....	21
Tablo 3. 28 günlük deney sonunda deneklerin ortalama vücut ağırlıkları, ortalama testis ağırlıkları ve ortalama testis indeksleri ve standart sapmaları (n=6).	25
Tablo 4. Deneklerin mililitredeki sperm sayısı değerlerinin ortalaması ve standart sapmaları (n=6).	26
Tablo 5. 28 gün süre ile 0.1 mg/gün ve 0.5 mg/gün PET-NP'lere maruz kalan ve kontrol grubuna ait farelerin spermlerin morfolojik yapılarının oranları ve standart sapmaları (n=6).....	30
Tablo 6. Kontrol ve uygulama gruplarının Johnsen skorlarının ortalamaları ve standart hataları	34

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** Sağlıklı bir farenin testis morfolojisi 12
- Şekil 2.** Sperm morfolojisi bozukluklarına örnekler- polistiren nanopartiküllerin sub-kronik oral uygulaması sonrası sperm morfolojisine etkisi (a-b, normal morfolojiye sahip sperm; c-f, baş kısmında anomaliye sahip olan sperm; g-j, boyun bölgesi hasarlı sperm; k-l, kuyruk hasarı olan sperm) 15
- Şekil 3.** 28 gün süre ile 0.1 mg/gün, 0.5 mg/gün PET-NP'lere maruz kalan ve kontrol grubuna ait farelerin mililitredeki ortalama sperm sayıları ve standart sapmaları (n=6; p<0.05*, p<0.001***). 27
- Şekil 4.** Kontrol grubu deneklerinin sperm morfolojisi. Sperm hücreleri morfolojik açıdan uygun bir yapıdadır. A. Kontrol grubunun 4 numaralı deneğin sperm morfolojisi. B. Kontrol grubunun 5 numaralı deneğin sperm morfolojisi (Diff-Quick, x400). 28
- Şekil 5.** 0.1 mg/gün PET-NP uygulanan denek grubunun sperm morfolojisi. A. Sperm baş morfolojisinde ve akrozomal yapıdaki bozulmalar. B. Sperm boyun bölgesindeki hasarlanma ve yine bir başka sperm başındaki anormal yapı (Diff-Quick, x400). 29
- Şekil 6.** 0.5 mg/gün PET-NP'e maruz bırakılan deneklerin sperm morfolojisi. A. Sperm başında görülen anormallikler. B. Boyun hasarı ve sperm baş morfolojisinde görülen anormallikler. C. Baş morfolojisinde değişim (Diff-Quick, x400). 30
- Şekil 7.** 28 gün boyunca 0.1 mg/gün ve 0.5 mg/gün PET-NP'lere maruz kalan ve kontrol grubuna ait farelerin ortalama normal ve anormal sperm yüzdeleri ile standart sapmaları (n=6; * p<0.05; ** p<0.01). 31
- Şekil 8.** 28 gün boyunca 0.1 mg/gün ve 0.5 mg/gün PET-NP'lere maruz kalan ve kontrol farelerinin COMET analizi ile hesaplanan ortalama % kuyruk DNA oranları ile standart sapmaları (n=5; * p<0.05). 32
- Şekil 9.** COMET analizi gerçekleştirilen sperm hücrelerinin DNA kırıklarının görüntüsü. Şekil A. ve şekil B. Kontrol grubuna ait spermelerdir. Şekil C. ve şekil D. 0.1 mg/gün grubuna ait spermelerdir. Şekil E. ve şekil F. ise 0.5 mg/gün grubuna ait spermeler görülmektedir (EtBr, x400). 33

Şekil 10. Johnsen skorlaması ile spermatogenezin incelendiği farelere ait testislerin tübül yapıları. Şekil A. kontrol gruba ait bir tübül yapısı. Şekil B. 0.1 mg/gün grubuna ait tübül yapısı. Şekil C. 0.5 mg/gün grubuna ait tübül yapısı (H&E, x400). 34



KISALTMALAR

MP : Mikroplastikler

NP : Nanoplastikler

PS : Polistren

PE : Polietilen

PET : Polietilen tereftalat

PET-NP : Polietilen tereftalat nanoplastik

1. GİRİŞ

1.1 Problem

Plastikler, genellikle petrol türevlerinden elde edilen, hafifliği, renklendirilebilirliği ve kırılmazlığı gibi üstün özelliklere sahip sentetik polimerler olup günlük hayatımızın vazgeçilmez bir parçasıdır (Halden, 2010; Wagner, 2017). Dünyada her yıl üretilen plastik miktarı 1950 yılında 2 milyon ton iken, 2019 yılı itibariyle 368 milyon tona ulaşmış durumdadır (Plastics Europe, 2022). Ortaya çıkan plastik atıkların miktarı 2015 yılı itibariyle 6.3 milyar tona ulaşmış durumda olup, eğer üretim bu hızda devam ederse 2050 yılında 12 milyar ton olacağı tahmin edilmektedir. Biriken bu plastik atıklar, ısı, güneş ışığı, pH ve çevresel etkilere maruz kalarak mikroplastiklere (MP) (<5mm) ve nanoplastiklere (NP) (<1 µm) dönüşmektedir (Smith, Love, Rochman ve Neff, 2018). Aynı zamanda polimer yapısı ve üretim tarihinin üzerinden geçen süre ile ilişkili olarak da plastiklerde bozulmalar meydana gelebilmekte ve hızlıca MP/NP'lere dönüşebilmektedir.

Sağlık riski oluşturan bu parçacıkların toksisitesinin değerlendirildiği çalışmalar partikül boyutuna göre sınıflandırıldığında, çalışmaların büyük bir bölümünü MP'lerin, plastik türüne göre sınıflandırıldığında ise polistren (PS) ve polietilen (PE) hammaddesinin oluşturduğu görülmektedir (Lehner, Weder, Petri-Fink ve Rothen-Rutishauser, 2019; Kik, Bukowska ve Sicińska, 2020). Fakat yaygın olarak kullanılan polietilen tereftalat (PET) materyali ile gerçekleştirilen toksisite çalışmaları oldukça sınırlıdır. PET, tereftalik asit ve etilen glikolden oluşan, yüksek bir moleküler ağırlığa sahip olan en yaygın sentetik polimerdir (Wei ve Zimmermann, 2017). Amorf ve yarı kristal yapılı bu polimer, en yaygın kullanılan ve üretilen plastikler arasında yer almaktadır (Plastics Europe, 2022; Webb, Arnott, Crawford ve Ivanova, 2013).

Farklı plastik türlerinden elde edilen NP'lerin ve MP'lerin genel toksikolojik etkilerinin belirlendiği çalışmalar her ne kadar limitli olsa da, bu çalışmalar arasında erkek üreme sistemi üzerinde negatif etkilerinin bulunduğu dair veriler mevcuttur (Marcelino, vd., 2022). Zhou ve ark.'ın 50 nm boyutundaki PS nanoplastiklerin toksisitesini fare

modelinde araştırdığı çalışmasında, 35 günlük PS nanoplastikleri (PS-NP) maruziyetinin deneklerin spermelerinde akrozom btnlgn bozduğu ve akrozom parametrelerinde değişikliklere sebep olduğu, sperm sayısında ve sperm hareketliliğinde azalmalar olduğu göstermiştir (Zhou vd., 2022). Amereh ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir başka çalışmada Wistar sıçanların, 5 hafta boyunca PS-NP'lere maruz bırakılması sonucunda folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH) ve testosteron konsantrasyonlarında düşüşler gözlenmiş ve semen yoğunluğunda azalmalar olduğu bildirilmiştir (Amereh, Babaei, Eslami, Fazelipour ve Rafiee, 2020). Nanoplastiklerden oldukça büyük boyutlara sahip olan MP'lerin toksisitesi ile ilişkili Jin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, farelerin polistiren MP'lere maruziyetinin seminifer tüplere zarar verdiği, testis iltihabına neden olduğu, kan-testis bariyerini bozduğu, sperm kalitesini ve testosteron seviyelerini dşrdği bildirilmiştir (Jin vd.,2021). Hou ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı başka bir çalışmada MP maruziyetinin epididimdeki spermelere zarar verdiği görülmüş, testislerde üretilen spermelerde atrofi ve apoptozun arttığı bildirilmiştir (Hou, Wang, Liu ve Wang, 2021).

Yapılan çalışmalarda maruz kalınan plastik boyutunun küçülmesinin toksikolojik etkilerinin artışında önemli bir rolü olduğu grlmştir (Lehner, Weder, Petri-Fink ve Rothen-Rutishauser, 2019). Fakat NP'lerin MP'lere oranla biyolojik etkileşimlere yol açan daha büyük bir yüzey-hacim oranına sahip olması, biyolojik bariyerleri geçme potansiyelinin fazla olması gibi özelliklerinden dolayı daha tehlikeli olduğu bildirilmektedir (Rist ve Hartman, 2018). Bununla beraber, kullanım alanı oldukça yaygın olan ve günlük hayatın bir vazgeçilmezi haline gelen PET plastiğinden türeyen MP veya NP'lerin sperm ve testis üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmanın bulunmaması literatürde önemli bir eksiklik olarak görülmektedir. Gerçekleştirilen tez çalışması ile PET-NP'lerinin sperm ve testis üzerindeki etkileri ilk kez araştırılmıştır.

1.2 Amaç

Çalışmamızın amacı günlük hayatımızda oldukça fazla yer bulan plastiklerin bir türü olan polietilen tereftalattan türeyen nanoplastiklere maruziyetin erkek üreme sistemindeki etkisini araştırmaktır. Araştırmamızın konu ile ilgili literatür eksikliğinin giderilmesinde fayda sağlayacağını düşünmekteyiz. Araştırmamızın cevaplamaya çalıştığı sorular:

- 1) PET yapılı nanoplastiklere maruziyet sperm parametreleri üzerinde olumsuz bir etki bırakır mı?
- 2) PET nanoplastikler sperm hücrelerinde DNA hasarı meydana getirir mi?
- 3) Polietilen Tereftalat yapılı nanoplastiklerin spermatogeneze etkisi var mı?

1.3 Önem

Plastiklerin üretiminin her geçen gün artışı ve bu üretime bağlı olarak hayatımızdaki yeri giderek artmaktadır. Buna bağlı olarak her geçen gün plastik maruziyetimiz artarak insan sağlığını tehdit eden bir unsur haline gelmektedir. Sınırlı sayıda da olsa, plastik türevli maddelerin ve bu maddelerin üretiminde kullanılan malzemelerin etkileri ile ilgili araştırmalar literatürde mevcut olmasına rağmen NP'ler ve MP'lerin üreme sağlığındaki etkisi ile ilgili çalışmalar yetersizdir. Yapılan hayvan deneyleri çalışmalarında plastik üretiminde kullanılan maddelerin ve plastik türevli malzemelerin erkek üreme sisteminde oksidatif stres oluşumunda, doku hasarı oluşumunda ve sperm parametrelerinin düşmesinde etkili olduğu göstermektedir. Fakat çalışmalar arasında NP'lerin ve MP'lerin üreme sağlığındaki etkisi ile ilgili yeterli çalışmalar bulunmamakla beraber, günlük hayatta oldukça yoğun olarak maruz kaldığımız PET nanoplastiklerinin sperm ve testis üzerindeki etkilerinin belirlendiği çalışmalar literatürde mevcut değildir. Polietilen tereftalat yapılı nanoplastikler ile gerçekleştirilen bu çalışma, erkek üreme sağlığındaki etkilerinin anlaşılmasında ve literatür eksikliğinin giderilmesinde önemli bir katkı sağlayacaktır.

1.4 Varsayımlar

Nano ve mikroplastik maruziyeti birçok doku ve organda toksik etkilere sebep olabilmektedir. İn vivo araştırmalar, nano ve mikroplastiklere maruziyetin sonucunda bu plastiklerin bağırsak epiteli (Lei vd., 2018), karaciğer (Yang, Chen, Lu ve Liao, 2019) ve böbrek (Deng, Zhang, Lemos ve Ren, 2017) gibi birçok hayati organ ve dokuya ulaşarak birikim gösterdiği ve aynı zamanda lipit profili değişikliklerine (Lu, Wang, Cao, Chen ve Dong, 2018) ve enerji metabolizması bozukluklarına (Deng vd., 2017) neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca NP ve MP'lerin testis hasarına ve sperm parametrelerindeki düşümlere neden olduğu da farklı çalışmalarda bildirilmiştir (Marcelino vd, 2022; Zhou vd., 2022; Amereh vd., 2020; Jin vd., 2021; Hou vd., 2021). Tüm bu çalışmalar göz önüne

alındığında, birçok kullanım alanına sahip olan polietilen tereftalatın literatürdeki yeri oldukça sınırlı ve yetersiz kalmaktadır. Farklı organizmalarda PET nanoplastiklerinin biyolojik bariyerleri aşabildiğinin gösterilmesi, PET nanoplastiklerine maruziyetin doğrudan kan-testis bariyerini aşarak veya dolaylı olarak testis dokusunda ve sperm hücrelerinde hasara neden olarak infertiliteye sebep olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle çalışmamızın konu ile ilgili literatür eksikliğinin giderilmesinde ve plastik maruziyetine bağlı erkek infertilitesinin anlaşılmasında etkili olacağı düşünülmektedir.

1.5 Sınırlıklar

PET-nanoplastiklerin fare modelinde in vivo toksisite veya erkek üreme sisteminde ve erkek infertilitesindeki ilişkisi ile ilgili temel alınabilecek bir çalışma, ve ayrıca PET-NP'lerin hem besinlerde hem de çevrede bulunan konsantrasyonları hakkında bilgi bulunmadığından çalışmada kullanılan PET-NP konsantrasyonları aynı yaş grubunun ve uygulama sürelerinin kullanıldığı fare modelinde PS-NP veya MP'ler ile gerçekleştirilen çalışmalar temel alınarak belirlenmiştir (Deng vd., 2017; Jeong vd., 2022; Nie vd., 2021).

1.6 Tanımlar

Polietilen Tereftalat: Polimer yapılı, tereftalik asit ve etilen glikolden oluşan, yaklaşık 25-50 yıllık ömre sahip, tek kullanımlık içecek şişeleri ve ambalajlar için tekstil elyafları ve reçineleri üretmek için kullanılan bir termoplastiktir (Pirillo, Pollegioni ve Molla, 2021).

Mikroplastikler: Mikroplastikler büyük plastik parçaların çevresel etkenler ile bozunmasından türeyen veya türetilen, boyutları 5 mm'den küçük olan minyatür formdaki küçük plastik parçalardır (Toussaint vd., 2019).

Nanoplastikler: Dış boyut 1 μm 'den küçük, doğal veya üretilmiş, potansiyel ekotoksositeye sahip, kimyasal kirleticiler ve ayrıca patojenler olarak uluslararası kabul görmüş bir tanıma sahip yapılardır (Hirt ve Body-Malapel, 2020).

2. GENEL BİLGİLER

Dünyada insanlar tarafından üretilen ve dünyanın her yerine yayılmış doğal olmayan ürünlerden biri plastiktir. Geyer ve arkadaşları, 2017 yılına kadar toplam 8.3 milyar metrik ton işlenmemiş plastiğin üretildiğini vurgulamıştır (Geyer, Jambeck ve Law, 2017). Giderek artan bu plastik üretimini ile beraber çevreye yayılan plastik parçaların sayısı da artmaktadır. Çevredeki mikroplastikler ve nanoplastikler dahil olmak üzere plastik parçaların doğal yollar ile kolay bir şekilde bozunmaması nedeniyle dünyanın en kritik çevre sorunlarından biri haline gelmiştir (Yang, Wang ve Xia, 2020). Plastik türleri hem ekosisteme karıştığında hem de kullanımı sırasında sağlık riski oluşturan mikro ve nano boyutlu plastikler üretmektedir (Oßmann vd., 2018; Hernandez vd., 2019; Li vd., 2020; Kankanige ve Babel, 2020). Sağlık riski oluşturan bu parçacıkların toksisitesinin değerlendirildiği çalışmalar partikül boyutuna göre sınıflandırıldığında, çalışmaların büyük bir bölümünü MP'lerin, plastik türüne göre sınıflandırıldığında ise polistren (PS) ve polietilen (PE) hammaddesinin oluşturduğu görülmektedir (Lehner vd., 2019; Yong, Valiyaveetil ve Tang, 2020; Pirsahab, Hossini ve Makhdoumi, 2020; Kik, Bukowska ve Sicińska, 2020).

Plastikler ve plastik içeren ürünlerin dünyanın hemen her yerinde doğada dolaşımı, plastik kirliliğine neden olur (Okeke vd., 2022). Bu plastikler doğada ultraviyole ışığa, hava koşullarına ve biyolojik bozunmaya maruz kalarak plastiklerin çok daha küçük boyutları olan mikroplastikleri (MP'ler) ve nanoplastikleri (NP'ler) oluşturur (Yin vd., 2021). NP'ler ve MP'ler kalıcı çevre kirleticileridir. Büyük plastik parçaların çevresel faktörler ile bozunmasından türetilenler ile oluşmalarının ardında karada olmalarının yanı sıra deniz ve içme sularına karışarak evlerimize kadar ulaşabilmektedir (Auta, Emenike, ve Fauziah, 2017; Galloway, Cole ve Lewis, 2017; de Souza Machado, Kloas, Zarfl, Hempel ve Rillig, 2018). İnsanların mikro ve nanoplastiklere maruziyeti genellikle sindirim, solunum ve deri yoluyla gerçekleşmektedir (Prata, Costa, Joao, da Costa Duarte ve Rocha-Santos, 2018). Özellikle gıda ürünlerindeki ambalajlar ve PET şişeli su tüketimi nedeniyle oral yolla alınan mikro ve nanoplastik miktarı oldukça fazladır. Tuz, süt, kahve ve poşet çay gibi birçok gıda maddesinde tespit edilmelerinin yanı sıra karton bardak ve

plastik ambalajlı ürünlerin tüketimi de bu partiküllere maruziyetimizi artırmaktadır (Souza ve Fernando, 2016).

MP'ler ve NP'ler, doğada çevresel kalıcılıkları nedeniyle potansiyel tehlikeler oluşturmaktadır (Alimba ve Faggio, 2019; de Souza Machado vd., 2018; de Sá, Oliveira, Ribeiro, Rocha ve Futter, 2018). Patojenik bir yapıya sahip olmalarının yanı sıra (Sgier, Freimann, Zupanic ve Kroll, 2016; Wu vd., 2019), ekosistemi tehdit eden bir toksisiteye sahiptir (Adam, Tong ve Bernd, 2019; Lambert, Scherer ve Wagner, 2017). Küçük yapılarından dolayı plastikler kimyasal kirleticiler için taşıyıcı olabilmeleri (Mensch vd., 2010; Sinkó vd., 2012) nedeniyle önemli ekolojik ve sağlık sorunlarına yol açmaktadırlar (Akdogan vd., 2019; Caruso vd., 2019). Bununla birlikte, literatürde insan sağlığına etkilerine ilişkin önemli bir araştırma eksikliği mevcuttur.

2.1 Mikroplastikler ve Nanoplastikler

Plastiklerin çoğu inert malzemelerdir, ancak 5 mm'den küçük boyutlu (<5 mm) mikroplastiklere bölündüklerinde daha problemlili hale gelebilirler. Geniş yüzey alanı nedeniyle, MP'ler çevresel kirleticileri daha iyi emebilir ve aktarabilir, bu nedenle onları daha büyük plastik parçalarından potansiyel olarak çok daha tehlikeli hale getirir (Hwang vd., 2020; Wright ve Kelly, 2017). NP'ler ise 1 mikrondan daha küçük boyutlu (<1 µm) polimerler olarak tanımlanır. NP'ler 1-1000 nm boyutlarında küçük parçalar olarak tanımlanır fakat bilimsel tanım hala tartışmalıdır (Gigault vd., 2018).

NP'lerin küçük boyutu, mikroplastiklere kıyasla rahatlıkla tüketilmelerini sağlar (da Costa, Santos, Duarte ve Rocha-Santos, 2016). Nanoparçacıklar hayvan yemi veya deniz tuzu gibi çeşitli yollar aracılığıyla insan ve hayvan besin zinciri boyunca kolay bir şekilde ilerleyebilmektedir (Yang vd., 2015). Özellikle NP'lerin deniz, toprak, içme suları gibi doğada birçok yaşam alanına rahatlıkla karışması nedeniyle organizmaların vücutlarına kolaylıkla ulaşabilmektedir. Oral yollarla alındığı takdirde gastrointestinal sistemde, bağırsakta taşınım ve emilim etkinliklerine çok sayıda model hayvanın dokularında birikebildiği görülmüştür. Bunun yanı sıra başlıca insan maruziyet yolları cilt teması ve solunum yolu ile akciğerler olduğunu görülmüştür (Lehner vd., 2019). Solunan nanoparçacıkların solunum yolu aracılığı ile kan dolaşımına geçtiğini ve insan solunum sistemini rahatsızlıklarına sebebiyet vermektedir. Kapalı bir ortamda, yetişkin bir insanın

her gün havadan 272 adede kadar havadaki plastik parçacığını soluyabildiği gösterilmiştir (Vianello, Jensen, Liu ve Vollertsen, 2019). Aynı zamanda 2,5 µm'den küçük olan partiküllerin akciğerlerde tutunabildiği ve solunum bariyerinden geçebileceğini gözlenmiştir (Enyoh, Verla, Verla, Ibe ve Amaobi, 2019). Solunum sistemindeki etkilerinin yanı sıra nanopartiküller, yüzey yüklerine ve boyutlarına bağlı olarak bağırsak bariyerini aşabilirler (Bouwmeester vd., 2009). Farklı yüzey bileşimleri ve farklı boyutlardaki polistiren partikülleri (50 nm–500 nm) kullanılarak çeşitli bağırsak modellerindeki etkileşimini test edilmiştir (He, Hu, Yin, Tang ve Yin, 2010). 50 nm boyutundaki polistiren partiküllerine oral yolla maruz kalındığında in vitro demir emilimini arttırdığı gözlenmiştir ve bu nedenle NP maruziyetinin bağırsak epitelinin bariyer özelliklerini değiştirdiğini düşünülmektedir (Mahler vd., 2012). NP'lerin hidrofobik bir yapıya sahip olmalarından dolayı NP'lerin deriye nüfuz etmesi zorlaşır ve NP'lerin doğrudan insan derisine yayıldığını gösteren bir çalışma bulunmamaktadır (Järvenpää, Perkkiö, Laitinen ve Lahtela-Kakkonen, 2022). Ancak cilt bakımı losyonlarındaki üre, gliserol ve alfa hidroksil asitler gibi bileşenler, NP'lerin deri üzerindeki difüzyonuna yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Jatana, Callahan, Pentland ve DeLouise, 2016).

NP'lerin ve MP'lerin çeşitli boyutları ve türleri ile yapılan araştırmalarda insan ve hayvanlar üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Sulara karışan NP'lerin balıklarda beyne kadar ulaşabildiği ancak parçacıkların sayısı ve bunların potansiyel etkisi hakkında yeterli düzeyde bilgi mevcut değildir (Prüst, Meijer ve Westerink, 2020). Sucul omurgasız türlerinden biri olan *Daphnia magna* ile yapılan bir çalışmada hem yetişkin hayvanlarda hem de açık kuluçka kesesindeki embriyolarda polistiren nanoplastiklerin alım yolunu ve hedef dokudaki etkileri incelenmiştir (Brun, Beenakker, Hunting, Ebert ve Vijver, 2017). Embriyonik gelişimin erken evrelerinde kuluçka kesesindeki embriyonik büyüme sırasında lipofilik hücreler içinde ve üzerinde NP'lerin biriktiği, fakat yetişkinlerin bağırsak epitelinin NP içermediği gözlenmiştir.

MP'ler ve NP'lerin dokulardaki etkilerinin yanı sıra hücresel düzeydeki etkileri de mevcuttur. NP'lerin glikoz metabolizmasında önemli bir bozulmaya, kortizol seviyelerinde değişikliğe neden olduğunu gösterilmiştir (Brun vd., 2017). Polistiren parçacıklarının yağ membranına kolayca nüfuz edebildiğini, hücrenin zar yapısında

değişikliğe neden olduğunu, zar yayılmasını önemli ölçüde azalttığını ve böylece hücre işlevini etkilediğini görülmüştür (Rossi, Barnoud ve Monticelli, 2014). Polistiren NP'lerin, insanlarda mide kanseri hücrelerinin canlılığını ve ayrıca IL-6, IL-8 gibi inflamatuvar genetik ifadeleri etkilediği de gösterilmiştir (Forte vd., 2016).

NP'ler ve MP'lerin potansiyel birikimi ve etkisi ile ilgili insan sağlığı riskleri hakkında literatürdeki bilgiler sınırlıdır. NP'ler ve MP'lerin çeşitli boyutlarda, şekillerde ve konsantrasyonlarda insan vücuduna ulaşması büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bu partiküller organizmaya hava yolu, besin zinciri ve deri nüfuzu ile kolay bir biçimde ulaşabilmektedir. Maruziyete bağlı olarak, NP'lerin büyük ölçüde biyolojik zarlardan geçebildiği ve bitki veya hayvan hücresi olması fark etmeksizin çoğu hücre aktivitesini etkilediği bilinmektedir (Koelmans vd., 2015). Bu nanoparçacıklar kan dolaşımına girdiğinde üreme ve sinir sistemlerine de zarar verebilir.

Mikro ve nanoplastiklerin sperm ve testis üzerindeki etkileri sınırlı sayıda çalışma ile araştırılmış olup, erkek fertilitesinde önemli bir problem olduğu ortaya konmuştur (D'Angelo ve Meccariello, 2021; O'Neill ve Lawler, 2021). Bu konudaki çalışmaların büyük bir çoğunluğu polistiren nano ve mikroplastikleri ile gerçekleştirilmiş olup sperm sayısında ve hareketliliğinde önemli miktarda azalmaya ve hatta morfolojik olarak bozulmalara neden olduğu bildirilmiştir (Amereh vd., 2020; Zhou vd., 2022 Huang vd., 2022). Ayrıca, polistiren yapılı plastiklerin yalnızca sperme değil testis dokusuna da zarar verdiği ortaya konmuş olup, oksidatif stres, testis-kan bariyerinin yıkılması, seminifer tüplerinde inflamasyon ve histopatolojik hasar meydana geldiği bildirilmiştir. Fakat PET mikro veya nanoplastiklerinin sperm veya testis üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışma literatürde mevcut olmadığından, PET-NP'lere maruziyetin meydana getireceği etkiler bilinmemektedir.

2.2 PET-Nanoplastikler

Poliyeten tereftalat (PET) 1941'de kullanılmaya başlanılan ve 2020'de dünya çapında 400 milyon tondan fazla üretilmiş sentetik yapıda bir polimerdir. (Skoczinski, Krause, Raschka, Dammer ve Carus, 2021). Plastik şişeler ve yiyecek ambalajlarının üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Wallace vd., 2020). PET geri dönüştürülebilir olmasına rağmen, ekosistemlerde yüksek oranda plastik atık olarak birikerek, ciddi bir

çevresel yüke neden olmaktadır (Wallace vd., 2020; Prata vd., 2019; Chen, Han, Ko, Liu ve Guo, 2018).

PET materyali yapısında monomerler, oligomerler, antimon gibi katalizörler, karbonil gruplu kimyasallar (formaldehit, asetaldehit, aseton vb.), ftalatlar, UV stabilizatörleri ve lumbrikantlar barındırmaktadır (Bach, Dauchy, Chagnon ve Etienne, 2012). Bu nedenle, PET kaynaklı toksisitenin önüne geçebilmek amacıyla gıda veya içecek teması olan PET ambalajlarla ilgili düzenlemeler getirilerek bazı kimyasalların kullanımı tamamen yasaklanmış, bazılarında ise gıda veya içeceğe sızan miktarı sınırlandırmak üzere spesifik migrasyon limitleri (SML) getirilmiştir (European Parliament, 2016). Örneğin, bir kilogram PET’te 210 ila 290 mg arasında antimon tespit edilirken (Keresztes vd., 2009), PET şişeden suya sızabilecek maksimum antimon miktarı 0.04 mg/kg olarak belirlenmiştir (European Parliament, 2004). Fakat alınan bu önlemler tamamen belirli kimyasallar için alınmış olup, PET ambalajlardan türeyerek gıda veya içeceğe bulaşan PET mikroplastikleri (M-PET) veya nanoplastikleri (PET-NP) ile ilgili herhangi bir düzenleme bulunmamaktadır. Depozitolu PET şişelerden alınan su numunelerinde litrede ortalama 118 adet MP bulunduğu (Schymanski, Goldbeck, Humpf ve Fürst, 2018), bu partiküllerin %84’ünün şişeden kaynaklı PET-MP olduğu (Schymanski vd., 2018), Avrupa’da bir bireyin ise PET şişe su tüketim ortalamasının yılda 118 litre olduğu göz önünde bulundurulduğunda, sadece PET şişe su tüketimiyle maruz kalınan M-PET veya PET-NP miktarı oldukça fazladır. PET nanopartiküllerin sindirim sistemiyle alınması hem polietilen tereftalat polimerinin hem de SML getirilen kimyasalların tümünü paket halinde organizmaya almak anlamına gelmektedir. SML getirilen kimyasalların sindirim kanalında bulunduğu sürece veya organizma boyunca farklı dokulara dağıldıklarında, değişen fiziksel, kimyasal ve biyolojik koşullar sebebiyle hangi dokulara ne kadar sızabileceği bilinmemektedir. Bununla beraber, PET materyali üretiminde bisfenol-A gibi iyi tanımlanmış endokrin bozucuların bulunmaması nedeniyle güvenli olarak görülür. Fakat PET ambalajlı içecek numunelerinde süreye ve sıcaklığa bağlı olarak artan, içecek çeşidine göre değişen miktarlarda endokrin bozucu kimyasallara rastlanmaktadır (Biscardi vd., 2003; Farhoodi, Emam-Djomeh ve Ehsani, 2008; Bošnjir ve., 2007; Shotyk ve Krachler, 2007). Her ne kadar bu kimyasalların in vivo toksikolojik etkileri bilinse de her bir kimyasalın PET-NP’lerden dokulara sızıp sızamayacağı, eğer sızıyorsa bu miktarlarının toksik olup olmadığı, ayrıca direkt kimyasal formunda değil de PET-NP

aracılığıyla dokulara taşınması (ve taşındığı doku içerisine salınması) durumunda meydana gelebilecek etkiler bilinmemektedir (Xu vd., 2021; Zhong vd., 2021; Hao, Cheng, Guo, Xia ve Ma, 2013; Feige vd., 2010; Yu, Wang, Wang, Wang ve Li, 2019; Mei vd., 2019). Çünkü çoğu kimyasalın nanopartiküller aracılığıyla hücrelere veya dokulara taşınması toksisitesini önemli derecede etkilemektedir (Naasz, Altenburger ve Kühnel, 2018).

PET materyali ile gerçekleştirilen in vivo toksisite çalışmaları ise oldukça sınırlı olup literatürde herhangi bir memeli modeli ile gerçekleştirilmiş toksisite çalışmasına veya erkek infertilitesi ile ilişkisinin ortaya konulduğu herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır (Teng vd., 2021; Liu, Kwak, Wang ve An, 2021; Hanachi, Kazemi, Zivary, Ghadami ve Karbalaei, 2021; Provenza, Piccardo, Terlizzi, ve Renzi, 2020; Piccardo vd., 2020; Ji vd., 2020).

2.3 İnfertilite

İnfertilite, 12 ay veya daha fazla düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrası gebelik elde edilememesi ile tanımlanan erkek veya dişi üreme organlarından kaynaklanan bir hastalıktır (World Health Organization, 2023). İnfertilite, dünya çapında yaklaşık 70 milyon insanı etkilemektedir ve dünya çapındaki çiftlerin %9'unun mücadele ettiği, sorunların %50'sine erkek faktörünün katkıda bulunduğunu bir sağlık sorunudur (Fainberg ve Kashanian, 2019). Birçok genetik faktör ve yaşam tarzı faktörünün erkek ile ilişkili olduğu düşünülür ancak vakaların yaklaşık %30'unun idiyopatik olarak nitelendirilir (Fainberg ve Kashanian, 2019). Yaşam süresi boyunca doğurganlık oranını azaltan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Yaşlanma sürecinde morfolojik ve fonksiyonel değişimler testisi etkiler ve sperm morfolojisi ve konsantrasyonundaki değişiklikler meydana gelir, böylece sperm motilitesi azalır ve semen kalitesi düşer (Almeida vd., 2017). Sperm hücrelerinde moleküler seviyelerde DNA hasarının yanı sıra kromatin yapısındaki değişiklikler meydana gelir ve bu nedenle hem spermatozoa hem de seminal plazmadaki epigenetik faktörlerin serbestleştirilmesi embriyonik gelişimi etkileyebilir (Jenkins, Aston, Meyer ve Carrell, 2015; Paoli vd., 2019).

Plastik ambalajların üretiminde kullanılan bisfenol A, ftalat gibi bir dizi zararlı kimyasallar içerisinde bulundukları gıda maddelerine karışmaktadır (Jambeck, Moss

ve Dubai, 2020; Rashtian, Chavkin ve Merhi, 2019). Bu kimyasallar, gıda ürünleri tüketilmesi ile vücuda alınarak hormonal sistemleri etkiler, çocuk yaştaki bireylerin beyin gelişimine zarar verebilir ve kanser riskini artırabilir (Coffee ve Diaz, 2022). Bu çevresel kirleticiler, endojen steroid hormonların aktivitesini taklit ederek ve farklı mekanizmalarla endokrin fonksiyonlarını etkileyerek, endokrin sistemin bozulmasında rol oynayabilmektedirler (Santoro vd., 2021; Domingo ve Nadal, 2019; Li, Li, Meng, Sun ve Wu, 2017). Ayrıca oluşturdukları oksidatif stres nedeniyle doku hasarına neden olurlar. Bunun sonucunda meydana gelen apoptoz, zayıf gamet kalitesi, gelişimsel anormallikler, nörotoksisite, metabolik bozukluklar veya epigenetik bozulmalar maruz kalma sonucu görülen toksik etkilerden bazılarıdır (Santoro vd, 2021; Domingo ve Nadal, 2019; Li vd., 2017).

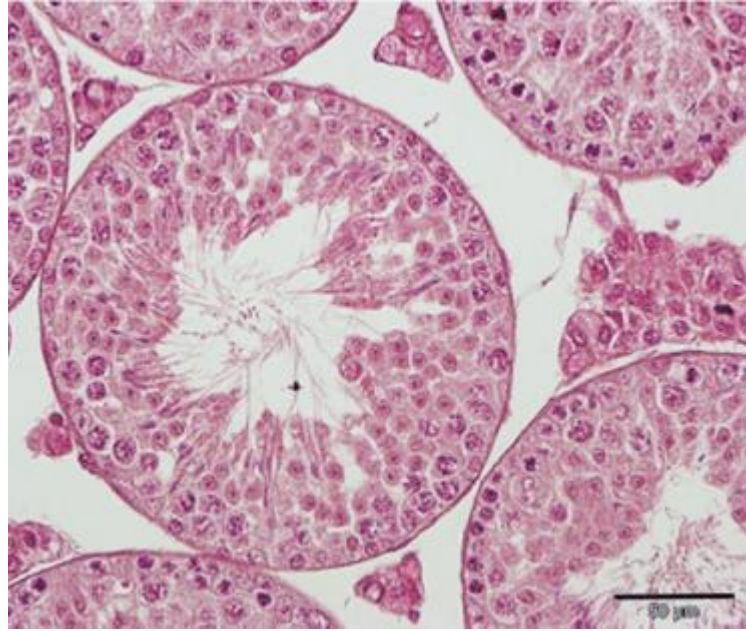
Uzun süreler boyunca infertilitenin kadınsal faktörlerden kaynaklandığı düşünülmüş ancak infertilitenin erkek faktörlerinden de kaynaklanabileceği anlaşılmıştır. Son yıllarda erkeklerdeki semen kalitesinin düşmesiyle beraber infertilite oranlarında artışlar gözlenmiştir (Andersson vd., 2008). Erkeklerde infertilitenin temelini azalan semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı ve sperm hareketliliği gibi parametreler ile ilişkilidir (Fainberg ve Kashanian, 2019). Spermatozoa, erkeğin zaman boyunca maruz kaldığı hem çevresel faktörlere hem de yaşam tarzına oldukça duyarlı bir epigenetik yapıya sahiptir. Bu nedenle erken embriyo gelişimini ve yavru sağlığını etkileyebildiği görülmüştür (Chianese vd., 2017). Çevresel kirleticilere maruz kalan erkeklerde sperm kalitesinin düştüğü ve bu nedenle çevresel kirleticilerin erkeklerde sperm kalitesini etkileyen önemli faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir (Vecoli, Montano ve Andreassi, 2016; Pizzol vd., 2021). Aynı zamanda, kadın hijyen ürünleri ve deterjanlar gibi temizlik malzemelerinin benzer kimyasallar içermesi nedeniyle kadınlarda görülen üreme bozukluklarının ve infertilite problemlerinin, bu malzemelere sıklıkla maruz kaldıklarından dolayı meydana gelebileceği düşünülmektedir (Rashtian, Chavkin ve Merhi, 2019).

Her geçen yüzyıl infertile oranında görülen artış göz önüne alındığında, plastik türevlerinin ve plastik üretiminde kullanılan kimyasalların infertile üzerine etkisi düşündürücüdür. Özellikle MP'lerin ve NP'lerin ekolojik çevrede artışı nedeniyle insanlarla etkileşimi daha da artmıştır. İnsanlar da dahil olmak üzere çoğu organizmaya

alınabilen bu nano boyuttaki parçacıklar üreme bozuklukları ve infertilite problemleri neden olabilir. PET-NP'lerin sperm veya testis üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışma literatürde mevcut olmadığından, PET nanoplastiklere maruziyetin meydana getireceği etkiler bilinmemektedir. Literatürdeki bu eksiklik yapılacak çalışmalar ile hem PET-NP'lerin etkisinin anlaşılmasında hem de infertilitedeki artışının önüne geçilmesine yardımcı olacaktır.

2.4 Testis Morfolojisi

Memelilerde, mayoz bölünme geçiren germ hücreleri sayesinde fonksiyonel gamet hücreleri oluşur ve olgun sperm hücrelerinin kök hücrelerden türetildiği bu sürece gametogenez adı verilir (Griswold, 2016). Erkeklerde mayoz, postnatal evreden sonra başlar ve her gün milyonlarca gamet hücresi oluşturulur. (Feng, Bowles ve Koopman, 2014). Memelilerin çoğunda sperm üretmek için gereken süre yaklaşık olarak 30-40 gün arasında sürmektedir ve bu süreç seminifer tübüllerde korunan bu bölgede gerçekleşir (Clermont, 1972).



Şekil 1. Sağlıklı bir farenin testis morfolojisi (Bernardino vd.,2019)

Testis en dıştan içe doğru tunika vajinalis, tunica albuginea ve tunica vasculosa'nın katmanlarından oluşur (Brook, 2007). İnsanlarda, testisinin peritübüler yapısı son derece

uzun, ince, düz kas benzeri bir yapıdadır (Mayerhofer, 2013). Testis gelişmekte olan germ hücreleri ile sertoli hücrelerinin yakın etkileşim içinde olduğu seminifer tübüllerden oluşan bir dokudur (Schulze ve Rehder, 1984). Spermatogenezin desteklenmesinde, özel bir morfolojik ve işlevsellikçe sahip somatik hücreler olan sertoli hücreleri rol oynar. Sertoli hücreleri aynı zamanda bir kan testis bariyeri oluşturarak seminifer epitelin bütünlüğünü sağlar ve biyokimyasal olarak destek olurlar (Naidu, Olojede, Lawal, Rennie ve Azu, 2021). Seminifer tübüllere yakın olan Leydig hücreleri testosteron üretir ve kan damarlarına salgılayarak dokuların hücreyel organizasyonu sağlar (Svechnikov vd., 2010). Kan-testis bariyeri oksidatif strese karşı koruyucu bir özelliğe sahiptir (Zhao, Nelson, Betsholtz ve Zlokovic, 2015; Mital, Hinton ve Dufour, 2011). Mayozun ardından epididime taşınan spermatid hücreleri, epididimde farklılaşarak spermatozoa olarak lümeneye salınır (O'Donnell ve O'Bryan, 2014).

2.5 Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogoniyal kök hücrelerin seminifer tübüllerin bazal membranı boyunca çoğalmasıyla ve oldukça özelleşmiş spermatozoaya farklılaşmasıyla sonuçlanan karmaşık bir moleküler olaylar dizisidir (Cannarella, Condorelli, Mongioi, La Vignera ve Calogero, 2020). Sperm üretimi bireyin ömrü boyunca devam eden bir süreçtir. Spermatogonial hücre proliferasyonu ve bunların olgun spermatozoaya farklılaşması, bir hücreyel olgunlaşma sürecidir ve bu süreçte meydana gelen değişiklikler infertiliteye neden olur (Larose vd., 2019).

Spermatogoniyal kök hücrelerin bölünerek spermatozoaya evrilmeleri 74 günlük bir süreç içerisinde seminifer tübüllerde meydana gelen mitoz bölünme, mayoz bölünme ve spermiyogenezi içeren üç farklı fazı içerir (Cannarella vd., 2020). Spermatogenezin başarılı bir biçimde sonuçlanması için sertoli hücreleri, germ hücreleri, epitelyal tübül hücreleri ve kan-testis-bariyerinin arasında düzenli etkileşimleri gerekir (Wu, Yan, Ge ve Cheng, 2020). İlk spermatogenez süreci ergenlikten hemen önce gerçekleşir ve oluşan ilk spermatositlerin önemli bir kısmı ise apoptoz geçirir (Miki vd., 2004; Yoshida vd., 2006; Mori vd., 1997). Spermatogenezin başlaması için hipotalamustan salgılanmaya başlayan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) sayesinde ön hipofizden folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinizan hormon (LH) salınımı ile testosteron salınımı indüklenir

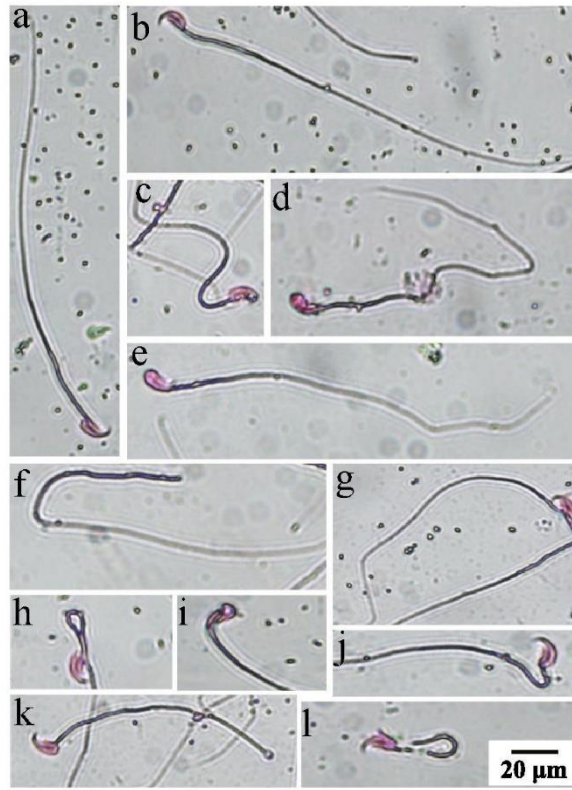
(Desai, Ludgin, Sharma ve Agarwal, 2013). Testesteronla birlikte spermatogonia kök hücreleri mitoz bölünmeler geçirmesi ile beraber tip A spermatogonyumlar ve tip B spermatogonyumlar meydana gelir (Cannarella, Condorelli, Duca, La Vignera ve Calogero, 2019). Tip A spermatogonyumlar mitoz bölünmeler ile sürekli olarak yenilenirler ve ardından Tip B spermatogonyumlara dönüşerek, bir germ hücresi olan primer spermatositlere farklılaşır. Oluşan primer spermatositler indirgenme bölünmesi olan mayoz bölünmenin profaz evresine girer. Bu evrede mayotik rekombinasyon yoluyla homolog kromozomlar eşleşir ve kromozomların geniş alanları çaprazlanarak değiştirilir (Marston ve Amon, 2004; Kota ve Feil, 2010). İlk mayoz bölünmenin ardından kromozom sayısı yarıya indirilmiş olan sekonder spermatositler meydana gelir ve mayoz bölünmenin tamamlanması ile beraber bu hücreler spermatidleri oluşturur (Eroschenko ve di Fiore, 2013). Spermatidler akrozom, sperm boynu oluşumu, kuyruk oluşumu ve hareketlilik kazanması için spermiyogenezis geçirerek farklılaşırlar. Oluşan hücreler haploid yapıdaki sperm (spermatozoa) hücreleridir.

Sperm hücrelerinin gelişimi; sperm hücreleri, sperm hücrelerinin somatik destek hücreleri ve endokrin sistem ile karşılıklı etkileşimleri nedeniyle karmaşık bir süreçtir. Sperm, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasara karşı oldukça duyarlı olması nedeniyle, antioksidan dengenin bozulmasına yol açan tüm çevresel faktörlerden etkilenir ve sperm fertilizasyon kapasitesi etkilenebilir (Duca, Calogero, Cannarella, Condorelli ve La Vignera, 2019; Calogero, Condorelli, Russo ve La Vignera, 2017). Sperm hücrelerinin uygun gelişimi, erkek doğurganlığı için şarttır. Bu sürecin anlaşılması erkek infertilitesinin potansiyel olarak teşhis edilmesi ve tedavisi için büyük bir önem arz eder.

2.6 Sperm Morfolojisi

Sperm morfolojisinin doğru bir biçimde değerlendirilememesi ve doğurganlıktaki etkisinin anlaşılabilmesi, infertilite tanısı konan çiftler için gereksiz tedavilere ve maliyetlere yol açmaktadır. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ile ilgili günümüze kadar detaylı analizler yapılmıştır (Menkveld, 2010). Sperm morfolojisi nesiller arasında incelendiğinde, yıllar içerisinde morfolojide önemli bir değişim olduğunu görülmüştür (Horte, Vierula, Toppari ve Suominen, 2001).

Spermatogenez, yoğun hücre bölünmesi ve morfolojik değişiklikler içeren bir süreçtir (Jung, Eberl ve Schill, 2001; Selit vd., 2013). İnsan spermatogenezinde tüm erkekler kusurlu spermatozoa üretirler ve bu bireylerin kusurlu hücre sayısı kritik bir düzeye ulaştığında infertilite riski başlar (McLachlan ve de Kretser, 2001). Erkek infertilitesinde, spermatozoanın işlevselliği ve yapısal bütünlüğü büyük bir rol oynamaktadır. Spermelerde görülen kopmuş baş, kopmuş kampaçı ya da sperm başı anormallikleri infertilitenin artmasındaki en önemli parametrelerden birkaçıdır (Ray vd., 2017; Chemes vd., 1987; Perotti, Giarola ve Gioria, 1981).



Şekil 2. Sperm morfolojisi bozukluklarına örnekler- polistiren nanopartiküllerin sub-kronik oral uygulaması sonrası sperm morfolojisine etkisi (a-b, normal morfolojiye sahip sperm; c-f, baş kısmında anomaliye sahip olan sperm; g-j, boyun bölgesi hasarlı sperm; k-l, kuyruk hasarı olan sperm) (Zhou vd., 2022).

Bir sperm hücresi baş, kuyruk ve boyun bölümlerinde çeşitli morfolojik anormalliklere sahip olabilir veya hücreler yoğun miktarda sitoplazmaya sahip olabilir (Netherton vd., 2020). Sperm morfolojisinde en yaygın morfolojik anormallik, sperm başının şekliyle

ilgili ilişkilidir. Sperm başı, spermin nükleusunda bulunan kromatini, DNA'sını ve sperm nükleer protaminlerini sıkı bir şekilde tutar. Aynı zamanda sperm başının ve sperm nükleozunun korunumu, sperm genomunun oksidasyon veya sıcaklık yükselmesi gibi dış streslerden korumasında önem arz eder (Kosower, Katayose ve Yanagimachi, 1992). Spermatogenezis aşamasında sperm baş morfolojisinin ve nükleus yapısının korunması sperm morfolojisinden kaynaklanabilecek infertiliteyi etkendir (Zini vd., 2009). Baş morfolojisindeki değişiklikler DNA'nın kalitesi ve paketlenmesi ile ilişkilendirilir (Auger, Jouannet ve Eustache, 2016). Spermatogenezis sırasında, spermatidten spermatozoaya geçişinde çekirdeğin boyutunda küçülme meydana gelir (Clermont, 1972; Champroux, Torres-Carreira, Gharagozloo, Drevet ve Kocer, 2016). DNA'nın bu şekilde sıkıştırılması çevresel faktörlerden kritik bir şekilde korunmasını sağlar ve hareketlilik için önem taşır (Netherton vd., 2020). Bu sıkıştırma sırasında kromatin sıkışmasının doğru şekilde gerçekleşmemesi infertilite ile ilişkilendirilebilmektedir (Netherton vd., 2020).

2.7 DNA İplik Kırıkları

Sperm DNA'sının bütünlüğü fertilizasyon süreci, implantasyon, oluşan embriyo kalitesi, embriyonun gelişimi ve sağlıklı bir gebelik süreci için oldukça önemlidir (Evgeni, Charalabopoulos ve Asimakopoulos, 2014; Simon vd., 2014). Fertilizasyonun sonrasında transkripsiyon başlar (Lee, Bonneau ve Giraldez, 2014) ve bu nedenle sperm DNA anormalliklerinin varlığı embriyo gelişimini büyük ölçüde etkiler. DNA hasarına bağlı olarak gelişecek olumsuzluklar implantasyonun başarısızlık ile sonuçlanmasına neden olabilir (Barroso vd.,2009). Nükleer DNA fragmantasyonları, DNA sarmalını etkileyerek tek veya çift sarmallı DNA kırıklarına neden olabilir (García-Rodríguez, Gosálvez, Agarwal, Roy ve Johnston, 2018).

Erkek gamet hücrelerindeki DNA hasarı, üreme yardımcı tedavilerin kötü sonuçlanmasına, infertilitenin düşük ile sonuçlanmasına ve yavrularda doğum kusurlarına neden olur (Esteves, Sharma, Gosálvez ve Agarwal, 2014; Aitken, De Iuliis ve McLachlan, 2009). ROS, sperm DNA fragmantasyonunun oluşmasındaki en büyük nedendir. Semen örneklerinde ROS miktarı, sperm DNA fragmantasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Farklı ajanlar potansiyel olarak sperm DNA hasarı oluşturabilir, bu etkinin

kaynağı ise antioksidan ve oksidan oranının dengesizliğinden kaynaklanan oksidatif strestin oluşmasıdır (Ribas-Maynou ve Benet, 2019). Gerçekleştirilen çalışmalarda, farklı yapıdaki mikro veya nanoplastiklerinin ROT oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Liu vd., 2022; He vd., 2022). Bu nedenle PET-NP maruziyetinin de ROT üretimine neden olarak sperm hücrelerinde DNA kırıklarına yol açabileceğini düşündürmektedir.

Tek sarmallı DNA kırıkları, genomun tamamında çoklu kırılmalar ile gözlenir fakat, çift sarmallı DNA kırıkları ise çoğunlukla lokalizedir ve çok az kırılma noktası olarak sperm nükleer matrisine bağlanır (Ribas-Maynou ve Benet, 2019). Sperm hücrelerinde görülen tek ve çift sarmallı DNA kırıkları daha yüksek düşük yapma riskine, düşük embriyo kalitesine ve implantasyon başarısızlığı riskinin artışıında, erkek infertilitesinde doğrudan etkisi bulunmaktadır.

3. YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan beş haftalık erkek Balb-C fareler Maltepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Hayvan bakımı ve PET-NP'lere maruziyet $25\pm 4^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, $50\pm 5\%$ bağıl nem, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyoda sahip ortam koşullarda, paslanmaz çelik kapaklı plastik kafeslerde (her kafeste 3'er hayvan olacak şekilde) gerçekleştirildi. Su ve yem ad libitum olarak sağlandı.

Beş haftalık 18 adet fare rastgele seçilerek kontrol grubu, düşük doz PET-NP ve yüksek doz PET-NP uygulama grupları olarak üç gruba ayrıldı ($n=6$). Uygulama gruplarına 28 gün boyunca, her gün oral gavaj yöntemiyle 100° er μL serum fizyolojikte hazırlanan 1 mg/mL ve 5 mg/mL PET-NP çözeltileri (düşük doz: 0.1 mg/gün; yüksek doz: 0.5 mg/gün), kontrol grubuna ise sadece serum fizyolojik verildi. PET-NP'lerin hem besinlerde hem de çevrede bulunan konsantrasyonları hakkında bilgi bulunmadığından çalışmada kullanılan PET-NP konsantrasyonları aynı yaş grubunun ve uygulama sürelerinin kullanıldığı fare modelinde PS-NP veya MP'ler ile gerçekleştirilen çalışmalar temel alınarak belirlenmiştir (Deng vd., 2017; Jeong vd., 2022; Nie vd., 2021). PET-NP'leri veya serum fizyolojisi farelere oral gavaj ile vermek için, gavaj iğnesi orofaringeal bölgeden geçtikten sonra iğnenin özofagusu girdiği düşünülerek gavaj yapıldı. Bu esnada farenin soluk alıp verdiğinin teyit edilmesi için göğüs hareketleri izlendi. Solunumun normal olduğu anlaşıldığında, gavaj iğnesinin solunum yoluna değil, sindirim kanalına girdiği anlaşıldığında ve gavaj işlemi tamamlandı.

28 günlük uygulama süresinin sonunda tüm fareler tartıldı ve 10 mg/kg ksilazin ve 90 mg/kg ketamin ile anestezi altına alındı. Kalpten tüm kan toplanarak kurban edilen hayvanların epididimleri, sağ ve sol testisleri disekte edildi.

Tablo 1. PET-NP Uygulama Protokolleri

Hafta/Gün	Kontrol Grubu						
	1	2	3	4	5	6	7
1	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl
2	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl
3	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl
4	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl
Hafta/Gün	Düşük Doz NP Grubu						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP
2	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP
3	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP
4	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP	0.1 mg/PET- NP
Hafta/Gün	Yüksek Doz NP Grubu						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP
2	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP
3	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP
4	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP	0.5 mg/PET- NP

3.1 Araştırma Modeli

Çalışmamız Maltepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinde (MÜDEHAM) prospektif çalışma olarak gerçekleştirildi. Deneklerin bakım ve tedavileri MÜDEHAM'da yapıldı. Çalışma sonrasında alınan doku örnekleri Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Bilimler laboratuvarında incelendi.

3.2 Evren ve Örneklem

Deney modelinde, her biri yaklaşık 25-40 gr ağırlığında, 12-14 haftalık, 18 adet Balb-C ırkı erkek fare kullanıldı. Fareler her gruptan rastgele 6 fare olacak şekilde 3 gruba ayrılarak; kontrol grubu düşük doz (0.1 mg/gün) PET-NP grubu ve yüksek doz (0.5 mg/gün) PET-NP grubu olacak şekilde isimlendirildi. 28 günlük deney sürecinde her gün tabloda belirtilen PET-NP'ler, oral gavaj uygulaması ile deneklere verildi.

3.3 Veriler ve Toplanması

Testis dokusundan alınan örneklerle rutin histolojik takip sonrası, hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelendi. Sperm baş ve kuyruk morfolojisindeki değişimler, Burruel ve arkadaşlarının ve Sekine ve arkadaşlarının fare için tanımladığı kategorilere göre belirlendi (Burruel, Yanagimachi ve Whitten, 1996; Sekine, Yokota ve Oshio, 2021). Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen COMET analizi, DNA'da oluşan hem tek ve hem de çift iplik kırıklarının tespit edilmesi için çalışmamızda kullanıldı (Lu, Liu ve Yang, 2017). Hücre analizler CometScore programı ile gerçekleştirildi. Testislerin histopatolojik incelemesi Johnsen skorlaması ile yapılarak tüm kesitler ışık mikroskopu altında incelenerek fotoğraflandı (Johnsen, 1970).

3.4 Verilerin Çözümlemesi ve Yorumlanması

3.4.1 PET nanoplastiklerinin karakterizasyonu

Deneylerde kullanılan PET nanoplastikleri, Rodríguez-Hernández ve arkadaşlarının yöntemi temel alınarak dilüsyon-presipitasyon yöntemi ile üretilmiştir (Rodríguez-Hernández ve ark., 2019). PET nanoplastiklerinin boyut, çoklu dağılım endeksi ve zeta potansiyeli ölçümleri Atomika Teknik Cihazlar firmasının test laboratuvarlarında Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile gerçekleştirilmiş olup Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan PET nanoplastiklerine ait hidrodinamik çap, çoklu dağılım endeksi ve zeta potansiyeli değerleri.

Hidrodinamik Çap	91.11 nm
Çoklu Dağılım Endeksi (PDI)	0.2803
Zeta Potansiyeli	-29.1 mV

3.4.2 Testis indeksinin hesaplanması

Deneklerin 28 günlük gavaj uygulamasının ardından her bir denek tartılarak ağırlıkları not edildi. Sakrifikasyonun ardından testis dokuları neşter yardımıyla yağ ve epididimden ayrıldı. Toplanan testis dokuları hassas terazide tartılarak not edildi. Toplanan veriler testis indeksinin hesaplanması için testis ağırlığı, vücut ağırlığına bölünerek tablo şeklinde veriler toplandı. Her bir grup için testis indeksi hesaplandı ve ortalamaları karşılaştırıldı.

3.4.3 Sperm sayımı ve morfolojik açıdan incelenmesi

Her bir fareden alınan epididimis, 1 mL global medyum içeren steril petri kabına alındı. Bu medyumda neşter yardımıyla epididimler küçük parçalara ayrıldı. Epididimisin parçalanması sonrası örnekler ependorflara alındı ve spermlerin yüzerek ayrılması için 20 dakika boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun ardından her örnekten 10’ar µL alınarak Makler lamı altında görüntülendi, mililitredeki total sperm sayısı hesaplandı.

Spermlerin morfolojik analizi için Diff-Quick boyaması, üreticinin önerdiği prosedüre göre gerçekleştirildi. Öncelikle global medyum içerisinde bulunan örnekten yaklaşık 50 µL'lik bir hacim lama yayılarak hava ile kurutuldu. Sonrasında lamlar sırasıyla kit içerisindeki solüsyon 1 ile 10 saniye, solüsyon 2 ile 8 saniye ve solüsyon 3 ile 8 saniye muamele edildikten sonra 1 dakika süre ile distile suda yıkandı ve hava ile kurutuldu. Kuruyan lamlardaki entellan ile kapatıldı. Ardından ışık mikroskobu altında morfolojik inceleme gerçekleştirildi. Sperm baş morfolojisindeki değişimler, Burruel ve arkadaşlarının fare için tanımladığı kategorilere göre belirlendi (Burruel, Yanagimachi ve Whitten, 1996; Trivedi, Kushwaha, Tripathi ve Jena, 2010). Bu sınıflandırmaya göre her fareye ait en az 500 sperm: normal (morfolojik açıdan değişim gözlenmeyen baş yapısı), yarı normal (akrozomun rostral kısmı ve/veya postakrozomal bölgenin posterolateral bölgesi eksik olan, deforme olmuş akrozomal kapakları olan ve anormal konturları olan kafalar) ve anormal (üçgen, parçalı, kalikülat, dev, çekiç şekilli veya ciddi deformasyona sahip akrozom kapaklarına sahip kafalar) olmak üzere üç kategoride sınıflandırıldı ve %'lik olarak normal, yarı normal ve anormal sperm oranları belirlendi. Kuyruk morfolojisindeki değişimler ise Sekine ve arkadaşlarının (Sekine, Yokota ve Oshio, 2021) sınıflandırması temel alınarak belirlendi ve her fareye ait en az 500 sperm hücresi normal ve anormal (saç tokası kıvrığı, sarmal kıvrık, kısa kuyruk ve çift kuyruk) kuyruk şeklinde gruplandırıldı.

3.4.4 Testis dokusundan histolojik kesitlerin hazırlanması ve spermatogenezisin jonhsen skorlaması ile değerlendirilmesi

Histopatolojik inceleme için dokular %10 nötral formalin içerisinde fikse edildi. Fikse edilen dokular, %70 alkolde 1 saat, %80 alkolde 1 saat, iki ayrı %96 alkolde 1'er saat ve yine iki ayrı %100 alkolde 1'er saat dehidrate edildi. Geçiş ortamı için ksilol kullanılacak, dokular iki ayrı ksilolde 1'er saat bekletildi. Ardından dokular 58°C etüvün içerisinde 50:50 parafin-ksilol karışımında 1 saat, sonrasında parafinde 1 saat bekletilecektir. Son olarak parafin değiştirilerek dokular gece boyu 58°C'de bekletildi ve ertesi gün bloklandı. Her bloktan mikrotom ile 5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak albumin mayer solüsyonu ile lamlara yapıştırıldı. Kesitlerden hematoksilen ve eosin boyaması gerçekleştirildi. Boyama aşamasına geçmeden önce lamlar 58°C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Ardından iki ayrı ksilolde 10'ar dakika bekletilerek deparafinize edildi ve

sırasıyla %100, %96, %80, %70 alkol ve distile suda 5'er dakika bekletilerek dehidrate edildi. Bu aşamadan sonra hematoksilen ve eozin boyaması yapılacak lamalar 2 dakika hematoksilende bekletilerek suyun rengi şeffaflaşınca kadar çeşme suyunda yıkandı ve distile sudan geçirildi. Ardından 2 dakika eozinde bekletilerek ikişer kez sırasıyla 5'er dakika %70, %80, %96 ve %100 alkole alındı. İki ayrı ksilolde 5'er dakika bekletilen lamaların üzerine entellan damlatılarak lamel kapatıldı. Numunenin Johnsen skorunu hesaplamak için tüm kesitler ışık mikroskobu altında incelenerek fotoğraflandı. Her bir denekten 100 adet tübül sayılarak Johnsen skorlaması aşağıdaki gibi yapılmıştır (Johnsen, 1970):

- 1) Tüm spermatogenezin varlığı görülenler tübüller 10 puan
- 2) Bol spermatozoa bulunan fakat spermatogenezde bozukluğu olan tübüller 9 puan
- 3) Çok az miktarda Spermatozoa bulunan tübüller 8 puan
- 4) Spermatozoanın az bulunduğu ve çok sayıda spermatid bulunan tübüller 7 puan
- 5) Çok az sayıda spermatid bulunan tübüller 6 puan
- 6) Spermatozoa ve spermatid bulunmayan, bol spermatosit bulunan tübüller 5 puan
- 7) Çok miktarda spermatosit bulunan tübüller 4 puan
- 8) Yalnız spermatogonyum bulunan tübüller 3 puan
- 9) Germ hücresi bulunmayan ve yalnızca sertoli hücresi bulunan tübüller 2 puan
- 10) Hücre bulunmayan tübüller 1 puan

Her bir deneğe ait 100 adet tübülün yukarıdaki kriterlere göre skorlanmasının ardından ortalamaları alınarak her hayvan için Johnsen skoru belirlendi. Sonrasında kontrol ve uygulama gruplarının ayrı ayrı ortalamaları alınarak veriler tablo haline getirildi.

3.4.5 DNA iplik kırıklarının alkali COMET analizi ile belirlenmesi

Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen COMET analizi, DNA'da oluşan hem tek ve hem de çift iplik kırıklarının tespit edilmesi için çalışmamızda kullanıldı (Lu, Liu ve

Yang, 2017). Dondurulmuş dokulardan gerçekleştirilen COMET analizi için, dokular analizden hemen önce dondurucudan çıkartılarak su banyosunda 37°C'de 2-3 dakika boyunca çözünmesi sağlandı ve dondurma sıvısı atıldı. Sperm örnekleri tekil hücreler içerdiği için bir ayrıştırma yöntemi uygulanmadı, G-MOB solüsyonunda süspansiyon halinde bulunan hücrelerden direkt 15 µL alınarak agaroz ile karıştırıldı. Sperm örnekleri ise farklı içerikli solüsyonlarda iki aşamalı lizis işlemine tabi tutuldu. Lamların birinci lizis solüsyonunda (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 ve 40mM dithiothreitol, pH=10.0) 24 saatlik inkübasyonu takiben, bu solüsyona 0.1 mg/ml Proteinaz K ilavesi ile 37°C'de 1.5 saatlik ikinci bir inkübasyon uygulandı. Lizis aşamasının ardından DNA sarmalının çözülmesi için lamlar taze hazırlanarak soğuk alkali elektroforez solüsyonunda (1 mM EDTA ve 300 mM NaOH, pH> 13) 10 dakika inkübe edildi. Sonrasında lamlar COMET elektroforez tankına (Clever Scientific) yerleştirilerek 24 V (0.7 V/cm) ve 330 mA akımda 10 dakika süre ile 4°C sıcaklıkta elektroforez gerçekleştirildi. Elektroforezin sonunda lamlar 5'er dakika süre ile 3'er kez nötralizasyon solüsyonuna (0.4 mM Tris, pH= 7.4) alınacaktır ve böylece elektroforez solüsyonundan kalan alkali nötrlendi. Ardından lamlar 20 µg/mL Etidyum Bromür (EtBr) ile boyanarak floresan mikroskop altında görüntülendi. Her örnekten en az 100 nükleus (her lamdan en az 50'şer adet) fotoğraflandı. Bu fotoğraflar üzerinden CometScore programı (CometScore, TriTek) aracılığıyla, kuyruk uzunluğu (µm), kuyruk momenti (µm) ve % kuyruk yoğunluğu (% kuyruk DNA) hesaplandı.

3.4.6 İstatistiksel Analiz

Testis indeksleri, sperm sayıları ve sperm morfolojilerinin yüzdelik dağılımları, Johnsen skorları ve alkali COMET analizi sonucu DNA iplik kırıklarını ifade eden % kuyruk DNA değerleri her denek için ayrı ayrı hesaplandı (n=5-6). Kontrol grubu, 0.1 mg/gün PET-NP grubu ve 0.5 mg/gün PET-NP gruplarının ortalamaları alındı ve standart sapmaları ile beraber bulgular kısmında verildi. İkilili gruplar arası farklılıklar student t-test ile analiz edildi ve P değerinin 0.05'den küçük olması durumu (p<0.05) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular

4.1.1 Testis ağırlıklarının değerlendirilmesi

Yirmi sekiz günlük uygulamanın ardından, fareler diseksiyondan hemen önce, testisler ise diseksiyondan hemen sonra tartıldı ve ağırlıkları testis indeksleri ile beraber Tablo 3’de verildi. Ortalama vücut ağırlıkları kontrol grubu için 23,16 g, 0.1 mg/gün PET-NP grubu için 24,8 g ve 0.5 mg/gün PET-NP grubu için 23,6 g olarak belirlendi.

Tablo 3. 28 günlük deney sonunda deneklerin ortalama vücut ağırlıkları, ortalama testis ağırlıkları ve ortalama testis indeksleri ve standart sapmaları (n=6).

	Ortalama Vücut Ağırlıkları	Ortalama Testis Ağırlıkları	Ortalama Testis İndeksi
Kontrol	23,16±3,17	0,16±0,04	0,70875827±0,15
0.1 mg/gün PET-NP	24,8±2,37	0,175833333±0,02	0,70975025±0,07
0.5 mg/gün PET-NP	23,56666667±1,29	0,165833333±0,01	0,70267661±0,05

Hem düşük hem de yüksek dozda 28 günlük PET-NP maruziyetinin hayvanların vücut ağırlığında anlamlı bir değişime neden olmadığı görüldü ($p>0.05$). Kontrol grubu için testis indeksi 0,70875827 olarak belirlendi 0.1 mg/gün PET-NP uygulanan grup için ise ortalama testis indeksi 0,70975025 olarak belirlendi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlam bulunamadı ($P = 0.1650$). 0.5 mg/gün PET-NP uygulama grubunun ortalama testis indeksi 0,70267661’dir ve bu değer de kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı değildir ($P = 0.09998$). Benzer bir şekilde 0.1 mg/gün

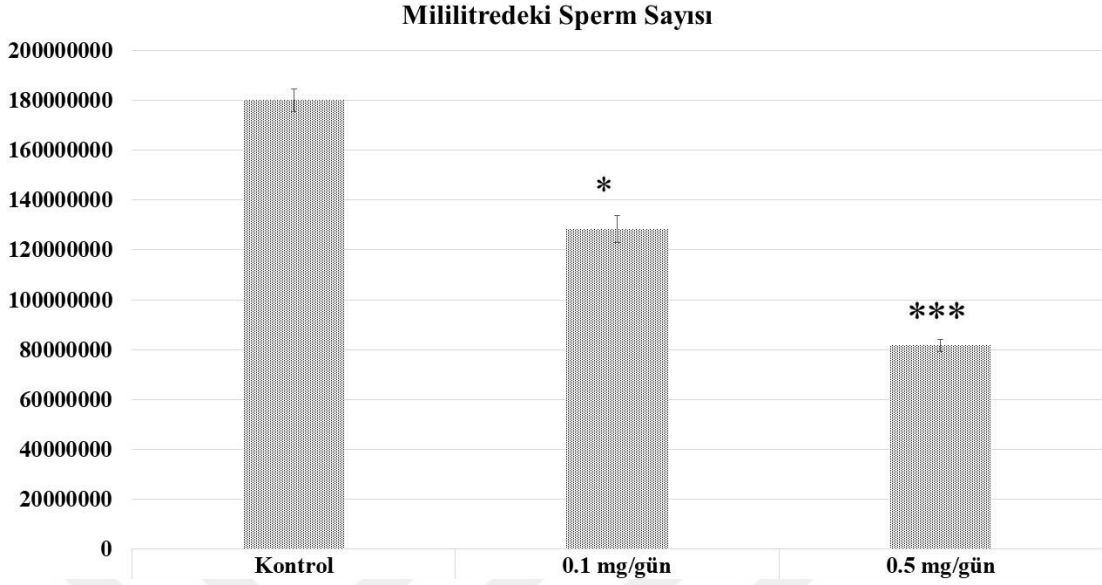
ve 0.5 mg/gün PET-NP'lere maruz kalan hayvanların da testis indeksleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmedi ($P = 0.1165$).

3.4.2 Sperm sayısının denekler arasında değerlendirilmesi

Sperm sayımı taze örnekten yapılabilmesi için deneklerin sakrifikasyonunun hemen ardından epididimleri alındı. Alınan epididimler boş bir petri kabında neşter yardımı ile parçalandı. Toplanan epididimlerden çıkan semen pipet yardımı ile ependorflara alındı ve 37°C'de 10-15 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonra PBS ile seyreltilerek Makler lamında sayım yapıldı. Mililitredeki ortalama sperm sayıları Tablo 4'de verildi.

Tablo 4. Deneklerin mililitredeki sperm sayısı değerlerinin ortalaması ve standart sapmaları (n=6).

X	Kontrol Grubu	0.1 mg/gün PET-NP Grubu	0.5 mg/gün PET-NP Grubu
Mililitredeki Ortalama Sperm Sayısı \pm sd	18.000.000 \pm 26832816	12.833.333 \pm 52236641,04	8.166.666,7 \pm 14719601



Şekil 3. 28 gün süre ile 0.1 mg/gün, 0.5 mg/gün PET-NP'lere maruz kalan ve kontrol grubuna ait farelerin mililitredeki ortalama sperm sayıları ve standart sapmaları (n=6; $p<0.05^*$, $p<0.001^{***}$).

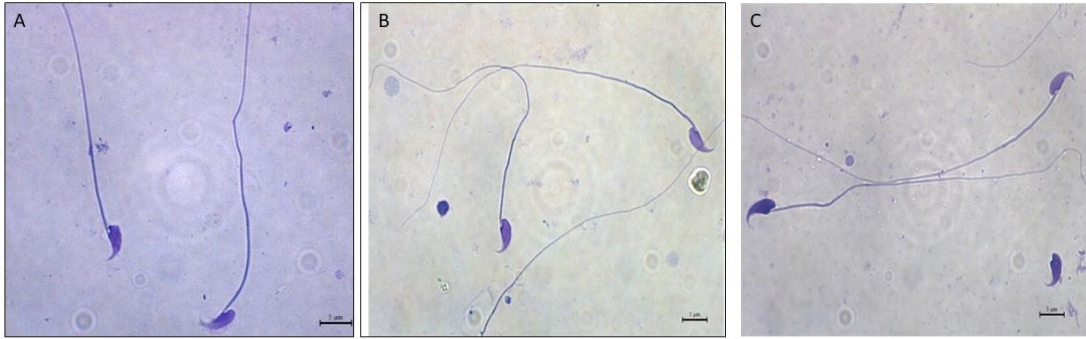
Denekler arası sperm sayılarının ortalaması alındığında kontrol grubuna kıyasla yarı yarıya bir azalma görüldü. Kontrol grubu ve 0.1 mg/gün PET-NP grubu arasında ortalama sperm sayılarında anlamlı düzeyde ($P<0.05$, $P=0.0102225878$) bir azalma olduğu görüldü. Kontrol grubu ve 0.5 mg/gün PET-NP grubu bakıldığında ise çok anlamlı ($P<0.001$, $P=0,00001358550492$) bir azalmanın olduğu görüldü. 0.1 mg/gün PET-NP ve 0.5 mg/gün PET-NP grubunda ise anlamlı bir sonuç ($P>0.05$, $P = 0,330396506$) görülmedi. Sperm sayılarındaki bu azalma, akut uygulamada yüksek ve düşük dozda PET-NP maruziyetinin infertilitede etkili olabileceğini düşündürmektedir.

3.4.3 Sperm morfolojisi

Diff-Quick boyaması ile spermelerin morfolojik analizi için her bir denekten en az 500 adet sperm hücresi görüntülenerek morfolojik açıdan değerlendirildi ve morfolojik değişimler Tablo 5'de belirtildi. Bununla beraber, her bir deneğe ait sperm örneklerinden temsili fotoğraflar alındı ve Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6'da verildi. Kontrol grubunun sperm morfolojisi genel olarak normal yapıya sahiptir (Şekil 4). Kontrol grubu farelerinin

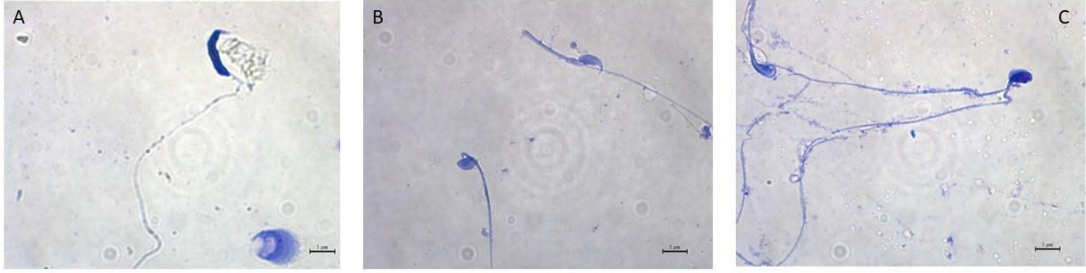
spermleri genel olarak kancalı bir sperm başı, bütünlüğü korunmuş bir sperm boynu ve hareketlilik için uzun bir kuyruğa sahiptir.

Tablo 3'de de belirtildiği gibi, kontrol grubu deneklerinin normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi oldukça yüksek olup bu değer %80,57 olarak belirlendi. Bununla beraber, morfolojik inceleme sırasında oran olarak oldukça az da olsa sadece sperm başları gözlemlendi (%6,12) ve sperm kuyruklarında kırıklarına rastlandı (%7,21). Morfolojik açıdan anormal spermlerin toplam oranının ise oldukça düşük düzeylerde olduğu görülmektedir (%19,42).



Şekil 4. Kontrol grubu deneklerinin sperm morfolojisi. Sperm hücreleri morfolojik açıdan uygun bir yapıdadır. A. Kontrol grubunun 4 numaralı denegin sperm morfolojisi. B. Kontrol grubunun 5 numaralı denegin sperm morfolojisi (Diff-Quick, x400).

0.1 mg/gün PET-NP uygulanan deneklerin sperm morfolojileri incelemeleri de Tablo 5'de verildi. Morfolojik olarak normal sperm ortalamaları (%70,61) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yaklaşık %10 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($P < 0.05$, $P = 0,0360167$). Spermlerin baş morfolojisindeki anomalileri oranında (%7,16) ise kontrol grubundakine (%4,61) kıyasla anlamlı bir artış olduğu görüldü ($P < 0.05$, $P = 0,02990036$). Aynı zamanda, boyun anomalileri oranlarında (%0,60) kontrol grubuna oranla anlamlı bir artış görüldü ($P < 0.01$, $P = 0,00382999$). Diğer parametreler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı değişim gözlenmedi. 0.1 mg/gün PET-NP grubunda gözlenen bazı sperm anomalileri Şekil 5'de örnek olarak verildi.



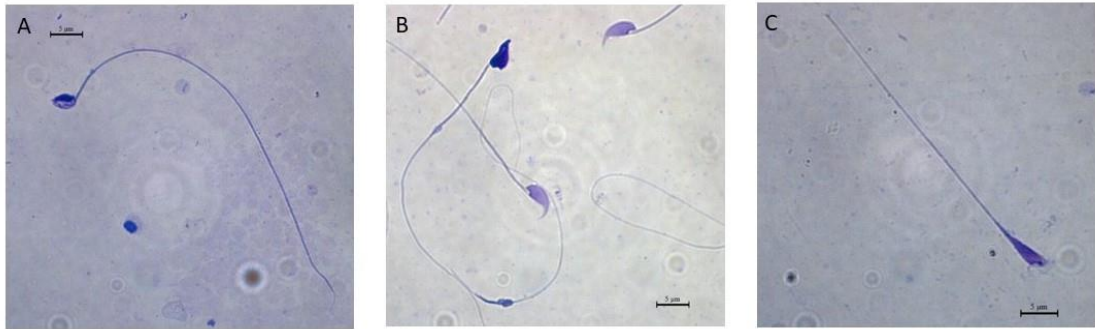
Şekil 5. 0.1 mg/gün PET-NP uygulanan denek grubunun sperm morfolojisi. A. Sperm baş morfolojisinde ve akrozomal yapıdaki bozulmalar. B. Sperm boyun bölgesindeki hasarlanma ve yine bir başka sperm başındaki anormal yapı (Diff-Quick, x400).

0.5 mg/gün PET-NP grubunun sperm morfolojilerindeki değişimler Tablo 5.'de verilmiştir. Bu gruba ait normal sperm morfolojisinin oranı %68,06 olup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (%80,57) %12,50 oranında azalması ile anlamlı bir değişim görülmektedir ($P < 0.01$, $P = 0.0013605$). Morfolojik incelemede görülen kuyruğunu ve boyun kısımları bulunmayan, sadece baş kısımları bulunan sperm oranlarında (%10,47) kontrole kıyasla (%4,35) anlamlı bir artış olduğu görüldü ($P < 0.05$, $P = 0.0313789$). Bununla beraber, 0.5 mg/gün PET-NP grubunun boyun anomalileri oranlarında da (%0,2) kontrol grubuna oranla anlamlı bir artış görülmüştür ($P < 0.01$, $P = 0.0011717$). Aynı zamanda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, küt başlı sperm (%4) oranları incelendiğinde anlamlı bir değişim görüldü ($P < 0.001$, $P = 0.000249$). Diğer parametrelerde ise anlamlı bir değişim görülmedi ($P > 0.05$). Sperm morfolojilerinde görülen değişimler Şekil 6'de örnek olarak verildi.

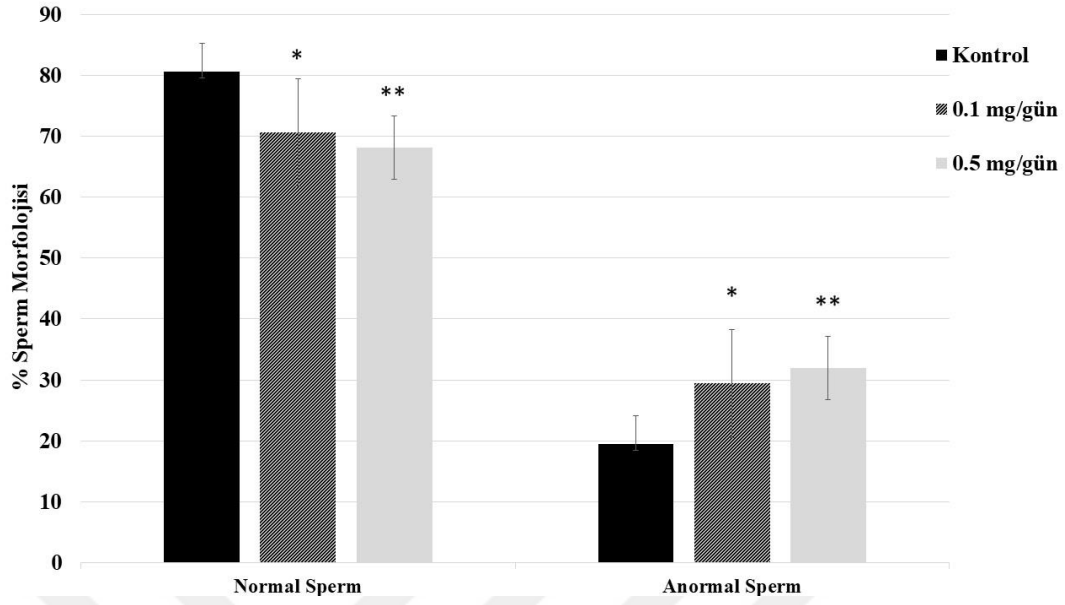
0.1 mg/gün PET-NP düşük doz alan grubu denekleri ve 0.5 mg/gün PET-NP grubu yüksek doz alan denekler arasındaki tüm parametreler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmedi ($P > 0.05$).

Tablo 5. 28 gün süre ile 0.1 mg/gün ve 0.5 mg/gün PET-NP'lere maruz kalan ve kontrol grubuna ait farelerin spermilerin morfolojik yapılarının oranları ve standart sapmaları (n=6).

%	Kontrol	0.1 mg/gün PET-NP	0.5 mg/gün PET-NP
Normal Sperm	80,57279± 4,66	70,61656±8,81	68,06667±5,19
Sadece Sperm Başı Bulunanlar	6,121088±2,28	8,070055±4,98	10,46667±3,58
Sperm Kuyruğu Kırığı	7,215646±2,57	9,769255±2,93	8,366667±2,37
Çift Başlı veya Çift Kuyruklu	0,066667±0,16	9,769255±0,19	0,2±0,25
Boyun Hasarı/Anomalisi	0,603401±0,52	2,574037±1,17	3,766667±1,64
Küt Başlı Sperm	4,617007±0,88	7,16983±2,30	8,6±1,52
Kuyuksuz/ Boyun-Baş Kısmından Oluşan Sperm	0,803401±0,81	1,633333±1,94	0,533333±0,56



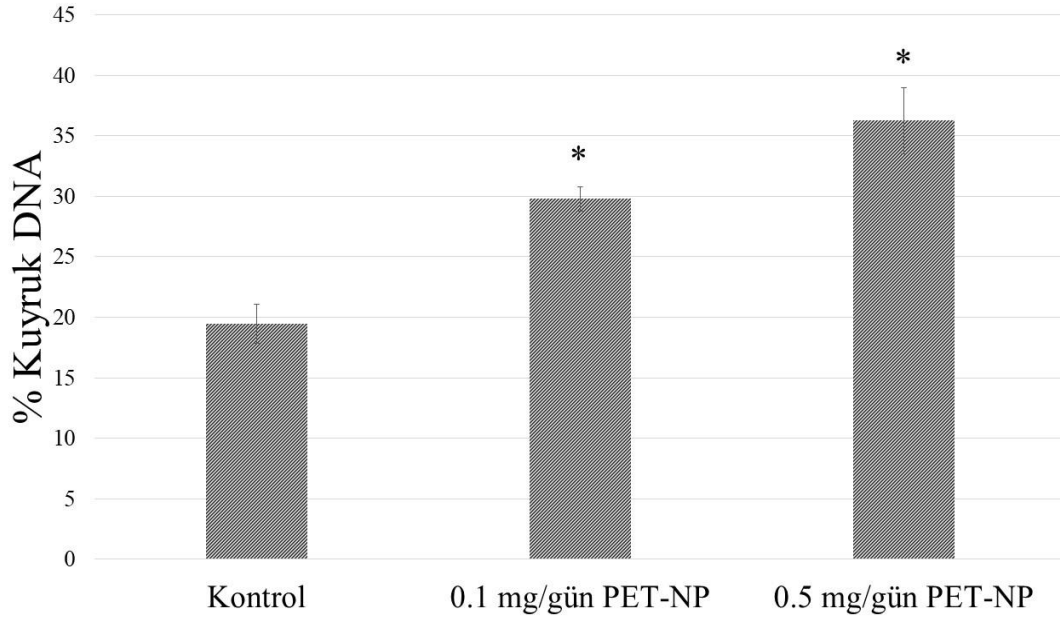
Şekil 6. 0.5 mg/gün PET-NP'e maruz bırakılan deneklerin sperm morfolojisi. A. Sperm başında görülen anormallikler. B. Boyun hasarı ve sperm baş morfolojisinde görülen anormallikler. C. Baş morfolojisinde değişim (Diff-Quick, x400).



Şekil 7. 28 gün boyunca 0.1 mg/gün ve 0.5 mg/gün PET-NP'lere maruz kalan ve kontrol grubuna ait farelerin ortalama normal ve anormal sperm yüzdeleri ile standart sapmaları (n=6; * p<0.05; ** p<0.01).

3.4.4 Sperm hücrelerinin COMET analizi ile DNA kırıklarının incelenmesi

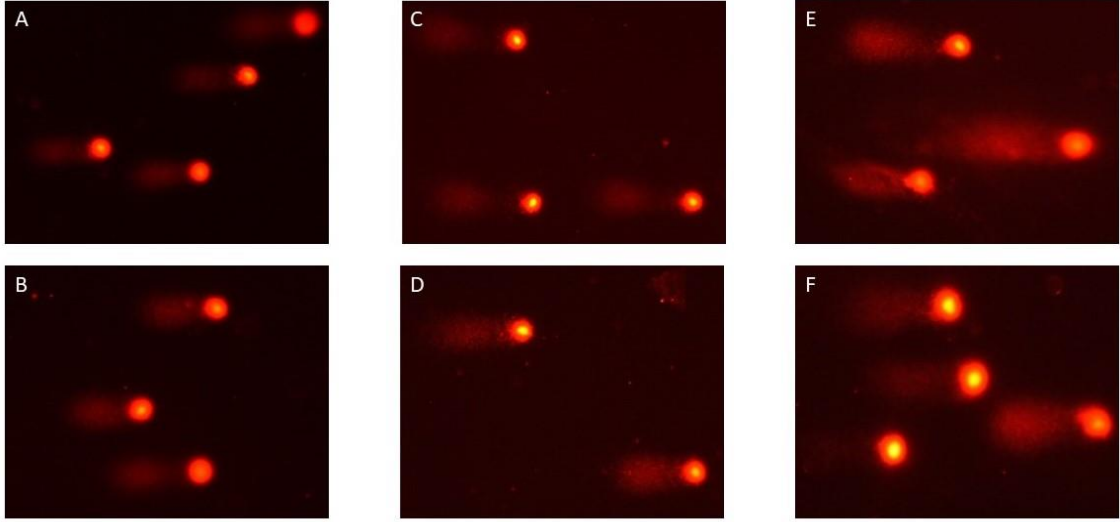
Sperm hücrelerinde görülen tek ve çift sarmallı DNA kırıkları daha yüksek düşük yapma riskine, düşük embriyo kalitesine ve implantasyon başarısızlığı riskinin artışı, erkek infertilitesinde doğrudan etkisi bulunur. Bu nedenle sperm hücrelerinde PET-NP maruziyetinden kaynaklı DNA hasarının olup olmadığını belirlemek oldukça önemlidir. Çalışmamızda tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen COMET analizi aracılığıyla, DNA'da oluşan hem tek ve hem de çift iplik kırıklarının tespiti gerçekleştirildi. Her bir denekten toplanan sperm hücrelerinin DNA kırıklarının tespiti için preparatlar hazırlandı, elektroforez gerçekleştirildi ve floresan mikroskop altında görüntüldü. Her örnekten en az 100 nükleus (her lamdan en az 50'şer adet) fotoğraflandı. Bu fotoğraflar üzerinden CometScore programı (CometScore, TriTek) aracılığıyla, % kuyruk DNA hesaplandı ve ortalamaları standart hata ile beraber grafiklendi (Şekil 8).



Şekil 8. 28 gün boyunca 0.1 mg/gün ve 0.5 mg/gün PET-NP'lere maruz kalan ve kontrol farelerinin COMET analizi ile hesaplanan ortalama % kuyruk DNA oranları ile standart sapmaları (n=5; * p<0.05).

Kontrol grubuna ait sperm hücrelerinde meydana gelen DNA kırıkları Şekil 9'da gösterildi ve %kuyruk DNA miktarları %19,48 olarak hesaplandı. Kontrol grubunda meydana gelen bu DNA kırıkları hem COMET uygulamasında DNA sarmalının çözülmesi aşamasından hem de örneklerin dondurulup çözülmesinden kaynaklanmakta olup normal olarak yorumlanmaktadır. 0.1 mg/gün PET-NP grubunda ise % kuyruk DNA oranı %29,79 olarak hesaplandı ve DNA kırıklarının görüntüsü Şekil 9'de verildi. 0.1 mg/gün grubunun %kuyruk DNA miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($P < 0.05$, $P = 0.04260$). 0.5 mg/gün PET-NP grubunun ise COMET analizi görüntüleri Şekil 8'de verilmiş olup % kuyruk DNA miktarları %36,24 olarak hesaplandı. Kontrol grubu ve 0.5 mg/gün PET-NP grubuna ait bu oranlar karşılaştırıldığında, sperm DNA kırıklarında anlamlı bir artış görüldü ($P < 0.05$, $P = 0.04556$). Düşük doz PET-NP ve yüksek doz PET-NP alan iki grup karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark görülmedi ($P > 0.05$, $P = 0.34930$).

Analiz sonucunda testisteki ROS artışı ile paralel şekilde sperm DNA iplik kırıklarında da bir artış görülmüştür.



Şekil 9. COMET analizi gerçekleştirilen sperm hücrelerinin DNA kırıklarının görüntüsü. Şekil A. ve şekil B. Kontrol grubuna ait spermelerdir. Şekil C. ve şekil D. 0.1 mg/gün grubuna ait spermelerdir. Şekil E. ve şekil F. ise 0.5 mg/gün grubuna ait spermeler görülmektedir (EtBr, x400).

3.4.5 Spermatogenezin Johnsen skorlaması ile incelenmesi

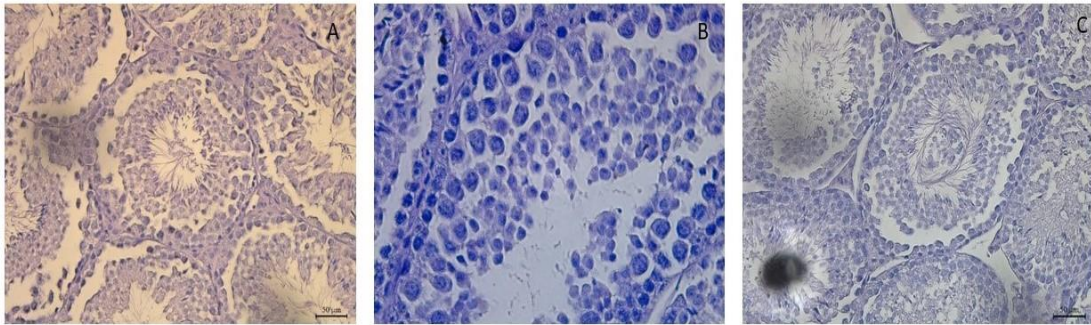
Deneklerin testis numunelerinden Johnsen skorunu hesaplamak için her bir denek için 5'er preparat hazırlandı. Her bir denekten 100 adet tübül sayılarak skorlaması yapıldı ve ortalama değerleri standart hata değerleri ile beraber Tablo 6'da verildi.

Kontrol grubuna ait hayvanların Johnsen skoru 9,616 olarak belirlendi ve histolojik kesiti Şekil 9'da gösterildi. 0.1 mg/gün PET-NP gruplarının skoru ise 9,51 olarak belirlendi ve bu değer kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı belirlendi ($P > 0.05$, $P = 0.18506534$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark olmamasına rağmen, 0.1 mg/gün PET-NP grubunda sıklıkla gözlenen değişimler spermatogenezin son aşamalarında oluşan spermatozoa sayısında azalmalar belirlendi. 0.1 mg/gün PET-NP'lere maruz kalar farelerin testislerinin histolojik yapısı da Şekil 10'da gösterildi. 0.5 mg/gün PET-NP grubunda, Johnsen skoru 9,008 olarak belirlendi ve kontrol

grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($P<0.001$, $P=0,00069352$). Bununla beraber, 0.5 mg/gün konsantrasyonunda PET-NP'e maruz kalan deneklerde spermatogenez döngüsünün bozulduğu ve tübüllerdeki gözlenmesi beklenen germ hücre aşamalarına rastlanmadığı gözlemlendi (Şekil 10). Aynı zamanda 0.1 mg/gün PET-NP ve 0.5 mg/gün PET-NP grupları arasında da anlamlı bir değişim görüldü ($P<0.01$, $P = 0.00114046$).

Tablo 6. Kontrol ve uygulama gruplarının Johnsen skorlarının ortalamaları ve standart hataları

	Kontrol Grubu	0.1 mg/gün PET-NP	0.5 mg/gün PET-NP
Johnsen skoru (ortalama \pm standart hata)	9,616 \pm 0.12	9,50666667 \pm 0,13	9,008 \pm 0.22



Şekil 10. Johnsen skorlaması ile spermatogenezin incelendiği farelere ait testislerin tübül yapıları. Şekil A. kontrol gruba ait bir tübül yapısı. Şekil B. 0.1 mg/gün grubuna ait tübül yapısı. Şekil C. 0.5 mg/gün grubuna ait tübül yapısı (H&E, x400).

4.2 Tartışma

Çevresel kirleticilere maruziyet, erkeklerde sperm kalitesinin düşürmektedir ve bu yüzden çevresel kirleticiler erkek üreme sağlığının etkilenmesinde önemli faktörlerden biridir (Vecoli, Montano ve Andreassi, 2016; Pizzol vd., 2021). Bu çevresel kirleticilerden biri olan PET yapıları plastikler, ekosistemlerde yüksek oranda plastik atık

olarak birikerek, büyük oranda çevresel bir yüke neden olur (Wallace vd., 2020; Prata, Costa, Joao, da Costa Duarte ve Rocha-Santos, 2018; Chen, Han, Ko, Liu ve Guo, 2018). Plastiklerin içeriğinde yer alan çeşitli kimyasalların ve farklı plastik çeşitlerinin üreme sağlığı açısından negatif yönlü bir etkisinin olduğu bildirilmiştir (Hlisníková ve ark., 2020). Aynı zamanda plastik ve türevleri sperm ve testis histolojisindeki etkileri çeşitli araştırmalar ile bildirilmiştir, hatta NP ve MP'lerin kan-testis bariyerini aşarak testis dokusunda birikebildiği ortaya konmuştur (Sun vd., 2023; Jin vd., 2021).

Mikro ve nanoplastikler ile yapılan çalışmalarda bu kirleticilerin erkek fertilitesinde önemli bir problem olduğu ortaya konarak spermler ve testis üzerindeki etkisini göstermiştir (D'Angelo ve Meccariello, 2021; O'Neill ve Lawler, 2021). Literatürde plastik türevlerinin erkek infertilitesi ile ilişkilendirildiği çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır ve daha fazla araştırma gerektirmektedir.

Çalışmamızda 5 haftalık Balb-C fareleri 28 gün boyunca PET-NP'lere maruz bırakılarak PET-NP'lerinin erkek üreme sağlığı üzerindeki etkileri incelendi. Testis organ indeksleri karşılaştırıldığında hem düşük hem de yüksek doz PET-NP'e maruz kalan gruplarının, kontrol grubununkine kıyasla anlamlı bir değişimin göstermediği belirlendi (Tablo 1). Testis ağırlıklarında ve testis yapısı gözle görülebilir bir oranda hasar tespit edilememiştir. Foster ve arkadaşlarının plastik üretiminde yaygın olarak kullanılan ftalatlar esterleri ile gerçekleştirdiği çalışmada hamilelik süresi boyunca ftalat esterleri maruziyetinin erkek farelerde testis ağırlıklarını azalttığı görüldü (Foster vd., 2001). Huang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada emzirme dönemindeki farelerin polistiren nanopartiküllere maruz kalması sonucunda testis ağırlıklarında bir azalma olduğu görüldü (Huang vd., 2022). Çalışmamız ile literatür karşılaştırıldığında testis ağırlıklarındaki anlamlı bir fark görülmemesi, gelişim döneminde plastik ürünlerine maruziyetin testis ağırlığını düşürdüğü fakat yetişkinlik dönemindeki maruziyetin testis ağırlığına doğrudan bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda taze sperm örnekleri kullanılarak gruplar arasında karşılaştırılmalı sperm sayımı yapıldı. Sonuçlar, uygulanan PET-NP konsantrasyonunun artışına bağlı olarak sperm sayılarının anlamlı bir şekilde azaldığını göstermektedir ($P < 0.05$). Sperm sayılarındaki anlamlı azalma, fertilizasyonu doğrudan etkileyecek bir durumdur. Sonuçlarımıza benzer bir şekilde, polistren nano ve mikro plastikleri ile gerçekleştirilen

önceki çalışmalarda da bu parçacıklara maruziyetin sperm sayısında ve hareketliliğinde önemli miktarda azalma ve hatta sperm morfolojilerinde bozulmalara neden olduğu bildirilmiştir (Amereh vd., 2020; Zhou vd., 2022 Huang vd., 2022). Li ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada insan testisleri incelendiğinde, plastik türevleri ve ftalatların seminifer tübüllerde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Li vd., 2017). Zhao ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği benzer bir çalışmada oral yolla 4 hafta boyunca ftalat maruziyetinin, fare testis dokularında kan-testis bariyer fonksiyon bozukluğunu tetiklediğini bildirmişlerdir (Zhao vd., 2023). Sonuçlarımız, farklı mikro veya nanoplastik türleri ile gerçekleştirilen çalışmalarla tutarlı olup, bu çalışma ile PET nanoplastiklerinin doza bağlı olarak sperm sayısını azalttığı ilk kez ortaya konmaktadır.

Sperm morfolojileri incelendiğinde ise PET-NP'e maruz bırakılan deneklerin özellikle sperm baş morfolojisinde ve kuyruk yapısında hasarlanmaların arttığı görüldü. Morfolojik olarak normal sperm oranlarının hem düşük hem de yüksek doz PET-NP'e maruz kalan gruplarda anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$). Anormaller arasında ise küt başlı spermelerin, diğer baş morfolojisindeki anormalliklerin, sperm boynundaki hasarlar ve diğer boyun anomalilerin oranlarında anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($P < 0.05$). Bunlara ilaveten, yüksek doz PET-NP'lere maruz kalan grupta kuyruk ve boyun kısımları olmayan sperm başlarının sayısında anlamlı bir artışın olduğu da görüldü ($P < 0.05$). Jin ve arkadaşları fareler ile gerçekleştirdiği çalışmada içme suyuna karıştırılan farklı konsantrasyonlardaki (0.5 μm , 4 μm ve 10 μm) polistiren mikroplastiklere maruz kalmanın sperm canlılığını azalttığını ve spermelerde morfolojisinde bozulma oranını artırdığını ortaya çıkardı (Jin vd., 2022). Li ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada 90 gün boyunca polistiren mikroplastikler ile beslenen Wistar sıçanlarında, spermatojenik hücrelerde apoptozu ile arttırdığı, spermelerde anormalliğini artırırken aynı zamanda sperm hareketliliğini ve konsantrasyonunu azalttığını görülmüştür (Li vd., 2020). Sperm baş hasarları, spermelerin penetrasyonunu etkilerken, sperm kuyruklarındaki hasarlanmalar ise spermelerin spiral hareketini etkiler. Bu durum spermelerin fertilizasyon başarısı etkileyerek üreme sağlığında bir tehdit oluşturur (Gatimel vd., 2017). Çalışmamızla ortaya koyduğumuz sperm morfoloji bozukluklarındaki artış, önceki çalışmalarda gösterilen hasarlar ile tutarlı olup, mikro ve nanoplastiklerin sperm morfolojisini etkileyerek infertiliteye neden olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda sperm hücrelerinde meydana gelen tek ve çift iplik kırıkları alkali COMET analizi ile belirlendi ve % kuyruk DNA oranları hesaplandı. Hem düşük doz hem de yüksek doz PET-NP uygulanan gruplarda DNA iplik kırıklarının kontrole göre anlamlı bir şekilde artış gösterdiği belirlendi ($p < 0.05$). Düşük doz PET-NP ve yüksek doz PET-NP alan iki grup karşılaştırıldığında ise DNA iplik kırıkları arasında anlamlı bir fark görülmedi ($P > 0.05$, $P = 0.34930$). Zhang ve arkadaşları erkek farelerde gerçekleştirdiği bir çalışmada, bir plastik katkısı olan Di(2-etilheksil) ftalatlar 1 g/kg/d oranında 60 gün boyunca intragastrik olarak uygulanmasının ardından, sperm DNA hasarında artış gözlediklerini bildirmiştir (Zhang vd., 2022). Erkek gamet hücrelerindeki DNA hasarı, çiftler arasında üreme yardımcı tedavilerin etkiler, infertilitenin düşük ile sonuçlanmasına ve yavrularda doğum kusurlarına neden olabileceği bilinmektedir (Aitken, De Iulius ve McLachlan, 2009; Esteves vd., 2014). Bu çalışmada, PET-NP'lere maruziyetin DNA hasarına neden olduğu DNA çift iplik kırıkları üzerinden ilk kez gösterilmesi, PET nanoplastiklerinin neden olabileceği infertilitenin DNA hasarı üzerinden gerçekleşebileceğini de düşündürmektedir.

Testiste meydana gelen spermatogenez Johnsen skorlaması ile değerlendirildiğinde, özellikle yüksek doz PET-NP'lere maruz bırakılan farelerde kontrol grubuna oranla anlamlı bir değişimin olduğu görüldü ($P < 0.001$). Bu grupta testis tübülleri incelendiğinde spermatid, spermatozoa gibi spermatogenez aşamalarında ortaya çıkan hücrelerin varlığında gözle görülebilir bir azalma olduğu belirlendi. Her ne kadar Johnsen skorundaki değişim kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, düşük doz PET-NP'lere maruz kalan farelerde de tübülerdeki spermatogenez sürecinde bozulmalar ve spermatozoa bulunmayan tübül sayılarında artış gibi bulgular ortaya konmuştur ($p > 0.05$). Amereh ve arkadaşlarının fareleri beş hafta boyunca polistiren nanoplastiklere maruz bıraktığı çalışmasında testislerde spermatogenez aşamalarında düzensizlikler, bazal membranlarda düzensizlikler ve bozulmuş yapılar, seminifer tübül dejenerasyonu gözlenmiştir (Amereh vd., 2020). Aynı zamanda çalışmamızla benzer şekilde spermatid ve spermatozoa sayılarında azalmalar ve sertoli hücrelerinde histolojik lezyonlar görülmüştür.

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, plastiğe maruz kalan farelerde mililitredeki sperm sayılarında yüksek oranda bir azalma ve morfolojik açıdan bozulmalar tespit edildi. İncelemelerde morfolojik açıdan yoğunlukla sperm baş morfolojisinde bozulmalar görüldü.

Aynı zamanda sperm hücreleri COMET analizi ile incelendiğinde plastik maruziyetinin sperm DNA iplik kırıklarını arttırdığı tespit edildi. Testislerden alınan kesitler incelendi ve plastiğe maruz kalan farelerin tübül yapılarında bozulmalar olduğu görüldü. Tüm sonuçları beraber değerlendirdiğimizde vardığımız kanı, PET nanoplastiklerinin testislerdeki tübülleri etkilemesi ile birlikte spermatogenez aşamalarını doğrudan etkileyerek sperm sayısında azalmalara, sperm morfolojisinde bozulmalara ve spermlerdeki DNA kırıklarını artırarak erkek üreme sağlığına negatif yönde etki edeceği yönündedir. PET-NP'lerin üreme sağlığındaki negatif etkisi çalışmamızda literatürde ilk kez gösterildi. PET-NP'ler üzerine daha fazla çalışmanın yapılması gerekmekte ve erkek infertilitesi üzerine daha kapsamlı çalışmalar gerektirmektedir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Gerçekleştirilen çalışmamızda PET-NP'lere maruz kalan Balb-C farelerin sperm hücrelerinde sayısal ve morfolojik değişimler ile beraber DNA hasarı, testis dokusunda ise organ indeksi ve spermatogeneze etkisi araştırıldı. PET-NP'lerin testis ağırlıklarında anlamlı bir değişime neden olmadığı, sperm sayılarında önemli oranda azalmalara neden olduğu, testis histolojisinde doku yapısının bozulmasına ve spermatogenezi etkilediği ve spermelerde DNA iplik kırıklarına neden olduğu gösterildi. Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde PET nanoplastiklerine maruziyetin erkek üreme sağlığına doğrudan etki ederek infertiliteye neden olabileceği düşünülmektedir.

Mikro ve nanoplastiklerin insan ve çevre sağlığına olumsuz etkileri günümüzde birçok yayın ile ortaya konmuş olup, yaygın kullanılan çoğu plastik hammaddesinin mikro veya nano boyutta toksisitesi farklı organizmalar ve farklı yöntemlerle incelenmiştir. Tüm çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde mikro ve nanoplastiklere maruziyetin insan sağlığını olumsuz etkilediği yönünde şüphe yoktur. Bununla beraber, literatürde plastik maruziyetinin erkek infertilitesi ile ilişkilendirildiği çalışmalar oldukça sınırlı sayıda olup PET mikro veya nanoplastiklerinin erkek infertilitesine etkisini ortaya koyan araştırma mevcut değildir. Bu çalışmada ile, PET nanoplastik maruziyetinin erkek infertilitesi ile ilişkisi ilk kez ortaya konulmuştur. Elde edilen veriler, diğer plastik türlerine kıyasla daha sık maruz kalınan PET plastiklerinin toksisitesinin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca, literatürde PET-NP'lerin üreme sistemi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir hayvan çalışması bulunmadığından, bu tez çalışmasında kullanılan modelleme, kullanılan deney hayvanı, hayvanın yaşı, PET-NP dozu ve uygulama süresi ile ileriki çalışmalar için model oluşturma potansiyeline sahiptir. Son olarak, tez çalışmasından elde edilen tüm bu veriler 28 günlük sub-kronik maruziyet ile elde edilmiş olup, kronik maruziyetin etkilerini açıklamak için daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır. PET-NP'lerinin erkek üreme sağlığına etkisinin daha kapsamlı ve detaylı incelenmesi için kronik maruziyetin de ele alınacağı ileriki çalışmalar önerilmektedir.

Amaç: İnfertilite birçok çiftte çocuk sahibi olması yolundaki büyük bir engeldir. Doğrudan veya dolaylı olarak çevresel etmenlerin infertiliteye neden olduğu bilinmekte

ve nesiller arasında infertil çiftlerin sayısı giderek artmaktadır. Plastikler daha küçük yapılara parçalanarak nanoplastiklere dönüşebilmektedir ve bu nanoplastikler yiyecekler, içecekler, solunum gibi çeşitli yollar ile insan vücuduna alınmaktadır. Bu çalışmada amaçlanan sindirim yolu aracılığıyla vücuda alınan PET-NP'lerin erkek üreme sağlığındaki etkisini araştırmak olmuştur.

Materyal ve Metot: 5 haftalık Balb-C türü fareler (n=18) rastgele olarak her grupta 6 hayvan olacak şekilde kontrol grubu, 0.1 mg/gün PET-NP grubu ve 0.5 mg/gün PET-NP grubu olarak 3 gruba ayrıldı. PET-NP'ler 100'er µL serum fizyolojikte hazırlanarak, düşük doz PET-NP alan gruba 28 gün boyunca günde 0.1 mg/gün PET-NP olarak ve yüksek doz PET-NP alacak olan gruba ise 0.5 mg/gün PET-NP olarak oral gavaj yöntemi ile mideye verildi.

Bulgular: Gruplar karşılaştırıldığında testislerin organ indekslerinde anlamlı bir değişim görülmedi. Kontrol grubu ve PET-NP grupları karşılaştırıldığında, sperm sayılarında düşük doz grubunda ($p<0.05$) ve yüksek doz grubunda ($p<0.001$) anlamlı bir azalma görüldü. 0.1 mg/gün PET-NP grubundaki normal sperm sayısı kontrol grubundakilere oranla anlamlı bir düşüş olduğunu gösterdi ($P<0.05$, $P=0,0360167$). Kontrol grubu ile 0.5 mg/gün PET-NP grubu karşılaştırıldığında normal sperm morfolojisinde anlamlı bir azalış görüldü ($P<0.01$, $P=0.0013605$). Sperm morfolojisinden PET-NP'lerin olumsuz yönde bir etkisi olduğu görüldü. Kontrol grubuna kıyasla 0.5 mg/gün PET-NP grubunda tübül yapısında anlamlı bir değişim olduğu görüldü ($P<0.001$).

Sonuç: Çalışmamızda PET-NP'lerin testis ve sperm üzerindeki etkilerine bağlı olarak erkek infertilitesindeki rolü incelendi. PET plastiğine maruziyetin mililitredeki sperm sayılarında yüksek oranda bir azalmaya neden olduğu ve sperm morfolojisinde bozulmalar tespit edildi. Sperm hücrelerinin COMET analizlerinde plastik maruziyetinin sperm DNA iplik kırıklarını arttırdığı tespit edildi. Testis tübül yapılarında bozulmalar olduğu ve spermatogenez aşamalarında düzensizliklerin arttığı tespit edildi. Elde edilen sonuçlarda PET-NP'ler erkek üreme sağlığı açısından oldukça tehdit edici bir unsur olarak görüldü.

KAYNAKLAR

- Adam, V., Tong, Y., ve Bernd, N. (2019). toward an ecotoxicological risk assessment of microplastics: comparison of available hazard and exposure data in freshwaters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 436-447. doi:10.1002/etc.4323
- Aitken, J. R., De Iuliis, G. N., ve McLachlan, R. I. (2009). biological and clinical significance of dna damage in the male germ line. *International Journal of Andrology*, 45-56. doi:10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x
- Akdogan, Z., ve Guven, B. (2019). Microplastics in the environment: a critical review of current understanding and identification of future research needs. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 254. doi:10.1016/j.envpol.2019.113011
- Alimba, C. G., ve Faggio, C. (2019). Microplastics in the marine environment: current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 61-74. doi:10.1016/j.etap.2019.03.001
- Almeida, S., Rato, L., Mario, S., Marco, A. G., ve Pedro, O. F. (2017). fertility and sperm quality in the aging male. *Current Pharmaceutical Design*, 29-37. doi:10.2174/1381612823666170503150313
- Amereh, F., Babaei, M., Eslami, A., Fazelipour, S., ve Rafiee, M. (2020). The emerging risk of exposure to nano(micro)plastics on endocrine disturbance and reproductive toxicity: From a hypothetical scenario to a global public health challenge. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 261. doi:10.1016/j.envpol.2020.114158
- Amin, M. A., Karimi, M., Seyed, T. S., Piri, H., ve Karimi, J. (2022). The association of oxidative stress and reactive oxygen species modulator 1 (ROMO1) with infertility: a mini review. *Honnam Medical Journal*, 91-95. doi:10.4068/cmj.2022.58.3.91

- Amini, M. A., Talebi, S. S., ve Karimi, J. (2019). Reactive oxygen species modulator 1 (rom1), a new potential target for cancer diagnosis and treatment. *Chonnam Medical Journal*, 136-143. doi:10.4068/cmj.2019.55.3.136.
- Andersson, A. M., Jørgensen, N., Main, K. M., Toppari, J., Meyts, E. R., Leffers, H., vd. (2008). Adverse trends in male reproductive health: we may have reached a crucial ‘tipping point’. *International Journal of Andrology*, 74-80. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00853.x
- Auger, J., Jouannet, P., ve Eustache, F. (2016). Another look at human sperm morphology. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 10-23. doi:10.1093/humrep/dev251
- Auta, H. S., Emenike, C. U., ve Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International*, 165-176. doi:10.1016/j.envint.2017.02.013
- Bach, C., Dauchy, X., Chagnon, M. C., ve Etienne, S. (2012). Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: a source of controversy reviewed. *Water Research*, 571–583. doi:10.1016/j.watres.2011.11.062
- Barroso, G., Valdespin, C., Vega, E., Kershenovich, R., Avila, R., Avendaño, C., vd. (2009). Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertility and Sterility*, 835-848. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.06.030
- Bernardino, R. L., D'Souza, W. N., Rato, L., Rothstein, J. L., Dias, T. R., Chui, D., vd. (2019). Knockout of MCT1 results in total absence of spermatozoa, sex hormones dysregulation, and morphological alterations in the testicular tissue. *Cell and Tissue Research*, 333-339. doi:10.1007/s00441-019-03028-4
- Biscardi, D., Monarca, S., De Fusco, R., Senatore, F., Poli, P., Buschini, A., vd. (2003). Evaluation of the migration of mutagens/carcinogens from PET bottles into mineral water by tradescantia/micronuclei test, comet assay on leukocytes and GC/MS. *The Science of the Total Environment*, 101-108. doi:10.1016/s0048-9697(02)00349-2

- Bošnjir, J., Puntarić, D., Galić, A., Škes, I., Dijanić, T., Klarić, M., vd. (2007). Migration of phthalates from plastic containers into soft drinks and mineral water. *Food Technology and Biotechnology*, 91-95. 05 Mayis 2023. <https://hrcak.srce.hr/30442> adresinden alındı
- Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M. Y., Hagens, W. I., Bulder, A. S., de Heer, C., vd. (2009). Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 52-62. doi:10.1016/j.yrtph.2008.10.008
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Brook, J., D. (2007). *Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia*. In: WeinAJ (ed) *Campbell-Walsh Urology*: Saunders Elsevier.
- Brun, N. R., Beenakker, M. M., Hunting, E. R., Ebert, D., ve Vijver, M. G. (2017). Brood pouch-mediated polystyrene nanoparticle uptake during daphnia magna embryogenesis. *Nanotoxicology*, 1059-1069. doi:10.1080/17435390.2017.1391344
- Burrue, V. R., Yanagimachi, R., ve Whitten, W. K. (1996). Normal mice develop from oocytes injected with spermatozoa with grossly misshapen heads. *Biology of Reproduction*, 709-714. doi:10.1095/biolreprod55.3.709
- Calogero, A. E., Condorelli, R. A., Russo, G. I., ve La Vignera, S. (2017). Conservative nonhormonal options for the treatment of male infertility: antibiotics, anti-inflammatory drugs, and antioxidants. *BioMed Research International*, 46-50. doi:10.1155/2017/4650182
- Cannarella, R., Condorelli, R. A., Duca, Y., La Vignera, S., ve Calogero, A. E. (2019). New insights into the genetics of spermatogenic failure: a review of the literature. *Human Genetics*, 125-140. doi:10.1007/s00439-019-01974-1
- Cannarella, R., Condorelli, R. A., Mongioi, L. M., La Vignera, S., ve Calogero, A. E. (2020). Molecular biology of spermatogenesis: novel targets of apparently

- idiopathic male infertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 17-28.
doi:10.3390/ijms21051728
- Caruso, G. (2019). Microplastics as vectors of contaminants. *Marine Pollution Bulletin*, 921-924. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.07.052
- Champroux, A., Torres-Carreira, J., Gharagozloo, P., Drevet, J. R., ve Kocer, A. (2016). Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic and Clinical Andrology*, 17. doi:10.1186/s12610-016-0044-5
- Chapdelaine, P., Vignola, K., ve Fortier, M. A. (2001). Protein estimation directly from SDS-PAGE loading buffer for standardization of samples from cell lysates or tissue homogenates before western blot analysis. *BioTechniques*, 478-482. doi:10.2144/01313bm04
- Chemes, H. E., Carizza, C., Scarinci, F., Brugo, S., Neuspiller, N., ve Schwarsztein, L. (1987). Lack of a head in human spermatozoa from sterile patients: a syndrome associated with impaired fertilization. *Fertility and Sterility*, 310-316. doi:10.1016/s0015-0282(16)50011-9
- Chen, C. C., Han, X., Ko, T. P., Liu, W., ve Guo, R. T. (2018). Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. *The FEBS Journal*, 3717-3723. doi:10.1111/febs.14612
- Chianese, R., Troisi, J., Richards, S., Scafuro, M., Fasano, S., Guida, M., vd. (2017). Bisphenol a in reproduction: epigenetic effects. *Current Medicinal Chemistry*, 748-770. doi:10.2174/0929867324666171009121001
- Cho, C. L., Esteves, S. C., ve Agarwal, A. (2016). Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Asian Journal of Andrology*, 186-193. doi:10.4103/1008-682X.170441
- Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, 198-236. doi:10.1152/physrev.1972.52.1.198
- Coffee, D., ve Diaz, R. (2022). The perils of plastic: tracking environmental, climate and human impacts of plastic production, use and disposal. *Los Angeles: UCLA Luskin*

Center for Innovation. <https://innovation.luskin.ucla.edu/wp-content/uploads/2022/04/The-Perils-of-Plastics.pdf> adresinden alındı

- da Costa, J. P., Santos, P. S., Duarte, A. C., ve Rocha-Santos, T. (2016). (Nano)plastics in the environment - sources, fates and effects. *The Science of The Total Environment*, 566-567. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.041
- D'Angelo, S., ve Meccariello, R. (2021). Microplastics: a threat for male fertility. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2392. doi:10.3390/ijerph18052392
- De Felice, B., Ambrosini, R., Bacchetta, R., Ortenzi, M. A., ve Parolini, M. (2021). Dietary exposure to polyethylene terephthalate microplastics (PET-MPs) induces faster growth but not oxidative stress in the giant snail *achatina reticulata*. *Chemosphere*, 270. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129430
- de Sá, L. C., Oliveira, M., Ribeiro, F., Rocha, T. L., ve Futter, M. N. (2018). Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: what do we know and where should we focus our efforts in the future? *The Science of The Total Environment*, 1029-1039. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.207
- de Souza Machado, A. A., Kloas, W., Zarfl, C., Hempel, S., ve Rillig, M. C. (2018). Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. *Global Change Biology*, 1405-1416. doi:10.1111/gcb.14020
- Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., ve Ren, H. (2017). Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific Reports*. doi:10.1038/srep46687
- Desai, N., Ludgin, J., Sharma, R. K., ve Agarwal, A. (2013). Female and male gametogenesis. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery*, 43-62. doi:10.1007/978-1-4614-6837-0_3
- Domingo, J. L., ve Nadal, M. (2019). Human exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) through drinking water: a review of the recent scientific literature. *Environmental Research*, 177. doi:10.1016/j.envres.2019.108648
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001

- Duca, Y., Calogero, A. E., Cannarella, R., Condorelli, R. A., ve La Vignera, S. (2019). Current and emerging medical therapeutic agents for idiopathic male infertility. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 55-67. doi:10.1080/14656566.2018.1543405
- Enyoh, C. E., Verla, A. W., Verla, E. N., Ibe, F. C., ve Amaobi, C. E. (2019). Airborne microplastics: a review study on method for analysis, occurrence, movement and risks. *Environmental Monitoring and Assessment*, 668. doi:10.1007/s10661-019-7842-0
- Eroschenko, V. E., ve di Fiore, M. S. (2013). *DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*: Lippincott Williams and Wilkins. Moscow. 06 Mayıs 2023. https://books.google.com.tr/books?id=sH87M12QswcC&printsec=frontcover&hl=tr&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false adresinden alındı
- Esteves, S. C., Sharma, R. K., Gosálvez, J., ve Agarwal, A. (2014). A translational medicine appraisal of specialized andrology testing in unexplained male infertility. *International Urology and Nephrology*, 1037-1052. doi:10.1007/s11255-014-0715-0
- European Parliament. (2016). Food contact materials - regulation (EC) 1935/2004. European Implementation Assessment, Mayıs 2016, 117-138. 03 Mayıs 2023 [https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2016/581411/EPRS_STU\(2016\)581411_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2016/581411/EPRS_STU(2016)581411_EN.pdf) adresinden alındı
- Evgeni, E., Charalabopoulos, K., ve Asimakopoulos, B. (2014). Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *Journal of Reproduction and Infertility*, 15(1), 2-14. 10 Mayıs 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3955419> adresinden alındı
- Fainberg, J., ve Kashanian, J. A. (2019). Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research*, 670. doi:10.12688/f1000research.17076.1
- Farhoodi, M., Emam-Djomeh, Z., ve Ehsani, M. R. (2008). Effect of environmental conditions on the migration of di (2-ethylhexyl) phthalate from PET bottles into

yogurt drinks: influence of time, temperature, and food. *Arabian Journal for Science and Engineering*.

- Feige, J. N., Gerber, A., Casals-Casas, C., Yang, Q., Winkler, C., Bedu, E., vd. (2010). The pollutant diethylhexyl phthalate regulates hepatic energy metabolism via species-specific PPARalpha-dependent mechanisms. *Environmental Health Perspectives*, 234-241. doi:10.1289/ehp.0901217
- Feng, C. W., Bowles, J., ve Koopman, P. (2014). Control of mammalian germ cell entry into meiosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 488-497. doi:10.1016/j.mce.2013.09.026
- Forte, M., Iachetta, G., Tussellino, M., Carotenuto, R., Prisco, M., De Falco, M., vd. (2016). Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells. *Toxicology In Vitro : An International Journal Published In Association with BIBRA*, 126-136. doi:10.1016/j.tiv.2015.11.006
- Foster, P. M., Mylchreest, E., Gaido, K. W., ve Sar, M. (2001). Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Human Reproduction Update*, 231-235. doi:10.1093/humupd/7.3.231
- Galloway, T. S., Cole, M., ve Lewis, C. (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nature Ecology and Evolution*, 116. doi:10.1038/s41559-017-0116
- García-Rodríguez, A., Gosálvez, J., Agarwal, A., Roy, R., ve Johnston, S. (2018). DNA Damage and Repair in Human Reproductive Cells. *International journal of molecular sciences*, 31. doi:10.3390/ijms20010031
- Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., ve Léandri, R. D. (2017). Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*, 845-862. doi:10.1111/andr.12389
- Geyer, R., Jambeck, J. R., ve Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 7. doi:10.1126/sciadv.1700782
- Gigault, J., Halle, A. T., Baudrimont, M., Pascal, P. Y., Gauffre, F., Phi, T. L., vd. (2018). Current opinion: what is a nanoplastic? *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 1030-1034. doi:10.1016/j.envpol.2018.01.024

- Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiological Reviews*, 1-17. doi:10.1152/physrev.00013.2015
- Halden, R. U. (2010). Plastics and health risks. *Annual review of public health*, 179–194. doi:10.1146/annurev.publhealth.012809.103714
- Hanachi, P., Kazemi, S., Zivary, S., Ghadami, S. A., ve Karbalaei, S. S. (2021). The effect of polyethylene terephthalate and abamectin on oxidative damages and expression of vtg and cyp1a genes in juvenile zebrafish. *Environmental Nanotechnology Monitoring and Management*, 8. doi:10.1016/j.enmm.2021.100565
- Hao, C., Cheng, X., Guo, J., Xia, H., ve Ma, X. (2013). Perinatal exposure to diethylhexyl-phthalate induces obesity in mice. *Frontiers In Bioscience (Elite edition)*, 725-733. doi:10.2741/E653
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., ve Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 3657-3666. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.065
- He, F., ve Zuo, L. (2015). Redox Roles of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 27770–27780. doi:10.3390/ijms161126059
- He, Y., Li, Z., Xu, T., Luo, D., Chi, Q., Zhang, Y., vd. (2022). Polystyrene nanoplastics deteriorate LPS-modulated duodenal permeability and inflammation in mice via ROS driven-NF- κ B/NLRP3 pathway. *Chemosphere*, 307. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135662> adresinden alındı
- Henkel, R., Kierspel, E., Stalf, T., Mehnert, C., Menkveld, R., Tinneberg, H. R., vd. (2005). Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertility and Sterility*, 635-642. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.11.022
- Hernandez, L. M., Xu, E. G., Larsson, H. C., Tahara, R., Maisuria, V. B., ve Tufenkji, N. (2019). Plastic Teabags Release Billions of Microparticles and Nanoparticles into Tea. *Environmental Science and Technology*, 12300-12310. doi:10.1021/acs.est.9b02540

- Hirt, N., ve Body-Malapel, M. (2020). Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. *Particle and Fibre Toxicology*, 57. doi:10.1186/s12989-020-00387-7
- Hlisníková, H., Petrovičová, I., Kolena, B., Šidlovská, M., ve Sirotkin, A. (2020). Effects and mechanisms of phthalates' action on reproductive processes and reproductive health: a literature review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6811. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186811> adresinden alındı
- Horte, A., Vierula, M., Toppari, J., ve Suominen, J. (2001). Reassessment of sperm morphology of archival semen smears from the period 1980--1994. *International Journal of Andrology*, 120-124. doi:10.1046/j.1365-2605.2001.00285.x
- Hou, B., Wang, F., Liu, T., ve Wang, Z. (2021). Reproductive toxicity of polystyrene microplastics: In vivo experimental study on testicular toxicity in mice. *Journal of Hazardous Materials*, 405. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124028
- Huang, T., Zhang, W., Lin, T., Liu, S., Sun, Z., Liu, F., vd. (2022). Maternal exposure to polystyrene nanoplastics during gestation and lactation induces hepatic and testicular toxicity in male mouse offspring. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published For The British Industrial Biological Research Association*, 160. doi:10.1016/j.fct.2021.112803
- Hwang, J., Choi, D., Han, S., Jung, S. Y., Choi, J., ve Hong, J. (2020). Potential toxicity of polystyrene microplastic particles. *Scientific Reports*, 7391. doi:10.1038/s41598-020-64464-9
- Indo, H. P., Hawkins, C. L., Nakanishi, I., Matsumoto, K. I., Matsui, H., Suenaga, S., vd. (2017). Role of mitochondrial reactive oxygen species in the activation of cellular signals, molecules, and function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 439–456. doi:10.1007/164_2016_117
- Jambeck, J., Moss, E., ve Dubay, B. (2020). Leveraging multi-target strategies to address plastic pollution in the context of an already stressed ocean. *Washington DC: World Resources Institute*, 39-41. 10 Mayıs 2023. https://www.un.org/sites/un2.un.org/files/2020/06/brajesh_dubey_publication_addressing_ocean_pollutants_full_report_final_0.pdf adresinden alındı

- Järvenpää, J., Perkkiö, M., Laitinen, R., ve Lahtela-Kakkonen, M. (2022). PE and PET oligomers' interplay with membrane bilayers. *Scientific Reports*. doi:10.1038/s41598-022-06217-4
- Jatana, S., Callahan, L. M., Pentland, A. P., ve DeLouise, L. A. (2016). Impact of cosmetic lotions on nanoparticle penetration through ex vivo C57BL/6 hairless mouse and human skin: a comparison study. *Cosmetics*. doi:10.3390/cosmetics3010006
- Jenkins, T. G., Aston, K. I., Meyer, T., ve Carrell, D. T. (2015). The sperm epigenome, male aging, and potential effects on the embryo. *Advances In Experimental Medicine and Biology*, 81–93. doi:10.1007/978-3-319-18881-2_4
- Jeong, B., Baek, J. Y., Koo, J., Park, S., Ryu, Y. K., Kim, K. S., vd. (2022). Maternal exposure to polystyrene nanoplastics causes brain abnormalities in progeny. *Journal of Hazardous Materials*, 426. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127815
- Ji, Y., Wang, C., Wang, Y., Fu, L., Man, M., ve Chen, L. (2020). Realistic polyethylene terephthalate nanoplastics and the size- and surface coating-dependent toxicological impacts on zebrafish embryos. *Environmental Science: Nano*, 2313-2324. doi:10.1039/D0EN00464B
- Jin, H. Y., Liu, Z., Sha, X., Jiang, C., Li, L., Pan, M., vd. (2022). Chronic exposure to polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity and decreased testosterone levels via the LH-mediated LHR/cAMP/PKA/StAR pathway. *Particle and Fibre Toxicology*. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123430
- Jin, H., Ma, T., Sha, X., Liu, Z., Zhou, Y., Meng, X., vd. (2021). Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice. *Journal of Hazardous Materials*. doi:10.1186/s12989-022-00453-2
- Johnsen, S. G. (1970). Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 2-25. <https://doi.org/10.1159/000178170> adresinden alındı
- Jung, A., Eberl, M., ve Schill, W. B. (2001). Improvement of semen quality by nocturnal scrotal cooling and moderate behavioural change to reduce genital heat stress in

- men with oligoasthenoteratozoospermia. *Reproduction (Cambridge, England)*, 595-6033. doi:10.1530/rep.0.1210595
- Kankanige, D., ve Babel, S. (2020). Smaller-sized micro-plastics (MPs) contamination in single-use PET-bottled water in Thailand. *The Science of The Total Environment*, 717. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137232
- Keresztes, S., Tatár, E., Mihucz, V. G., Virág, I., Majdik, C., ve Záray, G. (2009). Leaching of antimony from polyethylene terephthalate (PET) bottles into mineral water. *The Science of The Total Environment*, 4731–4735. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.04.025
- Kik, K., Bukowska, B., ve Sicińska, P. (2020). Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. doi:10.1016/j.envpol.2020.114297
- Kim, J. D., McCarter, J., ve Yu, B. P. (1996). Influence of age, exercise, and dietary restriction on oxidative stress in rats. *Aging (Milan, Italy)*, 123-129. doi:10.1007/BF03339566
- Koelmans, A. A., Diepens, N. J., Velzeboer, I., Besseling, E., Quik, J. T., ve van de Meent, D. (2015). Guidance for the prognostic risk assessment of nanomaterials in aquatic ecosystems. *The Science of The Total Environment*, 141-149. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.02.032
- Kosower, N. S., Katayose, H., ve Yanagimachi, R. (1992). Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *Journal of Andrology*, 342–348.
- Kota, S. K., ve Feil, R. (2010). Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. *Developmental Cell*, 675-686. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.009
- Lambert, S., Scherer, C., ve Wagner, M. (2017). Ecotoxicity testing of microplastics: Considering the heterogeneity of physicochemical properties. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 470–475. doi:10.1002/ieam.1901

- Larose, H., Shami, A. N., Abbott, H., Manske, G., Lei, L., ve Hammoud, S. S. (2019). Gametogenesis: A journey from inception to conception. *Current Topics In Developmental Biology*, 257–310. doi:10.1016/bs.ctdb.2018.12.006
- Lebel, C. P., ve Bondy, S. C. (1990). Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes. *Neurochemistry International*, 435-440. doi:10.1016/0197-0186(90)90025-o
- Lee, M. T., Bonneau, A. R., ve Giraldez, A. J. (2014). Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 581–613. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013027
- Lehner, R., Weder, C., Petri-Fink, A., ve Rothen-Rutishauser, B. (2019). Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. *Environmental Science and Technology*, 1748–1765. doi:10.1021/acs.est.8b05512
- Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., vd. (2018). Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Science of The Total Environment*, 619-620. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.11.103
- Li, D., Shi, Y., Yang, L., Xiao, L., Kehoe, D. K., Gun'ko, Y. K., vd. (2020). Microplastic release from the degradation of polypropylene feeding bottles during infant formula preparation. *Nature Food*, 746–754. doi:10.1038/s43016-020-00171-y
- Li, N., Li, Y., Meng, H., Sun, H., ve Wu, D. (2017). Associations between urinary phthalate metabolites and serum anti-müller hormone levels in U.S. men based on national health and nutrition examination survey 2003-2004. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. doi:10.3390/ijerph14121513
- Liu, H., Kwak, J. I., Wang, D., ve An, Y. J. (2021). Multigenerational effects of polyethylene terephthalate microfibers in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Research*. doi:10.1016/j.envres.2020.110569

- Liu, Z., Zhuan, Q., Zhang, L., Meng, L., Fu, X., ve Hou, Y. (2022). Polystyrene microplastics induced female reproductive toxicity in mice. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127629> adresinden alındı
- Lu, J., Wang, Z., Cao, J., Chen, Y., ve Dong, Y. (2018). A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*. doi:10.1186/s12958-018-0391-5
- Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z., ve Jin, Y. (2018). Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *The Science of The Total Environment*, 449–458. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.051
- Lu, Y., Liu, Y., ve Yang, C. (2017). Evaluating in vitro DNA damage using comet assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. doi:10.3791/56450
- Luti, S., Fiaschi, T., Magherini, F., Modesti, P. A., Piomboni, P., Semplici, B., vd. (2021). Follicular microenvironment: Oxidative stress and adiponectin correlated with steroids hormones in women undergoing in vitro fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 175-184. doi:10.1002/mrd.23447
- Mahler, G. J., Esch, M. B., Tako, E., Southard, T. L., Archer, S. D., Glahn, R. P., vd. (2012). Oral exposure to polystyrene nanoparticles affects iron absorption. *Nature Nanotechnology*, 264–271. doi:10.1038/nnano.2012.3
- Marcelino, R. C., Cardoso, R. M., Domingues, E. L., Gonçalves, R. V., Lima, G. D., ve Novaes, R. D. (2022). The emerging risk of microplastics and nanoplastics on the microstructure and function of reproductive organs in mammals: a systematic review of preclinical evidence. *Life Sciences*. doi:10.1016/j.lfs.2022.120404
- Marston, A. L., ve Amon, A. (2004). Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. Nature reviews. *Molecular Cell Biology*, 983–997. doi:10.1038/nrm1526
- Mayerhofer, A. (2013). Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *Reproduction (Cambridge, England)*, 107-116. doi:10.1530/REP-12-0497
- McLachlan, R. I., ve de Kretser, D. M. (2001). Male infertility: the case for continued research. *The Medical Journal of Australia*, 116-117. doi:10.5694/j.1326-5377.2001.tb143180.x

- Mei, Y., Rongshuang, M., Ruizhi, Z., Hongyuan, H., Qiyue, T., ve Shuhua, Z. (2019). Effects of dieffects of dimethyl phthalate (DMP) on serum sex hormone levels and apoptosis in C57 Female Mice. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 82-88. doi:10.5812/ijem.82882
- Menkveld, R. (2010). Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian Journal of Andrology*, 47–58. doi:10.1038/aja.2009.14
- Mensch, J., Melis, A., Mackie, C., Verreck, G., Brewster, M. E., ve Augustijns, P. (2010). Evaluation of various PAMPA models to identify the most discriminating method for the prediction of BBB permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik E.V*, 495-502. doi:10.1016/j.ejpb.2010.01.003
- Miki, H., Lee, J., Inoue, K., Ogonuki, N., Noguchi, Y., Mochida, K., vd. (2004). Microinsemination with first-wave round spermatids from immature male mice. *The Journal of Reproduction and Development*, 131-137. doi:10.1262/jrd.50.131
- Mital, P., Hinton, B. T., ve Dufour, J. M. (2011). The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of Reproduction*, 851–858. doi:10.1095/biolreprod.110.087452
- Mori, C., Nakamura, N., Dix, D. J., Fujioka, M., Nakagawa, S., Shiota, K., vd. (1997). Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice. *Developmental Dynamics : An Official Publication of The American Association of Anatomists*, 125-136. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199701)208:1<125::AID-AJA12>3.0.CO;2-5
- Naasz, S., Altenburger, R., ve Kühnel, D. (2018). Environmental mixtures of nanomaterials and chemicals: The Trojan-horse phenomenon and its relevance for ecotoxicity. *The Science of The Total Environment*, 1170–1181. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.180
- Naidu, E. C., Olojede, S. O., Lawal, S. K., Rennie, C. O., ve Azu, O. O. (2021). Nanoparticle delivery system, highly active antiretroviral therapy, and testicular

morphology: the role of stereology. *Pharmacology Research and Perspectives*. doi:10.1002/prp2.776

- Netherton, J., Ogle, R. A., Hetherington, L., Silva Balbin Villaverde, A. I., Hondermarck, H., ve Baker, M. A. (2020). Proteomic analysis reveals that topoisomerase 2A is associated with defective sperm head morphology. *Molecular and Cellular Proteomics : MCP*, 444-455. doi:10.1074/mcp.RA119.001626
- Newsholme, P., Cruzat, V. F., Keane, K. N., Carlessi, R., ve de Bittencourt, P. I. (2016). Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *The Biochemical Journal*, 4527–4550. doi:10.1042/BCJ20160503C
- Nie, J. H., Shen, Y., Roshdy, M., Cheng, X., Wang, G., ve Yang, X. (2021). Polystyrene nanoplastics exposure caused defective neural tube morphogenesis through caveolae-mediated endocytosis and faulty apoptosis. *Nanotoxicology*, 885-904. doi:10.1080/17435390.2021.1930228
- O'Neill, S. M., ve Lawler, J. (2021). Knowledge gaps on micro and nanoplastics and human health: a critical review. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*. doi:10.1016/j.cscee.2021.100091
- O'Donnell, L., ve O'Bryan, M. K. (2014). Microtubules and spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 45-54. doi:10.1016/j.semdb.2014.01.003
- Okeke, E. S., Chukwudozie, K. I., Nyaruaba, R., Ita, R. E., Oladipo, A., Ejeromedoghene, O., vd. (2022). Antibiotic resistance in aquaculture and aquatic organisms: a review of current nanotechnology applications for sustainable management. *Environmental Science and Pollution Research International*, 69241–69274. doi:10.1007/s11356-022-22319-y
- Okeke, E. S., Ejeromedoghene, O., Addey, C. I., Atakpa, E. O., Bello, S. F., Ezeorba, T. P., vd. (2022). Panacea for the nanoplastic surge in africa: a state-of-the-art review. *Heliyon*. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e11562
- Oßmann, B. E., Sarau, G., Holtmannspötter, H., Pischetsrieder, M., Christiansen, S. H., ve Dicke, W. (2018). Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water Research*, 307-316. doi:10.1016/j.watres.2018.05.027

- Paoli, D., Pecora, G., Pallotti, F., Faja, F., Pelloni, M., Lenzi, A., vd. (2019). Cytological and molecular aspects of the ageing sperm. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 218-227. doi:10.1093/humrep/dey357
- Pereira, S. C., Oliveira, P. F., Oliveira, S. R., Pereira, M. L., ve Alves, M. G. (2021). Impact of environmental and lifestyle use of chromium on male fertility: focus on antioxidant activity and oxidative stress. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. doi:10.3390/antiox10091365
- Perotti, M. E., Giarola, A., ve Gioria, M. (1981). Ultrastructural study of the decapitated sperm defect in an infertile man. *Journal of Reproduction and Fertility*, 543-549. doi:10.1530/jrf.0.0630543
- Phull, A. R., Nasir, B., Haq, I. U., ve Kim, S. J. (2018). Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. *Chemico-Biological Interactions*, 121-136. doi:10.1016/j.cbi.2017.12.024
- Piccardo, M., Provenza, F., Grazioli, E., Cavallo, A., Terlizzi, A., ve Renzi, M. (2020). PET microplastics toxicity on marine key species is influenced by pH, particle size and food variations. *The Science of The Total Environment*, 715, 136947. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136947
- Pirillo, V., Pollegioni, L., ve Molla, G. (2021). Analytical methods for the investigation of enzyme-catalyzed degradation of polyethylene terephthalate. *The FEBS Journal*, 4730–4745. doi:10.1111/febs.15850
- Pirsaheb, M., Hossini, H., ve Makhdoumi, P. (2020). Review of microplastic occurrence and toxicological effects in marine environment: experimental evidence of inflammation. *Process Safety and Environmental Protection*. doi:10.1016/j.psep.2020.05.050
- Pizzol, D. F., Garolla, A., Demurtas, J., Trott, M., Bertoldo, A., ve Smith, L. (2021). Pollutants and sperm quality: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research International*, 4095-4103. doi:10.1007/s11356-020-11589-z

- Plastics Europe. (2022). Plastic - The Facts 2022. Kasım 2022. Belgium: Plastics Europe.
<https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/> adresinden alındı
- Prata, J. C. (2018). Airborne microplastics: consequences to human health? *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 115-126. doi:10.1016/j.envpol.2017.11.043
- Prata, J. C., Costa, D., Joao, P., da Costa Duarte, A., ve Rocha-Santos, T. (2018). Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: a critical review. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 1-2. doi:10.1016/j.trac.2018.10.029
- Provenza, F., Piccardo, M., Terlizzi, A., ve Renzi, M. (2020). Exposure to pet-made microplastics: particle size and pH effects on biomolecular responses in mussels. *Marine Pollution Bulletin*. doi:10.1016/j.marpolbul.2020.111228
- Prüst, M., Meijer, J., ve Westerink, R. H. (2020). The plastic brain: neurotoxicity of micro- and nanoplastics. *Particle and Fibre Toxicology*. doi:10.1186/s12989-020-00358-y
- Rains, J. L., ve Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 567–575. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006
- Rashtian, J., Chavkin, D. E., ve Merhi, Z. (2019). Water and soil pollution as determinant of water and food quality/contamination and its impact on female fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*. doi:10.1186/s12958-018-0448-5
- Ray, P. F., Toure, A., Metzler-Guillemain, C., Mitchell, M. J., Arnoult, C., ve Coutton, C. (2017). Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clinical Genetics*, 217-232. doi:10.1111/cge.12905
- Ribas-Maynou, J., ve Benet, J. (2019). Single and double strand sperm DNA damage: different reproductive effects on male fertility. *Genes*. doi:10.3390/genes10020105
- Ribas-Maynou, J., Delgado-Bermúdez, A., Mateo-Otero, Y., Viñolas, E., Hidalgo, C. O., Ward, W. S., vd. (2022). Determination of double- and single-stranded DNA

- breaks in bovine sperm is predictive of their fertilizing capacity. *Journal Of Animal Science and Biotechnology*. doi:10.1186/s40104-022-00754-8
- Rist, S., ve Hartman, N. B. (2018). Aquatic ecotoxicity of microplastics and nanoplastics: lessons learned from engineered nanomaterials. *Freshwater Microplastics*, 25-49. doi: 10.1007/978-3-319-61615-5_2.
- Rodríguez-Hernández, A. G., Muñoz-Tabares, J. A., Aguilar-Guzmán, J. C., ve Vazquez-Duhalt, R. (2019). A novel and simple method for polyethylene terephthalate (PET) nanoparticle production. *Environmental Science: Nano*, 2031-2036. <https://doi.org/10.1039/C9EN00365G> adresinden alındı
- Rossi, G., Barnoud, J., ve Monticelli, L. (2014). Polystyrene nanoparticles perturb lipid membranes. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 241-246. doi:10.1021/jz402234c
- Santoro, N., Schauer, I. E., Kuhn, K., Fought, A. J., Babcock-Gilbert, S., ve Bradford, A. P. (2021). Gonadotropin response to insulin and lipid infusion reproduces the reprometabolic syndrome of obesity in eumenorrhic lean women: a randomized crossover trial. *Fertility and Sterility*, 566-574. doi:10.1016/j.fertnstert.2021.03.005.
- Schulze, W., ve Rehder, U. (1984). Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. *Cell and Tissue Research*, 395-407. doi:10.1007/BF00228424.
- Schymanski, D., Goldbeck, C., Humpf, H. U., ve Fürst, P. (2018). Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: release of plastic particles from different packaging into mineral water. *Water Research*, 154-162. doi:10.1016/j.watres.2017.11.011
- Sekine, N., Yokota, S., ve Oshio, S. (2021). Sperm Morphology is Different in Two Common Mouse Strains. *BPB Reports*, 162-165. doi:10.1248/bpbreports.4.5_162
- Selit, I., Basha, M., Marae, A., El-Naby, S. H., Nazeef, N., El-Mehrath, R., vd. (2013). Sperm DNA and RNA abnormalities in fertile and oligoasthenoteratozoospermic smokers. *Andrologia*, 35-39. doi:10.1111/j.1439-0272.2012.01305.x.

- Sgier, L., Freimann, R., Zupanic, A., ve Kroll, A. (2016). Flow cytometry combined with viSNE for the analysis of microbial biofilms and detection of microplastics. *Nature Communications*. doi:10.1038/ncomms11587.
- Shotyk, W., ve Krachler, M. (2007). Contamination of bottled waters with antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) increases upon storage. *Environmental Science and Technology*, 1560–1563. doi:10.1021/es061511+.
- Simon, L. M., Liu, L., Emery, B., Aston, K. I., Hotaling, J., ve Carrell, D. T. (2014). Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 2402–2412. doi:10.1093/humrep/deu228.
- Sinkó, B., Garrigues, T. M., Balogh, G. T., Nagy, Z. K., Tsinman, O., Avdeef, A., vd. (2012). Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of The European Federation For Pharmaceutical Sciences*, 698–707. doi:10.1016/j.ejps.2012.01.011.
- Skoczinski, P., Krause, L., Raschka, A., Dammer, L., ve Carus, M. (2021). Current status and future development of plastics: Solutions for a circular economy and limitations of environmental degradation. *Methods in Enzymology*, 1–26. doi:10.1016/bs.mie.2020.11.001.
- Smith, M., Love, D. C., Rochman, C. M., ve Neff, R. A. (2018). Microplastics in seafood and the implications for human health. *Current Environmental Health Reports*, 375–386. doi:10.1007/s40572-018-0206-z.
- Smith, M., Love, D. C., Rochman, C. M., ve Neff, R. A. (2018). Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Current environmental health reports*, 375-386. doi:10.1007/s40572-018-0206-z
- Souza, V. G., ve Fernando, A. L. (2016). Nanoparticles in food packaging: biodegradability and potential migration to food-a review. *Food Packaging and Shelf Life*, 63-70. doi:10.1016/j.fpsl.2016.04.001
- Sperm Morphology is Different in Two Common Mouse Strains. (2021). *BPB Reports*. doi:10.1248/bpbreports.4.5_162

- Sun, Z., Wen, Y., Zhang, F., Fu, Z., Yuan, Y., Kuang, H., vd. (2023). Exposure to nanoplastics induces mitochondrial impairment and cytomembrane destruction in Leydig cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. doi:10.1016/j.ecoenv.2023.114796
- Svechnikov, K. L., Weisser, J., Izzo, G., Colón, E., Svechnikova, I., ve Söder, O. (2010). Origin, development and regulation of human leydig cells. *Hormone Research in Paediatrics*, 93-101. doi:10.1159/000277141
- Teng, J., Zhao, J., Zhu, X., Shan, E., Zhang, C., Zhang, W., vd. (2021). Toxic effects of exposure to microplastics with environmentally relevant shapes and concentrations: accumulation, energy metabolism and tissue damage in oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*. doi:10.1016/j.envpol.2020.116169
- Tong, L., Chuang, C. C., Wu, S., ve Zuo, L. (2015). Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Letters*, 18–25. doi:10.1016/j.canlet.2015.07.008
- Toussaint, B., Raffael, B., Angers-Loustau, A., Gilliland, D., Kestens, V., Petrillo, M., vd. (2019). Review of micro- and nanoplastic contamination in the food chain. Food additives and contaminants. *Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure And Risk Assessment*, 639-673. doi:10.1080/19440049.2019.1583381
- Trivedi, P. P., Kushwaha, S., Tripathi, D. N., ve Jena, G. B. (2010). Evaluation of male germ cell toxicity in rats: correlation between sperm head morphology and sperm comet assay. *Mutation Research*, 115-121. doi:10.1016/j.mrgentox.2010.08.005
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 335–344. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478
- Vecoli, C., Montano, L., ve Andreassi, M. G. (2016). Environmental pollutants: genetic damage and epigenetic changes in male germ cells. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23339–23348. doi:10.1007/s11356-016-7728-4
- Vianello, A., Jensen, R. L., Liu, L., ve Vollertsen, J. (2019). Simulating human exposure to indoor airborne microplastics using a breathing Thermal Manikin. *Scientific Reports*. doi:10.1038/s41598-019-45054-w

- Wagner, M. (2017). Know thy unknowns: why we need to widen our view on endocrine disruptors. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 209–212. doi:10.1136/jech-2016-207259
- Wallace, N. E., Adams, M. C., Chafin, A. C., Jones, D. D., Tsui, C. L., ve Gruber, T. D. (2020). The highly crystalline PET found in plastic water bottles does not support the growth of the PETase-producing bacterium *Ideonella sakaiensis*. *Environmental Microbiology Reports*, 578–582. doi:10.1111/1758-2229.12878
- Webb, H. K., Arnott, J., Crawford, R. J., ve Ivanova, E. P. (2013). Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate). *Polymers*, 1-18. doi:10.3390/polym5010001
- Wei, R., ve Zimmermann, W. (2017). Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate. *Microbial Biotechnology*, 1302–1307. doi:10.1111/1751-7915.12714
- World Health Organization. (2023). Infertility. Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility> adresinden alındı
- Wright, S. L., ve Kelly, F. J. (2017). Plastic and human health: a micro issue? *Environmental Science and Technology*, 6634–6647. doi:10.1021/acs.est.7b00423
- Wu, S., Yan, M., Ge, R., ve Cheng, C. Y. (2020). Crosstalk between sertoli and germ cells in male fertility. *Trends in Molecular Medicine*, 215–231. doi:10.1016/j.molmed.2019.09.006
- Wu, X., Pan, J., Li, M., Li, Y., Bartlam, M., ve Wang, Y. (2019). Selective enrichment of bacterial pathogens by microplastic biofilm. *Water Research*. doi:10.1016/j.watres.2019.114979
- Xu, C., Yan, Y., Tan, J., ve Yang, D. (2019). Biodegradable nanoparticles of polyacrylic acid–stabilized amorphous CaCO₃ for tunable pH-responsive drug delivery and enhanced tumor inhibition. *Advanced Functional Materials*. doi:10.1002/adfm.201808146

- Xu, S., Yang, Z., Zhi, Y., Yu, S., Zhang, T., Jiang, J., vd. (2021). The effects of antimony on alzheimer's disease-like pathological changes in mice brain. *The Science of The Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143235
- Yang, D., Shi, H., Li, L., Li, J., Jabeen, K., ve Kolandhasamy, P. (2015). Microplastic pollution in table salts from china. *Environmental Science and Technology*, 13622–13627. doi:10.1021/acs.est.5b03163
- Yang, Y. F., Chen, C. Y., Lu, T. H., ve Liao, C. M. (2019). Toxicity-based toxicokinetic/toxicodynamic assessment for bioaccumulation of polystyrene microplastics in mice. *Journal of Hazardous Materials*, 703–713. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.12.048
- Yang, Y., Wang, J., ve Xia, M. (2020). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating superworms *zophobas atratus*. *The Science of The Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135233
- Yang, Z. S., Bai, Y. L., Jin, C. H., Na, J., Zhang, R., Gao, Y., vd. (2022). Evidence on invasion of blood, adipose tissues, nervous system and reproductive system of mice after a single oral exposure: nanoplastics versus microplastics. *Biomedical and Environmental Sciences : BES*, 1025–1037. doi:10.3967/bes2022.131
- Yin, K., Wang, Y., Zhao, H., Wang, D. G., Mu, M., Liu, Y., vd. (2021). A comparative review of microplastics and nanoplastics: toxicity hazards on digestive, reproductive and nervous system. *Science of The Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145758
- Yong, C. Q., Valiyaveetil, S., ve Tang, B. L. (2020). Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. doi:10.3390/ijerph17051509
- Yoshida, S., Sukeno, M., Nakagawa, T., Ohbo, K., Nagamatsu, G., Suda, T., vd. (2006). The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development (Cambridge, England)*, 1495–1505. doi:10.1242/dev.02316

- Yu, J., Wang, W., Wang, J., Wang, C., ve Li, C. (2019). Short-term toxicity of dibutyl phthalate to mice intestinal tissue. *Toxicology and Industrial Health*, 20-31. doi:10.1177/0748233718807303
- Zhang, B., Pan, C., Feng, C., Yan, C., Yu, Y., Chen, Z., vd. (2022). Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 45-52. doi:10.1080/13510002.2022.2046423
- Zhang, C., Wang, Z., Chen, R., Wang, S., Zhang, H., Ma, S., vd. (2022). Transcriptomic and proteomic characteristics of the di(2-ethylhexyl) phthalate-induced sperm dna damage mouse model. *Human and Experimental Toxicology*. doi:10.1177/09603271221139444
- Zhao, Y., Zhang, H., Cui, J. G., Wang, J. X., Chen, M. S., Wang, H. R., vd. (2023). Ferroptosis is critical for phthalates driving the blood-testis barrier dysfunction via targeting transferrin receptor. *Redox Biology*. doi: 10.1016/j.redox.2022.102584
- Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C., ve Zlokovic, B. V. (2015). Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell*, 1064–1078. doi:10.1016/j.cell.2015.10.067
- Zhong, G., Wan, F., Wu, S., Jiang, X., Tang, Z., Zhang, X., vd. (2021). Arsenic or/and antimony induced mitophagy and apoptosis associated with metabolic abnormalities and oxidative stress in the liver of mice. *The Science of The Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146082
- Zhou, L., Yu, Z., Xia, Y., Cheng, S., Gao, J., Sun, W., vd. (2022). Repression of autophagy leads to acrosome biogenesis disruption caused by a sub-chronic oral administration of polystyrene nanoparticles. *Environment International*. doi:10.1016/j.envint.2022.107220
- Zini, A., Phillips, S., Courchesne, A., Boman, J. M., Baazeem, A., Bissonnette, F., vd. (2009). Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*, 2495–2500. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.03.032

EKLER

Ek 1: Etik Onay Formu

“Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

88



Ek 2: Deney hayvanları kullanım sertifikası

“Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.



ÖZGEÇMİŞ

Oğuz Kaan TOMBUL

Eğitim

Derece	Yıl	Üniversite, Enstitü, Anabilim/Anasanat Dalı
Ls.	2021	Üsküdar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Lise.	2016	Özel Maltepe Uğur Anadolu Lisesi

İş/İstihdam (Varsa)

Yıl	Görev
2021-	Moleküler Biyolog/Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi
.	

