

**NONİLFENOL'ÜN SIĞIRLARDA SPERM MOTİLİTESİNE OLUMSUZ  
ETKİLERİNİN GLUTAMİN İLE GERİ ÇEVİRİLMESİ VE NONİLFENOL'ÜN  
SIĞIR EMBRİYOLARINA ETKİLERİ**

**Elif ADAÇOĞLU**  
**Yüksek Lisans Tezi**  
**Danışman: Prof. Dr. Cevdet UĞUZ**  
**2. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sedat Hamdi KIZIL**  
**Tez No: 2024-027**  
**Afyonkarahisar**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NONİLFENOL'ÜN SIĞIRLARDA SPERM MOTİLİTESİNE OLUMSUZ  
ETKİLERİNİN GLUTAMİN İLE GERİ ÇEVİRİLMESİ VE NONİLFENOL'ÜN  
SIĞIR EMBRİYOLARINA ETKİLERİ**

**Hazırlayan  
Elif ADAÇOĞLU**

**Danışman  
Prof. Dr. Cevdet UĞUZ**

**2. Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Sedat Hamdi KIZIL**

**Tez No: 2024-027**

**AFYONKARAHİSAR**

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No:  
'22.SAĞ.BİL.08'**

T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
ENSTİTÜ ONAYI

Öğrencinin	Adı- Soyadı	ELİF ADAÇOĞLU
	Numarası	203321012
	Anabilim Dalı	MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
	Programı	MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK TEZLİ (VET)
	Program Düzeyi	<input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora
Tezin Başlığı	Nonilfenol'ün Sığırlarda Sperm Motilitesine Olumsuz Etkilerinin Glutamin İle Geri Çevrilmesi Ve Nonilfenol'ün Sığır Embriyolarına Etkileri	
Tez Savunma Sınav Tarihi	14.06.2024	
Tez Savunma Sınav Saati	14:00	

Yukarıda bilgileri verilen öğrenciye ait tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
.... / .... / ..... tarih ve  
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

***e-imzalıdır***

**Prof. Dr. Esmâ KOZAN**

**Enstitü Müdürü**

# BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

14/06/2024

Elif ADAÇOĞLU

## ÖZET

### NONİLFENOL'ÜN SIĞIRLARDA SPERM MOTİLİTESİNE OLUMSUZ ETKİLERİNİN GLUTAMİN İLE GERİ ÇEVİRİLMESİ VE NONİLFENOL'ÜN SIĞIR EMBRİYOLARINA ETKİLERİ

Endokrin bozucular olarak bilinen bazı kimyasalların vücudun endokrin sistemi üzerinde zararlı etkileri olabilmektedir. Alkilfenol etoksilatların östrojen hormonunu taklit ederek endokrin sistemde bozulmalara neden olduğu gösterilmiştir. Hem su da hem de karada yaşayan canlılar için NF gibi türevlerinin çevrede rastlanan miktarlarının östrojenik, toksik ve karsinojenik etkileri olduğu bildirilmiştir. Nonilfenol'ün plastik şişelerden su içeriğine kadar sızdığı bulunmuştur. Çevresel kirleticilerin diğer türlerin yanı sıra insan üreme sistemine etkileri olduğu görülmektedir ve son yıllarda erkek üreme sistemi bozukluğundaki sıklığı artmaktadır. Nonilfenol'ün insanlar üzerinde erken embriyonik gelişmedeki zehirli etkilerinin çalışılması üzerine insan embriyonik kök hücrelerinde doza bağlı apoptoza neden olduğu belirtilmiştir. NF'nin birkaç organizma üzerinde yapılan çalışmada kronik, ağır ve zehirli özelliklerinin endokrin bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarda Glutamin'in kimyasallar üzerinde koruyucu etkisi olduğu görülmüştür. Bütün bu özelliklerden dolayı, bu çalışmanın konusu NF'nin fertilizasyon ve embriyo dönemindeki olumsuz etkilerinin olup olmadığını belirlenmiş ve Glutamin'in sperma üzerinde Nonilfenol'ün kimyasal etkisine koruyucu etki gösterip göstermediği çalışılmıştır. Bu tez çalışmasında 0,1; 10; 100 µg NF/ml konsantrasyonları seçilmiştir. NF'nin fertilizasyon ve embriyonik dönemdeki etkileri araştırılmıştır. 100 µg NF/ml ve 1; 5; 10 mM glutamin konsantrasyonları seçilmiştir. Bu tez çalışmasında çalışılan NF konsantrasyonlarında gelişme olmadığı görülmüştür ve NF'nin embriyo üzerinde olumsuz etkileri olduğu söylenebilir. Glutamin'in sperma üzerindeki Nonilfenol'ün olumsuz etkisini azalttığı görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Embriyo, glutamin, Nonilfenol, siğır

## SUMMARY

### REVERSAL OF THE ADVERSE EFFECTS OF NONYLPHENOL ON SPERM MOTILITY IN CATTLE BY GLUTAMINE AND THE EFFECTS OF NONYLPHENOL ON CATTLE EMBRYOS

Some chemicals known as endocrine disruptors can have harmful effects on the body's endocrine system. It has been shown that alkylphenol ethoxylates cause disruptions in the endocrine system by mimicking the estrogen hormone. It has been reported that the amounts of its derivatives such as NF found in the environment have estrogenic, toxic and carcinogenic effects on both aquatic and terrestrial creatures. Nonylphenol has been found to leach from plastic bottles into the water content. Environmental pollutants appear to have effects on the human reproductive system as well as other species, and the incidence of male reproductive system disorders has been increasing in recent years. Upon study of the toxic effects of NF on early embryonic development in humans, it was stated that it caused dose-dependent apoptosis in human embryonic stem cells. In studies conducted on several organisms, it has been reported that the chronic, severe and toxic properties of NF cause endocrine disruption. Studies have shown that glutamine has a protective effect on chemicals. Due to all these features, the subject of this study is to determine whether NF has negative effects during fertilization and embryo period and It was studied whether glutamine had a protective effect on the chemical effect of Nonylphenol on semen. In this thesis study, 0.1; 10; 100 $\mu$ q NF/ml concentrations of were chosen. The effects of NF on fertilization and embryonic periods have been investigated. Concentrations of 100  $\mu$ q NF/ml and 1, 5, 10 mM glutamine were selected. It was observed that there was no improvement in the NF concentrations studied in this thesis study, and it can be said that NF has negative effects on the embryo. It has been observed that Glutamine reduces the negative effect of Nonylphenol on semen.

**Key words:** Cattle, embriyo, glutamine, nonylphenol

## ÖNSÖZ

Tez konusunun belirlenmesinde yardımcı olan, çalışmalarım esnasında her türlü destek ve yardımı esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, danışman hocam Afyon Kocatepe Üniversitesi Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Cevdet UĞUZ'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda benden ilgi ve desteğini esirgemeyen, Laboratuvar çalışmalarım sırasında tecrübeleriyle bana yol gösteren ikinci tez danışmanım Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Sedat Hamdi KIZIL'a teşekkürlerimi sunarım. Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Prof. Dr. Ömer VARIŞLI desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım. Afyon Kocatepe Üniversitesi Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Prof. Dr. Metin ERDOĞAN, Prof Dr. Mine DOSAY AKBULUT, Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk LENGER ve Arş. Gör. Eda DEMİRTAŞ'a yüksek lisans sürecimdeki katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Tez laboratuvar çalışmam boyunca tecrübeleriyle yardımı esirgemeyen Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğr. Görevlisi Abdulkadir KAYA'ya teşekkür ederim. Yüksek lisans tez savunma komitesinde bulunan ve tezime katkı sağlayan sayın hocalarım jüri başkanı Prof Dr. Mine DOSAY AKBULUT, üye Prof. Dr. Cevdet UĞUZ ve üye Prof. Dr. Ömer VARIŞLI teşekkür ederim. Tez süresince desteğini esirgemeyen kardeşim Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğrencisi Semih ZENGİN'e ve aileme teşekkür ederim. Bu süreçte çalıştığım kurumda bana hep destek olan Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Nöroloji Sorumlu Hemşiresi Mehtap Atik'e teşekkür ederim. Yüksek lisans sürecimde bütün zorluklara benimle katlanan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen eşim Burak ADAÇOĞLU'na ve bu sürecin her anına hasretle, anlayışla tüm zorluklarına benden daha iyi göğüs gerebilen oğlum Mustafa ADAÇOĞLU'na çok teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESİMLER</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Nonilfenol .....	3
1.1.1. Nonilfenol'ün Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	3
1.1.2. Nonilfenol Çevresel Etkileri ve Kullanım Alanları .....	8
1.1.3. Nonilfenol'ün Toksik ve Karsinojenik Etkisi .....	10
1.1.4. Nonilfenol'ün Embriyonik Etkisi.....	11
1.1.5. Nonilfenol'ün Spermatazoa Üzerine Etkileri.....	12
1.1.6. Nonilfenol'ün Boğa Sperması ve Diğer Türler Üzerine Etkileri .....	13
1.2. Antioksidanlar.....	14
1.2.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları .....	15
1.2.2. Antioksidanların Nonilfenol Üzerine Etkileri.....	15
1.3. Glutamin .....	17
1.4. Sığırlarda İn Vitro Fertilizasyon .....	18
1.5. Tez Çalışmasının Konusu .....	19
<b>2. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>21</b>
2.2. Metot.....	21
2.2.1. Motilite Tayini (M) .....	24
2.2.2. Plazma Membran Bütünlüğü (PMB) .....	24
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>26</b>

<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>31</b>
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>34</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>36</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR

AFB	Alkilfenol Etoksilat Bileşikleri
AR	Akrozom reaksiyonu
BFA	Bisfenol A
BO	Brackett Oliphant
CAT D	Cathepsin D Aktivitesi
CR1aa	Charles Rosencrans 1 amino asit Kültür Mediumu
DES	Dietilstilbestrol
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDC	Endokrin Bozucu Kimyasallar
ER- $\alpha$	Östrojen Reseptörü Alpha
ETOH	Etanol
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
IU/ml	Ünite/mililitre
İn Vitro	Laboratuvar Ortamında
Km	Kilometre
M	Motilite
MCF7	Meme Kanseri Hücresi
mDC	Myeloid Dendritik Hücreler
mg/gün	Miligram/Gün
mg/kg/gün	Miligram/Kilogram/Gün
mg/L	Miligram/Litre
ml/kg	Mililitre/kilogram
mm	Milimetre
mM	MiliMol
m-PBS	Modifiye Fosfat buffer Solusyonu
MYR	Myricetin
NF	Nonilfenol
NFE	Nonilfenol Etoksilatlar
NPEO	Nonilfenol Polietoksilatlar
OF	Oktilfenol
PMB	Plazma Membran Bütünlüğü
Ppm	Milyonda bir birim
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
$\mu$ g/L	Mikrogram/Litre

$\mu\text{m}$   
 $\mu\text{g/ml}$

Mikrometre  
Mikrogram/Mililitre



## ŞEKİLLER

Şekil.1. 1: Nonilfenol kimyasal yapısı (Belibağlı ve Uysal, 2017). .....	4
Şekil.1. 2: Nonilfenol kimyasal sentezi(Vazquez-Duhalt vd., 2005). .....	5
Şekil.1. 3: Nonilfenol Etoksilatlar İçin Biyolojik Bozunma Yolu(Porter ve Hayden, 2002). .....	6
Şekil.1. 4: Yüzey aktif maddelerinn hidrofilik ve hidrofobik kısımları(Ecer, 2012). .....	7
Şekil.1. 5: Glutamin.....	17

## TABLÖLAR

Tablo.1. 1: Nonilfenol fiziksel ve kimyasal özellikleri(Belibagli ve Uysal, 2017).....	4
Tablo 2. 1: Çalışmada Kullanılan Gruplar ve Kimyasal Dozları .....	24
Tablo 3. 1: Grupların Motilite Tayini.....	28
Tablo 3. 2: Epididimal Boğa Spermına 100 µg/ml dozunda Nonilfenol ve Uygulanan Nonilfenolla Birlikte Farklı Dozlarda Glutamin Uygulamasının Spermatolojik Parametrelere Etkisi .....	30

## RESİMLER

Resim.1. 1: 17-estradiol / Nonilfenol (Alberts vd., 1983).....	5
Resim 2. 1: Ovaryum ve aspirasyonu.....	22
Resim 2. 2: Sığır oositlerinin morfolojik kalite sınıflandırması.....	22
Resim 2. 3: Kültür mediumu (CR1aa) dropları.....	23
Resim 3. 1: Mature oosit görüntüsü.....	26
Resim 3. 2: Kültürün 48. saatinde kontrol grubunda görülen dörde yarıklanma.....	27
Resim 3. 3: Kültürün 7. gününde kontrol grubunun görüntüsü.....	27
Resim 3. 4: Kontrol grubunda PMB incelenen ölü/canlı sperm görüntüsü.....	29
Resim 3. 5: 100 µg/ml Nonilfenol grubunda PMB incelenen ölü/canlı sperm görüntüsü.....	29
Resim 3. 6: 10 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol grubunda PMB incelenen ölü/canlı sperm görüntüsü.....	29

## 1. GİRİŞ

Hormonların algılandığı reseptörler ve saklandığı salgı bezleri canlılarda endokrin sistemi oluşturmaktadır. Hormonlar birer kimyasal haberci olarak vücut içerisinde hareket etmektedirler. Hormonlar hücre yüzeyinde bulunan karşı reseptörlere bağlanır ve biyokimyasal olarak hücrenin iç ve dış kimyasını değiştirirler (Şişe, 2011). Endüstriyel kimyasalların üretimi ve serbest bırakılması besin birikimi, toksik etkileri ve mekanizması gibi konuları akla getirmektedir ve dünya çapında artış göstermeye devam etmektedir (Jambor vd., 2018). Endokrin bozucular, endokrin sistemin gelişimini ve fonksiyonunu etkiler. Hormonların üzerinde salınım, üretim, taşınma, bağlanma, yıkım, aktivite ve vücuttan atılımları rolündedir. Bu maddeler, çevresel kirleticiler grubundadır (Yeşilkaya, 2008).

Nonilfenol (NF), polimer endüstrisinde kullanılan insanların sıklıkla kullandığı alanlarda çeşitli ürünlerde bulunan en önemli endokrin bozuculardır ve ksenoöstrojen olarak adlandırılan kimyasallar arasındadır. Endokrin bozucular geçici veya kalıcı etkilerle, insanlarda ve hayvanlarda iç hormonal dengeleri bozan bileşiklerin tümüdür (Zemheri ve Uğuz, 2018). Çevresel kirleticilerden olan bu kimyasalların birçoğu hormon benzeri etkidedir ve doğurganlığı, vücut gelişimini, hücre metabolizmasını hormon sistemini taklit ederek bozmaktadır (Ergün, 2013). İnsanlar, besin ve içme suyu ile büyük ölçüde NF'ye maruz kalırlar (Uğuz vd., 2003). Nonilfenol yaygın yüzeyel aktif maddelerde bulunur. Çevreye her türlü üründen sızar. Tekstil, plastik atıklar, su sistemleri, gıdalardaki katkı maddeleri, deterjanlar, kozmetik ürünler ve ilaç sanayisinde kullanılan kimyasallar, sigara dumanı, pestisitler, herbisitler gibi çok fazla üründe yer almaktadırlar (Abd-Elkareem vd., 2018; Gu vd., 2018). Nonilfenol oldukça hipotoksik bir madde olarak sınıflandırılmıştır (Abd-Elkareem vd., 2018). NF genelde çevrede yüksek yoğunlukta bulunmuyor olsa da herhangi bir kompartmanla ilişkilendirilebilir ve yüksek organik içerik ile karakterizedir (Lee vd., 2016). Çevresel kirleticilerin diğer türlerin yanı sıra insan üreme sistemine etkileri olduğu görülmektedir ve son 10 yılda, erkek üreme sistemi bozukluğundaki sıklığı artmaktadır (Jambor vd., 2018).

İnsanlarda endokrin bozucu bu kimyasallara maruziyet ile sperm sayısında azalma, meme ve testis kanserinin sıklığında artış, yardımcı üreme yöntemleri ile olan doğumlarda artış, erkek doğumlarda inmemiş testis gibi bozukluklarda artış olduğu bildirilmiştir (Carlsen vd., 1992; Toppari vd., 1996). Son zamanlarda, fetus ve çocuklarda yapılan araştırmalar, NF'nin merkezi sinir sistemine etki ettiği ve merkezi sinir sisteminde bozulmalara neden olabildiği için fazlasıyla ilgi görmektedir (Gu vd., 2018). Nonilfenol'ün karsinogenezler arasında uzun ve kısa süreli etkileri olduğu belirlendiği için insanlar ve diğer yaşam türlerinde DNA hasarına neden olduğunu söylenebilir (Tabassum vd.,2017).

Alkilfenolpolietoksilat bileşikleri (AFB) iyonik olmayan ve yüzey gerilimini azaltan katkı maddelerdir ve nonilfenol bir AFB türevidir. Çoğunlukla, evsel ve endüstriyel deterjanlarda, plastik eşyalarda, boyalarda, insektisitlerde, herbisitlerde, kozmetiklerde, kağıt ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. (Ahel vd., 1994) AFB'lerin dünyadaki yıllık üretimi toplamı 650.000 tonun üzerindedir. Bu miktarın % 60'ından fazla kısmının dere, göl, nehir ve deniz gibi sularda biriktiği bildirilmiştir. (Blankenship ve Coady, 2005) Hem su da hem de karada yaşayan canlılar için NF gibi türevlerinin çevrede rastlanan miktarlarının östrojenik, (Jobling ve Sumpter, 1993; Jobling vd.,1996; Cabaton vd., 2009) toksik (Gong ve Han, 2006; Gong vd., 2009) ve karsinojenik (Legler vd., 1999; Chiam vd., 2009) etkileri olduğu bildirilmiştir.

Uğuz vd. (2009), epididimal rat spermi üzerinde nonilfenol'ün etkisini incelediği çalışmalarında, NF'nin akrozomal bütünlüğü etkileyip bu nedenle sperm hareketliliğinde azalma, sperm fonksiyonlarının yok olması ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalmada önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir.

Li vd. (2017), yaptıkları çalışmada, NF'nin maruziyetinde ratların pankreası üzerinde etkileri, insülin sekresyonundaki etkileri, glukoz toleransındaki değişiklikler ve oksidatif stres üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığını araştırmışlardır. Bu çalışma, NF maruziyeti olan ratlarda mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve indüklenme adacık hücreleri apoptozundan dolayı pankreas hasarını gösteren deneysel kanıtlar sağlar. Buna karşılık, NF maruziyeti olan ratların pankreasındaki adacıkların boyutu

doza bağı olarak azaltılmış ve adacık boyutundaki azalma sekresyonda ve glukoz toleransının bozulmasında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir.

Sayed vd. (2017), çalışmalarında, balık fizyolojisi üzerinde 4-NF sebepli zararlı etkilerin ciddi krize neden olacak düzeylerde olmadığına bile su habitatı ile birlikte insanlarda öldürücü etkileri olduğunu bildirdi.

Tayvanda hamile kadınlar üzerinde yapılan bir kohort çalışmasında, idrar örneklerinde sırasıyla birinci, ikinci ve üçüncü trimesterde NF konsantrasyonlarının 4.27, 4.21, 4.10 olduğu görüldü (Liv vd., 2019).

Tabassum vd. (2017), yaptıkları çalışmada, yetişkin erkek ratlarda NF'nin rat beyindeki olumsuz etkileri ve iyileşmede melatoninin koruyucu rolünü, NF'nin maruziyetinin ürettiği nörotoksik etkileri ve davranışsal bozulma olduğunu göstermiştir. NF'nin indüklediği oksidatif stresin ratlarda toksikolojik bozulmaya katkıda bulunması, beyinde bilişsel fonksiyonların bozulmasının nihai sorumlusu olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada özetlenen mevcut sonuçlarla, melatoninin esasen NF kaynaklı nörotoksositeye karşı nöroprotektif bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir.

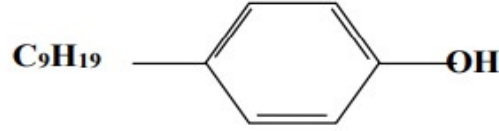
Ergün vd. (2013), sığır spermelerinde nonilfenol'ün etkisini görmek amacıyla yaptıkları çalışmada, kontrol grubuna göre 100 µg NF /ml konsantrasyonu grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu, sığır sperm hücrelerinde 100 µg NF/ml konsantrasyonu grubunun DNA kırılmalarına yol açarak apoptoza neden olduğunu bildirmişlerdir.

## **1.1. Nonilfenol**

### **1.1.1. Nonilfenol'ün Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri**

Hidrofob bir bileşik olan nonilfenol, bir hidroksil grubu ve yan pozisyonda doğrusal nonil zincire sahip olan fenol halkasından oluşur (Buitron vd. 2015). NPEO'nun yapısında olan hidrofilik (etoksilat) ve hidrofobik (alkilbenzen) durum, üstün sürfaktan özellikleri olan bir kimyasal olduğunu göstermektedir (Kassim ve Simoneit, 1993; Tai, 2000). Lipofilik ve toksik olan nonilfenol, ana bileşiklerden daha kalıcıdır ve monoetoksilat ve nonilfenol dietoksilat, NFEO'ların bozunumuyla üretilir (Belibağı ve

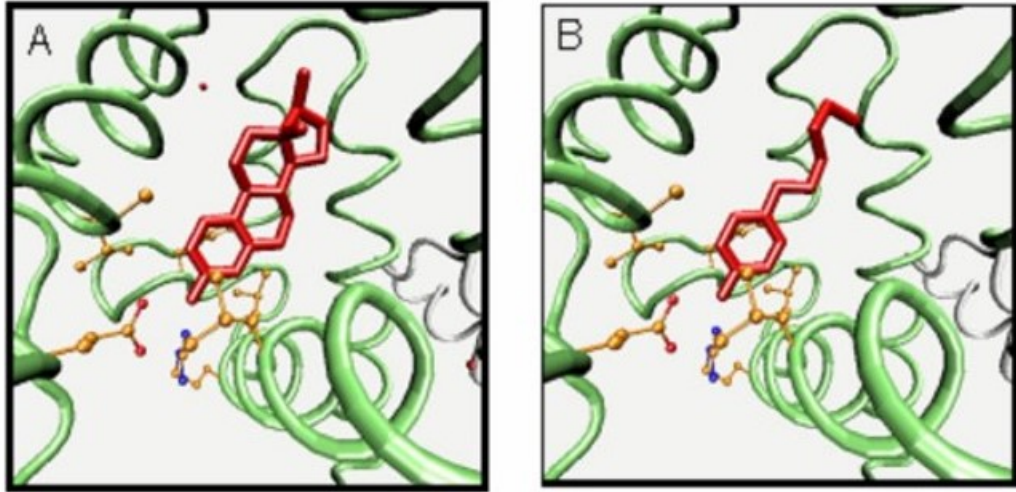
Uysal, 2017). Nonilfenol polietoksilatların (NFE) parçalanmasıyla oluşan nonilfenol, alkilfenollerin büyük bir kısmını oluşturan organik bileşiklerdir. Nonilfenol merkezinde aromatik halka, halkaya bağlı olan dokuz karbonlu (C) yan zincir ve bu zincirin karşısında hidroksil grubunun (OH) olduğu bileşiklerin en iyi bilinenidir (Akyüz vd., 2011).



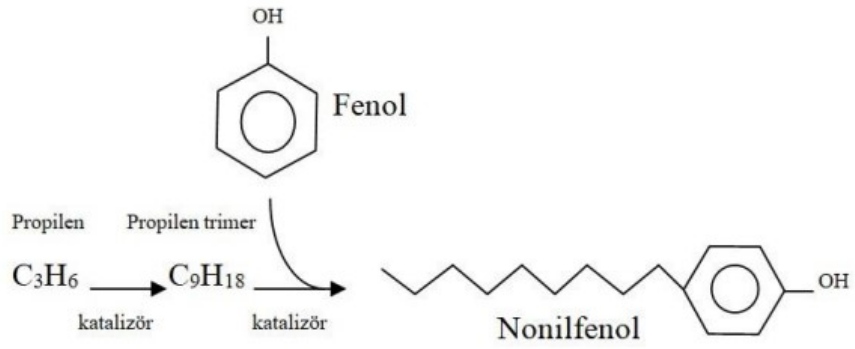
**Şekil.1. 1:** Nonilfenol kimyasal yapısı (Belibağlı ve Uysal, 2017).

**Tablo.1. 1:** Nonilfenol fiziksel ve kimyasal özellikleri (Belibağlı ve Uysal, 2017).

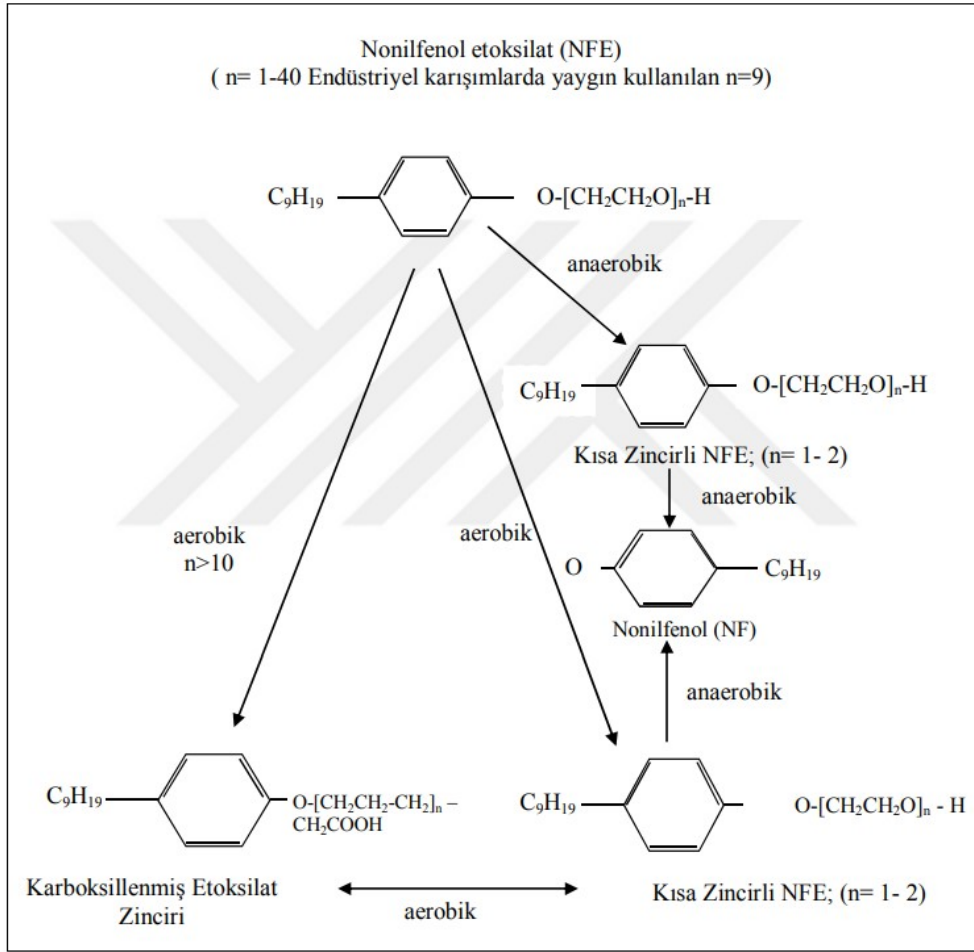
<b>Moleküler Formülü</b>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
<b>Moleküler Ağırlığı</b>	220,34 g/mol
<b>Fiziksel Durumu</b>	Renksiz veya açık sarı yapışkan sıvı
<b>Erime Noktası</b>	-8 °C
<b>Kaynama Noktası</b>	290 – 300 °C
<b>Yoğunluk</b>	0,952 g/cm <sup>3</sup>
<b>pKa</b>	10,28
<b>Buhar Basıncı</b>	0,3 Pa (25 °C)
<b>log K<sub>ow</sub></b>	4,48
<b>Alevlenme Noktası</b>	141 – 155 °C
<b>Viskozite</b>	2,500 mPa (25 °C)
<b>Suda Çözünürlük</b>	4,9 mg/L



**Resim.1. 1:** 17-estradiol / Nonilfenol (Alberts vd., 1983).

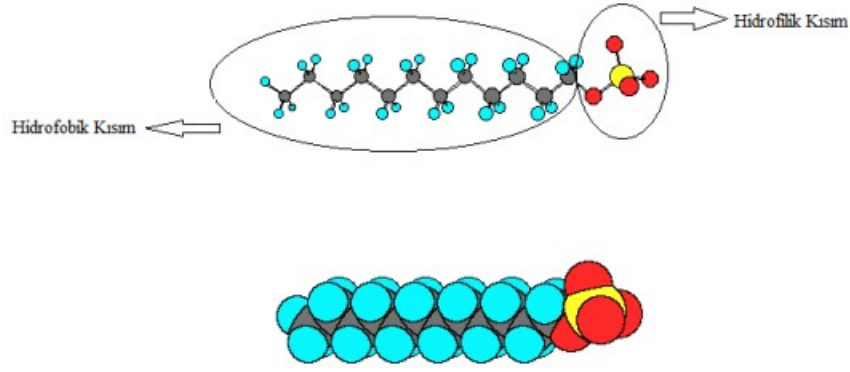


**Şekil.1. 2:** Nonilfenol kimyasal sentezi (Vazquez-Duhalt vd., 2005).



**Şekil.1. 3:** Nonilfenol Etoksilatlar İçin Biyolojik Bozunma Yolu (Porter ve Hayden, 2002).

Nonilfenol, dimetilsülfoksit (DMSO) ve etanol gibi çözücülerle iyi çözünür ve 6 mg/L (pH 7) sudaki çözünürlüğüdür. Nonilfenol'ün canlılarda, uzun yarılanma ömrü ve hidrofobikliğisebebiyle bir dizi toksik etki gösterdiği bilinmektedir. Pankreasında içinde olduğu çeşitli organlara zarar ve erkek üremesini etkilediği bildirilmiştir (Zemheri ve Uğuz, 2018). NFE'ler düşük sıcaklıklar için uygun ve ucuz, az yanıcı, iyonik olmayan yüzey temizleyici kimyasallardandır. Bir ucu NFE molekülünün hidrofilik "su çekme" ve diğer ucu hidrofobik "sudan kaçınma" özelliğindedir. NFE'lerin yüzey temizleyicisi olarak kullanılmasının bir nedeni aynı anda içerdiği hidrofilik ve hidrofobik özelliğidir (Canada, 2002).



**Şekil.1. 4:** Yüzey aktif maddelerin hidrofilik ve hidrofobik kısımları (Ecer, 2012).

NF'nin aşağıda verildiği gibi yapılan araştırmalar sonucundafarklı hücrelerin düzenleyici sistemlerine müdahale ettiği bildirilmiştir.

- Mitokondrinin zar geçirgenliğini değiştirip hücrelerin solunum toksisitesini tetikleme; EC50 1.8 mg/L,
- İstirahat halinde sarkoplazmik retikuluma iskelet kası hücrelerinin aktif kalsiyum taşınmasını olumsuz şekilde etkilemesi; IC50 880-2420 mg/L,
- Diğer endokrin bozucu maddelerin aksine apoptozise neden olması ve farelerde sinir kök hücrelerinin farklılaşmasını ve büyümesini inhibe etmesi; etkili konsantrasyon660 mg/L,
- Meme bezi hücrelerinin 0.01 mg/gün maruz kalma konsantrasyonlarında çoğalmasının artması,
- Olgunlaşmamış yapıları olgun yapılara dönüştürerek hücre döngüsü kinetiğini değiştirmesi,
- Kromozomal sapmalar ve telemetrik ilişkiler üretmesi (Belibağlı ve Uysal, 2017).

Laboratuar çalışmaları ve literatürler, özellikle nonilfenol ve alkilfenollerin canlı dokularda biyolojik birikime sebep olduğunu göstermektedir (Zemheri, 2011).

Kim vd. (2006), yaptıkları çalışmada, OF ve NF'nin zehirli etkilerini, insanlarda erken embriyonik gelişme üzerinde çalışmışlar ve doza bağlı insan embriyonik kök hücrelerinde apoptoza neden olduğunu belirtmişlerdir.

İn vivo ve in vitro biyoanalizlerinde testi yapılan birkaç organizma üzerinde OF ve NF'nin zehirli, kronik ve ağır özelliklerinin endokrin bozulmasına sebep olduğunu bildirmişlerdir (Boyacıoğlu vd., 2007).

Vivacqua vd. (2003), yaptıkları çalışmada, Bisfenol-A ve nonilfenol'ün östrojen reseptörü alpha (ER- $\alpha$ )'yi noniyonik yüzey aktif madde ürünlerine parçalanıp aktive ettiğini ve östrojen bağımlı gen ekspresyonuna neden olarak östrojene duyarlı olan meme kanseri hücreleri (MCF7)'nin büyümesini uyardıklarını belirtmiştir.

Hung vd. (2009), çalışmalarında, endokrin bozucuların, çevre ile alakalı bağışıklık sistemi düzenleyici etkiye sahip hücre tipi olan insan dendritik hücrelerinin fonksiyonlarını düzenleyebilmesi hipotezini araştırmışlardır. Bunun sonucunda NF ve OF'nin mDC (miyeloid dendritik hücreler)'lerde bulunan östrojen reseptörlerinde, histon modifikasyonlarında ve MKK3/6-p38 MAPK sinyal yollarında t-hücrelerindeki sitokin cevapları üzerinde fonksiyonel etkiler gösterdiğini belirtmişlerdir.

### **1.1.2. Nonilfenol Çevresel Etkileri ve Kullanım Alanları**

Alkilfenol etoksilatlar, bazı çamaşır deterjanlarına, dezenfektanlara, leke çıkarıcılara ve yağ çözücülere eklenen yüzey aktif maddelerdir. Alkilfenol etoksilatların östrojen hormonunu taklit ederek endokrin sistemde bozulmalara neden olduğu gösterilmiştir. Alkilfenol etoksilatların sudaki varlığı, suda yaşayan hayvanların üremesini ve hayatta kalmasını etkilediği bildirilmiştir (Satar, 2022).

Nonilfenol'ün plastik şişeler içerisinde bulunan su içeriğine kadar sızdığı bildirilmiştir. Ayrıca, atıksu arıtma tesislerinde bulunan atık sular çevredeki nonilfenol'ün ana kaynağıdır. Endokrin bozucu kimyasal olarak kabul edilen NF'nin Avrupa Birliği'nde kullanımları insan ve çevre sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı yasaklanmıştır (Pashı, 2022).

Endokrin bozucular olarak bilinen bazı kimyasalların vücudun endokrin sistemi üzerinde zararlı etkileri olabilmektedir. Hormonlar farklı miktarlarda ve zamanlarda gelişim, büyüme, üreme, metabolizma ve bağışıklığın düzenlenmesi için salgılanmaktadır. Endokrin bozucular doğal hormon sistemlerine etki eder ve sağlık üzerindeki etkileri, maruziyet sona erdikten çok sonra bile devam etmektedir. Endokrin bozuculara maruz kalmanın yaşam boyu etkileri ve hatta gelecek nesiller için bile sonuçları olabileceği bildirilmiştir (Monneret, 2017).

NFEO'ların büyük miktarı temizlik ürünlerinde özellikle de deterjanlarda kullanılmaktadır. 2004 yılında kullanılan 260 milyon poundluk Nonilfenol'ün %80'nin yüzey aktif madde olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Genel olarak NFEO metabolitlerinin %37'si su ekosistemine girmektedir. Bu verilere göre 2004 yılında yaklaşık 77 milyon poundluk NFEO bazlı temizlik maddesinin ABD su yollarına girdiği bildirilmiştir. 1997 yılı AB risk değerlendirmesine göre AB'nin NF üretimi 73.500 ton olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. 1997 yılında Avrupa'da yaklaşık 78.500 ton NF kullanılmıştır ve çoğu Avrupa'da üretilmiştir. NF neredeyse yalnızca bir ara madde olarak kullanılır. Diğer kimyasalların üretimi, bunların yaklaşık %60'ı (47.000 ton) NFEO yapımında ve geri kalanı diğer NF türevlerini yapmak için kullanılmaktadır. NFEO'nun AB üretimi aynı şekilde 1997'de 118.000 ton olduğu tahmin edilmektedir. Yaklaşık 77.600 ton NFEO 1997 yılında Avrupa'da kullanılmaya başlanmıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada NF seviyeleri İsviçre'deki Glatt Nehri'nde yaklaşık 0,1-0,3 µg/l ölçülmüştür. Kanalizasyon arıtma tesisinden 1 km uzaklıktaki bir Finlandiya gölünde yaklaşık 0,1-0,8 µg/L civarında NF seviyeleri ölçülmüştür (Gençel, 2011).

Yapılan bir çalışmada, önemli lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres nonilfenol'e maruziyeti olan balık karaciğer hücreleri ve spermaların ortak sonucu olduğu bulunmuştur (Paslı, 2022).

Tanghe vd. (1998), yaptıkları çalışmada, aktif çamurda olan nonilfenol gideriminin anoksik bölgelerin olmasına fazlasıyla bağımlı olduğu, sıcaklık ve havalandırmanın nonilfenol'ün bozunumu için temel faktörlerden biri olduğu bildirilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda, anoksik, aerobik ve anaerobik koşullar altında olanoksijenin, nonilfenollerin tamamen mineralizasyonu için önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir.

Nonilfenol, ortalama bir buharlaşmaya sahip olması ile havadaki konsantrasyonlarının çoğunlukla düşük olması istenir fakat yapılan araştırmalar buharlaşmanın fazla olduğu bazı bölgelerin olduğunu göstermiştir ve atmosferik NF konsantrasyonlarının artmış olduğu tespit edilmiştir (Belibağlı ve Uysal, 2017).

### **1.1.3. Nonilfenol'ün Toksik ve Karsinojenik Etkisi**

Toksik bir ksenobiyotik bileşik olan NF'nin çok sayıda organizmanın hormonal sistemine müdahale ederek üreme gelişimini etkilediği bildirilmiştir (Lee vd., 2017).

İnsanlar üzerinde NF'ye maruziyetin değerlendirilmesi güç olsa da toksik etkilerin süt ve et, sebze ekinleri, arıtılmamış içme suyu gibi gıda maddeleriyle olan temastan sonra veya mesleki maruziyet esnasında ortaya çıkması beklenmektedir (Shan vd., 2011). Nonilfenol'ün kandaki yarılanma ömrünün insan vücuduna girdikten sonra, 2 veya 3 saat olduğu bilinmektedir. Metabolizma içerisine alınan NF'nin dışkı ve idrarda yaklaşık %10' unun bulunması, gastrointestinal sistemde emildiğini göstermektedir (Muller vd., 1998).

Hayvanlarda yapılan bazı çalışmalarda endokrin bozucuların özellikle meme, prostat, testis, over ve tiroid gibi endokrin duyarlı dokularda kanserojen aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. Endokrin bozucular çeşitli reseptörlerle etkileşime girerek (östrojen reseptörleri, retinoid reseptörler vb.), DNA metilasyonu veya asetilasyonu ve histon modifikasyonları gibi genetik ve epigenetik değişiklikler ile ya da serbest radikaller aracılığıyla kanserojen etkide bulunabilirler (Bozucular vd., 2023).

Vivacqua vd. (2003), yaptıkları çalışmada, Bisfenol-A ve Nonilfenol'ün östrojen reseptörü alpha (ER- $\alpha$ )'yi noniyonik yüzey aktif madde ürünlerine parçalayıp aktive ettiğini ve östrojen bağımlı gen ekspresyonuna neden olarak östrojene duyarlı olan meme kanseri hücreleri (MCF7)'nin büyümesine sebep olduğunu belirtmiştir.

Hung vd. (2009), çalışmalarında, endokrin bozucuların, çevre ile bağlantılı bağışıklık sistemi düzenleyici etkiye sahip hücre tipi olan insan dendritik hücrelerinin fonksiyonlarını düzenleyebilmesi hipotezini araştırmışlardır. Bunun sonucunda NF ve OF'nin mDC (miyeloid dendritik hücreler)'lerde bulunan östrojen reseptörlerinde,

histon modifikasyonlarında ve MKK3/6-p38 MAPK sinyal yollarında t-hücrelerindeki sitokin cevapları üzerinde fonksiyonel etkiler gösterdiğini belirtmişlerdir.

Nonilfenol bileşiklerinin östrojenik etkisi, insan meme kanser hücrelerinde yapılan deneylerde göstermiştir ki, bu meme kanseri hücrelerinde belirgin oranda çoğalmaya sebebiyet verdiği bildirilmiştir. Tüm östrojen reseptörlerinin, doğada bulunan tavuk embriyosu, alabalık, fare gibi çeşitli canlıların meme hücreleri üzerinde yapılan araştırmalarda da alkilfenollere yanıtı olduğu gözlenmiştir (Ömeroğlu vd., 2011). Nonilfenollü bileşiklerin erkek tavşanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada sperm üretimi üzerinde östrojenik etkisine bakılmıştır. Erkek tavşanların derisine 2 mL/kg'lık dozda %25'lik kalsiyum alkil fenat uygulandığında, 4 hafta sonra sperm üretimin durduğu bildirilmiştir (Hewstone, 1994).

Endokrin bozucuların, prostat kanserinin oluşması ve gelişmesinde hormon etkisinde değişikliğe neden olarak önemli ölçüde biyolojik etkide bulunduğu belirtilmiştir (Hess-wilson ve Knudsen, 2006).

Jubendradass vd. (2012), yaptıkları çalışmada, ratlarda NF'nin hem Fas ve Fas-1 yoluyla hem de mitokondriye bağlı olarak karaciğere zarar verip apoptoza neden olduğunu belirtmişlerdir.

#### **1.1.4. Nonilfenol'ün Embriyonik Etkisi**

İşcan vd. (2005), Nonilfenol'ün balıklarda östrojenik aktivitesinin vitellojenin (yumurta oluşumundaki öncü protein) artması ile ilişkilendirildiğini bildirmişlerdir.

NF'nin, yüksek konsantrasyonlarda dişi balıklarda fertilitiyi azalttığı, balıklarda nonilfenol maruziyetinden 28 gün sonra üremede azalma olduğu ve testis yapısında bozulmaya neden olduğu bildirilmiştir (Kinnberg vd., 2000).

Arslan vd. (2007), yaptıkları çalışmada denizkestanesi türü olarak bilinen *Paracentrotus lividus* gamet ve embriyolarında, sperm ve yumurtaları 0,937- 18,74 µg/L konsantrasyon aralığında NF ve 5-160 µg/L konsantrasyon aralığında OF'ye maruz bırakarak mitotik aktivitedeki morfolojik değişim, şekil bozuklukları, sperm kalitesi, gelişim geriliği, embriyonik ve larval ölüm, fertilizasyon başarısı oranları incelenmiştir.

Kontamine spermlerin oluşturmuş olduğu larvaların iskelet yapısında şekil bozukluklarında artış görülmüş ve fertilizasyon başarısına bakıldığında yaklaşık %20 oranında azalma olduğu bildirilmiştir. Bu türde Nonilfenol'ün genotoksik ve embriyotoksik konsantrasyonları 0,937 µg/L, OF için 4,685 µg/L olarak bildirilmiştir.

Nice vd. (2000) Nonilfenol'ün *Crassostrea gigas* larva gelişimine etkisini incelemek amacıyla yaptığı çalışmada, larvalar 0,1; 1; 10; 100; 1000 ve 10000 µg/L konsantrasyonlarında NF'ye maruz bırakılmıştır. 10000 µg/L konsantrasyonunda verilen NF'nin *Crassostrea gigas* larva gelişimini geciktirici etki gösterdiği ve kabuk deformasyonunda artışa neden olduğu bildirilmiştir.

NF, BFA ve 17β-östrodiol'un sucul çevredeki *Xenopus laevis*'in embriyo gelişimine etkileri incelenmiştir. Embriyolar üzerinde 96 saat 20 µM NF, BFA ve 10 µM 17β-östrodiol maruziyetiyle normalden küçük başlılık, eğrilik, ödem, anormal mide kıvrılması ve kısa vücut uzunluğunun uyarıldığı görülmüştür. Özellikle gelişimin erken dönemlerinde Bisfenol-A, geç dönemlerinde ise nonilfenol dozlarının etkili olduğu bildirilmiştir (Sone vd., 2004).

#### **1.1.5. Nonilfenol'ün Spermatazoa Üzerine Etkileri**

Hossaini vd. (2001), ratlara Nonilfenol'ün potansiyel üreme toksisitesini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 11. günden başlayarak 18. güne kadar 30 mg/kg/gün dozunda dietilstilbestrol (DES) ve 3, 15 ve 75 mg/kg/gün dozlarda Nonilfenol uygulanmıştır. Erkek yavruların NF verilen grupta vücut ağırlıklarının, sağ epididimisin mutlak ağırlığının, yenidoğan ağırlıklarının ve 110 günlük hareketli sperm yüzdesinin azaldığı bildirilmiştir. Erkek ratlar üzerinde özellikle epididimal ağırlıktaki azalmayla ilişkili NF'nin 15 ve 75 mg/kg/gün dozlarının üreme gelişiminde etkisi olduğu bildirilmiştir.

Nonilfenol'ün 25 ppm ve üzerinde kullanılan dozlarının, erkek ratlarda yüksek oranda dişileşmeye neden olduğu, Nonilfenol dozlarının testosteron sentezinde olan enzimlerin aktivitesini engellediği ve bu mekanizmada çeşitli etkilere sahip olduğu bunun başlıca nedeni olarak rapor edilmiştir (Laurenzana vd., 2002).

Yapılan çalışmalarda, ratlarda (Uğuz vd., 2009), sığırlarda (Lukac vd., 2013; Uguz vd., 2014a), ve koçlarda (Uğuz vd., 2014b) Nonilfenol'ün akrozom reaksiyonunu tetiklediği vesperm motilitesini azalttığı rapor edilmiştir.

Karafakioğu vd. (2007), yaptıkları çalışmada, Nonilfenol rat böbrek ve testis dokusunda, lipid peroksidasyonu indükleyici özellikte bir etki meydana getirdiğini belirtmiştir. Uygulanan dozda taurinin bir antioksidan olarak koruyucu amaçla uygulanmasının, böbrek dokusunda lipid peroksidasyonunun gelişimini tam olarak önleyemediği, testis dokusunda ise nonilfenol tarafından induklenmiş oksidatif stresin azaltılmasında etkili olabileceği bildirmişlerdir.

Özarslan (2020), yaptığı çalışmada, kimyasal bir ajan olan Nonilfenol'ün testis dokusunda hasar oluşturduğu, seminifer tübüllerde spermatogenezini bozduğu, sperm motilitesini, kalitesini, sayısını etkilediği, fonksiyonel değişikliklere sebep olarak fertilizasyonu etkilediğini belirtmiştir.

#### **1.1.6. Nonilfenol'ün Boğa Spermı ve Diğer Türler Üzerine Etkileri**

Nonilfenol'ün biyolojik olarak vücutta biriktiği yapılan araştırmalarla belirtilmiş ve farklı NP konsantrasyonlarının toksik etkileri olduğu istiridye gametleri ve deniz kestanesi embriyo gelişimi üzerinde bildirilmiştir. Suda yaşayan omurgasızlarda, balık ve amfibiler gibi bazı omurgalılarda yapılan bazı çalışmalarda östrojenik bileşiklerin çeşitli olumsuz üreme sonuçlarına neden olabileceği bildirilmiştir. Endokrin bozucuların erkeklerde sperm sayısındaki düşümlere neden olduğu ve memeli üremesi üzerindeki olumsuz etkileri olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Uğuz vd., 2009).

Uğuz vd. (2009), rat spermı ile yaptıkları çalışmada, ETOH veya DMSO ile çözülmüş NF'nin çeşitli konsantrasyonlarına (1, 10, 100, 250 ve 500 µg/ml) maruz bırakıldıktan sonra rat sperm hareketliliği üzerinde 250 µg/ml NF konsantrasyonunda anlamlı ölçüde azalma olduğunu bildirmiştir. Rat sperm mitokondriyal membran potansiyeli üzerinde 1 ve 4 saat sürelerinde incelendiğinde ETOH içinde çözülmüş 100 ve 250 µg/ml NF ve DMSO ile çözülmüş 250 µg/ml NF ile inkubasyonunda önemli ölçüde azalma olduğunu bildirmiştir. Rat sperm akrozomal bütünlüğü üzerinde 4 saat maruziyet sonrası önemli ölçüde akrozomal reaksiyon ile sonuçlandığını bildirmiştir.

Çevresel toksik bir madde olan nonilfenol, erkek üreme sistemini çeşitli düzeylerde etkilemektedir. Testis epididimde ve yapısında hasara neden olduğu bilinen nonilfenol spermatogenezi etkileyerek sperm kalitesinin kaybına, spermelerin miktarının, hareketliliğinin ve canlılığının azalmasına neden olur. (Bistáková vd., 2016)

Bistáková vd. (2016), yaptıkları çalışmada, kısa süreli in vitro yetiştirme sırasında çeşitli NP konsantrasyonlarının sıgır sperma motilitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Sonuç olarak, yüksek nonilfenol konsantrasyonlarının spermatozoanın genel ve ilerleyici hareketliliği üzerindeki olumsuz etkisini bildirmiştir.

Uguz vd. (2014), yaptıkları çalışmada, Nonilfenol'ün dondurulmuş-çözündürülmüş boğa sperması üzerine etkisini değerlendirmiştir. Sperma örnekleri Ethanol veya DMSO içerisinde farklı NF konsantrasyonlarında (1, 10, 100, 250 ve 500 µg/ml) çözündürülerek 4 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 0., 1., 2., 3. ve 4. saatlerinde sperm parametrelerini değerlendirmiştir. 250 µg/ml ve 500 µg/ml NF dozlarındaki gruplarda hem motilite ve hem de mitokondrial membran potansiyelinin önemli derecede düştüğünü bildirmiştir.

## **1.2. Antioksidanlar**

Serbest radikaller, oksidatif reaksiyonlar sonucunda protein, lipid ve nükleik asitler gibi vücutta bulunan bileşiklere zarar vererek birçok biyolojik sorunlara neden olmaktadır. Serbest radikallerin canlı vücutunda artmasıyla hücre hasarları meydana gelebilir ve sağlık açısından önemli sorunlar oluşturma potansiyeline sahiptir (Karabulut ve Gülay, 2016).

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta görev yapan savunma mekanizmalarıdır (Akkaya ve Yanardağ, 2010). Serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturan antioksidanlar, serbest radikallere uygun elektronun bağlanmasını sağlayarak stabil yapı oluşumunu sağlar (Karabulut ve Gülay, 2016). Antioksidan diğer moleküllerin oksidasyonunu engelleme yeteneğine sahip bir moleküldür (Gülçin, 2020). Serbest radikaller normal hücre metabolizmasının toksik bir yan ürünüdür. Antioksidanlar serbest radikalleri etkisiz hale getirerek koruyucu etki gösterirler. Radikallerle oldukça

hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon/ peroksidasyonun ilerlemesini önler. Serbest radikallerin fazlasını etkisizleştirmek, serbest radikallerin toksik etkilerine karşı hücreleri korumak ve hastalıkları önlemede katkı sağlamak antioksidanların rolleri arasında sayılabilir (Karabulut ve Gülay, 2016).

### **1.2.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları**

- 1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek tutar veya daha zayıf yeni moleküle çevirerek toplayıcı etki gösterirler.
- 2) Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen ekleyip aktivitelerini azaltarak veya inaktif şekle dönüştürerek bastırıcı etki gösterir.
- 3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyerek zincir kırıcı etki gösterir.
- 4) Serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı onararak onarıcı etki gösterir.
- 5) Oksidasyon reaksiyonlarını durdurarak, hücresel kinaz kayıplarını önleme etkisi gösterir.
- 6) SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini artırarak enzimatik etki gösterir (Aydemir ve Sarı, 2009).

### **1.2.2. Antioksidanların Nonilfenol Üzerine Etkileri**

Nonilfenol'ün neden olduğu testis hasarına karşı Myricetin (MYR)'nin iyileştirici etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada Myricetin'in, Nonülfenol'ün neden olduğu hasarları önemli oranda ortadan kaldırdığı bildirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, MYR'nin NF kaynaklı testislerdeki hasarı ve oksidatif stresi anlamlı şekilde hafifletebileceğini göstermektedir (Ijaz vd., 2020).

Karafakıoğlu vd. (2007), rat testis dokusunda yaptıkları çalışmada NF'nin lipid peroksidasyonu indükleyici özellikte bir etkisi olduğunu, uygulanan dozlarda uygulanan taurinin bir antioksidan olarak kullanılmasının testis dokusunda nonilfenol kaynaklı indüklenen oksidatif stresin azalmasında etkili olduğunu bildirmiştir.

2 µg/mL araşidonik asit ve çok sayıda farklı miktarlarda kullanılan yağlar ile yapılan çalışmada bu yağ asitlerinin spermin döllenebilme yeteneğinin artırılması ve sürdürülebilmesi için spermin doğrusal hareketliliğine etki etme ve bu durumu

sürdürebilme konusunda olumlu etkisi olduğu bildirildi. Spermin tohumlama ortamında doymuş yağ asitleri ile çözülmesinin, döllenmeye olumlu etki ederek kadın genital kanalındaki bulunan spermin doğrusal hareketliliğini artırmasına etkisi olabileceği bildirildi (Islam vd., 2021).

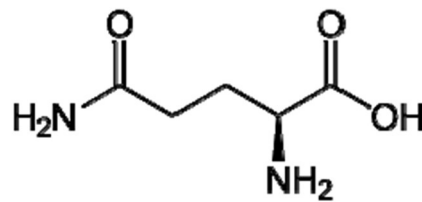
Hossain vd. (2007), Yaptıkları çalışmada, linoleik ve oleik asidin domuz spermasının hareketliliğini ve canlılığını olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir. Tüm inkübasyon dönemlerinde araşidonik asit ve oleik asidin Akrozom reaksiyonunu (AR) anlamlı ölçüde iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Canlılık, hareketlilik ve AR açısından linoleik, oleik ve araşidonik asit kombinasyonları incelendiğinde, oleik ile linoleik asidin hareketliliği anlamlı bir şekilde arttırdığı ve araşidonik ile oleik asidin AR'yi yüksek oranda arttırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, doymamış yağ asitlerinin, özellikle araşidonik asidin domuz sperm hareketliliği ve AR'yi yüksek oranda geliştirebileceğini düşünerek araşidonik ile oleik asit kombinasyonunun domuz spermi AR'sini indüklemek için önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Antioksidanların, çok miktarda olumsuz etkisi olan kimyasalın sperma üzerindeki etkisini azaltmakta faydalı olduğu bilinmektedir. Rat epididimal sperması üzerinde yapılan çalışmada, spermanın kısa süreli saklanması süresince, zamana bağlı olarak spermatolojik parametreler içerisinde motilite, anormal sperma oranındaki değişimler ve bu değişimler üzerine karnitinin etkilerine bakıldı. Her iki saklama sıcaklığında da sadece tris ile sulandırılmış gruplara kıyasla karnitin katılan gruplarda motilitenin anlamlı ölçüde iyi korunduğu saptanmıştır. Karnitinin önemli bir antioksidan özellikte madde olduğu, saklama süresi boyunca şekillenen lipid peroksidasyonuna karşı antioksidatif özellik gösterdiği düşünüldü. Çalışma içerisindeki karnitin kullanılan gruplarda motilitenin sadece tris ile sulandırılmış olan gruplarla kıyaslandığında daha iyi korunmuş olması da antioksidanların ROS oluşumunu engellemesi veya yok etmesi ile sperm plazma membranında bulunan lipidlerin korunması ve bundan dolayı spermin motilite ve canlılığının muhafaza edilmesini sağladığını göstermektedir. Karnitinin kullanılmış olduğu boğa sperminin dondurulup çözülmesi sonrasında motilitede olumlu etki gösterdiğini bildiren çalışma ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Rat epididimal sperması üzerinde iki farklı saklama sıcaklığında saklama süresinin ilerlemesi ile zamana bağlı baş, kuyruk anomalileri ve toplam anormallik oranında artış

gösterdiği, sadece tris ile sulandırılmış olan gruplara kıyasla karnitin ilave edilmiş gruplarda istatistiksel açıdan önemli ölçüde koruyucu etki gösterdiği ve 37 °C' ye kıyasla 4°C'de normal morfolojik yapı bütünlüğünün daha iyi korunduğu tespit edilmiştir (Yeşil ve Sarıözkan, 2019).

### 1.3. Glutamin

Glutamin, protein sentezinde öncü, metabolizmada bol miktarda bulunan ve standart genetik kodlarımızın şifrelendiği 20 amino asitten biridir. Amid grubu içerir ve glutamik asit ile amonyağın reaksiyonu sonucu elde edilir (Akkaya ve Yanardağ, 2010). Glutamin iki amino asitten oluşan beş karbonlu (Hall vd., 1996) memeli plazmasında en çok bulunan amino asittir. Hemen hemen her dokuda aktif olarak taşınır ve metabolize edilir. Glutamin vücudun normalde büyük glutamin rezervleri olmasına rağmen büyük miktarlarda yeniden sentezlenebildiği için “şartlı esansiyel” bir amino asit olarak tanımlanmıştır. Glutamin kanda ve dokularda bol miktarda bulunur, aynı zamanda hızla tüketilir. Glutamin farklı dokularda ve farklı fizyolojik koşullar altında çeşitli şekillerde kullanılır. Nitrojen taşınmasındaki rolü, hücrel redoks durumunun sürdürülmesi, metabolik olarak konumu ve enerji kaynağı olarak rolü hücre içindeki fonksiyonlarıdır (Labow ve Souba, 2000). Glutaminin bir 'nitrojen mekiği' olarak rolü, Vücudu yüksek maddelerin toksik etkilerine karşı korur (Hall vd., 1996).



Şekil.1. 5: Glutamin

Bucak vd. (2008), yaptıkları çalışmada dondurulmuş koç spermasının sperm özellikleri üzerine antioksidanların etkisini değerlendirmiştir. Dondurucu genişleticinin 2,5 mM glutamin ile eklenmesinin ardından hareketlilik ve HOST açısından önemli bir fark gözlenmemesinin yanı sıra 5 mM glutamin ile desteklenen bir dondurma genişletici, daha yüksek bir hareketliliğe yol açmıştır. Çözdürülmüş koç spermasında

antioksidanların lipit peroksidasyonu ve antioksidan aktiviteler üzerindeki etkilerine bakıldığında CAT aktivitesi, diğer tedavilerle karşılaştırıldığında 5 mM glutamin ilavesinin ardından önemli ölçüde yüksek olduğu bildirilmiştir.

5 mM Glutaminin kriyoprotektif bir etki sağladığı, kontrole kıyasla koç spermasının çözülme sonrası hareketliliğini ve membran bütünlüğünü iyileştirdiği gibi CAT aktivitesini de önemli ölçüde yükselttiğini bildirmiştir. Sperm sulandırıcılara glutamin (5 mM) takviyesinin, dondurulmuş-çözülmüş koç spermine daha fazla fayda sağladığını bildirmiştir.

#### **1.4.Sığırlarda İn Vitro Fertilizasyon**

İn vitro fertilizasyon (ivf), dişi genital organ dışında olgunya da olgunlaştırılan oositlerin, kapasitasyona uğramış ya da uğratılmış spermatozoitlerle birleşerek fertilize olması ile embriyo oluşumu ve akabinde uygun bulunan alıcı veya alıcılara gelişmiş dönemde olan embriyoların transferi veya uygun koşullar sağlanarak saklanması kapsayan bir tekniktir. IVF, gametlerin eldesi, in vitro şekilde olgunlaştırılması, in vitro fertilizasyon, embriyoların kültür aşaması ve alıcılara naklinin yapılması veya uygun koşullar ile saklanması gibi aşamaları içerir (Gündoğan, 1998).

Çiftlik hayvanlarında, özellikle sığırlarda in vivo koşullarda pronükleer dönemdeki embriyoları elde etmek oldukça zor ve fazlasıyla masraf gerektiren bir işlem olsa da IVF (in vitro olgunlaştırma, fertilizasyon ve kültür) tekniğiyle mezbaha materyalinden oldukça fazla sayıda pronükleer dönemdeki embriyo elde etme olanağı bulunmaktadır. (Birler vd., 1998)

İn vitro fertilizasyon için gerekli olan kriterler aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Gonadlarda gametlerin stoplazmik ve nükleer olgunlaşması,
- Dişi ve erkeklerde genital organlarında fertil olan gametlerin gelişmesi,
- Yeterli motilitesi olan fertilize olabilecek spermatozoitlerin yeterli miktarda olması,
- Fertilize olabilen 1. polar kısmı olan ovum (Pabuççuoğlu, 1998).

Çeşitli araştırmacılar tarafından sığır oositlerinin in vitro olgunlaştırma süreleri 18-20 saat, 22 saat, 20-22 saat, 20-24 saat, 24 saat, 24-26 saat ve 27 saat olarak bildirilmiştir. (Birler vd., 1998)

Fertilizasyon sonrası gebelik durumunun şekillenebilmesi için embriyo transferinde, transfer gerçekleştirilecek yere uygun olabilmesi için 2 hücreli olan dönemden 8 hücreli olan ve blastosit evresine gelişmelerini sağlamak için kültür edilmeleri gerekmektedir (Gündoğan, 1998).

### **1.5. Tez Çalışmasının Konusu**

Çevremizde kullandığımız eşya ve materyallerin büyük çoğunluğuyla sıklıkla çevresel kirleticilere, kimyasallara maruziyetimiz olmaktadır. Nonilfenol gibi kimyasalların içerisinde bulunduğu bu kirleticilere maruziyet hem erkek hem dişi de infertiliteye neden olabilmektedir.

Nonilfenol'ün sperm ve oosit üzerine etkilerini içeren çalışmalar sınırlı sayıda bulunmaktadır. Fertilizasyon ve embriyo dönemi etkileri incelenmiş bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

Yapılan çalışmalarda kullanılan nonilfenol konsantrasyonlarında spermanın motilite ve plazma membran bütünlüğü gibi parametrelerinde azalmalar olduğu bildirilmiştir. Bu durumun embriyo oluşumuna olumsuz etki yarattığı düşünülmektedir. Bir antioksidan olan glutaminin boğa spermasına katılan nonilfenolün olumsuz etkilerini azaltabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle yapılacak olan çalışmada sperm sulandırıcısına katılan nonilfenolün ve nonilfenol ile farklı dozlarda glutaminin birlikte kullanımının spermatolojik parametreler üzerine etkisi belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında, mezbalarda kesilen ineklerin ovaryumlarının 25-30 °C ısıda (%0.9 NaCl) serum fizyolojik bulunan termosta 2 saate kadar laboratuvara taşınarak, ovaryumların serum fizyolojik ile yıkanması, kesi atılarak oositlerin yıkanması, dondurulmuş sperma örnekleri ile in vitro fertilizasyon işlemi yapılmış ve sonrası kültür aşamasında 3 (üç) adet deneme grubuna nonilfenol eklenmesi uygulanmıştır.

Fertilizasyon sonrası embriyo süreci ve bu kimyasalların fertilizasyonda ve embriyo sürecindeki etkilerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması yapılmıştır.

Mezbahaneden 37°C ısıda (%0.9 Nacl) serum fizyolojik bulunan termos içerisine alınan testisler laboratuvara getirilmiştir. Testislerin dış kapsülü uzaklaştırıldıktan sonra epididimis diseke edilerek, spermier retrograde flushing metodu ile Tris tamponu içerisine aktarılmıştır. Ardından Thoma lamı ile sayılarak 1ml solüsyon içerisinde yoğunluğu 100-200 X 10<sup>6</sup> /ml spermatozoon olacak şekilde 5 farklı grup oluşturulmuştur. Gruplar 37°C de su banyosu içerisinde muhafaza edilmiştir ve Spermatolojik parametreler 2. saatte değerlendirilmiştir.



## 2. MATERYAL VE METOT

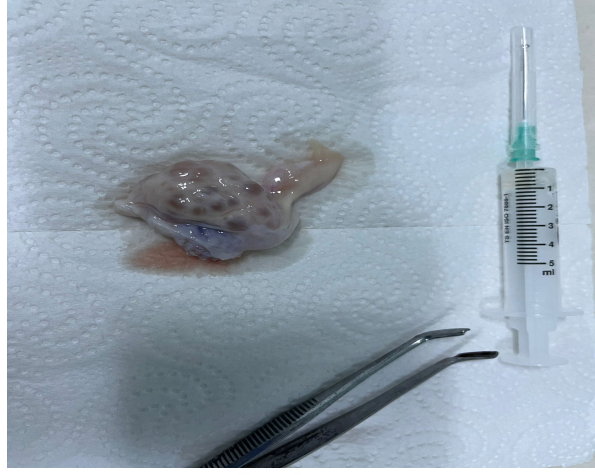
### 2.1. Materyal

Kırıkkale Yaren Mezbahesi'nden alınan toplam 57 baş dişi sığır materyalinde farklı zamanlarda mezbahadan, 57 baş dişi sığırdan toplam 109 adet ovaryum alınmıştır. 109 adet ovaryumdan toplam 352 adet A ve B kalite oosit elde edilmiştir. Elde edilen bu oositler 1 kontrol 3 deneme grubu olacak şekilde gruplara ayrılarak maturasyona bırakılmıştır. Toplam 352, A ve B kalite oositin 54 adeti kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Nonilfenol 1, nonilfenol 2 ve nonilfenol 3 deneme gruplarındaki oosit sayıları sırasıyla 66, 66, 64 adet olacak şekilde maturasyon grupları oluşturulmuştur.

Kırıkkale Yaren Mezbahesinde kesilmiş 12-18 aylık Simental boğalara ait testisler kullanılmıştır. 2 adet testisten A ve B grubu oluşturulmuştur. Thoma lamı ile sayılarak 1ml solüsyon içerisinde yoğunluğu 100-200 X 10<sup>6</sup> /ml spermatozoon olacak şekilde 5 farklı grup oluşturulmuştur.

### 2.2. Metot

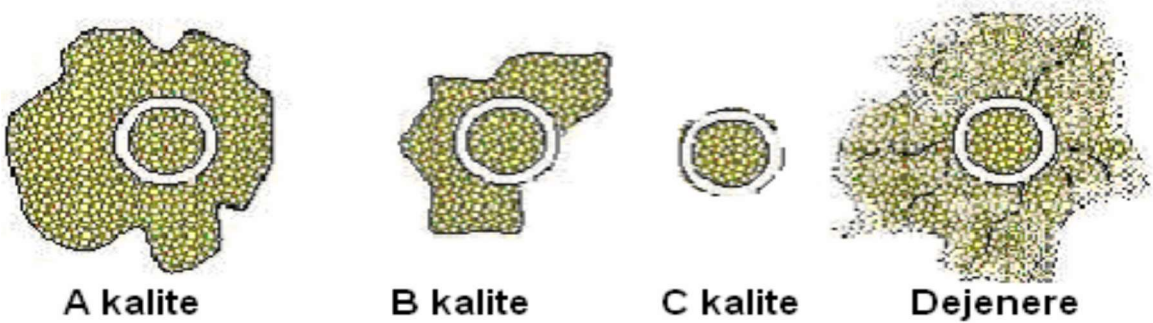
Mezbahadan temin edilmiş olan ovaryumlar, 25-30°C de 100mg/l Kanamisin Sülfat ihtiva eden (NaCL) %0.9'luk serum fizyolojik içerisine alınarak azami iki saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Ovaryumlardan aspirasyon işlemi yapılarak oositler elde edilmiştir. Ovaryum yüzeyindeki 2-8 mm çapındaki folliküllerden laboratuvarda, 5 ml'lik enjektöre takılan 21 Gauge'lik iğne ucu yardımıyla oositler aspire edilmiştir. Aspirasyondan önce enjektör içerisine 1 ml yıkama mediumu (m-PBS) çekilmiştir. Toplanan oositler aynı solüsyon içerisinde stereo mikroskop altında kalite değerlendirmesi yapılarak A ve B sınıfına giren oositler maturasyon sürecine alınmıştır.



**Resim 2. 1:** Ovaryum ve aspirasyonu

Oosit değerlendirilme kriterleri (Resim 1.3.); (Akyol vd., 2007)

- A. 5-6 sıradan daha fazla etrafında kumulus hücresi bulunup homojen yapıda olan oositler
- B. 2-4 sıra etrafında kumulus hücresi bulunan ya da az bir kısımda kumulus hücresi bulunmayan oositler
- C. Etrafında kumulus hücresi bulunmayan oositler
- D. Etrafında bulunan kumulus hücre yığınının dejenere durumda olduğu oositler.



**Resim 2. 2:** Sığır oositlerinin morfolojik kalite sınıflandırması

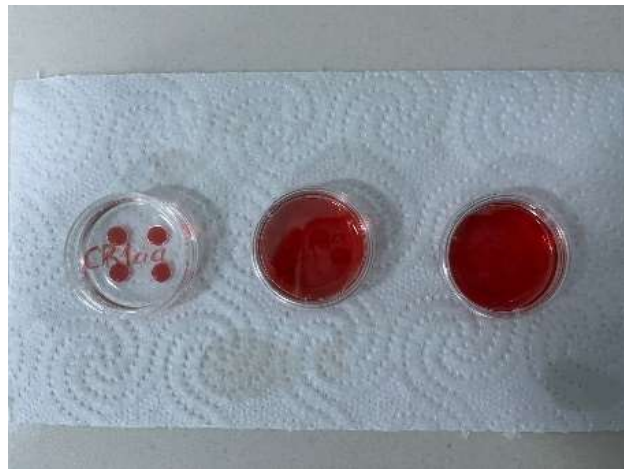
Oositler TCM-199 maturasyon mediumunun bulunduğu yıkama solüsyonunda yıkandıktan sonra aynı solusyondan hazırlanan ve üzeri mineral yağ ile kaplanan

100µl'lik mikrodamlara yerleştirilmiştir. Kullanılan mikrodamlarda yaklaşık 20 oosit olacak şekilde yerleştirilerek 20-22 saat %5 CO<sub>2</sub>, 38,5-39°C ve %95 bağıl nem ihtiva eden CO<sub>2</sub> inkubator içerisinde inkube edilmiştir.

Spermaların kriyoprotektanlar ve seminal plazmadan ayrıştırılması, kapasitasyonu ve sulandırılması amacıyla modifiye BO (Brackett Oliphant) mediumundan yararlanılmıştır. Yapılan sperm işleme metodunda ölü veya canlı spermatozoonların ayırımının yapılmasına ihtiyaç duyulmamıştır ve ortalama %50 motil spermatozoon olması koşuluyla işlemler sonunda oosit başına yaklaşık 25-30.000 canlı spermatozoa olacak şekilde fertilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fertilizasyon amacıyla hazırlanmış olan mediumun 100µl'lik fertilizasyon mikrodamları yapılmış ve üzerine mineral yağ eklenmiştir.

Oosit yıkama solüsyonunda yıkanan olgunlaştırılmış oositler sonrasında fertilizasyon mikrodamlarına alınmıştır. Olgunlaştırılmış oositlerden yaklaşık 20 adet olacak şekilde fertilizasyon mikrodamlarına ilave edilerek toplamda 100µl'lik inseminasyon şartları sağlanan mikrodamlar içerisine konmuştur. Sonrasında bunlar 5-6 saat kadar inkubasyon ortamında bekletilmiştir. Spermaların kapasitasyonu amacı ile 5 IU/ml Heparin ve 2mM Kafein kullanılmıştır.

İnkubasyon sonrası oositler 100µl'lik kültür mediumu (CR1aa) (amino asitli Charles Rosencrans) bulunan mikrodamlarda 7 gün boyunca inkubasyona bırakılarak 48 saatin sonunda ilk bölünme kontrolü yapılmıştır.



**Resim 2. 3:** Kültür mediumu (CR1aa) dropları

Oosit maturasyonu, fertilizasyon ve sonrasında embriyo kültürü amacıyla yapılan işlemlerin tamamı için %5 CO<sub>2</sub> , %95 bağıl nem ve 38,5-39°C ısıdaki inkubatör kullanılmıştır.

Deneme gruplarının hazırlanması amacıyla; DMSO ile 0.5 g NF/ 5 ml konsantrasyonu ile karıştırılan stok solüsyon elde edilerek, stok solüsyonundan 0,1; 10; 100 µg NF/ml konsantrasyonlarında solüsyonlar sırasıyla hazırlanıp deneme NF1, NF2, NF3 grupları oluşturulmuştur.

100 µg/ml ve üzerinde kullanılan nonilfenol dozlarında boğanın sperm hareketliliğinin önemli ölçüde etkilendiği görüldü. Planlanan gruplar üzerinde boğa spermasında etkili olan 100 µg/ml oranında nonilfenol dozu kullanılmıştır.

Glutaminin tek başına kullanıldığı çalışma sayısı oldukça azdır. Yapılan bir çalışmada koç spermasında 5 mM dozunda kullanıldığında olumlu yönde etkileri olduğu belirlenmiştir. Çalışmada 1mM, 5mM ve 10 mM dozları kullanılmıştır.

**Tablo 2. 1:** Çalışmada Kullanılan Gruplar ve Kimyasal Dozları

Kontrol Grubu	Grup
100 µg/ml Nonilfenol	Grup
1 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol	Grup
5 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol	Grup
10 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol	Grup

### 2.2.1. Motilite Tayini (M)

Gruplar ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskop ile 20X büyütmede subjektif olarak gözlemlenerek toplamda 5 farklı alanda spermatazoa hareket kabiliyeti yönünden incelenip motilite oranı yüzde olarak belirlendi.

### 2.2.2. Plazma Membran Bütünlüğü (PMB)

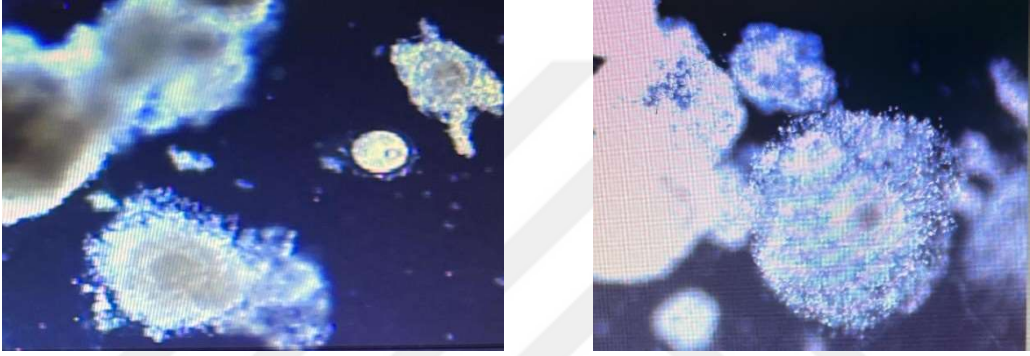
Floresan ataçmanlı (Leica DM IL LED FLUO; Leica, Germany) mikroskop kullanılarak SYBR-14 ve PI (Live-Dead Sperm Viability Lit L-7011; Invitrogen, Eugene, OR, USA) floresan boyalar ile boyama yapılarak, spermalar 1-2x10<sup>6</sup>/ml olacak şekilde seyreltikten sonra 50 µl sulandırılmış sperma ependorf tüplere konulup üzerine 1 µM

içeren 10 µl SYBR-14 eklenip 10 dk bekletildi. Solüsyon içerisine, 5 µM içeren 5 µl PI eklenip 5 dk sonra 3 µl Hancock solüsyonu ile reaksiyon durduruldu. 3 µl örnek lam üzerine konularak lamel kapatılıp, 200 spermatozoa sayıldı. PI ile boyanıp ve kırmızı floresan yayanlar ölü kabul edildi. SYBR-14 ile boyanıp ve yeşil flourasan yayanlar canlı olarak kabul edildi.



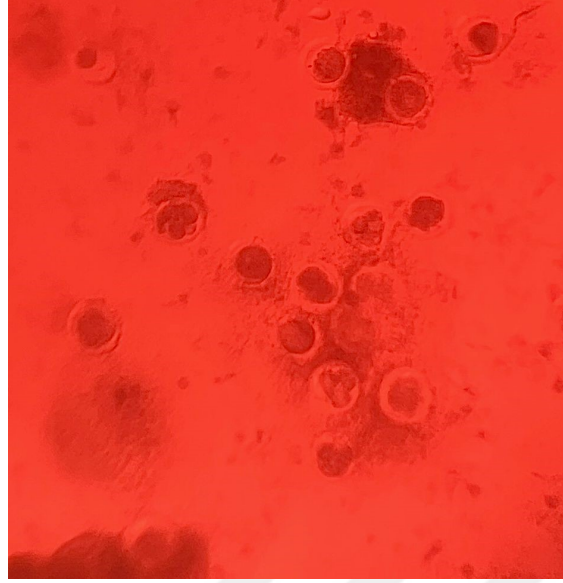
### 3. BULGULAR

Kontrol grubu içerisinde 54 adet oositin 20-22 saat inkubasyon sonrasında %75-80 oranında mature olduğu tespit edilmiştir. Maturasyon bulgusu olarak kumulus ekspansiyonu oositlerin stereo mikroskop altında sübjektif olarak değerlendirilmesiyle elde edilmiştir.

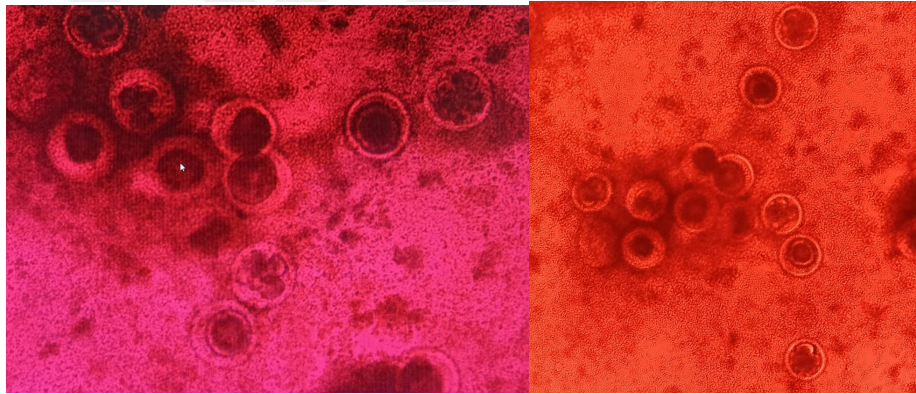


**Resim 3. 1: Mature oosit görüntüsü**

Fertilizasyon ve akabinde kültür droplarına yerleştirilen mature oositlerin kontrol grubunda kültürün ilk 48. saatinde yapılan kontrollerinde 11 adet oositte dörde yarıklanma görülmüş, kültür sonrası gelişim oranının %20 olduğu tespit edilmiştir. Kültürün 7. gününde yapılan kontrollerde bunlarında gelişmediği tespit edilmiştir.



**Resim 3. 2:** Kùltürün 48. saatinde kontrol grubunda görùlen dörde yarıklanma



**Resim 3. 3:** Kùltürün 7. gününde kontrol grubunun görüntüsü

Üç adet NF deneme grubunda yer alan oositlerin hiç birisinde kùltür ortamında gelişme olmadığı kaydedilmiştir. Gelişme olmaması üzerine nonilfenolün sperma etkisine bakmak için deneme gruplarında kullanılan dozlar ve bu dozlardan daha düşük dozlar ayarlanarak (0.01, 0.001 ve 0.0001  $\mu\text{g}$  NF/ml konsantrasyonlarında) spermalar üzerinde etkisine bakılmıştır. Çalışma için kullandığımız nonilfenol dozları spermlere katılarak yaklaşık 2 saat kadar izlendi. 0,1  $\mu\text{g}$  NF/ml dozunda yaklaşık 1 saat sonra %25 sperm motilitesinde azalma olduğu görüldü. 10  $\mu\text{g}$  NF/ml dozunda, doz eklenmesinin akabinde 1 saat sonunda sperm motilitesinde %40 azalma görüldü. 100  $\mu\text{g}$  NF/ml dozunda, doz eklenmesinin akabinde %55 den fazla azalma olduğu görüldü. Dozlar değiştirilerek spermatazoalar oositlere katıldı. 0.01  $\mu\text{g}$  NF/ml dozunda eklendikten 2 saat sonrasında

sperm motilitesinde yaklaşık %30 oranında, 0.001 µg NF/ml dozu eklendiğinde 2 saat sonunda yaklaşık %20 oranında sperm motilitesinde azalma olduğu görüldü.

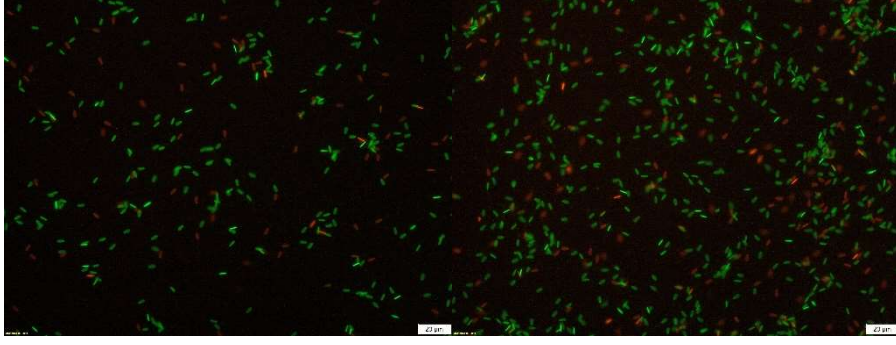
Gruplar 2 farklı testisten alınan sperm materyali ile 1ml solüsyon içerisinde yoğunluğu 100-200 X 10<sup>6</sup> /ml spermatozoon olacak şekilde oluşturuldu. 100 µg NF/ml konsantrasyonunda önemli ölçüde olumsuz etki kaydedildiği için çalışmada bu doz konsantrasyonu kullanıldı.

**Tablo 3. 1:** Grupların Motilite Tayini

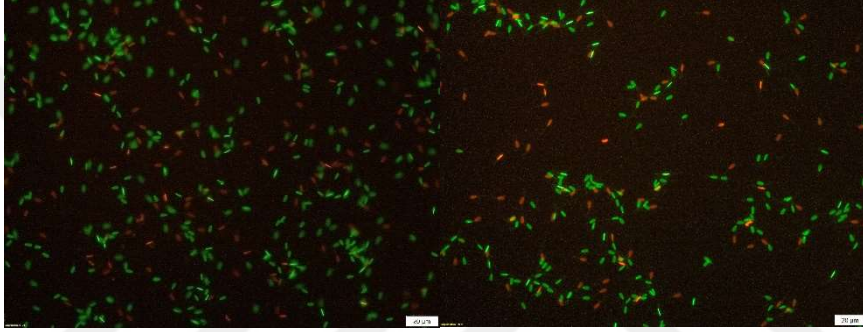
	Motilite (M) Yüzdesi	
	A Grubu	B Grubu
Kontrol Grubu	80,80	80,80
100µg/ml Nonilfenol	40,40	50,55
1 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol	50,50	80,80
5 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol	50,60	70,80
10 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol	90,80	80,90

Grupların motilite yüzdeleri değerlendirildiğinde 100µg/ml Nonilfenol kullanılan grupta kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalma olduğu gözlemlendi. 1 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol kullanılan grupta glutaminin nonilfenolün etkisini bu dozda kullanıldığında her iki grupta da motilite yüzdesini arttırdığı tespit edildi. 5 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol grubunda yine motilite yüzdesini arttığı gözlemlendi. 10 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol grubunda sadece nonilfenol kullanılan gruba göre yüksek oranda ve anlamlı düzeyde motilite yüzdesinde artış gözlemlendi ve ayrıca kontrol grubuyla kıyaslandığında da glutaminin olumlu etkisi ile motilite yüzdesinde artış olduğu söylenebilir.

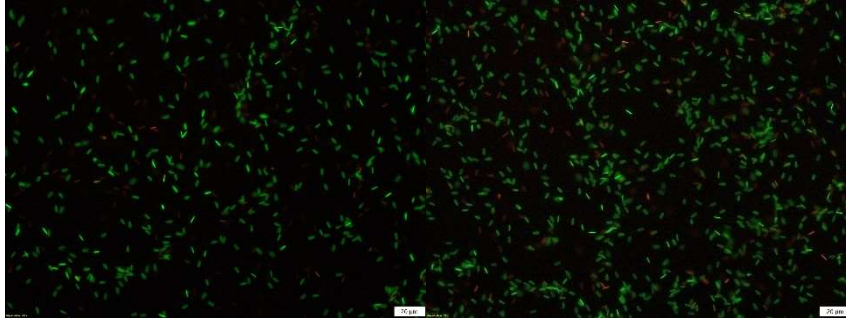
Grupların plazma membran bütünlüğü yüzdeleri değerlendirildiğinde 100µg/ml Nonilfenol kullanılan grupta azalma olduğu görüldü. Glutamin kullanılan tüm gruplarda glutaminin nonilfenol'ün toksik etkisini azalttığı ve nonilfenol grubuyla kıyaslandığında anlamlı ölçüde plazma membran bütünlüğü yüzdelerinde artış olduğu gözlemlendi.



**Resim 3. 4:** Kontrol grubunda PMB incelenen ölü/canlı sperm görüntüsü



**Resim 3. 5:** 100 µg/ml Nonilfenol grubunda PMB incelenen ölü/canlı sperm görüntüsü



**Resim 3. 6:** 10 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol grubunda PMB incelenen ölü/canlı sperm görüntüsü

## İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler SPSS v.16 programı ile analiz edildi ve Parametrik olan veriler arasındaki anlamlılık düzeyi Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve gruplar arasındaki farklar Post Hoc Tukey Testi ile belirlendi.

**Tablo 3. 2:** Epididimal Boğa Spermına 100 µg/ml dozunda Nonilfenol ve Uygulanan Nonilfenolla Birlikte Farklı Dozlarda Glutamin Uygulamasının Spermatolojik Parametrelere Etkisi

Gruplar (n=4)	Motilite(%)	Plazma Membran Bütünlüğü(%)
Kontrol	80,00±0,00 <sup>a</sup>	70,50±2,62 <sup>bc</sup>
100 µg/ml Nonilfenol	46,25±3,75 <sup>b</sup>	66,00±1,41 <sup>c</sup>
1 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol	65,00±8,66 <sup>ab</sup>	74,50±1,04 <sup>ab</sup>
5 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol	55,00±2,88 <sup>b</sup>	76,25±0,47 <sup>ab</sup>
10 mM Glutamin+100 µg/ml Nonilfenol	85,00±3,81 <sup>a</sup>	78,25±2,05 <sup>a</sup>
İstatistiksel Önem	*	-

Veriler = Ortalama ± Standart Hata, \*= P ≤ 0,05 düzeyinde anlamlılık. <sup>a-c</sup>: İstatistiksel fark

#### 4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında endokrin sistem bozucularından olan Nonilfenol'ün sığır embriyoları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Deneyle elde edilen veriler incelendiğinde deneme gruplarına nonilfenol eklendiğinde kültür ortamında gelişme olmadığı görülmüştür. Yapılan deneme gruplarında gelişme olmadığı görülmesi üzerine spermalara kullanılan dozlarda nonilfenol katılarak etkisine bakılmış ve çok kısa sürelerde sperma motilitesinde azalma olduğu görülmüştür. Bunun üzerine daha düşük dozlarda Nonilfenol dozları ile sperm motilitesi incelenmiş ve yine azalma olduğu kaydedilmiştir. Bu durumdan kaynaklı kültür ortamında gelişme olmadığı düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda Glutamin'in kimyasallar üzerinde koruyucu etkisi olduğu görülmüştür. Bu nedenle Nonilfenol'ün spermadaki olumsuz etkisi üzerine Glutamin'in koruyucu etkisine bakılmıştır. Anlamlı düzeyde Nonilfenol'ün olumsuz etkisini yok ettiği gözlemlenmiştir. Fertilizasyon ve embriyo gelişimi için de Glutamin'in Nonilfenol'ün olumsuz etkisini yok edebileceği düşünülmektedir.

Çakal ve Parlak (2007), denizkestanesi embriyoları üzerinde yaptıkları çalışmada, NF miktarını ölçmüşlerdir. Düşük miktarlarda kullanılan NF ve OF konsantrasyonlarının iskelet sistemi üzerinde bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir. Yüksek kullanılan NF ve OF konsantrasyonlarının ise mitozu engelleyip embriyo gelişimini erken yaşam dönemlerinde engellediğini bildirmiştir.

Arslan vd. (2007), yaptıkları çalışmada denizkestanesi türü olarak bilinen *Paracentrotus lividus* gamet ve embriyolarında, sperm ve yumurtaları 0,937- 18,74 µg/L konsantrasyon aralığında NF ve 5-160 µg/L konsantrasyon aralığında OF'ye maruz bırakarak mitotik aktivitedeki morfolojik değişim, şekil bozuklukları, sperm kalitesi, gelişim geriliği, embriyonik ve larval ölüm, fertilizasyon başarısı oranları incelenmiştir. Kontamine spermlerin oluşturmuş olduğu larvaların iskelet yapısında şekil bozukluklarında artış görülmüş ve fertilizasyon başarısına bakıldığında yaklaşık % 20

oranında azalma olduğu bildirilmiştir. Bu türde Nonilfenol'ün genotoksik ve embriyotoksik konsantrasyonları 0,937 µg/L, OF için 4,685 µg/L olarak bildirilmiştir.

Zebrabalıklarının üreme sistemlerinde üreme öncesinde Nonilfenol'e maruz bırakılmalarının etkisi incelenmesi amacıyla üç hafta boyunca 50 µg/L konsantrasyonunda Nonilfenol'e maruz bırakılmış olan dişi ve erkek zebrabalıkları, kontrol grubunda bulunan dişi ve erkek zebrabalıkları ile dört grupta incelenecek şekilde çiftleştirilmiştir. Bu dört grupta fekundite, embriyonik cathepsin D aktivitesi (CAT D), yavrulardaki şekil bozukluğu değerleri, yumurta kabuğu kalınlığı ve kuluçkadan çıkma oranı ölçülmüştür. NF'ye maruziyeti olan erkek balıkların bulunduğu gruplardaki değerlerin farklılık göstermediği gözlemlenmiş fakat NF'ye maruziyeti olan dişi balıkların olduğu gruplarda CAT D aktivitesinin yavaşladığı, üremede zayıflamalar olduğu, şekil bozukluğu oranının yükseldiği ve yumurta kabuğu kalınlığının azaldığı (% 23,6) bildirilmiştir (Yang vd., 2006).

NF'nin, insan plasentasına yavaş bir hızda olsa da geçtiği tespit edilmiştir. NF'nin, amniyon sıvısında çevredeki miktarlara ulaştığı belirlenmiştir. 19 doğum öncesinde NF miktarını ölçmek ve anne-cenin arasındaki NF geçişi olup olmadığını belirlemek için yapılan araştırmada 174 anneden ve göbek kordonundan alınan kan örnekleri incelenmiş, analiz sonucunda özellikle büyükşehirlerde Nonilfenol oranı tespit edilmiştir. Anne-bebek çiftlerin %63,6'sında göbek kordonu atardamarına göre göbek kordonu toplardamarında daha yüksek Nonilfenol konsantrasyonuna rastlanmıştır (Balakrishnan vd., 2011).

Lukacova vd. (2012), yaptıkları çalışmada, büyükbaş hayvan sperm hücrelerinin hareketliliğini incelemiştir. Nonilfenol'ün zamana ve doza bağlı etkilerini araştırmışlardır. Yüksek dozlardaki (100 µg/ml'den büyük) nonilfenol maruziyeti olan sperm hücrelerinin hareketliliğinin olumsuz etkilendiği bildirilmiştir. Bu konsantrasyonların üreme fizyolojisi üzerinde toksik etki oluşturduğu bildirilmiştir.

Bennetts vd. (2008), Nonilfenol'ün insan spermi üzerinde DNA bütünlüğüne zarar verdiğini ve bu durumda düşüklere neden olabileceğini bildirmiştir.

Uğuz vd. (2009), çalışmalarında NF'nin epididimal rat spermi üzerine etkisini incelemiştir. Rat sperminin nonilfenole in vitro maruz bırakılmasının öncelikle rat sperm akrozomalini değiştirdiğini göstermiştir. Nonilfenolün akrozomal bütünlüğünü etkileyip, NF dozuna bağlı sperm hareketliliğinde ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalma, sperm fonksiyonlarının yok olmasında anlamlı rolü olduğunu belirtmişlerdir.

Selcen (2013), Nonilfenol'ün sığır spermlerine etkisini görmeyi amaçladığı çalışmada, kontrol grubuna göre 100 µg NF /ml konsantrasyonu grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu bildirmiştir. Kullanılan konsantrasyon grubunda sığır sperm hücreleri üzerinde DNA kırılmaları sonucunda apoptoza neden olduğunu bildirmiştir. Nonilfenol'ün sığır oositlerindeki olgunlaşmaya etkisini görmeyi amaçladığı deneylerde, diğer gruplara göre 100 µg NF/ml konsantrasyonunda olan grubun olgunlaşma oranının istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca uygulanmış olan nonilfenol miktarı ile olgunlaşma yüzdelerinin arasında güçlü negatif doğrusal ilişki olduğunu bildirmiştir.

Bucak vd. (2008), yaptıkları çalışmada dondurulmuş koç spermasının sperm özellikleri üzerine antioksidanların etkisini değerlendirmiştir. Dondurucu genişleticinin 2,5 mM glutamin ile eklenmesinin ardından hareketlilik ve HOST açısından önemli bir fark gözlenmemesinin yanı sıra 5 mM glutamin ile desteklenen bir dondurma genişletici, daha yüksek bir hareketliliğe yol açmıştır. Çözdürülmüş koç spermasında antioksidanların lipid peroksidasyonu ve antioksidan aktiviteler üzerindeki etkilerine bakıldığında CAT aktivitesi, diğer tedavilerle karşılaştırıldığında 5 mM glutamin ilavesinin ardından önemli ölçüde yüksek olduğu bildirilmiştir.

5 mM Glutaminin kriyoprotektif bir etki sağladığı, kontrole kıyasla koç spermasının çözülme sonrası hareketliliğini ve membran bütünlüğünü iyileştirdiği gibi CAT aktivitesini de önemli ölçüde yükselttiğini bildirmiştir. Sperm sulandırıcılara glutamin (5 mM) takviyesinin, dondurulmuş-çözülmüş koç spermine daha fazla fayda sağladığını bildirmiştir.

## 5. SONUÇ

Çevre kirleticilerinin pek çok alanda kullanılıyor olması sağlık sorunlarını da beraberinde getirmektedir. Günlük yaşantımızda kullandığımız eşya ve materyallerden çevresel kirleticiler ve kimyasallararasıklıkla maruziyetimiz olmaktadır. Nonilfenol gibi kimyasalların içerisinde bulunduğu bu kirleticilere maruziyet hem erkek hem dişi de infertiliteye neden olabilmektedir.

Bu tez çalışmasında etkileri belirlenmeye çalışılan nonilfenol dünyanın her ülkesinde on binlerce ton miktarlarında üretilmektedir. Üretilen bu miktarlar, deterjanlarda, plastik eşyalarda, boyalarda, kozmetiklerde ve günlük yaşamımızda hemen her alanda kullanılmaktadır.

Çevre kirleticilerin hem erkek hem dişi de infertiliteye neden olabileceği, erkeklerde sperm sayısında ve motilitesinde azalmaya neden olduğu, gamet fizyolojisi üzerinde olumsuz etkileri literatürde rapor edilen bulgular arasındadır. Nonilfenol'ün östrojenik, toksik ve karsinojenik etkide olduğuna literatürde yaygın bir şekilde rastlanmaktadır. Nonilfenol'ün embriyo gelişimi esnasında meydana getirebileceği epigenetik etkilerin canlıların yaşamı boyunca kalıcı etki yapabildiği rapor edilmiştir. Glutamin'in kimyasallara karşı koruyucu etkisi olduğuna dair çalışmalar mevcuttur.

Nonilfenol'ün sığır oositlerindeki olgunlaşmaya etkisini görmek amacıyla yapılan deneylerde, diğer gruplara göre 100 µg NF/ml konsantrasyonunda olan grubun olgunlaşma oranının istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu belirtilmiştir. Ayrıca uygulanmış olan nonilfenol miktarı ile olgunlaşma yüzdelerinin arasında güçlü negatif doğrusal ilişki olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda sperma üzerinde 5 mM glutamin ile desteklenen bir dondurma genişletici, daha yüksek bir hareketliliğe yol açmıştır.

Nonilfenol'ün sperm ve oosit üzerine etkilerini içeren çalışmalar sınırlı sayıda bulunmaktadır. Fertilizasyon ve embriyo dönemi etkileri incelenmiş bir çalışma şimdide

kadar bulunmamaktadır. Glutamin'in sperma üzerinde Nonilfenol'ün olumsuz etkisine karşı koruyucu etkisi olup olmayacağı üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada Nonilfenol'ün sığır embriyoları üzerine etkisini görmek amacıyla yapılan deneylerde, 0,1; 10; 100 µq NF/ml konsantrasyonlarında hazırlanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Kontrol grubunda kültürün 48. Saatinde dörde yarıklanma görülürken, 0,1; 10; 100 µq NF/ml konsantrasyonlarının kullanıldığı gruplarının hiç birinde bir gelişme görülmemiştir. Bu durum nonilfenol'ün fertilizasyon ve embriyo döneminde anlamlı şekilde toksik etkisinin olduğunu göstermektedir.

Belirlenen dozlarda Glutamin'in sperma üzerinde Nonilfenol'ün toksik etkisine karşı koruyuculuğuna baktığımız bu çalışmada kontrol grubuna göre Nonilfenol grubunun büyük ölçüde sperma motilitesini ve plazma membran bütünlüğünü azalttığı bulunmuştur. Nonilfenol'e Glutamin katulan tüm gruplarda Motilite tayinine bakıldığında anlamlı bir şekilde Glutamin'i n sperma üzerindeki Nonilfenol'ün toksik etkisini azalttığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda Plazma membran bütünlüğüne bakıldığında Glutamin'nin Nonilfenol üzerindeki bu etkisinin istatistik olarak anlamlı fark gösterdiği bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- Abd-Elkareem, M., Aboukhalil, N.S., Sayed, A.H. (2018). Hepatotoxic responses of 4-nonylphenol on African catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant and histochemical biomarker. *Assiut Üni., Fish Physiol Biochem*, 44: 969-981.
- Ahel, M., Giger, W., Koch, M. (1994). Alkilfenol polietoksilat yüzey aktif maddelerin su ortamındaki davranışı - I. Kanalizasyon arıtımında oluşum ve dönüşüm. *Su Araştırmaları*, 28(5): 1131-1142.
- Akkaya, B.A., Yanardağ, R. (2010). Krom pikolinat ve l-glutamin'in antioksidan aktiviteleri. İstanbul Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Akyol, N., Kızıl, SH., Karşahin, T., Satılmış, M. (2007). İn vitro sığır embriyosu üretim ve transferi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47(1): 1-8.
- Akyüz, S., Yarat, A., Egil, E. (2011). Bisfenol-A İçerikli Dental Materyallere Güncel Yaklaşım. Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, *MÜSBED*, 1(3):190-195.
- Alberts, E., Kalverboer, AF., Hopkins, B.(1983). Mother Infant Dialog in the First Days of Life an Observational Study During Breast-Feeding. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip* 1983, 24: 145-61.
- Arslan, OC., Parlak, H., Oral, R., Katalay, S. (2007). The effects of nonylphenol and octylphenol on embryonic development of Sea Urchin (*Paracentrotus lividus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 53: 214-219.
- Aydemir, B., Sarı, E.K. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2(2): 56-60.

- Balakrishnan, B., Thorstensen, E., Ponnampalam, A., Mitchell, MD. (2011). Passage of 4-nonylphenol across the human placenta. *Placenta*, 32: 788-792.
- Belibağlı, P., Uysal, Y. (2017). Çevrede Nonilfenol; Oluşumu, Akıbeti, Toksisitesi ve Atıksularda Arıtımı. *KSU Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 20(4).
- Bennetts, LE., De Iulius, GN., Nixon, B., Kime, M., Zelski, K., Mcvıcar, CM., Lewis, SE., Aitken, RJ. (2008). Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: Evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutation Research*, 641: 1–11.
- Birler, S., Pabuçcuoğlu, S., Alkan, S., Evecen, M., İleri, İK. (1998). In vitro fertilize edilen sığır oositlerindeki pronüklear gelişim üzerine olgunlaştırma ve fertilizasyon sürelerinin etkisi. *Turk J Vet Anim Sci*, 22: 1-15.
- Birler, S., Pabuçcuoğlu, S., İleri, İK., Alkan, S., Evecen, M. (1998). Sığır Oositlerinin İn Vitro Olgunlaştırılmasında Farklı Sürelerin Etkisi. İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fak., *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 22: 551-557.
- Bistáková, J., Jambor, T., Lukáč, N. (2016). Short-term in vitro activity of 4-nonylphenol on bull sperm motility. *Veterinářství*, 66(7): 532-537.
- Blankenship, AL., Coady, K. (2005). Nonylphenol. *Encyclopedia of toxicology*, 260-263.
- Boyacıoğlu, M., Arslan, OC., Çakal, Ö., Parlak, H., Karaaslan, M. (2007). ‘‘Mutagenicity of Nonylphenol and Octylphenol Using Salmonella Mutation Assay.’’. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 24(3-4): 299–302.
- Bozucular, E., Tekin, ÖF., Özgün, SOY. (2023). BÖLÜM V. *BİDGE Yayınları*, 80-95.
- Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sarıözkan, S., Ulutaş, P.A. (2009). Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research*, 81(1), 13-17.

- Buitrón, G., Torres-Bojorges, AX., Barcia, GC. (2015). Removal of p-Nonylphenol Isomers Using Nitrifying Sludge in a Membrane Sequencing Batch Reactor. *Kimya Mühendisliği Derg*, 281: 860-868.
- Cabaton, N., Dumont, C., Severin, I., Perdu, E., Zalko, D., Cherkaoui-Malki, M., Chagnon, MC. (2009). Genotoxic and endocrine activities of bis (hydroxyphenyl) methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology*, 255(1-2): 15-24.
- Canada, (2002). Environment Canada. Canadian Environmental Quality Guidelines for Nonylphenol and its Ethoxylates (Water, Sediment, and Soil) Scientific Supporting Document. Ecosystem Health: Science-based Solutions Report, No. 1-3. National Guidelines and Standards Office, Environmental Quality Branch, Environment Canada.
- CARLSEN, E., GIWERCMAN, A., KEIDING, N., SKAKKEBAEK, N.E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*, 305: 609-13.
- Chiam, K., Tilley, W. D., Butler, L. M., Bianco-Miotto, T. (2009). The dynamic and static modification of the epigenome by hormones: a role in the developmental origin of hormone related cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1795(2): 104-109.
- Çakal Arslan, Ö., Parlak, H. (2007). Embryotoxic effects of nonylphenol and octylphenol in sea urchin *Arbacia lixula*. *Ecotoxicology*, 16: 439-444.
- Ecer, Ç. (2012). Sulu çözeltilerden alkoletoksilatların kimyasal yöntemler ile arıtımı. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Ergün, S.S. (2013). Nonilfenol ve Bisfenol A'nın Sığırlarda Gamet Fizyolojisine Olan Etkileri. Afyon Kocatepe Üni., Doktora Tezi, Afyonkarahisar.
- Gençel, HB. (2011). Nonil Fenol Etoksilatın Aerobik Parçalanmasının Değerlendirilmesi. İstanbul Teknik Üni., Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.

- Gong, Y., Han, XD. (2006). Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reproductive toxicology*, 22(4): 623-630.
- Gong, Y., Wu, J., Huang, Y., Shen, S., Han, X. (2009). Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicology letters*, 186(2): 84-95.
- Gu, W., Wang, Y., Qui, Z., Dong, J., Wang, Y., Chen, J. (2018). Maternal exposure to nonylphenol during pregnancy and lactation induces microglial cell activation and pro-inflammatory cytokine production in offspring hippocampus. China Medikal Üni., *Science of the Total Environment*, 634: 525-533.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3): 651-715.
- Gündoğan, M. (1998). İneklerde İn Vitro Fertilizasyon. A.K.Ü., Veteriner Fak., *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 38(2): 103-115.
- Hall, J.C., Heel, K., McCauley, R. (1996). Glutamine. *British Journal of Surgery*, 83(3), 305-312.
- Hess-Wilson, JK., Knudsen, KE. (2006). Endocrine disrupting compounds and prostate cancer. *Cancer Letters*, 241: 1–12.
- Hewstone, RK. (1994). “Environmental Health Aspects of lubricant additives”. *Science of Total Environment*, 156(3): 243-254.
- Hossain, A., Dalgaard, M., Vinggaard, AM., Frandsen, H., Larsen, JJ. (2001). In utero reproductive study in rats exposed to nonylphenol. *Reproductive Toxicology*, 15: 537-543.
- Hossain, S., Tareq, K.M.A., Hammano, K.I., Tsujii, H. (2007). Effect of fatty acids on boar sperm motility viability and acrosome reaction. *Reproductive medicine and biology*, 6: 235-239.

- Hung, CH., Yang, SN., Kuo, PL., Chu, YT., Chang, HW., Wei WJ., Huang, SK., Jong, YJ. (2010). "Modulation of Cytokine Expression in Human Myeloid Dendritic Cells by Environmental Endocrine Disrupting Chemicals Involves Epigenetic Regulation." *Environmental Health Perspectives*. 118(1).
- Ijaz, M.U., Anwar, H., Iqbal, S., Ismail, H., Ashraf, A., Mustafa, S., Samad, A. (2021). Protective effect of myricetin on nonylphenol-induced testicular toxicity: biochemical, steroidogenic, hormonal, spermatogenic, and histological-based evidences. *Environmental Science and Pollution Research*, 28: 22742-22757.
- Islam, M.M., Umehara, T., Tsujita, N., Shimada, M. (2021). Saturated fatty acids accelerate linear motility through mitochondrial ATP production in bull sperm. *Reproductive Medicine and Biology*, 20(3): 289-298.
- İşcan, M., Togan, İ., Severcan, F., Uğuz, C., Ergüven, A. (2005). Sakarya Nehri ve Değirmenderesi'nde Alkilfenol Kirliliği ve Nonilfenol'ün Alabalıklar (Onchoryncus Mykiss) Üzerine Etkileri. *The Scientific and technical Research Council of Turkey*, 286.
- Jambor, T., Greifova, H., Kavacık, A., Kovacıkova, E., Turda, EF., Z., Mossonyi, P., Lukac, N. (2018). Parallel effect of 4-octylphenol and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) alters steroidogenesis, cell viability and ROS production in mice Leydig cells. Slovak Uni., *Chemosphere*, 199: 747-754.
- Jobling, S., Sumpter, JP. (1993). Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) hepatocytes. *Aquatic toxicology*, 27(3-4): 361-372.
- Jobling, S., Sumpter, JP., Sheahan, D., Osborne, JA., Matthiessen, P. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 15(2): 194-202.

- Jubendradass, R., D’cruz, SC., Rani, SJA., Mathur, PP. (2012). Nonylphenol induces apoptosis via mitochondria- and Fas-L-mediated pathways in the liver of adult male rat. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 62: 405–411.
- Karabulut, H., Gülay, M.Ş. (2016). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1): 65-76.
- Karafakioğlu, YS., Fidan, AF., Ciğerci, İH., Dündar, Y., Aslan, R. (2007). Nonilfenol'ün Rat Böbrekve Testis Dokusunda İndüklediği Oksidatif Stres Üzerine Taurinin Koruyucu Etkisi. *Afyon Kocatepe University Journal of Science*, 7(1).
- Kassim, A., Simoneit, TA. (1993). Detergents: A Review of the Nature, Chemistry, and Behavior in the Aquatic Environment. Part 1. Chemical Composition and Analytical Techniques. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 23(4): 325-376.
- Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2000). Concentration dependent effects of nonylphenol on testis structure in adult platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Marine Environmental Research*, 50: 169-173.
- Kim, SK., Kim, JH., Shim, JE., Gil, YD., Yoon, J.H. (2006). ‘Nonylphenol and Octylphenol- Induced Apoptosis in Human Embryonic Stem Cells are related to Fas-Fas Ligand Pathway.’. *Tox. Sci.*, 94(2): 310- 321.
- Labow, B.I., Souba, W.W. (2000). Glutamine. *World journal of surgery*, 24(12): 1503-1513.
- Laurenzana, EM., Balasubramanian, G., Weis, C., Blaydes, B., Newbold, RR., Delclos, KB. (2002). Effect of nonylphenol on serum testosterone levels and testicular steroidogenic enzyme activity in neonatal, pubertal, and adult rats. *Chemico-Biological Interactions*, 139: 23- 41.
- Lee, JW., Han, HK., Park, S., Moon EY. (2016). Nonylphenol increases tumor formation and growth by suppressing gender-independent lymphocyte

proliferation and macrophage activation. Sejong Uni., *Wiley Environmental Toxicology*, 98: 143-747.

Lee, JW., Han, HK., Park, S., Moon, EY. (2017). Nonilfenol, cinsiyetten bağımsız lenfosit proliferasyonunu ve makrofaj aktivasyonunu baskılayarak tümör oluşumunu ve büyümesini artırır. *Çevresel toksikoloji*, 32(6): 1679-1687.

Legler, J., van den Brink, CE., Brouwer, A., Murk, AJ., van der Saag, PT., Vethaak, AD., van der Burg, B. (1999). Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 48(1): 55-66.

Li, S., Jiang, Z., Chai, W., Xu, Y., & Wang, Y. (2019). Autophagy activation alleviates nonylphenol-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *Neurochemistry International*, 122: 73-84.

Li, X., Zhou, L., Ni, Y., Wang, A., Hu, M., Lin, Y., Tian, H. (2017). Nonylphenol induces pancreatic damage in rats through mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Toxicology research*, 6(3): 353-360.

Lukac, N., Lukacova, J., Pinto, B., Knazicka, Z., Tvrda, E., Massanyi, P. (2013). The effect of nonylphenol on the motility and viability of bovine spermatozoa in vitro. *Journal of Environmental Science and Health*, 48: 973-979.

Lukacova, J., Knazicka, Z., Tvrda, E., Gren, A., Lukac, N., Massanyi, P. (2012). The impact of nonylphenol (np) on the spermatozoa motility in vitro. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, 6: 1551-1560.

Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies*. 340(9–10): 403–405.

Muller, S., Schmid, P., Schlatter, C. (1998). Pharmacokinetic Behavior of 4-Nonylphenol in Humans. *Environ Toxicol Pharmacol*, 5: 257–65.

- Nice, HE., Thorndyke, MC., Morrirt, D., Steele, S., Crane, M. (2000). Development of *Crassostrea gigas* Larvae is Affected by 4- nonylphenol. *Marine Pollution Bulletin*, 40(6): 491-496.
- Ömeroğlu, S., Kara, F., Ahmed, M., Bozkurt, H., Sanin, FD. (2011). Nonilfenollerin Çevre Sistemlerinde ve Arıtma Çamurunda Varlığı ve Etkileri. *Katı Atık ve Çevre*, 83: 39.
- Özarslan, Ç. (2020). 4-nonilfenol maruziyetinin wistar albino sıçanlarda spermatogenez üzerine yapısal ve fonksiyonel etkileri: curcuminin koruyucu rolü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Pabuççuoğlu, S. (1998). Sığır oositlerinin İn Vitro Olgunlaştırılmasında HEPES ve Hormonların Etkileri. İstanbul Üni., Veteriner Fak., Tubitak.
- Paslı, S. (2022). Plastik Katkı Maddeleri ve Sucul Ortama Etkileri. *Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 3(1): 40-49.
- Porter AJ., Hayden NJ. (2002). Nonylphenol in the Environment: A critical review. University of Vermont, Department of Civil and Environmental Engineering Üni., Burlington, VT 05405.
- Satar, Eİ. (2022). Evde Kullanılan Temizlik Malzemelerinin Sağlığa ve Çevreye Etkileri. *Sağlıklı Yaşam*, 3: 53.
- Sayed, AEDH., Hamed, HS. (2017). Induction of apoptosis and DNA damage by 4-nonylphenol in African catfish (*Clarias gariepinus*) and the antioxidant role of *Cydonia oblonga*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 139: 97-101.
- Shan J., Jiang B., Yu B., Li C., Sun Y., Guo H., Wu J., Klumpp E., Schäffer A., Ji R. (2011). Isomer-specific degradation of branched and linear 4-nonylphenol isomers in an oxic soil. *Environ. Sci. Technol.*, 45: 8283–8289.
- Sone, K., Hinagoa, M., Kitayamac, A., Morokumac, J., Uenoc, N., Watanabe, H., Iguchi, T. (2004). Effects of 17- $\beta$ -estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on

developing *Xenopus laevis* embryos. *General and Comparative Endocrinology*, 138: 228-236.

ŞiŖe, Ŗ. (2011). Anne Sütünde Nonilfenol ve Bisfenol A Düzeylerinin Belirlenmesi. Afyon Kocatepe Üni., Doktora Tezi. Afyonkarahisar.

Tabassum, H., Ashafaa, M., Paruez, S., Raisuddin, S. (2017). Role of melatonin in mitigating nonylphenol-induced toxicity in frontal cortex and hippocampus of rat brain. Hamdard Uni., *Neurochemistry International*, 104: 11-26.

Tai, HT. (2000). Formulating Detergents and Personal Care Products: A Guide to Product Development. *AOCS Press*, p16.

Tanghe, T., Devriese, G., Verstraete W. (1998). Nonylphenol Degradation in Lab Scale Activated Sludge Units is Temperature Dependent. *Water Research*, 2889-2896.

Topparı, J., Larsen, J.C., Christiansen, P. (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Persp.*, 104: 741-803.

Uğuz, C., Iscan, M., Erguven, A., Isgor, B., Togan, I. (2003). The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Environmental Research*, 92(3): 262-270.

Uğuz, C., VarıŖlı, O., Ağca, C., Ağca, Y. (2009). Effects of nonylphenol on motility and subcellular elements of epididymal rat sperm. *Reproductive toxicology*, 28(4): 542-549.

Uğuz, C., VarıŖlı, O., Ağca, C., Ağca, Y. (2014). Effects of Nonylphenol on Motion Kinetics, Acrosome and Mitochondrial Membrane Potential in Frozen-Thawed Bull Sperm. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 20(4): 583-590.

Uğuz, C., VarıŖlı, O., Ağca, C., Ağca, Y. (2014). In vitro effects of nonylphenol on motility, mitochondrial, akrozomal and chromatin integrity of ram and boar spermatozoa. *Andrologia*, 3:1:10.

- Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, AF., Viana, MT. (2005). Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Applied Ecology and Environmental Research*, 4(1): 1-25.
- Vivacqua, A., Recchia, AG., Fasanella, G., Gabriele, S., Carpino, A., Rago, V., (2003). “The food contaminants bisphenol A and 4- nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells.”. *Endocrine*, 22(3): 275-284.
- Yang, F., Xu, Y., Hu, Y. (2006). Reproductive effects of prenatal exposure to nonylphenol on zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 142: 77–84.
- Yeşil, M., Sarıözkan, S. (2019). The effect of different temperature and carnitine on liquid storage of rat epididymal semen. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1): 30-37.
- Yeşilkaya, E. (2008). Endokrin Bozucular, *Güncel Pediatri*, 6: 76-82.
- Zemheri, F. (2011). Nonilfenol ve Bisfenol A'nın Ames/Salmonella/Mikrozom Test Yöntemi Kullanılarak Mutajenik Etkisinin Belirlenmesi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar.
- Zemheri, F., Uğuz, C. (2018). Endokrin bozucu kimyasallar: Nonilfenol ve Bisfenol A Endokrin. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 30(1): 71-76.