

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

164642

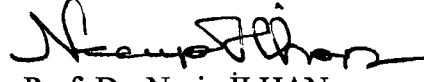
**POLİ KLORLU BİFENİLLERİN DIŞI SIÇANLARDA KEMİK DOKUSU,
PARATİROİD HORMONU, KALSİTONİN VE KEMİK DÖNÜŞÜM
PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe SEYRAN

ELAZIĞ - 2005

ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Bayram YILMAZ

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

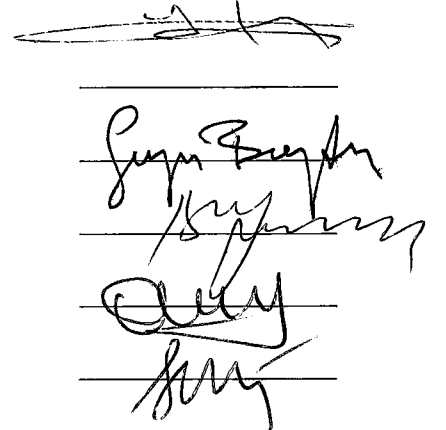
Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ

Doç. Dr. Bayram YILMAZ

Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK

Yrd. Doç. Dr. Selim KUTLU



Ailem,
Oğlum Alperen ve
Eşim Harun SEYRAN'a



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkıda bulunan, tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bayram YILMAZ'a ve Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince yardımlarını gördüğüm Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ, Doç. Dr. Ahmet AYAR, Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK ve Yrd. Doç. Dr. Selim KUTLU'ya; doktora öğrencileri Muammer ASLAN ve Abdullah YAŞAR'a, Araştırma Görevlileri Mehmet AYDIN, Sema TULAY KÖZ, M. Akif YAZAR ve Nevsun PIHTILI'ya; yüksek lisans öğrencileri, Sinan SARAL, Zafer ŞAHİN ve Mehmet ÖZER'e; Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Sayın Mete ÖZCAN, Araştırma Görevlisi Dr. Sinan CANPOLAT, doktora öğrencileri Tuğrul KUZGUN ve Ali ERSOY'a ve yüksek lisans eğitimini tamamlayan Öğr. Gör. İhsan SERHATLIOĞLU ve Dr. Süleyman SANDAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamızda maddi-manevi her türlü desteği veren Institute for Health and the Environment Başkanı Sayın Prof. David O. Carpenter'a (Department of Biomedical Science, School of Public Health, State University of New York at Albany); tecrübelerinden yararlandığımız Fırat Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Vedat BULUT ve Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ahmet GÖDEKMERDAN'a, ELISA deneyleri boyunca laboratuarda yardımlarını gördüğüm Biyolog Gökçen ÖZDEMİR'e, Fırat Üniversitesi Histoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU'na, İnönü

Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Doç. Dr. Yusuf TÜRKÖZ,
Araştırma Görevlileri Serpil FIRAT ve Muzaffer KOÇER'e teşekkür ederim..



İÇİNDEKİLER

1.	ÖZET	1
2.	ABSTRACT	3
3.	GİRİŞ	5
3.1.	Poli klorlu bifeniller	5
3.1.1.	Kimyasal yapıları	6
3.2.	PCBlerin doğada ve canlılardaki metabolizması	8
3.3.	Kontaminasyon yolları	9
3.4.	İnsandaki PCB seviyeleri	10
3.5.	Sağlığa etkileri	12
3.5.1.	PCBlerin kanserojenik etkileri	12
3.5.2.	PCBlerin sinir sistemi ve kognitif fonksiyonlar üzerine etkileri	13
3.5.3.	PCBlerin immün sistem üzerine etkileri	14
3.5.4.	PCBlerin endokrin bozucu etkileri	15
3.5.4.1.	İnsülin hormonu üzerine etkileri	16
3.5.4.2.	Tiroid hormonları üzerine etkileri	16
3.5.4.3.	Östrojenik etkileri	17
3.5.4.4.	Anti-östrojenik etkileri	18
3.5.4.5.	Androjenik ve anti-androjenik etkileri	19
3.6.	İskelet ve kemik dokusu	20
3.6.1.	Kemik dokusunun histolojik yapısı	22
3.6.1.1.	Kemik dokuda belirgin dört hücre tipi vardır	23
3.6.2.	Kemik döngüsü	24

3.6.2.1. Kemik döngüsünde etkili olan faktörler	24
3.6.2.2. Osteoporoz	25
3.6.2.3. Östrojenin kemik döngüsünde etkileri.....	26
3.6.2.4. Kemik döngüsünün belirteçleri	27
3.7. Literatür ışığında konunun önemi.....	28
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
4.1. Deney hayvanlarının bakım ve beslenmeleri	30
4.2. Kimyasal maddeler	30
4.3. Deney dizaynı	31
4.3.1. Birinci deney düzeni	31
4.3.2. İkinci deney düzeni	31
4.4. Ovariectomi	32
4.5. İdrar örneklerinin toplanması	33
4.6. Serum elde edilmesi	33
4.7. Femur, tibia ve vertebra diseksiyonu	33
4.8. Kemik dansitometri ölçümleri	33
4.9. Histolojik inceleme (ışık mikroskopik)	34
4.10. Biyokimyasal analizler	34
4.10.1. DPD	35
4.10.2. Alkalen fosfataz	35
4.10.3. Kalsiyum ve inorganik fosfat	35
4.10.4. Kalsitonin, osteokalsin ve PTH	35
4.11. İstatistiksel değerlendirme	36
5. BULGULAR	37

5.1.	Kemik dönüşüm belirteçleri	37
5.1.1.	İdrar DPD bulguları	37
5.1.2.	Serum osteokalsin bulguları	37
5.1.3.	Serum alkalen fosfataz (ALP) bulguları	38
5.1.4.	Serum kalsitonin bulguları	38
5.1.5.	PTH bulguları	38
5.1.6.	Serum kalsiyum ve inorganik fosfat bulguları	39
5.2.	Kemik dansitometri bulguları	40
5.3.	Histolojik inceleme bulguları	40
5.3.1.	İntak kontrol grubu	40
5.3.2.	A1254 grubu	41
5.3.3.	A1221 grubu	41
5.3.4.	Östradiol grubu	41
5.3.5.	Ovx grubu	41
5.3.6.	Ovx+A1221 grubu	41
5.3.7.	Ovx+A1254 grubu	42
5.3.8.	Ovx+östradiol grubu	42
6.	TARTIŞMA	64
7.	KAYNAKLAR	74
8.	ÖZGEÇMİŞ	87

TABLO LİSTESİ

- Tablo 3.1.** Ankara’da yaşayan bayanlardan alınan süt ve yağ dokusu örneklerindeki PCB bileşiklerinin seviyeleri.
- Tablo 3.2.** Türkiye (Ankara) ile altı farklı ülkedeki insanların yağ dokusu örneklerindeki bazı PCB bileşenlerinin seviyeleri.
- Tablo 3.3.** Kemik dokusu ve bileşenleri.
- Tablo 3.4.** Kemik döngüsü biyokimyasal belirteçleri.
- Tablo 4.1.** Sıçan yeminin bileşimi ve kalori değeri.
- Tablo 5.1.** İdrar DPD değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.
- Tablo 5.2.** Serum osteokalsin değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.
- Tablo 5.3.** Serum kalsitonin değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.
- Tablo 5.4.** Serum PTH değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.
- Tablo 5.5.** Serum kalsiyum değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.
- Tablo 5.6.** Serum inorganik fosfat değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.
- Tablo 5.7.** Serum ALP değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.

Tablo 5.8. Femur kemik mineral düzeylerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.

Tablo 5.9. Tibia kemik mineral düzeylerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1. PCBlerin kimyasal yapısı.

Şekil 3.2. Planar (A) ve non-planar (B) PCBlerin kimyasal yapıları.

Şekil 5.1. İdrar DPD değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.

Şekil 5.2. Serum osteokalsin değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.

Şekil 5.3. Serum kalsitonin değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.

Şekil 5.4. Serum PTH değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.

Şekil 5.5. Serum kalsiyum değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.

Şekil 5.6. Serum inorganik fosfat değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.

Şekil 5.7. Serum ALP değerlerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.

Şekil 5.8. Femur kemik mineral düzeylerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.

Şekil 5.9. Tibia kemik mineral düzeylerinde intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler.

Şekil 5.10. Kontrol grubu. Spongiöz kemikte trabeküler yapı ve kemik iliği.

Şekil 5.11. Kontrol grubu. Kompakt kemikte havers kanalları ve etrafındaki osteositler.

Şekil 5.12. A1221 grubu. Ekstraselüler matriks.

Şekil 5.13. A1254 grubu. Hiyalin kırıkdağın yeniden kemik oluşumunu indüklemesi.

Şekil 5.14. A1254 grubu. Kemik dokusunda nekroze alanlar.

Şekil 5.15. Östradiol grubu. Havers kanalı, osteositler ve kemik iliği.

Şekil 5.16. Ovx grubu. Kemik iliğinde oluşan yağlanma ve spongiöz kemikte trabeküllerin yapısı.

Şekil 5.17. Ovx grubu. Kompakt kemikteki osteositler ve havers kanalındaki geniş lakünler içinde yer alan osteositler.

Şekil 5.18. Ovx+A1221 grubu. Kompakt ve spongiöz kemiğin yapısı.

Şekil 5.19. Ovx+A1221 grubu. Ekstraselüler matriks.

Şekil 5.20. Ovx+A1254 grubu. Hiyalin kırıkdağın yeniden kemik oluşumunu indüklemesi.

Şekil 5.21. Ovx+A1254 grubu. Kemik iliğinde gözlenen lipid damlacıkları.

Şekil 5.22. Ovx+östradiol grubu. Kompakt ve spongiöz kemikte trabeküller yapı.

Şekil 5.23. Ovx+östradiol grubu. Ekstraselüler matriks.

KISALTMALAR LİSTESİ

A	: Aroclor
AH	: Aryl hydrocarbon
ALP	: Alkalen fosfataz
AR	: Androjen reseptörü
ATSDR	: Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CYP	: Cytochrom P450
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DPD	: Deoksiipridinolin
EIA	: Enzyme Immunoassay
ER	: Östrojen reseptörü
Ig	: Immüno globulin
IL	: Inter lökin
IRMA	: Immuno-radiometric assay
IUPAC	: The INternational Union of Pure and Applied Chiemistry
KMY	: Kemik mineral yoğunluğu
LDH	: Laktik dehidrogenaz
Ovx	: Ovaryektomi
PCB	: Poli klorlu bifenil
PCDD	: Poliklorlu dibenzo-p-dioxin
PCDF	: Poliklorlu dibenzo furan
PGE₂	: Prostaglandin
PTH	: Paratiroid hormon

TCDD : 2, 3, 7, 8-tetra chlorodibenzo-p-dioxin

XRE : Xenobiotic response element

1,25-OH₂-D-3 : 1 alfa-25-dihidroksikalsiferol



1. ÖZET

Poli klorlu bifeniller (PCB) endüstriyel amaçla üretilmiş ve doğada kalıcı oldukları belirlendikten sonra dünyanın birçok ülkesinde üretimleri yasaklanmıştır. Ancak, PCB içeren birçok ürün bugün hala kullanımda olduğu için çevre ve insan sağlığını tehdit etmektedir. Kimyasal kararlılıkları ve lipofilik özellikleri nedeniyle doğada ve canlı organizmada birikme eğilimi gösterirler. Bugüne kadar PCBlerin toksik, kanserojenik, immun baskılayıcı ve endokrin bozucu dahil birçok etkileri araştırılmıştır. Ancak, kemik dokusu üzerine etkilerini inceleyen araştırma sayısı yok denecek kadar azdır. Bu çalışmanın amacı, ticari PCB karışımları olan Aroclor 1221 (A1221) ve 1254 (A1254) ile östradiolün kemik dönüşüm belirteçleri olan deoksipiridinolin (DPD), osteokalsin, alkalen fosfataz (ALP), kalsitonin, paratiroid hormon (PTH) ve kalsiyum (Ca) ile inorganik fosfat seviyeleri üzerine etkileri; ayrıca kemik mineral yoğunluğuna (KMY) ve kemiğin histolojik yapısı üzerine etkilerini intak ve ovariektomize (OVX) sıçan modellerinde araştırmaktır.

Deneylerde 200-220g ağırlığında dişi Wistar sıçanlar kullanıldı. Birinci deney düzeninde toplam 33 intak sıçan, dört gruba ayrıldı. Bunlara gün aşırı olarak ve 46 gün süreyle subkutan yolla sırasıyla %4'lük DMSO, A1221 (10mg/kg), A1254 (10mg/kg) ve östradiol (30µg/kg) uygulandı. İkinci modelde kullanılan toplam 33 sıçan bilateral olarak OVX edildi ve dört ayrı gruba ayrıldı. Birinci gruptaki sham OVX sıçanlara taşıt solüsyonu, diğer gruplara ise sırasıyla A1221, A1254 ve östradiol gün aşırı olarak 34 gün süreyle uygulandı. İdrar DPD seviyeleri ELISA yöntemiyle; serum osteokalsin, kalsitonin ve PTH seviyeleri immunoradiometrik metotla; ALP, Ca ve inorganik fosfat düzeyleri Olympus

marka kitler kullanılarak otoanalizörde ölçüldü. Diseksiyonla çıkartılan L2 vertebra ların histolojik yapısı ışık mikroskopuyla incelendi. Femur ve tibia KMY değerleri kemik dansitometrisi ile belirlendi.

İntak modelde A1221 veya A1254 uygulaması DPD, osteokalsin, kalsitonin, PTH, inorganik fosfat seviyeleri ile femur ve tibia KMY’de anlamlı değişiklikler oluşturmadı, fakat Ca ve ALP düzeylerinde artışlar gözlemlendi. Östradiol DPD, osteokalsin, ALP düzeylerinde azalmaya neden olurken, kalsitonin, PTH, Ca seviyelerinde ve tibia KMY’da anlamlı artışlara neden oldu. İntak kontrol değerlerine göre, sham OVX grubu DPD, osteokalsin ve kalsitonin düzeylerinde artış, Ca seviyesinde ise anlamlı azalma belirlendi. OVX sıçanlara A1221 uygulaması idrar DPD seviyesinde azalmaya, inorganik fosfat ve femur KMY’da artışa neden oldu, osteokalsin, kalsitonin, PTH, Ca, ALP düzeylerinde ve tibia KMY’da anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. A1254 ise DPD ve PTH düzeylerini anlamlı şekilde yükseltirken, L2 vertebra dokusunu da önemli oranda etkiledi. Östradiol uygulaması DPD, osteokalsin, kalsitonin seviyelerinde azalmaya, Ca, inorganik fosfat femur ile femur ve tibia KMY değerlerinde anlamlı artışa neden oldu. Sonuç olarak, A1221 ve A1254 kemik formasyon ve rezorbsiyonu üzerine etkilerinin olduğu, A1254’ün özellikle östrojen yokluğunda kemik organik matriks kaybını artırdığı kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: PCB, DPD, osteokalsin, PTH, kalsitonin, östradiol

2. ABSTRACT

Polychlorinated biphenyls (PCBs) were produced for industrial purposes and banned in several countries in the world when they were determined to be persistent pollutants in the environment. However, many PCB-containing industrial products and equipments are still in use and thus pose a threat to the environment and human health. They tend to bio-accumulate both in the environment and living organisms due to their lipophilic features and chemical stability. Several effects of PCBs including toxicity, carcinogenicity, immunosuppression and endocrine disruption have been investigated. However, there is very limited data on their actions on the bone tissue. We have examined the effects of two industrial PCB mixtures, Aroclors 1221 (A1221) and 1254 (A1254) and estradiol on bone turnover markers deoxypyridinolin (DPD), osteocalcin, alkaline phosphatase (ALP), calcitonin, parathyroid hormone (PTH), serum Ca and inorganic phosphate levels; in addition on bone mineral density (BMD) and histology in intact and ovariectomized (OVX) rat models.

Adult female Wistar rats (200-220g) were used in this study. In the first experimental model, a total of 33 animals were divided into four groups. They were subcutaneously injected with DMSO (4%), A1221 (10mg/kg), A1254 (10mg/kg) and östradiol (30µg/kg) at two daily intervals for a period of six weeks. In the second model, 33 rats were bilaterally OVX and divided into four groups. Sham OVX rats in the first group received vehicle alone, and the others A1221, A1254 and estradiol, respectively, at two daily intervals for 34 days. At the end, all animals were decapitated. Serum PTH, calcitonin and osteocalcin levels were

determined by immunoradiometric method. Urinary DPD was measured by ELISA and serum ALP, Ca and inorganic phosphate concentrations by autoanalyzer using Olympus kits. Lumbar vertebrae (L2) of all animals were dissected out and processed for light microscopy. BMD of femur and tibia were determined by bone densitometry.

Administration of A1221 or 1254 to intact rats caused no significant changes in urinary DPD and serum osteocalcin, calcitonin, PTH, inorganic phosphate levels and femur and tibia BMD values, but increases in the serum levels of Ca and ALP were observed. Oestradiol injection resulted in significant reductions in DPD, osteocalcin and ALP levels and elevations in calcitonin, PTH, Ca and tibia BMD values. In the sham OVX group, DPD, osteocalcin and calcitonin levels were significantly increased and Ca concentrations decreased compared to the intact control group. Administration of A1221 to OVX animals caused significant reduction in urinary DPD and elevation in serum inorganic phosphate and femur BMD. However, it had no significant effect on serum osteocalcin, calcitonin, PTH, Ca, ALP levels and tibia BMD. A1254 administration significantly increased urinary DPD levels and also caused important changes in the L2 vertebral bone histology. Injection of estradiol to OVX rats resulted in significant reductions in DPD, osteocalcin and calcitonin levels, and increases in Ca, inorganic phosphate, femur and tibia BMD values. Our findings indicate that both Aroclor compounds may interfere with bone formation and resorption mechanisms. In particular, A1254 increased the loss of bone organic matrix in the absence of estrogen.

Keywords: PCB, DPD, osteocalcin, PTH, calcitonin, estradiol

3. GİRİŞ

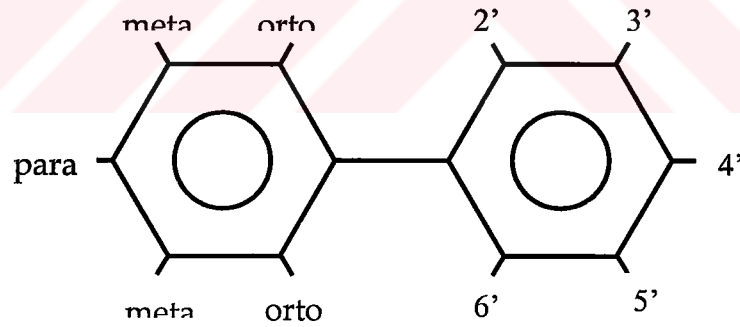
3.1. Poli klorlu bifeniller

Poli klorlu bifenil (PCB)ler, 1930'lu yıllarda endüstriyel kullanım amacıyla üretilmeye başlanan organik klorlu bileşiklerdir (5). Kimyasal ve fiziksel yapı bakımından oldukça stabil (non-flammable) maddeler olduklarından, başlıca kapasitatör, trafo, hidrolik pompa, matbaa mürekkebi, boya, pestisit ve elektrik izolasyon sıvılarının yapımında (yanmayı ve enerji kaybını önlemek için) kullanıldılar (5). PCBler, bilinen tüm kimyasal maddeler arasında doğada en kalıcı olanlardır. Lipofilik özellikleri ve kimyasal kararlılıkları nedeniyle besin zincirinde birikerek çevresel kontaminasyona neden oldukları ve insan sağlığını tehdit etmeye başladıkları anlaşılmıştır (99). Bu nedenle, 1977 yılından itibaren başta ABD olmak üzere birçok ülkede kullanımları yasaklanmış, bazı ülkelerde de sınırlandırılmıştır (5). Ancak, birçok ülkede PCB içeren endüstriyel teçhizat ve sanayi ürünleri hala kullanılmaktadır. Rusya ve Kuzey Kore'de PCB üretimine günümüzde de devam edilmektedir (29). Türkiye'nin de aralarında bulunduğu birçok ülkede (özellikle ABD, Japonya, Çin, Tayvan ve eski Doğu Bloku ülkeleri) PCB kontaminasyon alanları bulunmaktadır. Ülkemizde PCB bileşiklerinin endüstrideki kullanım boyutu tam olarak bilinmemesine rağmen, İzmir ve İzmit körfezlerinin kirlenmiş olduğuna dair bulgular vardır (9, 10, 11). Ayrıca, TEDAŞ sisteminde kullanılan birçok trafoda PCB yağı ile izolasyon yapıldığı bilinmektedir. Şöyle ki, Türkiye genelinde halen 250 ton PCB bileşiğinin çeşitli termik ve hidroelektrik santrallerde 180 adet trafo ve 2202 adet kapasitatörde kullanımda olduğu ve 10 tona yakın kimyasal maddenin de stok halinde saklandığı rapor edilmiştir (12). PCBli bileşikler linol, oleokorlin ve

ormalin adı ile 1970'den 1982 yılına kadar tarımsal amaçla kullanılmış ve kirlenmeye neden olmuştur. Genel olarak, ülkemizde PCBler ile kirlenilen alanların boyutu ve insanlardaki düzeyleri hakkında daha kapsamlı ve güncel bilimsel araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

3.1.1. Kimyasal yapıları

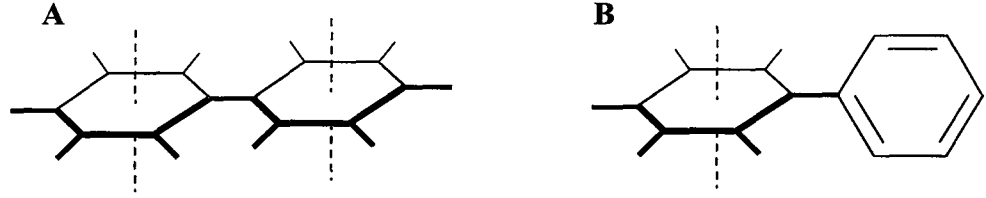
PCBler, bir bifenil yapısı üzerine değişik sayıdaki (1 ile 10 arasında) klor iyonlarının farklı konfigürasyonlarda (orto, meta ve para; Şekil 1) bağlanmasıyla meydana gelen aromatik bileşiklerdir (6). Klor iyonlarının bağlanma yeri ve sayıları nedeniyle, teorik olarak 209 farklı PCB bileşeni (congener) üretilebilir (8). Bu bileşenler International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) tarafından numaralandırılmıştır (örn. PCB 153).



Şekil 3.1. PCBlerin kimyasal yapısı.

PCB bileşenleri, klor atomlarının bağlanma pozisyonuna göre iki farklı grupta sınıflandırılırlar: Orto- pozisyonuna bağlı klor atomu yoksa planar (Şekil 3.2 A), var ise non-planar (Şekil 3.2 B) olarak isimlendirilirler (150). Meta ve para pozisyonlarına klor atomlarının bağlanması PCB bileşeninin konfigürasyonunu

değiştirmemektedir. Planar veya non-planar özellik, PCBlerin biyolojik etkilerinin derece ve yönünü belirlemede etkili olabildiğinden, önemlidir.



Şekil 3.2. Planar (A) ve non-planar (B) PCBlerin kimyasal yapıları.

PCBler farklı ülkelerde farklı ticari isimler altında ve karışımlar halinde üretilmişlerdir (29). ABD’nde faaliyet gösteren Monsanto Şirketi ve diğer üreticiler farklı klorlama dereceleriyle çeşitli karışımlar elde etmişlerdir (29). Monsanto tarafından üretilen ve Aroclor adı altında piyasaya sürülen karışımlar en yaygın olarak kullanılmıştır (29). Aroclor 1016 (A1016)’nın her molekülünde 3 klor, Aroclor 1221 (A1221)’in yapısında 1 klor, Aroclor 1242 (A1242)’nin 3 klor, Aroclor 1248 (A1248)’in 4 klor, Aroclor 1254 (A1254)’ün yapısında 5 klor ve Aroclor 1260’ın yapısında ise yaklaşık olarak ortalama 6 klor bulunmaktadır (144). PCBlerin planar ve non-planar özelliklerinin yanı sıra, bifenil halkası üzerinde bulunan klor iyonu sayısının da bu maddelerin biyolojik etki derecelerini etkiledikleri bilinmektedir (29). Bu nedenle, yukarıda belirtilen Aroclor karışımları birbirinden farklı biyolojik aktivite gösterebilmektedir. Östrojenik ve anti-östrojenik özellik taşıdıkları bildirilen, sırasıyla A1221 ve A1254 (7, 72) bu tezin konusunu teşkil ettiklerinden, ileriki bölümlerde detaylı olarak açıklanacaktır.

3.2. PCBlerin doğada ve canlılardaki metabolizması

PCBler doğada ve canlılarda en kalıcı olarak bilinen kimyasal maddeler arasında yer almaktadırlar (149). Bu bileşenler kimyasal yapılarındaki farklar sebebiyle daha az klorlu bileşenlerin sudaki çözünürlükleri daha fazladır ve daha kolay buharlaşabilirler. Bu faktörler hem bileşenlerin taşınmasını hem de yıkılma şeklini etkiler (29). PCBler yavaş bir şekilde hem aerobik hem de anaerobik yollarla yıkılırlar (2). Yüksek derecede klorlu, aynı zamanda da oldukça hidrofobik ve stabil olan PCB bileşenleri anaerobik olarak (muhtemelen klor çıkarılarak), daha hafif klorlu olanlar ise aerobik yolla yıkılırlar (1, 73). Anaerobik yol özellikle toprak ve sedimentlerdeki metabolizma için önemlidir (29). Çoğu tanımlanamamış bakteri türleri PCBlerin klor bileşenlerini çıkararak enerji elde edebilmektedir. Ancak bu bakteri türleri sadece meta- ve parapozisyonlardan klor sökebilmekte (2, 162) bu da yalnızca bileşenlerin profillerinde değişiklik yapmakta (net kayıp ise çok az miktarda) (57, 91, 127, 128) ve böylece bileşenler daha düşük klorlu bir şekle dönüşmektedirler (örneğin, A1254 doğada anaerobik metabolizma sonucu klor iyonları azaltılarak A1221'e dönüşebilmektedir). PCB bileşenlerinin konsantrasyonları bir eşik değere ulaştığı zaman anaerobik yıkım mekanizması sonuna kadar devam etmemekte ve durmaktadır (91).

Türler arasında PCBleri metabolize etme şekilleri bakımından farklılıklar olduğu bildirilmiştir (20). Bu bileşenler karaciğerde sitokrom P450 enzimleri tarafından katabolize edilirler ki bu, düşük klorlu PCBler için etkili bir yoldur (29, 67). İnsanlarda farklı PCB bileşenlerinin yarılanma ömürleri birbirlerinden çok farklı olabilmekte, düşük klorlu bileşenler için günler ya da saatler söz konusu

iken (133), çok daha fazla klorlu bileşenler için bu zaman on yıl ya da daha fazla olabilmektedir (20). Sinkkonen ve Paastavirta (147) herhangi bir ayırım yapmadan insan vücudunda bulunan PCBlerin yarı ömürlerinin 7-10 yıl arasında olabildiğini bildirmiştir. Shain ve arkadaşları düşük klorlanmış PCB bileşiklerin büyük derecede biriktirilmediğini fakat yüksek klorlanmış PCB bileşiklerin esas biyolojik birikime uğradığını kanıtlamışlardır (143). İkisinin arasında bulunan PCBlerin (5 veya 6 klorlu) farklı derecelerde biyolojik birikime uğradığını göstermişlerdir (29). En uzun yarılanma ömürlü PCB bileşikleri vücut yağ dokusunda depolandığı için, fizyolojik işlemlerde önemli değişimlere neden olmayabilirler (29).

3.3. Kontaminasyon yolları

PCBler başta sindirim olmak üzere deri yoluyla da organizmaya girebilmektedirler. PCBlerin % 90'nına oral yolla maruz kalınırken, % 10'una ise diğer yollarla maruz kalınmaktadır (161). Ayrıca son yıllarda solunum yoluyla da kontaminasyonun gerçekleşebildiği ileri sürülmüştür. Sindirim yoluyla maruziyet, kontamine olmuş olan balıkların (15) ve kümes hayvanlarının tüketimiyle olmaktadır (29). Yüksek klorlanmış ve sürekli PCB bileşiklerin dermal absorpsiyonu ve mesleki aktivitelerde dışarıdan maruz kalınması da mümkündür (29). Uzun süre kontamine olmuş suda yüzülmesiyle sudaki PCBlerin absorbe edilebileceği bildirilmiştir (64). PCBlerin plasenta yoluyla fetusa ve süt yoluyla yeni doğana transfer olduğu tespit edilmiştir (99). Meme sütündeki PCB konsantrasyonlarıyla, aynı annelerin 42 aylık çocuklarındaki plazma ve beyin omurilik sıvısı değerlerinin önemli derecede benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (99). Organizmadaki birçok sistemin fonksiyonlarının bu kritik dönemde

şekillendiği veya yönlendirildiği göz önüne alınınca, PCBlere peri-natal maruziyetin önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

PCBlerin buharlaşabildiği ve bu nedenle çok uzun bir süre içinde kaynaklarından uzaklaşarak farklı yerlerde tortu bırakabileceği öne sürülmektedir (100). Sudaki ortalama PCB buharlaşması ilk kez Fick ve Henry'nin kuralları kullanılarak hesaplanabilmiştir (29). Chiarenzelli ve arkadaşları kirlenme ve ıslanmadan sonraki tekrarlamada veya kirlenme süresindeki sediment örneklerinde bulunan küçük kontaminasyonlardaki PCBlerin buharlaşma kaybı üzerine çalışmışlardır (34, 35, 33). Buharlaşmadaki derece klor içeriğiyle ters orantılıdır (29). A1248 ile kontamine olmuş doğal sedimentle çalışanlar buharlaşmayla PCBlerin % 19'nun kaybolduğunu ve düşük klorlanmış orto- PCB bileşiklerin buharlaşmasıyla % 55'inin kaybolduğunu bulmuşlardır (29). Busshart ve arkadaşları, 600 ppm PCB içeren St. Lawrence nehrindeki kontamine olmuş sedimentin PCB kaybını incelemiş ve sedimentlerdeki kirlenme döngüsünde 24 saat süreyle havadaki total PCBlerin % 0.7-1.7 arasında kayba uğradığını belirlemişlerdir (23). Bu araştırmalar, atmosferik transport özellikle de düşük klorlanmış PCB bileşiklerinin global dağılımında önemli bir girişimdir (29).

3.4. İnsandaki PCB seviyeleri

Tabiatta uzun süre kalıcı oldukları bilinen PCB bileşiklerinin, insanlarda kan, süt ve idrar örneklerinde belirlenmesi, bu bileşiklerin insan sağlığı üzerine sergiledikleri toksik etkiler bakımından büyük önem arz etmektedir (29). Ölçümlerde kullanılan metotların benzerliği ve total PCB incelenmesi nedeniyle, farklı laboratuvarlarda yapılan ölçümler az oranda varyasyon göstermektedir (29).

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) tarafından farklı popülasyonlardaki serum PCB düzeyleri araştırılmıştır (15). ABD’nde spesifik olarak herhangi bir PCB uygulamasına maruz kalmayan toplam 4,889 insanla yapılan 12 çalışmada, serum PCB konsantrasyonun 3.88 ve 15 µg/L arasında olduğu belirlenmiştir (29). Ülkemizde son yıllarda yapılan bir çalışmada Dr. İsmet Çok ve arkadaşları Ankara’da yaşayan emziren annelerin yağ ve süt numunelerinde yedi farklı PCB bileşiğinin varlığını göstermişlerdir (41, 42) (Tablo 3.1).

Doku/PCB	28	52	101	118	138	153	180	Toplam
Süt örneği	5.7	10.3	6.6	18.9	54.3	110.0	59.8	265.6
Yağ dokusu	5.0	11.4	10.4	40.7	82.3	141.7	91.8	383.3

Tablo 3.1. Ankara’da yaşayan emziren annelerden alınan süt ve yağ dokusu örneklerindeki PCB bileşiklerinin seviyeleri (ng/g lipid ağırlığı).

Ülke/PCB	28	52	101	118	138	153	180
Polonya 1994 (n=20)	13	1.7	4.2	71.0	230.0	290.0	195.0
Belçika 2000 (n=46)	2.8	2.7	3.0	57.1	68.3	145.3	93.7
İtalya 2000 (n=10)	-	-	3.0	20.7	58.0	112.0	85.5
İspanya 2000 (n=35)	4.9	0.9	2.0	47.0	220.0	300.0	280.0
İsveç 2000 (n=28)	4.1	1.4	2.3	40.0	230.0	300.0	200.0
Şili 2000 (n=10)	-	-	-	3.2	6.2	11.0	7.8
Türkiye 2001 (n=29)	5.0	11.4	10.4	40.7	82.3	141.7	91.8

Tablo 3.2. Türkiye (Ankara) ile altı farklı ülkedeki insanların yağ dokusu örneklerindeki bazı PCB bileşenlerinin seviyeleri (ng/g lipid ağırlığı).

Türkiye'nin de içinde bulunduğu yedi değişik ülkede yapılan araştırma sonuçları ise Tablo 3.2'de sunulmuştur. Bu çalışma sonuçları PCB bileşiklerinin seviyelerinin bölgesel olarak farklılık arz edebileceğini göstermektedir. Tablo 3.2'de gösterilen PCB bileşiklerinden ilk üçünün (28, 54, 104) seviyesinin endüstriyel olarak daha gelişmiş olan ülkelere daha yüksek oluşu, bu kirleticilerin ülkemizde kullanımının halen devam etmekte olduğu konusunda şüpheler ortaya koymaktadır. Yüksek derecede klorlu olan bileşiklerin (PCB 118, 138, 153) seviyeleri ise ülkemizde Polonya, İsveç ve İspanya gibi ülkelere oldukça düşüktür. Bunun sebebi ise adı geçen ülkelere endüstrileşme sürecinde kullanılan bileşiklerin çok daha fazla olmasıdır (42).

3.5. Sağlığa etkileri

Besin zincirine girerek, insanlar da dahil olmak üzere yeryüzündeki her canlıya taşındığı bildirilen (27) bu çevre kirletici ajanların, kanserojenik (114), immün sistemi baskılayıcı, endokrin bozucu (disrupter) (13), nörotoksik (130), davranışla ilgili (32) ve teratojenik etkilerinin (3) olduğu bildirilmiştir. PCBlerin bu fonksiyonlar ile ilgili sağlığa zararlı etkileri aşağıda kısaca özetlenecek ancak esas olarak östrojenik ve anti-östrojenik özelliklerden kaynaklanan endokrin bozucu etkiler üzerinde durulacaktır.

3.5.1. PCBlerin kanserojenik etkileri

PCBlere maruziyetin kansere sebep olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (50). Bütün Arocolor karışımlarının sıçan karaciğerinde kansere yol açtığı (21, 106) ve kondansatör üretiminde çalışan insanlarda da karaciğer, safra

kesesi ve safra kanalında kanser insidansını artırdığı bildirilmiştir (19). Yine bu çevre kirleticilere maruz kalan insanlarda gastrointestinal kanal, *malign melanoma*, akciğer, beyin ve *non-Hodking* lenfomayı da kapsayan spesifik kanser türlerinde bir artışın olduğu rapor edilmiştir (36). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda karaciğer kanseri insidansının, dişi sıçanlarda erkeklere oranla daha yüksek olduğu gösterilmiş ve bunun da muhtemelen planar PCB bileşiklerinin anti-östrojenik etkilerinden kaynaklanmış olabileceği öne sürülmüştür (106).

Genel olarak karsinogeneze planar PCB bileşenlerinin sebep olduğu ve bunu da *aryl hydrocarbon* (AH) reseptörünün aktivasyonu ile gerçekleştirdikleri kabul edilmektedir. Ancak son zamanlarda giderek artan sonuçlar, daha az klorlu PCBlerin de benzer etkiler yapabileceğine işaret etmektedir (29). Oakley ve arkadaşları (114) daha düşük klor içeriğine sahip bifenillerin oksidasyonu süresince, serbest radikal ve oksidatif DNA hasarı meydana geldiğini göstermişlerdir. Safe, Aroclor 1260'ın toplam toksik eşdeğerlilik faktörlerle açıklanabildiğinden daha fazla kanserojenik olduğunu belirterek, non-planar fakat yüksek düzeyde klorlu olan fenobarbital tip PCBlerin kanserojenik sürece katkıda bulunabileceklerini öne sürmüştür (133). Kesin olmamakla birlikte, nispeten yüksek klor içeriğine sahip olan dioksin benzeri planar PCBler daha kanserojenik görünmektedirler (29).

3.5.2. PCBlerin sinir sistemi ve kognitif fonksiyonlar üzerine etkileri

İnsanlarda epidemiolojik olarak, hayvanlarda da laboratuvar ortamında yapılan araştırmalar PCBler ile kognitif fonksiyonların gelişimi arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (157). Japonya ve Tayvan'da meydana gelen iki

kitlesel zehirlenme kazasında (32, 68, 96) ve Michigan'da annelerin PCBlerle kontamine olmuş balık yemesiyle (78, 79, 80, 81) prenatal olarak PCBlere maruz kalan çocuklarda, görsel hafızada eksiklik, daha zayıf kısa süreli hafıza, davranış anomalileri ve kognitif fonksiyonlarda kayıp gibi sinir sistemiyle ilgili fonksiyonlarda defektler olduğu saptanmıştır. Bu çocuklara 11 yaşına geldiklerinde uygulanan zeka testlerinde, PCBlere en çok maruz kalanlarda 6.2 puanlık bir kayıp olduğu tespit edilmiştir (29). Doğumdan sonra anne sütüyle beslenen çocuklarda da PCBlere maruz kalınması sonucu (29) sinir sistemi ve davranış üzerine benzer olumsuz etkiler gözlenmiştir (32). İnsanlarda görülen bu kognitif defektlerin bir kısmı maymunlarda (138) ve diğer havan türlerinde de (93, 163) belirlenmiştir. Bu nörotoksik etkilerin beyinde dopamin (141) ve glutamat (63) serbestlemesinde, sinaptik plastisitede (112) ve kalsiyum homeostazisinde (99) meydana gelen değişiklikler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

PCBlerin sinir sistemi ve davranış üzerine olan etkilerinin çoğu non-planar bileşenler tarafından meydana getirilir (28). Ancak planar PCBlerin toksik etkilerine işaret eden çalışmalar da mevcuttur (24, 52, 71). Bu sonuçların çoğu *in vivo* çalışmalardan elde edildiği için sinir sistemi üzerine olan etkilerin bazıları endokrin sistemin bozulmasının (tiroid ve cinsiyet hormonları) bir sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir (124, 177).

3.5.3. PCBlerin immün sistem üzerine etkileri

Bu çevresel kirleticilerin immün sistemi nasıl etkiledikleri sorusu birçok araştırmaya konu olmuştur. PCBlerin genel olarak immün sistemin baskılanmasına neden olduğu bildirilmiştir (29). Bu maddelerin humoral (60) ve hücreli immünite

(148) üzerine etkilerinin olduğu hem insanlarda hem de sıçan, fare ve maymun gibi hayvan türlerinde gösterilmiştir (31, 169). Planar PCBlere maruz kalınmasının, *in vivo* T lenfosit aktivitesi ve antikor üretimini azaltarak immün fonksiyonları zayıflattığı öne sürülmüştür (90, 145). Yine insanlarda (31) ve hayvanlarda (58), hem PCBler (165, 176) hem de dioksinin (107) immün sistemde baskılanma ve timik atrofiye sebep olduğu gösterilmiştir. Yoo ve ark., PCBlerin dalakta doz ve zaman bağımlı olarak apoptozisi hızlandırdığı ve hücre canlılığında kayba sebep olduğunu bildirmişlerdir (174). Literatürdeki bilgilere göre, planar PCBlerin immün baskılayıcı etkilerini, timus hücrelerini apoptozis yoluyla öldürmek suretiyle sergiledikleri sanılmaktadır (43). Bizim laboratuvarımızda yapılan yeni bir çalışmada, iki farklı PCB bileşiğinin (PCB 52 ve 77) fare timus kültürlerinde sitokin salınım profilini Th1 yönünde değiştirdikleri, ancak bu etkinin test edilen PCBlerin planar veya non-planar konfigürasyonu ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir (137).

Chang ve arkadaşları, PCBlerin insanlarda IgA ve IgM'nin konsantrasyonunu azalttığını, T hücrelerine etki ettiğini fakat IgG'ye etki etmediğini belirtmişlerdir (31). Benzer değişiklikleri A1254'e maruz bırakılan maymunlarda da gözlemlemişlerdir (150). PCBlerin immünotoksik etkilerinin AH reseptörleri yolu üzerinden meydana geldiği bildirilmesine rağmen (146) az da olsa bazı immünotoksik bileşikler etkilerini AH reseptör aktivasyonundan bağımsız olarak gösterebilirler (75).

3.5.4. PCBlerin endokrin bozucu etkileri

Ksenohormonlar, vücudun doğal hormonlarının etkilerini taklit ederek veya antagonize ederek endokrin sistem homeostazını bozan maddelerdir (38). Bu etkilerini östrojen ve androjen reseptörlerini uyararak veya bloke ederek gösterdiklerine inanılmaktadır (104). Bazı PCB bileşiklerinin de ksenohormon özelliği taşıdığı da gösterilmiştir (39, 108). PCBlerin endokrin bozucu etkileri esas olarak östrojenik, anti-östrojenik ve anti-androjenik özelliklerinden kaynaklanmaktadır (104, 173). Ayrıca PCBler, insülin (56) ve tiroid hormonlarının (108) serbestlenmesini değiştirmek suretiyle de endokrin bozucu etkiler gösterirler.

3.5.4.1. İnsülin hormonu üzerine etkileri

PCBlerin *in vivo* olarak pankreas beta hücrelerinde morfolojik değişikliklere sebep olduğu (170), *in vitro* olarak ise beta hücrelerinden insülin serbestlenmesini arttırdığı bildirilmiştir (55, 56). İlginç olarak, *in vitro* çalışmalarda non-planar bileşenler daha güçlü etkiler sergilerken, dioksine maruz kalınmasıyla diyabette artış meydana gelmesi arasında ilişki olması, planar bileşenlerin de beta hücreleri üzerine etkilerinin olduğunu düşündürmektedir (74).

3.5.4.2. Tiroid hormonları üzerine etkileri

PCBlerin tiroid bezinin yapısında ve serum tiroid hormonu seviyelerinde bir azalmaya sebep olduğu Collins ve Capen tarafından bildirilmiş (37) ve bu sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da desteklenmiştir (66, 123). Bazı araştırmacılar ise, PCBlere ani bir cevap olarak tiroid hormonlarının yükseldiğini ve daha sonra da bunu bir düşüşün izlediğini bildirmişlerdir (70). PCB bileşenlerinin

tamamı tiroid fonksiyonlarını değiştirmez. Yapısal özellik (planar, non-planar) ve etki mekanizması arasındaki ilişki henüz tam olarak açıklanamamıştır (29). PCBlerin tiroid fonksiyonları üzerine olan etkilerinin, tiroid hormonlarına yapısal olarak benzer olmalarından dolayı olabileceği öne sürölmüştür (120). PCBlerin yapısında klor, tiroksinin yapısında da iyot bulunmasına rağmen benzer birçok özelliğe sahiplerdir (29). PCBlerin etki mekanizmaları için ileri sürölen bir diğer önemli hipotez de, tiroid hormonlarıyla aynı taşıyıcı globulinlere bağlanmak için yarıştıkları ve proteine bağlanamayan tiroid hormonlarının yıkıma uğradığıdır (86, 139). Tiroid hormonlarının her yaşta önemli fonksiyonları vardır ve bunlar özellikle gelişme döneminde daha büyük önem arz eder (119). Normal tiroid fonksiyonları zihinsel gelişim için de önemlidir.

3.5.4.3. Östrojenik etkileri

Östrojen reseptörü (ER) nükleer reseptör süperfamilyasına aittir. Doğal ligandı olan 17- β -östradiol reseptöre bağlanınca, ER'nün Hsp 70, p 60 gibi proteinlerden ayrılması ile sonuçlanan bir seri konformasyonel değişiklikler başlar. DNA'daki spesifik ilerleticiye (estrogen responsive element) bağlanan hormon+reseptör kompleksi, transkripsiyonel aktivasyonu başlatır (104). Bazı PCBler ER ile direk olarak etkileşime girip endojen ligandı (17- β -östradiol) uzaklaştırma ve sonunda illegal olarak uyarma potansiyeline sahiptirler (29). Ayrıca, son zamanlarda DNA üzerinde bulunan ve ksenoestrogenlerin etkilediği bir "xenobiotic response elementin" (XRE) varlığı rapor edilmiştir (65).

Östradiol etkilerini esas olarak ER α üzerinden göstermekle beraber, bir diğer reseptör tipinin (ER β) varlığı da gösterilmiştir (164). Ancak, östradiolün ER β

üzerinden meydana getirdiği reseptör aktivasyonu, ER α 'ya kıyasla oldukça zayıf kalmaktadır. Bununla birlikte, bazı ksenoöstrojenlerin her iki reseptör tipine de aynı affiniteyi gösterdikleri bildirilmiştir (95). *Northern blot* yöntemiyle ER β ekspresyonu özellikle testis ve ovaryumlarda gösterilmiştir.

PCBlerden kimyasal yapı bakımından östradiol-17- β 'ya benzeyen bileşiklerin ER'ne bağlanma potansiyeline sahip oldukları bildirilmiştir (29). PCBlerde bifenil halkası üzerinde 2 ve 6 pozisyonlarına klor atomlarının bağlanmasıyla uzaysal konfigürasyon değişmekte ve bileşiğin aldığı şekil “non-planar” olarak adlandırılmaktadır (29). Bu non-planar yapıdaki bileşenlerin östradiol-17- β 'ya benzediği ve bu nedenle östrojenik aktivite gösterdikleri ileri sürülmüştür (54). Ayrıca, klor atomu sayısının da molekülün özelliğini etkileyebileceği ve düşük klora sahip PCBlerin östrojenik aktivite göstermeye meyilli oldukları bildirilmiştir (14). İşte tüm bu östrojenik kirleticilere maruziyet, kadınlarda çeşitli fertilite problemlerinin yanı sıra özellikle meme ve endometriyum kanseri için önemli bir çevresel faktördür (134, 18). Östrojenik ksenohormonlara maruziyetin özellikle laktasyon ve menopozdaki kadınlarda kemik yapım ve yıkımını nasıl etkileyebileceği bugüne kadar araştırılmış değildir.

3.5.4.4. Anti-östrojenik etkileri

Dioksin (TCDD) ve yapısal olarak buna benzeyen PCBler düzeysel (planar) bir yapıya sahiptirler ve etkilerini sitoplazmik AH reseptör (AHR)'üne bağlanarak gösterirler (132, 101). Bir sitoplazmik reseptör olan AHR'nin dioksiin ve benzeri ajanlar tarafından aktivasyonu ile “AHR nuclear translocator protein” şekillenir ve bu kompleks de DNA'da spesifik XRE'ye bağlanarak transkripsiyon

prosesini başlatır (122). AHR agonisti bileşiklerin meme kanseri hücrelerinde sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) ve 1B1 (CYP1B1) ekspresyonunu indükledikleri ve bu yolla östrojen metabolizmasını (yıkımını) artırarak hücre içi hormon seviyesini azalttığı gösterilmiştir (154). Dioksin ve benzeri PCB bileşiklerinin anti-östrojenik etki mekanizmasının bu şekilde oluştuğuna inanılmaktadır. Yüksek sayıda klor atomuna sahip PCBlerin de anti-östrojenik etki göstermeye eğilimli oldukları bildirilmiştir (134). AHR antagonistleri ile yapılan *in vitro* deneyler (167) ve AHR *knock-out* farelerde yapılan testlerde de benzer bulgular gözlenmiştir (22).

3.5.4.5. Androjenik ve anti-androjenik etkileri

Yukarıda açıklanan ER aktivasyonuna benzer şekilde, testosteron başta olmak üzere androjenik hormonlar da bir nükleer reseptör süperfamilyasına ait olan androjen reseptörü (AR)'ne bağlanarak etkilerini gösterirler. AR de DNA üzerinde “androgen responsive element”e bağlanarak gen transkripsiyonunu uyarır (104). Bir fungusit olan vinklozolinin metaboliti enalilid gibi bazı eksojen ajanların AR'ne bağlanarak agonistik etkiler oluşturabileceği bildirilmiştir (171). Toksafen, p,p'-DDE gibi bazı çevresel ajanlar ise AR'ne bağlanarak bloke ederler ve sonuçta anti-androjenik etkilere neden olurlar (89). Bunun dışında ketokonazol gibi bazı ajanlar da direk olarak Leydig hücrelerine etki ederek testosteron sentezini (17 β -hidroksilazı bloke ederek) baskılayabilirler (82). Erkek çocukların bu tür çevresel kirleticilere özellikle puberte döneminde maruz kalması, erkek cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkması dahil çeşitli fonksiyon bozukluklarına yol açabilir. Çevresel ajanlara maruziyetin erişkinlerde de oligospermi, azospermi, impotans

gibi fertilite problemlerine neden olabileceği ve testis kanseri insidansını artırabileceği bildirilmiştir (134, 104).

3.6. İskelet ve kemik dokusu

Destek dokuları arasında gerçek anlamda destekleme görevi yapan doku kemik dokusudur (135). Organizmaya biçim kazandırıp, organizmanın yükünü taşıyan da yine kemiklerin oluşturduğu iskelettir (135). Kemikler vücutta kalsiyum, fosfor ve diğer minerallerin başlıca depolandığı yerdir (135). Ayrıca kemik, kan hücrelerinin kemik iliğinde üretimi ve depolanması gibi yaşamsal fonksiyonlara sahiptir. Histolojik ve makroskopik olarak iki kısımdan oluşur: kompakt (kortikal kemik) ve spongiyöz (trabeküler kemik). Kortikal kemik iskeletin % 80'ini oluşturur, trabeküler kemikten çok daha yoğundur ve metabolik aktivite düzeyi düşüktür. Femur gibi uzun kemiklerde daha yüksek oranda bulunur. Trabeküler kemik ise iskeletin ve kemik dokusunun % 20'sini teşkil eder, ancak metabolizmanın çok aktif olduğu ve mineral değişimin yaklaşık % 80'inin meydana geldiği bölgedir. Vertebra korpusları gibi kemiklerde oranı daha fazladır.

Kemik dokusu esas olarak iki kısma ayrılır; A) Ekstraselüler doku B) Hücreler. Tablo 1'de kemik dokusu ve içeriği özetlenmiştir (87).

A-) Ekstraselüler doku: Organik matriks (%35):

Tip I Kollajen (%95) +

Osteokalsin, osteonektin, a2 Hs Lipotropin

proteoglikan, Glikozamin, Lipidler (%5)

İnorganik matriks (%65):

Hidroksiapatit kristalleri, kalsiyum, sodyum,
magnezyum sülfat, fosfor

B-) Hücreler: Osteosit, Osteoklast, Osteoblast, Osteoprogenitor

Tablo 3.3. Kemik dokusu ve bileşenleri.

Diğer destek dokularında olduğu gibi, kemik dokusunda da, hücreler azınlıktadır; dokunun esasını matriks adı verilen temel madde oluşturur (135). Ancak ne var ki, diğer destek dokularında temel madde sadece organik öğelerden meydana geldiği halde, kemik dokusunun temel maddesinde inorganik maddeler de vardır ve bunlar temel maddenin kuru ağırlığının aşağı yukarı yarısını oluştururlar (135). Kemik dokusuna sertlik kazandıranlar inorganik maddelerdir (135). İnorganik maddelerin başında, % 85’lik bir payla kalsiyum fosfat gelir (135). Bunu kalsiyum karbonat (% 10) izler (135). Ayrıca, az miktarda olmak üzere, kalsiyum florid ile, magnezyumun florid, hidroksit ve sülfat bileşikleri de bulunur (135). Kalsiyum ve fosfor, hidroksiapatit adı verilen iğne biçiminde kristaller oluştururlar (135). Bunların yüzeylerinde de, diğer iyonlarla su molekülleri ince bir tabaka halinde toplanırlar (135).

Temel maddenin organik bölümü, diğer destek dokularında olduğu gibi iplikler ve şekilsiz temel maddeden meydana gelir (135). Organik maddelerin %95 kadarını, I. tip kollajen iplikler oluştururlar (135). Çok sert olmasına karşın, kemiklerin kolay kırılmamalarını sağlayan ögeler, bu kollajen ipliklerdir (135). Kıkırdak dokularına kıyasla daha az miktarda olan şekilsiz temel maddeyi, proteoglikanlar (kondroitin-4-sülfat, kondroitin-6-sülfat, keratan sülfat), glikozaminoglikanlar (hiyaluridik asit) ve glikoproteinler (osteonektin) meydana getirirler (135).

3.6.1. Kemik dokusunun histolojik yapısı

Kompak kemikler: Bu tür kemik dokusu, gözle bakılırsa homojen ve kompakt görünür (135). Ancak bundan yapılan preparatlar mikroskopla incelendiğinde, dokunun kanallar sistemi ile donanmış olduğu görülür. Kompakt kemik dokusunda iki türlü kanal vardır. Bunlar, Havers ve Volkmann kanallarıdır. Havers kanalları kompakt kemiğin uzun eksenine paralel düşecek şekilde ve aralıklarla yerleşmişlerdir. Volkmann kanalları ise, komşu Havers kanallarını birbirine bağlayan yan kollarıdır. Kemiklerin yüzeylerindeki besleyici deliklerden (foramen nutritium) giren kan damarları, volkmann kanallarından geçerek Havers kanallarına girer ve dallanarak iki yönde seyrederek (135). Bunlardan ayrılan yan kollar, daha içteki Volkmann kanallarından geçerek daha derinlerdeki Havers kanallarına girerler.

Spongiyöz kemikler: Bu kemik dokusu ince trabeküllerden oluştuğundan, bunların içinde Havers ve Volkmann kanalları, dolayısıyla da damarlar hemen hemen hiç bulunmazlar (135). Bunlar besin maddelerine, aralarını dolduran kemik

iliğinde bol olarak bulunan kan damarlarından, kanaliküller ve bunların içinde bulunan sitoplazma uzantıları aracılığı ile alırlar.

3.6.1.1. Kemik dokuda belirgin dört hücre tipi vardır

a) Osteoprogenitor hücreler: Osteoblastlara değişen ve kemik matrikslerini salgılayan kalıcı hücrelerdir (135). Kemiklerin dış ve iç yüzeylerinde bulunurlar.

b) Osteoblastlar: Kemik matriksini salgılayan hücrelerdir (135). Başlangıçta mineralize olmayan kemiği (Osteoid) oluşturan kollogen ve temel maddeyi salgırlar. Aynı zamanda matriksin kalsifikasyonundan da sorumlulardır.

c) Osteositler: Olgun kemik hücreleridir; osteoblastlar tarafından salgılanan kemik matriksi ile kuşatılmışlardır (135). Osteoblastlardan farklılaşırlar ve kemik matriksinin korunmasından sorumlulardır. Kemik matriksi sentezleme ve sınırlı oranda da rezorbe etme yeteneğine sahiplerdir. Bu aktiviteler kan kalsiyum seviyesinin dengede tutulabilmesi için önemlidir. Osteosit hücre biçimine uygun bir boşluk ya da lakuna içinde bulunur.

d) Osteoklastlar: İşlevleri kemiği rezorbe etmek olan iri, çok çekirdekli hücrelerdir (135). Aktif oldukları zaman doğrudan kemiğin yüzeyinde rezorbsiyonun oluşacağı yerde kalırlar. Osteoklastlar sadece büyüklükleri ile değil, çok belirgin bir şekilde asidofilik olmaları ile de dikkat çekerler. Aynı zamanda çok sayıda lizozomlara sahip olmalarından dolayı da asit fosfataz için kuvvetli histokimyasal reaksiyon verirler (135).

3.6.2. Kemik Döngüsü

Kemik yaşam boyu sürekli yapılan, yıkılan canlı bir dokudur. Büyüme çağında kemik formasyonu rezorbsiyonundan daha fazladır ve büyüme kıkırdakları henüz kapanmadığı için şekil değiştirerek büyüme meydana gelir. Bu olaya şekillenme (modelling) denir. Büyüme kıkırdağı kapandıktan sonra kemikte meydana gelen yapım ve yıkım olayları ise yeniden şekillenme (remodelling) olarak adlandırılmaktadır. Önce osteoklastik hücreler kemik yüzeyine gelir, yapışır ve rezorbsiyon olayı başlar. Bu safhadan sonra kemik yüzeyinde açılan çukurcularda osteoblastlar birikerek yeni kemik oluşmaya başlar. Kemik üzerinde rezorbsiyon fazı yaklaşık olarak 50, formasyon dönemi ise 150 gün kadar olmak üzere toplam 200 günde yeniden şekillenme tamamlanmış olur (17).

3.6.2.1. Kemik döngüsünde etkili olan faktörler

Kemik "remodelling"i genetik program, mekanik yükleme, beslenme ve hormonlar gibi pek çok faktör tarafından kontrol edilmektedir (87). Hücrelerin proliferasyonu, farklılaşmaları ve sekretuar aktiviteleri çeşitli hormonlar, sitokinler ve büyüme faktörlerinin kontrolü altında gerçekleşmektedir. Kemik dokusunun yeniden şekillenmesinde etkileri olan hormonlar şu şekilde sınıflandırılabilir (175).

- a) Polipeptid hormonlar: Paratiroid hormon (PTH), kalsitonin, büyüme hormonu;
- b) Tiroid hormonları: tiroksin ve triiodotironin,
- c) Steroid hormonlar: Vitamin D, kortikosteroidler ve gonadal steroid hormonlar.

PTH, osteoblastlar üzerinden osteoklastları etkileyerek kemik rezorbsiyonuna yol açar. Bununla birlikte, düşük doz ve aralıklı olarak uygulanan

PTH'nın kemik formasyonunu başlatıcı etkisinin olduğu bildirilmiştir (87). Kalsitoninin kemik rezorpsiyonunu inhibe edici etkisi iyi bilinmekle birlikte kemik formasyonunda etkisi için ise bir kanıt bulunamamıştır (87). Büyüme hormonu, normal kemik dokusu gelişimi için gerekli bir hormondur. D vitamini kemik matriksinin kalsifikasyonu için gereklidir. Kortikosteroid hormonların fizyolojik sınırlar üzerindeki düzeyleri primer olarak kemik yapımını baskılayarak kemik kütlesinin kaybına neden olurlar. Osteopeni, osteoporoz ve kemik kırıkları yüksek kortikosteroid serbestlemesinin sonucu olarak ortaya çıkar. Ancak, kortikosteroidlerin bu etkilerini hangi mekanizmayla meydana getirdikleri günümüzde henüz aydınlatılmış değildir (102). Tiroid hormonlarının da kemik formasyon ve rezorpsiyonunda etkili oldukları uzun zamandan beri tartışılmaktadır. Günümüzde genel olarak, hipertiroidizmin kemik kütlesi üzerine negatif etkilerinin sınırlı veya hiç olmadığı, ancak hipotiroidizmin kemik kaybına ve kırıklara yol açtığı kabul edilmektedir (97). Östrojen ve androjenler, kemik rezorpsiyonunun önlenmesi ve kemik bütünlüğünün korunması için çok önemli olan hormonlardır (87).

3.6.2.2.Osteoporoz

Kemiklerin kütle kaybetmesine yol açan ve oldukça yaygın görülen bir kemik metabolizması hastalığıdır. Kemiğin mineral ve matriksinin eşit oranlarda azalarak normal değerlerin altına inmesi ve buna bağlı olarak kırık riskinin artması veya spontan kırıkların oluşması haline osteoporoz denir (87). Osteoporozda kemik organik matriksinin azalması özellikle önemlidir. Kemik

dokusunun yapısal bozulmasıyla karakterize olan osteoporoz %80 oranında kadınları etkilemektedir.

Primer osteoporoz olarak da bilinen postmenopozal kemik kaybının başlıca nedeni gonadlardan östrojen serbestlenmesinin önemli oranda azalması, hatta durmasıdır (87). Normal kemik kütlesini idame ettirebilmek için gerekli olan kritik kan östrojen düzeyinin 40-50 pg/ml olduğu bildirilmiştir (153). Östrojenin kemik dokusunu koruyucu etkilerini gösterdiği mekanizmalar, güncel literatür ışığında aşağıda özetlenmiştir.

3.6.2.3. Östrojenin kemik döngüsünde etkileri

Kemik dokusunda düzenleyici fonksiyon gören bazı osteoblastların östrojen reseptörleri (alfa ve beta) taşıdığı, osteosit ve osteoklastların ise bu reseptörlere sahip olmadığı gösterilmiştir (49, 117). Östrojen, kemik dokusunu koruyucu etkilerini farklı mekanizmalar aracılığı ile gösterebilir.

Östrojenin kemik dokusundaki en önemli etkisi, osteoblastlarda kemik rezorbsiyonunu sağlayan sitokinlerin oluşumunu baskılayarak, kemik erimesini önlemektir (152). Östrojen esas olarak kemikte hücresel düzeyde osteoklastların olgunlaşmasını baskılayarak sayılarını azaltmaktadır. Bu etkisinin sitokinler aracılığı ile olduğu sanılmaktadır (168). Kemik rezorbsiyonuna neden olan sitokinler olarak başlıca IL-1, IL-6 ve TNF- α ; gösterilmektedir (16, 103). Bunlardan özellikle IL-6'nın osteoklast aktivitesini indüklediği bilinmektedir (53). Bu faktörler kemik ve kemik iliğinde lokal olarak yapılmakta olup östrojen eksikliği veya yokluğunda bol miktarda salgılanmaktadır. Östrojenin osteoklastların olgunlaşmasını ve aktivasyonunu baskılamasında bu sitokinlerin önemli görevleri

olmakla beraber, çok sayıda başka sitokinlerin de burada rol aldığı bildirilmiştir (53, 61). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, östrojen eksikliğine bağlı olarak gelişen kemik kaybından sorumlu tek bir sitokinin olmadığı, sitokinlerin sinerjistik etkileri de dahil farklı mekanizmaların etkili olduğu bildirilmiştir (85).

Östrojenin prostaglandin (PGE_2) sentezini artırarak kemik dönüşümünü azalttığı da ileri sürülmüştür (140). Normal kemik yapımının devamı için büyüme hormonu ve dolayısıyla IGF-1 gereklidir (84). Östrojenin IGF-1 ve TGF gibi büyüme faktörlerinin sentezini artırarak kemik formasyonuna yardımcı olduğu da bildirilmiştir (105).

3.6.2.4. Kemik döngüsü belirteçleri

Osteokalsin, kemik döngüsünün özellikle formasyon fazını gösteren bir biyokimyasal belirteçdir (44). Yarı ömürleri kısa olup; hemen tamamı böbrekler tarafından atılır (87). Alkalen fosfataz (ALP), kemik formasyonunu gösterir (87). Kemikte osteoblastlarda bulunur ve osteoblastların fosfolipaz ile muamelesi sonucunda dolaşıma salınır. Kemik spesifik enzim aktivitesinin ölçümü ile kemik döngüsü ile ilgili daha spesifik bilgilerin elde edilmesi olanaklıdır (87). İdrardaki hidroksiprolin, kollajen yıkımı sonucu serbestleşir ve yaklaşık % 90'ı böbrekler tarafından reabsorbe edilirken, % 10'u idrarla atılır (87).

Kemik döngüsünde etkili olan biyokimyasal faktörler Tablo'2 de gösterilmiştir (87).

Formasyon belirteçleri	Rezorpsiyon belirteçleri
Serum alkaleen fosfataz	İdrar hidroksiprolini
- Total aktivite	İdrar hidroksilizin glikozidleri
- Kemik spesifik enzim aktivitesi	Pridinolin çapraz-bağları
Serum osteokalsin (BGP)	- Total piridinolinler (Pyr veya Dpy)
Serum tip I kollajen peptidleri	- Serbest pridinolinler (Pyr veya Dpy)
- C-terminal propeptid (PICP)	- Çapraz bağ C veya N telopeptidler
- N-terminal Propeptid (PINP)	Serum tartarat rezistant asid fosfataz

Tablo 3.4. Kemik döngüsü biyokimyasal belirteçleri.

3.7. Literatür ışığında konunun önemi

PCBler lipofilik özellikleri nedeniyle besin zincirinde birikme eğilimi gösterirler (29). Klor atomlarının bifenil halkası üzerindeki pozisyonlarının yanı sıra (planar ve non-planar) sayıları da PCB bileşiklerinin biyolojik etkilerinin derecesini ve yönünü etkileyebilmektedir (29). Ticari PCB karışımları olan A1221'in östrojenik, A1254'ün ise anti-östrojenik özellik gösterdiği bildirilmiştir (7, 72). Bu etkileri, A1221'in az, A1254'ün ise çok sayıda klor atomu içermesine atfedilmektedir. Bu Aroclor karışımlarının toksik ve kanserojenik özellikleri birçok araştırmaya konu olmuştur (50). Ancak, A1221 ve A1254'ün kemik dokusu üzerine etkilerini inceleyen araştırma sayısı yok denecek kadar azdır (4). Kemik formasyon ve yıkımının östrojen ve çevresel östrojenik ve anti-östrojenik potansiyele sahip ajanlarla ilişkisi ise şimdiye kadar incelenmemiştir.

AMAÇ

Bu projenin amacı, ticari PCB karışımları olan A1221 ve 1254 ile östradiol'ün

- a) Kemik formasyon ve rezorbsiyonunu düzenleyen hormonlar,
- b) Kemik formasyon ve yıkım belirteçleri,
- c) Kemik mineral yoğunluğu ile serum kalsiyum ve inorganik fosfat düzeyleri ve
- d) Kemik dokusu histolojisi üzerine etkilerini intak ve ovariektomize (ovx) sıçan modellerinde araştırmaktır.



4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney hayvanlarının bakım ve beslenmeleri

Çalışmada F.Ü. Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden sağlanan, 200-220 gr ağırlığında 66 adet Wistar cinsi dişi sıçan kullanıldı.

Tüm hayvanlar 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ve standart oda sıcaklığı ($21\pm1^{\circ}\text{C}$) sağlanan ortamda, her gün temizlenen pleksiglas kafeslerde, dörderli gruplar halinde tutuldu. Hayvanlar çeşme suyuyla ve Elazığ Yem Fabrikası'nda hazırlanan pelet halindeki özel sıçan yemiyle beslendi. (Tablo 4.1).

Maddenin adı	Birim	Değer
Kuru madde	%	93,69
Ham protein	%	34,15
Ham yağ	%	3,00
Metabolik enerji	Kcal/kg	2095
Kalsiyum	%	3,36
Sodyum	%	1,09
Magnezyum	%	0,50
Çinko	mg/kg	286,80
Demir	mg/kg	920,00
Bakır	mg/kg	29,33
Ham maddeler	Balık unu, mısır, buğday, ayçiçeği küspesi, çavdar ve mineral maddeler	

Tablo 4.1. Sıçan yeminin bileşimi ve kalori değeri.

4.2. Kimyasal maddeler

Aroclor 1221 (A1221) ve Aroclor 1254 (A1254) AccuStandard Inc.'dan (New Haven, CT, USA); östradiol ise Sigma Chemical Co.'dan (St. Louis, MO,

USA) temin edildi. PCB karışımı olan Aroclor bileşikleri % 4'lük Dimetil Sülfoksit (DMSO; Amresco, Ohio, USA) içerisinde çözüldü. Taşıt solüsyonun hazırlanması için, DMSO (0.5 ml) serum fizyolojik (11.5 ml) ile seyreltildi.

4.3. Deney dizaynı

4.3.1. Birinci deney düzeni

Bu bölümde kullanılan toplam 33 intak dişi sıçan, dört gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (n=9) subkutan yolla % 4'lük DMSO (0.5 ml/sıçan) enjekte edildi. İkinci (n=8) ve üçüncü (n=8) gruptaki sıçanlara ise sırasıyla Aroclor 1221 ve Aroclor 1254 10 mg/kg dozunda subkutan (0.5 ml) olarak uygulandı. Diğer bir grup (n=8) hayvana da 30 µg/kg dozunda östradiol (0.5 ml) uygulandı. Tüm gruplardaki enjeksiyonlar gün aşırı olarak ve 46 gün süreyle (toplam 23 doz) gerçekleştirildi.

4.3.2. İkinci deney düzeni

Bu deneylerde kullanılan toplam 33 dişi sıçan aşağıda açıklanan şekilde bilateral olarak ovarektomize (OVX) edildi ve daha sonra dört ayrı gruba ayrıldı. Birinci gruptaki sıçanlar (n=9) sham OVX olarak ayrıldı ve bu hayvanlara taşıt solüsyonu olan DMSO % 4'lük oranında subkutan yolla (0.5 ml/sıçan) enjekte edildi. İkinci (n=8) ve üçüncü (n=8) grup OVX sıçanlara sırasıyla Aroclor 1221 ve Aroclor 1254 subkutan olarak 10 mg/kg dozunda (0.5 ml) uygulandı. Dördüncü gruptaki (n=8) hayvanlara ise aynı yolla östradiol (30 µg/kg/0.5 ml) uygulandı. Tüm gruplardaki enjeksiyonlar gün aşırı olarak ve 34 gün süreyle (toplam 17 doz) gerçekleştirildi.

4.4. Ovarektomi

İkinci deney düzeneğindeki sıçanlar, kas içi yolla uygulanan 60mg/kg ketamin (Eczacıbaşı, İstanbul) ve 5 mg/kg rompun (Bayer, İstanbul) kombinasyonu ile genel anesteziye alındı. Hayvanlar dorso-ventral pozisyonda diseksiyon tahtasına yatırıldı. Sırtın orta kısmı ile kuyruk kaidesi arasında kalan abdominal bölge üzerindeki tüyler kesilerek temizlendi ve etil alkol ile silindi. Temizlenen abdominal bölgenin merkez kısmında orta hatta makasla küçük bir deri insizyonu (0.5-1 cm) gerçekleştirildi. Bir makas insizyon yerinden deri altına sokularak bağ dokusu ayrıldı, sonra kas tabakası kesildi ve periton boşluğuna ulaşıldı. Ovaryum, insizyon bölgesinden ucu küt bir pens yardımıyla kendisini çevreleyen yağ tabakasıyla birlikte ovaryuma dokunulmadan dikkatlice çekildi (çünkü ovaryumdan kopan parçalar tekrar implante olabilir ve normal fonksiyonunu devam ettirebilir). Dışarıya alınan ovaryumlar, uterus tüpü ile birleştiği yerin hemen altından ligatüre edilerek makas yardımıyla bütünüyle kesildi. İşlem bittikten sonra kas tabakası ve deri 4.0 ipek iplik ile dikildi ve yara kenarlarına betadin sürüldü. Bu işlem bilateral olarak gerçekleştirildi ve hayvanlar iyileşme süresince (15-25 gün) bireysel kafeslerde tutuldu.

4.5. İdrar örneklerinin toplanması

Deneylerin sonunda (son enjeksiyondan 48 saat sonra), sabah 08:⁰⁰-10:⁰⁰ arasında her bir sıçan dönüşümlü olarak elle tutuldu ve ependorf tüpler içine idrar toplandı. Her hayvandan yaklaşık olarak 500 μ l idrar elde edildi.

4.6. Serum elde edilmesi

İdrar örneklerinin toplanmasından hemen sonra (10:⁰⁰-12:⁰⁰) sıçanlar dekapite edildi. Kan örnekleri cam tüplerde toplandı ve daha sonra +4°C’de 10 dk süreyle santrifüj (3000 devir/dk) edildi. Elde edilen serum örnekleri kuru buz içine yerleştirilmiş 1.5 ml’lik plastik ependorf tüplere transfer edilerek hemen donduruldu ve analiz edilinceye kadar -80°C’de saklandı.

4.7. Femur, tibia ve vertebra diseksiyonu

Dekapitasyondan sonra, kemik dansitometri ölçümleri ve histolojik incelemeler için, femur, tibia ve lumbar vertebra (L2) diseksiyonla çıkartıldı.

4.8. Kemik dansitometri ölçümleri

Femur ve tibianın kemik mineral yoğunluğu (KMY) kemik dansitometrisi ile belirlendi. KMY ölçümleri kemik dansitometrisi (Lunar, Madison, WI, USA) ile küçük hayvanlarda ölçüm için hazırlanmış ve bu amaçla kullanılabileceği gösterilmiş olan özel yazılım programı (DPX, Small Animal Software Version 4.6d) ile yapıldı. Bu kemik dansitometrisi sabit 76 kVp gücünde X-ray üretmek üzere programlandı. Tarama esnasında her ölçüm noktası 0.6-1,2 mm boyutlarındaydı. DEXA cihazı ile ölçüm masasının ortasında femur

başlangıcından tibia sonlanması kadar 1/32 oranında aralıklarla seri transvers tarama yapıldı. Tarama hızı yüksek çözünürlük (high resolution) – orta mod olarak belirlendi ve her bir ölçüm yaklaşık 5 dakikada tamamlandı. Ölçümlerde 150 μ Amp güç ve 0.24mRem radyasyon dozu kullanıldı. Ölçümler aynı kişi tarafından ve tüm sıçanlar için aynı teknikle yapıldı. Sonuçlar g/cm² cinsinden elde edildi.

4.9. Histolojik inceleme (ışık mikroskopik)

Deneylerin sonunda sıçanların L2 vertebraları ve femurları diseksiyonla histolojik inceleme için ayrıldı. Hazırlanan %10'luk EDTA solüsyonunda 15 gün süreyle dekalsifiye edildi. Örnekler, dekalsifikasyon sonrası %10'luk formaldehit ile 24 saat boyunca tespit edildi. Tespit işleminden sonra dokular çeşme suyunda 24 saat yıkandı, dereceli etanol serilerinden, takiben xylol'den geçirilip parafin bloklar hazırlandı. Ancak, femur örneklerinden uygun kesitler alınamadığı için histolojik olarak incelenemedi. Sadece L2 vertebralardan hazırlanan örnekler ışık mikroskopik olarak değerlendirildi. Parafin bloklardan 5 μ m kalınlığında kesitler alındı. Doku kesitleri Hematoksilen-Eozin ve Masson'un üçlü boyama teknikleriyle boyandı. Son olarak BH₂ Olympus marka foto-mikroskopta incelenip fotoğraflandı.

4.10. Biyokimyasal analizler

Elde edilen idrar örneklerinde deoksipridinolin (DPD), serum örneklerinde ise alkalen fosfataz (ALP), osteokalsin, kalsitonin, parathormon (PTH), kalsiyum ve inorganik fosfat değerleri aşağıda belirtilen yöntemlerle tayin edildi.

4.10.1.

İdrar DPD düzeyleri Metra Biosystems (Mountain View, CA, U.S.A.) marka ticari ELISA kiti kullanılarak belirlendi. Değerler nmol/L olarak ifade edildi.

4.10.2. Alkalen fosfataz

Serum ALP aktivite düzeyleri (U/L) Olympus marka ticari kit (Olympus Diagnostika GmbH, Wendenstraße, Hamburg, Germany) kullanılarak Olympus AU-600 otoanalizöründe (Olympus Optical Co.Ltd. Tokyo, Japan) ölçüldü.

4.10.3. Kalsiyum ve inorganik fosfat

Serum kalsiyum ve inorganik fosfat düzeyleri Olympus marka ticari kitler (Olympus Diagnostika GmbH, Wendenstraße Hamburg, Germany) kullanılarak Olympus AU-600 otoanalizöründe (Olympus Optical Co. Ltd. Tokyo, Japan) belirlendi. Elde edilen değerler mg/dL olarak sunuldu.

4.10.4. Kalsitonin, osteokalsin ve PTH

Serum kalsitonin, osteokalsin ve PTH düzeyleri, Immutopics marka immunoradiometric (IRMA) kitler (Immunotopics International, San Clemente, CA, USA) kullanılarak RIA cihazıyla (DPC-Gambyrt Cr, DPC Los Angeles, CA USA) ölçüldü. Osteokalsin ng/mL, kalsitonin ve PTH ise pg/mL cinsinden belirlendi.

4.11. İstatistiksel değerlendirme

Bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS paket programından (10.0 for Windows) yararlanıldı. Tüm sonuçlar Ortalama $\pm$ SH olarak gösterildi. $P \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Deney protokolünde kemik ölçümü ve biyokimyasal analiz sonuçları için Student's t testi kullanıldı.



5. BULGULAR

5.1. Kemik dönüşüm belirteçleri

5.1.1. İdrar DPD bulguları

Çalışma sonucunda toplanan idrar örneklerinde yapılan incelemeler sonucunda DPD düzeyinin östradiol grubunda intak kontrol grubuna göre anlamlı şekilde ($p<0.001$) azaldığı belirlendi. İntak sıçanlara uygulanan A1221 ve östradiol anlamlı değişikliklere neden olmadı. OVX hayvan modelinde ise, DPD değerlerinin A1254 uygulamasıyla anlamlı olarak arttığı ($p\leq 0.005$) gözlemlendi. Aynı modelde, A1221 ve östradiol uygulamasıyla DPD düzeylerinin ovx grubuna göre anlamlı şekilde ($p<0.01$) azaldığı belirlendi. OVX fakat sadece taşıt çözelti uygulanan sıçanların idrar DPD düzeyleri, intak kontrol grubu değerlerine kıyasla anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.05$). (Tablo 5.1, Şekil 5.1).

5.1.2. Serum osteokalsin bulguları

İntak sıçan modelinde, östradiol serum osteokalsin düzeylerini anlamlı şekilde ($p<0.005$) azalttı. Aynı deneylerde uygulanan A1221 ve A1254 ise anlamlı değişiklikler meydana getirmedi. OVX model deneylerde de benzer şekilde, östradiol uygulaması serum osteokalsin değerlerinde azalmaya ($p<0.001$) neden olurken, A1221 ve A1254'ün anlamlı değişiklikler meydana getirmediği gözlemlendi. OVX kontrol grubu osteokalsin düzeylerinin de intak kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). (Tablo 5.2, Şekil 5.2).

5.1.3. Serum alkalen fosfataz (ALP) bulguları

Çalışma sonucunda elde edilen serum örneklerinde yapılan incelemelerde ALP değerlerinin A1221 grubunda intak kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0.05$), östradiol grubunda ise anlamlı olarak azaldığı ($p<0.001$) tespit edildi. Fakat intak sıçanlara uygulanan A1254 önemli bir değişiklik meydana getirmedi. Ovx hayvan modeline uygulanan A1221, A1254 ve östradiol anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. Ovx yapıp sadece taşıt çözelti uygulanan sıçanların serum ALP değerleri, intak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. (Tablo 5.7, Şekil 5.7).

5.1.4. Serum kalsitonin bulguları

İntak grubuna göre, östradiolün serum kalsitonin seviyesinde anlamlı ($p<0.05$) bir artış oluşturduğu belirlendi. Fakat intak sıçanlara uygulanan A1221 ve A1254 anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. OVX sıçanlar ile karşılaştırıldığında, serum kalsitonin düzeyi ovx+östradiol grubunda anlamlı ($p<0.05$) bir şekilde azaldı. Ancak OVX yapılan sıçanlara uygulanan A1221 ve A1254 anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. OVX yapıp taşıt çözelti uygulanan sıçanların serum kalsitonin düzeylerinin, intak kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) şekilde yükseldiği gözlemlendi. (Tablo 5.3, Şekil 5.3).

5.1.5. PTH bulguları

Serum PTH düzeylerinin östradiol grubunda intak kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) bir şekilde arttığı belirlendi. Fakat intak sıçanlara uygulanan A1221 ve A1254 anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. OVX kontrol grubuna göre

ovx+A1254 grubunda anlamlı ($p<0.001$) artış gözlemlendi. Ovx yapılan sıçanlara uygulanan A1221 ve östradiol anlamlı bir fark oluşturmadi. Taşıt çözelti uygulanan ovx sıçanların serum PTH düzeylerinde intak kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. (Tablo 5.4, Şekil 5.4).

5.1.6. Serum kalsiyum ve inorganik fosfat bulguları

Serum kalsiyum seviyelerinin A1221 ($p<0.05$), A1254 ($p<0.01$) ve östradiol ($p<0.001$) uygulanan gruplarda intak kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlendi. Ovx kontrol grubuna göre ovx+östradiol grubunda anlamlı ($p<0.005$) artış gözlemlendi. Ovx yapılan sıçanlara yapılan A1221 ve A1254 uygulamaları, ovx kontrol sıçan modeline göre anlamlı bir fark oluşturmadi. Ayrıca intak kontrole göre, ovx yapıp sadece taşıt çözelti uygulanan sıçanların serum kalsiyum düzeyinde anlamlı ($p<0.01$) bir azalma gözlemlendi. (Tablo 5.5, Şekil 5.5).

Serum inorganik fosfat seviyelerinin intak kontrol grubuna göre A1254 uygulanan grupta anlamlı ($p<0.001$) olarak arttığı; fakat A1221 ve östradiol gruplarında anlamlı fark oluşturmadiğı belirlendi. Ovx kontrol grubuna göre ovx+A1221 ($p<0.05$) ve ovx+östradiol ($p<0.01$) gruplarında anlamlı bir artış belirlenirken; ovx+A1254 grubunda anlamlı bir fark gözlenmedi. Ayrıca intak kontrol verilerine göre, ovx yapıp sadece taşıt çözeltisi uygulanan sıçanların serum inorganik fosfat düzeyinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi. (Tablo 5.6, Şekil 5.6).

5.2. Kemik dansitometri bulguları

Femur kemik mineral yoğunluğu düzeylerinde intak kontrol sıçan modeline göre; A1221, A1254 ve östradiol gruplarında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Ovx kontrol grubuna göre ovx+A1221 grubunda ($p<0.05$) ve ovx+östradiol grubunda ($p<0.05$) anlamlı bir artış tespit edilirken; ovx+A1254 grubunda anlamlı bir fark gözlenmedi. Ovx yapıp sadece taşıt çözelti uygulanan sıçanlarda intak kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik belirlenmedi. (Tablo 5.8, Şekil 5.8).

Tibia kemik mineral düzeylerinde intak kontrol sıçan modeline göre, östradiol grubunda anlamlı ($p<0.05$) artış belirlendi fakat A1221 ve A1254 uygulanan gruplarda anlamlı bir fark oluşmadı. Ovx kontrol sıçan modeline göre; ovx+A1221, ovx+A1254 ve ovx+östradiol gruplarında anlamlı bir değişiklik meydana gelmedi. İntak kontrol ve ovx grup tibia mineral yoğunluğu değerleri arasında da anlamlı bir fark gözlenmedi. (Tablo 5.9, Şekil 5.9).

5.3. Histolojik inceleme bulguları

Çalışma sonucunda farklı gruplarda yer alan sıçanlardan elde edilen vertebralar histolojik olarak incelendi.

5.3.1. İntak kontrol grubu

Spongioz kemikte trabeküler yapı, boşlukları dolduran kemik iliği; kompakt kemikte havers kanalları ve etrafındaki osteositler normal yapıda izlendi. Kompakt kemikte spesiyal lameller, ara lameller, iç ve dış sirkümferensiyel lameller açık bir şekilde ayırt edildi. (Şekil 5.10, Şekil 5.11).

5.3.2. A1254 grubu

A1254'ün kemik yapısını bozduğu fakat bununla birlikte çevredeki mezenşim dokudan hiyalin kıkırdak üretimini sağlayarak endokondral ossifikasyon yolu ile yeniden kemik oluşumunu indüklediği gözlemlendi. A1254 toksikasyonuna bağlı olarak dokuda yer yer nekroze alanlar da tespit edildi. (Şekil 5.13, Şekil 5.14).

5.3.3. A1221 grubu

Kompakt ve trabeküler kemik yapıları normal olarak ayırt edildi. Üçlü boyamada birkaç alanda ekstrasellüler matriksin homojen olmadığı gözlemlendi. (Şekil 5.12).

5.3.4. Östradiol grubu

Spongiöz kemik, kompakt kemik ve kemik iliği kontrol grubuna benzer yapıda izlendi. (Şekil 5.15)

5.3.5. OVX grubu

Bu grupta en belirgin yapısal değişiklik kemik iliğindeki yoğun yağlanma idi. Spongiöz kemikteki trabeküller normal yapısını korurken, kompakt kemikte normal kemik hücrelerinin (osteositler) yanısıra havers kanallarının etrafında geniş lakünler içinde yer alan osteositler de gözlemlendi. (Şekil 5.16, Şekil 5.17).

5.3.6. OVX+A1221 grubu

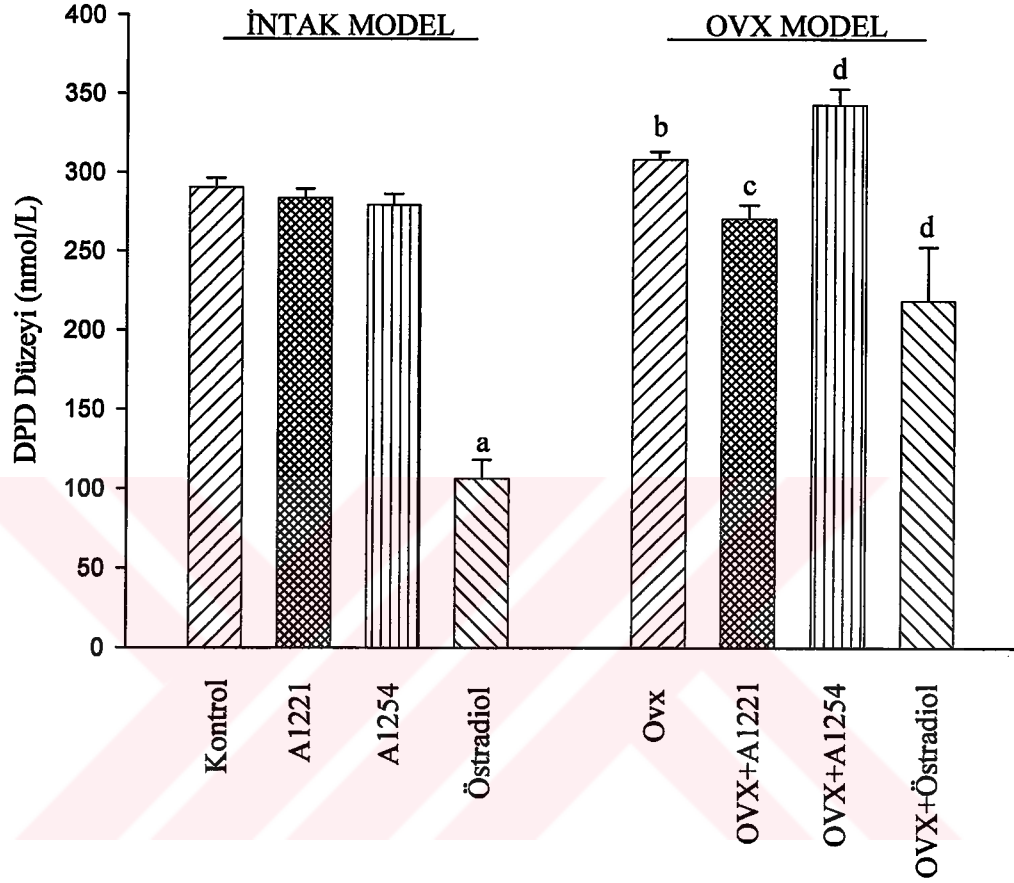
Hem kompakt kemiğin hem de spongios kemiğin normal yapı gösterdiği tespit edildi. Kemik boşluklarını dolduran kemik iliği de kontrol grubuna benzer olarak gözlendi. Yapılan üçlü boyamada ekstraselüler matriksin homojen boyanarak kontrole benzer özellikler gösterdiği saptandı. (Şekil 5.18, Şekil 5.19).

5.3.7. OVX+A1254 grubu

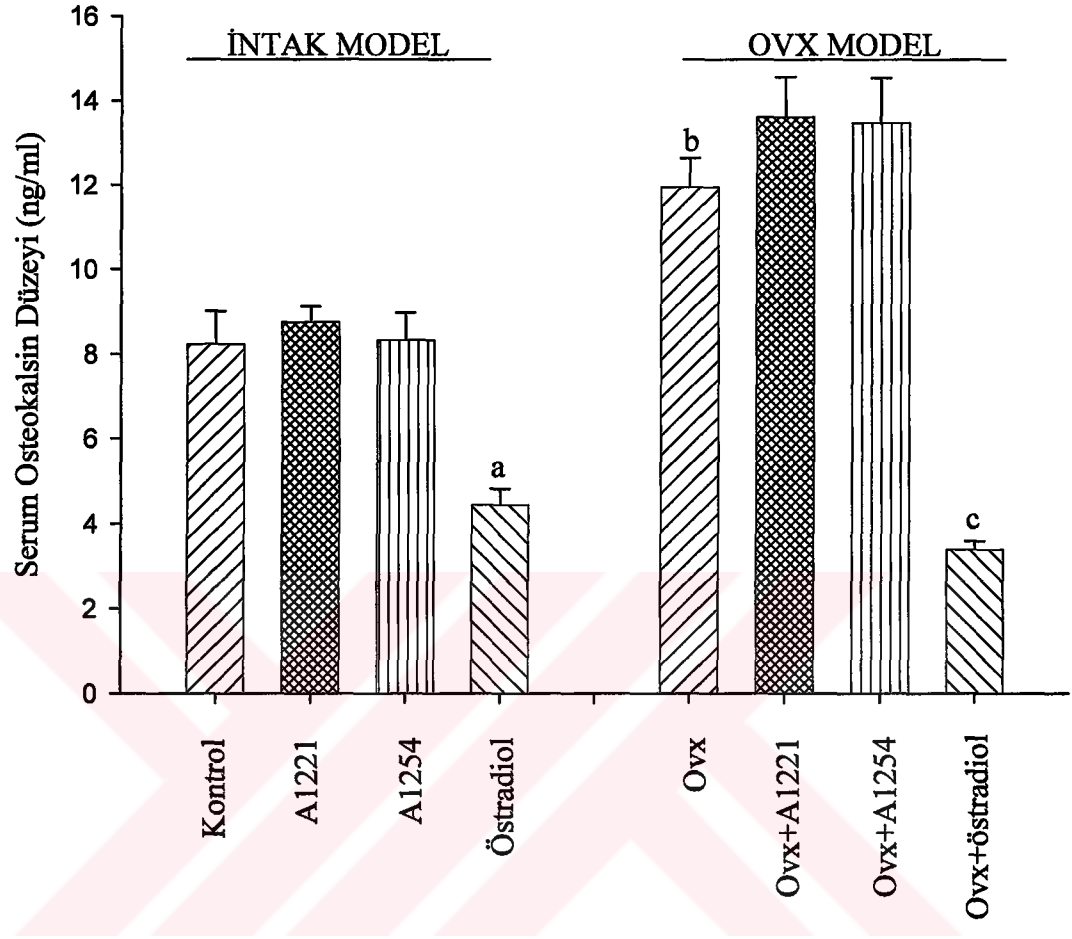
Bu grupta da A1254 grubuna benzer şekilde kemik yapısının bozulduğu ve özellikle kompakt kemik kısmında bozulma olduğu, yerine çevre mezenşim dokudan köken alan hiyalin kırırdağın olduğu böylece endokondral ossifikasyonun indüklendiği gözlendi. Ayrıca overektominin, A1254 toksikasyonu ile oluşan nekroze alanları artırdığı tespit edildi. Bu grupta göze çarpan bir diğer yapısal değişiklik ise kemik iliğinde oldukça bol miktarda lipid damlacıklarının ayırt edilmesiydi. (Şekil 5.20, Şekil 5.21).

5.3.8. OVX+östradiol grubu

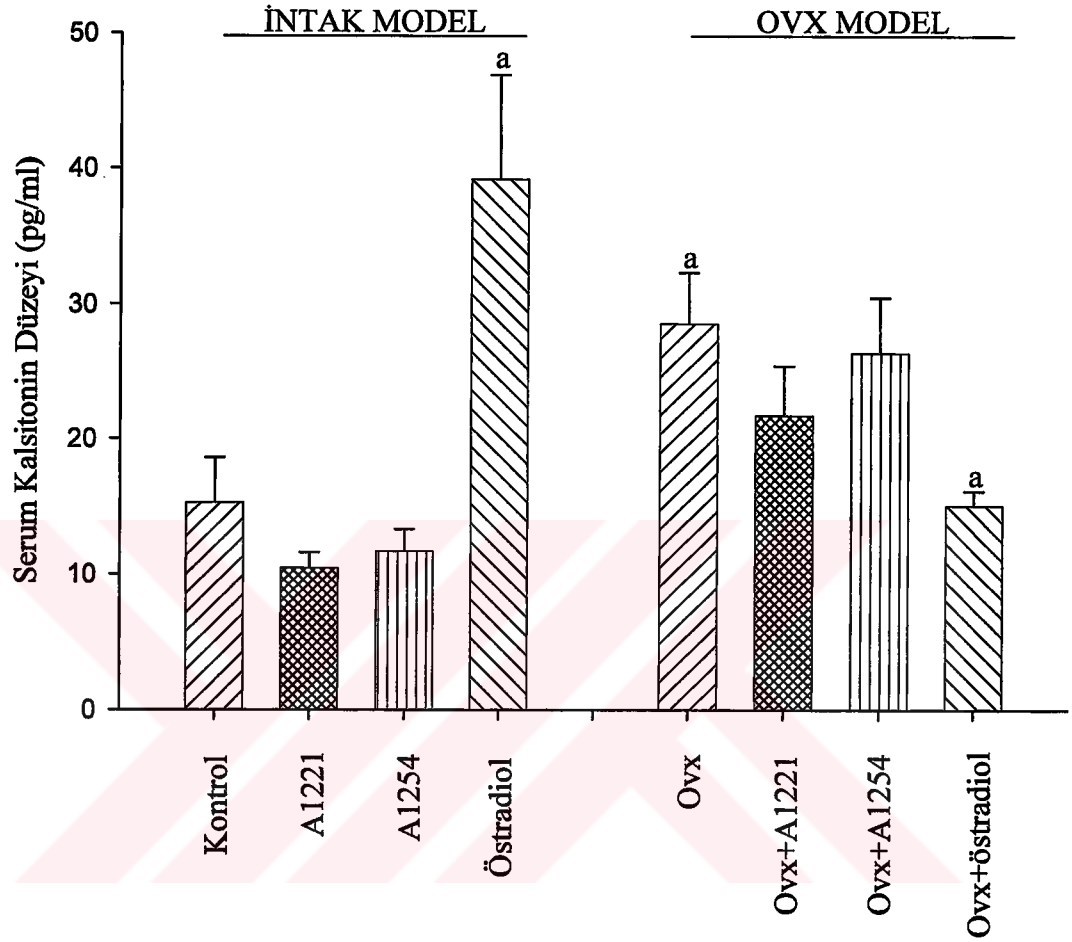
Kompakt kemik ve spongios kemik trabekülleri kontrol grubuna benzer olarak gözlendi. Kemik iliğinde oldukça seyrek lipid damlacıklarına rastlandı. Yapılan üçlü boyamada ekstraselüler matriksin homojen boyandığı tespit edildi. (Şekil 5.22, Şekil 5.23).



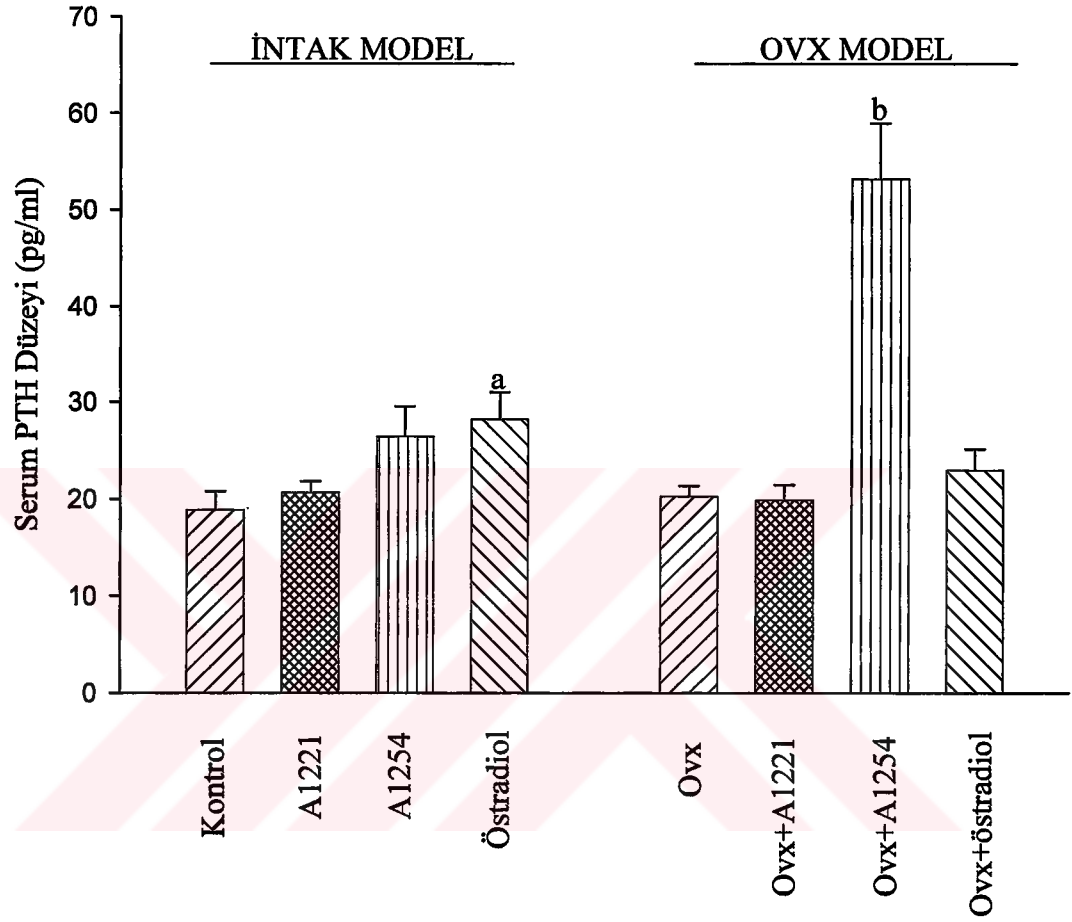
Şekil 5.1. İdrar DPD değerlerinde (Ort±SH; nmol/L) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: $p<0.001$, b: $p<0.05$ intak kontrol grubuna göre; c: $p<0.005$, d: $p<0.01$ ovx kontrol gruba göre. Student'in t-testi.



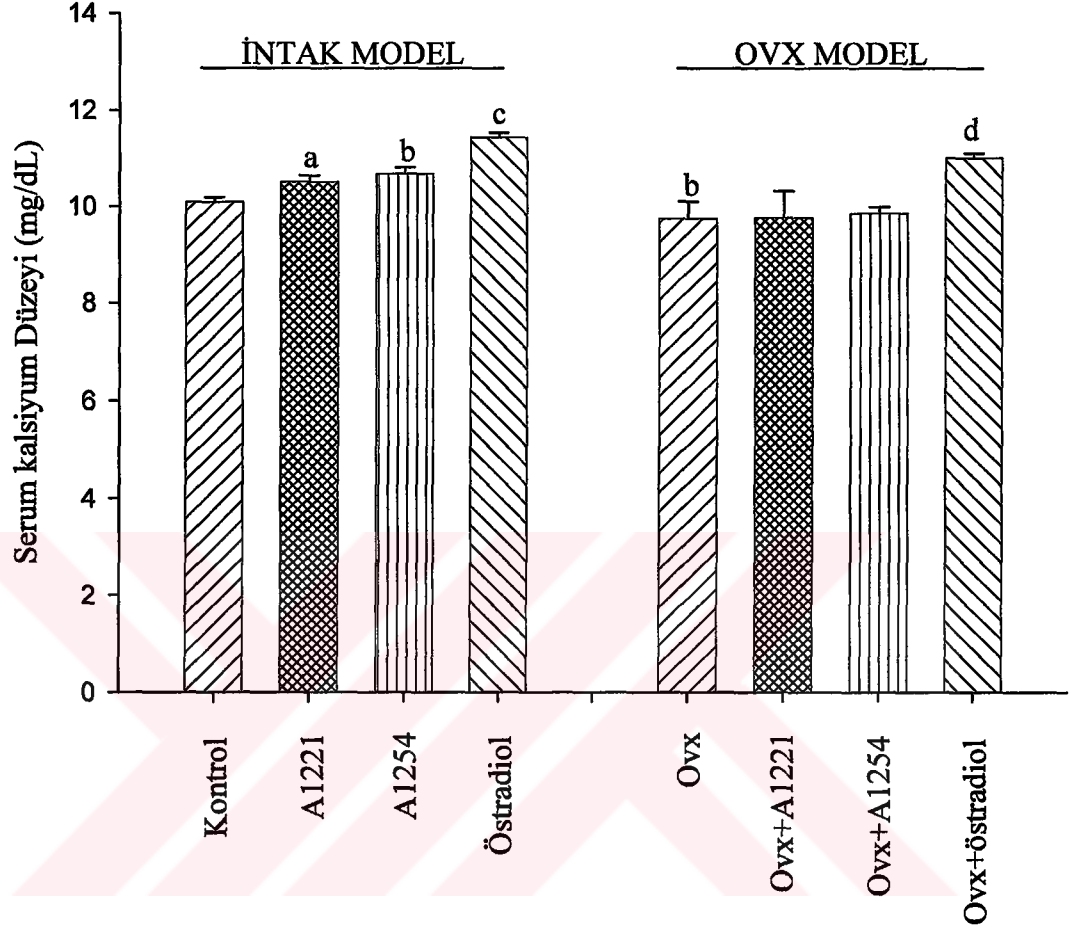
Şekil 5.2. Serum osteokalsin değerlerinde (Ort±SH; ng/mL) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: $p<0.005$, b: $p<0.05$ intak kontrol grubuna göre; c: $p<0.001$ ovx kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.



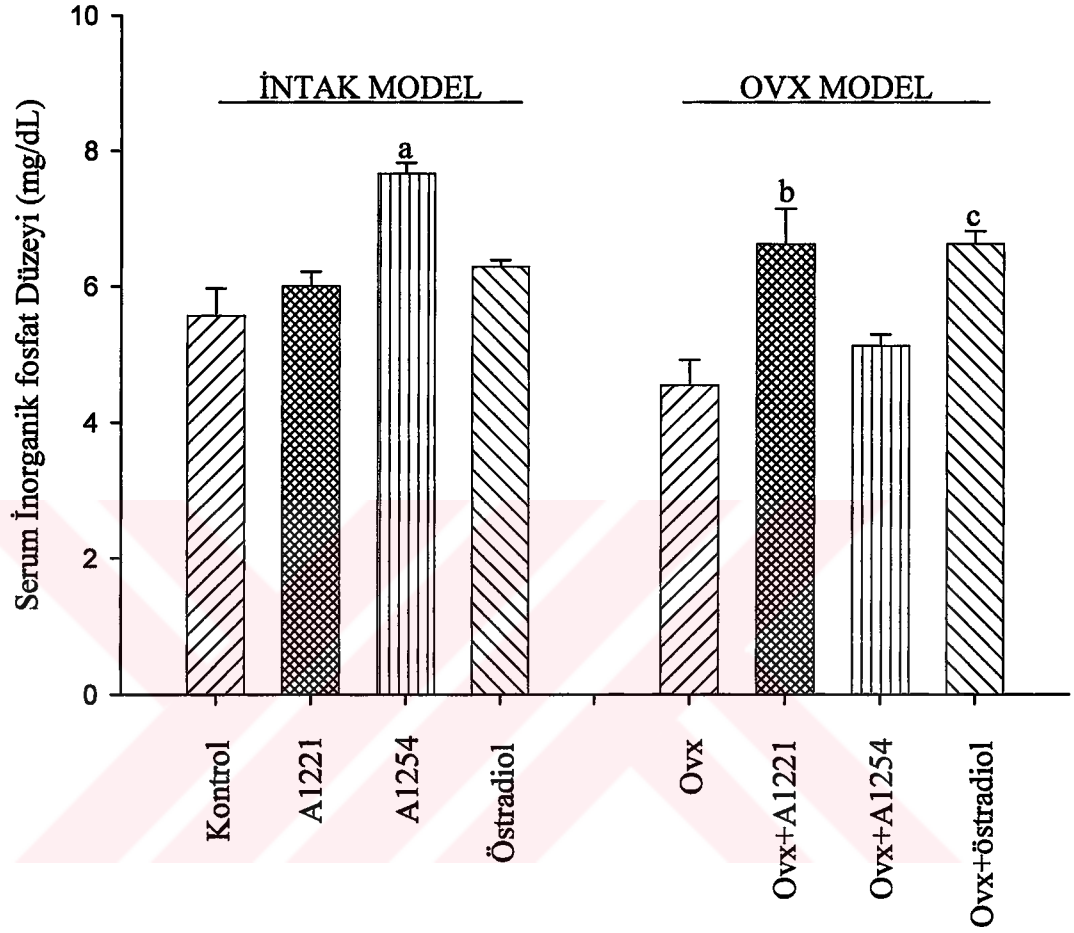
Şekil 5.3. Serum kalsitonin düzeylerinde (Ort±SH; pg/mL) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: $p < 0.05$ intak kontrol grubuna ve ovx kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.



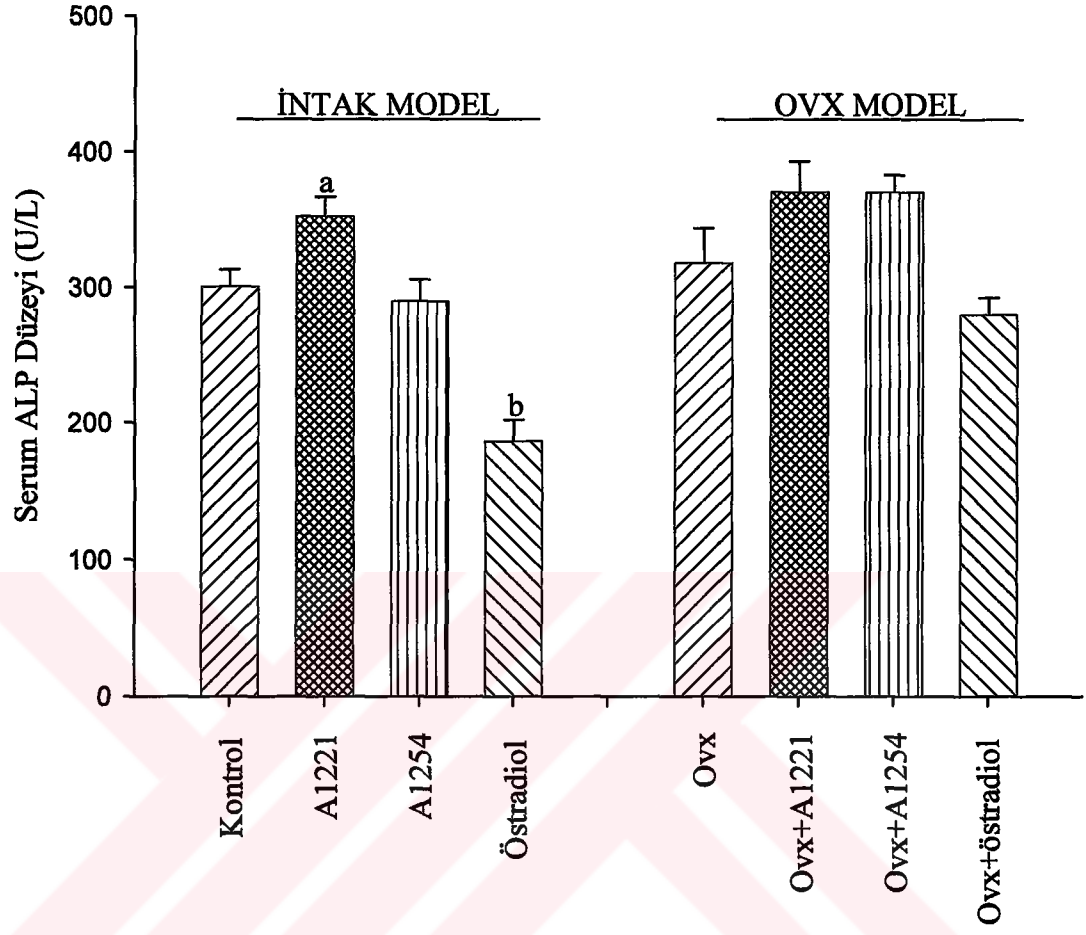
Şekil 5.4. Serum PTH düzeylerinde (Ort±SH; pg/mL) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: $p<0.05$ intak kontrol grubuna göre; b: $p<0.001$ ovx kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.



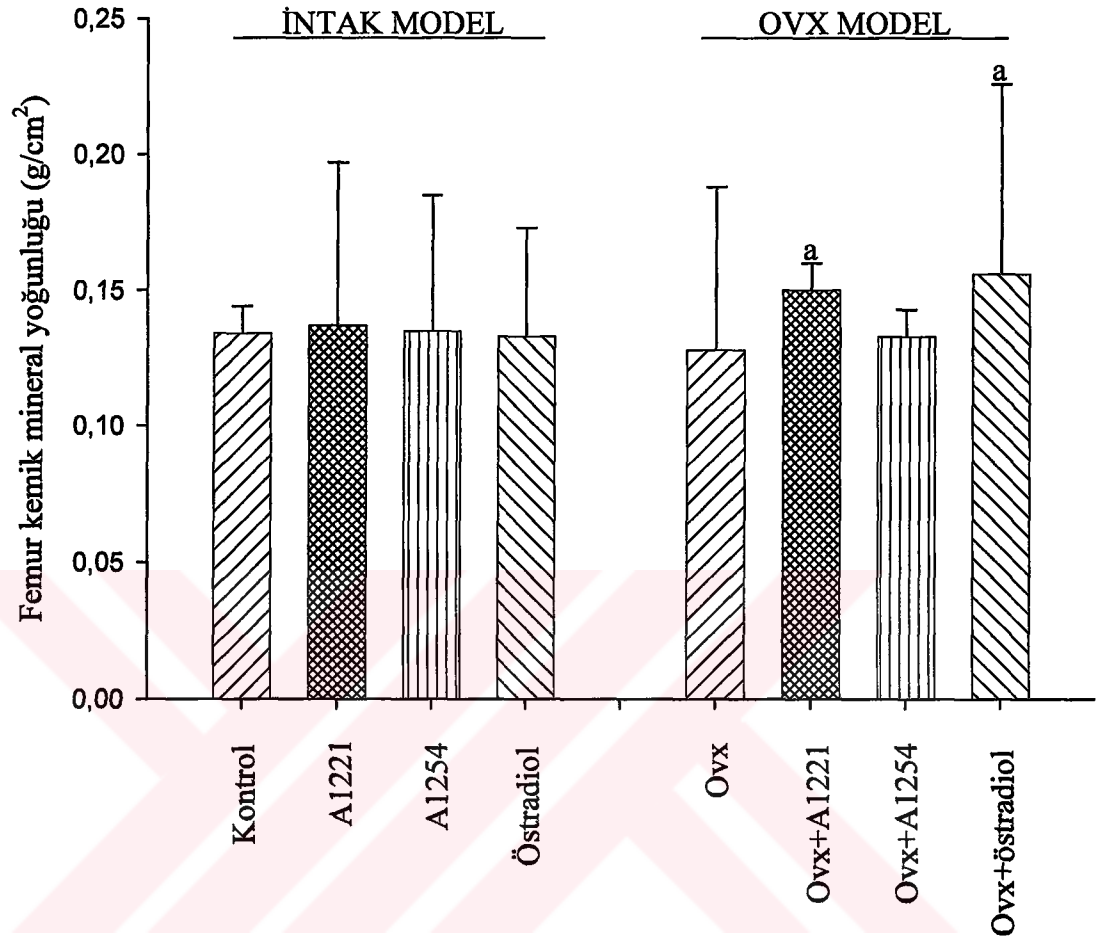
Şekil 5.5. Serum kalsiyum seviyelerinde (Ort±SH; mg/dL) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: $p<0.05$, b: $p<0.01$, c: $p<0.001$ intak kontrol grubuna göre; d: $p<0.005$ ovx kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.



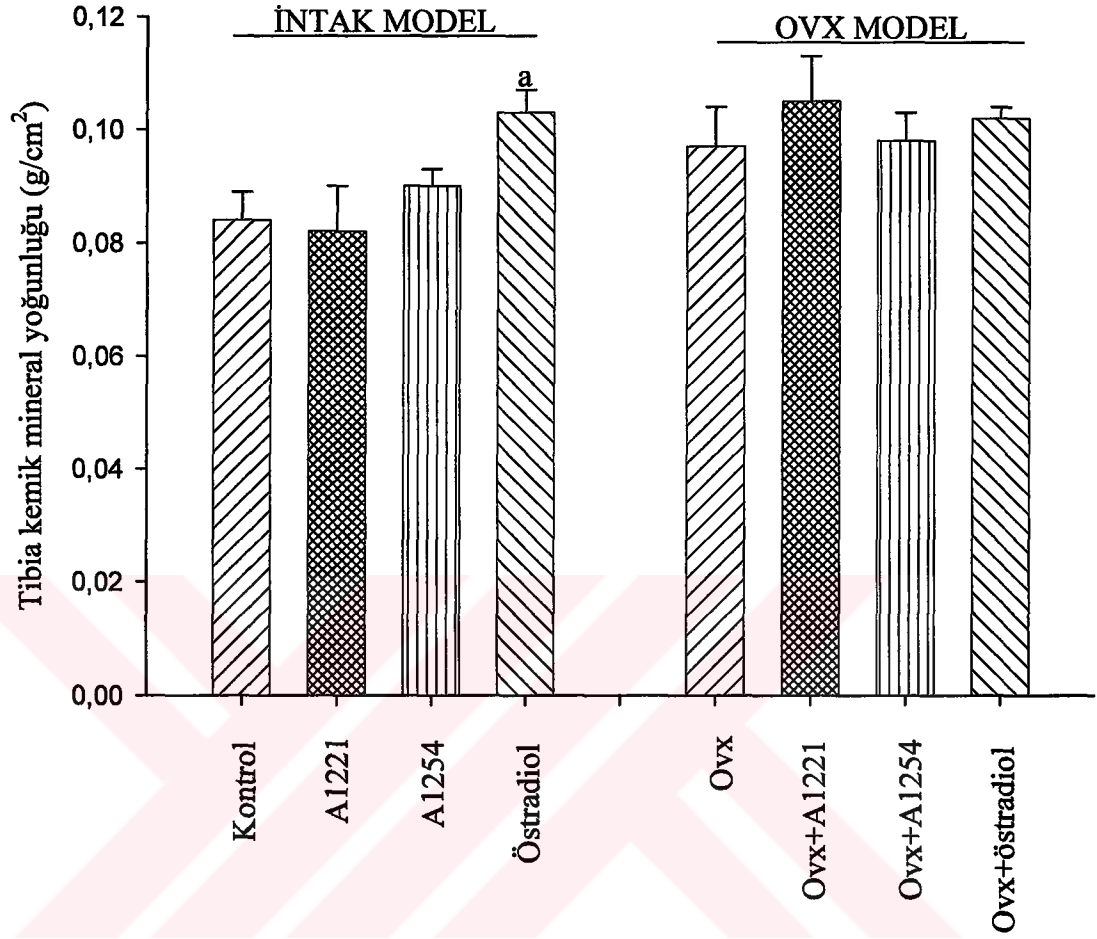
Şekil 5.6. Serum inorganik fosfat seviyelerinde (Ort±SH; mg/dL) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: $p<0.001$ intak kontrol grubuna göre; b: $p<0.05$, c: $p<0.01$ ovx kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.



Şekil 5.7. Serum ALP seviyelerinde (Ort±SH; U/L) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: $p<0.05$, b: $p<0.001$ intak kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.



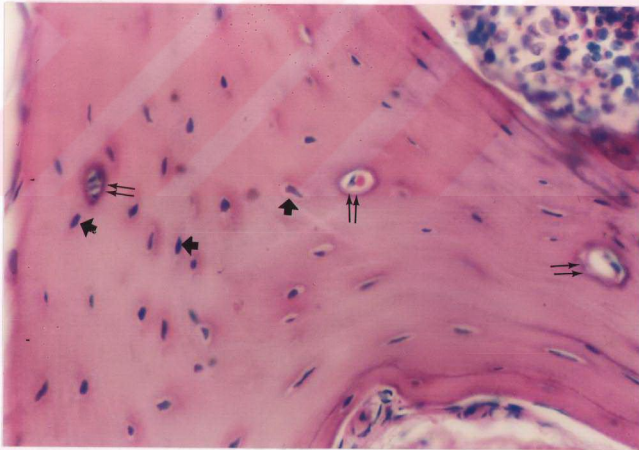
Şekil 5.8. Femur kemik mineral düzeylerinde (Ort±SH; g/cm²) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: p<0.05 ovx kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.



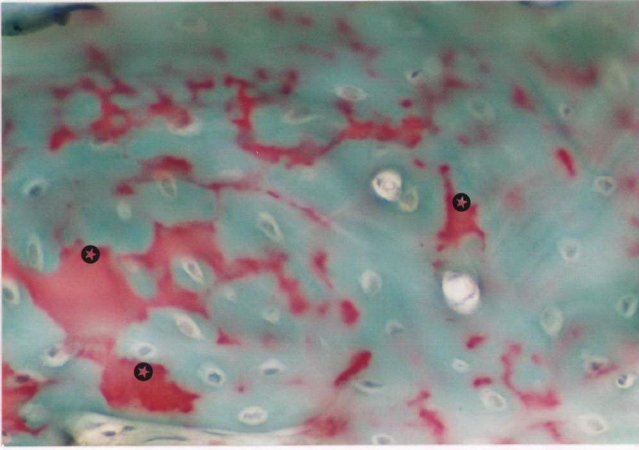
Şekil 5.9. Tibia kemik mineral düzeylerinde (Ort±SH; g/cm²) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: p<0.05 intak kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.



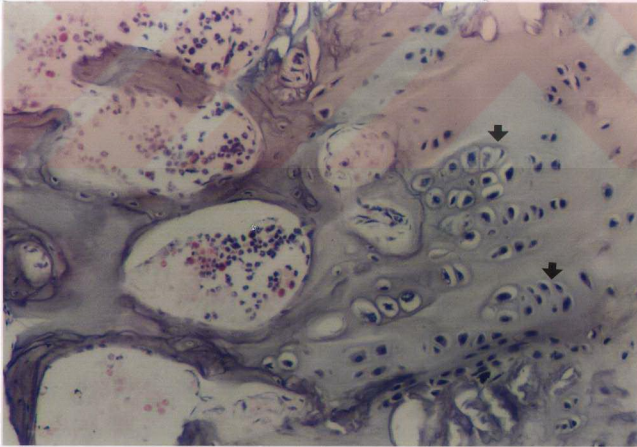
Şekil 5.10. Kontrol grubu. Spongiöz kemikte trabeküler yapı (→), boşlukları dolduran kemik iliği (*) normal yapıda izlendi. Hematoksilen Eozin X 20.



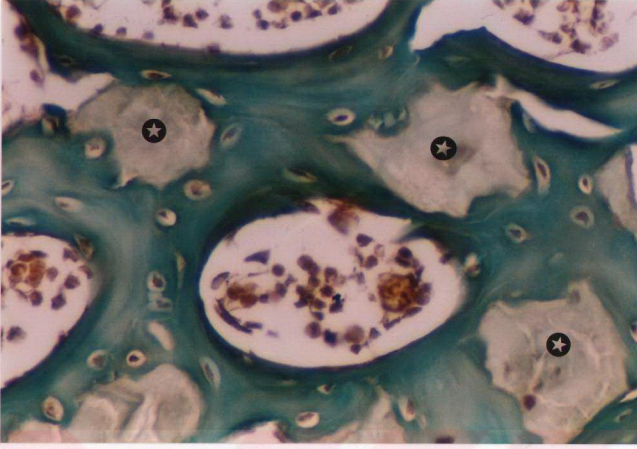
Şekil 5.11. Kontrol grubu. Kompakt kemikte havers kanalları (⇒) ve etrafındaki osteositlerin (→) normal yapıda olduğu gözlenmektedir. Hematoksilen Eozin X 20.



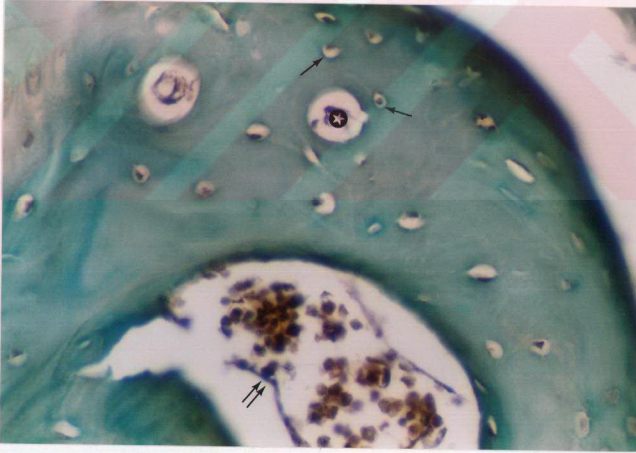
Şekil 5.12. A1221 grubu. Üçlü boyamada birkaç alanda ekstrasellüler matriksin homojen olmadığı (*) ayırt edilmektedir. Masson'un üçlü boyaması X 20.



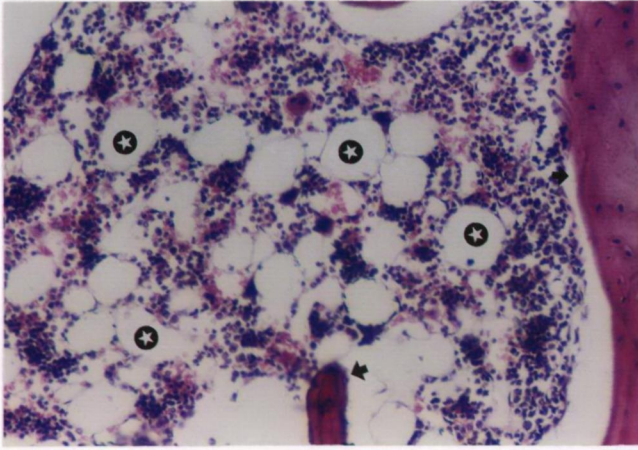
Şekil 5.13. A1254 grubu. Hiyalin kırıkdağın (→) yeniden kemik oluşumunu indüklediği gözlenmektedir. Hematoksilen Eozin X 10.



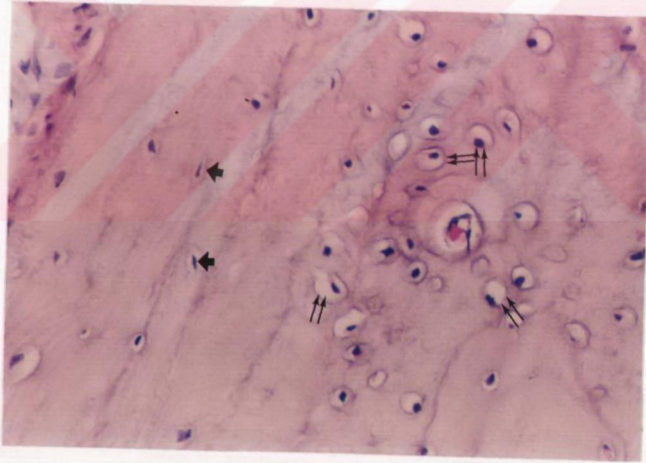
Şekil 5.14. A1254 grubu. Dokuda yer yer nekroze alanlar (*) tespit edilmektedir. Masson'un üçlü boyaması X 20.



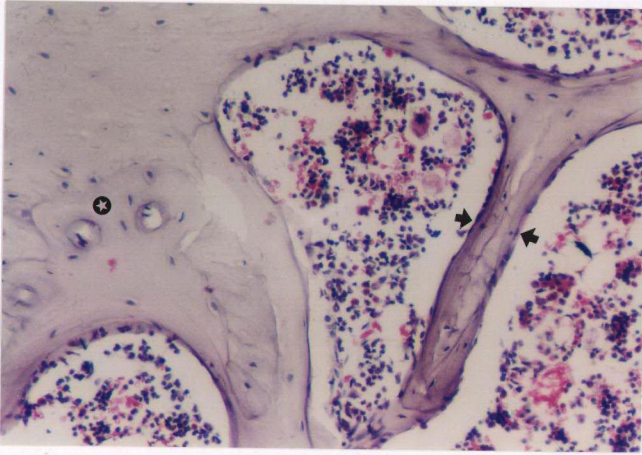
Şekil 5.15. Östradiol grubu. Havers kanalı (*) etrafında osteositler (→) ve kemik boşluğundaki kemik iliği (⇒) normal yapıda ayırt edilmektedir. Masson'un üçlü boyaması X 20.



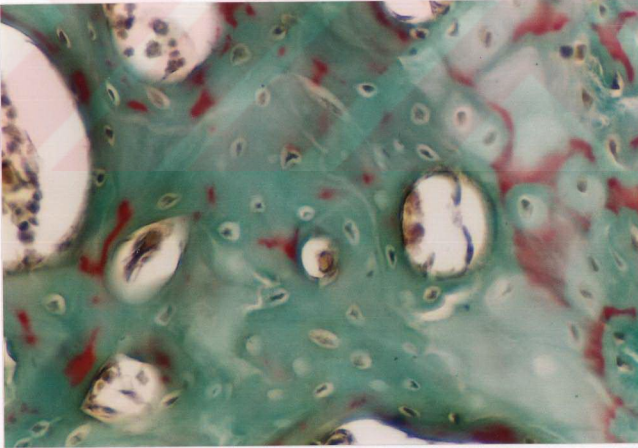
Şekil 5.16. Ovx grubu. Kemik iliğinde yoğun yağlanma (*) ve spongiöz kemikte trabeküllerin normal yapısını (→) koruduğu ayırt edilmektedir. Hematoksilen Eozin X 10.



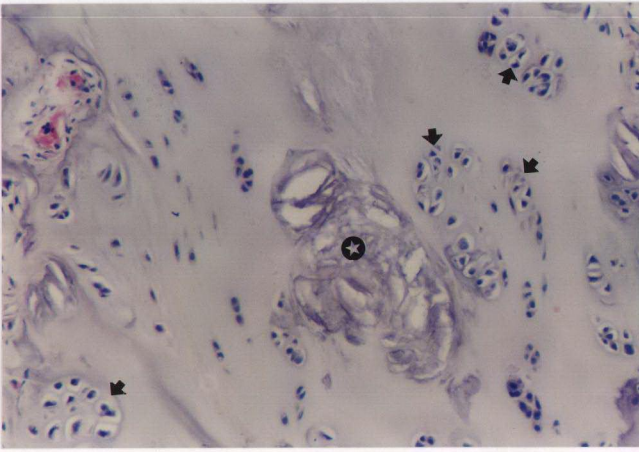
Şekil 5.17. Ovx grubu. Kompakt kemikte normal osteositlerin (→) yanı sıra havers kanallarının etrafında geniş lakünler içinde yer alan osteositler de (⇒) belirlenmektedir. Hematoksilen Eozin X 20.



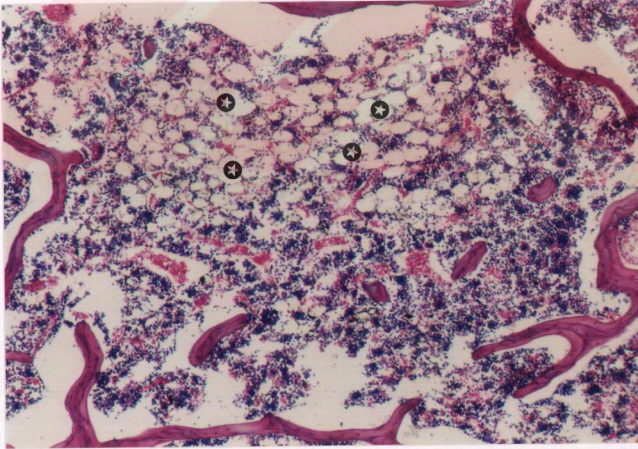
Şekil 5.18. Ovx+A1221 grubu. Hem kompakt kemiğin (*) hem de spongiöz kemiğin (→) normal yapı gösterdiği gözlenmektedir. Hematoksilen Eozin X 10.



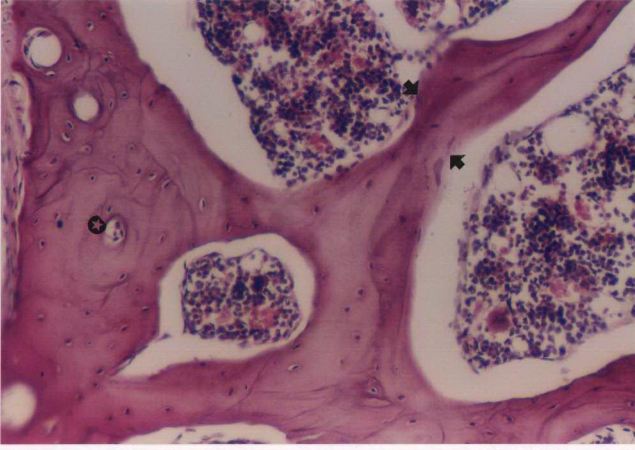
Şekil 5.19. Ovx+A1221 grubu. Yapılan üçlü boyamada ekstraselüler matriksin homojen boyandığı tespit edilmektedir. Masson'un üçlü boyaması X 20.



Şekil 5.20. Ovx+A1254 grubu. Hiyalin kıkırdığın (→) yeniden kemik oluşumunu indüklediği gözlenmektedir. Dokuda yer yer nekroze alanlar (*) tespit edilmektedir. Hematoksilen Eozin X 10.



Şekil 5.21. Ovx+A1254 grubu. Kemik iliğinde oldukça bol miktarda lipid damlacığı (*) ayırt edilmektedir. Hematoksilen Eozin X 4.



Şekil 5.22. Ovx+Östradiol grubu. Kompakt kemik (*) ve spongiöz kemik trabekülleri (→) normal olarak gözlenmektedir. Hematoksilen Eozin X 10.



Şekil 5.23. Ovx+östradiol grubu. Yapılan üçlü boyamada ekstraselüler matrisin (*) homojen boyandığı tespit edilmektedir. Masson'un üçlü boyaması X 20.

İntak sıçan modeli		Ovx sıçan modeli	
Gruplar	DPD	Gruplar	DPD
Kontrol	290.4±5.9	Ovx	308.5±4.9 b
A1221	283.7±5.7	Ovx+A1221	270.7±8.9 c
A1254	279.3±7.0	Ovx+A1254	342.9±10.5 d
Östradiol	106.4±11.8 a	Ovx+Östradiol	217.9±34.0 d

Tablo 5.1. İdrar DPD değerlerinde (Ort±SH; nmol/L) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: p<0.001, b: p<0.05 intak kontrol grubuna göre; c: p<0.005, d: p<0.01 ovx kontrol gruba göre. Student'in t-testi.

İntak sıçan modeli		Ovx sıçan modeli	
Gruplar	Serum Osteokalsin	Gruplar	Serum Osteokalsin
Kontrol	8.2±0.8	Ovx	12.0±0.7 b
A1221	8.8±0.4	Ovx+A1221	13.6±0.9
A1254	8.3±0.7	Ovx+A1254	13.5±1.1
Östradiol	4.5±0.4 a	Ovx+Östradiol	3.4±0.2 c

Tablo 5.2. Serum osteokalsin değerlerinde (Ort±SH; ng/mL) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: p<0.005, b: p<0.05 intak kontrol grubuna göre; c: p<0.001 ovx kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.

İntak sıçan modeli		Ovx sıçan modeli	
Gruplar	Serum Kalsitonin	Gruplar	Serum Kalsitonin
Kontrol	15.3±3.4	Ovx	28.5±3.8 a
A1221	10.4±1.2	Ovx+A1221	21.7±3.7
A1254	11.7±1.6	Ovx+A1254	26.4±4.1
Östradiol	39.2±7.7 a	Ovx+Östradiol	15.0±1.1 a

Tablo 5.3. Serum kalsitonin düzeylerinde (Ort±SH; pg/mL) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: p<0.05 intak kontrol grubuna ve ovx kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.

İntak sıçan modeli		Ovx sıçan modeli	
Gruplar	Serum PTH	Gruplar	Serum PTH
Kontrol	18.9±1.9	Ovx	20.3±1.1
A1221	20.6±1.2	Ovx+A1221	19.9±1.6
A1254	26.4±3.1	Ovx+A1254	53.2±5.8 b
Östradiol	28.2±2.8 a	Ovx+Östradiol	23.0±2.2

Tablo 5.4. Serum PTH düzeylerinde (Ort±SH; pg/mL) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: p<0.05 intak kontrol grubuna göre; b: p<0.001 ovx kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.

İntak sıçan modeli		Ovx sıçan modeli	
Gruplar	Serum kalsiyum	Gruplar	Serum kalsiyum
Kontrol	10.1±0.1	Ovx	9.7±0.4 b
A1221	10.5±0.1 a	Ovx+A1221	9.8±0.6
A1254	10.7±0.1 b	Ovx+A1254	9.9±0.1
Östradiol	11.4±0.1 c	Ovx+Östradiol	11.0±0.1 d

Tablo 5.5. Serum kalsiyum seviyelerinde (Ort±SH; mg/dL) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: p<0.05, b: p<0.01, c: p<0.001 intak kontrol grubuna göre; d: p<0.005 ovx kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.

İntak sıçan modeli		Ovx sıçan modeli	
Gruplar	İnorganik fosfat	Gruplar	İnorganik fosfat
Kontrol	5.7±0.4	Ovx	4.6±0.4
A1221	6.0±0.2	Ovx+A1221	6.6±0.5 b
A1254	7.7±0.1 a	Ovx+A1254	5.1±0.2
Östradiol	6.3±0.1	Ovx+Östradiol	6.6±0.2 c

Tablo 5.6. Serum inorganik fosfat seviyelerinde (Ort±SH; mg/dL) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: p<0.001 intak kontrol grubuna göre; b: p<0.05, c: p<0.01 ovx kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.

İntak sıçan modeli		Ovx sıçan modeli	
Gruplar	Serum ALP	Gruplar	Serum ALP
Kontrol	300.6±12.5	Ovx	318.2±25.4
A1221	352.4±14.5 a	Ovx+A1221	370.2±23.0
A1254	290.0±15.8	Ovx+A1254	370.4±12.7
Östradiol	186.2±15.7 b	Ovx+Östradiol	279.8±12.6

Tablo 5.7. Serum ALP seviyelerinde (Ort±SH; U/L) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: p<0.05, b: p<0.001 intak kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.

İntak sıçan modeli		Ovx sıçan modeli	
Gruplar	FEMUR	Gruplar	FEMUR
Kontrol	0.134±0.01	Ovx	0.128±0.06
A1221	0.137±0.06	Ovx+A1221	0.150±0.01 a
A1254	0.135±0.05	Ovx+A1254	0.133±0.01
Östradiol	0.133±0.04	Ovx+Östradiol	0.156±0.07 a

Tablo 5.8. Femur kemik mineral düzeylerinde (Ort±SH; g/cm²) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: p<0.05 ovx kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.

İntak sıçan modeli		Ovx sıçan modeli	
Gruplar	TİBİA	Gruplar	TİBİA
Kontrol	0.084±0.005	Ovx	0.097±0.007
A1221	0.082±0.008	Ovx+A1221	0.105±0.008
A1254	0.090±0.003	Ovx+A1254	0.098±0.005
Östradiol	0.103±0.004 a	Ovx+Östradiol	0.102±0.002

Tablo 5.9. Tibia kemik mineral düzeylerinde (Ort±SH; g/cm²) intak ve ovx sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulamasından sonra meydana gelen değişiklikler. a: p<0.05 intak kontrol grubuna göre. Student'in t-testi.

6. TARTIŞMA

6.1. Kemik mineral yoğunluğu üzerine etkileri

Kemik yoğunluğunun homeostazisi kemik remodellinginin iki fazıyla dengede tutulur bunlar; osteoklastların sebep olduğu kemik rezorbsiyonu ve osteoblastlar tarafından yürütülen kemik formasyonudur (118, 126). KMY dolaşımdaki östrojenlerin varlığıyla ilişkilidir (30, 88, 110) ancak fiziksel aktivite, kalsiyum alımı, genetik faktörler ve beslenme gibi diğer bazı faktörlerin de KMY üzerine etkilerinin olduğu bilinmektedir (40, 136). Çevresel östrojenlerin *in vitro* ve *in vivo* olarak kemik kaybını önlediği ve kemik kitle yoğunluğunu arttırdığı çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (48, 98). Dişi sıçanlarda OVX sonrasında östrojen eksikliğine bağlı olarak trabeküler (spongiyöz) kemikte kayıplar meydana geldiği gösterilmiştir (59, 83, 172). Dent ve Friedman (46) yaptıkları çalışmada OVX işlemini takiben kemik rezorbsiyonunda %400, formasyonunda ise %270 oranlarına ulaşan bir artışın meydana geldiğini; rezorbsiyon ile formasyon arasındaki dengenin östrojen eksikliğine bağlı olarak rezorbsiyon lehine döndüğünü bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız iki farklı modeldeki (intak ve OVX) sıçanlara A1221, A1254 ve östradiol uygulaması yapıldı ve deney sonunda dansitometrik yöntemle sıçanların femur ve tibialarının KMY düzeyleri belirlendi. Kullanılan ajanların intak grup sıçanların femur ve tibialarında KMY bakımından anlamlı bir fark meydana getirmediği (tibia+östradiol grubu hariç), OVX grubu sıçanlarda ise östradiol ve A1221 uygulamasının femur mineral yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı artışlar meydana getirdiği belirlendi. Tibianın mineral yoğunluğunda ise kullanılan ajanların hiçbirisi anlamlı

değişikliklere neden olmadı. A1221'in östradiolün koruyucu etkisine paralel etki göstererek femurun mineral yoğunluğunu artırması A1221'in östrojenik etkilere sahip olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda elde edilen KMY bulguları gruplar arasında farklılık göstermesine rağmen, standart hatanın beklenmedik şekilde yüksek çıkması nedeniyle bu değişiklikler istatistiksel olarak anlam kazanmadı. Bu durum, dansitometre ile KMY ölçümlerinin, özellikle sıçanlarda, daha dikkatli yapılması gerektiğini göstermektedir.

Literatürde, PCB maruziyetine bağlı kemik morfometresinde değişiklikleri inceleyen çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. On ve 15 hafta süreyle 10 ve 25 mg/kg dozunda uygulanan A1254'ün erkek sıçanlarda femur ağırlığı ve boyunda anlamlı şekilde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (4). Aynı çalışmada en yüksek PCB dozu (25 mg/kg) kemik hacminde azalmaya yol açtı. Ayrıca, tüm doz gruplarında 10 haftalık uygulamalardan sonra kemik yoğunluğunda artış gözlemlendi. En yüksek dozun 15 haftalık periyotta uygulandığı grupta A1254'ün femurda zayıflamaya neden olduğu belirlendi. Andrews ve ark. tarafından 1989'da yayınlanan bu çalışmadaki kemik metabolizması ile ilgili bulguların mekanizmasına yönelik çalışmalar yapılmamıştır (4). Bizim çalışmamızda KMY ile ilgili anlamlı değişiklikler bulunmasa da, ileride tartışılacağı gibi, özellikle A1254'ün kemikte organik matriksin önemli kısmını oluşturan kollajenin yıkımını artırdığı gösterilmiştir.

6.2. Kemik histolojisi üzerine etkileri

17 β -östradiol'e yapısal olarak benzerlik gösteren bitkisel ve çevresel östrojenlerin insan ve hayvanlarda östrojenin agonist ve antagonisti olarak etkiler sergiledikleri rapor edilmiştir (95, 156). Östrojenik etkiye sahip olan PCB bileşenleri östrojen reseptörlerine bağlanarak, anti-östrojenik bileşikler ise Ah reseptörünün aktivasyonu ile etkilerini gösterirler (158).

Bu çalışmada, intak modeldeki grupların histolojik incelemeleri sonrasında, östradiol ve A1221 uygulaması herhangi bir değişikliğe neden olmazken, A1254'ün vertebraların histolojisinde deformasyonlara neden olması, A1254'ün anti-östrojenik etkisine atfedilebilir. Ayrıca histolojik incelemede belirlenen nekroz alanların sebebinin ise A1254'ün toksik özelliklerinden kaynaklandığı sanılmaktadır. OVX modelindeki grupların histolojik incelemelerinde OVX'e bağlı olarak meydana gelen histolojik değişikliklerin östrojen ve A1221 uygulanmasıyla intak kontrol grubuna benzer hale geldiği, A1254 uygulamasının ise OVX'in neden olduğu histolojik bozulmalara ilave olarak nekroze alanlar meydana getirdiği belirlendi. A1221'in östradiol ile benzer şekilde etki göstermesi, A1254'ün ise östradiole zıt etkiler ortaya koyması bu çevresel toksik maddelerin östrojenik ve anti-östrojenik etkilere sahip olduklarını düşündürmektedir.

6.3. İdrar DPD, serum ALP ve osteokalsin seviyeleri üzerine etkileri

DPD, kemik organik matriksinin önemli kısmını oluşturan kollajenin yıkım (katabolizma) ürünüdür ve başlıca idrarla atılır (166). Kemik rezorpsiyonu hakkında oldukça önemli ipuçları sağladığından, son yıllarda giderek artan sayıda

kemik metabolizması çalışmalarında kullanılmaktadır (94). Östrojenin idrar DPD düzeylerini önemli oranda azalttığı bilinmektedir (51). Bizim çalışmamızda, idrar DPD değerlerinin her iki modelde de östradiol tarafından azaltılması ancak A1221'in ise sadece OVX sonrasındaki uygulanmasının idrar DPD değerleri üzerine benzer etkiler göstermesi, A1221'in östrojenik özelliklerini göstermektedir. Ancak intak grupta östrojen varlığında A1221 için bir etkinin söz konusu olmaması östrojenik özelliğinin östradiolün sergilediğinden daha az olabileceğini, muhtemelen östrojen reseptörlerine bağlanma hususundaki yarışta endojen östrojenlerin daha etkin olduklarını düşündürmektedir. Fakat A1221'in kemik rezorbsiyonunu önleme bakımından özellikle östrojenlerin yokluğunda etkili olabileceği söylenebilir. OVX+A1254 grubunda DPD seviyelerinin OVX grubuna göre daha da yükselmesi, A1254'ün kemik rezorbsiyonuna sebep olduğunu ve bu etkinin de anti-östrojenik özellikten kaynaklandığını göstermektedir. Kemik rezorbsiyon belirteci olarak kabul edilen DPD'nin (77) idrardaki miktarı aynı zamanda böbrek fonksiyonlarıyla da ilişkili olduğu için DPD/kreatin oranı biçiminde değerlendirmek daha uygundur (87).

İntak modeldeki sıçanların serum ALP ve osteokalsin değerleri incelendiğinde, östradiol uygulamasının ALP ve osteokalsin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar meydana getirdiği; A1221 ve A1254 uygulaması yapılan gruplarda ise A1221'in serum ALP seviyelerini arttırması dışında anlamlı herhangi bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlendi. OVX işlemini takiben yapılan uygulamalarda ise östradiolün, serum osteokalsin düzeylerinde meydana getirdiği azalmadan başka anlamlı bir değişiklik belirlenmedi.

Altı ay süresince postmenopozal kadınlara uygulanan östrojen replasman tedavisinin, serum osteokalsin ve ALP seviyelerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiş ve östrojen uygulamasından sonra ve önce serum osteokalsin ve ALP seviyelerindeki oransal değişiklikler arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir (76). Bu bulgu OVX işlemini takiben östradiol uygulaması yapılan sıçanların serum ALP ve osteokalsin seviyelerindeki azalmayla paralellik göstermektedir. Ohta ve ark. (116) OVX nedeniyle kemiğin değişim oranında meydana gelen artmaya bağlı olarak serum ALP seviyelerinin de artmış olduğunu rapor etmişlerdir. Yine yapılan bir diğer çalışmada da serum ALP seviyelerinin postmenapozal kadınlarda belirgin şekilde artmış olduğu gösterilmiştir (151). Serum ALP ve osteokalsin seviyelerinin değişmesi arasında bir ilişkinin var olduğu bildirilmiştir (76). OVX yapılan grupta serum osteokalsin seviyelerinde meydana gelen artma bu çalışmadaki bulgularla benzerdir. Osteoblastlar tarafından sentezlenen osteokalsinin, kemik döngüsünün özellikle formasyon fazını gösteren bir biyokimyasal belirteç olduğu (44) yapılan klinik (47) ve deneysel (25) çalışmalarla gösterilmiştir. Serum ALP seviyesi de osteokalsin gibi bir diğer kemik formasyon belirtecidir ve osteoblastların fosfolipaz ile etkileşmesi sonucu dolaşıma serbestlenir (62). Son zamanlarda sıçanlarda yapılan bir çalışmada, OVX'nin serum ALP seviyelerinde artışa, bu hayvanlara uygulanan östradiolün ise azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (51). Benzer şekilde, östrojen uygulanan sıçanlarda serum osteokalsin seviyelerinde anlamlı azalmalar meydana geldiği bildirilmiştir (142). Genel mekanizma göz önünde tutulduğunda serum ALP ve osteokalsin seviyelerinin OVX işlemine bağlı olarak azalması, ortama östradiol ve A1221 verilmesiyle de tekrar kontrol seviyelerine gelmesi

beklenirdi. Ancak unutmamak gerekir ki, kemik rezorbsiyonunda meydana gelen artış yanı sıra formasyonda da artışın olması (ancak rezorbsiyon hızının formasyon hızından daha fazla olması) (46) serum ALP ve osteokalsin seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri kısmen açıklamaktadır. İlgili literatür incelendiğinde, osteokalsin ve ALP'nin kemik dönüşümünü her zaman tutarlı şekilde yansıtmadıkları tartışmalı bir konudur. Ayrıca PCBlerin direkt toksik etkileri sonucu serum ve idrar ALP seviyelerinde artışa neden oldukları bildirilmiştir (4) ki bu da bizim çalışmamızda görülen A1221 ve özellikle A1254 ile indüklenmiş serum ALP artışını açıklar niteliktedir.

6.4. Serum kalsiyum, inorganik fosfat, PTH ve kalsitonin seviyelerine etkileri

Çalışmamızda, intak ve OVX grubu sıçanlara östradiol, A1221 ve A1254 uygulamaları yapıp kalsiyum, inorganik fosfat, PTH ve kalsitonin seviyelerinde meydana gelen değişiklikler incelendi. A1221 uygulaması intak modelde kalsiyum seviyesini yükseltirken, OVX modelde de inorganik fosfat seviyelerinde artış meydana getirdi. İntak modeldeki sıçanlara A1254 verilmesini takiben kalsiyum ve inorganik fosfat seviyelerinde artışlar olduğu, OVX+A1254 grubundaki sıçanlarda da serum PTH'sinde artış meydana geldiği belirlendi. Östradiol uygulaması her iki modeldeki sıçanların serum kalsiyum seviyelerini yükseltmesi yanı sıra intak gruptaki sıçanların PTH ve kalsitonin seviyelerinde de artışlar meydana getirdi. OVX grubunda ise kalsiyum seviyesindeki artışı inorganik fosfat seviyesinde bir artış ve kalsitonin seviyesinde de bir azalma takip etti. PTH'nın, kemik rezorbsiyonunu (26, 125) ve formasyonunu (159) uyaran bir

hormon olduğu bilinmektedir. PTH'nin sürekli uygulanması osteoklastik aktiviteyi uyarak kemik kitlesinde azalmalara neden olurken, aralıklarla (intermittent) verilmesi osteoblast farklılaşmasını aktive ederek kemik kitlesinin artışına neden olur (111). Kalsitonin ise PTH'nin aksine serum kalsiyum seviyelerindeki artış ile uyarılmakta ve kalsiyumun kemikte depolanmasını uyarmak suretiyle serum seviyelerinin normal değere dönmesini sağlamaktadır (69). Östrojen sekresyonunun azalması ince bağırsakta kalsiyum absorpsiyonunun azalması ve idrar ile atılımının artmasına neden olur (115, 116, 109). Ohta ve ark. osteoporozda (115) ve OVX işleminden sonra (116) serum kalsiyum ve inorganik fosfat konsantrasyonlarının yükseldiğini rapor etmişlerdir. Bunun sebebinin de başlıca, östrojen salınımında meydana gelen azalma nedeniyle kemikten kalsiyumun salıverilmesi yüzünden olduğunu bildirmişlerdir. OVX'in serum kalsiyum seviyelerinde bir azalma, inorganik fosfat konsantrasyonunda ise artışa sebep olduğu bildirilmiştir (113). Kim ve ark., (92) OVX'in serum inorganik fosfat seviyelerini yükselttiğini bildirmişlerdir. Serum kalsiyum seviyesi üzerine PTH ve kalsitoninin etkisinden başka daha birçok faktörün de rol oynadığı (beslenme, bağırsaklardan absorpsiyon ve böbreklerden geri emilim gibi) iyi bilinmektedir. Vitamin D3'ün aktif formu olan 1 alfa-25-dihidroksikalsiferol'ün (1,25-OH₂-D-3) ince bağırsaklarda kalsiyum ve inorganik fosfat absorpsiyonu ile bunların böbreklerden geri emilimi için önemli bir pro-hormon olduğu bilinmektedir (45). PCBlere maruz kalmanın kalsiyum metabolizmasını etkilediği gösterilmiştir (4). Ancak aynı çalışmada uygulanan A1254, en yüksek doz (25 mg/kg) ve periyotta (15 hafta) bile serum 1,25-OH₂-D-3 düzeylerinde anlamlı

değişiklikler meydana getirmedir. Andrews ve arkadaşlarının (4) bu bulgusu, PCB'lerin kalsiyum absorpsiyonunu etkilemediği şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızda başvurulmuş östrojenik ajan A1221'in (7) intak gruptaki kalsiyum ve OVX grubundaki inorganik fosfat seviyeleri dışındaki diğer parametreler üzerine östradiol ile benzer etkiler göstermemesi, konunun sadece östrojenik etki bakımından değerlendirilmesinin tek başına yeterli olmayacağı ve farklı mekanizmaların da incelenmesi gerektiğini düşünmemize neden oldu.

6.5. Sonuç

PCB'lerin bazı bileşenlerinin östrojenik veya antiöstrojenik özelliklere sahip oldukları ve organizmada "aryl hydrocarbon" ve östrojen reseptörleri üzerinden östrojenin etkilerini taklit veya bloke ederek etkilerini gösterdikleri bildirilmiştir (126, 155). Çevresel kaynaklı östrojenik maddelerin organizmada daha uzun süre kalabildikleri rapor edilmiştir (160). Arcaro ve Gierthy (14) endokrin bozucu etkilerin çoğunu meme kanseri epitel hücre kültürlerinde gösterilmişlerdir. Kemik dokusunda düzenleyici fonksiyon gören bazı osteoblastların östrojen reseptörleri (alfa ve beta) taşıdığı, osteosit ve osteoklastların ise bu reseptörlere sahip olmadığı gösterilmiştir (49, 117). Çalışmamızda östrojenik ve anti-östrojenik özellikleri bakımından incelediğimiz A1221 (östrojenik) ve 1254'ün (anti-östrojenik) KMY, kemik histolojisi ve serum DPD konsantrasyonları üzerine östradiol benzer ve zıt etkiler sergiledikleri gözlemlendi.

Bu çalışmada, A1221 ve A1254'ün kemik metabolizmasını etkileme potansiyeline sahip olduklarını gösteren en önemli bulgu, idrarda belirlenen DPD

seviyeleri idi. Çok geniş bir hayvan grubundan 24 saatlik periyotta idrar toplamak teknik olarak çok zordu ve bu gerekçeyle yapılmadı. Ancak buna rağmen, deneyler sonlandırılmadan hemen önce sıçanlardan elde edilen idrar örnekleri, DPD düzeyi ölçümleri için oldukça tutarlı sonuçlar verdi. İntak hayvanlara uygulanan östradiol idrar DPD değerlerini azaltırken, tersine, OVX sıçanlarda kollajen yıkımı arttığı için DPD seviyeleri de kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Östrojenin kemik dokusundaki en önemli etkisi, osteoblastlarda kemik resorpsiyonunu sağlayan sitokinlerin (IL-1, IL-6 ve TNF- α) oluşumunu baskılayarak, kemik erimesini önlemektir (152). Sitokinler, kollajen yıkımını artırıcı etkilerini lokal (parakrin) olarak gösterdiklerinden, bunların serum profillerinin incelenmesi kemikteki metabolik etkileri hakkında bir fikir vermeyecekti. Bu nedenle bizim çalışmamızda serum IL-1, IL-6 ve TNF- α seviyeleri belirlenmedi, ayrıca, *in vivo* şartlarda bunların kemikteki miktarlarının ölçülmesi de teknik olarak mümkün değildi. Literatür incelendiğinde, bu çalışmanın, kemik dokusunda kollajenin PCBler tarafından etkilendiğini, yapım ve yıkımının östrojen benzeri mekanizmalarla değiştirilebildiğini gösteren ilk araştırma olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, anti-östrojenik potansiyele sahip A1254'ün kemik kollajen yıkımını arttırdığı, bu etkilerin endojen östrojenin az olduğu OVX modelde çok daha belirgin olduğu görüldü. Bu bulgular, PCBler ile kontamine olmuş bölgelerde yaşayan özellikle menopozdaki kadınlarda osteoporoz riskinin bu çevresel kirleticiler tarafından artırılabilirliğini düşündürmektedir. Bu çalışma, PCBlerin, tüm diğer zararlı etkilerinin yanı sıra, kemik dokusu üzerine de endokrin bozucu-değiştirici etkilerinin olduğunu göstermektedir.

6.6. İleri alışmalar:

Bu tez projesinden elde edilen bulgular ışığında, daha ileri olarak yapılacak çalışmalar için aşağıdaki hususlar öngörülebilir:

- 1- Daha uzun süreli (10 ve 15 hafta) ve farklı doz PCB uygulamalarının yapılması,
- 2- Aroclor gibi PCB karışımlarının yanı sıra, östrojenik ve anti-östrojenik özellikleri bilinen PCB bileşiklerinin (PCB 126 gibi) kullanılması,
- 3- İn vivo çalışmalarda, idrar DPD değerleriyle paralel olarak kemik mikro-mimarisinin elektron mikroskopik olarak görüntülenmesi,
- 4- Sıçanlara dikkatli şekilde uyarlanmış DEXA cihazı ve yazılımı ile KMY ölçümlerinin özellikle vertebral kolonda yapılması,
- 5- Kemik (femurda) dayanıklılık testleri ile korteks ve medullanın morfolometrik ölçümleri,
- 6- Kemik hücre kültürü modellerinde PCBlerin sitokin salınım profilleri üzerine direkt etkilerinin olup olmadığının araştırılması.

7. KAYNAKLAR

1. Abraham WR, Nogales B, Golyshin PN, Pieper DH, Timmis KN. (2002). Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr Opin Microbiol.* 5: 246-253.
2. Abramowicz DA. (1990). Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: A review. *Crit Rev Biotechnology.* 10: 241-251.
3. Ahlborg UG, Becking GC, Birnbaum LS, Brouwer A, Derks HJ, Feeley M. Feeley M, Golor G, Hanberg A, Larsen JC, Liem AK, Safe SH, Schlatter C, Waern F, Younes M, Yrjänheikki E (1994). Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere.* 28: 1049-1067.
4. Andrews JE. (1989). Polychlorinated biphenyl (Arochlor 1254) induced changes in femur morphometry, calcium metabolism, and nephrotoxicity. *Toxicology* 57, 83-96.
5. Anon. (2005). 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH). Erişim: (<http://www.probes.com/servlets>). Erişim Tarihi: 05.12.2004.
6. Anon. (2005). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi-Dermatoloji Anabilim Dalı. Erişim:(<http://lokman.cu.edu.tr/dermatology/egitim/age20021007.htm>). Erişim Tarihi: 20.12.2004.
7. Anon. (2005). Environmental contaminants and the neuroecolog reproductive behavior. Erişim: (<http://www.iet.msu.edu>). Erişim Tarihi: 31.12.2004.
8. Anon. (2005). Fluo calcium indicators. Erişim: (<http://www.probes.com/servlets>). Erişim Tarihi: 04.12.2004.
9. Anon. (2005). Lymphatic System. Erişim: (<http://www.manavata.org>). Erişim Tarihi: 30.12.2004.
10. Anon. (2005). Mouse dissection for Principles of Biology. Erişim: (http://www.ksu.edu/biology/pob/mouse_dissection.pdf). Erişim Tarihi: 28.12.2004.
11. Anon. (2005). Penn State Hershey Medical Center FRED-Faculty Research Expertise Database. Erişim: (<http://fred.hmc.psu.edu>). Erişim Tarihi: 05.12.2004.
12. Anon. (2005). Propidium iodide nucleic acid stain. Erişim: (<http://www.probes.com/servlets>). Erişim Tarihi: 04.12.2004.
13. Apostoli P, Mangili A, Carasi S, Manno M. (2003). Relationship between PCBs in blood and D-glucaric acid in urine. *Toxicol Lett.* 144: 17-26.
14. Arcaro KF and Gierthy JF. (2001). Assessing modulation of estrogenic activity of environmental and pharmaceutical compounds using MCF-7 focus assay. *Methods Mol Biol*, 176: 341-51.
15. ATSDR. (1995). Draft toxicological profile for polychlorinated biphenyls. Research Triangle Institute, 363.
16. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. (2000). Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem.* 275: 4858-64.

17. Baron RE. (1997). Anatomy and ultrastructure of bone in: *Osteoporosis: Fundamentals and Clinical Practice* ed: Favus MJ, Lippincot-Raven, Philadelphia, 3-10.
18. Birnbaum LS and Fenton SE. (2003). Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Perspect*, vol. 111, pp. 389-94.
19. Brown JF, Bedard DL, Brennan MJ, Carnahan JC, Feng H, Wanger RE. (1987). Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediment. *Science*. 236: 709-711.
20. Brown JF. (1994). Determination of PCB metabolic, excretion and accumulation rates for use as indicators of biological response and relative risk. *Environ Sci Technol*. 28: 2294-2305.
21. Brunner MJ, Sullivan TM, Singer AW. (1996). An assessment of the chronic toxicity and oncogenicity of Arocolor 1016, Arocolor 1242, Arocolor 1254 and Arocolor 1260 administered in diet to rats. Battelle Study No: SC92192. Colombus, OH, USA.
22. Buchanan DL, Sato T, Peterson RE and Cooke PS. (2000). Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mouse uterus: critical role of the aryl hydrocarbon receptor in stromal tissue. *Toxicol Sci*, vol. 57, pp. 302-311.
23. Bushart SP, Bush B, Barnard EL, Bott A. Volatilization of extensively dechlorinated PCBs from historically-contaminated sediments. *Environ Health Perspect* (in pres).
24. Bushnell PJ, Rice DC. (1999). Behavioral assessments of learning and attention in rats exposed perinatally to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) *Neurotoxicol Teratol*. 21: 381-392.
25. Calero JA, Dela Piedra C, Diaz Curiel M. (1998). Usefulness of serum pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptides of type I collagen and osteocalcin in study of the bone resorption rate in oophorectomized rats. *Miner Electrolyte Metab* 24: 3003-6.
26. Canalis E. (1983). The hormone and local regulation of bone formation. *Endocrinol. Rev.*, 4, 62-76.
27. Carpenter DO, Arcaro KF, Bush B, Niemi WD, Pang S and Vakharia DD. (1998). Human health and chemical mixtures: an overview. *Environ Health Perspect*, vol. 106, pp. 1263-1270.
28. Carpenter DO, Stoner CT, Lawrence DA, Niemi WD, Shain W, Seegal R. (1996). Multiple mechanisms of PCB neurotoxicity. *Proc Pacific Basin Conference on Hazardous Waste*. Kuala Lumpur, Malaysia. Sayfa: 404-418.
29. Carpenter DO. (1998). Polychlorinated biphenyls and human health. *Int J Occup Med Environ Health*. 11: 291-303.
30. Cauley JA, Gutai JP, Kuller LH, et al. (1988). Endogenous estrogen levels and calcium intakes in postmenopausal women. Relationships with cortical bone measures. *JAMA*; 260:3150-3155.
31. Chang KJ, Hsieh KH, Lee TP, Tang SY, Tung TC. (1981). Immunologic evaluation of patients with polychlorinated biphenyl poisoning: determination of lymphocyte subpopulations. *Toxicol Appl Pharmacol*. 61: 58-63.

32. Chen CJ, Yu ML, Rogan WJ, Gladen BC, Hsu CC. (1994). A 6-year follow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yu-cheng children. *Am J Public Health*. 84: 415-421.
33. Chiaranzelli JR, Scrudato RJ, Wunderlich ML, Oenga GN, Lashko OP. (1997b). PCB volatile loss and the moisture content of sediment during drying. *Chemosphere* 34: 2429 – 2436.
34. Chiarenzelli J, Scrudato R, Arnold G, Wunderlich M, Rafferty D. (1996). Volatilization of polychlorinated biphenyls from sediment during drying at ambient conditions. *Chemosphere* 33: 899 – 911.
35. Chiarenzelli J, Scrudato R, Wunderlich M. (1997a). Volatile loss of PCB Aroclors from subaqueous sand. *Environ Sci Technol* 31: 597 – 602.
36. Coglianò VJ. (1998). Assessing the cancer risk from environmental PCBs. *Environ Health Perspect*. 106: 317-323
37. Collins WT, Capen CC. (1980). Fine structural lesions and hormonal alterations in thyroid glands of perinatal rats exposed in utero and by the milk to polychlorinated biphenyls. *Am J Pathol*. 99: 125-142.
38. Connor K, Ramamoorthy K, Moore M, Mustain M, Chen I, Safe S, Zacharewski T, Gillesby B, Joyeux A and Balaguer P. (1997). Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and antiestrogens: structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 145, pp. 111-123.
39. Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetcke KP, Hoffmann JL, Morrow MS, Rodier DJ, Schaeffer JE, Touart LW, Zeeman MG, Patel YM. (1998). Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environ Health Perspect*. 106(Suppl 1): 11-56.
40. Cummings SR, Kelsey JL, Nevitt MC, O'Dowd KJ. (1985). Epidemiology of osteoporosis and osteoporotic fractures. *Epidemiol Rev*; 7:178-208.
41. Çok I, Görücü E, Şatiroğlu MH, Demircigil GC. (2003). Polychlorinated biphenyl (PCB) levels in human milk samples from Turkish mothers. *Bull Environ Contam Toxicol*. 70: 41-45.
42. Çok İ, Şatiroğlu MH. (2004). Polychlorinated biphenyl levels in adipose tissue of primiparous women in Turkey. *Environmental International*; 7- 10.
43. Davis D, Safe S. (1990). Immunosuppressive activities of polychlorinated biphenyls in C57BL/6N mice: structure-activity relationships as Ah receptor agonists and partial antagonists. *Toxicology*. 63: 97-111.
44. De Leo V, Ditto A, la Marca A, Lanzetta D, Massafra C, Morgante G. (2000). Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in peri and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 66:263-267.
45. DeLuca HF. (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 80: 1689S-96S.

46. Dent C, Friedman M. (1965). Idiopathic juvenile osteoporosis. *Quarterly Journal of Medicine, New Series* 134: 177-210.
47. Dominguez Cabrera C, Sosa Henriquez M, Traba ML, Alvarez Villafane E, de la Piedra C. (1998). Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 8: 147-51.
48. Draper CR, Edel MJ, Dick IM, Randall AG, Martin GB, Prince RL. (1997). Phytoestrogens reduce bone loss and bone resorption in oophorectomized rats. *J. Nutr.* 127, 1795-1799.
49. Egerbacher M, Helmreich M, Rossmanith W, Haeusler G. (2002). Estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta are present in the human growth plate in childhood and adolescence, in identical distribution. *Horm Res*, 58: 99-103.
50. EPA. (1996). PCBs: Cancer dose-response assessment and application to environmental mixtures. EPA/600/P-96/001F. Washington DC, USA.
51. Erben RG, Brunner KS, Breig B. (2004). Long-term sensitivity of uterus and hypothalamus/pituitary axis to 17beta-estradiol is higher than that of bone in rats. *J Bone Miner Res.* 19: 1827-32.
52. Eriksson P, Fredriksson A. (1998). Neurotoxic effects in adult mice neonatally exposed to 3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl or 2,3,3',4'-pentachlorobiphenyl. Changes in brain nicotinic receptors and behaviour. *Environ Toxicol Pharmacol.* 5: 17-28.
53. Ershler WB, Harman SM, Keller ET. (1997). Immunologic aspects of osteoporosis. *Dev Comp Immunol.* 21: 487-99.
54. Fischer LJ, Seegal RF, Ganey PE, Pessah IN and Kodavanti PR. (1998). Symposium overview: toxicity of non-coplanar PCBs. *Toxicol Sci*, vol. 41, pp. 49-61.
55. Fischer LJ, Wagner MA, Madhukar BV. (1999). Potential involvement of calcium, CaM kinase II, and MAP kinases in PCB-stimulated insulin release from RINm5F cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 159: 194-203.
56. Fischer LJ, Zhou HR, Wagner MA. (1996). Polychlorinated biphenyls release insulin from RINm5F cells. *Life Sci.* 59: 2041-2049.
57. Fish KM, Principe JM. (1994). Biotransformations of Aroclor 1242 in Hudson River test tube microcosms. *Appl Environ Microbiol.* 60: 4289-4296.
58. Frazier DE, Silverstone AE, Gasiewicz TA. (1994). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced thymic atrophy and lymphocyte stem cell alterations by mechanisms independent of the estrogen receptor. *Biochem Pharmacol.* 47: 2039-2048.
59. Frost HM, Jee WSS. (1992). On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. *Bone and Mineral*, 18:227-236.
60. Gajewski TF, Joyce J, Fitch FW. (1989). Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. III. Differential selection of Th1 and Th2 murine helper lymphocyte clones using recombinant IFN-gamma. *J Immunol.* 143: 15-22.

61. Gao Y, Qian WP, Dark K, Toraldo G, Lin AS, Guldberg RE, Flavell RA, Weitzmann MN, Pacifici R. (2004). Estrogen prevents bone loss through transforming growth factor beta signaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci*, 101:16618-23.
62. Garcia-Moreno, Calvo OM, Herrero S, Martin E, Suquia B, San Roman JI, Martin M, Garcia-Talavera JR, Calvo JJ, del Pino J. (1995). Heterogeneous decrease of bone mineral density in the vertebral column of ovariectomized rats. *Bone* 16:295S-300S.
63. Gilbert ME, Liang D. (1998). Alterations in synaptic transmission and plasticity in hippocampus by a complex PCB mixture, Aroclor 1254. *Neurotoxicol Teratol*. 20: 383-389.
64. Gladen BC, Rogan WJ, Harday P, Thullen J, Tully M. (1988). Development after exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorobiphenyl dichlorethene transplacentally and through human milk. *J Pediat* 113: 991 – 995.
65. Gozgit JM, Nestor KM, Fasco MJ, Pentecost BT and Arcaro KF. (2004). Differential action of polycyclic aromatic hydrocarbons on endogenous estrogen-responsive genes and on a transfected estrogen-responsive reporter in MCF-7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 196, pp. 58-67.
66. Gray LE, Ostby J, Marshall R, Andrews J. (1993). Reproductive and thyroid effects of low-level polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposure. *Fundam Appl Toxicol*. 20: 288-294.
67. Guengerich FP. (1989). Characterization of human microsomal cytochrome P-450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 29: 241-264.
68. Guo YL, Chen YC, Yu ML, Hsu CC. (1994). Early development of Yu-Cheng children born seven to twelve years after the Taiwan PCB outbreak. *Chemosphere*. 29: 2395-2404.
69. Guyton AC. (2001). Textbook of medical physiology. Çavuşoğlu H, Yeğen ÇB, Aydın Z, Alican İ (Editörler). Yüce yayımları a.ş. & Nobel tıp kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul. 10. edisyon. Sayfa 909.
70. Hansen LG. (1998). Stepping backward to improve assessment of PCB congener toxicities. *Environ Health Perspect*. 106(Suppl 1): 171-189.
71. Hany J, Lilienthal H, Sarasin A, Roth-Harer A, Fastabend A, Dunemann L, Lichtensteiger W, Winneke G. (1999). Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference behavior. *Toxicol Appl Pharmacol*. 158: 231-243.
72. Haris M, Zacharewski T, Safe S. (1993). Comparative potencies of Aroclor 1232, 1242, 1248, 1254, and 1260 in male Wistar rats-assessment of the toxic equivalency factor (TEF) approach for polychlorinated biphenyls (PCBs). *Fund Appl Toxicol* 20:456-463.
73. Harkness MR, McDermott JB, Abramowicz DA, Salvo JJ, Flanagan WP, Stephens ML, Mondello FJ, May RJ, Lobos JH, Carroll KM. (1993). In situ stimulation of aerobic PCB biodegradation in Hudson River sediments. *Science*. 259: 503-507.

74. Henriksen GL, Ketchum NS, Michalek JE, Swaby JA. (1997). Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology*. 8: 252-258.
75. Holene E, Nafstad I, Skaare JU, Beernhoft A, Engen P, Sagvolden T. (1995). Behavioral effects of pre- and postnatal exposure to individual polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Environ Toxicol Chem* 14: 967 – 976.
76. Honjo S, Mizunuma H, Soda M, Igarashi M. (1989). Effect of estrogen replacement therapy on the serum osteocalcin level in the postmenopausal and castrated women. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*. 41(10):1571-6.
77. Huber F, Traber L, Roth HJ, Heckel V, Schmidt-Gayk H. (2003). Markers of bone resorption-measurement in serum, plasma or urine? *Clin Lab*; 49(5-6):203-7.
78. Jacobson JL, Jacobson SW, Humphrey HE. (1990). Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *J Pediatr*. 116: 38-45.
79. Jacobson JL, Jacobson SW. (1996). Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N Engl J Med*. 335: 783-789.
80. Jacobson JL, Jacobson SW. (1997). Evidence for PCBs as neurodevelopmental toxicants in humans. *Neurotoxicology*. 18: 415-424.
81. Jacobson SW, Fein GG, Jacobson JL, Schwartz PM, Dowler JK. (1985). The effect of intrauterine PCB exposure on visual recognition memory. *Child Dev*. 56: 853-860.
82. Joshi SC, Jain GC and Lata M. (1994). Effects of ketoconazole (an imidazole antifungal agent) on the fertility and reproductive function of male mice. *Acta Eur Fertil*, vol. 25, pp. 55-58.
83. Kalu DN. (1991). The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15:175-192.
84. Kanbur NO, Derman O, Kinik E. (. 2005). The relationships between pubertal development, IGF-1 axis, and bone formation in healthy adolescents. *J Bone Miner Metab* 23: 76-83.
85. Kassem M. (1997). Cellular and molecular effects of growth hormone and estrogen on human bone cells. *APMIS Suppl*. 71: 1-30.
86. Kato Y, Haraguchi K, Shibahara T, Masuda Y, Kimura R. (1998). Reduction of thyroid hormone levels by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Arch Toxicol*. 72: 541-544.
87. Kavuncu V. (2001). Ovarektomili dişi ratlarda kalsitonin ve östrojenin etkinliği. Doktora tezi. Elazığ.
88. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. (1995). The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop*; 313:36-46.
89. Kelce WR and Wilson EM. (1997). Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J Mol Med*, vol. 75, 198-207.

90. Kerkvliet NI, Steppan LB, Smith BB, Youngberg JA, Henderson MC, Buhler DR. (1990). Role of the Ah locus in suppression of cytotoxic T lymphocyte activity by halogenated aromatic hydrocarbons (PCBs and TCDD): structure-activity relationships and effects in C57B1/6 mice congenic at the Ah locus. *Fundam. Appl Toxicol.* 14: 532-541.
91. Kim JS, Sokol RC, Liu X, Bethoney CM, Rhee GY. (1996). Population dynamics of dechlorinators and factors affecting the level and products of PCB dechlorination in sediments. *Proc Pasific Basin Conference on Hazardous Waste.* Kuala Lumpur, Malaysia. 196-210.
92. Kim Sang-keun, Lee Myung-hun, and Rhee Man-hee. (2003). Studies on the effects of biomedical agents on serum concentration of Ca^{+2} , P and ALP activity in osteoporosis-induced rats. *J. Vet. Sci.* 4(2), 151-154.
93. Kodavanti PR, Tilson HA. (1997). Structure-activity relationships of potentially neurotoxic PCB congeners in the rat. *Neurotoxicology.* 18: 425-441.
94. Krupa B, Miazgowski T. (2005). Bone mineral density and markers of bone turnover in boys with constitutional delay of growth and puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* PMID: 15687323.
95. Kuiper G, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg P, Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139, 4252-4263.
96. Lai TJ, Guo YL, Yu ML, Ko HC, Hsu CC. (1994). Cognitive development in Yucheng children. *Chemosphere.* 29: 2405-2411.
97. Lakatos P. (2003). Thyroid hormones: beneficial or deleterious for bone? *Calcif Tissue Int.* 73: 205-9.
98. Lees RL, Sabharwal VK, Heersche JNM. (2001). Resorptive state and cell size influence intracellular pH regulation in rabbit osteoclasts cultured on collagen-hydroxyapatite films. *Bone* 28, 187-194.
99. Lilienthal H, Fastabend A, Hany J, Kaya H, Harer A, Dunemann L, Winneke G. (2000). Reduced levels of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in rat dams and offspring after exposure to a reconstituted PCB mixture. *Toxicological sciences* 57: 292 – 301.
100. Lonky E, Reihman J, Darvill T. (1996). Mather J, Daly H. Neonatal behavior assessment scale performance in humans influenced by maternal consumption of environmental contaminated Lake Ontario fish. *J Great Lakes Res* 22: 198 – 212.
101. Machala M, Blaha L, Lehmler HJ, Pliskova M, Majkova Z, Kapplova P, Sovadinova I, Vondracek J, Malmberg T and Robertson LW. (2004). Toxicity of hydroxylated and quinoid PCB metabolites: inhibition of gap junctional intercellular communication and activation of aryl hydrocarbon and estrogen receptors in hepatic and mammary cells. *Chem Res Toxicol*, vol. 17, pp. 340-347.
102. Manelli F and Giustina A. (2000). Glucocorticoid-induced Osteoporosis. *TEM*, 11; 79-85.

103. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. (2002). Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res.* 57:385-409.
104. Massaad C, Entezami F, Massade L, Benahmed M, Olivennes F, Barouki R and Hamamah S. (2002). How can chemical compounds alter human fertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, vol. 100, pp. 127-137.
105. Mauras N. (1999). Growth hormone, insulin-like growth factor I and sex hormones: effects on protein and calcium metabolism. *Acta Paediatr Suppl.* 88: 81-3.
106. Mayes BA, McConnell EE, Neal BH, Brunner MJ, Hamilton SB, Sullivan TM, Peters AC, Ryan MJ, Toft JD, Singer AW, Brown JF Jr, Menton RG, Moore JA. (1998). Comparative carcinogenicity in Sprague-Dawley rats of the polychlorinated biphenyl mixtures Aroclors 1016, 1242, 1254, and 1260. *Toxicol Sci.* 41: 62-76.
107. McConkey DJ, Hartzell P, Duddy SK, Hakansson H, Orrenius S. (1988). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin kills immature thymocytes by Ca^{2+} -mediated endonuclease activation. *Science.* 242: 256-259.
108. McKinney JD, Waller CL. (1994). Polychlorinated biphenyls as hormonally active structural analogues. *Environ Health Perspect.* 102: 290-297.
109. Meller Y, Kestenbaum RS, Mozes M, Mozes G, Yagil R, and Shany S. (1984). Mineral and endocrine metabolism during fracture healing in dogs. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 187, 289-295.
110. Murphy S, Khaw KT, Sneyd MJ, Compston JE. (1992). Endogenous sex hormones and bone mineral density among community-based postmenopausal women. *Postgrad Med J;* 68:908-913.
111. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. (2001). Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Eng J Med* 344:1434-1441.
112. Niemi WD, Audi J, Bush B, Carpenter DO. (1998). PCBs reduce long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Exp Neurol.* 151: 26-34.
113. Nyda MJ, de Majo SF, and Lewis RA. (1948). The effects of ovariectomy and physiological doses of estradiol upon body weight, linear growth and fat content of the female albino rat. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 83, 279-287.
114. Oakley GG, Devanaboyina U, Robertson LW, Gupta RC. (1996). Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. *Chem Res Toxicol.* 9: 1285-1292.
115. Ohta H, Makita K, Suda Y, Ikeda T, Masuzawa T, and Nozawa S. (1992b). Influence of oophorectomy on serum levels of sex steroids and bone metabolism and assessment of bone mineral density in lumbar trabecular bone by QCT-C value. *J. Bone Miner. Res.* 7(6), 659-665.

- 116.Ohta H, Masuzawa T, Ikeda T, and Nozawa S. (1992a). Which is more osteoporosis-including, menopause or oophorectomy? *Bone Miner.* 19, 273-285.
- 117.Pal R, Chaturvedi R, Kamboj KK, Chowdhury SR and Dwivedi A. (2001). Estrogen receptors in rat bone: their interaction with estrogen receptor modulators. *Endocr Res*, 27: 283-91.
- 118.Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, M:alluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. (1987). Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2:595-610.
- 119.Parkinson A, Safe S, Robertson LW et al. (1983). Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in liver microsomes from polychlorinated or ploybrominated biphenyl-treated rats. A study of structure-activity relationships. *J Biol Chem* 258: 5967 – 5976.
- 120.Pluim HJ, de Vijlder JJ, Olie K, Kok JH, Vulsma T, van Tijn DA, van der Slikke JW, Koppe JG. (1993). Effects of pre- and postnatal exposure to chlorinated dioxins and furans on human neonatal thyroid hormone concentrations. *Environ Health Perspect.* 101: 504-508.
- 121.Poland A, Knutson JC. (1982). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 22: 517-554.
- 122.Pollenz RS, Sattler CA and Poland A. (1994). The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol*, vol. 45, pp. 428-438.
- 123.Porterfield SP. (1994). Vulnerability of the developing brain to thyroid abnormalities: environmental insults to the thyroid system. *Environ Health Perspect.* 102(Suppl 2): 125-130.
- 124.Porterfield SP. (2000). Thyroidal dysfunction and environmental chemicals--potential impact on brain development. *Environ Health Perspect.* 108(Suppl 3): 433-438.
- 125.Raisz LG. (1988). Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *New Engl. J. Med.* 318, 818-828.
- 126.Ramamoorthy K, Gupta MS, Sun G, McDougal A, Safe SH. (1999). 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl exhibits antiestrogenic and antitumorigenic activity in the rodent uterus and mammary cells and in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 20: 115-23.
- 127.Rhee GY, Bush B, Bethoney CM, DeNucci A, Oh HM, Sokol RC. (1993). Reductive dechlorination of Arocolor 1242 in anaerobic sediments: pattern, rate and concentration dependence. *Environ Toxicol Chem.* 12: 1025-1032.

- 128.Rhee GY, Sokol RC, Bethoney CM, Bush B. (1993). A long-term study of anaerobic dechlorination of PCB congeners by sediment microorganisms: Pathway and mass balance. *Environ Toxicol Chem.* 12: 1829-1834.
- 129.Rodan GA. (1992). Introduction to bone biology. *Bone* 13, S3-S6.
- 130.Rogan WJ, Gladen BC. (1992). Neurotoxicology of PCBs and related compounds. *Neurol Toxicol.* 13: 27-36.
- 131.Rolands JC, Gustafsson J. (1997). Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol.* 27: 109-134. (193)
- 132.Safe S and Wormke M. (2003). Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol*, vol. 16, pp. 807-816.
- 133.Safe S. (1994). Polychlorinated bipheyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 24: 87 – 149.
- 134.Safe S. (2002). Environmental estrogens: roles in male reproductive tract problems and in breast cancer. *Rev Environ Health*, vol. 17, pp. 253-262.
- 135.Sağlam M, Aştı NR, Özer A. (1997). Genel histoloji. Yorum matbaacılık sanayi, Ankara. Genişletilmiş 5. baskı. Sayfa: 181-204.
- 136.Salamone LM, Glynn NW, Black DM, et al. (1996). Determinants of premenopausal bone mineral density: the interplay of genetic and lifestyle factors. *J Bone Minner Res*; 11:1557-1565.
- 137.Sandal S. (2004). Poli klorlu bifenillerin fare timus hücre kültüründe immünobiyolojik etkileri. Doktora tezi. Elazığ.
- 138.Schantz SL, Seo BW, Wong PW, Pessah IN. (1997). Long-term effects of developmental exposure to 2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB 95) on locomotor activity, spatial learning and memory and brain ryanodine binding. *Neurotoxicology.* 18: 457-467.
- 139.Schuur AG, Brouwer A, Bergman A, Coughtrie MW, Visser TJ. (1998). Inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. *Chem Biol Interact.* 109: 293-297.
- 140.Secretó FJ, Grover A, Pacurari M, Rice MB, Kantorow M, Bidwai AP, Blaha JD, Keeting PE. (2003). Estrogen potentiates the combined effects of transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha on adult human osteoblast-like cell prostaglandin E2 biosynthesis. *Calcif Tissue Int.* 73: 565-74.
- 141.Seegal RF, Bush B, Shain W. (1990). Lightly chlorinated ortho-substituted PCB congeners decrease dopamine in nonhuman primate brain and in tissue culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 106: 136-144.
- 142.Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W. (2004). Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone. *Toxicology.* 205: 103-12.

143. Shain W, Overmann SR, Wilson LR, Kostos J, Bush B. (1986). A congener analysis of polychlorinated biphenyls accumulating in rat pups after perinatal prenatal exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 15: 678 – 707.
144. Shiu WY, Mackay D. (1986). A critical review of aqueous solubilities, vapor pressures, Henry's Law constants, and octanol water partition coefficients of polychlorinated biphenyls. *J Phys Chem Ref Data*. 15:91-929
145. Silkworth JB, Antrim L, Kaminsky LS. (1984). Correlations between polychlorinated biphenyl immunotoxicity, the aromatic hydrocarbon locus, and liver microsomal enzyme induction in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Toxicol Appl Pharm*. 75: 156-165.
146. Silkworth JB, Grabstein EM. (1982). Polychlorinated biphenyl immunotoxicity: Dependence on isomer planarity and the Ah gene complex. *Toxicol Appl Pharmacol* 65: 109 – 115.
147. Sinkkonen S, Paasivirta J. (2000). Degradation half-life times of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling. *Cemosphere*. 40: 943-949.
148. Smialowicz RJ, Andrews JA, Riddle MM, Rogers RR, Luebke W, Copeland CB. (1989). Evaluation of the immunotoxicity of low level PCB exposure in the rat. *Toxicology*. 56: 197-211.
149. Smith AG, Gangolli SD. (2002). Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns. *Food Chem Toxicol*. 40: 767-779.
150. Smithwick LA, Smith A, John F. Quensen III. JA, Stack A, London L, Morris PJ. (2003). Inhibition of LPS-induced splenocyte proliferation by orthosubstituted polychlorinated biphenyl congeners. *Toxicology*. 188: 319-333.
151. Song SJ. (1993). Bone metabolism in postmenopausal women and after estrogen treatment. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 28(2):79-81, 122.
152. Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S. (1999). The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol*, 13: 819-28.
153. Speroff L, Glass HR, Kase GN. (1996). *Klinik jinekolojik endokrinoloji ve infertilite*. Erk A (Editör). Nobel tıp kitabevleri, İstanbul. Sayfa: 617-630.
154. Spink DC, Lincoln DW, Dickerman HW and Gierthy JF. (1990). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes an extensive alteration of 17 α -estradiol metabolism in human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, vol. 87, pp. 6917-6921.
155. Ssempebwa J, Yılmaz B, Carpenter DO and Arcaro KF. (2002). Antioestrogenic activity of a reconstituted PCB mixture of PCBs in a human breast-cancer cell assay. *The Toxicologist*, 66, P178.
156. Stahl S, Chun TY, Gray WG. (1998). Phytoestrogens act as estrogen agonists in an estrogen-responsive pituitary cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 152, 41-48.
157. Stewart PW, Reihman J, Lonky EI, Darvill TJ, Pagano J. (2003). Cognitive development in preschool children prenatally exposed to PCBs and MeHg. *Neurotoxicol Teratol*. 25: 11-22.

158. Storelli MM, Storelli A, D'Addabbo R, Barone G, Marcotrigiano GO. (2004). Polychlorinated biphenyl residues in deep-sea fish from Mediterranean Sea. *Environ Int.* 30: 343-349.
159. Tam CS, Heersche JNM, Murray TM, and Parsons JA. (1982). Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology*, 110, 506-512.
160. Tapiero H, Ba GN, Tew KD. (2002). Estrogens and environmental estrogens. *Biomed Pharmacother*, 56: 36-44.
161. Theelen RMC, Liem AKD, Slob W, van Wijnen JH. (1993). Intake of 2,3,7,8, chlorine substituted dioxins, furans and planar PCBs from food in The Netherlands: median and distribution. *Chemosphere*; 27: 1625-35.
162. Tiedje JM, Quensen JF, Chee-Sanford J, Schimel JP, Boyd SA. (1993). Microbial reductive dechlorination of PCBs. *Biodegradation*. 4: 231-240.
163. Tilson HA, Kodavanti PR. (1997). Neurochemical effects of polychlorinated biphenyls: an overview and identification of research needs. *Neurotoxicology*. 18: 727-743.
164. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F and Giguere V. (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol*, vol. 11, pp. 353-365.
165. Tryphonas H, Luster MI, Schiffman G, Dawson LL, Hodgen M, Germolec D, Hayward S, Bryce F, Loo JC, Mandy F. (1991). Effect of chronic exposure of PCB (Aroclor 1254) on specific and nonspecific immune parameters in the rhesus (*Macaca mulatta*) monkey. *Fundam Appl Toxicol*. 16: 773-786.
166. Uebelhart, D., Gineyts, E., Chapuy, M.C., Delmas, P.D., 1990. Urinary excretion of pyridinium crosslinks. A new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner.* 8, 87-96.
167. Ueng TH, Wang HW, Huang YP and Hung CC. (2004). Antiestrogenic effects of motorcycle exhaust particulate in MCF-7 human breast cancer cells and immature female rats. *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 46, pp. 454-462.
168. Vaananen HK, Harkonen PL. (1996). Estrogen and bone metabolism. *Maturitas* 23:S65-9.
169. Vos JG, Bolksma N, Osterhaus AD, van Loveren H, Wester PW. (1996). Comparative sensitivity of different species to environmental chemical-induced immunotoxicity. In: *Modulators of Immune Responses: The Evolutionary Trail*. SOS Publications. Fair Haven, NJ. USA. Sayfa: 341-347, 351-364.
170. Wassermann D, Wassermann M, Lemesch C. (1975). Ultrastructure of beta-cells of the endocrine pancreas in rats receiving polychlorinated biphenyls. *Environ Physiol Biochem*. 5: 322-340.
171. Wong C, Kelce WR, Sar M and Wilson EM. (1995). Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J Biol Chem*, vol. 270, pp. 19998-20003.

172. Wronski TJ, Yen CF. (1991). The ovariectomized rat model as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cells Materails suppl.* 1:69-74.
173. Yılmaz B. (2003). Endokrin bozucu kimyasal kirleticiler. *Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 29. Ulusal Kongresi Bildiri Kitabı*. GATA. Ankara, Türkiye. Sayfa: 28.
174. Yoo BS, Jung KH, Hana SB, Kim HM. (1997). Apoptosis-mediated immunotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) in murine splenocytes. *Toxicol Lett.* 91: 83-89.
175. Zallone AZ, Zambonin G. (1998). Cellular basis of bone resorption in: *Bone densitometry and osteoporosis*. ed: Genant HK, Guglielmi G, Jegas M. Springer, Berlin, 83-93.
176. Zhao F, Mayura K, Harper N, Safe SH, Phillips TD. (1997). Inhibition of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced fetal cleft palate and immunotoxicity in C57BL/6 mice by 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl. *Chemosphere.* 34: 1605-1613.
177. Zoeller RT, Dowling AL, Vas AA. (2000). Developmental exposure to polychlorinated biphenyls exerts thyroid hormone-like effects on the expression of RC3/neurogranin and myelin basic protein messenger ribonucleic acids in the developing rat brain. *Endocrinology.* 141: 181-189.

8. ÖZGEÇMİŞ

02.07.1979 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta, lise eğitimimi aynı şehirde tamamladım. 1997 yılında başladığım İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği'nden, 2001 yılında Biyoloji Öğretmeni olarak mezun oldum. Aynı yıl Malatya'da Öge dershanesinde öğretmen olarak göreve başladım. 2001 yılı bahar döneminde, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım. 2002 Kasım ayında öğretmenlik görevinden ayrılarak, Fırat Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak geçiş yaptım. Evli ve bir çocuk annesiyim.