T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNATÖRLÜĞÜ

TDK-2015-6181

BİSFENOL A'NIN FETAL KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNE TERATOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Proje Ekibi
Doç. Dr. Tolga ERTEKİN (Proje Yöneticisi)

Öğr. Gör. Dr. Emre ATAY (Doktora Tez Öğrencisi, Araştırmacı)

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR (Araştırmacı)

Doç. Dr. Arzu Hanım YAY (Araştırmacı)

Yrd. Doç. Dr. Mehtap NİSARİ (Araştırmacı)

Arş. Gör. Hatice SUSAR (Araştırmacı)

Arş. Gör. Özge AL (Araştırmacı)

Doktora Tez Projesi

Eylül 2017

KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

BİSFENOL A'NIN FETAL KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNE TERATOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Emre ATAY

Danışman
Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

Doktora Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2015-6181 nolu proje ile desteklenmiştir.

Eylül 2017
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı : Emre ATAY

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Bisfenol A'nın Fetal Kemik Gelişimi Üzerine Teratojenik Etkilerinin Araştırılması" adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Emre ATAY

Danışman

Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

Anatomi Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Erdoğan ÜNÜR

KABUL VE ONAY

Doç. Dr. Tolga ERTEKİN danışmanlığında Emre ATAY tarafından hazırlanan **"Bisfenol A'nın Fetal Kemik Gelişimi Üzerine Teratojenik Etkilerinin Araştırılması"** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Anatomi** Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

18./09/2017

JÜRİ: **İMZA**

Danışman : Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

(Afyon Kocatepe Ünv. Tıp Fakültesi Anatomi ABD)

Üye : Prof. Dr. Erdoğan UNUR

(Erciyes Ünv. Tıp Fakültesi Anatomi ABD)

Üye : Prof. Dr. Ayhan DÜZLER

(Erciyes Ünv. Veteriner Fakültesi Anatomi ABD)

Üye : Doç. Dr. Mehmet Tuğrul YILMAZ

(NecmettinErbakan Ünv. Meram Tıp Fakültesi Anatomi ABD)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet DEMİR

(Kahramanmaraş Sütçü İmam Ünv. Tıp Fakültesi Anatomi ABD)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ...305..... tarih ve ...09.09.2017..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Aykut ÖZDAREN DELİ

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez çalışmam boyunca titiz çalışmasıyla bilgi ve desteğini esirgemeyen, yeri geldiğinde bir BABA, yeri geldiğinde bir AĞABEY gibi yanımda olan Sayın Hocam Doç. Dr. Tolga ERTEKİN'e,

Anatomi Anabilim Dalında geçirdiğim süre boyunca yetişmemde büyük emekleri olan ve aynı zamanda bir dönem danışmanlığımı yapan Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Erdoğan UNUR'a, yetişmemde büyük emekleri olan Anatomi Anabilim Dalı değerli hocaları Sayın Prof. Dr. Kenan AYCAN, Sayın Prof. Dr. Nihat EKİNCİ, Sayın Prof. Dr. Harun ÜLGER, Sayın Prof. Dr. Niyazi ACER ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehtap NİSARİ'ye, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR ve Sayın Doç. Dr. Arzu YAY'a,

Anatomi eğitimimi seçmemde bana yol gösteren Değerli Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet DEMİR ve ailesine, Doktora eğitimim boyunca her daim desteğini esirgemeyen Değerli Hocam Sayın Doç. Dr. B. Göker DURDU ve ailesine, Kayseri'de bana evini açan ve her zaman yanımda olan kardeşim Arş. Gör. Gökhan ÇOBANOĞULLARI ve ailesine, Kilis'te çalıştığım dönemdeki değerli mesai arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Fatih ŞEN, Yrd. Doç. Dr. Erhan KILINÇ, Öğr. Gör. Uğur DOĞAN, Öğr. Gör. N. Nesrin İPEKÇİ ve değerli ailelerine ve Kilis 7 Aralık Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Akademik ve İdari Personelleri'ne, mesai arkadaşlarım Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Niğde Zübeyde Hanım Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Akademik ve İdari Personelleri'ne,

Eğitimim boyunca ve bu çalışmayı yaparken benden emeğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Seher YILMAZ, Yrd. Doç. Dr. Şerife ÇİNAR ve her an birlikte çalıştığımız kıymetli dostlarım Arş. Gör. Hatice SUSAR, Arş. Gör. Özge AL ve ailelerine ve kıymetli dostum, çalışma ortağım, gece gündüz beraber koşuşturduğumuz Öğr. Gör. Halil YILMAZ'a,

Doktora öğrenimim süresince sıcak bir ortamda birlikte çalıştığımız Anatomi Anabilim Dalı'nda yüksek lisans ve doktora öğrenimini yapan ve yapmış olan tüm kıymetli

arkadaşlarıma, tezin deneysel aşamasında yardımlarını esirgemeyen Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı asistanı Arş. Gör. Betül YALÇIN'a

Eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen Anatomi Anabilim Dalı çalışanları Hüseyin ÇELEBİ, Ahmet ALPAY, Kazım KARABULUT ve Ferhat ÇAKMAKKAYA'ya,

Tezin yapılmasında katkıları olan DEKAM yöneticileri ile çalışanlarına, tez çalışmasına maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Bugünlere gelmem için fedakârlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen ve üzerimde büyük emekleri olan, beni yetiştiren sevgili ANNEM Demet ATAY ve BABAM Nevzat ATAY'a,

Hayatımın iki önemli DEĞERİ Ailemizin Tek Gülü kardeşim Merve ATAY BOYRAZ ve evimizin sarı çocuğu kardeşim Yaşar ATAY ile tüm diğer AİLE bireylerime,

Hayatımızın her anında birlikte olmaya söz verdiğimiz, her zaman yanımda olan desteği ve motivasyonuyla beni güdüleyen Değerli ve Biricik EŞİM Hatice ATAY'a,

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

BİSFENOL A'NIN FETAL KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNE TERATOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emre ATAY

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anatomi Anabilimdalı Doktora Tezi
Eylül 2017
Danışman: Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

ÖZET

Sanayide geniş bir kullanım alanına sahip olan Bisfenol A (BFA) dünya genelinde en fazla üretilen kimyasallardan biridir. BFA; gıda, kişisel bakım ürünleri, kozmetik malzemeleri, deterjanlar, plastik şişeler gibi ürünlerde yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda BFA amniyotik sıvıda, anne ve fetus plazmasında, plasenta ve anne sütünde, yağ dokusunda, semende, kolostrumda ve tükürükte tespit edilmiştir. Bu veriler göz önüne alındığında araştırmanın amacı, anneleri BFA'ya maruz kalan fetusların ön ve arka ekstremitelerindeki kıkırdak/kemik oranını belirlemektir.

Çalışma kapsamında 16 adet erişkin Sprague Dawley cinsi gebe rat kullanıldı. Ratlar; kontrol grubu, düşük (0.5 mg/kg/gün BFA), orta (5 mg/kg/gün BFA) ve yüksek doz (50 mg/kg/gün BFA) BFA verilen gruplar olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Belirtilen BFA dozları gebeliğin 1. ve 20. günleri arasında gebe ratlara enjekte edildi. Gebeliğin 20. gününde gebe ratlara sezeryan uygulandı. Fetüslerin iskelet sistemi gelişimi ikili iskelet ve immünohistokimyasal boyama (tartara dirençli asit fosfataz (TRAP) ve alkalin fosfataz (AP) ekspresyon düzeyleri) yöntemleriyle incelendi. Ön ekstremite (humerus, radius, ulna) ve arka ekstremite kemiklerinde (femur, tibia, fibula) kemik-kıkırdak oranı ImageJ programı ile belirlendi ve veriler SPSS istatistiksel yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

Humerus, radius ve ulna'da ossifikasyon oranlarının en yüksek olduğu değerler sırasıyla %41.05, %39.25, %37.26 olarak kontrol grubunda saptanırken; en düşük ossifikasyon oranları ise %31.80, %30.24, %35.03 olarak yüksek doz BFA grubunda tespit edildi. Humerus, radius ve ulna'nın uzunlukları ve kemikleşme alanları ile gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$).

Femur, tibia ve fibula kemiklerinde ossifikasyon oranlarının en yüksek olduğu değerler sırasıyla %23.04, %30.73, %32.78 olarak kontrol grubunda gözlenirken; en düşük

ossifikasyon oranları ise %17.75, %20.90 ve %24.32 olarak yüksek doz BFA grubunda tespit edildi. Bununla birlikte immünohistokimyasal boyamada; femurlara ait TRAP ve AP ekspresyon değerlerinin kontrol grubu ile deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu tespit edildi (p = 0.000).

Bu verilere göre, gebelik sırasında BFA'ya maruz kalma iskelet sisteminde ossifikasyonu azaltmakta ve kemik büyümesini olumsuz etkilemektedir. Bununla birlikte incelenen kemiklerin ossifikasyon oranındaki azalmanın doza bağlı olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Bisfenol A, rat, ikili boyama, immünhistokimyasal boyama, kemik gelişimi

THE INVESTIGATION OF THERATOGENIC EFFECTS OF BISFENOL A ON FETAL BONE DEVELOPMENT

Emre ATAY

Erciyes University, Institute Of Medical Sciences
Department Of Anatomy PhD Thesis
September 2017
Supervisor: Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA), which has a wide use in the industry is one of the most produced chemicals in the world. BPA takes part in the products such as food, personal care products, detergents, plastic bottles. In studies performed, BPA was identified in amniotic fluid, maternal and fetal plasma, placenta and mother's milk, fat tissue, semen, colostrum and saliva. The aim of research is to determine the rate of cartilage/bone that belongs to forelimbs and hindlimbs of fetus whose mothers exposed to BPA.

In this study, 16 adult pregnant female Sprague Dawley rats were used. Rats were divided into 4 groups; the control group, low (0.5 mg/kg/day BPA), medium (5 mg/kg/day BPA) and high dose (50 mg/kg/day BPA) BPA groups. Indicated BPA doses were given between first and 20th day of gestation. The fetus were removed out on the 20th day of pregnancy by cesarean. Skeletal system development of fetuses was examined with double and immunohistochemical staining (the tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) and the alkaline phosphatase (AP) expressions) methods. The rate of bone-cartilage in forelimb (humerus, ulna, raidus) and hindlimb bones (femur, tibia, fibula) were determined with ImageJ program and data was analyzed using SPSS statistical software.

While the most ossification rates of humerus, radius and ulna were detected as 41.05%, 39.25%, 37.26% in the control group, the least ossification rates were detected as 31.80%, 30.24%, 35.03% in the high dose BFA group respectively. The differences among the groups that related to the ossification areas and the lenghts of humerus, radius, ulna were determined statistically significant ($p<0.001$).

While the most ossification rates of femur, tibia and fibula were detected as 23.04%, 30.73%, 32.78% in the control group, the least ossification rates were detected as 17.75%, 20.90%, 24.32% in the high dose BPA group respectively. The differences

among the control and experimental groups that related to TRAP and AP expressions of femur were determined statistically significant by using immunohistochemical staining (p=0.000).

According to these data, exposure to BPA during pregnancy reduces the ossification in skeleton system and affects bone growth negatively. The decrease in the ossification rate of examined bones was in a dose-dependent manner.

Keywords: Bisphenol A, rat, double staining, immunohistochemical staining, bone development

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI iii
KABUL VE ONAY iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET vii
ABSTRACT ix
İÇİNDEKİLER xi
KISALTMALAR VE SİMGELER xiii
TABLOLAR LİSTESİ xv
ŞEKİLLER LİSTESİ xvi
RESİMLER LİSTESİ xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. BİSFENOL A (BFA) 3
2.1.1. Bisfenol A'nın Üretimi 4
2.1.2. Bisfenol A'nın Kullanım Alanları 5
2.2. BİSFENOL A VE İNSAN SAĞLIĞI 9
2.2.1. Bisfenol A'ya Dış Etkenlerden Kaynaklı Maruziyet 9
2.2.2. Bisfenol A'ya İç Etkenlerden Kaynaklı Maruziyet 11
2.2.3. Bisfenol A'nın Sağlık Üzerine Etkisi 12
2.3. KEMİK HİSTOLOJİSİ, ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ 18
2.3.1. Kemik Oluşumu ve Rezorpsiyonu 18
2.3.2. Kemik Matriksi 22
2.3.3. Periosteum ve Endosteum 22
2.3.4. Kemik Türleri 23
2.3.5. Kemik Büyümesi 25
2.4. KIKIRDAK HİSTOLOJİSİ, ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ 27
2.4.1. Kıkırdak Türleri 27
2.5. SIÇANLAR VE SIÇANLARDA İSKELET SİSTEMİ 31
2.5.1. Sıçanların Anatomik ve Fizyolojik Özellikleri 31
2.5.2. Sıçanlarda İskelet Sistemi 33

2.6. SIÇANLARDA EMBRİYONİK GELİŞİM 42
3. GEREÇ VE YÖNTEM 46
3.1. DENEY SIRASINDA KULLANILAN KİMYASALLAR 46
3.1.1. İkili İskelet Boyama İçin Kullanılan Kimyasallar 46
3.1.2. İmmünohistokimyasal Boyama İçin Kullanılan Kimyasallar 47
3.2. DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ 47
3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI 48
3.4. DENEKLERİN ELDE EDİLMESİ 51
3.5. İKİLİ İSKELET BOYAMA YÖNTEMİ 53
3.6. HİSTOLOJİK DOKU TAKİP YÖNTEMİ 55
3.7. İMMÜNOHİSTOKİMYA BOYAMA (IHK) YÖNTEMİ 56
3.8. İKİLİ İSKELET BOYAMAYA AİT MORFOLOJİK ÖLÇÜMLER 58
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 59
4. BULGULAR 61
4.1. İKİLİ İSKELET BOYAMA YÖNTEMİNE AİT BULGULAR 61
4.2. IHK BOYAMA YÖNTEMİNE AİT BULGULAR 88
4.2.1. H&E İle Boyanmış Gruplara Ait Histolojik Bulgular 88
4.2.2. AP Yoğunluğuna Ait Bulgular 90
4.2.3. TRAP Yoğunluğuna Ait Bulgular 93
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 96
6.KAYNAKLAR 105
EK-1 119
EK-2 120
ÖZGEÇMİŞ 122

KISALTMALAR VE SİMGELER

BFA : Bisfenol A
DMSO : Dimetilsülfoksid
PVC : Polivinil Klorür
ASTM : American Society for Testing and Materials
RIC : International Resin Identification Coding System
ACC : American Chemistry Council
PET : Polietilen Tereftalat
HDPE : High Density Polyethylene
LDPE : Low Density Polyethylene
PP : Polipropilen
PS : Polistiren
PLA : Polilaktik Asit
FDA : The Food and Drug Administration
EFSA : European Food Safety Authority
TDI : Tolerable Daily Intake Dose
NOAEL : No Observed Adverse Effect Level
LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level
CERHR : Center for The Evaluation of Risks to Human Reproduction
NTP : National Toxicology Program
ANSES : Agence Nationale de Securite Sanitaire
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
DES : Dietilstilbestrol
EE : Etinil Östradiol
BKİ : Beden Kitle İndeksi
TSH : Tiroid Uyarıcı Hormon
CRH : Kortikotropin Salgılatıcı Hormon
PKC delta : Protein Kinase C delta
CREB : Cylic Amp-Response Element Binding Protein
EB : Östradiol Benzoat
TRAP : Tartara Dirençli Asit Fosfataz
SHR : Spontaneous Hypertansive
DEKAM : Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi

i. p.	**:** İntraperioteneal
KOH	**:** Potasyum Hidroksit
H&E	**:** Hemotoksilen-Eosin
IHK	**:** İmmünohistokimyasal
AP	**:** Alkalin Fosfataz
H_2O_2	**:** Hidrojen Peroksit
PBS	**:** Phosphate Buffered Saline
DAB	**:** Diaminobenzidin
SPSS	**:** Statistical Package for Social Sciences
ÖRα	**:** Östrojen Reseptörü Alfa
ÖRß	**:** Östrojen Reseptörü Beta
bw	**:** Body weight
g	**:** Gram
kg	**:** Kilogram
mg	**:** Miligram
µg	**:** Mikrogram
ng	**:** Nanogram
µ	**:** Mikro
LOQ	**:** Limit of Quantification
cm^2	**:** Santimetrekare
m^3	**:** Metreküp
l	**:** Litre
o	**:** Derece
C	**:** Santigrat
kPa	**:** Kilopascal
MCF-7	**:** Michigan Cancer Foundation-7
$Ca_{10}(PO4)_6(OH)_2$	**:** Hidroksiapatit
$PO4^{-3}$	**:** Fosfat
Ca^{+2}	**:** Kalsiyum
ACI	**:** Abnormalities Congenital
dak	**:** Dakika
mmHg	**:** Milimetre Civa

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Bisfenol A'nın fizikokimyasal özellikleri....4
Tablo 2-2. Reçine kodları tablosu....6
Tablo 2-3. Güncel reçine kodları tablosu....8
Tablo 2-4. Gıdalardaki ve gıda dışı kaynaklardaki BFA konsantrasyonları....10
Tablo 2-5. Kıkırdak tiplerinin özellikleri....27
Tablo 2-6. Ratlara ait bazı fizyolojik özellikler....32
Tablo 2-7. Sıçan embriyolojik gelişiminin Witschi evrelendirme aşamaları....43
Tablo 3-1. İkili İskelet Sistemi Boyama Protokolü....54
Tablo 3-2. Doku hazırlama metodu....55
Tablo 3-3. H&E Boyama Yöntemi....56
Tablo 4-1. Fetus gruplarına ait ağırlık ortalamaları....62
Tablo 4-2. Boy ve frontal-occipital uzunluk verileri....62
Tablo 4-3. Clavicula'ya ait istatistiksel veriler....65
Tablo 4-4. Scapula'ya ait istatistiksel veriler....68
Tablo 4-5. Humerus'a ait istatistiksel veriler....72
Tablo 4-6. Ulna'ya ait istatistiksel veriler....75
Tablo 4-7. Radius'a ait istatistiksel veriler....78
Tablo 4-8. Femur'a ait istatistiksel veriler....81
Tablo 4-9. Tibia'ya ait istatistiksel veriler....84
Tablo 4-10. Fibula'ya ait istatistiksel veriler....87
Tablo 4-11. Tüm gruplara ait AP ekspresyon yoğunluğu....91
Tablo 4-12. Tüm gruplara ait TRAP ekspresyon yoğunluğu....94

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. BFA'nın fenol ve asetondan kondensasyonu. 3
Şekil 2-2. Fissür örtücü ve kompozit rezin dolgu uygulanmış dişler. 9
Şekil 2-3. Kemiğin yapısındaki hücreler. 19
Şekil 2-4. Kemiğin eritilerek emilişi 20
Şekil 2-5. Kemik dokusunu sindiren 3 tane osteoklast hücresi 21
Şekil 2-6. Kemik yapıya ait şematik çizim 23
Şekil 2-7. Havers Sistemine ait şematik çizim 25
Şekil 2-8. Kıkırdak model üzerine endokondral kemikleşme 26
Şekil 2-9. İntramembranöz kemikleşmenin başlaması ile ilgili şematik çizim. 26
Şekil 2-10. Perikondriyum ve Hyalin kıkırdak arasındaki geçişin şematik gösterimi 29
Şekil 2-11. Rat iskelet sistemi görünümü 36
Şekil 2-12. Rat'a ait thorax iskeleti 37
Şekil 2-13. Sol scapula'nın lateral görünümü 38
Şekil 4-1. Tüm gruplara ait AP immunoreaktivite yoğunluğu 93

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1. Hyalin kıkırdağın mikroskop fotoğrafı 28
Resim 2.2. Elastik liflerin boyandığı elastik kıkırdak matriksinin mikroskopik fotoğrafı 30
Resim 2.3. Fibröz kıkırdağın mikroskopik fotoğrafı. 30
Resim 2.4. Sıçan cranium iskeleti 34
Resim 2.5. Rat kulak kemikçikleri 37
Resim 2.6. Sol ön ekstremite kemikleri 40
Resim 2.7. Sol arka ekstremite kemikleri 41
Resim 3.1. Çiftleştirilen ratların ve vaginal smear örneğinin fotoğrafları 48
Resim 3.2. Ratlara intraperioteneal enjeksiyon uygulaması 49
Resim 3.3. Gelişimini tamamlayamayan fetus 50
Resim 3.4. Gebe ratlara sezeryan uygulanması 51
Resim 3.5. Fetusların uterustan diseke edilmesi 52
Resim 3.6. Fetusların baş-kıç ve occipito-frontal uzunluklarının ölçülmesi 52
Resim 3.7. Derileri soyulup gözleri ve iç organları çıkarılan fetuslar 53
Resim 3.8. ImageJ programının kalibrasyon ayarı 58
Resim 3.9. ImageJ programında yapılan kemik ölçümleri 59
Resim 4.1. Clavicula'ya ait görüntüler 64
Resim 4.2. Scapula'ya ait görüntüler 67
Resim 4.3. Humerus'a ait görüntüler 71
Resim 4.4. Ulna ve Radius'a ait görüntüler 77
Resim 4.5. Femur'a ait görüntüler 82
Resim 4.6. Tibia ve Fibula'ya ait görüntüler 86
Resim 4.7. Kontrol grubuna ait kemikleşme 88
Resim 4.8. 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruba ait kemikleşme 89
Resim 4.9. 5 mg/kg/gün BFA verilen gruba ait kemikleşme 89
Resim 4.10. 50 mg/kg/gün BFA verilen gruba ait kemikleşme 90
Resim 4.11. Tüm gruplara ait immünohistokimyasal boyama uygulanmış preparatlarda kemikleşme görülen bölgedeki AP ekspresyonu 92
Resim 4.12. Tüm gruplara ait immünohistokimyasal boyama uygulanmış preparatlarda kemikleşme görülen bölgedeki TRAP ekspresyonu. 95

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bisfenol A (BFA) dünya genelinde en fazla üretilen kimyasal maddelerden biridir (1). Bununla birlikte 1996 yılında BFA'nın %48'inin Amerika'da, %32'sinin Doğu Avrupa'da ve %20'sinin Japonya'da üretildiği bildirilmiştir (2). 1980'li yıllarda yıllık üretim kapasitesi 1 milyon ton civarında olan BFA'nın, 2009 yılında 2.2 milyon tonu aşkın bir üretimi olmuştur (1, 3). Böyle yüksek miktar bir üretime sahip olan BFA; besinler, kozmetikler, kişisel bakım ürünleri, deterjanlar, oyuncaklar, plastik şişeler gibi günlük hayatta yoğun olarak kullanılan ürünlerde yer almaktadır (4).

Sanayide geniş bir kullanım alanı olmasından dolayı, insanların sürekli maruz kaldığı BFA; idrar, kan ve dokularda tespit edilmiştir (5-7). BFA'ya düşük seviyelerde bile maruz kalınması; hücre farklılaşması ve çoğalması, vücut büyüme oranı, cinsel olgunlaşma, üreme fonksiyonu ve gelişimi ile beyin yapısı ve davranışlar üzerine etki etmektedir (8, 9). Ayrıca yetişkinlerin maruz kaldığı BFA, amniyotik sıvıda, anne ve fetus plazmasında, plasenta ve anne sütünde, yağ dokusunda, semende, kolostrumda ve tükürükte tespit edilmiştir (6, 7, 10-13).

BFA; östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenik etki gösteren bir maddedir. Deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda BFA'nın üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilerinin olabileceği tespit edilmiştir. BFA'nın deney hayvanlarında sperm sayısının azalmasına ve meme dokusunda meme kanserinin erken dönemlerine benzer nitelikteki değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (7).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda; BFA'nın erken ergenlik, prostat hiperplazisi, bağışıklık işlevlerinde azalma, beyinde, cinsiyet organlarında ve cinsel davranışta değişme, antioksidan enzimlerde azalma, hiperaktivite, insülin artışı, şişmanlık, osteoporoz gibi çok çeşitli etkileri saptanmıştır. BFA'nın düşük çevresel konsantrasyonları (2.4 µg/kg) sıçanlarda eşeysel olgunluğun hızlanması ve postnatal gelişimde anormalliklere neden olmaktadır (14). İçme suyu ile sıçanlara verilen

BFA'nın üreme (testis patolojisi ve spermatogenezis) üzerine etkisi dört nesil boyunca incelenmiş ve olumsuz sonuçlar meydana getirdiği gözlemlenmiştir (15). Oral yolla alınan BFA, gastrointestinal yolla vücuda girmektedir. Oral yolla alınan miktarın %83'ü 72 saat içinde dışkı ile atılmaktadır. Vücuda alınan BFA, öncelikle karaciğerde monoglukuronid formuna dönüştürülmekte ve daha sonra idrarla vücuttan atılmaktadır (16). BFA'nın monoglukuronid formunun anne sütüne geçebileceği belirtilmektedir (17).

Hamile sıçanlara besinlerle verilen BFA'nın; plasentada 0.4 µg/kg, kanda ise 1.6 µg/kg olarak bulunduğu ve plasenta yolu ile fetüse geçtiği belirtilmektedir. Yavruda BFA konsantrasyonunun anneye göre daha az olduğu ancak BFA'nın birikebilme özelliğinden dolayı fetüsün risk altında olduğu belirtilmektedir (18-20). Düşük dozlarda BFA'ya maruz kalan anne farelerden doğan dişi farelerin vücut ağırlıklarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. BFA ile metabolik sendrom ve obezite arasında bir ilişkinin olabileceği ileri sürülmektedir (1).

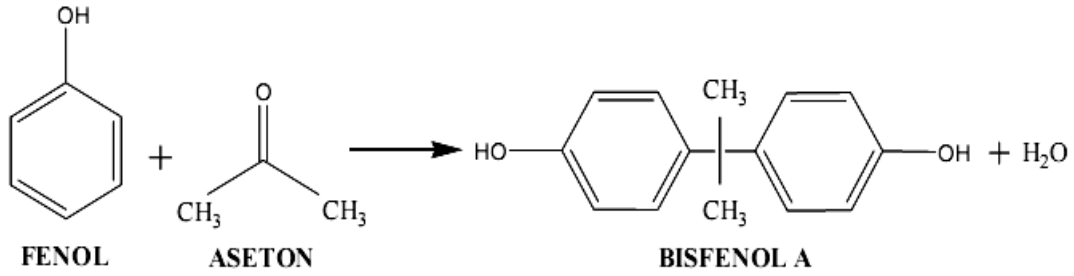
BFA; östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojen gibi davranan bir madde olmasına rağmen kalsiyum üzerine etkileri östrojenden farklıdır. Çünkü östrojen hem plazma kalsiyum seviyesinin hem de kalsitonin seviyesinin artması yönünde etki gösterirken (21), BFA hem plazma kalsiyum seviyesinin ve hem de kalsitonin seviyesinin düşmesine yol açmaktadır (22). Buna ek olarak, östrojenin kemik metabolizmasını ve osteblastik farklılaşmayı etkilediği belirtilmiştir (23-25).

Tüm bu verilere göre BFA'nın kemik hücreleri üzerine etki edebileceği ve kalsiyum seviyesini olumsuz yönde etkileyeceği düşünülmektedir. Bu bağlamda çalışmanın amacı; fetal kemik gelişimi üzerine BFA'nın teratojenik etkilerini ikili iskelet boyama ve immünohistokimyasal boyama yöntemleri ile ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BİSFENOL A (BFA)

Bisfenol A (BFA), doğal olarak bulunmayan, laboratuar ortamında üretilen bir moleküldür (26). BFA, ilk kez 1891 yılında Rus Kimyacı Alexander Pavlovich Dianin tarafından sentezlenmiştir (27). 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan, genel olarak BFA adı ile bilinmektedir. BFA iki mol fenolün bir mol aseton ile düşük pH'da ve yüksek sıcaklıkta kondensasyonu ile elde edilmektedir (28). BFA'nın saflığı üreticiye bağlı olarak değişmesine rağmen genelde %99-99.8 saflıkta üretilmektedir. Geriye kalan yaklaşık %1'lik kısım ise fenol (<%0.06), BFA'nın orto ve para izomerleri (<%0.2) ve sudan (<%0.2) meydana gelmektedir (29).



Şekil 2-1. BFA'nın fenol ve asetondan kondensasyonu (28).

BFA laboratuvar ortamında iki farklı yöntem ile üretilebilmektedir. Bunlardan biri düşük pH, yüksek sıcaklık altında ve katalizör eşliğinde fenol ile asetonun kondense edilmesi prensibine dayanmaktadır. Ham BFA distilasyon yöntemleri kullanılarak saflaştırılır, sıvı haldeki ürün filtreden süzülür ve daha sonra kurutularak BFA elde edilir. Diğer yöntem ise, teknik olarak birinciye benzemesine rağmen, bu yöntemde asetondan farklı katalizör ve değişik saflaştırma teknikleri kullanılmaktadır. Ayrıca ikinci yöntemde daha az oranda atık ortaya çıkmaktadır. Her iki yöntemde de elde edilen BFA kristal bir yapıya veya pelet şekline dönüştürülerek kullanılmaktadır (30).

BFA kimyasal formülü $(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$ olan organik bir bileşiktir. BFA katı, fenolik kokulu, krem-beyaz renkte ve kristal yapıdadır. Sudaki çözünürlüğü azdır ve 25°C'deki yoğunluğu 1.1-1.2 g/L'dir. Etanol, aseton ve dimetilsülfoksid (DMSO) gibi organik çözücülerde iyi çözünmektedir. Sudaki çözünürlüğü 25°C'de 300 mg/L'dir (31). BFA'nın önemli fizikokimyasal özellikleri Tablo 2-1'de listelenmiştir (29).

Tablo 2-1. Bisfenol A'nın fizikokimyasal özellikleri (29).

Parametre	Değer
Normal Sıcaklık ve Basınçta Fiziksel Hali	Hafif Fenolik Kokulu, Beyaz Krem Renkli
Erime Noktası	Atmosfer Basıncında 155-157°C
Kaynama Noktası	Atmosfer basıncında ayrışma ile 360°C
Bağıl Yoğunluk	25°C'de 1.1-1.2 kg/m^3
Buhar Basıncı	25°C'de 5.3* 10^{-9} kilopascal (kPa)
Sudaki Çözünürlük	300 mg/l (Normal Sıcaklık ve Basınçta)
Dağılım Katsayısı	3.4
Yanma Noktası	Yaklaşık 207°C
Alevlenme Noktası	Yaklaşık 532°C
Oksitlenme Özelliği	Oksitleyici Bir Madde Değildir

2.1.1. Bisfenol A'nın Üretimi

BFA, dünya genelinde en fazla üretilen kimyasal maddelerden biridir (1). Bununla birlikte her yıl BFA'ya olan talep miktarı, dünya ekonomisinin genel durumu üzerinde önemli bir gösterge olarak karşımıza çıkmaktadır. Çünkü BFA ve türevleri otomotiv, inşaat ve elektrik/elektronik sanayinde kullanılan temel bir kimyasal girdi olarak karşımıza çıkmaktadır (32).

Dünyadaki 1996 yılında üretilen BFA'nın ülkelere göre dağılımına baktığımızda; %48'inin Amerika'da, %32'sinin Doğu Avrupa'da ve %20'sinin Japonya'da üretildiği görülmektedir (2). Avrupa'nın BFA ihtiyacı Almanya, Hollanda, Belçika ve İspanya'da bulunan toplam 6 üretim merkezinden karşılanmaktadır. Bu üretim merkezlerinden çeşitli ülkelere ihraçlarda gerçekleştirilmektedir (29).

BFA'nın 1980'li yıllardaki yıllık üretim miktarı 1 milyon ton civarında iken, 2009 yılında 2.2 milyon tonu aştığı, 2011 yılında 4.4 milyon tona yükseldiği, 2012 yılında ise 4.6 milyon tonu aştığı görülmektedir (1, 3, 33).

BFA'nın üretiminin kıta bazında dağılımına baktığımızda Asya kıtası, genel üretimde %53 pay (yaklaşık 2.4 milyon ton) ile liderdir. Bunu sırasıyla; %18 ve %25 oranlarıyla Kuzey Amerika ve Avrupa kıtaları takip etmektedir (33). Son yıllarda ise küresel talebin yarısından fazlası Asya kıtasından karşılanmaktadır. Bu durum Asya pazarını genişletmeye devam edecek bir etken olarak görünmektedir. Böylelikle Çin bu bölgede talep ve kapasite gelişimini yönlendiren ülke konumuna gelmiştir (3).

ABD, Tayvan, Güney Kore, Çin ve Japonya'da dünyanın ilk beş BFA üreticileri olarak sıralanmaktadır. 2012 yılında, küresel BFA üretim hacmine bu ülkelerin kümülatif katkısı 2.7 milyon ton üzerinde olmuştur. Dünya çapında BFA pazarı, planlanan BFA kapasitesine eklemelerle birlikte artan talebi karşılamaya yönelik önümüzdeki yıllarda sürdürülebilir bir büyüme için hazırlanmaktadır. Öyle ki dünya BFA üretim hacminin sonraki yıllarda 5.4 milyon tonu aşacağı tahmin edilmektedir (33).

2.1.2. Bisfenol A'nın Kullanım Alanları

BFA dünya genelinde en fazla üretilen kimyasal madde olmasının yanı sıra üretilen BFA'nın kullanım oranı ise %80 seviyelerindedir (33). BFA, ağırlıklı olarak polikarbonat plastik ve epoksi reçine üretiminde iki fonksiyonlu monomer olarak ve polivinil klorür (PVC) üretiminde antioksidan olarak kullanılmaktadır (26). 2009 yılında dünyada tüketilen BFA'nın %95'inden fazlası polikarbonat plastik ve epoksi reçine üretiminde kullanılmıştır (34). 2015 yılı itibariyle dünya BFA talebine baktığımızda, polikarbonat plastikler yaklaşık %64'lük kısmından; epoksi reçineler ise yaklaşık olarak %34'lük kısmından sorumludur (3).

BFA genel olarak inşaat, elektronik ve gıda sanayinde polikarbonat plastik üretiminde kullanılan bir monomerdir. Polikarbonatlar yaygın olarak biberonlar, mikro dalga fırın kapları, gıda saklama kapları ve su şişeleri gibi gıda ile temas eden malzemelerin yapımında kullanılmaktadır. Epoksi reçineler ise konserve yiyecek ve içeceklerde; bebek mamalarının saklandığı kaplarda dâhil olmak üzere cam kavanoz ve şişelerin metal kapaklarında koruyucu bir astar tabakası olarak kullanılmaktadır (34).

Günlük hayatta sıklıkla kullandığımız bu malzemelerden plastik olanlarının üzerinde çeşitli kodlar yer almaktadır. Bu kodlar plastik ürünün içeriğinde hangi maddenin bulunduğunu bildirmektedir.

American Society For Testing and Materials (ASTM), materyaller, ürünler, sistemler ve hizmetler için standartlar geliştiren ve yayınlayan bir uluslararası kuruluştur. Yine

ASTM tarafından belirlenen International Resin Identification Coding System (RIC) aracılığıyla plastik ürünlerin hangi reçineden elde edildiği ürünün üzerine ilgili sembol görseli basılarak belirtilmektedir. Böylelikle uluslararası boyutta kullanılan RIC sembolleri geliştirilmiştir (35, 36). Plastiklerin üzerinde yer alan ve RIC aracılığıyla geliştirilen reçine tanımlama kodları saat yönünde dönen okların birleşmesiyle meydana gelen üçgen şeklindeki sembollerdir.

Tablo 2-2. Reçine kodları tablosu (37).

Geri Dönüşüm Numarası	**Sembol**	**Alternatif Sembol-1**	**Alternatif Sembol-2**	**Kısaltma**	**Polimer Adı**
1				PETE veya PET	Polietilen Tereftalat
2				HDPE veya PE-HD	Yüksek Yoğunluklu Polietilen
3				PVC veya V	Polivinil Klorür
4				LDPE veya PE-LD	Düşük Yoğunluklu Polietilen
5				PP	Polipropilen
6				PS	Polisitren
7				OTHER veya O	Diğer plastik, akrilik, naylon, polikarbonat, polilaktik asit bioplastik ve farklı plastiklerden katmanlı kombinasyonları

Yukarıdaki Tablo 2-2, 2011 yılında American Chemistry Council (ACC) tarafından yayınlanmıştır. Üçgen sembollerin içindeki her rakam kullanılan plastik tipini ve zararlarını göstermektedir. Buna göre;

- "1" nolu sembol ürünün polietilen tereftalat (PET) (terfoformlu levhalar, içecek şişeleri, bardak, bant, mobilya, halı, lambriler vb.) ile yapılmış olduğunu belirtir.
- "2" nolu sembol ürünün yüksek yoğunluklu polietilen (HDPE) (şişeler, market torbaları, plastik sulama hortum ve borular, oyuncaklar, geri dönüşüm konteynırları, araç takozları, süt paketleri vb) ile yapılmış olduğunu belirtir.
- "3" nolu sembol ürünün polivinil klorür (PVC) (borular, pencere profilleri, PVC kaplama panelleri, korkuluklar, duş perdeleri, yer döşemeleri, gıda dışı şişeler, bahçe sandalyeleri vb.) ile yapılmış olduğunu belirtir.
- "4" nolu sembol ürünün düşük yoğunluklu polietilen (LDPE) (tek kullanımlık şişeler ve bardaklar, plastik torbalar, laboratuar tüpleri ve ekipmanları vb.) ile yapılmış olduğunu belirtir.
- "5" nolu sembol ürünün polipropilen (PP) (otomobil parçaları, endüstriyel elyaflar, gıda kutuları, tabaklar vb.) ile yapılmış olduğunu belirtir.
- "6" nolu sembol ürünün polistiren (PS) (büro aksesuarları, kafeterya tepsileri, plastik mutfak eşyaları, oyuncaklar ve kılıflar, kapaklı kaplar, kuruyemiş ambalajlama paketleri, yalıtım levhası, strafor vb.) ile yapılmış olduğunu belirtir.
- "7"nolu sembol ürünün akrilik, naylon, polikarbonat ve polilaktik asit (PLA) gibi diğer plastikler ile yapılmış olduğunu belirtir (35, 37).

Bu sembollerden 1, 2, 4 ve 5 nolu sembolleri barındıran ürünlerin sağlık açısından zararlı olmadığı, 3, 6 ve 7 nolu sembollerin bulunduğu ürünlerin ise sağlık açısından zararlı olduğu bildirilmektedir. Yapısında BFA içeren ürünler için 7 nolu sembol kullanılmaktadır. Polikarbonat plastiklerin yapımında kullanılan BFA; ASTM, RIC ve ACC gibi uluslararası kuruluşlar tarafından sağlık açısından zararlı bir madde olarak kabul edilmektedir.

Tablo 2-2’de yer alan semboller ASTM tarafından 2016 yılında güncellenmiştir. Günümüzde plastik ürünlerin üzerinde Tablo 2-3’de belirtilen güncel semboller kullanılmaktadır.

Tablo 2-3. Güncel reçine kodları tablosu (36).

1 PETE	01 PET
2 HDPE	02 PE-HE
3 V	03 PVC
4 LDPE	04 PE-LD
5 PP	05 PP
6 PS	06 PS
7 OTHER	07 O

Plastik ürünlerin yanı sıra BFA, diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılan fissür örtücü ve kompozit rezin dolgu maddelerinin yapısında ve tetrabromobisfenol A gibi yanmayı önleyen malzemelerin içeriğinde de bulunmaktadır. Karbonsuz kopya kâğıtlarında ve termal kâğıtlarda renk geliştirici madde olarak da tercih edilmektedir. BFA ihtiva eden ürünler su borularının kaplanmasında ve döküm kalıplarında da kullanılmaktadır (38-40).

Şekil 2-2. Fissür örtücü ve kompozit rezin dolgu uygulanmış dişler (41, 42).

BFA otomotiv sektöründe de bir antioksidan olarak kullanılmaktadır. Ayrıca poliamidlerin üretiminde katkı maddesi olarak, etoksillenmiş BFA'nın sentezinde bir reaktif olarak ve benzoksazinler sentezinde ön uyarıcı olarak da kullanılmaktadır. Bunların dışında BFA, ısı transfer yağı ve madeni yağların bir bileşeni ve beton yüzeyinin yeniden şekillendirilmesi için bir işleme ajanı olarak kullanılmaktadır (43).

2.2. BİSFENOL A VE İNSAN SAĞLIĞI

BFA, polikarbonat plastikler ve epoksi reçinelerin imalatında hammadde olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Öyle ki; BFA, dünya genelinde polikarbonat plastiklerin %75'inden, epoksi reçinelerin ise %17'sinden fazlasının üretiminde kullanılan temel monomerdir (44). Buna bağlı olarak polikarbonat plastik ve epoksi reçine ile üretilen epoksi esaslı yapıştırıcılar, yer döşeme malzemeleri, boyalar, termal kâğıtlar, diş dolgu malzemeleri, plastik oyuncaklar, bebek bakım malzemeleri, elektronik cihazlar gibi günlük hayatta sıklıkla kullanılan birçok gıda dışı tüketici ürünle temas sonucu BFA'ya maruz kalınmaktadır (45). BFA'ya maruziyet dış ve iç etkenlerden altında iki başlık halinde ele alınacaktır.

2.2.1. Bisfenol A'ya Dış Etkenlerden Kaynaklı Maruziyet

BFA'ya dış etkenlerden kaynaklı olarak maruz kalma durumu, günlük tüketilen gıdalar ve gıda dışı kaynaklar ile temas sonucu BFA'nın vücuda taşınması veya göç etmesi şeklinde meydana gelmektedir (Tablo 2-4). İçme suyu, konserve gıda maddeleri, kutu içecekler, plastik şişeli günlük süt ürünleri, plastik şişeli içecekler, yeni doğanlar için anne sütü gibi gıda maddeleri besinlerden vücuda alınan BFA kaynaklarıdır. Günlük hayatta sıklıkla kullanılan termal kâğıtlar (alışveriş fişleri, faks kâğıtları vs.), iç ve dış

ortam havası, yüzme havuzu suları dâhil yüzey suları, havadaki toz partikülleri, oyuncaklar ve kozmetik ürünler ise gıda dışı BFA kaynaklarıdır (45).

BFA'nın gıdalara geçişi çeşitli yollarla meydana gelmektedir. Üretim sürecinden sonra polimerde bulunan az miktardaki BFA difüzyon aracılığıyla gıdalara geçebilir. Yine polimer ester bağlarının hidrolizi ile polikarbonattan gıdalara BFA geçişi söz konusudur. Bir başka BFA geçişi ise, polimerin sulu gıda veya sulu gıdalara benzer gıdalarla temas halindeyken hidroksit ile katalize edilen kimyasal bir reaksiyon aracılığıyla meydana gelmektedir (46, 47).

Tablo 2-4. Gıdalardaki ve gıda dışı kaynaklardaki BFA konsantrasyonları (45).

Gıda ve Gıda Dışı Kaynaklar	BFA Konsantrasyon Aralığı
Konserve Gıda	30-50 µg/kg
Plastik Kutulu Gıdalar	0-10 µg/kg
Konserve İçecek ve Süt Ürünleri	0.5-5 µg/kg
Plastik Şişe İçecekler	0-1 µg/kg
İlk Anne Sütü	3 µg/l
İleriki Dönem Anne Sütü	1.5 µg/l
Kozmetik Ürünler	31 (<Limit of Quantification (LOQ-88) µg/kg
Termal Kâğıt	0.8-3.2 µg/100g
Kapalı Ortam Havası	0.5-5.3 ng/m^3
Toz Partikülleri	117-20.000 µ/kg
Oyuncaklar	0.14 (<LOQ-0.63) µg/kg
Emzikler	0.28-0.36 µg

BFA'nın gıda dışı kaynaklar aracılığıyla da vücuda geçişi söz konusudur. Gıda dışı kaynaklarla BFA maruziyeti birkaç parametre altında değerlendirilmektedir ve bunlar aşağıda sıralanmıştır.

Toz Yutma: Yetişkinlerin ve bebeklerin maruz kalma durumu değişik seviyelerdedir. European Food Safety Authority (EFSA) verilerine göre, yetişkinlerde günlük 0.6 ng/kg bw, bebeklerde ise günlük 8.8 ng/kg bw toz partiküllerinin yutulması ile BFA maruziyeti söz konusudur.

Plastik Oyuncaklar/Emzikler ile Temas: Bebekler tarafından plastik oyuncaklar ve emziklerin emilmesi, ağza alınması gibi durumlar aracılığıyla BFA'ya maruziyet söz konusudur.

Hava Soluma: Günlük yaşantımızda solunan havanın içerisinde az miktarlarda BFA bulunmaktadır. Solunum yolu BFA maruziyeti yetişkinlerde 0.2-0.3 ng/kg bw, bebeklerde ise 0.7-1.4 ng/kg bw değerleri arasındadır.

Kozmetik Kaynaklı Dermal Maruziyet: BFA'nın gıda dışı maruziyet kaynaklarından biri kozmetik ürünlerdir. Bu ürünlerin deriye sürülmesi ile yapılarında BFA vücut dokularına taşınmaktadır. Bebeklere BFA maruziyeti ise kozmetik ürün ile temas etmiş kişilerin bebekleri öpmesi, kucaklaması gibi durumlardan kaynaklanmaktadır (45).

2.2.2. Bisfenol A'ya İç Etkenlerden Kaynaklı Maruziyet

Aslında BFA'ya iç etkenlerden kaynaklı maruziyet, dış etkenlerden kaynaklı günlük maruz kalınan BFA değerlerini doğrulama prensibine dayanmaktadır. Bu durum özetle aşağıdaki gibi açıklanmaktadır.

Günlük olarak BFA vücuda; besin kaynakları, toz yutma, soluma ve dermal emilim gibi yollarla alınmaktadır. Bu şekilde vücuda farklı yollarla taşınan BFA miktarının toplamı, BFA'nın vücuttaki günlük iç seviyesini göstermektedir. Vücuttaki toplam BFA'nın büyük bir kısmı ise idrar yolu ile atılmaktadır. İdrar boşaltımı ile atılan BFA miktarı ile vücuttaki toplam BFA miktarının karşılaştırılması, dış etkenlerden kaynaklı günlük maruz kalınan BFA'nın ne kadarının vücutta kaldığını ortaya çıkarmaktadır. Sonuç olarak elde edilen veri günlük alınan ve vücuttan atılamayan toplam BFA miktarını göstermektedir (45).

BFA'ya çeşitli kaynaklardan sürekli olarak maruz kalınması, metabolizmanın tolere edebileceği günlük doz miktarının belirlenmesi ile ilgili çalışmaların yapılmasına neden olmuştur. Yapılan çalışmalara göre BFA'nın tolere edilebilir günlük alım dozu (TDI), yan etki gözlemlenmeyen dozu (NOAEL) ve yan etki gözlemlenen en düşük dozu (LOAEL) belirlenmiştir. Bu bağlamda yapılan çalışmalar ve dozlar ile ilgili bilgilere aşağıda yer verilmiştir.

TDI tüketicinin kayda değer sağlık riski oluşmadan günlük olarak yaşam boyunca alabileceği, vücut ağırlığı temelinde ifade edilen doz olarak tanımlanmaktadır (48). EFSA tarafından 2006 yılında BFA'nın TDI dozu 0.05 mg/kg bw/day olarak bildirilmiştir (49).

NOAEL ise belirli maruz kalma koşulları altında hedef organizmanın morfolojisinin, fonksiyonel kapasitesinin, büyümesinin, gelişiminin veya ömrünün olumsuz bir şekilde değişmesine neden olmayan, bir maddenin en büyük konsantrasyonu veya miktarını

gösteren doz olarak tanımlanmaktadır (48). EFSA tarafından 2006 yılında ratlar üzerinde üç nesil boyunca yapılan çalışma ile NOAEL dozu belirlenmeye çalışılmıştır. EFSA tarafından BFA'nın NOAEL dozu 5 mg/kg bw/day olarak bildirilmiştir (49). Bununla birlikte The Food and Drug Administration (FDA)'nun bilim çalışma grubu NOAEL için belirlenen dozu teyit ettiklerini bildirmişlerdir. Mevcut farmakokinetik veriler, yaş aralıkları ve türler arasındaki karşılaştırmalar, insanlar için bu NOAEL doz kullanımını desteklemektedir (50).

LOAEL doz, vücut yapısında sistematik düzeyde yan etkinin görülmeye başlandığı doz olarak ifade edilmektedir. Bu dozun üzerindeki maruziyetlerde metabolizmada toksik etkiler görülmeye başlanmaktadır. EFSA tarafından BFA için LOAEL doz günlük 120 mg/kg bw/day olarak tanımlanmaktadır. Bu doz ile ilgili çalışmalarda farelerin sindirim ve üreme sistemleri ile gelişimleri üzerine de toksik etkilerin gözlemlendiği bildirilmiştir (49).

2.2.3. Bisfenol A'nın Sağlık Üzerine Etkisi

BFA'ya ait toksisite verileri, bilimsel araştırma kurumları tarafından hazırlanan inceleme ve birçok bilimsel çalışmada özetlenmiştir. Bununla birlikte; BFA'nın gıdalarla temasından kaynaklı olarak düşük µg/kg-bw/gün maruziyetinin insan sağlığına zararlı olup olmadığı konusundaki tartışmalar hala devam etmektedir (11, 51-55). Center for The Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR) ve National Toxicology Program (NTP) tarafından 2008 yılında gerçekleştirilen uzman panelinde BFA için bazı endişeler bulunduğu sonuca varmışlardır. CERHR uzmanları, insanların gıda ile maruz kaldığı BFA'nın düşük dozlarda nevral ve davranışsal etkileri açısından toksisite oluşturduğunu ifade etmişlerdir (11).

2.2.3.1. BFA'nın Kanserojen Etkisi

BFA'nın kanserojenik etkisi ile ilgili bilimsel araştırma kurumları tarafından hazırlanan raporda ortak kanaat olarak, insanlarda BFA ile karsinojenite arasında herhangi bir ilişkinin olmadığı bildirilmiştir (11, 29, 34, 48, 49, 56, 57). Bununla birlikte Yang ve ark.'nın (2009) BFA maruziyeti ve meme kanseri arasındaki ilişkiyi inceledikleri mevcut tek epidemiyolojik çalışmada, BFA'nın kanserojen etki gösterdiğini tanımlamışlardır (58). Bu çalışma Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES)

tarafından büyük metodolojik kısıtlamaları olduğu ve bu nedenle herhangi bir sonuç çıkarmanın uygun olmadığı bir çalışma olarak düşünülmüştür (57).

Hiroi ve ark.'nın 2004 yılında yaptığı çalışmada, endometriyal kanserli ve kompleks endometriyal hiperplazili hastaların BFA düzeylerinin sağlıklı kadınlara ve basit endometriyal hiperplazisi olanlara göre daha düşük olduğunu ileri sürmüşlerdir (59). Bu çalışmayı yorumlayan NTP uzmanları çalışmanın kesitsel bir çalışma olduğunu, bu ilişkinin hastalıktan önce gelip gelmediğini veya hastalık süreciyle ilişkili olabileceğini belirlemenin mümkün olamayacağını açıklamışlardır (11). Bu düşünceyi destekleyen başka bir çalışma Lang ve ark. tarafından 2008 yılında yapılmış ve kanser ile BFA maruziyeti arasında herhangi bir ilişki bildirilmemiştir (60).

Tüm bu veriler göz önüne alındığında BFA'nın direkt olarak kanserojen etki göstermediği ve kanserojen bir madde olmadığı ifade edilebilir.

2.2.3.2. BFA'nın Genotoksisite Etkisi

BFA'nın genotoksisitesi, in vitro ve in vivo çalışmalar aracılığıyla incelenmiştir. BFA üzerine yapılan in vitro çalışmalar; bakteri, maya ve memeli hücrelerinde gen mutasyon testlerini, kromozom sapma testlerini, kardeş kromatit değişim testlerini, hücre transformasyon testlerini, DNA bağlama ve mikrotübül bozulması testlerini içermektedir. İn vivo çalışmalar ise, mikronukleus oluşumu, kromozom sapma incelemeleri, dominantlık testi ve DNA adüktü oluşumu üzerine yapılmıştır (11, 29, 48, 49, 52, 61).

İn vivo çalışmalarda, BFA'nın mikronukleus frekansı ve kromozamal sapmalar üzerine etkileri değerlendirildiğinde kemirgenlerde kromozom hasarına neden olmadığı belirlenmiştir (62-65). Bununla birlikte, BFA maruziyetine bağlı olarak germinal hücrelerde tıpkı somatik hücrelerde olduğu gibi hiperploidi veya poliploidi indüksiyonunun görülmediği bildirilmiş; fakat BFA'nın dişi farelerin karaciğer ve meme bezlerinde DNA katımını (kansere neden olan bileşiğin kovalent olarak DNA'ya bağlanmış hali) indüklediği gösterilmiştir (66).

İn vitro çalışmalarda, BFA'nın bakteri, maya ve meme hücrelerinde gen mutasyonu veya kromozomal sapmaları indüklemediği bildirilmiştir (49, 61, 63, 67). BFA'nın, anöploidi (hücre bölünmesi esnasında kromozomlarda ayrılamama ya da bölünememe sorunları nedeniyle ortaya çıkan diploid sayıdaki artış ya da azalmalar) indükleyen iğ aparatını etkileme potansiyeli, birçok güvenilir çalışmada açıkça ortaya konmuştur (68,

69). Buna ek olarak, BFA’nın izojen olmayan insan hücre dizilerindeki (Michigan Cancer Foundation (MCF)-7 ve MDA-MB-231) DNA hasarında (70), hücresel olmayan sistemlerde (66) ve hamster ve insan hücre dizilerinde DNA katımını (kansere neden olan bileşiğin kovalent olarak DNA'ya bağlanmış hali) indüklediği belirlenmiştir (49, 62).

Sonuç olarak; EFSA Bilim Komitesi, BFA’nın in vitro ve in vivo olarak mutajenezisitesi ve klastojenisitesi (DNA/kromozom yapısında hasara yol açan faktörler) olmadığı için genotoksisite konusundaki olumlu bulguların endişe verici olmadığını bildirmiştir (71).

2.2.3.3. BFA’nın Kemik Gelişimine Etkisi

BFA’nın kemik gelişimine etkisini inceleyen çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bundan dolayı BFA’nın kemik yapısı üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir. Bu konu ile ilgili çalışmalardan birinde Pelch ve ark. (2012) düşük doz BFA, dietilstilboestrol (DES) ve etinil östradiol (EE) maruziyetinin kemik geometrisi ve dayanıklılığı üzerine etkisini incelemişlerdir. Gebe C57BL/6 farelerine 0.1 µg/kg/gün DES, 10 µg/kg/gün BFA, 0.01, 0.1 ve 1.0 µg/kg/gün EE mini-ozmotik pompa vasıtasıyla oral olarak, gebeliklerinin 11. gününden doğumdan sonraki 12. güne kadar verilmiştir. DES, BFA ve EE'ye maruz kalan yetişkin farelerin femur uzunluğunda küçük artışlar (yaklaşık %2.5) olduğu belirlenmiştir. EE ve DES'e maruz kalma femur gerilme kuvvetinde azalmaya sebep olurken, kemik kollajen içeriğinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Düşük doz BFA'nın ise herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir (72).

EFSA Bilim Komitesi, çevresel açıdan ilgili xenoestrojenlere (BFA, DES, EE) gelişimsel dönemde maruz kalmanın yetişkinlikte kemik uzunluğunu ve gücünü olumsuz etkilediği sonucuna varmışlardır (73).

2.2.3.4. BFA’nın Metabolik Etkileri

BFA’nın metabolik ve hormonal etkileri üzerine çalışmaların sayısı önceleri sınırlıydı. Bundan dolayı kardiyovasküler sistem üzerine yapılan çalışmaların sonuçlarına göre metabolik etkiler değerlendirilmekteydi. Günümüzde yapılan çalışmalarda ise BFA’nın metabolik etkileri daha iyi anlaşılmaktadır. Çalışmalar; obezite, endokrin/hormonal sonuçlar, diyabet ve diğer sonuçlara göre gruplandırılmıştır (73).

Obezite Çalışmaları

Literatürde 2010-2013 yılları arasında insanlarda BFA maruziyeti ile obezite arasındaki ilişkileri inceleyen 11 çalışmaya ulaşıldı. Bu çalışmalardan 5'i yetişkin; 6'sı ise çocuk ve adölesanlar ile ilgiliydi (73).

Shankar ve ark. (2012) 20 yaş ve üstü 3967 bireyin yer aldığı çalışmada BFA ve obezite düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, artan BFA konsantrasyonları ve obezite arasında, beden kitle indeksi (BKİ) ve bel çevresi tarafından belirlenen karıştırıcı faktörlerden bağımsız olarak, pozitif bir ilişki olduğunu bildirilmişlerdir (74).

Galloway ve ark. (2010) 715 İtalyan erişkin bireyde 24 saatlik üriner BFA atılımı ile serum seks hormonu konsantrasyonları arasındaki ilişkileri incelemiştir. Bu çalışma, obeziteyi belirten parametreler de dâhil olmak üzere, çalışmada belirlenen tüm değişkenler ile BFA arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Daha yüksek BFA atılımının, artan bel çevresi ve kilo ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Ancak Dünya Sağlık Örgütü tarafından tanımlanan BKİ tanımına göre aşırı kilolu veya obezite olarak ifade edilen vücut kitleleri ile üriner BFA atılımı ilişkili değildir (75).

Literatürde, üriner BFA ile obezite arasında anlamlı ilişki olduğunu bildirilmiştir (76, 77). Li ve ark. (2013) ise Şanghay'daki 1326 okul yaşındaki çocukta üriner BFA ve obezite arasındaki ilişkiyi incelemiş ve artan üriner BFA'nın, yalnızca 9-12 yaşlarındaki kızlarda fazla kilo riskiyle anlamlı derecede ilişkiliyken, kız veya erkek çocuklar için BFA ve BKİ arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını rapor etmişlerdir (78).

Endokrin ve Hormon Çalışmaları

Galloway ve ark. (2010) yüksek üriner BFA atılımı ile artmış serbest testesteron arasında zayıf bir ilişki olduğunu bildirmiş ancak kadınlarda seks hormonları ile ilişki bildirmemiştir (75).

Brucker-Davis ve ark. (2011) Fransa'daki 54 erkek bebekte kordon kanı ve kordon tayini testlerinde BFA'nın kesitsel bir analizini gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda, BFA'nın serbest tiroksin veya serbest triiodotironin ile ilişkili olmadığı; ancak düşük tiroid uyarıcı hormonu (TSH) ile zayıf bir şekilde ilişkili (istatistiksel olarak anlamlı değil) olduğunu bildirmişlerdir (79).

Chou ve ark. (2011) Tayvan'da 97 anne-çocuk çiftinde anne kanındaki ve göbek kordonu kanındaki BFA arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Çalışmada BFA'nın leptin ve düşük adiponektin ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır (80).

Volberg ve ark. (2013) Meksika-Amerikalı 188 anne-çocuk çiftinde prospektif kohort çalışması yapmıştır. 9 yaş ve üzeri erkeklerde ve kızlarda plazma leptin ve adiponektin konsantrasyonları ile prenatal BFA maruziyeti arasında (hamilelikte maternal üriner BFA konsantrasyonları) ilişkileri araştırmışlardır. Gebelik sonrasındaki yüksek maternal BFA konsantrasyonları, erkeklerde artan plazma leptiniyle, kızlarda artmış plazma adiponektini ile ilişkili olarak belirlenmiştir (81).

Diyabet Çalışmaları

Wang ve ark.'nın (2012) 40 yaş üstü 3390 Çinli erişkinde yaptığı çalışmada, yüksek üriner BFA atılımı ile artan obezite prevalansının ve insülin direncinin ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (82).

Shankar ve ark. (2011) 2003-2008 yılları arasında 3967 yetişkine ait veriler üzerinde inceleme yapmıştır. Çalışmaya açlık glikoz düzeyleri ve glikoz ile hemoglobin ile tip-2 diyabetleri teşhis edilen hastalar dâhil edilmiştir. Tip-2 diyabet riskinin, BFA arttıkça doza bağımlı olarak arttığını ifade etmişlerdir (83).

Doğum öncesi ve doğum sonrası sıçanlarda ve farelerde yapılan bir dizi çalışmada; BFA maruziyetinin glukoz-insülin regülasyonu ve lipogenezis üzerindeki etkileri kanıtlanmıştır. Bununla birlikte BFA maruziyetinin metabolik fonksiyon üzerinde ve vücut ağırlığında artışa (kısa dönemli çalışmalar) neden olduğu ortaya konulmuştur. Daha uzun süreli (örneğin 90 gün) yapılan diğer çalışmaların sonuçlarına dayanarak, BFA'ya intrauterin dönemde maruz kaldıktan sonra obezojenik olduğuna dair ikna edici bir kanıt bulunmamaktadır (73).

2.2.3.5. BFA'nın Kardiyovasküler Sisteme Etkisi

İnsanlarda BFA maruziyetine bağlı herhangi bir kardiyovasküler etki olduğu bilimsel sağlık kuruluşları tarafından bildirilmemiştir (29, 48, 56, 57, 73). Fakat Meltzer ve ark. (2012) yapmış oldukları bir çalışmada daha yüksek üriner BFA atılımı ile koroner arter hastalığının gelişme riski arasında ilişkili olduğunu bildirmiştir. Bu çalışma, Avrupa nüfusunda BFA maruziyeti ve kardiyovasküler sonuç arasında bir ilişki bildiren ilk çalışma özelliğini taşımaktadır (84).

2.2.3.6. BFA'nın Nörolojik, Nörogelişimsel ve Nöroendokrin Etkileri

Miodovnik ve ark. (2011) 404 anne-çocuk çifti grubunda doğum öncesi BFA maruziyetini incelemiştir. Çalışmada, New York'taki 7 ile 9 yaş grubundaki çocukların

sosyal davranışları (Sosyal Duyarlılık Ölçeği) ile maternal üriner BFA konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, otistik spektrum tipi davranışlarla prenatal BFA için ilişkiler göstermiş olup ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir (85).

Yolton ve ark. (2011) 350 anne/bebek çifti üzerinde çalışmış ve maternal üriner BFA konsantrasyonu ve bebek nörobilitesi arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Prenatal BFA maruziyeti ve bebek nörobilitesi arasında anlamlı bir ilişki olmadığını rapor etmişlerdir (86).

Yapılan deney hayvanları çalışmalarında, BFA maruziyeti ile kaygı benzeri davranış, öğrenme ve hafıza, sosyal davranış ve duyu-motor fonksiyonları araştırılmıştır. Bazı çalışmalarda, BFA maruziyetinden sonra kaygı benzeri davranış değişiklikleri rapor edilmiştir. Bazı araştırmalar, BFA maruziyetinden sonra öğrenme ve/veya bellek kapasitelerinde önemli bir bozulma olduğunu bildirmiştir. Birkaç çalışma da BFA maruziyetinin sosyal davranış ve duyusal-motor fonksiyon üzerindeki etkilerini bildirmektedir (73).

2.2.3.7. BFA'nın Üreme ve Gelişim Sistemi Üzerine Etkisi

Dobrzynska ve ark. (2013), 5, 10, 20 veya 40 mg/kg BFA'yı içme suyuna karıştırarak 2 hafta boyunca erkek farelere uygulamışlardır. Çalışma sonucunda 5 mg/kg/gün dozu hariç tüm BFA dozlarının sperm sayısı, sperm motilitesi ve anormal sperm morfolojisi üzerinde negatif yönde etkili olduğunu bildirmişlerdir (87).

Qiu ve ark.'nın (2013) çalışmalarında; yetişkin erkek Sprague-Dawley farelerine (8 haftalık) 8 hafta süreyle 0.0005, 0.5, 5 mg/kg doz düzeylerinde BFA uygulamışlardır. BFA'nın organ ve vücut ağırlıklarını, serum biyokimyasını, hepatonefrik fonksiyonu etkilemediğini bildirmişlerdir. Fakat 5 mg/kg BFA dozunun intratestiküler testosteronu düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Benzer şekilde bu dozun aynı zamanda, sperm sayısını, seminifer tübül epitel yüksekliğini, yuvarlak spermatid sayısını ve yuvarlak spermatid/sertoli hücrelerinin oranını düşürdüğü bildirilmişlerdir. Çalışma sonucunda spermatogenez ile ilgili genlerde ve proteinlerde meydana gelen değişiklikler de bildirilmiştir (88).

Tan ve ark. (2013) 6-8 haftalık hamile dişi ICR farelerine günde 0, 2, 20, 200 mg/kg BFA'yı gavaj yoluyla etanol/mısır yağı çözeltisi içinde uygulamışlardır. Günde 20 ve 200 mg/kg BFA'ya maruz bırakılan farelerin östrojen, testosteron ve kortikotropin

salgılatıcı hormon (CRH) seviyelerinde anlamlı derecede yükselme olmuştur. Protein kinase C delta (PKC delta) seviyesi sadece en yüksek dozdan etkilenirken, plasental CREB (cyclic amp-response element binding protein) proteini ve PKC zeta/gamma oranı tüm BFA gruplarında yükselmiştir. Bununla birlikte çalışma, gebe farelerde BFA maruziyetinin plasentada endokrin ve PKC sinyal yollarını bozabileceğini öngörmektedir (89).

Lee ve ark. (2013), yetişkin (8 haftalık) dişi Sprague-Dawley sıçanlara 90 gün süreyle günde 0.001 veya 0.1 mg/kg dozlarında BFA'yı oral yoldan uygulamışlardır. Pozitif kontrol grubuna ise günde 0.001 mg/kg östradiol benzoat (EB) verilmiştir. Çalışma sonucunda, dolaşımdaki östrojen ve testosteron seviyeleri hem BFA hem de EB tarafından azaltılmıştır. Östrus fazının süresi artmıştır. Follikül sayısı ve korpus luteum atrezisi BFA ile artmıştır. FSH düzeyleri etkilenmezken; LH düzeyleri, her iki BFA doz düzeyinde de artmıştır (90).

2.3. KEMİK HİSTOLOJİSİ, ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ

Kemik kollajen bir yapı içinde yer alan mikroskobik Ca^{+2} ve PO_4^{-3} tuzlarından, özellikle genel formülü $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ olan hidroksiapatitten yapılmış özel bir bağ dokusu şeklidir. Kemikler Ca^{+2} ve $PO4^{-3}$ homeostazında da rol oynar (91).

Yetişkin iskeletinin ana yapısını kemik doku oluşturmaktadır. Fonksiyonel olarak kemik doku; vücuttaki yumuşak yapıları destekler, hayati önem taşıyan organları korur ve kan hücrelerini yapan kemik iliğini yapısında barındırır. Ayrıca yapısında kalsiyum, fosfat ve diğer iyonları da bulundurmaktadır. Vücut iç dengesinin ayarlanmasında bu iyonların kontrollü olarak dolaşıma salıverilmesinde ya da dengede tutulmasında kemik doku önemli bir rol oynar (92).

Bunlara ek olarak kemikler, iskelet kası kasılmaları ile oluşan kuvvetleri çoğaltarak, bunları vücut hareketlerine dönüştüren bir kaldıraç sistemi oluştururlar. Tüm bu süreçlerle birlikte kemiklerde bir yaşlanma meydana gelir ve sürekli rezorbe olarak yeni kemikler üretirler (91, 92).

2.3.1. Kemik Oluşumu ve Rezorpsiyonu

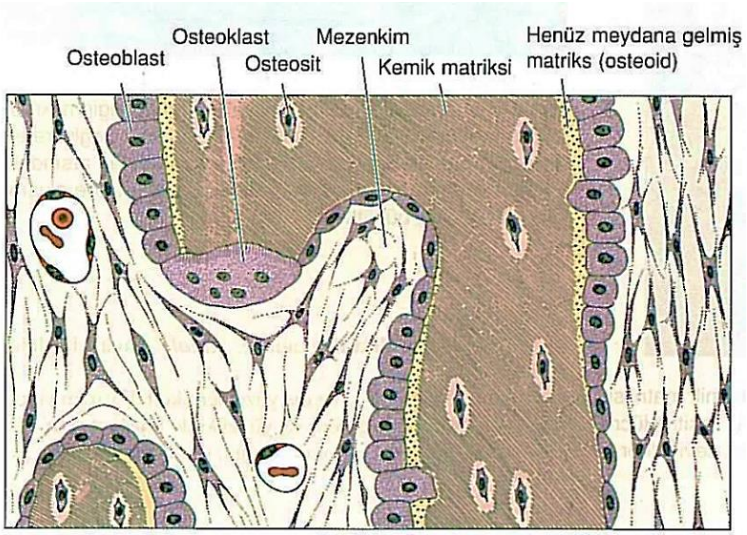
Kemik, hücreler arası kireçlenmiş materyal olan kemik matriksi ve 3 tür hücreden meydana gelmiştir (Şekil 2.3). Bu yapılar matriks içinde laküna adı verilen boşluklarda bulunan osteositler, matriksin organik kısımlarının sentezini yapan osteoblastlar ve

kemiğin yeniden modellenmesi ile ilgili olarak çok çekirdekli dev hücreler olan osteoklastlardan oluşmaktadır (92).

2.3.1.1. Osteoblastlar

Osteoblastlar kemik matriksinin organik kısımlarının üretilmesinden (Tip I kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinler) sorumlu hücrelerdir (92). Osteoblastların mezenşimden gelişimleri fibroblastlara benzerdir. Temel olarak modifiye fibroblastlar olarak görev yapmaktadırlar (91).

Osteblastlar özellikle kemik yüzeylerinde yan yana tek katlı epiteli andıracak şekilde bulunurlar. Aktif dönemde, matriks sentezi yaparken şekilleri kübikten prizmatiğe kadar birçok farklı modifikasyon göstermektedir. Fakat üretim işlevleri azalmaya başladığında yassılaşmış bir görüntüye sahip olurlar (92).



Şekil 2-3. Kemiğin yapısındaki hücreler (92).

Osteoblastlar kemik yapımı esnasında iki önemli fonksiyona sahiptirler. Bunlar yeni kemik oluşumunu başlatan maddeler salgılamak ve osteoklastların farklılaşmasını ve aktivitesini etkileyen paratiroid hormonu, D vitamini ve diğer faktörlere cevap vermektir (93).

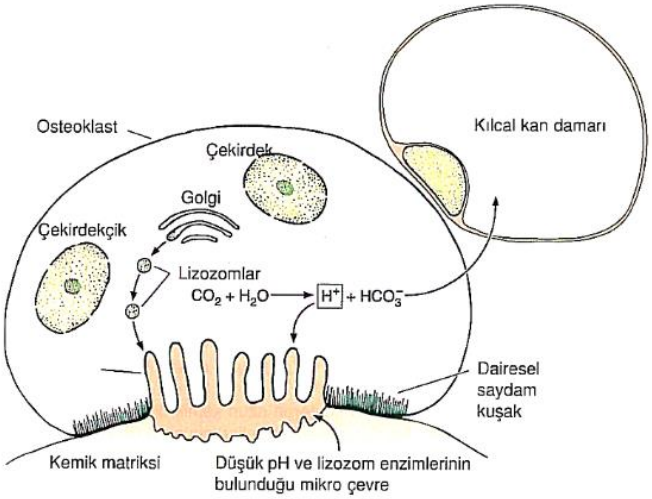
Osteoblastlar bu fonksiyonlarını gerçekleştirirken matriks ile kuşatılırlar ve osteosit haline gelirler. Bu işlem sırasında laküna adı verilen boşluklar oluşur. Lakünaların içinde osteosit ve uzantıları ile bunlarla birlikte az miktar kireçlenmemiş matriks vardır (92).

Osteosit oluşumundan birkaç gün sonra osteoblastlardan kaynaklanan alkalen fosfataz varlığında kollajen liflerinin yüzeyine kalsiyum tuzları çökmeye başlar. Bu çökelmeler kollajen lifleri üzerinde düzenli bir şekilde gerçekleşir ve haftalar sonunda son şekli olan hidroksiapatit ortaya çıkar. Tüm bunların sonuna osteoblastlar osteositlere farklılaşırlar (93).

2.3.1.2. Osteoklastlar

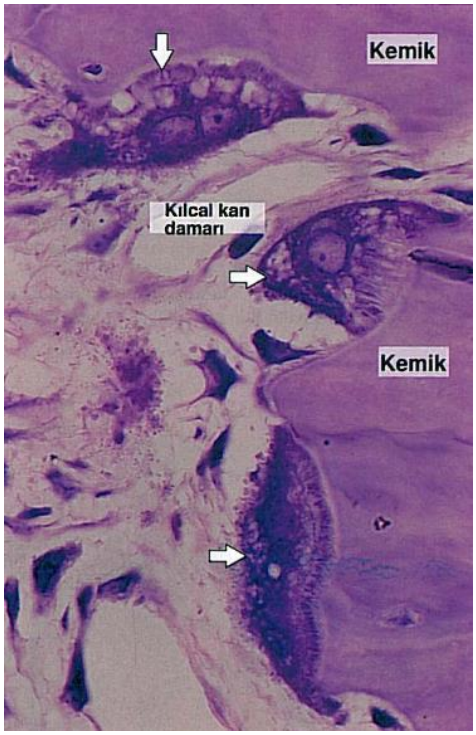
Osteoklastlar, çok büyük dallanmış, hareket edebilen hücrelerdir (Şekil 2-5). Genişlemiş hücre gövdesinde 5-50 arasında nükleus içeren, tartara dirençli asit fosfatazdan (TRAP) zengin monosit ailesinin üyeleridirler (92, 93).

Osteoklastlar, ileri derecede hareketli hücrelerdir. İntegrinler aracılığı ile sıkı bir şekilde kemiğe tutunarak rezorpsiyon çukurları oluştururlar. Bu alanlar kemiğin rezorbe olduğu Howship lakünası olarak adlandırılan içi boş alanlardır. Hücrenin çukurlara bakan kenarı kıvrımlı bir sınır oluşturur ve buradan kemiği gevşetmek, parçalamak ve eritmek üzere kollajenazlar, fosfatazlar ve lizozomal enzimler salgılanır (Şekil 2-4). Kemiğin erime ürünleri endositoza uğrar ve osteoklastlardan interstisyel aralığa serbestlenirler (92, 93).



Şekil 2-4. Kemiğin eritilerek emilişi (92).

Osteoklastların işlevi sitokinler ve hormonlar tarafından kontrol edilmektedir. Osteoklastların tiroitten salgılanan bir hormon olan kalsitonin için reseptörleri vardır. Ancak paratiroid hormonu reseptörlerine sahip değildirler. Bununla birlikte osteoblastlarda paratiroid hormonu reseptörleri mevcuttur ve bu hormon ile uyarıldıklarında osteoklastları uyarıcı faktör denilen sitokini üretirler (92).



Şekil 2-5. Kemik dokusunu sindiren 3 tane osteoklast hücresi (92).

2.3.1.3. Osteositler

Osteositler, osteoblast hücrelerinin olgunlaşmasıyla oluşmaktadır. Matriksin kanalcıkları arasındaki lakünalarda bulunurlar. Her laküna içerisinde bir osteosit bulunur. Bu kanalcık ve lakünalar aracılığıyla komşu osteositler ve osteoblastlarla temas eden ince dallı uzantılar ile çevrilidirler. Bu bağlantılar komşu hücreler arasında iyonların akışını sağlar (92, 93).

Bununla birlikte, osteositler ile kan damarları arasındaki bazı moleküler değişim, osteositler ile kemik matriksi arasında az miktardaki hücreler arası madde aracılığı ile de yapılır. Bu değişim yaklaşık 15 hücre zincirini besler (92).

Osteoblastlar ile karşılaştırıldığında osteositler, yassı ve badem şeklinde bir görünüme sahiptirler. Bununla birlikte granüllü endoplazma retikulumu epeyce azalmış ve golgi ile birlikte daha koyu kromatin sergilerler. Osteositler, morfolojik özellikleri ve çevredeki kemik matriksi eritmek üzere paratiroid hormonu tarafından uyarılmaları nedeniyle kemikten kana kalsiyum geçişinde rol oynadıkları düşünülmektedir. Ayrıca aktif olarak kemik matriksinin bakımından sorumludurlar (92, 93).

2.3.2. Kemik Matriksi

Kemik matriksinin kuru ağırlığının %50'lik kısmı inorganik maddelerden oluşur. Özellikle kalsiyum ve fosfor boldur, ancak bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum da kemik matriksinin yapısında bulunurlar (92).

Matriksin organik maddesi Tip I kollajen ve proteoglikan agregasyonları ile birkaç özel yapısal glikoproteini içeren temel maddedir. Kemik matriksindeki proteinin %90'dan fazlası Tip I kollajenden meydana gelmektedir. Bu protein aynı zamanda tendon ve deride de yer alan temel yapısal proteindir. Tip I kollajen birbirine sıkıca bağlanan üç polipeptidin üçlü sarmalından yapılmıştır. Bu özelliği ile Tip I kollajen aynı miktardaki çelik kadar sağlamdır. Kemik glikoproteinleri ise matriks kalsifikasyonunun başlatılmasından sorumlu olarak görev almaktadırlar (91, 92).

Matriksin yapısındaki inorganik ve organik maddeler esasen kemiğin yapısının ve şeklinin korunmasında görev almaktadırlar. Matriksin inorganik maddelerinden olan kalsiyum ortadan kaldırıldığında kemik yapısını şeklini korur ancak tendon kadar esnek bir hale gelir. Büyük bir kısmı Tip I kollajenden oluşan organik madde çıkarıldığında ise kemik yapı yine orijinal şeklini korur ancak kırılgan hale gelir ve dokunulduğunda ufalanarak kırılır (92).

2.3.3. Periosteum ve Endosteum

Kemiğin iç ve dış yüzeyleri, periosteum ve endosteum adı verilen bağ dokusu ile örtülüdür (Şekil 2-6).

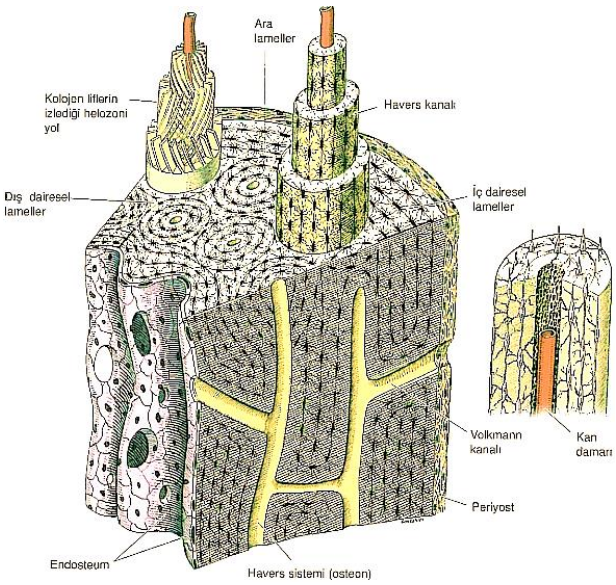
Periosteum, kemiklerin yüzeyini kaplayan yoğun fibröz, damarlı ve innerve edilen bir membrandır. Kollajen lif ve fibroblastlardan oluşan bir dış tabakadan ve kemik büyümesine potansiyel destek sağlayan hücreleri içeren ince elastik iç katmandan oluşur. Kollajen liflerden oluşan dış katmandaki Sharpey lifleri matriks içine girerek periosteumu kemiğe bağlar. İç katmanda yer alan osteoprogenitor hücreler ise kemik büyümesi ve onarılmasında rol oynamaktadırlar (91, 92).

Periosteum kıkırdak ile kaplı bölgeler hariç kemiğin bütün yüzeylerini kaplar ve ligament ve tendonlar için bağlanma yeri olarak görev yapar. Yaşlandıkça periosteum incelir ve damarlarının bir kısmını kaybeder. Bu olay kemiği yaralanma ve hastalıklara karşı daha duyarlı hale getirir (91). Periosteum damar ve sinir yönünden oldukça zengindir. Ağrı duyusunu ileten lifler periosteumda dağılır. Bu yüzden darbelere,

yırtılmalara ve gerilmeye karşı oldukça hassastır. Periosteum dışında kalan kemik dokusu ağrıya karşı duyarsızdır (94).

Endosteum, kemik içindeki bütün boşlukları sarar ve tek tabaka halinde yassılaşmış osteoprogenitor hücreler ile çok az miktardaki bağ dokusundan oluşur (91).

Periosteum ve endosteumun görevi; kemik dokusunun beslenmesini, büyümesini ve harap olan kısımlarının onarımını gerçekleştirmektir. Devamlı olarak yeni osteoblastların üretimini sağlamaktadırlar (92, 94).



Şekil 2-6. Kemik yapıya ait şematik çizim (92).

2.3.4. Kemik Türleri

Kemik dokusu olgunlaşmamış (primer veya lamelsiz) ve olgunlaşmış (sekonder veya lamelli kemik dokusu) olarak ikiye ayrılır.

Primer kemik dokusu, embriyolojik gelişim evresinde ve kırıkların onarımında görülür. Primer kemik dokusu genellikle geçicidir ve yetişkinlerde kafatası kemikleri arasındaki eklemlerin etrafında, tendonların kemiğe yapıştığı yerde ve diş alveollarında görülür. Primer kemik dokusu daha az minarel içeriğe sahiptir ve sekonder kemiğe göre daha fazla osteosit içermektedir. Ayrıca kollajen lifleri düzensiz sıralanır (92, 94).

Sekonder kemik dokusu; çocuklarda ve yetişkinlerde görülen kemik dokusu olup iki tiptir. Bunlar; vücuttaki kemiklerin %80'ini oluşturan ve birçok kemiğin dış tabakasını yapan kompakt veya kortikal kemik ve kalan %20'yi oluşturan kortikal kemiğin içindeki süngerimsi (spongioz) veya trabeküler kemiktir (91). Tipik olarak sekonder

kemik dokusu, kollajen liflerin birbirine paralel veya bir damar kanalı etrafında dairesel olarak düzenlendiklerini gösterir. (91, 92, 94).

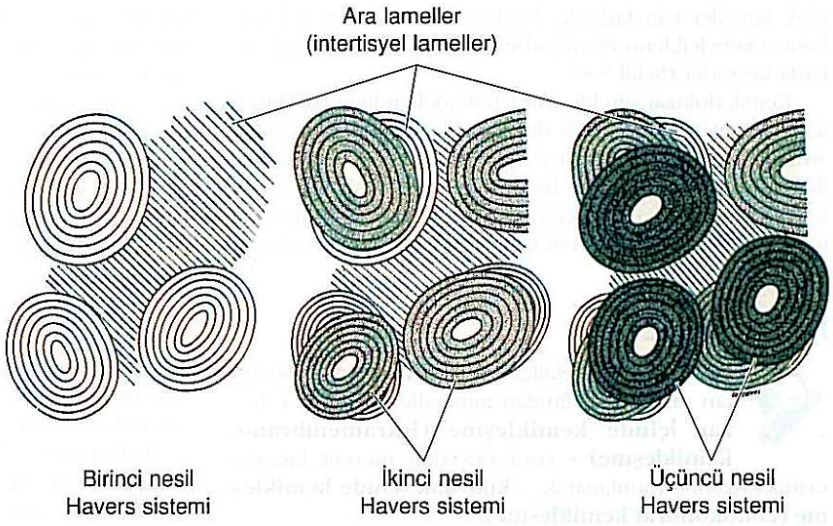
2.3.4.1. Süngerimsi Kemik

Süngerimsi kemik iskelet sisteminin %20'sini oluşturur. Genellikle kemiklerin iç kısımlarında bulunur. Yapısında iğnemsi çıkıntılar veya plakalar yer almaktadır. Bu kemiklerde kemik yüzeyin kemiğin tüm hacmine oranı yüksektir ve plakların yüzeyinde birçok hücre yer almaktadır. Yapısında çok sayıda kemik trabekülü ve bunlar arasındaki boşlukları ihtiva eder. Bu boşluklar canlıda kırmızı kemik iliği tarafından doldurulmuştur. Süngerimsi kemiklerin yapısında Havers kanalları bulunmaz. Bundan dolayı besin maddeleri trabekülaya difüzyon ile geçmektedir (91, 94).

2.3.4.2. Kompakt Kemik

Kompakt kemik; kanallar ve lamellerden oluşmuş homojen bir yapıya sahiptir. Kompakt kemikteki lameller; Havers sistemi, dış dairesel lamelcikler, iç dairesel lamelcikler ve ara lamelciklerden meydana gelmektedir (94).

İç dairesel lameller kemik iliği boşluğunun etrafında, dış dairesel lameller ise hemen periosteumun altında yer alır. Dış lamellerin sayısı iç lamellerden daha fazladır. Ara lameller ise Havers sistemleri arasında yer alan birbirine paralel uzanan lamellerdir (92). Havers sistemi; diyafizin uzun eksenine paralel uzanan, uzun ve sık dallanma gösteren kanallardır (Şekil 2-7). Etrafı 4-20 lamelcik ile sarılı merkezi kanaldan meydana gelir. Endosteum ile örtülü her kanalda kan damarları, sinirler ve gevşek bağ dokusu vardır. Havers kanalları, kemik iliği boşluğu, periosteum ve enine veya çapraz uzanan Volkmann kanalları ile ilişkilidir. Volkmann kanalları dairesel lamel içermez, bunun yerine lamelleri delerek uzanırlar. Kemik dokusu sürekli yeniden modellendiği için Havers kanallarının çapları büyük değişiklik gösterir. Her sistem ardı ardına dıştan içeriye doğru lamellerin tortulanması ile meydana gelir. Bu yüzden yeni oluşmaya başlamış sistemlerin kanalları daha büyüktür. Yetişkin Havers sisteminde merkezdeki kanala en yakın lamel en yeni oluşmuş olandır (92).



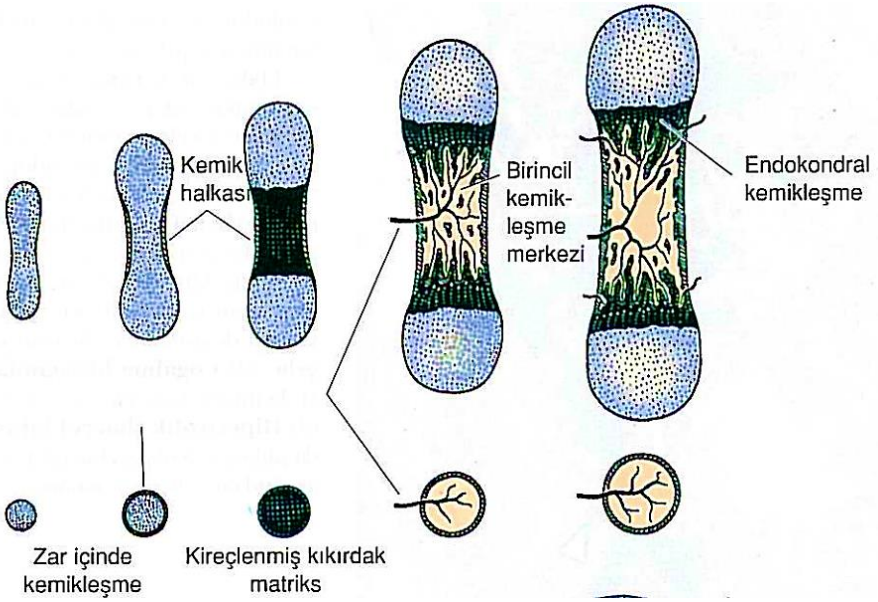
Şekil 2-7. Havers Sistemine ait şematik çizim (92).

2.3.5. Kemik Büyümesi

Fetal gelişim döneminde kemiklerin çoğu önce kıkırdak olarak şekillenir, daha sonra gövdede başlayan ossifikasyonla normal kemik haline dönüşür. Mezenşimal hücrelerin doğrudan kemik oluşturduğu clavicula, mandibula ve kafatasındaki bazı kemikler bunun dışındadır. İşte bu iki farklı şekilde gelişen kemik büyümesi; intramembranöz ve endokondral kemikleşme şeklinde ifade edilmektedir (91, 92).

2.3.5.1. Endokondral Kemikleşme

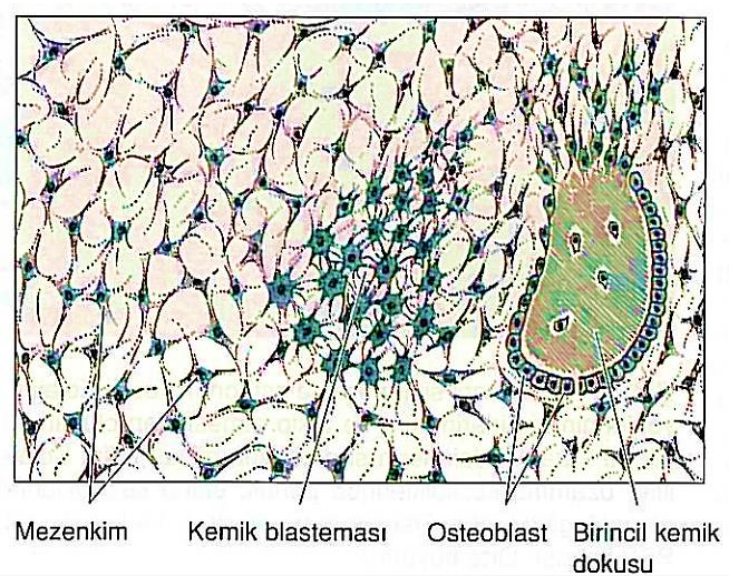
Endokondral kemikleşme modelinde, kemiklerin oluşacağı yerlerde kemiğin şeklini andıran küçük bir hiyalin kıkırdak model meydana gelmektedir (Şekil 2-8). Bu tür kemikleşme ekstremite kemikleri, omurga kemikleri, pelvis kemikleri gibi kısa ve uzun kemiklerde görülmektedir. Bu kemikleşme modelinde, fetal kemik gelişim döneminde kemiklerin çoğu önce kıkırdak olarak şekillenir, sonra gövdede başlayan ossifikasyonla kemik şekline dönüşür. İlk oluşan kemik dokusu primer kemik şeklindedir. Erişkin kemiklerin olgunlaşması (sekonder kemik) için primer kemik dokusunun yıkılarak lamelli kemik dokusunun yapımı gerekir (91, 92, 94).



Şekil 2-8. Kıkırdak model üzerine endokondral kemikleşme (92).

2.3.5.2. İntramembranöz Kemikleşme

İntramembranöz kemikleşme, çoğu yassı kemiğin kaynağıdır. Bu kemikleşmede mezenkim dokusu yoğunlaşması içinde kemikleşme gelişir. Bağ dokusu kıkırdak dokuya dönüşmeden direkt olarak kemik dokusunu oluşturur (Şekil 2-9). Kafatasının frontal ve parietal kemikler ile occipital, temporal, mandibula ve maxilla kemiklerinin bazı kısımları intramembranöz kemikleşme ile oluşur. Ayrıca bu kemikleşmenin kısa kemiklerin büyümesinde ve kalınlaşmasında da katkısı vardır (92, 94).



Şekil 2-9. İntramembranöz kemikleşmenin başlaması ile ilgili şematik çizim (92).

2.4. KIKIRDAK HİSTOLOJİSİ, ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ

Kıkırdak dokusu, kollajen matriksinde yer alan glikozaminoglikan kümeleri ile karakterize yarı sert bir bağ dokusudur. Yapısında sıvı içeriğinin fazla olmasından kaynaklı esnek bir destek sağlamak üzere görev yapar. Kıkırdak doku, kan damarı içermediği için besin maddelerinin ve metabolik ürünlerin geçişi difüzyon ile gerçekleşmektedir. Aynı zamanda kıkırdak dokuda lenfatik damarlar ve sinirlerde bulunmamaktadır (92, 93).

Perikondriyum, kıkırdağın büyük bir kısmını saran, kıkırdak ile kıkırdağın desteklediği doku arasında ara yüz meydana getiren yoğun bağ dokusu tabakasıdır. Bu tabaka kıkırdak doku için damar desteği sağlar ve ayrıca lenfatik damarlar ve sinirleri de barındırır (92).

Kıkırdak doku içerdiği liflere göre hyalin, elastik ve fibröz kıkırdak olmak üzere üç tipe ayrılır. Özellikleri bakımından kıkırdak tipleri Tablo 2-5'de özetlenmiştir.

Tablo 2-5. Kıkırdak tiplerinin özellikleri (93).

Kıkırdak Tipi	Yeri	Özellikleri
Hyalin	- Kaburgaların ön uçları - Kemiklerin eklem yüzeyleri	- Kollajen ve glikozaminoglikan miktarının yüksek olması nedeniyle makroskopik olarak lifler görülmez
Elastik	- Dış kulak	- Çok sayıda dallı elastin lifi içermesi nedeniyle hyalin kıkırdağa göre daha esnektir
Fibröz	- İntervertebral diskler - Bazı tendonların kemiğe bağlanma noktaları	- Tek başına bulunmaz, hyalin kıkırdak ve yoğun bağ dokusu arasında köprü kurar - Lifler çıplak gözle görülür - Gerilme gücüne ve esnekliğe katkısı vardır

2.4.1. Kıkırdak Türleri

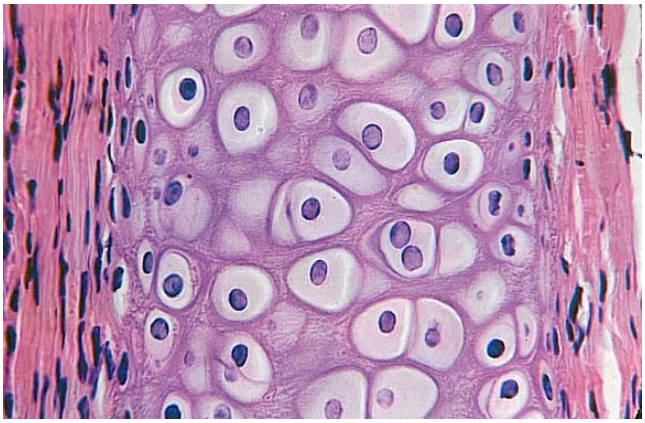
Vücut yapısına uygun bir şekilde, bölgesel biyomekanik gereksinimler doğrultusunda oluşan farklı matriks elemanları üç çeşit kıkırdağın ortaya çıkmasına sebep olur. Bu kıkırdak dokulardan en yaygın olanı hyalin kıkırdaktır. Matriksinin içerisinde yoğun bir şekilde tip II kollajen bulunmaktadır. Daha esnek ve bükülgen olan elastik kıkırdaktır. Matriksinde tip II kollajene ilaveten bol miktarda elastik lif vardır. Yoğun kaba tip I

kollajen lif ağına sahip matriksi ile tanınan fibröz kıkırdak, kuvvet etkisindeki vücut bölgelerinde bulunur.

2.4.1.1. Hyalin Kıkırdak

Hyalin kıkırdak, kıkırdak türleri içerisinde en yaygın olanıdır. Taze haylin kıkırdak yarı saydam mavimsi beyaz renktedir (Resim 2.1). Embriyolojik dönemde zamanla yerini kemik doku alıncaya kadar geçici iskelet doku olarak görev yapar (92).

Yetişkinlerde hyalin kıkırdak, hareketli eklemlerin eklem yüzeylerinde, solunum yollarının duvarlarında, kaburgaların sternum eklem yaptıkları ön uçlarında ve epifiz plaklarında yer alır (92).



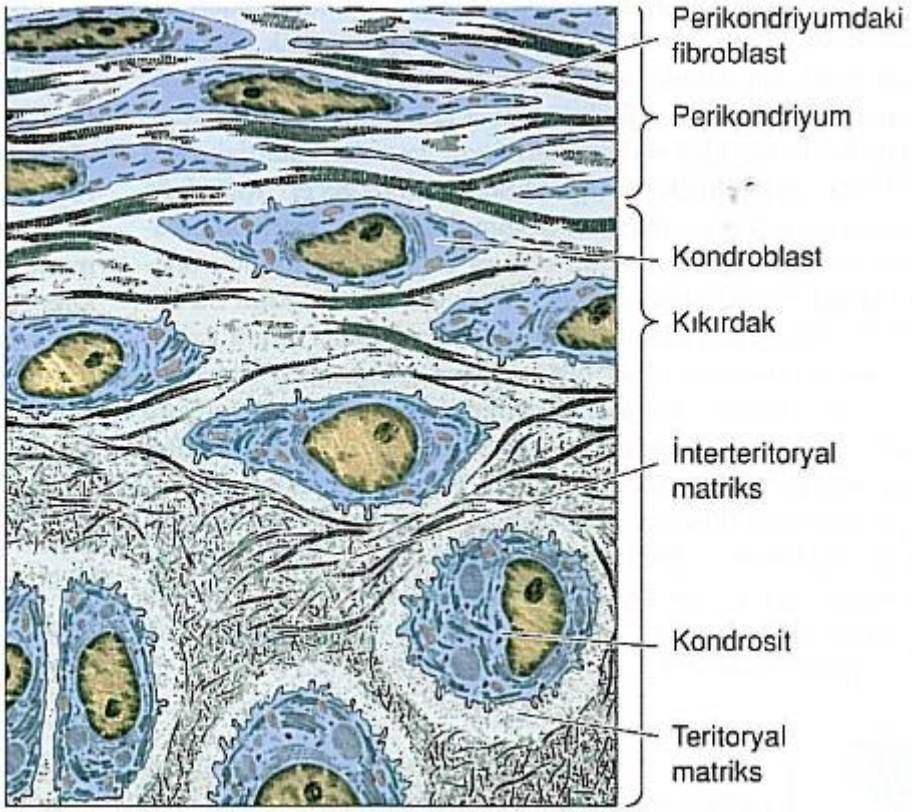
Resim 2.1. Hyalin kıkırdağın mikroskop fotoğrafı (92).

Hyalin kıkırdak matriksi, proteoglikan ve yapısal glikoprotein içeren, su ile karışık pelte içine gömülü kollajenden meydana gelmiştir. Hyalin kıkırdak öncelikle tip II kollajen içermektedir. Bununla birlikte çoğu kez az miktarda IX, X, XI ve diğer kollajen tiplerine de rastlanır (92).

Kondroblastlar; sentez aktivitesine sahip bölünebilen hücrelerdir. Genişledikçe ve farklılaştıkça çevrelerine hızla kıkırdak matriksi oluşturan içeriklerini salgılarlar. Tip II kollajen sekresyonun başlıca bileşenini oluşturur. Aynı zamanda hücrelerin aktiviteleri için büyüme hormonu olarak görev yapar. Kondroblastların sürekli olan sekretuvar aktiviteleri hücrelerin aralarını açan matriks miktarını artırır (93).

Kondrositler; olgun kıkırdak hücreleridir. Yapısal elemanların sentezinde görev almazlar fakat mitoz bölünmeye devam ederler. Böylelikle yeni oluşan hücreler kondroblastlara farklılaşırlar veya farklılaşma göstermezler. Farklılaşmayan hücreler sekresyon yapmayan kondrositlerin yuvası halinde kalır. Diğer taraftan kondroblastlara

farklılaşma gösterenler interstisyel büyüme ile kıkırdak miktarını arttırırlar (Şekil 2-10) (93).



Şekil 2-10. Perikondriyum ve Hyalin kıkırdak arasındaki geçişin şematik gösterimi (92).

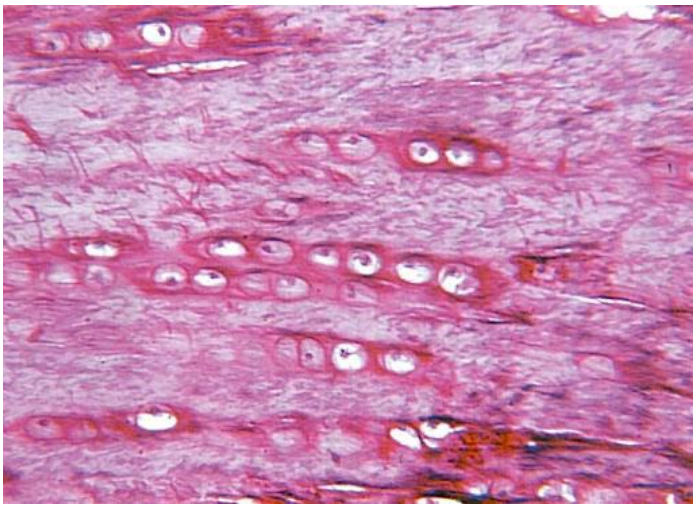
2.4.1.2. Elastik Kıkırdak

Elastik kıkırdak, kulak kepçesinde, dış kulak kanalı duvarında, östaki borusunda, epiglotta ve gırtlağın küneiform kıkırdağında bulunur. Matriks yapısı; tip II kollajen liflere ilave olarak, balık ağı gibi ince çok sayıda elastik lifçik bulundurması dışında hyalin kıkırdak matriksine birebir benzemektedir. Taze elastik kıkırdak sarımtırak renktedir (Resim 2.2.). Elastik kıkırdak çoğu zaman hyalin kıkırdağa dönüşür. Hyalin kıkırdakta olduğu gibi elastik kıkırdağın yapısında perikondriyum vardır (92).

Resim 2.2. Elastik liflerin boyandığı elastik kıkırdak matriksinin mikroskopik fotoğrafı (92).

2.4.1.3. Fibröz Kıkırdak

Fibröz kıkırdak, tıkız bağ dokusu ve hyalin kıkırdak arası bir dokudur. Omurlar arası disklerde, belirli bağların kıkırdağımsı kemik yüzeylerine bağlandıkları yerlerde ve symphysis pubica'da bulunur. Fibröz kıkırdak ya tek başına ya da izogen gruplar halinde yer alan kıkırdak hücrelerini içerir (Resim 2.3). Matriksi tip I kollajenden zengin olduğu için asidofildir. Bunun yanı sıra yapısında tanımlanabilecek herhangi bir perikondriyum yoktur (92).



Resim 2.3. Fibröz kıkırdağın mikroskopik fotoğrafı (92).

2.5. SIÇANLAR VE SIÇANLARDA İSKELET SİSTEMİ

Günümüzde deneysel çalışmaların birçoğu deney hayvanları üzerinde yapılmaktadır. En çok kullanılan deney hayvanları arasında sıçan (rat), fare ve tavşan gelmektedir. Bu çalışma Sprague-Dawley cinsi ratlar üzerinde yapılmıştır. Bu bağlamda araştırmacıların çalışma yapacağı deney hayvanına ait anatomik, fizyolojik ve cinse bağlı genel özelliklerini bilmesi gerekmektedir. Bu bölümde ratların genel özellikleri ve iskelet sistemine dair bilgilere yer verilecektir.

2.5.1. Sıçanların Anatomik ve Fizyolojik Özellikleri

Laboratuvar ratları, kahverengi Norveç ratı olarak bilinen Rattus norvegicus ırıkından gelmekte olup tıp ve diğer alanlardaki araştırmalar için önemli bir hayvan modeli olarak kullanılmaktadır (95).

Kemirgenlerde suş kavramı, tüm üyelerin mümkün olduğunca genetik açıdan özdeş olduğu bir grup anlamına gelmektedir. Ratlarda, inbred ve outbred iki tip suş vardır (95).

İnbred suşlar erkek ve dişi kardeşlerin çiftleşmesiyle elde edilen jenerasyondur. Kolonideki hayvanların hepsi genetik açıdan farksızdır. Fischer 344 albino, Lewis albino, Buffalo albino, abnormalities congenital (ACI) kahverengi ve Spontaneous hypertensive (SHR) türleri inbred ratlara örnek olarak gösterilebilir.

Outbred suşlarda, kolonideki hayvanların genetiği bilinmemekte olup akraba olmayan fare veya ratların çiftleşmesinden elde edilen hayvanlar yer almaktadır. Temelde bu hayvanlar inbredlere göre daha ucuzdurlar ve çok daha fazla yavru vermektedirler. Outbred soyun tüm üyeleri görünüşte aynı olmasına rağmen genetik olarak birbirinden farklıdırlar. Bu durum, outbred hayvanla yapılan çalışmalarda farklı sonuçların çıkmasının sebebini bize açıklamaktadır (96).

Erkek ratlar 300-400 gr, dişi ratlar yaklaşık 250-300 gr ağırlığında olup boyları ortalama 20-25 cm arasında değişmektedir. Yaşam süreleri 2.5-3 yıl arasındadır ve doğumdan sonra yaklaşık 13 hafta içinde cinsel olgunluğa erişmektedirler (97, 98).

Ratlar; diş formülleri, akciğer loblanması ve genel anatomik özellikleri bakımından farelere benzemektedirler. Diş formülleri Incisiv:1/1-Canin:0/0-Premolar:0/0-Molar:3/3 şeklindedir. Ratların sol akciğerinde bir lob, sağ akciğerinde dört lob bulunur. Solunum sayıları dakikada 160 civarındadır. Fakat kendilerini tehlikede hissetlerinde kalp atım hızları dakika 300 civarına kadar yükselmektedir (97).

Bunların yanı sıra ratların, göz ve kulak kökü arasında fazladan bir gözyaşı bezi (glandula lacrimalis accessoria) bulunur. Farelerden farklı olarak ratların safra kesesi (vesica felleae) ve tonsilla palatinası bulunmamaktadır (97).

Ratlarda fareler gibi gece aktif hayvanlardır. Bununla birlikte vitamin A eksikliğine bağlı olarak gece körlüğü mevcuttur. Görme yetenekleri de çok zayıftır ve renkleri ayırt edemezler. Göz mercekleri büyük ve küreseldir ama her iki göz küresinin birbiri ile uyum gücü yoktur. Ratların gözlerinde, kedilerde olduğu gibi tapetum lucidum yapısı bulunmaktadır. Bu sayede ışık yansıması olmakta ve gece görme sağlanabilmektedir (97, 98).

Ratların görme duyuları zayıf olmasına karşın, işitme ve koku duyuları kuvvetlidir. Öyle ki, ultrasound ve yüksek düzeydeki seslere karşı çok duyarlı olup, dalga boyu 80 kHz'e kadar olan sesleri rahatlıkla işitebilirler. Koku duyuları da çok iyi gelişmiştir ve beyinlerindeki regio olfactoria olarak isimlendirilen koku alanları büyüktür (97, 98).

Ratlar 10ºC ile 30ºC arasındaki çevre sıcaklıklarına adapte olabilirler ancak ratlar için optimal çevre sıcaklığı 20ºC ile 26ºC arasındadır. Fakat çevresel sıcaklık değişimlerine karşı, fareler gibi ayak tabanlarında bulunan ter bezleri ve kuyruk damarlarının genişlemesi ile rahat bir şekilde uyum sağlamaktadırlar (97, 98).

Ratalara ait fizyolojik özellikler Tablo 2-6'da gösterilmiştir.

Tablo 2-6. Ratlara ait bazı fizyolojik özellikler (99).

Erişkin vücut ağırlığı (dişi)	200-300 g
Erişkin vücut ağırlığı (erkek)	300-500 g
Doğum ağırlığı	5-6 g
Vücut yüzey alanı	230 cm^2/50g 250 cm^2/130g 325 cm^2/200g
Vücut sıcaklığı	35.9- 37.5^{0}C
Yaşam süresi	2.5-3.5 yıl
Gıda tüketimi	5-6 g/100 g
Su tüketimi	10-12 ml/100 g
Seksüel olgunluk (dişi)	65-110 gün (13 hafta)
Seksüel olgunluk (erkek)	65-110 gün (13 hafta)
Siklus uzunluğu	4-5 gün

Gebelik süresi	21-23 gün
Yavru sayısı	6-12
Doğurganlık süresi	350-440 gün
Kalp atım sayısı	250-500/dak
Işık periyodu (aydınlık / karanlık)	12 / 12
Kan volümü	54-70 ml/kg
Kan basıncı	84-134/ 60-68 mmHg

2.5.2. Sıçanlarda İskelet Sistemi

İskelet sistemi genel olarak tüm memelilerde benzerlik göstermektedir. Sıçanlarda iskelet sistemi, skeleton axiale ve skeleton appendiculare içinde dağılım gösteren toplam 223 kemikten oluşmaktadır (100).

2.5.2.1. Skeleton Axiale (Aksiyal İskelet)

Ratlarda aksiyal iskelet; cranium (kafatası), thorax (göğüs kafesi), vertebrae (costalar), columna vertebralis (omurga) ve kulak kemikçiklerinden meydana gelmektedir.

Cranium Kemikleri: Ratların kafatası iskeleti iki büyük bölgeden meydana gelmektedir. Ön tarafta yer alan yüz bölgesinde; burun iskeleti, göz kürelerinin yerleştiği orbita ve çene iskeleti yer almaktadır. Ratların koku alma özelliği çok hassas olduğu için buna bağlı olarak burun iskeleti diğer memelilere göre daha uzun bir yapıya sahiptir. Arka tarafta yer alan kafatası bölgesinde ise kulak ve beyin yerleşim göstermektedir. Bu bölgenin büyüklüğü beyin hacmine bağlı olarak değişmektedir. Bu bölgede aynı zamanda foramen magnum adı verilen büyük bir delik vardır (101).

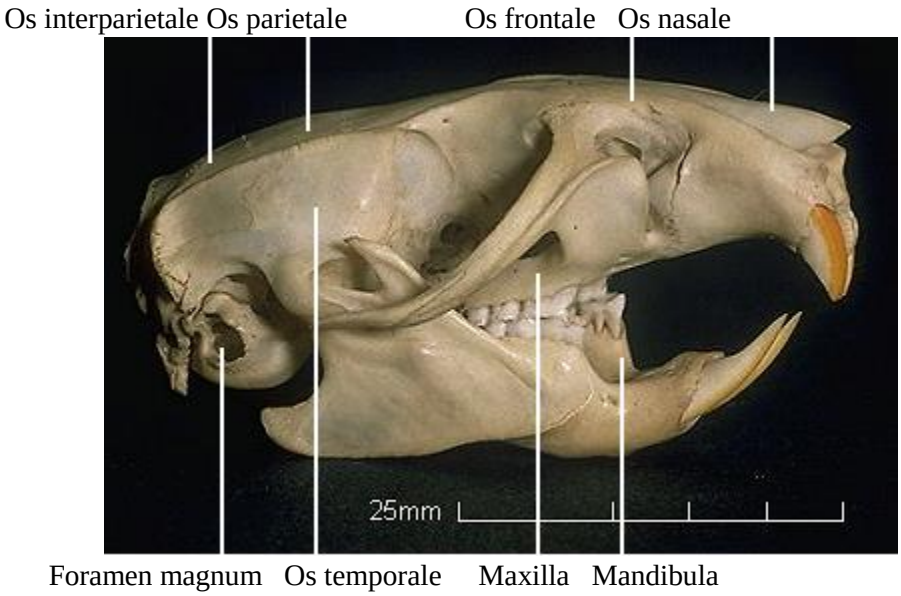
Genel olarak cranium toplam 28 kemikten meydana gelmektedir. Bu kemiklerden 6 tanesi tek, geriye kalan 11 tanesi ise çifttir.

Tek olanlar; os ethmoidale, os occipitale, os interparietale, os hyoideum, os palatinum ve vomer kemikleridir.

Çift olanlar ise; os frontale, os sphenoidale, os zygomaticum, os parietale, os temporale, os lacrimale, os nasale, os incisivum, os pterygoideum, maxilla ve mandibula kemikleridir (102).

Maxilla, üst çene kemiği olup dişlerle ilişkilidir. İki büyük kesici diş maxilla'nın ön tarafında; molar dişler ise maxilla'nın arka tarafında yerleşim göstermektedir. Os nasale çift kemiklerden olup burun boşluğunun dorsal duvarını oluşturmaktadır. Frontal

kemikler, kafatasının ön kısmının çatısını ve orbitanın yan duvarını oluşturur. Os parietale ve os interparietale kemikleri cranium'un dorsal ve lateral duvarını oluştururlar. Os palatinum, ağız boşluğunun tavanını ve kafatasının ön bölgesinin ventral yüzeyini oluşturmaktadır. Mandibula ise kafatasının tek hareketli kemiğidir ve alt çeneyi oluşturmaktadır (101). Bu kemiklerin kafatası üzerindeki yerleri Resim 2.4'de gösterilmiştir.



Resim 2.4. Sıçan cranium iskeleti (103).

Columna Vertebralis: Columna vertebralis baş ve gövdeyi destekleyen ve ağırlığın vücut bölümleri arasında dengeli bir şekilde aktarılmasını sağlayan aksiyal iskelet bölümüdür. Columna vertebralis beş bölgeye ayrılarak incelenir. Columna verteberalis'i oluşturan omurlar temelde benzer bir yapıya sahiptir. Fakat bölgesel olarak vertebraların ebat ve şekillerinde bazı farklılar bulunmaktadır. Aynı zamanda her bir vertebra bulunmuş olduğu bölgede hareketi kontrol eden kaslar ve bağlar için bir bağlanma noktası olarak işlev görmektedir (101, 104).

Ratların columna vertebralisi toplamda 57-61 vertebradan meydana gelmektedir. Bu vertebralar beş bölgede dağılım göstermekte olup 7'si servikal, 13'ü torakal, 6'sı lumbal, 4'ü sakral ve 27-31'i kaudal bölgeye aittir. Buna göre vertebralar C7, T13, L6, S4 ve Cy27-31 olarak formülize edilmektedir (102).

Servikal vertebraları diğer vertebralardan ayıran en önemli özellik kan damarlarının geçtiği foramen transversarium'lara sahip olmalarıdır. 1. boyun omuru olan atlas ve 2.

boyun omuru olan axis yapısal olarak kafa hareketlerini sağlayacak ve desteleyecek şekilde değişim sergilemektedir (101).

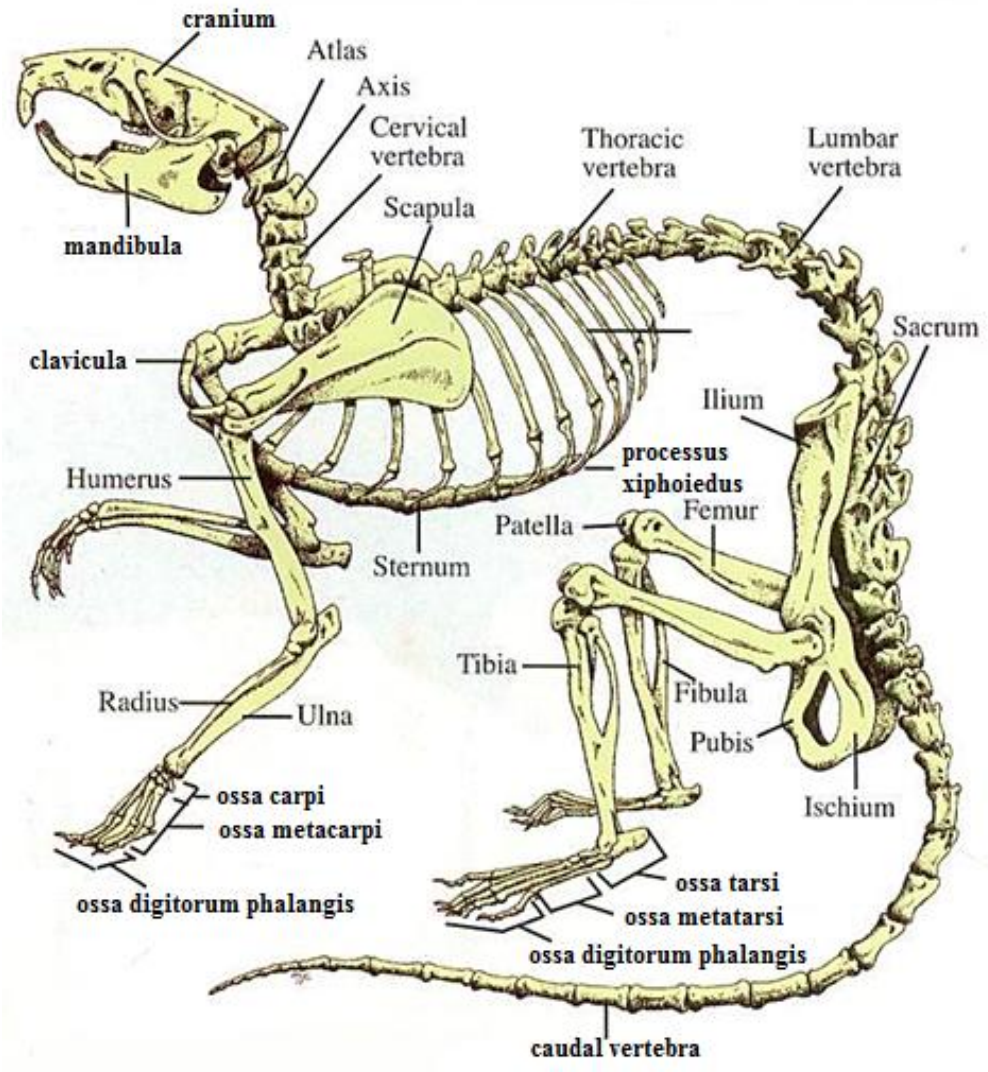
Torakal vertebraların uzunlukları kaudale doğru 2 mm'den 7 mm'ye kadar artmaktadır. Torakal bölgede canalis vertebralis'in çapı servikal bölgeye oranla daha dardır ve 3.3 mm'ye kadar düşmektedir. Torakal vertebraların processus spinosus'ları diğer bölgedekilerine göre daha uzun ve sivridir. Ayrıca torakal vertberaların gövdelerinin ön ve yan taraflarında kemik costaların tutunmuş olduğu eklem yüzleri bulunmaktadır. Bu sayede arkadan ön tarafa doğru uzanan kemik costalar, kıkırdak costalar aracılığıyla sternum ile eklem yaparak thorax iskeletini meydana getirirler (101, 102).

Lumbal vertebralar, diğer bölgelerden farklı olarak daha büyük corpus vertebra'ya sahiptirler. Bununla birlikte geniş ve belirgin çıkıntıları vardır.

Sakral vertebralar bir araya gelip kemikleşerek sacrum kemiğini oluştururlar. Ortalama 20-23 mm olan sacrum da pelvis iskeletinin yapısına katılmaktadır.

Kaudal vertebraların sayısı kuyruk uzunluğuna bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bununla birlikte kaudal vertebraların ilk ikisinde arcus vertebrae tam olarak gelişmiş olup kuyruğun sonuna doğru diğer vertebraların arka kısımları kapanmayarak U şeklinde açık kalmaktadır (101, 102).

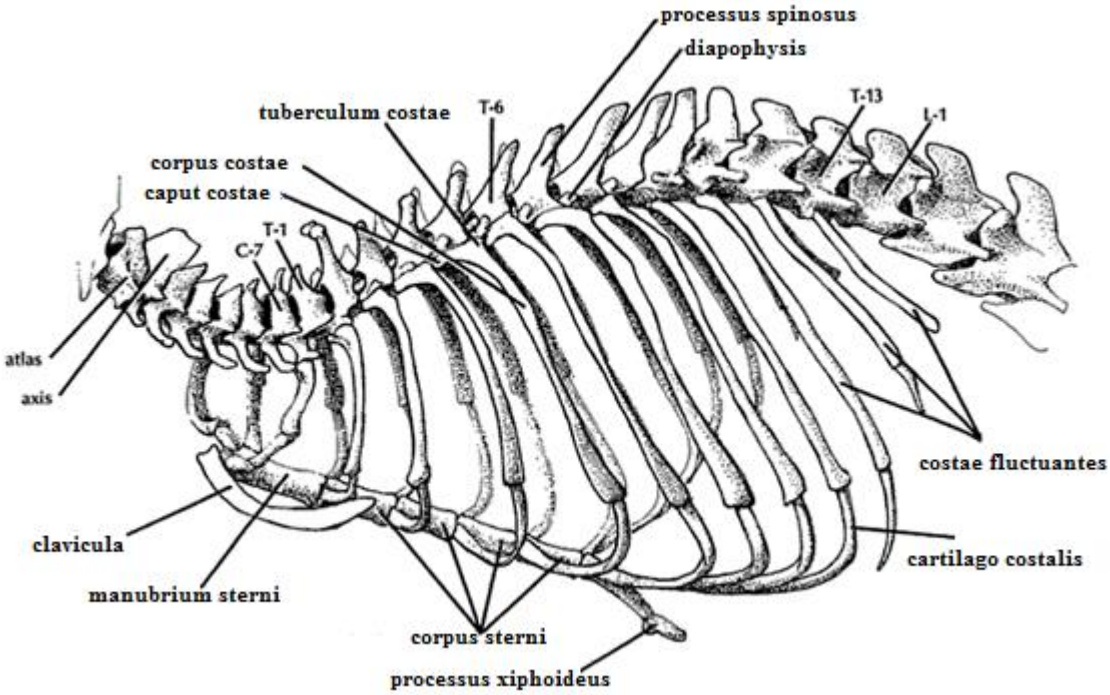
Rat iskelet sistemine ait kemiklerin tamamı Şekil 2-11'de gösterilmiştir.



Şekil 2-11. Rat iskelet sistemi görünümü (105).

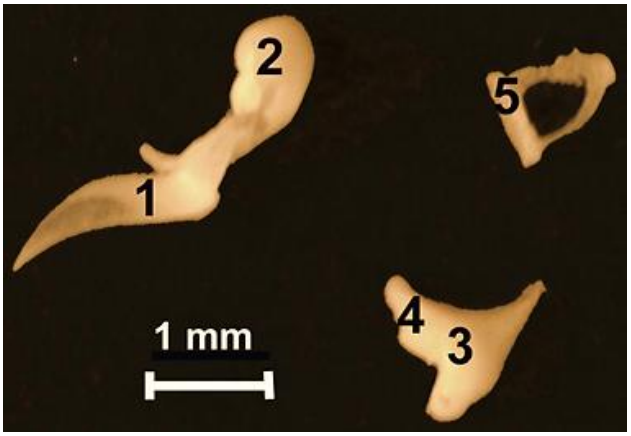
Thorax İskeleti: Sıçanlarda thorax iskeleti toplam 27 kemikten meydana gelmektedir (Şekil 2-12). Bu kemikleri 13 çift costa ve 1 adet sternum oluşturmaktadır. Costalar arka tarafta torakal vertebralar; ön tarafta ise sternum ile eklem yaparlar. Böylelikle kafes şeklinde bir görünüme sahip olan thorax iskeletini meydana getirirler. Bu iskelet yapı vücudu destekleyerek kalbi ve akciğerleri korumaktadır. Solunuma yardımcı olan kaslar için de bir tutunma noktası oluşturmaktadır (101, 102).

13 çift costanın ilk 7 çifti sternum ile direkt olarak eklem yapan gerçek costalardır (costae verae). Son 6 çift costa ise sternum ile direkt eklem yapmazlar. Bu costalara ise yalancı costalar (costae spuriae) denilmektedir. Costae spuriae'ların ilk 3 çifti 7. costa aracılığıyla sternumla bağlantı kurarlar, son 3 çifti ise serbest olarak sonlanırlar ve sternum ile eklem yapmazlar. Bu costalara da costae fluctuantes adı verilmektedir (102).



Şekil 2-12. Rat'a ait thorax iskeleti (106).

Kulak Kemikçikleri: Ratların malleus, incus ve stapes adı verilen 3 adet kulak kemikçiği bulunmaktadır (Resim 2.5). Orta kulakta bulunan bu kemikçikler dış kulak aracılığıyla alınan sesin işitme yoluna aktarılmasında görev yapmaktadırlar. Fizyolojik olarak sesleri algılama konusunda çok hassas olan ratlar 200 Hz – 76 kHz frekansları arasındaki sesleri rahatlıkla işitebilmektedirler (107).



Resim 2.5. Rat kulak kemikçikleri. 1-manubrium mallei, 2-caput mallei, 3-corpus incudis, 4-crus breve, 5-basis stapedis (108).

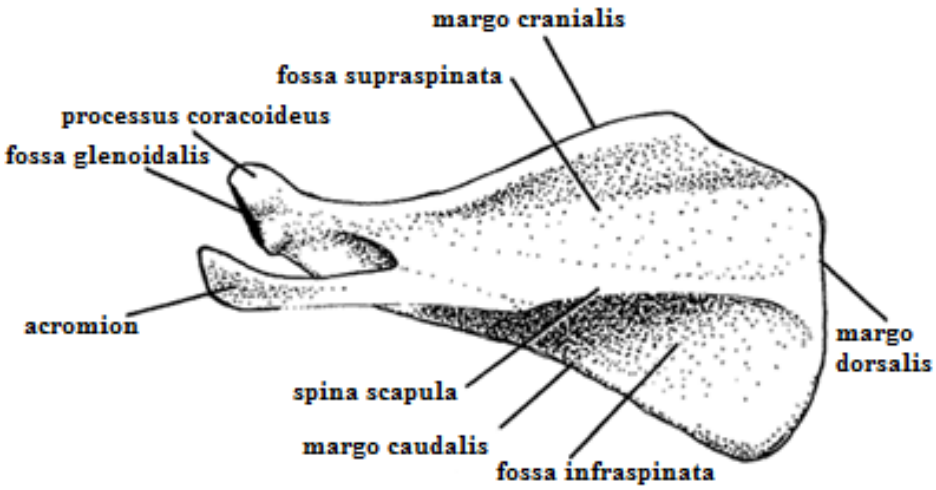
2.5.2.2. Skeleton Appendiculare (Appendiküler İskelet)

Ratlarda appendiküler iskelet; ön ve arka ekstremite kemiklerinden meydana gelmektedir.

Ön Ekstremite Kemikleri: Ön ekstremite clavicula, scapula, humerus, radius, ulna ve ön ayak kemikleri tarafından sağda ve solda toplamda 64 kemikten meydana gelmektedir (Resim 2.6).

Clavicula, iskelet sistemi gelişiminde ossifikasyonu ilk başlayan kemiktir. Ayrıca omuz kavşağını aksiyal iskelete bağlamaktadır. Proksimal ucu sternum ile distal ucu scapula eklem yapmaktadır (101, 106).

Üçgen şeklinde yassı bir kemik olan scapula'nın; üç kenarı, üç köşesi ve iki yüzü bulunmaktadır (Şekil 2-13). Scapula'nın dış yüzünde spina scapula olarak adlandırılan belirgin bir çıkıntı vardır. Bu yapı laterale doğru acromion isimli çıkıntı ile devam eder. Üst kenarında ise kanca şeklinde görünümü olan processus coracoideus isimli çıkıntı bulunmaktadır. Ayrıca scapula'nın lateral kenarında humerus ile eklem yaptığı fossa glenoidale adı verilen çukur bulunmaktadır. Böylece ön ekstremite ile omuz kavşağı arasında bağlantı kurulmaktadır (106).



Şekil 2-13. Sol scapula'nın lateral görünümü (106).

Humerus, ön ekstremitenin uzun kemiklerinden biridir. İki ucu ve bir gövdesi bulunan humerus, proksimalde scapula ile distalde radius ve ulna ile eklem yapar. Art. humeri, humerus'un caput humeri'si ile scapula'nın fossa glenoidale'si arasındadır. Humerus'un proksimal uçunda tuberculum majus, tuberculum minus ve m. deltoideus kasının

tendonlarının tutunduğu tuberositas deltoidea bulunmaktadır. Ayrıca yaşlı ratlarda tuberositas teres adında bir kabarıklık daha mevcuttur. Humerus'un distal ucunda ise epicondylus medialis ve lateralis olarak adlandırılan iki ayrı epikondil bulunmaktadır (102, 109, 110).

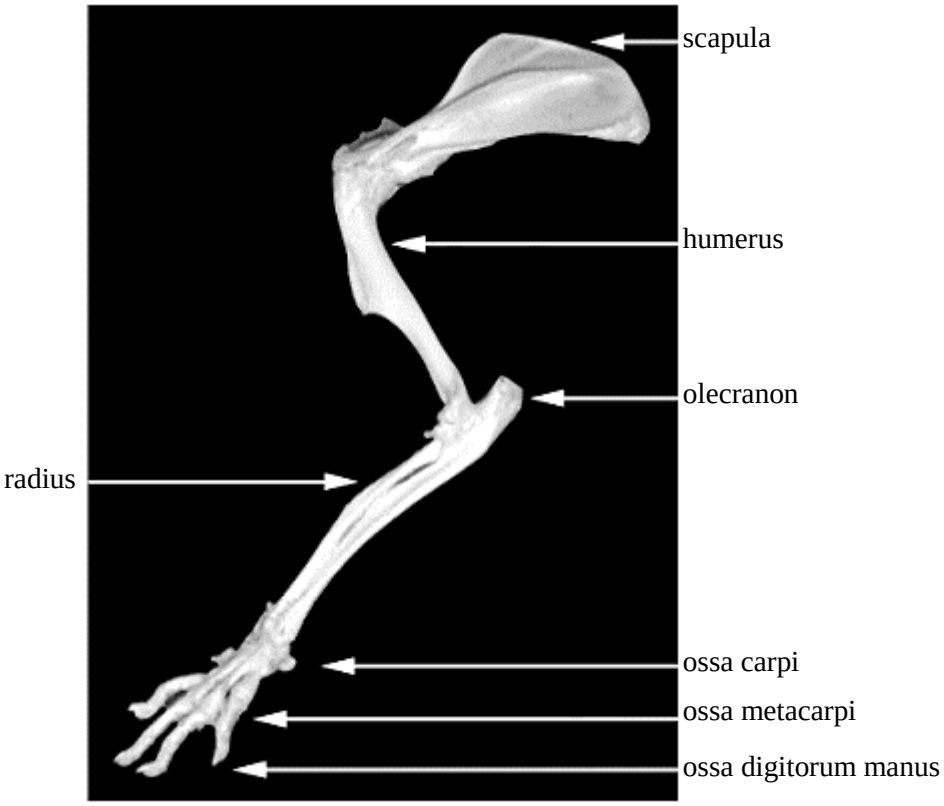
Ön ekstremitede humerus ile carpal kemikler arasında radius ve ulna kemikleri bulunmaktadır (Resim 2.6). Ulna ve radius temelde benzer çaplarda kemiklerdir. Fakat ulna proksimal ucundaki olecranon çıkıntısından dolayı radius'tan 1/6 oranında daha uzundur. Ulna ve radius arasında dar bir aralık bulunmaktadır ve burası membran ile kapatılmıştır (102, 109, 110).

Ön ekstremitede el bileği ve el iskeleti toplam 27 adet kemikten oluşmaktadır. Bu kemikler; ossa carpi (8 adet), ossa metacarpi (5 adet) ve ossa digitorum manus (14 adet)'dur.

Ossa carpi kemikleri proksimal ve distal iki sıra halinde dizilmiştir. Proksimal sırada 2 adet kemik bulunur. Medialde os carpi intermedioradiale (os carpi radiale ve os carpi intermedium'un birleşmesinden oluşur), lateralde ise os carpi ulnare bulunur. Distal sırada ise 6 adet kemik bulunur. Bunlar, os carpale I, os carpale II, os carpale III, os carpale IV, os carpale V ve os carpi centrale olarak adlandırılırlar. Ayrıca el iskeletinde bunların dışında iki adet sesamoid kemik bulunmaktadır. Bu kemiklerden medialde bulunana os falciforme veya os marginale, lateralde bulunana ise phalanx postminimi adı verilmektedir.

Ossa metacarpale toplamda 5 adet kemikten meydana gelmektedir. Bu kemiklerin en kısası I. metacarpal kemik en uzunu ise III. metacarpal kemiktir.

Ossa digitorum manus ise başparmak 2, diğer parmaklar ise 3'er tane falanks olmak üzere toplam 14 adet kemikten oluşur (102, 109, 110).



Resim 2.6. Sol ön ekstremite kemikleri (101).

Arka Ekstremite Kemikleri: Arka ekstremite os coxae, femur, tibia, fibula, patella ve arka ayak kemikleri tarafından sağda ve solda toplamda 64 kemikten meydana gelmektedir. Buna ek olarak 2 adet patella'da bulunmaktadır.

Os coxae, sacrum kemiğinin sağ ve sol tarafında bulunan bir çift kemik olup pelvis iskeletini oluşumuna katılmaktadır. Os coxae kemikleşmesini tamamlamadan önce üç parçadan meydana gelmektedir. Bunlar os ilium, os ischium ve os pubis'tir. Fossa acetabuli ile femur'un caput femoris'i arasında oluşan art. coxae arka ekstremite ve pelvis kavşağı arasında bağlantıyı kurmaktadır (102, 111).

Arka ekstremitenin en uzun kemiği olan femur'un proksimal ve distal olmak üzere iki ucu ve bunlar arasında yer alan bir gövdesi bulunmaktadır. Proximal uçta caput femoris ve collum femoris vardır. Yine proksimal uçta; trochanter major, trochanter minor ve trochanter tertius olmak üzere üç adet çıkıntı bulunmaktadır. Distal uçta ise condylus medialis ve condylus lateralis olmak üzere iki kondil mevcuttur (102, 111, 112).

Ratlarda tibia ve fibula kemiklerinin anatomik yapısı insanınkinden biraz farklıdır. Şöyle ki tibia ve fibula ratlarda tek bir kemik olarak incelenmektedir. Çünkü tibia ve fibula, proksimal ve distal uçta birleşmektedirler. Bundan dolayı os tibiofibulare olarak

isimlendirilmektedir. Yeni doğanlarda bile kısmi bir kemikleşme ile birleşen bu kemikler, yaş ilerledikçe daha iyi kaynaşırlar. Tibia ile fibula arasındaki kaynaşmaya rağmen iki kemik arasında geniş bir aralık bulunmaktadır ve burası membran ile kapatılmıştır (102, 111, 112).

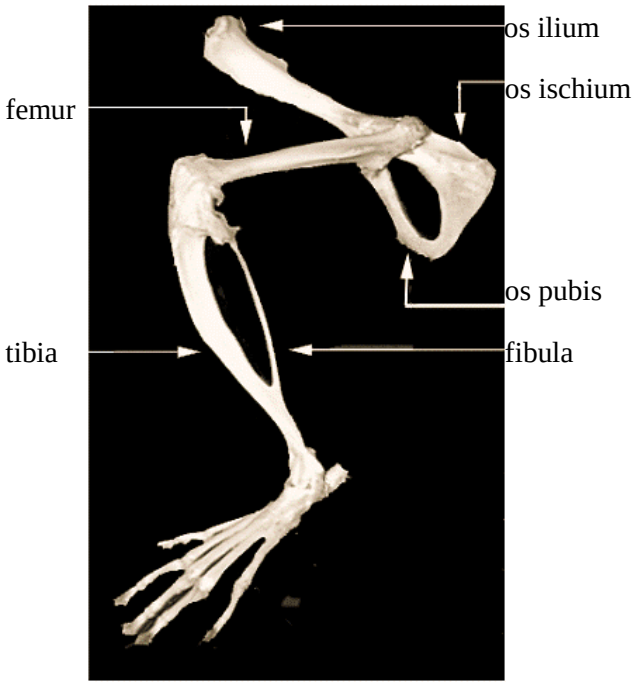
Arka ekstremitede ayak bileği ve ayak iskeleti toplam 27 adet kemikten oluşmaktadır (Resim 2.7). Bu kemikler; ossa tarsi (8 adet), ossa metatarsi (5 adet) ve ossa digitorum pedis (14 adet)'dir.

Ayak bileğine ait kemikler proksimal ve distal iki sıra halinde dizilmiştir. Proksimal sırada dört adet kemik bulunmaktadır. Bu kemikler; talus, calcaneus, os tibiale mediale tarsi ve talus ile distal sıra arasında yer alan os naviculare (os tarsi centrale) kemikleridir.

Distal sırada da dört adet kemik bulunmaktadır. Bu kemikler medialden laterale doğru os cuneiforme mediale, intermedium, laterale ve cuboideum (os tarsale I, os tarsale II, os tarsale III, os tarsale IV) kemikleridir (102, 111, 112).

Ossa metatarsale toplamda 5 adet kemikten meydana gelmektedir. Bu kemiklerin en kısası I. metatarsal kemik en uzunu ise III. metatarsal kemiktir.

Ossa digitorum pedis 14 kemikten meydana gelmektedir. Birinci parmakta iki falankstan, diğer parmaklar ise üç falankstan oluşur (102).



Resim 2.7. Sol arka ekstremite kemikleri (101).

2.6. SIÇANLARDA EMBRİYONİK GELİŞİM

Ratlarda gebelik ortalama olarak 21-22 gün arasında değişmektedir. Bu gebelik dönemi boyunca embriyoların iskelet ve organ sistemleri gelişmektedir. Gebeliğin yaklaşık 9. veya 10. günlerinde organlar gelişmeye başlamaktadır. Yine bununla birlikte embriyoların somit gelişimi de başlamakta ve gebeliğin 16. gününde tamamlanmaktadır. Gebeliğin 9-16. günleri arasında embriyolarda yaklaşık olarak 65 somit gelişmektedir. Somitlerin dağılımları; 4'ü oksipital, 8'i servikal, 13'ü torakal, 6'sı lumbal, 4'ü sakral ve 30'u kaudal bölgede olacak şekilde meydana gelmektedir (102, 113, 114).

10.5 günlük bir rat embriyosunda; kas-iskelet sistemi, nöral krest, kalp, karaciğer ve ön bağırsak tomurcuklarının gelişmeye başladığı gözlemlenmektedir. Ayrıca 7-9 adet arasında somit gelişimi de mevcuttur. Buna ek olarak allantois, eksosölom karşısında gelişmektedir ve ektoplasental kon ile birleşmektedir. 10.5 günlük embriyonun konumu ventral olarak konveks olup katlanmaya başlayarak kuyruğu kıvrılır. Katlanma olayı embriyo 11.5 günlükken tamamlanmaktadır ve embriyonun konumu dorsal olarak konveks hale gelmektedir. Embriyo, amniyon kesesi içinde katlandığı için amniyon kesesi embriyonun etrafını çevrelemektedir. Aynı zamanda embriyonun etrafında vitellus kesesi de gelişmektedir. Böylece hem amniyon hem de embriyo tamamen vitellus kesesi içinde gelişmektedir. 12.5 günlük rat embriyosunda hemen hemen bütün organlar belirginleşmeye başlamıştır. Embriyonun bu dönemi insan embriyosunun yaklaşık 8. haftasına denk gelmektedir (102, 115).

16. günde tamamlanan somit gelişimin ardından ilk kemikleşme merkezleri görülmeye başlanır. İlk kemikleşme merkezlerinin görüldüğü kemikler; clavicula, costalar ve kafatasının bazı kemikleridir. Bununla birlikte yine 16. günde kalça, diz, omuz ve dirsek eklemlerine ait eklem boşlukları oluşmaya başlamaktadır (102, 113).

17. günde kemikleşme, ekstremite tomurcuklarında ve kafatasının diğer kemiklerinde görülmektedir. El bileği ve ayak bileği eklemlerine ait boşluklar da belirginleşmiştir. 18. günde ise kafa hızla büyümektedir ve damak taslakları kaynaşmaktadır. 19. ve 20. günlerde ön ve arka ekstremitelerin parmak eklemlerine ait boşluklar ortaya çıkmaktadır (102, 113).

Sıçan embriyolojik gelişiminin Witschi evrelendirme aşamaları Tablo 2-7'de özetlenmiştir.

Tablo 2-7. Sıçan embriyolojik gelişiminin Witschi evrelendirme aşamaları (116, 117).

Standart evreler (Witschi)	Yaş (gün)	Boyut (en x boy) (mm)	Evrelerin özellikleri
Yarıklanma ve Blastula			
1	1	0.07	Ovidukt (tuba uterina) içinde tek hücreli evre
2	2	(0.08 X 0.06)	Ovidukt içindeki 2 hücreli evre
3	3	(0.08 X 0.05)	Ovidukt içinde 4 hücreli evre
4	3.5		Ovidukt içinde 8-12 hücreli evre
5	3.25	(0.08 X 0.04)	Uterus içinde morula
6	4	(0.08 X 0.03)	Uterus içinde erken blastosist dönemi
7	5	(0.08 X 0.05)	Uterus içinde serbest blastosist dönemi
Gastrula			
8	6	(0.28 X 0.07)	Blastosist, embriyonal kutup ve iç hücre kitlesiyle implante olmaya ve endoderm (hipoblast) gelişmeye başlar.
9	6.75		İki sıralı trofoblastlar, iç hücre kitlesini ve endodermi çevrelemeye başlar.
10	7.25	0.3 X 0.1	İmplantasyon bitimine yakın dönemde iç hücre kitlesi embriyo ve ekstraembriyonik oluşumlara farklılaşmaya başlar.
11	7.25	0.5 X 0.1	İmplantasyon tamamlanır. Embriyonal kutupta primer amniyotik kese ortaya çıkar.
Primitif çizgi			
12	8.5	(1.04 X 0.26)	Bağlantı sapı ve amniyon boşluğu şekillenir. Ayrıca primitif çizgi, üçüncü germ yaprağı, kalp ve perikard taslakları şekillenmeye başlar.
Nörula			
13	9	1.0	Presomit nörulasyon; amniyokoryonik katlantıların birleşmesi, nöral plak, embriyo kıvrımları ve allantois kesesinin tomurcuğu şekillenir.
14	9.5	1.5	1-4 oksipital somitler şekillenir. Amnion boşluğu, eksosölom ve ektokoryonik kese ihtiva eden bir embriyo şekillenir. Ektokoryonik kese kollapse olur, allantois sapı ekzosölom boşluğuna doğru uzanır ve embriyonun dorsal kıvrımı artar.
15	10	2	5-12 servikal somitler, 1. visseral arkus şekillenir. Ektokoryonik kese, ektoplesenta ve allantoik sap ile kaynaşır. Vitellus kesesinin alt bölümü ve trofoektoderm geriler. Reichart membranı ve eondoderm içinde primordial germ hücreleri görülür.

16	10.5	2.4	13-20 no'lu üst torakal somitler, 2. visseral arkus, kol ve bacak tomurcukları görülür. Embriyonun ventrale doğru katlanması artar.
17	11	3.3	21-25 no'lu alt torakal somitler şekillenir. Vitellus kesesi 15 no'lu somite yaklaşır. Mezenterium içindeki primordiyal germ hücreleri şekillenir. Primitif çizgi kaybolur. Kuyruk tomurcuğu şekillenir, kol ve bacak tomurcukları belirginleşir.
Embriyonun arka bölgesi			
18	11.5	3.8	26-28 no'lu üst lumbal somitler, 3. visseral arkus ile kol tomurcukları iyice belirginleşir.
19	11.75	4.2	29-31 no'lu alt lumbal somitler, I-IV visseral arkuslar, servikal kıvrımlar görülür.
20	11.875	5	32-33 somitli evre olup ilk kez sakral somitler ortaya çıkar.
21	12	5.1	34-35 somitli evre olup alt sakral somitler ve derin servikal sinüsler ortaya çıkar.
22	12.125	5.2	36 somit sayısına ulaşılır. Birinci kaudal somit ile burun çukurları görülür.
23	12.25	5.6	37-38 somitli evre olup göbek fıtığı başlangıcı görülebilir.
24	12.375	6	39. ve 40. somitler gelişir.
Embriyo gelişiminin tamamlanması			
25	12.5	6	41 ve 42. kaudal somitler şekillenir, oksipital somitler kaybolur ve 4 tane visseral arkus ile derin servikal sinüsler gelişimine devam eder. 8-14. somitler seviyesinde kol tomurcukları uzayıp belirginleşir. Ayak tomurcukları ise 28-31. somitler seviyesinde gelişir fakat daha küçüktürler. Embriyo gövdesi 1.5 turluk bir dönüş yaparak sol yüz ve gövde, vitellus kesesine bakar, sağ taraf ise plasentaya doğru yönelir. Kuyruk ve allontoik sap plasentaya doğru uzar.
Embriyonun metamorfozu			
26	12.75	7	43-45 somitli evre. Bu evrede kaudal somitler; mandibula, maksilla ve frontonazal kemikler uzar, servikal sinüsler kapanmaya başlar. Meme taslakları, el plaklarınının farklılaşması hızlanır. El tomurcukları damarlanır ve brakiyal sinirleri alır. Göbek fıtığı başlar.
27	13	8	46-48 somitli evre. Yüzdeki çıkıntılar ve yarıklar, burun uzantısı şekillenir ve servikal sinüsler kapanır. Primer meme bezleri, el ve ayak plaklarının yuvarlaklaşması görülür. Göbek fıtığı belirginleşir.
28	13.5	8.5	49-51 somitli evre olup kaudal somitler şekillenir. 1 visseral yarık dış kulak yoluna dönüşür ve el

			plaklarında kıkırdak taslakları yoğunlaşır.
29	14	9.5	52-55 somitli evredir. Kaudal somitler şekillenir. I. ve II. visseral arkuslarda kulak kepçesinin çıkıntıları görülür.
30	14.5	10.5	56-60 somitli evre. Kaudal somitler şekillenir. Mandibula'da kıkırdak taslaklar görülür. Dış kulak yolunun açıklığı, hemen hemen yuvarlaklaşmıştır. Pleura-periton arasında dar bir kanal şekillenir.
31	15	12	61-63 somitli evre. Kaudal somitler şekillenir. Yüz yarıkları, pleura-periton kanalı kapanır ve dıyafragma oluşur.
32	15.5	14.2	64. kaudal somit şekillenir. Kulak kepçesi çıkıntısı belirginleşir. Göbek fıtığı maksimum büyüklüğüne ulaşır.
33	16	15.5	En son kaudal somit olan 65. somit şekillenir. Metamorfozun son evresidir.
Fetus			
34	17-18	16-20	Fetusun 1. evresi: göz kapakları hızla gelişir (18. günün sonunda gözler tamamen kapanır). Damak şekillenir, auricula dış kulak yolunu çevreler ve göbek fıtığı ortadan kalkar.
35 Doğum öncesi	19-22	20-40	Fetusun 2. evresi: Göz kapakları birbirine tam yaklaşır. Fötal membranlar ve plasentanın gelişimi maksimum seviyededir, kuyruk uzunluğu 10mm'ye kadar ulaşır. Doğum oluşur (sıçanlar 22. ve fareler 19. günde doğar).
35 Doğum sonrası	1-16 Doğum sonrası	40-100[1]	Doğumdan sonra fetus solumaya başlar. 1. ile 16. günler arasında göz kapakları ve dış kulak yolu halen kapalıdır.
36 Doğum sonrası	17+ Doğum sonrası	100+[1]	Dış kulak yolu kapalıdır, göz kapakları ise açılır. 17. günden sonraki 3 gün içinde aktif olarak beslenmeye başlar ve 1 hafta sonrada sütten kesilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na başvuruldu ve 12.08.2015 tarihli 15/103 karar nolu Etik Kurul izni alındı. Daha sonra çalışma kapsamında deney hayvanlarının bakımı-beslenmesi, hayvanlarda yapılacak deneysel çalışmaların ve deney sonunda hayvanların sakrifikasyonunu kapsayan deneysel uygulamaların Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM) bünyesinde yapılması ile ilgili olarak 28.09.2015 tarihli 40175052-020/72382 sayılı onay alındıktan sonra çalışma başlatıldı. Çalışmanın her aşamasında yapılan tüm işlemler etik kurul yönergesinde belirtilen kurallara uygun olarak gerçekleştirildi. Ayrıca çalışmamız Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2015-6181 nolu projesi ile desteklendi.

3.1. DENEY SIRASINDA KULLANILAN KİMYASALLAR

3.1.1. İkili İskelet Boyama İçin Kullanılan Kimyasallar

- Alcian Blue 8 Gx Merck (Almanya)
- Alizarin Red S Sigma-Aldrich (Almanya)
- Acetic Acid (Glacial) %99 Merck (Almanya)
- Etil Alkol %99.5 Merck (Almanya)
- Etil Alkol %96 NECM (Türkiye)
- Xylene For Analysis Emsure Sigma-Aldrich (Almanya)
- Gliserin %99.5 Merck (Almanya)
- Potassium Hydroxide Gr For Analysis Merck (Almanya)
- Diethylether For Analysis Emsure Merck (Almanya)
- Bisphenol A %99 Sigma-Aldrich (Almanya)

3.1.2. İmmünohistokimyasal Boyama İçin Kullanılan Kimyasallar

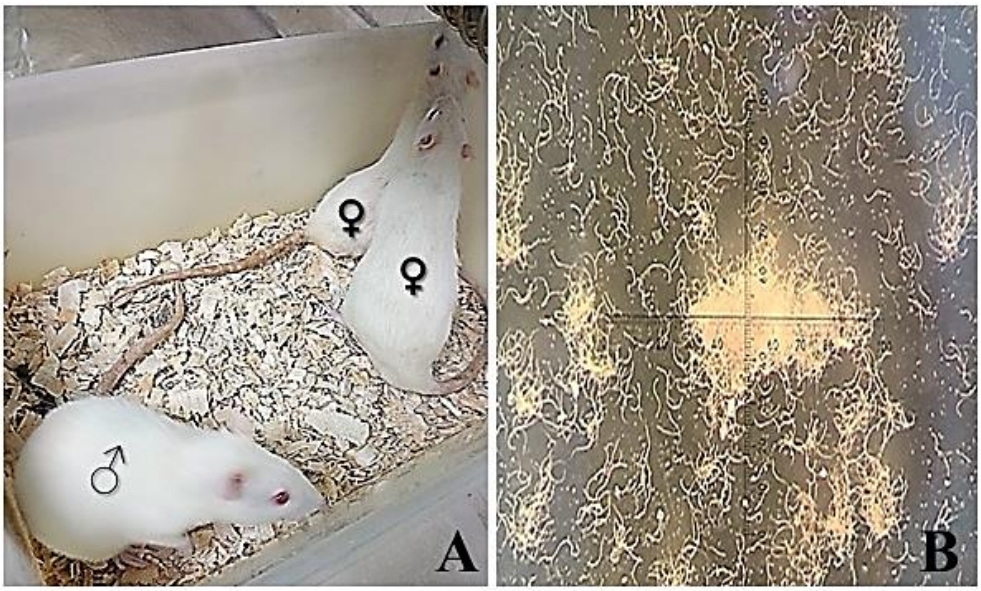
- Phosphate Buffer Saline (PBS) Sigma-Aldrich (Almanya)
- EDTA Buffer, pH 8, 125 ml Thermo Fisher Scientific (Amerika)
- Citrat Buffer, pH 6, 125 ml Thermo Fisher Scientific (Amerika)
- Ultravision Polyvalent (Rabbit-Mouse) HRP Kit, 125 ml Thermo Fisher Scientific (Amerika)
- DAB Chromogen and Substrate System, 125 ml Thermo Fisher Scientific (Amerika)
- ImmunoCruz™ Rabbit ABC Staining System Santa Cruz Biotechnology (Amerika)
- Rabbit Anti-TRAP/Tartrate Resistant Acid Phosphatase Polyclonal Antibody Abcam (Amerika)
- Anti-Alkaline Phosphatase Antibody 100µl Abcam (Amerika)
- Aseton %99.5 Merck (Almanya)

3.2. DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ

Çalışma kapsamında DEKAM bünyesinden temin edilen ağırlıkları 180-250 gr arasında değişen, daha önce herhangi bir çalışmada kullanılmamış, 4-7 aylık Sprague-Dawley cinsi 16 adet erişkin dişi rat kullanıldı.

Çalışmada kullanılacak dişi ratlar 20 gün süreyle, erkek ratlardan ayrı olarak bekletildi. Bu sürenin sonunda gebe olmadıkları kesin olarak belirlenen dişi ratlar gebe kalmaları için erkek ratlarla çiftleştirildi. Çiftleşmenin gerçekleşmesi için iki dişiye bir erkek damızlık düşecek şekilde akşam saat 17:00'da ratlar özel kafeslere alındı. Ertesi sabah saat 08:00'a kadar erkek ve dişi ratlar aynı kafeste tutuldu (Resim 3.1/A). Bu sürenin bitiminde dişi ratlardan alınan vaginal smear örnekleri mikroskop altında incelendi (Resim 3.1/B) ve vajinal smearda spermium görülen dişiler 0.5 günlük gebe olarak kabul edildi.

Ratlar, DEKAM'da 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamın sağlandığı ve otomatik olarak klimatize edilen odalarda 25±2C°'lik odada tutularak, her biri ayrı kafeslerde olmak üzere, rutin olarak standart sıçan besi yemi (ad-libitum %21 ham protein içeren granüle pelip) ile beslendiler. Sıçanların su gereksinimleri günlük olarak değiştirilen ve kontrol edilen musluk suyundan sağlandı.



Resim 3.1. Çiftleştirilen ratların ve vaginal smear örneğinin fotoğrafları

A. Çiftleşme için iki dişi ve bir erkek ratın aynı kafese bırakılması

B. Çiftleşme sonucu vaginal smear'da spermiumların tespit edilmesi

3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Vaginal smearda spermium görülen ve 0.5 günlük gebe olarak kabul edilen ratlar rastgele 4 (n=4) gruba dağıtıldı. Her gruptaki gebe rat sayısı; gruplarda en az 15 fetusta ölçüm yapılmak istenmesi, diseksiyon, ikili iskelet ve immünohistokimyasal boyama aşamalarında oluşabilecek kayıplar gibi nedenler göz önüne alınarak belirlendi. Yeterli fetus sayısına ulaşıldıktan sonra sakrifiye edilmeyen ratlar DEKAM'a teslim edildi.

Kontrol Grubu (Mısır Yağı Verilen Grup): Bu gruptaki ratlara gebeliklerinin 20. gününe kadar 1 ml/kg/gün mısır yağı intraperioteneal (i.p.) olarak günde bir kez ve saat 16:00'da yapıldı. Gebe ratlar hamileliklerinin 20. gününde sakrifiye edildi. Bu gruptaki ratların fetusları rastgele olarak ikili iskelet ve immünohistokimyasal boyama için dağıtıldı. İkili iskelet boyama için fetusların içlerinin boşaltılması ve boyanması aşamasında oluşan deformasyonlara bağlı olarak çalışmadan çıkarılma işlemi gerçekleştirildi. Toplam 3 fetus bu aşamada elendi.

BFA Verilen Gruplar

BFA verilecek gruplar için doz belirleme işleminde literatür taraması gerçekleştirildi. BFA'nın; TDI, NOAEL ve LOAEL güncel dozları belirlendi. Buna göre TDI dozunun

0.05 mg/kg bw/day, NOAEL dozunun 5 mg/kg bw/day ve LOAEL dozunun ise 120 mg/kg bw/day olduğu EFSA verileri aracılığıyla elde edildi (49). Bu verilerle birlikte yapılan literatür taraması sonucunda BFA'nın 0.5, 5 ve 50 mg/kg/gün dozlarda mısır yağı içerisinde çözülerek i.p. olarak verilmesi kararlaştırıldı (118-121). 10 ml mısır yağı içinde 50 mg BFA çözülerek stok çözelti hazırlandı. Stok çözelti +4^{0}C'de muhafaza edildi.

0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup:

Bu grupta bulunan ratlara gebeliklerinin 0.5. gününden 20. gününe kadar her gün saat 16:30'da 0.5 mg/kg/gün BFA uygulaması i.p. olarak yapıldı (Resim 3.2). Gerekli BFA stok çözeltiden temin edildi. Gebe ratlar 20. günde sakrifiye edilerek fetusların sezeryan ile doğum işlemi gerçekleştirildi. Bu gruptaki ratların fetusları rastgele olarak ikili iskelet ve immünohistokimyasal boyama için dağıtıldı. İkili iskelet boyama için fetusların içlerinin boşaltılması ve boyanması aşamasında oluşan deformasyonlara bağlı olarak fetusların çalışmadan çıkarılma işlemi gerçekleştirildi. Toplam 3 fetus bu aşamada elendi. Ayrıca immünohistokimyasal boyama için ayrılan fetuslardan bir tanesinde oluşan deformasyon sonucu çalışmadan çıkarıldı.

Resim 3.2. Ratlara intraperioteneal enjeksiyon uygulaması

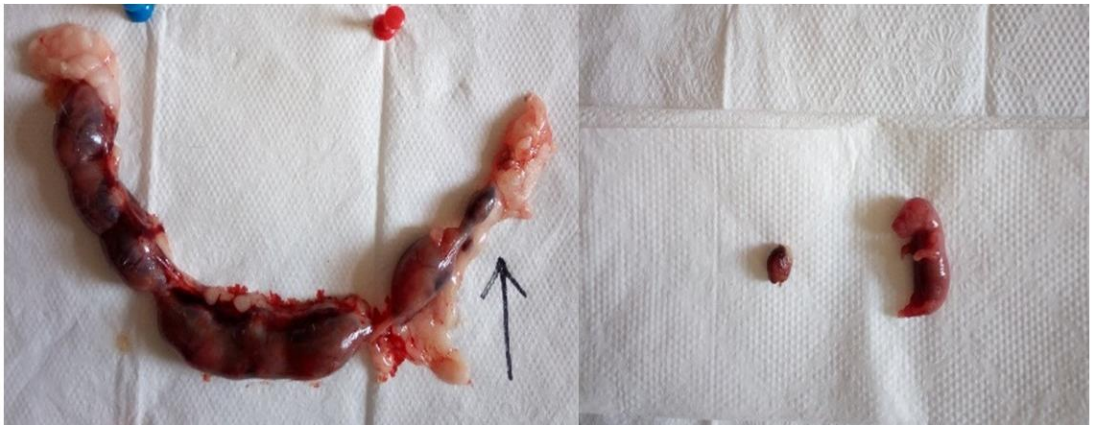
5 mg/kg/gün BFA verilen grup:

Bu grupta bulunan ratlara gebeliklerinin 0.5. gününden 20. gününe kadar her gün saat 16:30'da 5 mg/kg/gün BFA uygulaması i.p. olarak yapıldı (Resim 3.2). Gerekli BFA

stok çözeltiden temin edildi. Gebe ratlar 20. günde sakrifiye edilerek fetusların sezeryan ile doğum işlemi gerçekleştirildi. Bu gruptaki ratların fetusları rastgele olarak ikili iskelet ve immünohistokimyasal boyama için dağıtıldı. İkili iskelet boyama için fetusların içlerinin boşaltılması, boyanması ve ekstremitelerinin ayrılması aşamasında oluşan deformasyonlara bağlı olarak fetusların çalışmadan çıkarılma işlemi gerçekleştirildi. Toplam 4 fetus bu aşamada elendi. Ayrıca immünohistokimyasal boyama için ayrılan fetuslardan 2 tanesi de oluşan deformasyon sonucu çalışmadan çıkarıldı.

50 mg/kg/gün BFA verilen grup:

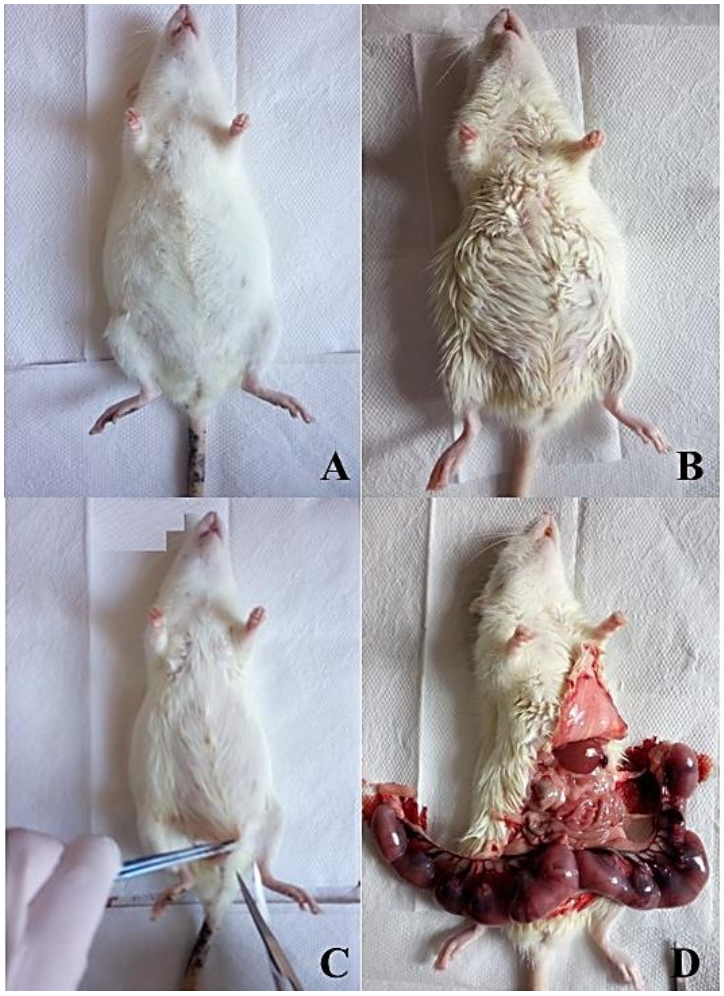
Bu grupta bulunan ratlara gebeliklerinin 0.5. gününden 20. gününe kadar her gün saat 16:30'da 50 mg/kg/gün BFA uygulaması i.p. olarak yapıldı (Resim 3.2). Gerekli BFA stok çözeltiden temin edildi. Gebe ratlar 20. günde sakrifiye edilerek fetusların sezeryan ile doğum işlemi gerçekleştirildi. Bu gruptaki ratların fetusları rastgele olarak ikili iskelet ve immünohistokimyasal boyama için dağıtıldı. Gebe ratlardan birinin sezeryan işleminden sonra fetuslardan bir tanesinin gelişimini tamamlamadığı tespit edildi (Resim 3.3). Bu fetus çalışmadan çıkarıldı. Bununla birlikte ikili iskelet boyama için fetusların içlerinin boşaltılması, boyanması, şeffaflandırılması ve ekstremitelerinin ayrılması aşamasında oluşan deformasyonlara bağlı olarak 5 fetus bu aşamada elendi. Ayrıca immünohistokimyasal boyama için ayrılan fetuslardan 1 tanesi oluşan deformasyon sonucu çalışmadan çıkarıldı.



Resim 3.3. Gelişimini tamamlayamayan fetus

3.4. DENEKLERİN ELDE EDİLMESİ

Ratlara gebeliklerinin 20. gününe kadar yer almış oldukları deney grubundaki ilgili madde ve doz verilme işlemi gerçekleştirildikten sonra sezeryan ile fetusları alındı. Sezeryan işlemi için ratlar, ketamin (75 mg/kg) + ksilazin (10 mg/kg) uygulaması ile anestezi altına alındı. Anestezi altındaki ratların abdominal bölgesi %70'lik alkol solüsyonu ile temizlendikten sonra transvers bir kesi ile karın ön duvarları kaldırıldı (Resim 3.4). Uterus, içerisindeki fetuslar ile birlikte diseke edildi (Resim 3.5).



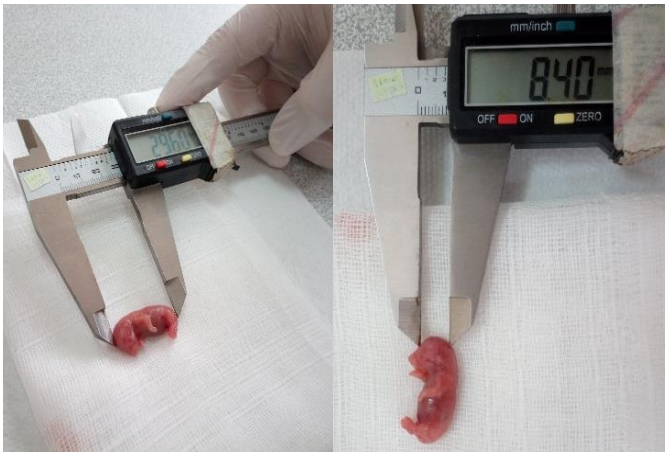
Resim 3.4. Gebe ratlara sezeryan uygulanması

A. Anestezi altındaki ratın sezeryana hazırlanması
B. Karın ön duvarının temizlenmesi
C. Karın ön duvarına kesi atılması
D. Uterusun ve fetusların çıkartılması

Resim 3.5. Fetusların uterustan diseke edilmesi

A. Fetusların Uterus ile birlikte diseke edilmesi **B.** Fetusun uterustan plasenta ile ayrılması
C. Uterustan tam diseke olmuş fetus ve plasenta

Plasentalarından ayrılan fetusların ağırlıkları tartılıp, baş-kıç ve occipito-frontal uzunlukları dijital kumpas ile ölçülerek kayıt altına alındı (Resim 3.6). Fetuslar makroskopik olarak incelenip yüksek doz eter inhalasyonu ile öldürüldü. Elde edilen fetuslar daha sonra ikili iskelet ve immünohistokimyasal boyama analizi için rastgele olarak ayrıldı.



Resim 3.6. Fetusların baş-kıç ve occipito-frontal uzunluklarının ölçülmesi

3.5. İKİLİ İSKELET BOYAMA YÖNTEMİ

Fetusların iskelet sistemi, ikili iskelet boyama yöntemiyle boyandı. Boyama işlemi protokolüne geçmeden önce tüm fetuslar, %70'lik etil alkol içinde 4-7 gün bekletilerek dokularındaki sıvının çekilmesi sağlandı. Bu işlemi takiben fetuslar saf asetonda 1-3 gün süreyle bekletilerek yağlarından arındırıldı. Sonrasında tüm fetusların derileri soyulup, iç organları ve gözleri çıkarıldı (Resim 3.7). Bütün bu işlemler boyunca zarar gören fetuslar çalışmadan çıkarıldı. Fetusların iskelet sistemi aşağıdaki tabloda belirtilen ikili iskelet boyama protokolü çerçevesinde gerçekleştirildi (Tablo 3-1).

Resim 3.7. Derileri soyulup gözleri ve iç organları çıkarılan fetuslar

Tablo 3-1. İkili İskelet Sistemi Boyama Protokolü

Teknik Aşamalar	Solüsyonlar	Süre
Tespit	%70'lik etil alkol	4-7 gün
Yağdan Arındırma	Saf aseton	1-3 gün
Boyama	**Boyanın hazırlanışı** **1. solüsyon:** 300 mg Alcian Blue + 100 ml %70'lik etil alkol **2. solüsyon:** 100 mg Alizarin Red S + 100 ml %95'lik etil alkol **3. solüsyon:** 1. solüsyon + 2. Solüsyon + 100 ml glacial asetik asit **4. solüsyon:** Hazırlanan ilk üç solüsyonun içerisine 1700 ml %70'lik etil alkol ilave edilerek hazırlanır.	7 gün süreyle 38-40 C° de etüvde bekletildi
Şeffaflaştırma	**1)** %1'lik Potasyum Hidroksit (KOH) **2)** %1'lik KOH (80 ml)+%20'lik gliserin (20 ml) **3)** %1'lik KOH (50 ml)+%50'lik gliserin (50 ml) **4)** %1'lik KOH (20 ml)+%80'lik gliserin (80 ml)	1-3 gün 5-7 gün 5-7 gün 5-7 gün
Saklama	%100'lük gliserin	

Boya Solüsyonunun Hazırlanması: Boya solüsyonu ayrı ayrı hazırlanan solüsyonların belirli yöntemlerle birleştirilmesi ile elde edildi.

Bu solüsyonların hazırlanması:

1. solüsyon: 100 ml %70'lik etil alkol içerisinde 300 mg Alcian Blue'nun sürekli karıştırılarak eritilmesi ile elde edildi.

2. solüsyon: 100 ml %95'lik etil alkol içerisinde 100 mg Alizarin Red–S sürekli karıştırılarak eritilmesi ile elde edildi.

3. solüsyon: Daha önce hazırlanmış olan birinci solüsyonun içine ikinci solüsyon azar azar eklenerek elde edildi. Bu iki solüsyonun tamamen karışması beklendi. Karışma işleminin ardından ortaya çıkan solüsyona 100 ml Glacial Asetik Asit eklendi.

4. solüsyon: 3. solüsyonun üzerine 1700 ml %70'lik etil alkol ilave edilerek hazırlandı.

Boyama Süreci: Derileri soyulup, iç organları ve gözleri çıkarılarak boyama için hazır hale getirilen fetuslar, cam kaplar içerisine boşaltılan boya solüsyonunun içerisine alındı. Solüsyonun bulunduğu cam kapların hava ile temasının kesilmesi için streç film

ile ağızları sarıldı. Daha sonra cam kaplar sıcaklığı 38-40^0 C'ye ayarlanmış etüve alındı. Etüvde 7 gün süreyle bekletilerek dokuların ve kemik yapıların boyanması sağlandı. 7. günün sonunda fetuslar, akan musluk suyu altında 2 saat süre ile yıkanarak su ile tepkimeye girmesi sağlandı. Sonrasında şeffaflaştırma aşamasına geçildi.

Şeffaflaştırma Aşaması: Bu basamak toplam 4 aşamadan oluşmaktadır.

1. aşama: Boyanmış olan fetuslar 1 gün süreyle %1'lik KOH içerisinde bekletildi.

2. aşama: 5 gün süreyle 80 ml %1'lik KOH ve 20 ml %20'lik gliserinden oluşan karışım içinde bekletildi.

3. aşama: 5 gün süreyle 50 ml %1'lik KOH ve 50 ml %50'lik gliserinden oluşan karışımda bekletildi.

4. aşama: 20cc %1'lik KOH ve 80 ml %80'lik gliserinden oluşan solüsyon içinde 5-7 gün süreyle bekletildi.

Şeffaflandırma işleminin tamamlanmasından sonra fetuslar %100 gliserin içerisine alınarak saklandı.

3.6. HİSTOLOJİK DOKU TAKİP YÖNTEMİ

İmmünohistokimyasal boyama için ayrılan fetusların, arka ekstremitelerinden çıkarılan kemik dokuları tespit işlemi için %10'luk formaldehit içine alındı. Tespit solüsyonunda 72 saat bekleyen dokular akan musluk suyunda yıkandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra ksilol ile şeffaflandırılarak parafine gömüldü ve bloklama yapıldı (Tablo 3-2).

Tablo 3-2. Doku hazırlama metodu

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	%10 Formaldehit	72 saat	**8**	Absolü Alkol	1 saat
2	Musluk suyu	1 gece	**9**	Absolü Alkol	1 saat
3	%50 Alkol	1 saat	**10**	Ksilen	20 dakika
4	%70 Alkol	1 saat	**11**	Ksilen	20 dakika
5	%80 Alkol	1 saat	**12**	Ksilen	20 dakika
6	%96 Alkol	1 saat	**13**	Sıvı parafin (60°C)	1 gece
7	Absolü Alkol	1 saat	**14**	Bloklama	

Çalışmada kullanılan kemik dokularından alınan 5 µm'luk kesitler polilizin kaplı lamlara alındı. Hazırlanan lamların, standart histolojik doku takip yöntemi kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı. Daha sonra lamlar dereceli alkol (%100, %96, %80, %70, %50) serilerinden geçirilip suda yıkandı. Genel histolojik yapının belirlenmesi amacıyla kesitler Hematoksilen-Eosin (H&E) ile boyanarak önce artan alkol serilerinden daha sonra ksilolden geçirildi ve entellan kullanılarak lamel yardımıyla kapatıldı. Uygulanan H&E boyama teknikleri ayrıntılı şekilde aşağıda verilmiştir (Tablo 3-3).

Tablo 3-3. H&E Boyama Yöntemi

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Ksilen-I	15 dk	**12**	Akarsu	10 dk
2	Ksilen-II	15 dk	**13**	%50 Alkol	10 dk
3	Absolü Alkol	10 dk	**14**	%70 Alkol	10 dk
4	%96 Alkol	10 dk	**15**	%80 Alkol	10 dk
5	%80 Alkol	10 dk	**16**	%96 Alkol	10 dk
6	%70 Alkol	10 dk	**17**	Absolü Alkol	10 dk
7	%50 Alkol	10 dk	**18**	Absolü Alkol	10 dk
8	Akarsu	10 dk	**19**	Ksilen-I	15 dk
9	Hematoksilen	7 dk	**20**	Ksilen-II	15 dk
10	Akarsu	5 dk	**21**	Kapatma	
11	Eozin	5 dk			

3.7. İMMÜNOHİSTOKİMYA BOYAMA (IHK) YÖNTEMİ

İmmünohistokimyasal (IHK) yöntem, özgül antijenik saptama özelliğine sahip bir belirleyicinin, hücrelerin yüzeyine bağlanması temeline dayanmaktadır. Bu çalışmada yeni doğan kemik dokusunda TRAP ve Alkalin Fosfataz (AP)'ın ekspresyonu immünohistokimyasal olarak gösterildi. TRAP (Rabbit Anti-TRAP/Tartrate Resistant Acid Phosphatase Polyclonal Antibody Abcam (Amerika)) ve AP (Anti-Alkaline

Phosphatase Antibody 100µl Abcam (Amerika)) primer antikorları kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyamada streptavidin-biotin kiti kullanılarak avidin-biotin peroksidaz yöntemi uygulandı.

İmmünohistokimyasal boyama için %10'luk formalin fiksasyonu sonrası rutin takip ile hazırlanmış parafine gömülü bloklardan 5 mikronluk kesitler, dokuların dökülmemesi için poli-lizinli lamlara alındı. Kesit 60 derecelik etüvde 1 saat bekletildikten sonra 15 dakika ksilolde deparafinize edilip ardından derecesi giderek azalan %99, %96 ve %70'lik alkol serilerinin her birinde 5'er dakika tutularak dehidrate edildi ve 10 dakika distile suda bekletildi. Daha sonra antijen geri kazanımı için %5'lik sitrat tamponu ile mikrodalga fırında 600W'de 5 dakika kaynatılan kesitler Phosphate Buffered Saline (PBS) ile tekrar yıkanarak endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 10 dakika %3 hidrojen peroksit (H_2O_2) ile muamele edildi.

Bundan sonraki aşamalar için boyama kiti (Thermo Scientific) kullanıldı. Kalan işlemler, dokuların kurumasını nemli ortam oluşturarak önleyen chamber içerisinde gerçekleştirildi. Kullanılan her bir solüsyon dokunun üzerini tamamen kapatacak şekilde uygulandı. Spesifik olmayan boyamaları önlemek ve zemin boyamasını aza indirmek için endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ile 10 dakika bloke edildi. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 10 dakika Blok serum uygulandı. Preparatlardaki dokuların üzerine dilüsyonu 1/100 olacak şekilde hazırlanan TRAP ve AP antikorları damlatılarak buzdolabında bir gece inkübe edildi. Negatif kontrol olarak, primer antikor yerine PBS kullanıldı.

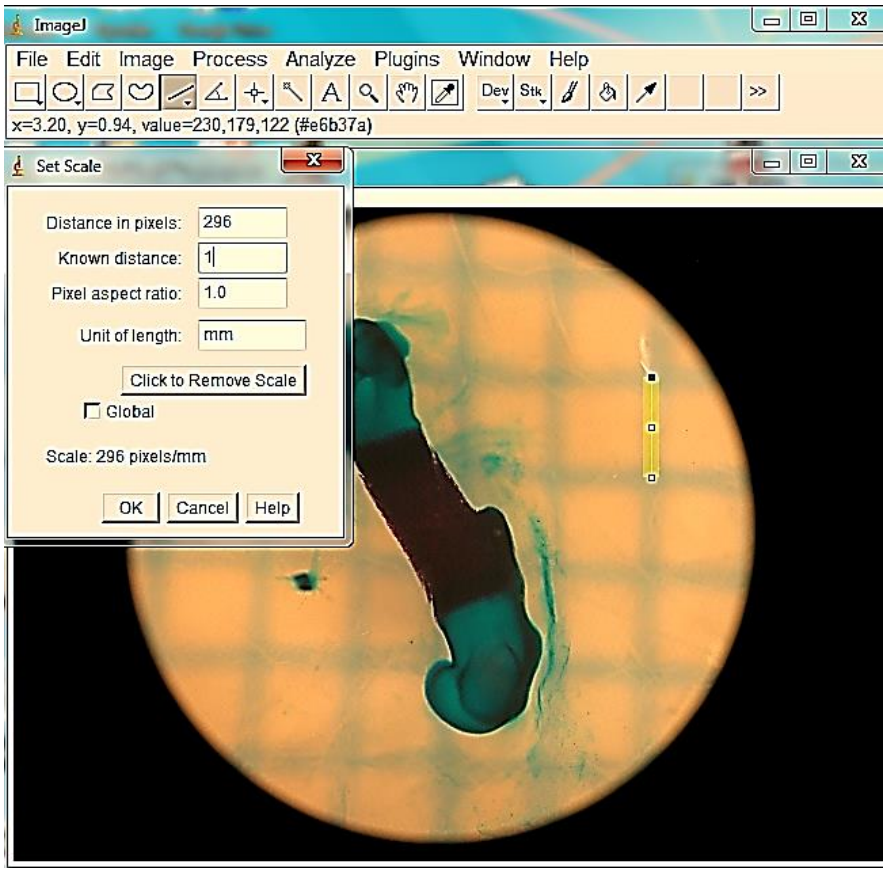
Yıkama işleminden sonra kesitler biotinli-sekonder antikor ile 15 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama işlemi tekrarlandı. Daha sonra streptavidin peroksidaz ile 15 dakika muamele edilen kesitler yıkanarak immunreaktiviteleri görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB) (Thermo Scientific) özelliği gösteren substrat ile 5 dakika muamele edildikten sonra 5 dakika deiyoinze H_2O ile yıkandı. Ardından 5 dakika distile su ile yıkandıktan sonra artan alkol serilerinde 5'er dakika bekletilerek ksilolde dokuların parlaması için 15 dakika tutulup ardından da entellan ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Hazırlanan kesitler Olympus BX51 mikroskobunda incelendi.

3.8. İKİLİ İSKELET BOYAMAYA AİT MORFOLOJİK ÖLÇÜMLER

İkili iskelet boyama yöntemi ile kemik ve kıkırdak yapıları belirlenen fetusların morfometrik ölçümleri için ön ve arka ekstremite kemiklerinin fotoğrafları çekildi. Nikon E5700 marka fotoğraf makinasının monte edildiği stereomikroskop aracılığıyla milimetrik kâğıt üzerine yerleştirilen kemiklerin görüntüleri kaydedildi.

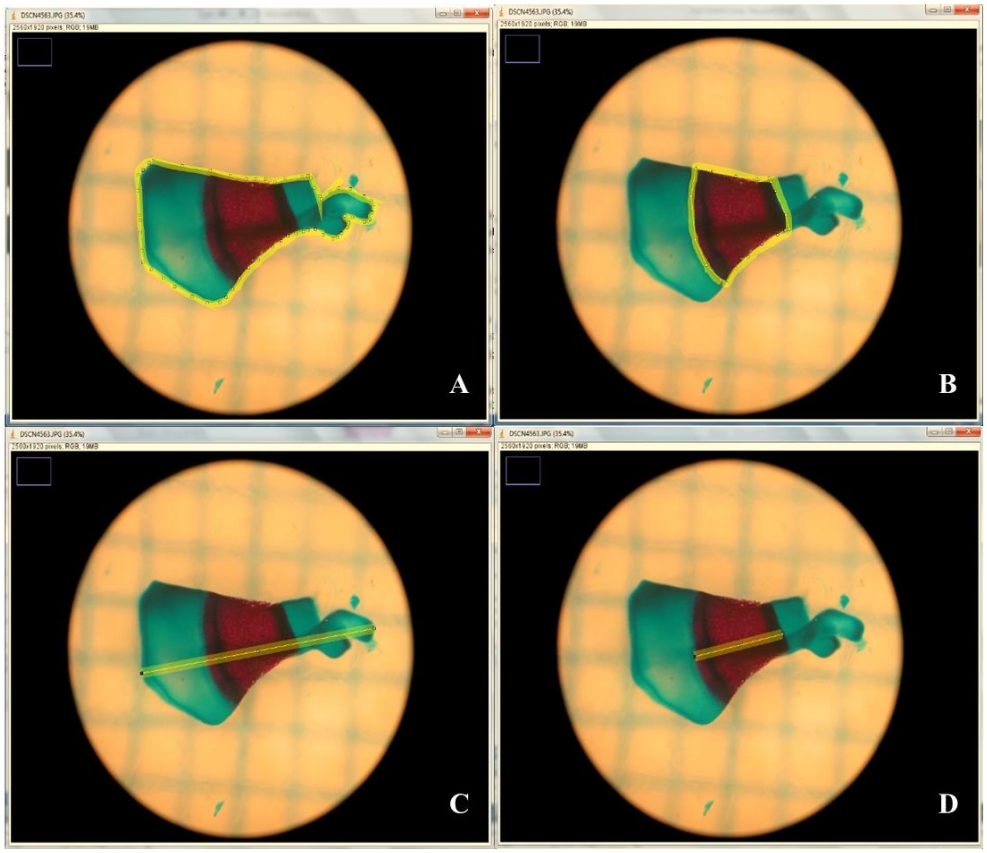
Elde edilen görüntüler bilgisayar ortamına aktarılarak, ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/download.html) yazılım programı aracılığıyla kemik ve kıkırdak alanlar üzerinde ölçümler gerçekleştirildi.

Ölçüm işleminin doğru sonuç vermesi amacıyla orijinal görüntü ile fotoğraf görüntüsü arasında kalibrasyon ayarı yapıldı. Bu kalibrasyon ayarının yapılması için sırasıyla şu yol izlendi. Öncelikle ölçüm yapılacak fotoğraf ImageJ programı ile açıldı. Fotoğraf üzerinde milimetrik kâğıtta orjinali 1 mm olan mesafe Straight Line aracılığıyla ölçüldü. Daha sonra ImageJ programının Analyze - Set Scala - Known distance menüsü kullanılarak uygun kalibrasyon yapıldı (Resim 3.8).



Resim 3.8. ImageJ programının kalibrasyon ayarı

Yapılan kalibrasyon sonucu ImageJ programının Wand Tool özelliği ile ölçüm yapılacak alan ve mesafe manuel olarak belirlendi ve sonuçlar mm olarak elde edildi. Kemikleşme yüzey alanının tüm kemik yüzey alanına oranını bulmak için; (Kemikleşme Alanı / Tüm Kemik Alanı) x 100 formülü kullanıldı (Resim 3.9).



Resim 3.9. ImageJ programında yapılan kemik ölçümleri

A. Total Yüzey Alanı Ölçümü **B.** Kemikleşme Gösteren Bölgenin Yüze Alan Ölçümü

C. Kemik Total Boy Uzunluğu Ölçümü **D.** Kemikleşme Sergileyen Bölgenin Ölçümü

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İkili iskelet boyama yöntemi uygulanan kemiklerin, Image J programı ile tüm kemik uzunluğu, kemikleşme uzunluğu, tüm kemik yüzey alanı ve kemikleşme yüzey alanı ölçüldü. IHK yöntemi uygulanan preparatlardan alınan görüntülerde TRAP ve AP'nin ekspresyon ölçümleri yapıldı. Her gruba ait preparatlardan rastgele 10 alana bakıldı ve ekspresyon yoğunlukları ölçüldü. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi IBM Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Statistics 23.0 programı ile yapıldı.

Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini belirlemek için Kolmogorov-Smirnov testi yapıldı. Normal dağılımın olduğu belirlendikten sonra One-Way ANOVA ve gruplar arası anlamlı farklılıkları belirlemek için %95 güven aralığında ($p<0.05$) Tukey HSD testi uygulandı. Analiz sonucuna göre p değeri $p<0.05$ olan gruplar arasında anlamlı fark olduğu kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İKİLİ İSKELET BOYAMA YÖNTEMİNE AİT BULGULAR

Tüm gruplarda boyama işlemine başlamadan önce fetusların boy uzunlukları ve ağırlıkları tespit edildi. Çalışma kapsamına dâhil edilen her gruptaki 22 fetusun 15'i ikili iskelet boyama için, 7'si ise immünohistokimyasal boyama için kullanıldı. Fetusların ağırlık, boy ve frontal-occipital uzunluk ölçümleri ile ilgili veriler Tablo 4-1 ve Tablo 4-2 gösterildi. Ağırlık ölçümleri için kontrol grubu ile tüm gruplar arasında çıkan sayısal farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$). Boy ve frontal-occipital uzunluk ölçümleri gruplar arasında karşılaştırıldığında ise kontrol grubu ile 0.5 mg/kg/gün BFA grubu arasındaki sayısal farklılık hariç tüm gruplar arasında belirlenen sayısal farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Tablo 4-1. Fetus gruplarına ait ağırlık ortalamaları

Grup	N	Ağırlık (gr)			
		Ortalama±SS	Min	Max	P*
Kontrol	22	2.47±0.15[b,c,d]	2.21	2.83	0.000
0.5 mg/kg BFA	22	2.31±0.14[a,c,d]	2.10	2.62	
5 mg/kg BFA	22	2.10±0.9[a,b]	1.90	2.28	
50 mg/kg BFA	22	2.08±0.12[a,b]	1.83	2.31	

* One-Way ANOVA; p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c: 5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Tablo 4-2. Boy ve frontal-occipital uzunluk verileri

Grup	N	Boy (mm)				Frontal-Occipital Uzunluk (mm)			
		Ortalama±SS	Min	Max	P*	Ortalama±SS	Min	Max	P*
Kontrol	22	29.34±1.48[c,d]	26.50	31.94	0.000	9.21±0.72[c,d]	7.52	10.73	0.000
0.5 mg/kg BFA	22	28.57±1.41[c,d]	25.74	30.96		8.66±0.31[c,d]	7.91	9.35	
5 mg/kg BFA	22	27.15±1.05[a,b]	24.37	28.60		8.72±0.65[a,b]	7.67	10.02	
50 mg/kg BFA	22	26.95±1.47[a,b]	24.45	29.31		8.61±055[a,b]	7.05	9.44	

* One-Way ANOVA; p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c: 5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Çalışmamızda tüm gruplarda fetusların ön ve arka ekstremite kemikleri incelendi. Ön ekstremitede clavicula, scapula, humerus, radius ve ulna üzerinde, arka ekstremite de ise femur, tibia ve fibula üzerinde ölçümler yapıldı. Bu ölçümler; kemik total uzunluğu, kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu, kemik total alanı ve kemikleşme sergileyen bölgenin alanı şeklindedir. Alan ölçüm verileri kullanılarak kemiklerin kemikleşme

yüzdesi hesaplandı. Her fetusa ait sağ ve sol iki taraflı inceleme yapıldığı için toplamda her kemikten 30 adet incelemeye dâhil edildi.

Boyama sürecinden sonra fetusların stereomikroskop altında fotoğrafları alındı. İnceleyeceğimiz kemiklerin morfometrik ölçümlerinde fotoğraf çekimi esnasında milimetrik kâğıt kılavuz olarak kullanıldı. Morfometrik ölçümler sonucunda elde edilen veriler gruplar arasında karşılaştırıldı.

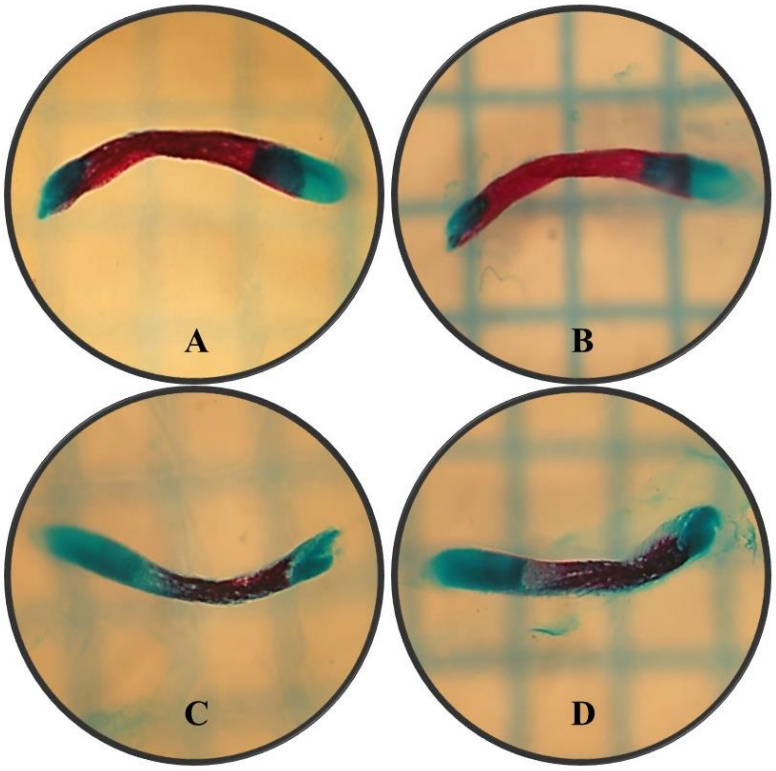
Kontrol Grubuna Ait Clavicula'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta 15 fetusa ait 30 adet clavicula incelendi. Claviculanın uzunluğu; minimum 2.76 ile maximum 3.40 mm arasında değiştiği (ortalama uzunluğu: 3.04±0.17 mm) tespit edildi. Clavicula'lar incelendiğinde kemikleşmenin özellikle corpus claviculae bölgesinde yoğunlaştığı ve bu alanların kırmızıya boyandığı görüldü (Resim 4.1). Geriye kalan clavicula kısımlarının kıkırdak yapıda olup mavi renk ile boyandığı görüldü. Claviculaların kemikleşme sergileyen bölgelerinin ortalama uzunluğunun 1.72±0.14 mm ve ortalama kemikleşme yüzdesinin ise 55.65±7.02 olduğu tespit edildi (Tablo 4-3).

0.5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Clavicula'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta 15 fetusa ait 30 adet clavicula incelendi. Bu gruptaki clavicula uzunluklarının ortalaması 2.9±0.15 mm olarak belirlendi. İncelemeye alınan tüm claviculalarda kemikleşme görüldü. Clavicula'larda kemikleşme yüzdesi ortalama olarak 52.82±6.10 olarak tespit edildi. Bu gruba ait veriler kontrol grubunun sonuçları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmezken, 5 mg/kg/gün BFA ve 50 mg/kg/gün BFA verilen gruplar ile bu grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya çıktı ($p<0.05$), (Tablo 4-3).

5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Clavicula'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta 15 fetusa ait 30 adet clavicula incelendi. Bu gruptaki fetusların clavicula uzunlukları ortalama 2.71±0.13 mm olarak belirlendi. Kemik uzunlukları 2.40 ile 2.98 mm arasında değişmekteydi. Makroskopik olarak incelendiğinde kontrol grubuna göre bu gruptaki kemiklerin kemikleşme sergileyen alanları daha küçüktü. Ortalama kemikleşme yüzdesi 42.58±10.7 olarak tespit edildi. Bu gruptaki clavicula'lara ait sayısal veriler ile kontrol ve 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi ($p<0.05$), (Tablo 4-3).

50 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Clavicula'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta stereomikroskop altında incelen görüntülerde total kemik uzunluğu ortalama 2.67±0.17 mm olarak hesaplandı (Resim 4.1). Tüm kemiklerde kemikleşme görüldü,

fakat kemikleşme corpus claviculae boyunca dar bir alandaydı. Kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ortalama 1.24±0.20 mm olarak, kemikleşme yüzdesi ise 37.46±9.84 olarak hesaplandı (Tablo 4-3). Bu grubu ait tüm ölçümlerin hem kontrol grubundan hem de 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$).



Resim 4.1. Clavicula'ya ait görüntüler

A. Kontrol grubu **B.** 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup
C. 5 mg/kg/gün BFA verilen grup **D.** 50 mg/kg/gün BFA verilen grup

Clavicula kemik total boyu, kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ve kemikleşme yüzde oranının uygulanan BFA dozu arttıkça kontrol grubundan 50 mg/kg/gün BFA verilen gruba doğru azaldığı tespit edildi. Vücuttaki ilk kemikleşmeye başlayan kemik olan clavicula'da, kıkırdak yıkımının geç meydana gelmesi BFA'nın fetus iskelet sisteminde oluşturduğu zararı göstermektedir.

Tablo 4-3. Clavicula'ya ait istatistiksel veriler

Grup	N	Total Kemik Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Sergileyen Bölge Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Yüzde Oranı (%)			
		Ortalama±SS	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***
Kontrol	30	3.04±0.17[c,d]	2.76	3.40	0.000	1.72±0.14[c,d]	1.44	2.14	0.000	55.65±7.02[c,d]	45.57	71.40	0.000
0.5 mg/kg BFA	30	2.99±0.15[c,d]	2.53	3.19		1.71±0.18[c,d]	1.06	2.11		52.82±6.10[c,d]	41.63	66.92	
5 mg/kg BFA	30	2.71±0.13[a,b]	2.40	2.98		1.30±0.17[a,b]	0.88	1.60		42.58±10.7[a,b]	24.70	67.88	
50 mg/kg BFA	30	2.67±0.17[a,b]	2.13	2.93		1.24±0.20[a,b]	0.77	1.57		37.46±9.84[a,b]	21.06	54.24	

*One-Way ANOVA; $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c: 5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

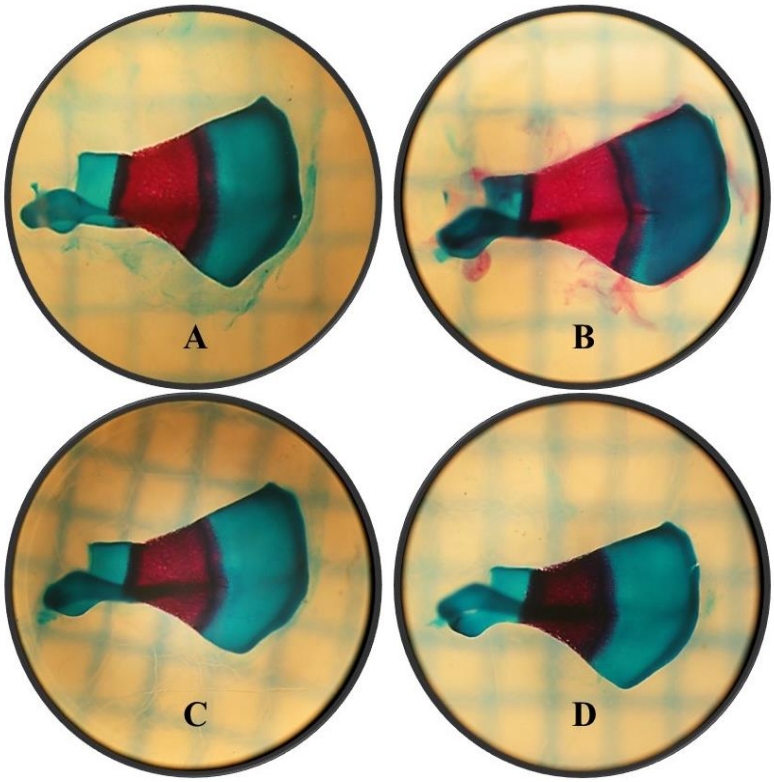
Kontrol Grubuna Ait Scapula'ların Morfolojik Bulguları: Kontrol grubunda incelenen 30 adet scapula'nın total kemik uzunluğu ortalaması 4.78±0.22 mm olarak belirlendi. Scapula'ların uzunlukları 4.41 ile 5.21 mm arasında değişmekteydi. Scapulaların kemikleşme yüzde oranı 36.58±2.46 olarak tespit edildi. Kontrol grubuna ait scapulalarda kemikleşme genel olarak kemiğin orta kısmında yoğunlaşmaktaydı (Resim 4.2). Kemiğin ön yüzünde fossa subscapularis'in orta kısmı, arka yüzünde ise fossa infraspinatus ve supraspinatus arasında kalan bölge yoğun olarak kırmızı renge boyanmıştı. Özellikle cavitas glenoidalis, acromion, processus coracoideus mavi renk ile boyanmış olarak gözlendi. Kemikleşme gösteren bölgeye ait uzunluk ortalaması 1.88±0.11 mm olarak ölçüldü. Bu gruptaki scapulaların total kemik uzunluğu, kemikleşme sergileyen bölge uzunluğu ve kemikleşme yüzdeleri ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlendi ($p<0.05$), (Tablo 4-4).

0.5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Scapula'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta incelenen scapula'ların total kemik uzunluğu 3.84 ile 4.86 mm arasında değişmekte olup, ortalaması 4.40±0.23 mm olarak belirlendi (Resim 4.2). Tüm scapula'larda kemikleşme görüldü. Kemikleşme alanı scapulanın gövdesi ve spina scapulae kısımlarında belirgin olarak gözlemlendi. Kemikleşme yüzde oranı ortalama 30.00±2.65 olarak tespit edildi. Bu gruptaki total kemik uzunluk ölçümleri ile diğer tüm grupların verileri arasındaki sayısal farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı iken, kemikleşme yüzde oranı için ise bu grup ile kontrol ve 50 mg/kg/gün BFA verilen gruplar arasındaki sayısal fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$), (Tablo 4-4).

5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Scapula'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta incelenen 30 adet scapulanın total kemik uzunluğu ortalaması 4.26±0.19 mm olarak hesaplandı. Bu gruba ait total kemik uzunluğunun kontrol ve 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0.05$). Fakat kemikleşme yüzde oranının (29.79±2.63) 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruba yakın, istatistiksel olarak anlamlı derecede kontrol grubundan düşük, 50 mg/kg/gün BFA verilen gruptan ise yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-4).

50 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Scapula'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta incelenen 30 adet scapulanın total kemik uzunluğunda belirgin olarak azalma olduğu makroskopik inceleme ve ölçümlerde gözlemlendi (4.25±0.15 mm). Scapulaların total kemik uzunluğu hem kontrol grubundan hem de 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruptan istatistiksel açıdan anlamlı olarak kısaydı ($p<0.05$). Genel olarak

kemikleşmenin spina scapulae'nın gövdeye tutunduğu yer ve bu bölgenin medial-lateral hattı boyunca olduğu tespit edildi. Tüm scapula'larda kemikleşme görüldü, fakat bazı kemiklerde kemikleşen bölge kahverengiye yakın bir koyuluğa sahipti. Kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ortalama 1.08±0.12 mm olarak hesaplandı. Kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ve kemikleşme yüzdelerinin diğer tüm gruplar ile karşılaştırıldığında bu grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde küçük olduğu tespit edildi ($p<0.05$).



Resim 4.2. Scapula'ya ait görüntüler

A. Kontrol grubu **B.** 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup
C. 5 mg/kg/gün BFA verilen grup **D.** 50 mg/kg/gün BFA verilen grup

Scapula'ya ait total kemik uzunluğu, kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ve kemikleşme yüzde oranının verilen BFA dozu arttıkça doza bağlı olarak azaldığı tespit edildi. Öyle ki, 50 mg/kg/gün BFA verilen grupta kemikleşme alanının giderek azaldığı hatta bazı kemiklerde bu bölgenin renginin kahverengiye doğru koyu bir renk aldığı gözlendi. Bu durum kıkırdak yıkımının diğer gruplara göre 50 mg/kg/gün BFA verilen grupta daha geç olduğunu göstermektedir.

Tablo 4-4. Scapula'ya ait istatistiksel veriler

Grup	N	Total Kemik Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Sergileyen Bölge Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Yüzde Oranı (%)			
		Ortalama±SS	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***
Kontrol	30	4.78±0.22[b,c,d]	4.41	5.21	0.000	1.88±0.11[b,c,d]	1.65	2.05	0.000	36.58±2.46[b,c,d]	32.18	41.58	0.000
0.5 mg/kg BFA	30	4.40±0.23[a,c,d]	3.84	4.86		1.53±0.15[a,d]	1.08	1.86		30.00±2.65[a,d]	22.92	35.98	
5 mg/kg BFA	30	4.26±0.19[a,b]	3.81	4.64		1.49±0.10[a,d]	1.27	1.65		29.79±2.63[a,d]	25.22	36.09	
50 mg/kg BFA	30	4.25±0.15[a,b]	3.88	4.52		1.08±0.12[a,b,c]	0.86	1.33		23.05±2.82[a,b,c]	16.74	29.17	

*One-Way ANOVA; $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c: 5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

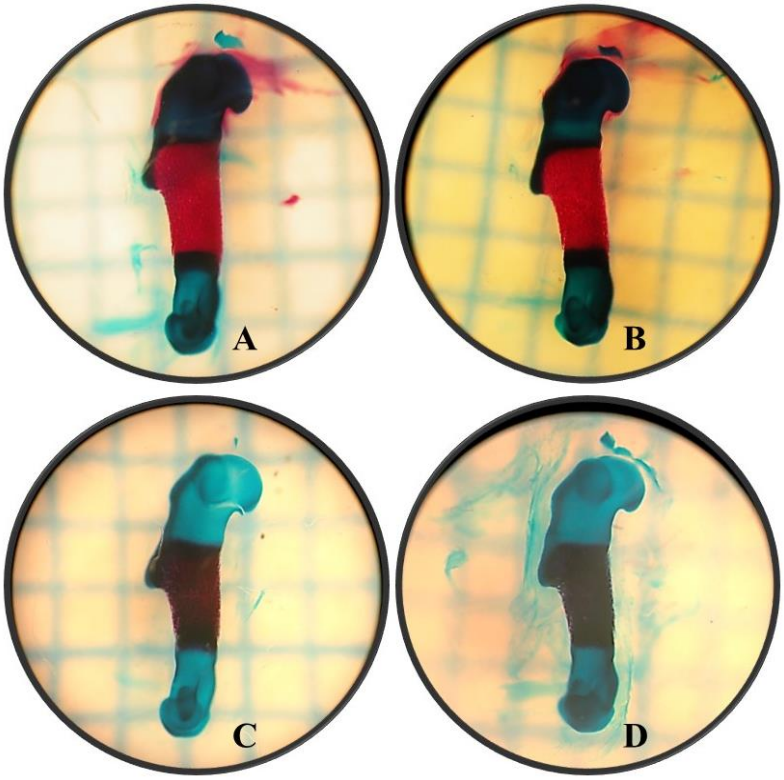
Kontrol Grubuna Ait Humerus'ların Morfolojik Bulguları: Çalışmamızda kontrol grubuna ait humerus'lar incelendiğinde total kemik uzunlukları 4.48 ile 5.07 mm arasında ve ortalama uzunluk ise 4.68±0.14 mm olarak bulundu (Tablo 4-5). Kemiğin corpus humeri kısmından başlayan kemikleşme merkezinin proksimal ve distal uçlara doğru yayıldığı ve proksimalde tuberositas deltoidea'ya kadar ilerlediği görüldü. Kemikleşmenin olduğu bölgelerde yoğun kırmızı rengin hâkim olduğu tespit edildi. Bununla birlikte proksimal ve distal uçta kıkırdak yapının hâkim olduğu ve bu bölgelerin mavi renk ile boyandığı belirlendi. Kıkırdak yıkımının başladığı kemikleşmenin olduğu bölgeye yakın kısımlarda ise mavi ve kırmızı karışımı bir renk gözlemlendi. Bu gruptaki humeruslarda kemikleşme gösteren bölgenin ortalama uzunluğu 1.83±0.12 mm olarak, kemikleşme oranı ise %41.05±3.49 olarak hesaplandı. (Resim 4.3). Kontrol grubundaki humerus'lara ait total kemik uzunluğu, kemikleşme görülen bölgenin uzunluğu ve kemikleşme yüzde oranının diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-5).

0.5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Humerus'ların Morfolojik Bulguları: Bu gruba ait 30 humerusun ortalama total kemik uzunluğu 4.53±0.17 mm olarak hesaplandı. Total kemik uzunluğunun kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük diğer deney gruplarından ise yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Kemikleşme gösteren bölgenin ortalama uzunluğu 1.61±0.13 mm olarak tespit edildi. Humerusa ait kemikleşme oranı %36.02±2.52 olarak belirlendi. Kemikleşme gösteren bölgeye ait uzunluk ve yüzde değerlerinin kontrol grubundan düşük, 50 mg/kg/gün BFA verilen gruptan ise yüksek olduğu ve bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Humerus'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta makroskopik olarak incelenen 30 adet humerusda herhangi bir anomali veya anormal kemik gelişimine rastlanmadı (Resim 4.3). Kemiklerin ortalama total kemik uzunluğu 4.39±0.11 mm olarak hesaplandı. Diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu ($p<0.05$), (Tablo 4-5). Kemikleşme alanları incelendiğinde tüm kemiklerde kemikleşmenin olduğu tespit edildi.

Kemikleşmenin genel olarak corpus humerinin ortasında olup kontrol grubuna göre sınırlı bir alanı kapladığı belirlendi. Kemikleşme sergileyen bölge uzunluğunun ise ortalama 1.57±0.10 mm olduğu ve 1.37 ile 1.75 mm arasında değiştiği tespit edildi. Ortalama kemikleşme oranı 33.52±2.10 olarak hesaplandı. Kemikleşme yüzde oranı için bu grup ile kontrol ve 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).

50 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Humerus'ların Morfolojik Bulguları: Makroskopik olarak bakıldığında incelenen 30 adet humerusun diğer gruplara oranla daha küçük olduğu, kemikleşme gösteren bölgenin daha kısa olduğu görüldü (Resim 4.3). Bununla birlikte kemikleşme alanının corpus humerinin orta kısmında dar bir alana yayıldığı tespit edildi. Kıkırdak yıkımının olduğu bölgelerde kemikleşmenin geç olmasına bağlı olarak mavi kırmızı karışımı koyu renkli bir kemikleşme alanı tespit edildi. Total kemik uzunluğu, kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ve kemikleşme yüzde oranının diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-5).



Resim 4.3. Humerus'a ait görüntüler

A. Kontrol grubu **B.** 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup

C. 5 mg/kg/gün BFA verilen grup **D.** 50 mg/kg/gün BFA verilen grup

Tablo 4-5. Humerus'a ait istatistiksel veriler

Grup	N	Total Kemik Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Sergileyen Bölge Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Yüzde Oranı (%)			
		Ortalama±SS	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***
Kontrol	30	4.68±0.14[b,c,d]	4.48	5.07	0.000	1.83±0.12[b,c,d]	1.58	2.05	0.000	41.05±3.49[b,c,d]	33.96	47.03	0.000
0.5 mg/kg BFA	30	4.53±0.17[a,c,d]	3.98	4.72		1.61±0.13[a,d]	1.20	1.78		36.02±2.52[a,c,d]	29.42	40.17	
5 mg/kg BFA	30	4.39±0.11[a,b,d]	4.19	4.60		1.57±0.10[a,d]	1.37	1.75		33.52±2.10[a,b]	29.49	37.77	
50 mg/kg BFA	30	4.27±0.13[a,b,c]	3.94	4.63		1.47±0.15[a,b,c]	1.06	1.71		31.80±4.02[a,b,c]	24.13	42.04	

*One-Way ANOVA; $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c: 5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Kontrol Grubuna Ait Ulna'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta 15 fetusa ait 30 ulna üzerinde inceleme yapıldı (Resim 4.4). Yapılan incelemeler sonucu ulnaların en büyüğü 4.57 mm, en küçüğü ise 4.09 mm olarak ölçüldü. Bu gruptaki ulnaların ortalama total kemik uzunluğu 4.32±0.10 mm olarak hesaplandı. Ulnaların kemikleşme alanı makroskopik olarak incelendiğinde, kemikleşmenin ulna'ların gövde kısmında yoğun olarak meydana geldiği gözlendi. Bu bölgede yoğun kırmızı rengin hâkim olduğu kemiğin uç kısımlarına doğru azaldığı ve geriye kalan kemik bölgelerinin mavi renk ile boyandığı belirlendi.

Bu gruptaki ulnaların kemikleşme gösteren bölgelerinin ortalama uzunluğu 1.63±0.09 mm olarak, kemikleşme yüzde oranı ise %37.26±4.32 olarak hesaplandı. Bu grupta elde edilen tüm ölçüm değerlerinin diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derece yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-6).

0.5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Ulna'ların Morfolojik Bulguları: Yapılan incelemede ulnaların ortalama 4.19±0.22 mm total kemik uzunluğuna sahip olduğu hesaplandı. Ulnanın minimum ve maximum uzunluğu 3.46 ile 4.59 mm arasında değişmekteydi. Total kemik uzunlukları diğer gruplar ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$, Tablo 4-6). Ulnalarda kemikleşme sergileyen bölgelerin uzunlukları ortalama 1.42±0.14 mm olarak hesaplandı. Kemikleşme sergileyen alanların ölçümlerinden elde edilen kemikleşme yüzde oranı 33.41±2.03 olarak hesaplandı. Kontrol grubu ve 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında kemikleşme gösteren bölgenin uzunluğunun ve kemikleşme yüzdesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede kontrol grubundan daha az, 50 mg/kg/gün BFA verilen gruptan ise fazla olduğu belirlendi ($p<0.05$).

5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Ulna'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta incelenen ulnalarda kemikleşmenin corpus ulnae'da belirgin olarak görüldüğü ve verilen dozun kemik yapımını olumsuz etkilediği makroskopik olarak gözlendi (Resim 4.4). Kemiklerin total uzunluğunun üst sınırı 4.22 mm, alt sınırı ise 3.70 mm olarak ölçüldü. Ortalama total kemik uzunluğu 3.99±0.15 mm olarak hesaplandı. Bu gruptaki total kemik uzunluklarının kontrol ve 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruplar ile karşılaştırıldığında düşük olduğu ve farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$), 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında ise yüksek olduğu fakat bu sayısal farklılığın anlamlı olmadığı belirlendi (Tablo 4-6). Bu gruptaki ulnaların kemikleşme sergileyen bölge uzunlukları ve kemikleşme dereceleri kontrol

grubu ve 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruplar ile karşılaştırıldığında daha düşük olup, bu fark kontrol grubu için istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$), diğer grup için ise anlamlı değildi.

50 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Ulna'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta makroskopik olarak incelenen ulnaların boyları diğer gruplara göre daha kısa olarak gözlendi (Resim 4.4). Bu gruptaki ulnaların total kemik uzunluğu ortalaması 3.89±0.17 mm olarak hesaplandı. Total kemik uzunluğu gruplar arasında karşılaştırıldığında bu gruba ait veriler, kontrol ve 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grubun sonuçlarından düşüktü ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-6). Kemikleşme gösteren bölgeler incelendiğinde corpus ulnanın donuk bir kırmızı ile boyandığı görüldü. Kemiğin proksimal ve distal uçlarına doğru kemikleşmenin kaybolduğu ve bu bölgede kıkırdak yıkımının tamamlanmamasına bağlı olarak siyaha yakın bir rengin hâkim olduğu belirlendi (Resim 4.4). Yapılan ölçümlerde bu alanlar kemikleşmeye dâhil edilmedi. Kemikleşme yüzdesi %30.24±2.91 olarak hesaplandı. BFA'nın dozu arttırıldıkça ulna kemiğinde kemikleşme yüzdesinin azaldığı, bu grup ile kontrol ve 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-6), (Resim 4.4).

Tablo 4-6. Ulna'ya ait istatistiksel veriler

Grup	N	Total Kemik Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Sergileyen Bölge Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Yüzde Oranı (%)			
		Ortalama±SS	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***
Kontrol	30	4.32±0.10[b,c,d]	4.09	4.57	0.000	1.63±0.09[b,c,d]	1.42	1.83	0.000	37.26±4.32[b,c,d]	30.02	46.99	0.000
0.5 mg/kg BFA	30	4.19±0.22[a,c,d]	3.46	4.59		1.42±0.14[a,d]	0.93	1.67		33.41±2.03[a,d]	30.20	38.46	
5 mg/kg BFA	30	3.99±0.15[a,b]	3.70	4.22		1.39±0.11[a]	1.18	1.62		31.70±2.89[a]	26.19	37.84	
50 mg/kg BFA	30	3.89±0.17[a,b]	3.44	4.28		1.31±0.11[a,b]	0.97	1.52		30.24±2.91[a,b]	24.93	37.43	

*One-Way ANOVA; $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c: 5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

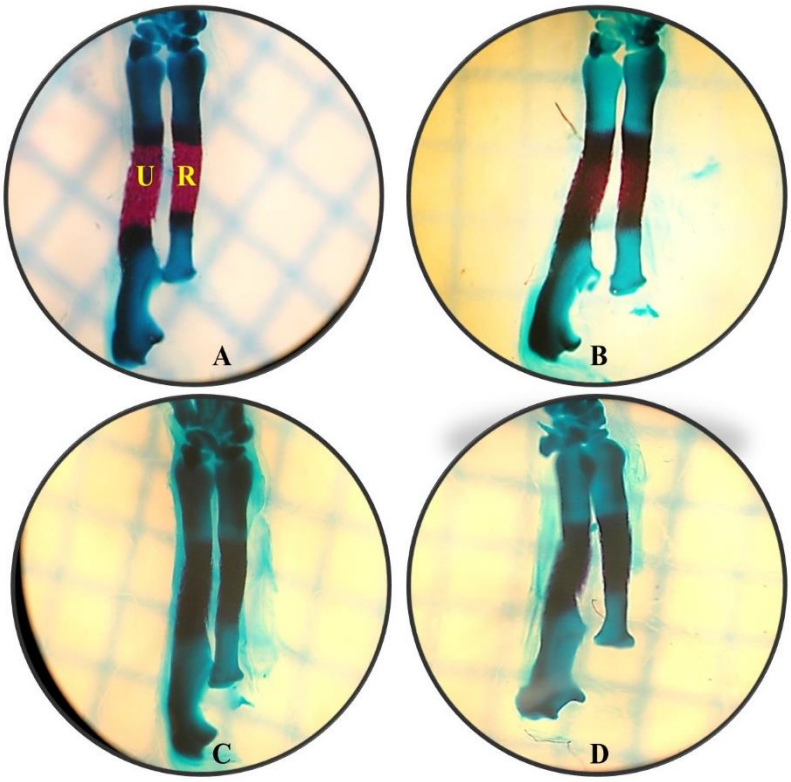
Kontrol Grubuna Ait Radius'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta çalışılan 30 adet radius'un total kemik uzunluğu ortalaması 3.31±0.18 mm olarak hesaplandı. Total kemik uzunluk değerleri 2.97 ile 3.64 mm arasında değişmekteydi (Tablo 4-7). Radiusların kemikleşme alanları incelendiğinde corpus radi'nin orta kısmında yoğun kırmızı rengin hâkim olduğu belirlendi. Proksimal ve distal uçlarda bulunan yapıların tamamının mavi renk ile boyandığı gözlendi (Resim 4.4). Kemikleşme görülen alanların uzunluk ortalaması 1.37±0.09 mm olarak ölçüldü. Radius'a ait kemikleşme yüzde oranı %39.35±2.80 olarak tespit edildi. Bu gruba ait kemikleşme görülen alanların uzunlukları ve kemikleşme yüzde değerleri deney grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$), (Tablo 4-7).

0.5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Radius'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta incelenen radiusların total kemik uzunlukları (ortalama 3.26±0.17 mm) kontrol grubuna göre düşük, daha yüksek dozlar verilen deney gruplarına göre yüksekti ve gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (Resim 4.4), ($p<0.05$), (Tablo 4-7). Bu grupta kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu 1.24±0.14 mm olarak, kemikleşme oranı ise %37.08±3.36 olarak tespit edildi. Kemikleşme oranı değeri gruplar arasında karşılaştırıldığında bu grup ile kontrol grubu arasındaki sayısal farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-7).

5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Radius'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta 15 fetusa ait 30 radius üzerinde inceleme yapıldı (Resim 4.4). Yapılan incelemeler sonucu radiusların en büyüğü 3.24 mm, en küçüğü ise 2.78 mm olarak ölçüldü. Bu gruptaki radiusların ortalama total kemik uzunluğu 3.09±0.14 mm olarak hesaplandı. Kemikleşme sergileyen bölgelerin uzunluk ortalaması 1.21±0.09 mm olarak tespit edildi. Radius'a ait kemikleşme yüzde oranı %35.78±2.15 olarak hesplandı. Bu gruba ait total kemik uzunluğu değeri diğer gruplar ile karşılaştırıldığında kontrol ve 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlendi ($p<0.05$), (Tablo 4-7).

50 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Radius'ların Morfolojik Bulguları: Makroskopik olarak bakıldığında incelenen 30 adet radius'un diğer gruplara oranla daha küçük olduğu, kemikleşme gösteren bölgenin daha kısa olduğu görüldü (Resim 4.4). Bununla birlikte kemikleşme radius gövdesinin orta kısmında küçük bir alanı kapsamaktaydı. Görüntüler üzerinde bu bölgeler donuk kırmızı ile boyanmış olarak belirlendi. Kemikleşme oranı ise %35.03±4.14 olarak tespit edildi. Kemikleşme oranı

diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, elde edilen verinin sayısal olarak düşük olmasına rağmen bu grup ile sadece kontrol grubu arasındaki sayısal farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-7).



Resim 4.4. Ulna ve Radius'a ait görüntüler

A. Kontrol grubu **B.** 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup

C. 5 mg/kg/gün BFA verilen grup **D.** 50 mg/kg/gün BFA verilen grup

Tablo 4-7. Radius'a ait istatistiksel veriler

Grup	N	Total Kemik Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Sergileyen Bölge Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Yüzde Oranı (%)			
		Ortalama±SS	Min	Max	P*	Ortalama±SS	Min	Max	P*	Ortalama±SS	Min	Max	P*
Kontrol	30	3.31±0.18[c,d]	2.97	3.64	0.000	1.37±0.09[b,c,d]	1.23	1.61	0.000	39.35±2.80[b,c,d]	33.71	46.22	0.000
0.5 mg/kg BFA	30	3.26±0.17[c,d]	2.78	3.59		1.24±0.14[a,d]	0.80	1.44		37.08±3.36[a]	25.17	42.93	
5 mg/kg BFA	30	3.09±0.14[a,b]	2.76	3.34		1.21±0.09[a,d]	1.05	1.39		35.78±2.15[a]	32.67	40.03	
50 mg/kg BFA	30	3.03±0.11[a,b]	2.78	3.24		1.14±0.15[a,b,c]	0.80	1.39		35.03±4.14[a]	24.55	42.37	

*One-Way ANOVA; $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c: 5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Kontrol Grubuna Ait Femur'ların Morfolojik Bulguları: Kontrol grubuna ait 30 adet femur boyama işleminden sonra makroskopik olarak incelendi. İncelemeye alınan tüm kemiklerde kemikleşmenin olduğu gözlendi. Kemikleşmenin corpus femoris'in orta kısmında daha fazla olduğu belirlendi. Proksimal ve distal uçlara doğru devam eden kemikleşmede, distal uca doğru kemikleşmenin fazla olduğu tespit edildi. Proksimal kısımda trochanter major, trochanter minor, collum femoris ve caput femoris'in kıkırdak yapıda olduğu ve mavi ile boyandığı belirlendi. Extremitas distalis'de ise femur kondilleri mavi renkle boyanmış olarak gözlendi (Resim 4.5). Ortalama total kemik uzunluğu 4.10±0.12 mm, kemikleşme sergileyen bölge uzunluğu ise 1.19±0.09 mm olarak hesaplandı. Bu gruba ait kemikleşme yüzde oranı ise %23.04±2.12 olarak belirlendi. Total kemik uzunluğu ve kemikleşme yüzde oranı açısından değerlendirildiğinde; kontrol grubu ile 5 mg/kg/gün ile 50 mg/kg/gün BFA verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-8).

0.5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Femur'ların Morfolojik Bulguları: İnceleme yapılan femur'ların en küçüğü 3.46 mm, en büyüğü ise 4.46 mm olarak ölçüldü. Total kemik uzunluğu ortalamasının 4.00±0.20 mm olduğu belirlendi. Bu gruptaki femurların total kemik uzunluğu, kontrol grubundan daha kısa olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 4-8). Bu gruba ait femurlarda kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğu 1.05±0.16 mm ve kemikleşme yüzde oranı %21.65±3.09 olarak hesaplandı. Kemikleşme yüzde oranı açısından değerlendirme yapıldığında; bu grup ile 50 mg/kg/gün BFA verilen grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Bununla birlikte kemikleşme sergileyen bölge uzunluğu değerlendirildiğinde ise bu grup ile hem kontrol hem de 50 mg/kg/gün BFA verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-8).

5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Femur'ların Morfolojik Bulguları: Çalışmanın bu grubunda incelenen femur'ların total kemik uzunluğu ortalaması 3.77±0.19 mm olarak ölçüldü. Kemiklerin boyları 3.39 ile 4.18 mm arasında değişmekteydi. Total kemik uzunluğunun kontrol grubuna göre daha kısa olduğu ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-8). Kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğu 0.99±0.11 mm, kemikleşme yüzde oranı ise %20.16±2.32 olarak hesaplandı. Hem kemikleşme

sergileyen bölgenin uzunluğu hem de kemikleşme yüzde oranın kontrol grubundan düşük olduğu, kemikleşme yüzdesinin ayrıca 50 mg/kg/gün BFA verilen gruba göre yüksek olduğu belirlendi ve yukarıda bahsedilen gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-8).

50 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Femur'ların Morfolojik Bulguları: Bu gruptaki femurlar makroskopik olarak incelendiğinde; hem total kemik uzunluğunda hem de kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğundaki azalma gözle fark edilebilir düzeydeydi (Resim 4.5). Total kemik uzunluğu ortalaması 3.63±0.13 mm olarak hesaplandı. Kemiklerin en küçüğü 3.34 mm ile en büyüğü ise 3.87 mm uzunluğa sahipti. Yapılan istatistiksel analizde total kemik uzunluğu açısından bu grupla ile tüm gruplar arasında anlamlı derecede farklılık tespit edildi ve total kemik uzunluğunun diğer gruplara göre kısaldığı belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4-8). Kemikleşme sergileyen bölge incelendiğinde corpus femoris'te başlayan kemikleşmenin çok küçük bir alanda olduğu tespit edildi. Her kemikte az bir alanda da olsa kemikleşme mevcuttu. Kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğu 0.90±0.22 mm olarak hesaplandı. Kemikleşme yüzde oranı ise %17.75±2.52 olarak ölçüldü. Bu kemikleşme oranı diğer gruplara göre en küçük değer olarak belirlendi ve bu grup ile diğer gruplar arasındaki sayısal farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-8).

Tablo 4-8. Femur'a ait istatistiksel veriler

Grup	N	Total Kemik Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Sergileyen Bölge Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Yüzde Oranı (%)			
		Ortalama±SS	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***
Kontrol	30	4.10±0.12[c,d]	3.85	4.30	0.000	1.19±0.09[b,c,d]	1.00	1.42	0.000	23.04±2.12[c,d]	19.91	28.11	0.000
0.5 mg/kg BFA	30	4.00±0.20[c,d]	3.46	4.46		1.05±0.16[a,d]	0.52	1.28		21.65±3.09[d]	12.48	26.71	
5 mg/kg BFA	30	3.77±0.19[a,b,d]	3.39	4.18		0.99±0.11[a]	0.79	1.25		20.16±2.32[a,d]	15.85	24.65	
50 mg/kg BFA	30	3.63±0.13[a,b,c]	3.34	3.87		0.90±0.22[a,b]	0.65	1.84		17.75±2.52[a,b,c]	13.02	23.11	

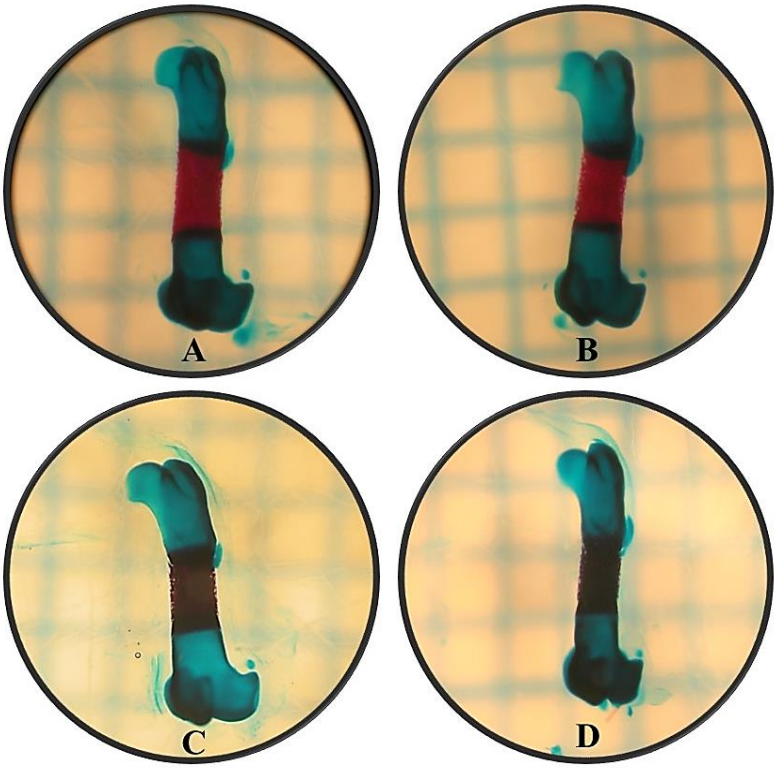
*One-Way ANOVA; $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c: 5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.



Resim 4.5. Femur'a ait görüntüler

A. Kontrol grubu **B.** 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup
C. 5 mg/kg/gün BFA verilen grup **D.** 50 mg/kg/gün BFA verilen grup

Kontrol Grubuna Ait Tibia'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta çalışılan 30 adet tibia'nın total kemik uzunluğu ortalaması 3.93±0.12 mm olarak hesaplandı. Total kemik uzunluk değerleri 3.69 ile 4.29 mm arasında değişmekteydi (Tablo 4-9). Yapılan makroskopik incelemede kemikleşmenin corpus tibia kısmının ortasından başladığı ve proksimal ve distal uçlara doğru uzandığı gözlendi. Proksimal uçta tibia kondilleri kıkırdak yapıdayken, distal ucun tamamının kıkırdak yapıda olduğu, malleolus medialis ve facies articularis inferior'un mavi renkte boyandığı belirlendi (Resim 4.6). Bu gruptaki tibia'ların kemikleşme sergileyen bölge uzunluğu ortalaması 1.26±0.08 mm ve kemikleşme yüzde oranı %30.73±2.70 olarak hesaplandı (Tablo 4-9). Bu gruba ait uzunluk ölçümleri ve kemikleşme yüzde değerleri diğer gruplar ile karşılaştırıldığında aradaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-9).

0.5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Tibia'ların Morfolojik Bulguları: Bu gruptaki tibia'lar makroskopik olarak incelendiğinde kemiklerin tamamında kemikleşme olduğu gözlendi. Bu gruptaki tibiaların total kemik uzunluğu ortalaması

3.74±0.24 mm olarak hesaplandı. Total kemik boyunun en küçüğü 3.07 mm, en büyüğü ise 4.19 mm olarak ölçüldü. Kemikleşme yüzde oranı %28.67±1.81 olarak tespit edildi. Kemikleşme yüzde oranı ve total kemik uzunluğu diğer gruplar ile karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$, Tablo 4-9).

5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Tibia'ların Morfolojik Bulguları: İnceleme yapılan tibiaların en küçüğü 3.09 mm, en büyüğü ise 3.94 mm olarak ölçüldü. Total kemik uzunluğu ortalaması 3.55±0.19 mm olduğu belirlendi. Yaptığımız ölçümlerde tibia'larda kemikleşme gösteren bölgenin ortalama uzunluğu 1.04±0.12 mm ve kemikleşme oranı %24.72±2.25 olarak hesaplandı. Total kemik uzunluğu ve kemikleşme yüzde oranı ortalamaları kontrol ve 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruplardan daha düşük, 50 mg/kg/gün BFA verilen gruptan daha yüksekti ve bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$), (Tablo 4-9).

50 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Tibia'ların Morfolojik Bulguları: Bu gruptaki tibia'lar makroskopik olarak incelendiğinde en küçük tibia'ların bu grupta olduğu görüldü (Resim 4.6). Kemikleşme yüzde oranlarına bakıldığında da yine en küçük kemikleşme oranının bu grupta olduğu belirlendi. ImageJ programı ile yapılan ölçümlerde ortalama total kemik boyunun 3.39±0.16 mm olduğu hesaplandı. Kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğu 0.85±0.19 mm olarak, kemikleşme yüzde oranı ise %20.90±3.90 olarak tespit edildi. Bu grupta her üç parametre ortalaması diğer gruplardan küçüktü ve diğer gruplar ile arasındaki sayısal farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$), (Tablo 4-9). BFA'nın tibia'da kemikleşmeyi azalttığı ve bu etkinin doza bağlı olduğu tespit edildi.

Tablo 4-9. Tibia'ya ait istatistiksel veriler

Grup	N	Total Kemik Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Sergileyen Bölge Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Yüzde Oranı (%)			
		Ortalama±SS	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***
Kontrol	30	3.93±0.12[b,c,d]	3.69	4.29	0.000	1.26±0.08[b,c,d]	1.08	1.42	0.000	30.73±2.70[b,c,d]	24.74	34.46	0.000
0.5 mg/kg BFA	30	3.74±0.24[a,c,d]	3.07	4.19		1.05±0.14[a,d]	0.67	1.27		28.67±1.81[a,c,d]	24.21	31.65	
5 mg/kg BFA	30	3.55±0.19[a,b,d]	3.09	3.94		1.04±0.12[a,d]	0.83	1.26		24.72±2.25[a,b,d]	21.38	30.18	
50 mg/kg BFA	30	3.39±0.16[a,b,c]	3.03	3.65		0.85±0.19[a,b,c]	0.45	1.19		20.90±3.90[a,b,c]	9.95	26.40	

*One-Way ANOVA; $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c: 5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

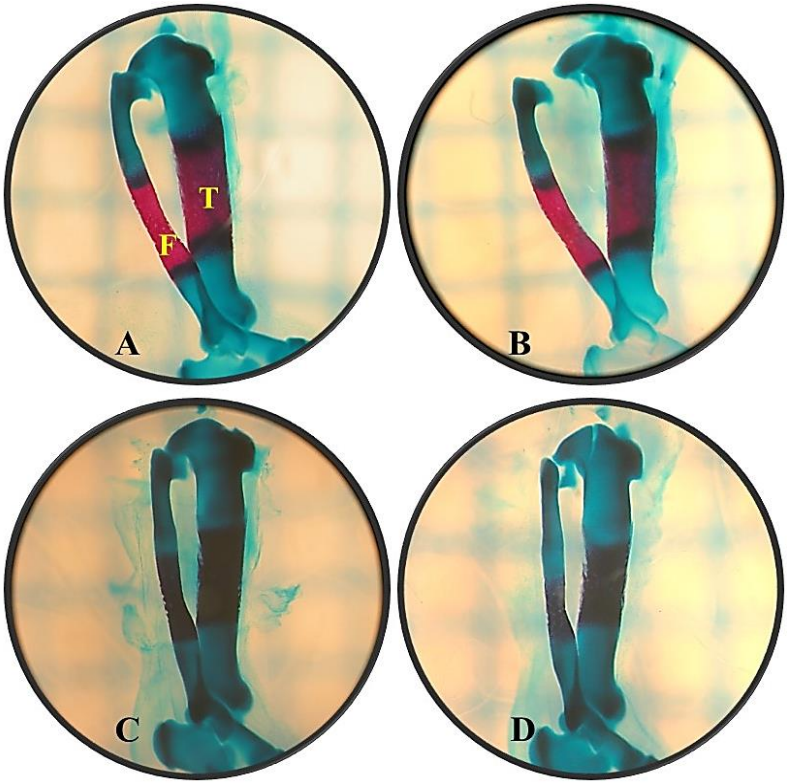
Kontrol Grubuna Ait Fibula'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta 15 fetusa ait 30 adet fibula incelendi. Makroskopik incelemede fibula'larda kemikleşmenin kemik gövdesinde başladığı; proksimal ve distal uçlara doğru ilerlediği görüldü. Gövdede kemikleşen kısmın parlak kırmızı renk ile boyandığı gözlendi. Extremitas proximalis'de caput fibulae, extremitas distalis'de ise malleolus lateralis'in henüz kıkırdak yapıda olduğu için mavi renk ile boyandığı görüldü (Resim 4.6). Yapılan ölçümlerde total kemik uzunluğu ortalaması 3.58±0.15 mm, kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğu ise 1.12±0.11 mm olarak hesaplandı. Kontrol grubunda yer alan fibulaların kemikleşme oranının %32.78±3.77 olduğu tespit edildi (Tablo 4-10). Bu değerler açısından gruplar arasında yapılan karşılaştırmada kontrol grubu ile 5 mg/kg/gün ve 50 mg/kg/gün BFA verilen gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-10).

0.5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Fibula'ların Morfolojik Bulguları: Düşük dozda BFA verilen bu grupta toplam 30 adet fibula incelendi. Total kemik uzunluğu, kemikleşme gösteren bölge uzunluğu ve kemikleşme yüzdesinin kontrol grubundan düşük olduğu fakat farkın istatisiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Tablo 4-10). Bu gruptaki fibula'lara ait parametreler diğer deney grupları ile karşılaştırıldığında 5 mg/kg/gün ve 50 mg/kg/gün BFA verilen gruplara göre tüm verilerin yüksek olduğu farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-10).

5 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Fibula'ların Morfolojik Bulguları: Bu grupta yapılan total kemik uzunluğu ölçümlerinde kemik boyları 3.09-3.62 mm arasında değişmekteydi. Total kemik uzunluğu ortalaması 3.38±0.12 mm olarak hesaplandı. Kemikleşme sergileyen alan fibula'ların gövde kısmında yoğunlaşmış fakat kontrol grubuna göre daha az bir bölgeyi kapsamaktaydı. Kemikleşme sergileyen alanın uzunluğu ortalama 0.92±0.15 mm, kemikleşme yüzde oranı ise %27.82±3.16 olarak tespit edildi. Ölçülen tüm değerlere ait veriler kontrol ve 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruplara göre daha düşük, 50 mg/kg/gün BFA verilen gruba göre daha yüksekti. Bu grup ile diğer gruplar arasındaki sayısal farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-10).

50 mg/kg/gün BFA Verilen Gruba Ait Fibula'ların Morfolojik Bulguları: 50 mg/kg/gün BFA uygulanan gebe ratların fetuslarının bulunduğu bu gruptaki fibula'lar makroskopik olarak incelendiğinde; en kısa kemiklerin bu grupta olduğu görüldü (Resim 4.6). Kemikleşme sergileyen bölge dikkate alındığında kemiğin gövdesinde

küçük bir alanın donuk bir kırmızı renk ile boyandığı tespit edildi. Yapılan ölçümler sonucunda total kemik uzunluğu ortalaması 3.24±0.14 mm olarak hesaplandı. Kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğu 0.79±0.09 mm ve kemikleşme yüzde oranı %24.32±4.22 olarak hesaplandı. 50 mg/kg/gün BFA verilen grupta yapılan ölçüm değerlerinin diğer gruplardan daha az olduğu belirlendi. Tüm bu parametreler dikkate alındığında bu grup ile diğer gruplar arasındaki sayısal farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-10). Sonuç olarak; BFA'nın dozu arttıkça fibula'da total kemik uzunluğunun, kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğunun ve kemikleşme yüzde oranının azaldığı tespit edildi.



Resim 4.6. Tibia ve Fibula'ya ait görüntüler

A. Kontrol grubu **B.** 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup

C. 5 mg/kg/gün BFA verilen grup **D.** 50 mg/kg/gün BFA verilen grup

Tablo 4-10. Fibula'ya ait istatistiksel veriler

Grup	N	Total Kemik Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Sergileyen Bölge Uzunluğu (mm)				Kemikleşme Yüzde Oranı (%)			
		Ortalama±SS	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***	**Ortalama±SS**	**Min**	**Max**	**P***
Kontrol	30	3.58±0.15[c,d]	3.33	3.88	0.000	1.12±0.11[c,d]	0.79	1.28	0.000	32.78±3.77[c,d]	24.35	38.93	0.000
0.5 mg/kg BFA	30	3.55±0.22[c,d]	2.97	3.84		1.04±0.12[c,d]	0.72	1.28		30.99±3.18[c,d]	23.75	37.62	
5 mg/kg BFA	30	3.38±0.12[a,b,d]	3.09	3.62		0.92±0.15[a,b,d]	0.58	1.23		27.82±3.16[a,b,d]	20.17	34.31	
50 mg/kg BFA	30	3.24±0.14[a,b,c]	2.92	3.49		0.79±0.09[a,b,c]	0.60	0.97		24.32±4.22[a,b,c]	16.90	33.45	

*One-Way ANOVA; $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c: 5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

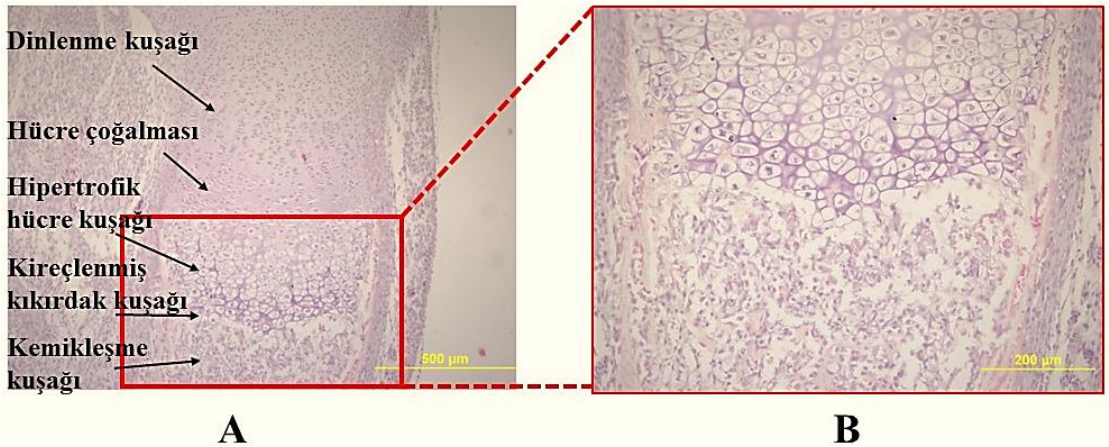
d: 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

4.2. IHK BOYAMA YÖNTEMİNE AİT BULGULAR

Çalışmamızda toplam 4 gruba ait fetusların femur'larında kemik yapımının metabolik belirleyicilerinden AP ve kemik yıkımının metabolik belirleyicilerinden olan TRAP yoğunluğu analiz edilerek BFA'nın teratojenik etkisinin olup olmadığı gösterilmeye çalışıldı. Öncelikle her gruptaki fetuslara ait femur dokularının genel histolojik yapılarının belirlenmesi amacıyla histolojik doku takip yöntemi uygulandı. Daha sonra her preparatta H&E ile boyama işlemi yapıldı.

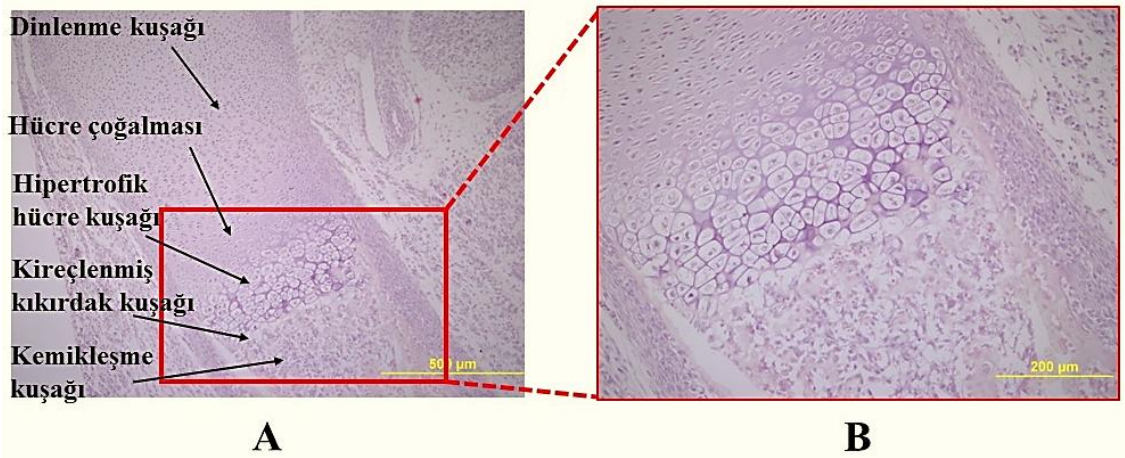
4.2.1. H&E İle Boyanmış Gruplara Ait Histolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait H&E ile boyanmış preparatta kemiğin oluşumu mikroskobik olarak incelendi. Femur gibi uzun kemiklerde kemikleşme endokondral kemikleşme ile meydana gelmektedir. Mikroskopik incelemede, dinlenme kuşağındaki hyalin kıkırdaklar, hücre çoğalmasının meydana geldiği bölgede kondrositlerin hızla bölünmesi, hipertrofik hücre kuşağında büyük kondrositlerin yer alması, kireçlenmiş kıkırdak kuşağı bölgesinde matrikslerin kireçlenmesi ve kemikleşme kuşağında kemik dokusunun belirmesi gibi tüm evreler gözlemlendi (Resim 4.7).



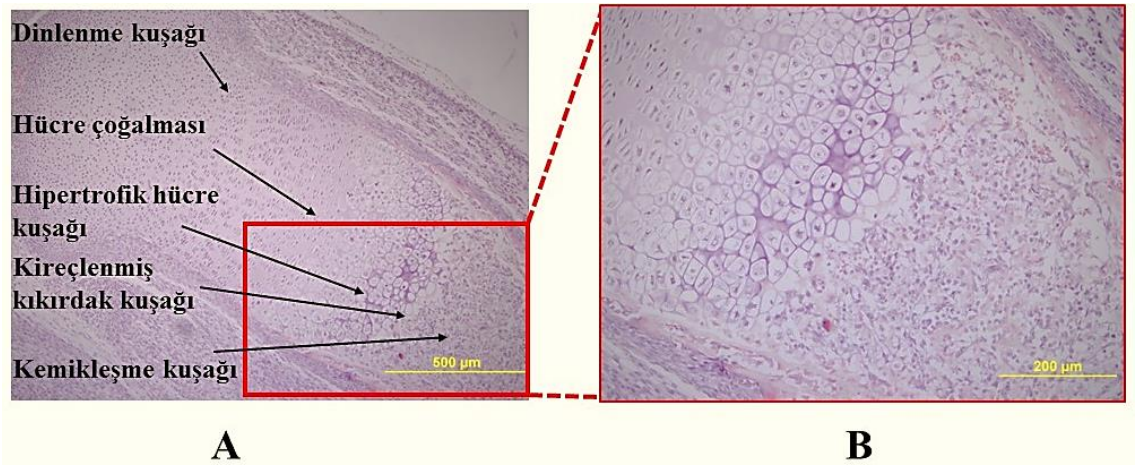
Resim 4.7. Kontrol grubuna ait kemikleşme (A: X10, B: X20, H&E)

0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruba ait H&E ile boyanmış preparatlarda kemikleşme sürecinin tüm evreleri gözlemlendi. Bu gruptaki kemikleşme düzeyinin kontrol grubu ile hemen hemen aynı özelliklere sahip olduğu mikroskopik olarak tespit edildi (Resim 4.8).



Resim 4.8. 0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruba ait kemikleşme (A: X10, B: X20, H&E)

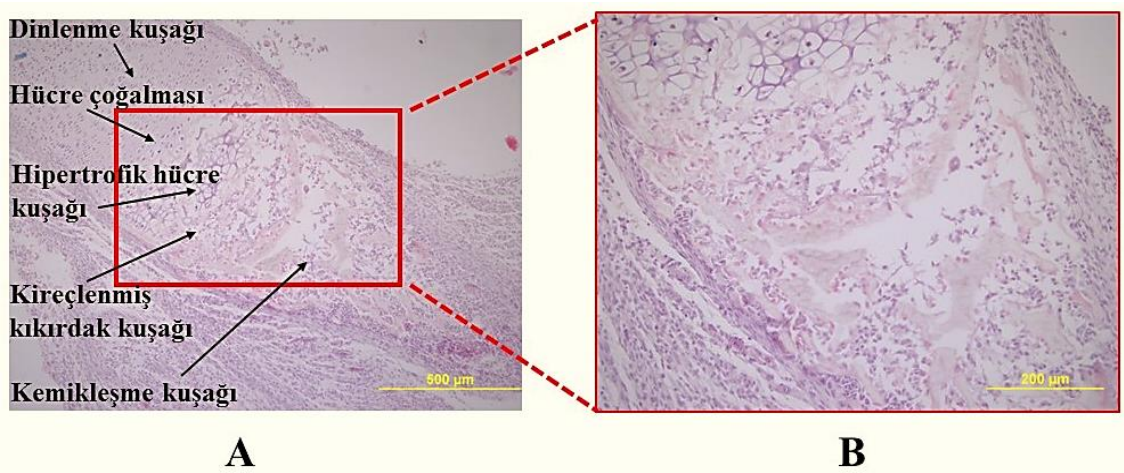
5 mg/kg/gün BFA verilen gruba ait H&E ile boyanan preparatta kemiğin oluşumu mikroskobik olarak incelendi. Mikroskopik incelemede hipertrofik hücre kuşağında büyük kondrositlerin kontrol grubuna göre daha az yer aldığı ve kemikleşme kuşağında kemik dokusunun kontrol grubuna göre az olduğu belirlendi (Resim 4.9). Genel anlamda BFA dozunun artması ile kemikleşmenin geciktiği tespit edildi.



Resim 4.9. 5 mg/kg/gün BFA verilen gruba ait kemikleşme (A: X10, B: X20, H&E)

50 mg/kg/gün BFA verilen gruba ait preparat mikroskobik olarak incelendiğinde göze çarpan önemli noktalardan biri kemikleşme sürecindeki evrelerde hücre yoğunluğunun kontrol grubuna göre daha az olmasıydı. Özellikle bu durum kemikleşme kuşağındaki hücre yoğunluğunda tespit edildi (Resim 4.10). Hipertrofik hücre kuşağında büyük kondrositlerin sayısı daha az olarak göze çarpmaktaydı. Tüm bunlar göz önüne

alındığında BFA'nın dozu arttıkça kemikleşme yönünden bir azalmanın meydana geldiği tespit edildi.



Resim 4.10. 50 mg/kg/gün BFA verilen gruba ait kemikleşme (A: X10, B: X20, H&E)

4.2.2. AP Yoğunluğuna Ait Bulgular

İmmünohistokimyasal boyama yapılan preparatlarda her gruba ait dokulardan alınan kesitlerde AP immunoreaktivite yoğunluğunu belirlemek için ImageJ programı kullanıldı. Tüm gruplara ait veriler ayrı ayrı değerlendirildi.

Kontrol grubuna ait IHK boyama yöntemi uygulanmış preparatlar mikroskopik olarak incelendiğinde kemikleşmenin olduğu bölgede yoğun AP ekspresyonu gözlendi (Resim 4.11). Bununla birlikte AP yoğunluğunun hesaplanması için kullanılan ImageJ programına ait veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında AP'nin ekspresyon yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark elde edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-11).

0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruba ait preparatlar mikroskopik olarak incelendiğinde kemikleşmenin olduğu bölgede AP ekspresyonu gözlendi. Ekspresyon yoğunluğu kontrol gurubu kadar fazla değildi (Resim 4.11). Bu gruba ait veriler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edildi ($p<0.05$, Tablo 4-11).

5 mg/kg/gün BFA verilen gruba ait ekspresyon yoğunluğu ortalama 70.35±5.39 olarak hesaplandı. Bununla birlikte mikroskopik incelemede AP ekspresyonunun zayıf boyanmalar şeklinde olduğu tespit edildi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede bu gruba ait veriler ile kontrol grubu arasında yüksek derecede anlamlı bir fark bulundu ($p<0.05$), (Tablo 4-11).

50 mg/kg/gün BFA verilen grubun immünohistokimyasal boyamasında AP ekspresyonunun çok zayıf olduğu gözlendi (Resim 4.11). AP yoğunluğunun hesaplanması için kullanılan ImageJ programına ait verilerin ortalaması 68.90±4.59 olarak hesaplandı. AP yoğunlu açısından bu grup ile hem kontrol hem de 0.05 mg/kg/gün BFA verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-11).

Genel anlamda, AP ekspresyonun yoğunluğu kontrol grubunda en fazla, 50 mg/kg/gün BFA verilen grupta ise en az olarak tespit edildi. Kemik yapımının metabolik belirleyicilerinden AP yoğunluğunun BFA dozu arttıkça azaldığı tespit edildi (Şekil 4-1).

Tablo 4-11. Tüm gruplara ait AP ekspresyon yoğunluğu

Grup	N	AP Ekspresyon Yoğunluğu			
		Ortalama±SS	Min	Max	P*
Kontrol	101	77.18±6.90[b,c,d]	62.43	91.40	0.000
0.5 mg/kg BFA	93	71.63±6.61[a,d]	60.67	90.76	
5 mg/kg BFA	92	70.35±5.39[a]	57.39	82.12	
50 mg/kg BFA	113	68.90±4.59[a,b]	58.98	78.42	

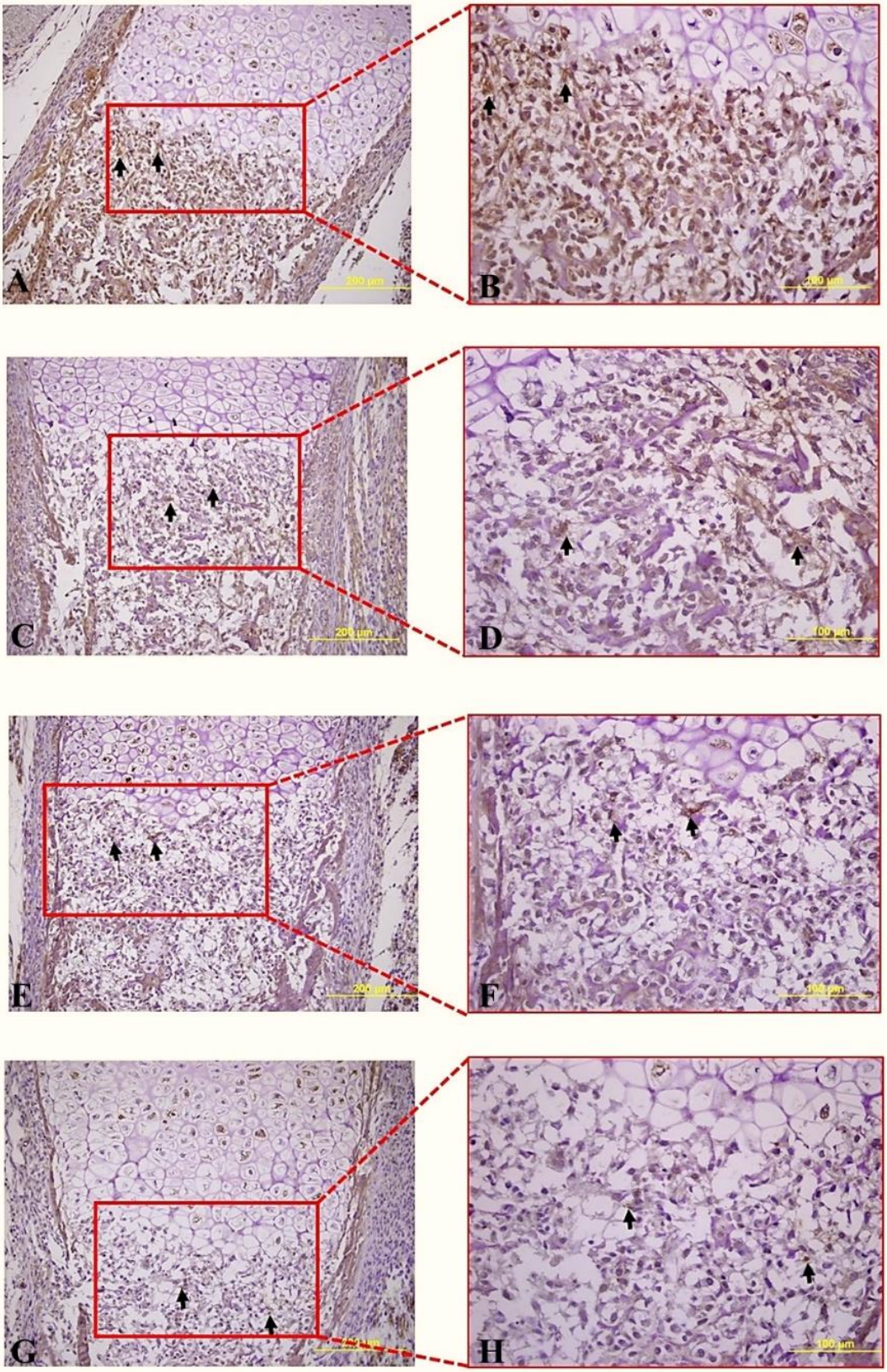
*One-Way ANOVA; $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

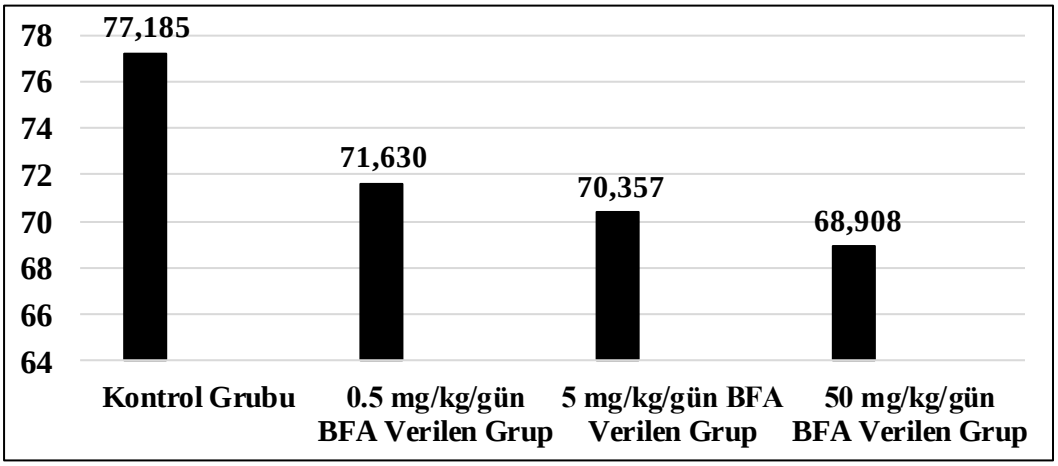
c: 5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.



Resim 4.11. Tüm gruplara ait immünohistokimyasal boyama uygulanmış preparatlarda kemikleşme görülen bölgedeki AP ekspresyonu (➞).

A (X20)-B (X40): Kontrol Grubu, **C (X20)-D (X40):** 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup, **E (X20)-F (X40):** 5 mg/kg/gün BFA verilen grup, **G (X20)-H (X40):** 50 mg/kg/gün BFA verilen grup



Şekil 4-1. Tüm gruplara ait AP immunoreaktivite yoğunluğu

4.2.3. TRAP Yoğunluğuna Ait Bulgular

İmmünohistokimyasal boyama yapılan preparatlarda her gruba ait dokulardan alınan kesitlerde TRAP immunoreaktivite yoğunluğu belirlendi.

Kontrol grubuna ait IHK boyama yöntemi uygulanmış preparatlar mikroskopik olarak incelendiğinde kemikleşmenin olduğu bölgede yoğun TRAP ekspresyonu gözlendi (Resim 4.12). TRAP yoğunluğuna ait verilerin ortalaması 88.00±5.52 olarak hesaplandı. TRAP immunoreaktivite yoğunluğunun kemikleşen bölgede yoğun şekilde görülmesi osteoblast-osteoklast dengesinin bir sonucu olarak düşünülmektedir. Çünkü kontrol grubuna ait AP immunoreaktivite yoğunluğu (77.18±6.90) değeri TRAP immunoreaktivite yoğunluğuna yakın bir değer olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte kontrol grubu ile diğer gruplar arasında TRAP'in ekspresyon yoğunluğu açısından anlamlı fark elde edildi ($p<0.05$), (Tablo 4-12).

0.5 mg/kg/gün BFA verilen gruba ait preparatlarda da kemikleşmenin olduğu bölgede TRAP ekspresyonu gözlendi (Resim 4.12). Ekspresyon yoğunluğu kontrol grubuna yakındı (86.16±4.08) fakat veriler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edildi ($p<0.05$, Tablo 4-12).

5 mg/kg/gün BFA verilen grupta TRAP immunoreaktivite yoğunluğu ortalama 85.91±3.38 olarak hesaplandı. Mikroskopik incelemede TRAP ekspresyonunun kontrol grubuna göre zayıf ve açık renkli boyanmalar şeklinde olduğu tespit edildi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede bu gruba ait veriler ile kontrol grubu arasında yüksek derecede anlamlı bir fark bulundu ($p<0.05$), (Tablo 4-12).

50 mg/kg/gün BFA verilen grubun immünohistokimyasal boyamasında TRAP ekspresyonunun ortalaması 85.00±4.53 olarak tespit edildi. Bu değer diğer gruplara göre daha azdı ve kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0.05$), (Tablo 4-12).

Çalışmamızda, BFA verilmeyen kontrol grubunda kemikleşmenin olduğu bölgelerde hem AP hem de TRAP immunoreaktivite yoğunluğuna ait ortalamalar en yüksek değere; 50 mg/kg/gün BFA verilen grupta ise bu ortalamalar en düşük değere sahipti. Normal kemik dokusunda osteoklast ve osteoblastlar denge halinde olmasına rağmen BFA'nın dozu arttıkça bu dengenin bozularak kemikleşmenin azaldığı görüldü.

Tablo 4-12. Tüm gruplara ait TRAP ekspresyon yoğunluğu

Grup	**N**	**TRAP Ekspresyon Yoğunluğu**			
		Ortalama±SS	**Min**	**Max**	**P***
Kontrol	111	88.00±5.52[b,c,d]	75.69	109.27	0.000
0.5 mg/kg BFA	86	86.16±4.08[a]	73.85	98.43	
5 mg/kg BFA	100	85.91±3.38[a]	79.34	93.00	
50 mg/kg BFA	100	85.00±4.53[a]	73.23	96.28	

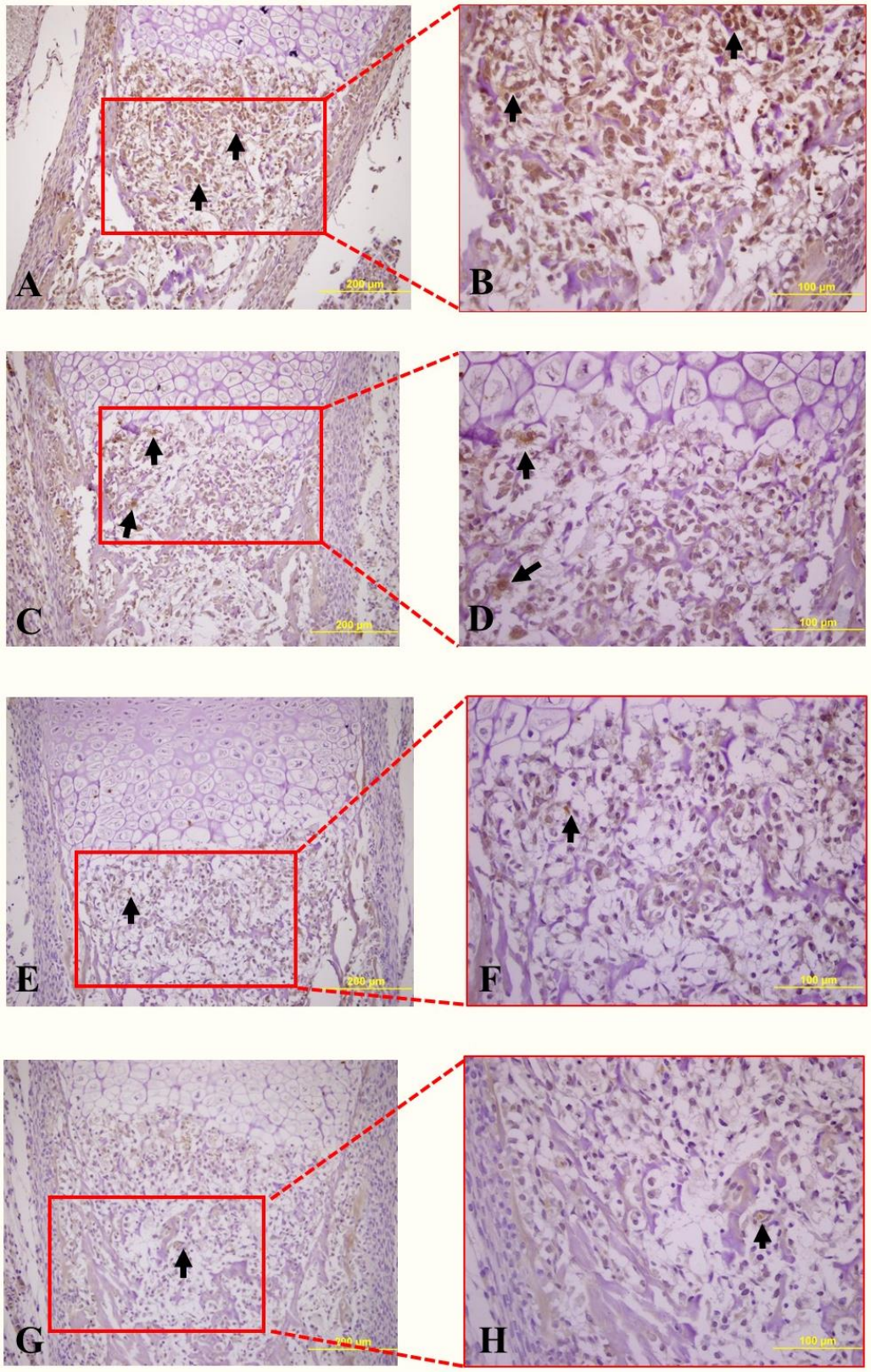
*One-Way ANOVA; $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c: 5 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.



Resim 4.12. Tüm gruplara ait immünohistokimyasal boyama uygulanmış preparatlarda kemikleşme görülen bölgedeki TRAP ekspresyonu (➞).

A (X20)-B (X40): Kontrol Grubu, **C (X20)-D (X40):** 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grup, **E (X20)-F (X40):** 5 mg/kg/gün BFA verilen grup, **G (X20)-H (X40):** 50 mg/kg/gün BFA verilen grup

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gebelik döneminde anneler çeşitli kimyasallara maruz kalmaktadırlar (122, 123). Bunlardan birisi de endokrin sistem üzerinde olumsuz etkileri olan kimyasallardan Bisfenol A'dır (124-126). BFA, ilk olarak Rus kimyager Alexander P. Dianin tarafından 1891 yılında sentezlenmiş, 1930'da ise BFA'nın östrojenik etkileri keşfedilmiştir (127). En yaygın olarak maruz kalınan ajanlardan bir olan BFA (127, 128), polikarbonat plastiklerin üretiminde, gıda ve içecek ambalajı da dâhil olmak üzere çeşitli plastik ürünlerde, alev geciktiricilerde, yapışkanlarda, inşaat malzemelerinde, elektronik bileşenler ve kâğıt kaplamalarda kullanılan bir monomerdir (73). Bu kullanım alanları ile birlikte BFA'nın, hem östrojen reseptörü α (ÖRα) hem de östrojen reseptörü β (ÖRβ) için zayıf bağlanma afinitesi olduğu bilinmektedir (129). Bu nedenle, ÖR yolunun uyarılmasıyla BFA'nın üreme sistemi, nöral gelişim, bağışıklık sistemi ve kardiyovasküler fonksiyonlar üzerinde endokrin bozucu etkiler bıraktığı düşünülmektedir (127). Ayrıca kemik gelişimi üzerine etkilerine yönelik yapılan çalışmada Pelch ve ark. (2012), BFA'nın hem yetişkin erkek hem de dişi farelerde femur uzunluğunu arttırdığını bildirmiştir (72). Ek olarak, BFA'nın kemirgenlerin (130-132) ve balıkların kemik dokularındaki osteoblastlar veya osteoblast benzeri hücreler üzerinde doğrudan etkide bulunduğu tespit edilmiştir (22). Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında BFA'nın birçok sistem üzerinde etkisi olduğu görülmektedir. Aynı zamanda yapılan çalışmalarda yetişkinlerin maruz kaldığı BFA'nın; amniyotik sıvıda, anne ve fetus plazmasında, plasenta ve anne sütünde, yağ dokusunda, semende, kolostrumda ve tükürükte tespit edildiği ortaya konmuştur (6, 7, 10-13). Hamile sıçanlara besinlerle verilen BFA'nın; plasentada 0.4 µg/kg, kanda ise 1.6 µg/kg olarak bulunduğu ve plasenta yolu ile fetüse geçtiği belirtilmektedir (18-20). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda BFA'nın embriyolojik gelişim sürecinde kemik gelişimi üzerine etkileri incelenmeye değer bulunmuştur.

Çalışmamızda gebe ratlara verilecek BFA'nın dozunun belirlenmesinde öncelikle literatürde yer alan TDI, NOAEL ve LOAEL dozları göz önüne alınmıştır. Buna göre literatürde günlük TDI dozu 0.05 mg/kg bw/day, NOAEL dozu 5 mg/kg bw/day ve LOAEL dozu 120 mg/kg bw/day olarak tespit edilmiştir. Özellikle LOAEL dozu ile ilgili çalışmalarda BFA'nın farelerin sindirim ve üreme sistemlerinin gelişimleri üzerine toksik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (49). Bu veriler ışığında literatürdeki BFA ile ilgili diğer çalışmalar incelenmiştir. Literatürde BFA'nın gavaj ile 1-1250 mg/kg/d dozlarda (11, 29, 133); i.p. olarak ise 1-200 mg/kg/d dozlarda (118-121, 134, 135) verildiği belirlenmiştir. Bu bağlamda LOAEL dozu ve literatür bilgileri göz önüne alınarak çalışmamızda 0.5, 5 ve 50 mg/kg/gün BFA verilen gruplar oluşturulmuştur. Kontrol grubuna ise BFA'nın çözülerek stok çözelti hazırlanmasında kullanılan mısır yağı verilmiştir. Belirtilen dozlarda BFA'nın ve mısır yağının verilmesinde i.p. yol tercih edilmiştir. Çünkü bu enjeksiyon uygulama yöntemi, BFA ile ilgili çalışmalarda en fazla tercih edilen yollarından biridir (118-121, 134, 135) ve diğer pek çok parenteral uygulama yolları ile karşılaştırıldığında uygulaması çok daha kolaydır (136).

Literatürde BFA'nın gebelik dönemine ait etkilerini inceleyen çalışmalarda BFA'nın gebeliğin çeşitli dönemlerinde verildiği belirlenmiştir. Smith ve ark. (2007) BFA'nın uterus gelişimi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada farelere gebeliklerinin 9-16. günleri arasında çeşitli dozlarda (0.5, 1.0, 5.0, 50 ve 200 mg/kg BFA) BFA verdikleri (119), Tanaka ve ark.'nın (2010) gebe ve yeni doğan farelerde BFA dağılımı ile ilgili çalışmalarında dişi farelere BFA'yı sadece gebeliklerinin 13. gününde verdikleri (137), Lemmen ve ark.'nın (2004) BFA'nın östrojen reseptörleri üzerine etkisini inceledikleri çalışmada ise ratlara gebeliklerinin sadece 13.5-14.5 günleri arasında çeşitli dozlarda (10, 100, 1000, 10000 µg/kg BFA) BFA verdikleri tespit edilmiştir (138). Tachibana ve ark. plasenta ve fetusların hayatta kalması üzerine BFA'nın etkilerini inceledikleri çalışmada farelere gebeliklerinin 0-7. günleri arasında günlük 10 mg/kg BFA vermişlerdir. Gebeliklerinin 10. ve 12. günlerinde anne farelere anestezi altında sezeryan uygulanmıştır. 10. günde sezeryan uygulanan gruplara ait verilere baktığımızda kontrol grubunda ortalama fetus sayısı 16.2±1.64 iken, BFA grubunda 4.6±1.14 olarak tespit edilmiştir. 12. günde sezeryan uygulanan gruplara ait verilere baktığımızda kontrol grubunda ortalama fetus sayısı 16.4±2.61 iken, BFA grubunda 4.8±0.84 olarak tespit edilmiştir. BFA'nın gebelik döneminde embriyo gelişimini ve fetus sayısını olumsuz yönde etkilediği sonucuna varmışlardır (139). Bununla birlikte

sıçanların embriyolojik gelişimi ile ilgili bilgilere baktığımızda gebeliğin yaklaşık 9. veya 10. günlerinde organların; 10.5 günlük bir rat embriyosunda da kas-iskelet sistemi gelişiminin başladığı gözlemlenmektedir (102) (115). Literatürdeki bilgiler ışığında çalışmamızda vaginal smearda spermium görülen ve 0.5 günlük gebe olarak kabul edilen ratlara gebeliklerinin başlangıcından gebeliğin 20. gününe kadar BFA verilmiş olup, kontrol grubuna ise yine aynı dönemde mısır yağı verilmiştir.

Tachibana ve ark.'nın (139) 2007 yılındaki çalışması göz önüne alınarak çalışmamızın planlanma aşamasında BFA verilen gruplarda gebelik döneminde gelişim gösterecek embriyo sayısının normal gebeliğe göre düşük olacağı ön görülerek her gruptaki gebe rat sayısı 4 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kontrol grubunda gebe ratlara ait ortalama fetus sayısı 11, 0.5 mg/kg/gün BFA verilen grupta ortalama fetus sayısı 10.5, 5 mg/kg/gün BFA verilen grupta ortalama fetus sayısı 10 ve 50 mg/kg/gün BFA verilen grupta ortalama fetus sayısı 9.5 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte 50 mg/kg/gün BFA verilen grupta gebe ratlardan birinde yapılan sezeryan işleminde bir fetusun gelişimini tamamlamadığı ve aynı gebe rata ait sezeryanla elde edilen sağlıklı fetus sayısının 6 olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler göz önüne alındığında çalışmamızda da yüksek doz (50 mg/kg/gün) BFA'nın embriyolojik gelişim esnasında olumsuz etkiler meydana getirdiği belirlenmiştir. Bu bulguların Tachibana ve ark.'nın (2007) bulguları ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (139).

Çalışmamızda BFA'nın kemik gelişimi üzerine etkileri ikili iskelet ve immünohistokimyasal boyama yöntemleri ile incelendi. İkili iskelet boyama, embriyonik ve postnatal dönemde teratolojik araştırmaların çoğunda kullanılan önemli bir yöntemdir (140). Bu boyama yöntemi ile fetusların iskelet sisteminin gelişim düzeyleri belirlenebilmektedir (141, 142). Hill ve ark. (1973) ikili iskelet boyama yöntemini ilk kullanan araştırmacıyı Belchier (1735–1736) olarak ifade etmişlerdir. Belchier, halk arasında *Madder plant* ismiyle bilinen bitkinin köklerini toz haline getirip hayvanların yemlerine karıştırarak kemiklerin kırmızıya boyandığını saptamıştır (143). Ancak, deney hayvanlarına ait fetusların embriyolojik dönemde iskeletlerinin büyük bir bölümü kıkırdaktan meydana gelmektedir. Bundan dolayı kemiğin tek başına boyanması ile elde edilecek sonuçların güvenilir olmayacağı anlaşılmıştır. Bunun üzerine iskeletin hem kıkırdak hem de kemik bölümlerinin boyanmasını sağlayacak yeni yöntemler geliştirilmiştir (144-148). Bu bağlamda çalışmamızda da kullandığımız, iskeletin kemik kısımlarının Alizarin red, kıkırdak kısımlarının ise Alcian blue ile

boyandığı Inouye'un metodu ortaya çıkmıştır (149). Literatürde bu yöntem kullanılarak teratojenik maddenin iskelet sistemi üzerinde oluşturduğu muhtemel hasarların tespit edildiği ve kemik kıkırdak oranlarının ölçülerek değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur (140, 145, 150-153).

Literatürde araştırdığımız kadarıyla BFA'nın kemik gelişimi üzerine etkilerini inceleyen ikili iskelet boyama yöntemi ile yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bundan dolayı çalışmamız literatürde bir ilk olma özelliğine sahiptir. Bunun dışında BFA'nın prenatal maruziyetine bağlı kemik gelişimi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda ossifikasyonda gerilik, iskelet bozuklukları ve femur uzunluğunda artma gibi sonuçlara varılmıştır (154, 155). Hardin ve ark. (1981) gebeliğin 1-15. günlerinde dişi sıçanlara 85 ve 125 mg/kg dozlarında i.p. olarak uygulanan BFA'nın canlı fetus sayısını azalttığını ve fetal vücut ağırlığı ile baş-kıç uzunluğunu baskıladığını bildirmişlerdir. Buna ek olarak, 125 mg/kg BFA dozunun gebelik oranının azalmasını, imperfore anüs ve ventrikülomegali dâhil fetal malformasyon insidansını artırdığını belirlemişlerdir (121). Morrissey ve ark. (1987) gebeliğin 6-15. günleri arasında 160, 320 ve 640 mg/kg BFA'yı gebe sıçanlara oral olarak uygulamışlardır. Çalışma sonucunda bu dozların hem fetal toksisiteyi hem de fetal morfolojik değişiklikleri etkilemediğini tespit etmişlerdir (133). Kim ve ark. (2001) gebeliğin 1. gününden 20. gününe kadar dişi ratlara 100, 300 ve 1000 mg/kg gibi yüksek dozlarda BFA'yı oral olarak uygulamışlardır. Bu çalışma, gebelik sırasında BFA uygulanmasının tüm dozlarda maternal toksisite oluşturduğunu ortaya koymuştur. 1000 mg/kg BFA dozunda ağır maternal toksisite gözlemlenirken, 300 mg/kg BFA dozunda hafif maternal toksisitenin gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Ek olarak fetus ağırlıklarında da düşük dozdan yüksek doza doğru bir azalma olduğu tespit edilmiştir (154). Çalışmamızda da fetusların vücut ağırlığında ve boy uzunluklarında kontrol grubundan 50 mg/kg/gün BFA verilen gruba doğru azalma olduğu, gruplar arasındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4-1, Tablo 4-2). Elde ettiğimiz bu veriler Hardin ve ark. ile Kim ve ark.'nın çalışmasını desteklemekteyken, Morrissey ve ark.'nın çalışmasını desteklememektedir. Çalışmalar arasındaki bu belirgin farklılıkların; uygulama yolu, doz ve BFA'ya maruz kalma süresindeki farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Kim ve ark.'nın (2001), dişi ratlara gebeliklerinin 1. gününden 20. gününe kadar 100, 300 ve 1000 mg/kg gibi yüksek dozlarda BFA'yı oral olarak uyguladıkları çalışmada fetusların iskeletlerinde çeşitli varyasyonlar görülmüştür. Bu varyasyonlar; fontanellerin

kapanamayacak kadar genişlemesi, 13. kaburgada kısalık, sternumda çarpık veya iki parçalı kemikleşme, costaların dalgalı ossifakasyonu, toraks iskeletinin iki parçalı kemikleşmesi ve os pubis'in tam olarak kemikleşmemesi şeklinde sıralanmıştır. Ayrıca sternum, metakarplar, metatarslar ve falankslardaki ossifikasyon merkezlerinin sayısı 1000 mg/kg BFA verilen grupta anlamlı olarak azalmışken; 100 ve 300 mg/kg BFA gruplarında ise azalmanın anlamlı düzeyde olmadığı belirlenmiştir (154). Çalışmamıza baktığımızda ise hem ön ekstremite hem de arka ekstremite kemiklerinin ikili iskelet boyama yöntemi ile belirlenen total kemik uzunluğu, kemikleşme sergileyen bölge uzunluğu ve kemikleşme yüzde oranı değerlerinin kontrol grubundan 50 mg/kg/gün BFA verilen gruba doğru azaldığı tespit edilmiştir. Genel olarak kemik gelişiminde varyasyonlar olmamasına rağmen total fetus uzunluğunda yine kontrol grubundan 50 mg/kg/gün BFA verilen gruba doğru azalma olduğu belirlenmiştir. Bu verilere baktığımızda BFA'nın Kim ve ark.'nın çalışmasında olduğu gibi ossifikasyonu geciktirdiğini ve kemik gelişimini olumsuz yönde etkilediğini görmekteyiz.

BFA'nın femoral geometri ve biyomekanik güç üzerine etkileri konusunda yoğunlaşan başka bir çalışmada farelere gebeliklerinin 11. gününden başlayarak doğumdan sonraki 12. güne kadar 10 µg/kg dozunda BFA verilmiştir. Çalışma esasen fetusların femurları üzerinde yapılmıştır. Bundan dolayı doğuma kadar olan dönemde BFA mini ozmotik pompa aracılığıyla gebe fareye verilirken; doğumdan sonra ise 12. güne kadar anne sütü ile BFA'nın fetuslar tarafından alınması sağlanmıştır. Çalışma neticesinde erkek ve dişi fetuslara ait femur boyunun %1.0 ile %2.3 oranında arttığı ortaya konmuştur. Fakat femurun gücü üzerinde BFA'nın herhangi bir etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir (72).

Lejonklou ve ark. (2016), embriyolojik dönemde çeşitli dozlarda BFA'ya (0, 25, 250, 5000, 50000 mg/kg/gün) maruz kalınmasının femur geometrisi üzerinde meydana getirdiği değişiklikleri araştırmışlardır. Gebe ratlara, gebeliklerinin 7. gününden doğumdan sonraki 22. güne kadar BFA gavaj yolu verilmiştir. Kontrol grubundaki gebe ratlara ise BFA'nın stok çözelti hazırlanmasında kullanılan mısır yağı verilmiştir. Anne sütü ile beslenen 89 erkek, 93 dişi toplam 182 yavru 3 aylıkken sakrifiye edilerek her yavrunun sağ femuru incelenmiştir. Çalışmanın bulgularına incelendiğinde; dişi yavruların total femur uzunluğu kontrol grubunda ortalama 32.3 ± 0.8 mm iken; 50000 mg/kg/gün BFA verilen grupta ortalama 32.5 ± 0.9 mm olarak ölçülmüştür. Erkek yavruların total femur uzunluğu kontrol grubunda ortalama 35.7 ± 1.5 mm iken; 50000

mg/kg/gün BFA verilen grupta ortalama 36.2 ± 0.9 mm olarak ölçülmüştür. 25 mg/kg/gün ya da 5000 mg/kg/gün dozunda BFA'ya maruz bırakılan dişi yavruların femur total uzunluğunun, kontrol grubundaki yavrulara kıyasla belirgin olarak daha uzun olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda en düşük dozda uygulanan BFA'nın hem erkek hem de dişi yavrularda femur geometrisini etkilediğini fakat kemik gücü üzerinde etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte BFA gibi xenoestrojenlere gelişimsel açıdan maruz kalan yavrularda kemik geometrisinin etkilenebileceğine dair kanıtlar güçlenmiştir (156).

Çalışmamızda ise femurlara ait ikili iskelet boyama yöntemi uygulanarak hesaplanan total kemik uzunluğu, kemikleşme sergileyen bölge uzunluğu ve kemikleşme yüzde oranı değerleri kontrol grubundan, 50 mg/kg/gün BFA verilen gruba doğru azalma göstermektedir (Tablo 4-8). Bununla birlikte 50 mg/kg/gün BFA verilen grup ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$, Tablo 4-8). Çalışmamız ile Pelch ve ark. ve Lejonklou ve ark.'nın çalışmaları arasındaki farkın BFA'nın veriliş yolu, verilme süresi, verilme zamanı ve verilen doz farklılığı gibi etkenlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Birçok çalışma, östrojenin osteoklastogenezisi önlediğini ve osteoblastların farklılaşmasını başlattığını göstermiştir (157, 158). BFA yapay bir östrojen olmasına rağmen tipik olarak östrojen antagonisti etkiler göstermektedir (159). Buna ek olarak endokrin bozucu kimyasalların deney hayvanları ve insanlarda üreme, sinir, bağışıklık ve iskelet sistemleri üzerine direk etki gösterdikleri bildirilmiştir (58, 160, 161). Bu bağlamda çalışmamızda, endokrin bozucu kimyasallardan olan BFA'nın fetal kemik metabolizması üzerindeki doğrudan etkisini incelemede immünohistokimya boyama metodu kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyama metodu ile fetusların kemik dokularında AP ve TRAP ekspresyon yoğunluğu belirlendi.

Kemik yapımının metabolik belirleyicilerinden AP, kemik döngüsünün yapım aşamasında çok yüksek konsantrasyonlarda üretilmektedir. Aynı zamanda AP, genel kemik yapım etkinliği hakkında iyi bir fikir vermektedir (162, 163). Kemik yıkımının metabolik belirleyicilerinden olan TRAP ise, aktif kemik yıkımı esnasında osteoklastlardan salgılanmaktadır. TRAP osteoklastlarda büyük miktarlarda bulunmaktadır ve kemik rezorpsiyonunda ortaya çıkmaktadır (164, 165). Bunların yanı sıra normal kemik döngüsünde osteoblastlar ve osteoklastlar arasında denge söz konusudur (166). Çalışmamızda immünohistokimyasal boyama metodu uygulanan

preparatlarda AP ve TRAP ekspresyonunun kontrol grubundan 50 mg/kg/gün BFA verilen gruplara doğru azaldığı ve hem kemik yapımının hem de kemik yıkımının BFA tarafından etkilendiği belirlendi. Normal kemik dokusunda osteoklast ve osteoblastlar denge halinde olmasına rağmen BFA'nın dozu arttıkça bu dengenin bozularak kemikleşmenin olumsuz yönde etkilendiği görüldü.

Miki ve ark. (2016), steroid ve xenobiyotik reseptör aracılığıyla BFA'nın insan osteoblastları üzerine etkilerini immünohistokimyasal boyama metodu kullanarak araştırmışlardır (167). İnsan osteoblast çalışmaları steroid ve xenobiyotik reseptörün K_2 vitamini aracılığı ile kemik homeostazını regüle ettiğini bildirmişlerdir (168, 169). Bu bağlamda Miki ve ark.'da 5 yetişkin 8 fetüs toplam 13 insan kemik dokusu üzerinde hücre kütürü ile BFA maruziyeti sağlayarak steroid ve xenobiyotik reseptör aracılığıyla BFA'nın osteoblastlar ve osteoklastlar üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışma neticesinde insan kemik gelişiminde BFA'ya maruz kalınmasının, fetüslerin ve yeni doğanların normal steroid ve xenobiyotik reseptöre bağlı kemik büyümesini bozabileceğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte BFA'nın, osteoblastlar ve osteoklastlar da dâhil olmak üzere kemik hücreleri üzerinde çok faktörlü yolaklar aracılığıyla çeşitli etkiler oluşturabileceği düşünmektedir (167).

Suzuki ve ark. (2003), goldfishler üzerinde BFA'nın plazma kalsiyum ve kalsitonun düzeylerini nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Goldfishlerin akvaryum sularının içerisine 10^{-6} M dozunda BFA karıştırılmıştır. BFA'ya maruz bırakılan toplam 3 grup (her grupta 8 goldfishin yer aldığı 2 gün, 4 gün ve 8 gün BFA'ya maruz kalan gruplar) musluk suyu içerisinde tutulan kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada plazma kalsiyum seviyesi kontrol grubunda 8 gün boyunca değişiklik göstermezken; BFA'ya maruz bırakılan goldfishlerde 4. günde plazma kalsiyum seviyesi ortalaması 8.94±0.25 mg/100 ml iken 8. günde 5.96±0.42 mg/100 ml olarak tespit edilmiştir. Plazma kalsitonin seviyesine bakıldığında kontrol grubunda 8 gün boyunca değişiklik görülmezken; BFA'ya maruz kalan gruplarda kademeli bir şekilde azalma olduğu belirlenmiştir (2. günde plazma kalsitonun seviyesi ortalama 186.93±11.81 pg/ml, 4. günde 168.33±17.50 pg/ml, 8. günde 117.50±10.86 pg/ml). Sonuç olarak BFA'nın plazma kalsiyum seviyesi üzerine etkilerinin östrojenin aksi yönünde olduğu ve kalsiyum homeostazını olumsuz yönde etkilediğini tespit etmişlerdir. Aynı şekilde plazma kalsitonun seviyesinin de BFA'ya maruz kalma süresinin artmasıyla olumsuz yönde etkilendiği ve bu etkinin östrojenin aksi yönünde olduğu bildirmiştir (22).

Suzuki ve Hattori (2003), BFA'nın goldfishlerde osteoblast ve osteoklast aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. 10^{-7} ile 10^{-5} molarite dozlarındaki BFA, % 1'lik bir penisilin-streptomisin karışımına eklenen Earle medium'unun içerisine karıştırılarak, BFA'nın osteoblast ve osteoklastlar üzerindeki doğrudan etkileri TRAP ve AP aktiviteleri kullanılarak incelenmiştir. TRAP aktivitesinin, BFA uygulanan grupta anlamlı derecede azaldığıni tespit etmişlerdir. Aynı zamanda BFA uygulamasının, AP aktivitelerini kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede baskıladığını belirlemişlerdir. Sonuç olarak bu in vitro çalışmada BFA'nın osteoklastik ve osteoblastik aktiviteler üzerinde doğrudan negatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (170).

Hwang ve ark. (2013), kemik iliği kaynaklı makrofajlar ve RAW 264.7 hücreleri aracılığıyla osteoklast oluşumu ve MC3T3-E1 hücreleri aracılığıyla osteoblast oluşumu üzerine BFA'nın etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda hem osteklastlardaki TRAP aktivitesinin ve hemde osteoblastlardaki AP aktivitesinin doza bağımlı olarak azaldığını belirtmişlerdir. BFA'nın osteoklast ve osteoblasta özgü spesifik genleri ve hücre sinyallemesini bastırdığını tespit etmişlerdir (171).

Literatürde BFA'nın TRAP ve AP aktivitesi üzerine etkisini inceleyen çalışmalarda genel sonuç BFA dozunun artmasıyla TRAP ve AP aktivitesinin olumsuz yönde etkilendiği şeklindedir. Bu sonuçlar sayesinde kemik yapımı ve yıkımı aşamalarında osteoblastik ve osteoklastik aktivitenin bastırıldığı ortaya konulmuştur. Çalışmamızda ise AP ekspresyon yoğunluğu kontrol grubunda ortalama 77.18±6.90 iken, 50 mg/kg/gün BFA verilen grupta ortalama 68.90±4.59 olarak tespit edilmiştir. TRAP ekspresyon yoğunluğu da aynı şekilde kontrol grubunda 88.00±5.52 olarak belirlenirken yüksek doz BFA (50 mg/kg/gün) verilen grupta 85.00±4.53'e doğru azalma göstermiştir. Bu veriler BFA'ya maruz kalan fetusların osteoklast ve osteoblast aktivitesinin doza bağımlı olarak azaldığını göstermektedir. Bu durumda çalışmamızdaki kemiklere ait morfometrik ölçüm sonuçlarındaki BFA dozuna bağlı azalmayı açıklamaktadır.

Çalışmamız sonucunda BFA'ya maruz kalan gebe ratların fetuslarında BFA dozu ile orantılı olarak; düşük doğum ağırlığında artma, baş-kıç uzunluğunda kısalma, kemik gelişiminde gecikme ve buna bağlı olarak kemikleşme oranında azalma tespit edildi. Bu tespit işlemi hem ikili iskelet boyama hem de immünohistokimya boyama metotlarıyla ayrı ayrı ortaya konuldu. Literatürde incelediğimiz kadarıyla BFA'nın etkilerinin bu iki

metotla aynı anda araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu iki metot birbirinin sağlaması şeklinde düşünülürse birbirlerini destekleyen sonuçlar BFA'nın kemik metabolizmasını olumsuz yönde etkilediğini, kemik yapımı-yıkımı aşamalarını geciktirdiğini göstermektedir. Çalışmaya ait sonuçların BFA'nın iskelet sistemi üzerine etkileri yönünden önemli bir kaynak oluşturacağını düşünmekteyiz.

6.KAYNAKLAR

1. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, et al. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. Mol Cell Endocrinol 2012; 355(2):201-207
2. Cousins IT, Staples CA, Klecka GM, et al. A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. Hum Eco Risk Assess 2002; 8(5):1107-1135
3. Greiner E, Kaelin T, Toki G. Bisphenol A:Chemical Economics Handbook. Menlo Park, CA: SRI Consulting 2004; pp 1-10
4. Durmaz E, Giray KB. Çevresel bir endokrin bozucu: Bisfenol A ve toksik etkilerinin değerlendirilmesi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2013; 56:192-199
5. Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, et al. Urinary concentrations of Bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. Environ Health Perspect 2005; 113(4):391-395
6. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, et al. Determination of Bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. Hum Reprod 2002; 17(11):2839–2841
7. Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, et al. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. Environ Health Perspect 2002; 110(11):A703-707
8. Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, et al. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. Mol Cell Endocrinol 2006; 254-255:179-86
9. vom Saal FS, Welshons WV. Large effects from small exposures in the importance of positive controls in low-dose research on Bisphenol A. Environ Res 2006; 100(1):50-76
10. Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to Bisphenol A. Toxicology 2006; 226(2-3):79-89
11. Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of Bisphenol A. NTP CERHR MON 2008 Sep; (22):v, vii-ix, 1-64 passim.
12. Li DK, Zhou Z, Miao M, et al. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. Fertil Steril 2011; 95(2):625-30
13. Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufiki J, et al. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. Reprod Toxicol 2007; 24(2):259-64

14. Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, et al. Exposure to Bisphenol A advances puberty. Nature 1999; 401(6755):763-764
15. Peknicová J, Kyselová V, Buckiová D, et al. Effect of an endocrine disruptor on mammalian fertility: Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. Am J Reprod Immunol 2002; 47(5):311-318
16. Jing X, Bing S, Xiaoyan W, et al. A study on bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol in human urine amples detected by SPE-UPLC-MS. Biomed Environ Sci 2011; 24(1): 40-46
17. Snyder RW, Maness SC, Gaido KW, et al. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. Toxicol Appl Pharmacol 2000; 168(3):225-34
18. Miyakoda H, Tabata M, Onodera S, et al. Passage of Bisphenol A into the fetus of the pregnant rat. J Health Sci 1999; 45(6):318-323
19. Miyakoda H, Tabata M, Onodera S, et al. Comparison of conjugative activity, conversion of Bisphenol A to Bisphenol A glucuronide, in fetal and mature male rat. J Health Sci 2000; 46(4):269-274
20. Selinski S, Degen GH. Comparison of the toxicokinetics of daidzein and Bisphenol A in pregnant and non-pregnant DA/Han rats. Technical Report/Universität Dortmund 2004; 41:1-21.
21. Björnsson BT, Haux C, Bern HA, et al. 17β-Estradiol increases plasma calcitonin levels in salmonid fish. Endocrinology 1989; 125 (4):1754-1759.
22. Suzuki N, Kambegawa A, Hattori A. Bisphenol A influences the plasma calcium level and inhibits calcitonin secretion in goldfish. Zoolog Sci 2003; 20(6):745-748.
23. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. Science 1988; 241(4861):84-86
24. Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, et al. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. Science 1988; 241(4861):81-84
25. Okazaki R, Inoue D, Shibata M, et al. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. Endocrinology 2002; 143(6):2349-2356

26. Dorn PB, Chou CS and Gentempo JJ. Degradation of bisphenol a in natural waters. Chemosphere 1987; 16(7):1501-1507
27. Dianin A. Zhurnal russkogo fiziko-khimicheskogo obshchestva. J Russ Phys Chem Soc 1891; 23:488–611
28. Prokop Z, Hankova L, Jerabek K. Bisphenol A synthesis – modeling of industrial reactor and catalyst deactivation. Reactive & Functional Polymers 2004; 60:77–83
29. European Chemicals Bureau Institute for Health and Consumer Protection. European union risk assessment report; 4,4'-isopropylidenediphenol (Bisphenol-A), European Communities, Ispra, 2003: pp 20-290
30. Staples CA, Dome PB, Klecka GM, et al. A review of the environmental fate, effects and exposures of Bisphenol A. Chemosphere 1998; 36(10): 2149-2173
31. Harvey PW, Johnson I. Approaches to the assessment of toxicity data with endpoints related to endocrine disruption. J Appl Toxicol 2002; 22(4): 241-247
32. WEB_1. (2016). IHS Markit web sitesi. https://www.ihs.com/products/bisphenol-chemical-economics-handbook.html (09.10.2016).
33.WEB_2. (2014). PRWeb sitesi. http://www.prweb.com/releases/2014/04/prweb11761146.htm (10.10.2016).
34. World Health Organization. Toxicological and health aspect of bisphenol A. Report of Joint FAO/WHO Expert Meeting, Ottawa, 2010: pp 17-40
35. WEB_3. (2016). Wikipedia web sitesi. https://en.wikipedia.org/wiki/Resin_identification_code (12.10.2016).
36. American Society for Testing and Materials (ASTM) International. Guiding the plastics recycling value chain. ASTM Committee, West Conshohocken, 2016: pp 1-4.
37. American Chemistry Council (ACC). Plastic packaging resins. ACC Board of Directors and Executive Committee, Washington DC, 2011: pp 1-3.
38. Wolstenholme JT, Rissman EF and Connelly JJ. The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. Horm Behav 2011; 59(3):296-305
39. The Association of State and Territorial Dental Directors (ASTDD). Dental sealants and Bisphenol A (BPA) policy statement. ASTDD Company, Nevada, 2011: pp 1-3.
40. Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, et al. Bisphenol A and related compounds in dental materials. Pediatrics 2010; 126(4):760-768.

41. WEB_4. (2015). Merkez Ortodonti web sitesi. http://www.merkezortodonti.com/img/e7758c_33f9507ce246452f8778f39be6b15ee7.jpg (13.10.2016).
42. WEB_5. (2016). Dentsply Türkiye web sitesi. http://dentsply.com.tr/news/klinik-vaka-k%C3%B6kten-kurona-adeziv-rekonstr%C3%BCksiyonlar-drenrico-cassai (13.10.2016).
43. French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety. Health effects of Bisphenol A. Collective Expert Report, Maisons-Alfort Cedex, 2011: pp 45-51.
44. The National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). Bisphenol A: Recommendations for risk management (Part 2). RIVM Report, Bilthoven, 2015: pp 17-60.
45. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of Bisphenol A (BPA) in foodstuffs:Executive summary. EFSA Journal 2015; 13(1):3978.
46. Mountfort KA, Kelly J, Jickells SM, et al. Investigations into the potential degradation of polycarbonate baby bottles during sterilization with consequent release of Bisphenol A. Food Addit Contam 1997; 14(6-7):737-740
47. Hoekstra EJ, Simoneau C. Release of bisphenol A from polycarbonate: a review. Crit Rev Food Sci Nutr 2013; 53(4):386-402
48. World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Bisphenol A (BPA)-Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO. INFOSAN Information Note, 2009; 5:1-6.
49. European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane (Bisphenol A). The EFSA Journal 2006; 428:1-75.
50. Food and Drug Administration (FDA). Bisphenol A (BPA): Use in food contact application. U.S. Food and Drug Administration Press, Maryland, 2014; pp 1-5.
51. Goodman JE, McConnell EE, Sipes IG, et al. An updated weight of the evidence evaluation of reproductive and developmental effects of low doses of Bisphenol A. Crit Rev Toxicol 2006; 36(5):387-457

52. Haighton LA, Hlywka JJ, Doull J, et al. An evaluation of the possible carcinogenicity of Bisphenol A to humans. Regul Toxicol Pharmacol 2002; 35(2 Pt 1):238-254

53. Willhite CC, Ball GL, McLellan CJ. Derivation of a bisphenol A oral reference dose (RfD) and drinking-water equivalent concentration. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2008; 11(2):69-146

54. Gray GM, Cohen JT, Cunha G, et al. Weight of the evidence evaluation of low-dose reproductive and developmental effects of bisphenol A. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal. 2004; 10(5):875-921

55. Huff J. Carcinogenicity of Bisphenol A in Fischer 344 and B6CC3F1 mice. Odontology 2001; 89:12-20

56. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES). Effets sanitaires du Bisphénol A and connaissances relatives aux usages du bisphénol A. Rapport d'expertise collective, Maisons-Alfort, 2011; pp 48-218.

57. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES). Risk assessment of Bisphenol A (BPA) on human health. Rapport d'expertise collective, Maisons-Alfort, 2013; pp 50-180.

58. Yang YJ, Hong YC, Oh SY, et al. Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. Environ Res 2009; 109(6):797-801

59. Hiroi H, Tsutsumi O, Takeuchi T, et al. Differences in serum bisphenol a concentrations in premenopausal normal women and women with endometrial hyperplasia. Endocr J 2004; 51(6):595-600

60. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, et al. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. JAMA 2008; 300(11):1303-1310

61. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A. EFSA Journal 2010; 8(9):1829

62. De Flora S, Micale RT, La Maestra S, et al. Upregulation of clusterin in prostate and DNA damage in spermatozoa from bisphenol A-treated rats and formation of DNA adducts in cultured human prostatic cells. Toxicol Sci 2011; 122(1):45-51

63. Masuda S, Terashima Y, Sano A, et al. Changes in the mutagenic and estrogenic activities of bisphenol A upon treatment with nitrite. Mutat Res 2005; 585(1-2):137-146

64. Naik P, Vijayaaxmi KK. Cytogenetic evaluation for genotoxicity of bisphenol-A in bone marrow cells of Swiss albino mice. Mutat Res 2009; 676(1-2):106-112.

65. Pacchierotti F, Ranaldi R, Eichenlaub-Ritter U, et al. Evaluation of aneugenic effects of bisphenol A in somatic and germ cells of the mouse. Mutat Res 2008; 651(1-2):64-70

66. Izzotti A, Kanitz S, D'Agostini F, et al. Formation of adducts by Bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA in vitro and in liver and mammary tissue of mice. Mutat Res 2009; 679(1-2):28-32

67. Tiwari D, Kamble J, Chilgunde S, et al. Clastogenic and mutagenic effects of Bisphenol A: an endocrine disruptor. Mutat Res 2012; 743(1-2):83-90

68. Johnson GE, Parry EM. Mechanistic investigations of low dose exposures to the genotoxic compounds bisphenol-A and rotenone. Mutat Res 2008; 651(1-2):56-63

69. Tayama S, Nakagawa Y, Tayama K. Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. Mutat Res 2008; 649(1-2):114-125

70. Iso T, Watanabe T, Iwamoto T. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. Biol Pharm Bull 2006; 29(2):206-210

71. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. EFSA Journal 2011; 9(9):2379

72. Pelch KE, Carleton SM, Phillips CL, et al. Developmental exposure to xenoestrogens at low doses alters femur length and tensile strength in adult mice. Biol Reprod 2012; 86(3):69

73. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of Bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Part I – Exposure assessment. EFSA Journal 2015; 13(1):3978

74. Shankar A, Teppala S, Sabanayagam C. Urinary Bisphenol A levels and measures of obesity: results from the national health and nutrition examination survey 2003-2008. ISRN Endocrinol 2012; 2012:965243

75. Galloway T, Cipelli R, Guralnik J, et al. Daily bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: results from the InCHIANTI adult population study. Environ Health Perspect 2010; 118(11):1603-1608

76. Bhandari R, Xiao J, Shankar A. Urinary bisphenol A and obesity in U.S. children. Am J Epidemiol 2013; 177(11):1263-1270

77. Wang HX, Zhou Y, Tang CX, et al. Association between bisphenol A exposure and body mass index in Chinese school children: a cross-sectional study. Environ Health 2012; 11:79

78. Li DK, Miao M, Zhou Z, et al. Urine bisphenol-A level in relation to obesity and overweight in school-age children. PLoS One 2013; 8(6):e65399

79. Brucker-Davis F, Ferrari P, Boda-Buccino M, et al. Cord blood thyroid tests in boys born with and without cryptorchidism: correlations with birth parameters and in utero xenobiotics exposure. Thyroid 2011; 21(10):1133-1141

80. Chou WC, Chen JL, Lin CF, et al. Biomonitoring of Bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. Environ Health 2011; 10:94

81. Volberg V, Harley K, Calafat AM, et al. Maternal Bisphenol A exposure during pregnancy and its association with adipokines in Mexican-American children. Environ Mol Mutagen 2013; 54(8):621-628

82. Wang T, Li M, Chen B, et al. Urinary Bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance. J Clin Endocrinol Metab 2012; 97(2):E223-227

83. Shankar A, Teppala S. Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 2011; 96(12):3822-3826

84. Melzer D, Osborne NJ, Henley WE, et al. Urinary bisphenol A concentration and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. Circulation 2012; 125(12):1482-1490

85. Miodovnik A, Engel SM, Zhu C, et al. Endocrine disruptors and childhood social impairment. Neurotoxicology 2011; 32(2):261-267

86. Yolton K, Xu Y, Strauss D, et al. Prenatal exposure to Bisphenol A and phthalates and infant neurobehavior. Neurotoxicol Teratol 2011; 33(5):558-566

87. Dobrzyńska MM, Radzikowska J. Genotoxicity and reproductive toxicity of bisphenol A and X-ray/bisphenol A combination in male mice. Drug Chem Toxicol 2013; 36(1):19-26

88. Qiu LL, Wang X, Zhang XH, et al. Decreased androgen receptor expression may contribute to spermatogenesis failure in rats exposed to low concentration of Bisphenol A. Toxicol Lett 2013; 219(2):116-124

89. Tan W, Huang H, Wang Y, et al. Bisphenol A differentially activates protein kinase C isoforms in murine placental tissue. Toxicol Appl Pharmacol 2013; 269(2):163-168

90. Lee SG, Kim JY, Chung JY, et al. Bisphenol A exposure during adulthood causes augmentation of follicular atresia and luteal regression by decreasing 17β-estradiol synthesis via downregulation of aromatase in rat ovary. Environ Health Perspect 2013; 121(6):663-669.

91. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, et al. Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi. Gökbel H. (Edt), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2015: ss 385-388.

92. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S. (Edt), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006: ss 142-156.

93. Ackermann U. Pretty Darned Quick Fizyoloji. Alican İ. (Edt), İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2006: ss 498-505.

94. Unur E, Ülger H, Ekinci N. Anatomi. Kıvılcım Kitapevi, Kayseri, 2014: ss 7-11.

95. WEB_6. (2001). Wikipedia Free Online Encyclopedia web sitesi. https://en.wikipedia.org/wiki/Laboratory_rat (14/11/2016).

96. WEB_7. (2013). ÇÜTF-DETAUM web sitesi. http://www.cu.edu.tr/tr/detay.aspx?pageid=1388 (23/11/2016).

97. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı. Deney Hayvanları Anatomisi. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı, Kayseri, 2014: ss 27-33.

98. Çetin N. Deney Hayvanları Fizyolojisi. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı, Kayseri, 2014: ss 23-31.

99. Kaya M, Çenesiz M. Laboratuar hayvanları:Deney Hayvanlarının Fizyolojisi. Aksoy A, Kolbakır A, Hökelek M. (Edt). Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, Samsun, 2010: ss 42.

100. WEB_8. (2016). Tutorvista web sitesi. http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iii/animal-morphology/skeletal-digestive-circulatory-system-rat.php (25/11/2016).

101. WEB_9. (2016). Kenyon College web sitesi. http://biology.kenyon.edu/courses/biol10/110pdfs/8skeleton.pdf (25/11/2016).

102. Hebel R, Stromberg MW. Anatomy and embryology of the laboratory rat. BioMed Verlag, Wörthsee, 1986; 9-21:231-251.

103. WEB_10. (2016). Skullsite web sitesi. http://www.skullsite.co.uk/Rat/comrat.jpg (25/11/2016).

104. WEB_11. (2016). University of Massachusetts Amherst web sitesi. http://bcrc.bio.umass.edu/intro/manual/index.php/Rat_I (29/11/2016).

105. WEB_12. (2016). Memorial University web sitesi. http://www.mun.ca/biology/mcolbo/Lectures%2012,13,14/mammal1.JPG (29/11/2016).

106. Wingerd DB. Rat Dissection Manual. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1988: pp 5-10.

107. West CD. The relationship of the spiral turns of the cochlea and the length of the basilar membrane to the range of audible frequencies in ground dwelling mammals. J Acoust Soc Am 1985; 77(3):1091-1101

108. Charuta A, Wysocki J, Wieczorek U. Anatomical conditions of strengthening of the acoustic wave in the middle ear in selected species of mammals.. EJPAU 2011; 14(2):12.

109. Olude MA, Olopade JO, Akinloye AK, et al. Macro-anatomical investigations of the skeletons of the African giant rat (Cricetomys gambianus Waterhouse 1840) II: Fore limb. Eur J Anat 2010; 14 (1):19-23

110. Özkan ZE. Macro-Anatomical Investigations on the Forelimb Skeleton of Mole-Rat (Spalax leucodon Nordmann). Veterinarski Arhiv 2002; 72(2):91-99

111. Olude MA, Olopade JO, Mustapha OA. Macro-anatomical investigations of the skeletons of the African giant rat (Cricetomys gambianus Waterhouse): Pelvic limb. Eur J Anat 2009; 13(3):127-131

112. Salami SO, Onwuama KT, Byanet O, et al. Morphological studies of the appendicular skeleton of the African giant pouched rat (Cricetomys gambianus)

part (ii) pelvic limb. et al. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health, 2011; 3(7):88-93

113. Evans HE, Sack WO. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. Anat Histol Embryol 1973; 2:11-45

114. Butcher EO. The development of the somites in the white rat (mus norvegicus albinus) and the fate of the myotomes, neural tube, and gut in the tail. Developmental Dynamics 1929; 44(3):381-439

115. Moore KL. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology (4th Edition). W.B. Saunders Co, London, 1988: pp 20-30.

116. WEB_13. (2016). UNSW Web siesi. https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Rat_Development_Stages (01/12/2016).

117. WEB_14. (2016). UNSW Web siesi. https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Rat_Development (01/12/2016).

118. Kovanecz I, Gelfand R, Masouminia M, et al. Chronic high dose intraperitoneal Bisphenol A (BPA) induces substantial histological and gene expression alterations in rat penile tissue without impairing erectile function. J Sex Med 2013; 10(12):2952–2966

119. Smith CC, Taylor HS. Xenoestrogen exposure imprints expression of genes (Hoxa10) required for normal uterine development. FASEB J 2007; 21(1):239-246

120. Holladay SD, Xiao S, Diao H, et al. Perinatal Bisphenol A exposure in C57B6/129svj male mice: potential altered cytokine/chemokine production in adulthood. Int J Environ Res Public Health 2010; 7(7):2845-2852

121. Hardin BD, Bond GP, Sikov MR, et al. Testing of selected workplace chemicals for teratogenic potential. Scand J Work Environ Health 1981; 7(4):66-75

122. Woodruff TJ, Zota AR, Schwartz JM. Environmental chemicals in pregnant women in the United States: NHANES 2003–2004. Environ Health Perspect 2011; 119(6):878-885

123. Ye X, Pierik FH, Hauser R, et al. Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, Bisphenol A, and phthalates among pregnant

women in Rotterdam, the Netherlands: the Generation R study. Environ Res 2008; 108(2):260-267

124. Arbuckle TE, Davis K, Marro L, et al. Phthalate and bisphenol A exposure among pregnant women in Canada-results from the MIREC study. Environ Int 2014; 68:55–65

125. Casas M, Valvi D, Luque N, et al. Dietary and sociodemographic determinants of Bisphenol A urine concentrations in pregnant women and children. Environ Int 2013; 56:10–18

126. Harley KG, Schall RA, Chevrier J, et al. Prenatal and Postnatal Bisphenol A Exposure and Body Mass Index in Childhood in the CHAMACOS Cohort. Environ Health Perspect 2013; 121(4):514–520

127. Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. J Steroid Biochem Mol Biol 2011; 127(1-2):27-34

128. Vandenberg LN, Hunt PA, Myers JP, et al. Human exposures to bisphenol A: mismatches between data and assumptions. Rev Environ Health 2013; 28(1):37-58

129. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology. 1998; 139(10):4252-4263

130. Kanno S, Hirano S and Kayama F. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. Toxicology 2004; 196 (1–2):137–145

131. Rucinski M, Ziolkowska A, Hochol A, et al. Estradiol and resveratrol stimulating effect on osteocalcin, but not osteonectin and collagen-1alpha gene expression in primary culture of rat calvarial osteoblast-like cells. Int J Mol Med 2006; 18(4):565–570

132. Ziolkowska A, Rucinski M, Pucher A, et al. Expression of osteoblast marker genes in rat calvarial osteoblast-like cells, and effects of the endocrine disrupters diphenylolpropane, benzophenone-3, resveratrol and silymarin. Chem Biol Interact 2006; 164(3):147-156

133. Morrissey RE, George JD, Price CJ, et al. The developmental toxicity of Bisphenol A in rats and mice. Fundam Appl Toxicol 1987; 8(4):571-582

134. Fernández M, Bianchi M, Lux-Lantos V, et al. Neonatal exposure to Bisphenol A alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. Environ Health Perspect 2009; 117(5):757-762

135. Nagahori H, Komai K, Tomigahara Y, et al. Initial induction and subsequent reduction of alpha(2u)-globulin in urine and serum of mature male rats after repeated intraperitoneal injections of (anti)estrogen. Toxicology 2001; 162(2):73–80

136. Eroğlu F, Eroğlu HE. Ratlarda analjezi ve anestezi. Journal of Clinical and Analytical Medicine 2011; 1:52-59

137. Tanaka M, Kawamoto T, Matsumoto H. Distribution of 14C-bisphenol A in pregnant and newborn mice. Dent Mater 2010; 26(6):e181-187

138. Lemmen JG, Arends RJ, van der Saag PT, et al. In vivo imaging of activated estrogen receptors in utero by estrogens and Bisphenol A. Environ Health Perspect 2004; 112(15):1544-1549

139. Tachibana T, Wakimoto Y, Nakamuta N, et al. Effects of Bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice. J Reprod Dev 2007; 53(3):509-514

140. Sadeghi F. Two separated protocols with the most important comments for skeletal staining in embryonic and adulthood period in laboratory animals. Anatomical Sciences 2014; 11(2):87-92.

141. Danielson M, Kihlström I. Calcification of the rabbit fetal skeleton. Growth 1986; 50(3):378-384

142. Menegola E, Broccia ML, Giavini E.Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. Teratology 2001; 64(3):125–133

143. Hill MF, Zdan R. Staining of developing skeleton with murexide. Acta Anatomica 1973; 84:509–515

144. Kimmel CA, Laborde JB, Trammell CT. Evaluation of cartilage and bone formation in fetal skeletons following prenatal insult reveals abnormalities not apparent in Alizarin stained specimens. Teratology 1982; 25:54A–55A

145. Williams TW. Alizarin red S and toluidine blue for differentiating adult or embryonic bone and cartilage. Stain Technol 1941; 16(1):23–25

146. Burdi AR. Toluidine blue alizarin red S staining of cartilage and bone in whole–mount skeletons in vitro. Stain Technol 1965; 40(2):45–48

147. Burdi AR, Flecker K. Differential staining of cartilage and bone in the intact chick embryonic skeleton in Vitro. Stain Technol 1968; 43(1):47–48.

148. Salaramoli J, Sadeghi F, Gilanpour H, et al. Modified double skeletal staining protocols with Alizarinred and Alcian blue in laboratory animals. AMHSR 2015; 13:76-81

149. Inouye M. Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by Alcian blue and Alizarin red S. Cong Anom 1976; 16:171–173

150. Soysal H, Unur E, Düzler A, et al. Effects of intraperitoneal administration of the phenytoin on the skeletal system of rat fetus. Seizure 2011; 20(3):187-193

151. Sunay FB, Ersoy S, Kahveci Z. İkili iskelet boyamasında mikrodalga işınımının kullanılması. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2009; 35(3):113-118

152. Yılmaz H. Nikotinin embriyonal kemik gelişimi üzerindeki teratojenik etkisine karşi melatoninin koruyucu rolü. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2016: ss 40-74.

153. Kimmel CA, Trammel C. A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. Stain Technol 1981; 56(5):271–273

154. Kim JC, Shin HC, Cha SW, et al. Evaluation of developmental toxicity in rats exposed to the environmental estrogen Bisphenol A during pregnancy. Life Sci 2001; 69(22):2611–2625

155. Agas D, Sabbieti MG, Marchetti L. Endocrine disruptors and bone metabolism. Arch Toxicol 2013; 87(4):735–751

156. Lejonklou MH, Christiansen S, Örberg J, et al. Low-dose developmental exposure to bisphenol A alters the femoral bone geometry in wistar rats. Chemosphere 2016; 164:339-346

157. Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, et al. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. J Biol Chem 2001; 276(12):8836–8840

158. Kousteni S, Almeida M, Han L, et al. Induction of osteoblast differentiation by selective activation of kinase-mediated actions of the estrogen receptor. Mol Cell Biol 2007; 27(4):1516–1530

159. Bergeron RM, Thompson TB, Leonard LS, et al. Estrogenicity of Bisphenol A in a human endometrial carcinoma cell line. Mol Cell Endocrinol 1999; 150(1-2):179–187

160. Sonne C, Dietz R, Born EW, et al. Is bone mineral composition disrupted by organochlorines in east Greenland polar bears (Ursus maritimus)?. Environ Health Perspect 2004; 112(17):1711-1716

161. Tsukamoto Y, Ishihara Y, Miyagawa-Tomita S, et al. Inhibition of ossification in vivo and differentiation of osteoblasts in vitro by tributyltin. Biochemical Pharmacology 2004; 68(4):739–746

162. Marshall WJ. Illustrated Textbook of Clinical Chemistry (1 st edition). Gower Medical Publishing, London, 1988: pp 65.

163. Moss DW.Alkaline phosphatase isoenzymes. Clinic Chemistry 1982; 28(10):2007-2016

164. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. Clin Biochem 1997; 30(8):573-593

165. Price CP, Kirwan A, Vader C. Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone resorption. Clin Chem 1995; 41(5):641-643

166. Kosteva J, Langer C. The changing landscape of the medical management of skeletal metastases in nonsmall cell lung cancer. Curr Opin Oncol 2008; 20(2):155-161

167. Miki Y, Hata S, Nagasaki S, et al. Steroid and xenobiotic receptor-mediated effects of Bisphenol A on human osteoblasts. Life Sci 2016; 155:29-35

168. Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, et al. Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. J Biol Chem 2006; 281(25):16927-16934

169. Tabb MM, Sun A, Zhou C, et al. Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. J Biol Chem 2003; 278(45):43919-43927

170. Suzuki N, Hattori A. Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the cultured scales of goldfish. Life Sci 2003; 73(17):2237-2247

171. Hwang JK, Min KH, Choi KH, et al. Bisphenol A reduces differentiation and stimulates apoptosis of osteoclasts and osteoblasts. Life Sci 2013; 93(9-11):367-372

EK-1

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)

Tarih: 12.08.2015 **Toplantı Sayısı: 07** **Karar**
No:15/103

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 12.08.2015 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Çağrı ŞAKALAR	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	KATILMADI
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	KATILMADI
Nükhet KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	KATILMADI
Serpil SARIÖZKAN	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Hamiyet ÜNAL	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi A.D.'dan **Doç. Dr. Tolga ERTEKİN** tarafından sunulan **"Bisfenol A'nın Fetal Kemik Gelişimi Üzerine Teratojenik Etkilerinin Araştırılması."** başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : **12.08.2015**
Etik kurul Başkan Vekili : **Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA**
İmza :

EK-2

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü

Sayı :40175052-020/72382 28/09/2015
Konu :Olurlar, Onaylar

ANATOMİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi : 28/09/2015 tarihli ve 72244 sayılı yazınız

İlgili yazı gereği Anabilim Dalınız Doktora öğrencisi Emre ATAY tarafından sunulan "Bisfenol A'nın Fetal Kemik Gelişimi Üzerine Teratojenik Etkilerinin Araştırılması " başlıklı doktora tez araştırma projesinde kullanılacak deney hayvanlarının bakımı-beslenmesi, hayvanlarda yapılacak deneysel çalışmaların ve deney sonunda hayvanların sakrifikasyon aşamalarını kapsayan deneysel uygulamaların merkezimiz bünyesinde çalışılması uygundur.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. Vehbi GÜNEŞ
Merkez Müdürü V.

Erciyes Üniversitesi Talas Yolu Melikgazi 38039 KAYSERİ
Telefon: +90 352 437 49 01/24404
E-Posta: dekam@erciyes.edu.tr
Ayrıntılı bilgi için irtibat: Vehbi Güneş
Faks: +90 352 437 52 73
Elektronik Ağ: http://www.erciyes.edu.tr

Doktora Tezi

ORIJINALLIK RAPORU

%13	%10	%6	%4
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	shmyo.kilis.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
2	BENDERLİ, Yasemin and DENİZ, Kemal. "Sıçanlarda radyasyona bağlı oral mukozitte propolisin etkisi", KBB- BBC Derneği, 2011. Yayın	%1
3	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
6	tipwiki.blogspot.com İnternet Kaynağı	%1
7	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
8	klinikmikrobiyoloji2013.org İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Unvanı	Öğretim Görevlisi	
Adı-Soyadı	Emre ATAY	
Doğum Tarihi ve Yeri	09/07/1989-Arapgir	
Çalıştığı Birim	Niğde Zübeyde Hanım Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu	
Bölüm/Program	Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü İlk ve Acil Yardım Programı	
E-mail	eemreatay@gmail.com	
Telefon	0(552) 202 79 44	

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	**Üniversite/Enstitü-Fakülte/Alan**	**Yıl**
Doktora	Erciyes Üniversitesi/ Tıp Fakültesi/ Anatomi ABD	2012- Devam ediyor
Lisans	Fırat Üniversitesi/ Sağlık Yüksekokulu/ Sağlık Memurluğu	2006-2010
Ön Lisans	Anadolu Üniversitesi/ Sağlık Kurumları İşletmeciliği	2009-2011

MESLEKTE DENEYİM

Görev Ünvanı	**Kurum/Kuruluş**	**Görev Dönemi**
Öğretim Görevlisi	Ömer Halisdemir Üniversitesi	2017-Devam ediyor
Araştırma Görevlisi	Kilis 7 Aralık Üniversitesi	2010-2017

ARAŞTIRMA ALANLARI

İnsan Anatomisi, İkili İskelet Boyama, Antropometrik Ölçümler, Morfometrik Ölçümler, İmmünohistokimyasal Boyama

YABANCI DİL/ ALES/ LİSANS NOT ORTALAMASI

İngilizce: (YÖKDİL-66,25) / **ALES:** 71,18422 (Kasım 2015) / **Lisans Notu:** 94,16

BİLİMSEL ETKİNLİKLER (KONGRE, SEMPOZYUM, SEMİNER, PANEL vb)

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. Göllüce A, Doğan U, İpekçi NN, **Atay E**. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğrencilerine Verilen Kök Hücre Eğitiminin Donör Olma Eğilimi Üzerine Etkisi. Uluslararası Afet Ve Acil Tıp Kongresi, 13-15 Mayıs, Ankara 2016 (Sözlü Bildiri)

2. Doğan U, **Atay E**. Göçün Sağlık Üzerine Etkileri: Türkiye Örneği. 2. Uluslararası Orta Doğu Konferansı, 28-29 Nisan, Kilis 2016 (Sözlü Bildiri) S-15.

3. Demir M, Avnioğlu S, Gülaçtı MM, **Atay E**. Can We Estimate Body Mass Index From The Wrist Anthropometric Measurements?. XXIV. International Symposium on Morphological Sciences, 2nd-6th September, İstanbul 2015 (Poster Bildiri) P-153.

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Doğan Ugur, Kılınç Erhan, İpekçi Nuriye Nesrin, **Atay Emre** (2016). Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğrencilerinin Eleştirel Düşünme Düzeylerinin Belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Dergisi, 25(3):138-143 (Kontrol No: 3190879)

2. Doğan Uğur, **Atay Emre**, Öztürk Melek, Yurdagül Gülistan (2016). Öğrencilerin Kendi Kendine Testis Muayenesi İle İlgili Yaklaşımları. Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 5(3): 39-45 (Kontrol No: 2865380)

3. **Atay Emre**, Çinar Şerife, Özçelik Özlem, Tokpınar Adem, Soysal Handan, Doğan Uğur (2016). Anket Çalışması Tıp Fakültesi Dönem 1 Öğrencilerinin Sosyo Demografik Özellikleri Ve Anatomi Eğitimi Hakkındaki Düşünceleri. Sağlık Bilimleri Dergisi, 25(1):24-28 (Kontrol No:2828006)

4. Demiroğlu Tuğba, Kılınç Erhan, **Atay Emre** (2015). Sağlık Çalışanlarına Uygulanan Şiddet Kilis İli Örneği. Sağlık Bilimleri Dergisi, 24(1):49-55 (Kontrol No: 1916259)

5. Demir Mehmet, **Atay Emre,** Kılıç Meryem, İpekçi Nuriye Nesrin (2014). Kilis 7 Aralık Üniversitesi Lisans Ve Ön Lisans Eğitiminde Öğrencilerin Anatomi Dersi İle İlgili Görüşlerinin Karşılaştırılması. Sağlık Bilimleri Dergisi, 23(3):144-148 (Kontrol No: 1345758)

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. **Atay E,** Ertekin T, Yılmaz H, Susar H, Al Ö, Nisari M, Yay A, Unur E. Hamilelik Döneminde Bisfenol A'ya Maruz Kalan Dişi Ratların Fetuslarında Ön Ekstremite Kemik Gelişimlerinin İkili Boyama Yöntemi İle Belirlenmesi. 17. Ulusal Anatomi Kongresi, 5-9 Eylül 2016, Eskişehir (P108).

2. Ertekin T, Degirmenci M, Uçar İ, **Atay E**, Sağıroglu A, Susar H, Doğanay S. 0-6 Yaş Arası Sağlıklı Çocuklarda Fossa Cranii Posterior Hacmi. 17. Ulusal Anatomi Kongresi, 5-9 Eylül 2016, Eskişehir (P24).

3. Susar H, Aycan K, Ertekin T, Nisari M, Ömerli A, Al Ö, **Atay E**, Yılmaz H. İdrar Kaçıran Kadınlarda Prolapsus Evrelerinin Pelvis Çaplarıyla İlişkisi. 17. Ulusal Anatomi Kongresi, 5- 9 Eylül 2016, Eskişehir (P08).

4. Yılmaz H, Ertekin T, **Atay E**, Nisari M, Susar H, Al Ö, Payas A. Nikotin'in Sıçan Fetuslarında Arka Ekstremite Kemik Gelişimi Üzerine Etkisi. 17. Ulusal Anatomi Kongresi, 5-9 Eylül 2016, Eskişehir (S28).

5. **Atay E,** Sağıroğlu A, Demir M, Özçelik Ö, Acer N. Bulbus Oculi Ve N. Opticus Hacimlerinin Manyetik Rezonans Görüntüleri İle Hesaplanması. Antropoloji Radyoloji ve Anatomi Kongresi, Ankara 2015 (Poster Bildiri) P-142.

6. Demir M, Akın İE, **Atay E**, Gülaçtı MM, Seringeç BN. 4-16 Yaş Arası Çocukların Kalça Eklemini Oluşturan Yapıların Morfometrik Ölçümleri. 3. Ulusal KSÜ Tıp Öğrenci Kongresi, Kahramanmaraş- 2015 (Poster Bildiri).

7. **Atay E**, Al Ö, Ertekin T, Nisari M, Unur E. Os Coxae'nın Morfometrik Ölçümlerinin ve Eklem Yüzey Alanlarının Hesaplanması. 16. Ulusal Anatomi Kongresi, Malatya-2014 (Poster Bildiri)

8. Al Ö, **Atay E**, Ertekin T, Nisari M, Ülger H. Humerus Proksimal ve Distal Segmentlerinin Morfometrik Ölçümleri. 16.Ulusal Anatomi Kongresi, Malatya-2014 (Poster Bildiri)

9. Demir M, **Atay E**, Kılıç M, Dokur M, İpekçi NN. Kilis İli Tıkayıcı Uyku Apne Sendromlu Hastaların Beden Kitle İndeksi Ve Boyun Çevresi Ölçümlerinin Apne-Hipopne İndeksi İle Karşılaştırılması. 15. Ulusal Anatomi Kongresi, Samsun-2013 (Sözel Bildiri).

10. Demir M, **Atay E,** Kılıç M, Dokur M, İpekçi NN. Kilis İli Tıkayıcı Uyku Apne Sendromlu Hastaların Apne-Hipopne İndeksi İle Fizik Muayene ve Epworth Uykululuk

Skalası Değerlerinin Karşılaştırılması. 15. Ulusal Anatomi Kongresi, Samsun- 2013 (Poster Bildiri).

11. Demir M, Koebke J, Güven A, **Atay E**. Disseksiyon Yöntemiyle Lig. Coracoacromiale'nin Tiplendirimesi ve Morfometrik Ölçümlenmesi. 15. Ulusal Anatomi Kongresi, Samsun-2013 (Poster Bildiri).

12. Demir M, **Atay E,** Kılıç M. Kilis 7 Aralık Üniversitesi Lisans Ve Önlisans Eğitiminde Öğrencilerin Anatomi Dersi İle İlgili Görüşlerinin Karşılaştırılması. Anatomi Günleri 2013, 18-20 Ocak, Kayseri- 2013 (Sözlü Bildiri). S18

13. **Atay E**, Çınar Ş, Özçelik Ö, Tokpınar A, Soysal H. Anket Çalışması: Tıp Fakültesi Dönem 1 Öğrencilerinin Sosyo-Demografik Özellikleri Ve Anatomi Eğitimi Hakkındaki Düşünceleri. Anatomi Günleri 2013, 18-20 Ocak, Kayseri-2013 (Poster Bildiri). P1

14. Özçelik Ö, Çınar Ş, **Atay E**, Akargöl S, Unur E. Anket Çalışması: Tıp Fakültesi Dönem 2 Öğrencilerinin Sosyo-Demografik Özellikleri Ve Anatomi Eğitimi Hakkındaki Düşünceleri. Anatomi Günleri 2013, 18-20 Ocak, Kayseri-2013 (PosterBildiri). P2

15. Çınar Ş, Özçelik Ö, **Atay E**, Arslan A, Aycan K. Anket Çalışması: Tıp Fakültesi Dönem 6 Öğrencilerinin Sosyo-Demografik Özellikleri Ve Anatomi Eğitimi Hakkındaki Düşünceleri. Anatomi Günleri 2013, 18-20 Ocak, Kayseri-2013 (Poster Bildiri). P5

PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER

1. BAP-2016 ID: 6585: Hipoksik Embriyo Kültüründe Folik Asitin Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tez Projesi. Erciyes Üniversitesi BAP Birimi, 2016 (Proje Araştırmacısı).

2. BAP-2015 ID: 6181: Bisfenol A'nın Fetal Kemik Gelişimi Üzerine Teratojenik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tez Projesi. Erciyes Üniversitesi BAP Birimi, 2015 (Proje Araştırmacısı).

3. BAP-2015 ID: 6188: Nikotinin Embriyonal Kemik Gelişimi Üzerindeki Teratojenik Etkisine Karşı Melatoninin Koruyucu Rolü. Yüksek Lisans Tez Projesi. Erciyes Üniversitesi BAP Birimi, 2015 (Proje Araştırmacısı).

4. BAP-2012/1/BAP12: Tıkayıcı Uyku Apne Sendromlu (TUAS) Hastaların Antropometrik Ölçümlerinin Karşılaştırılması (Proje Araştırmacısı)

EĞİTİMLER

1. "Mendeley Platformunun Kullanıcı Eğitim Toplantısı" Kilis 7 Aralık Üniversitesi Muallim Rıfat Eğitim Fakültesi Konferans Salonu. 9 Haziran 2015. Kilis

2. "MriStudio ile Beyin Parselasyon Hazırlama" Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi ABD. 8-9 Mayıs 2014. Kayseri

3. "DTI ile Beyin Parselasyon ve Traktografi Hazırlama" Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi ABD. 30 Ekim-1 Kasım 2013. Kayseri

4. "Laboratuar Hayvanları Bilimi" Erciyes Üniversitesi 3.Ulusal Laboratuvar Hayvanları Bilimi Kongresi. 26-28 Eylül 2013. Kayseri

5. "OHSAS 18001:2007 İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi" Kilis 7 Aralık Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu.14-18 Mayıs 2012. Kilis

KONFERANSLAR

1. III. Üniversiteler Arası Optisyenlik Programı Eğitim Şurası. 09-10 Mayıs 2015. İzmir

2. "Hemşirelikte Profesyonelleşme Yolunda Okul-Klinik İşbirliği","Hemşire Hasta İletişim ve Etkileşimi" (Prof. Dr. Meliha ATALAY- Prof. Dr. Ayşe ÖZCAN)-Elazığ, 2010

3. "Üriner İnkontinans ve Hemşirelik Yaklaşımı" (Prof. Dr. Nezihe KIZILKAYA BEJİ)-Elazığ, 2009

SERTİFİKALAR

1. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 29.09.2014 -29.12.2014

2. DTI ile Beyin Parselasyon ve Traktografi Hazırlama Sertifikası, Erciyes Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (ERSEM), 30.10.2013 -01.11.2013

ÖDÜLLER

1. Poster Bildiri Alanında 1.lik Ödülü. **Atay E**, Ertekin T, Yılmaz H, Susar H, Al Ö, Nisari M, Yay A, Unur E. Hamilelik Döneminde Bisfenol A'ya Maruz Kalan Dişi Ratların Fetuslarında Ön Ekstremite Kemik Gelişimlerinin İkili Boyama Yöntemi İle Belirlenmesi. 17. Ulusal Anatomi Kongresi, 5-9 Eylül 2016, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2016

DERECELER

1. Fırat Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu 2009-2010 Eğitim Öğretim Yılı Okul 3.'sü, Sağlık Memurluğu Bölüm 1.'si