

## Di-(2-etilhekzil) Ftalat (DEHP) Kaynaklı Testis Toksisitesine karşı Hesperedinin Etkilerinin İncelenmesi

### Investigation of the Effects of Hesperidin Against Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)-Induced Testicular Toxicity

Tuba DOĞAN<sup>1</sup>  
Ömercan ALAT<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.



Geliş Tarihi/Received :17.10.2024  
Kabul Tarihi/Accepted :03.03.2025  
Yayın Tarihi/Publication Date :17.03.2025

Sorumlu Yazar/Corresponding author:

Tuba Doğan

E-mail: tuba.dogan@atauni.edu.tr

Cite this article: Doğan, T., Alat, Ö. (2025). Investigation of the Effects of Hesperidin Against Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)-Induced Testicular Toxicity. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*. 5(1), 60-66.  
<https://doi.org/10.62425/jlasp.1569011>



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

#### ÖZ

Ftalatlar, plastiklerdeki esneklikleri nedeniyle yaygın olarak plastikleştirici olarak kullanılan sentetik kimyasallardır. İnsan popülasyonları ftalatlara doğrudan temas veya çevresel kirlenme yoluyla maruz kalabilir. Çoğu çalışma ftalatların üreme sistemi üzerindeki etkilerine odaklanmış ve bu bileşikler endokrin bozucular olarak sınıflandırmıştır. Hesperidin, narenciye kabuklarında bolca bulunan ve güçlü antioksidan, anti-inflamatuar ve nöroprotektif özelliklere sahip doğal bir flavonoiddir. Bu çalışmada, di-(2-etilhekzil) ftalat (DEHP) tarafından rat testisinde indüklenen olası oksidatif hasarı araştırmayı ve hesperedinin (HES) düzenleyici etkilerini değerlendirmeyi amaçladık. Bu amaçla, 35 erkek rat 5 deney grubuna ayrıldı. Grup I kontrol, Grup II HES 200 mg/kg, Grup III DEHP (1 g/kg), Grup IV DEHP+HES 100 mg/kg ve Grup V DEHP+HES 200 mg/kg olarak tasarlandı. Bütün uygulamalar oral olarak gerçekleştirildi. Ratların malondialdehit (MDA) seviyesi, ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP), glutasyon seviyesi (GSH), glutasyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktiviteleri belirlendi. Bulgularımız DEHP'nin MDA ve AOPP düzeylerini önemli oranda arttırdığını bunun yanında GSH seviyesi, GPx, SOD ve KAT aktivitelerinde önemli oranda azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Diğer yandan HES ile tedavi sonucu MDA ve AOPP seviyelerinde azalma, GSH seviyelerinde ve antioksidan enzim aktivitelerinde ise artış gözlemlendi. Sonuç olarak, DEHP'in, kısmen oksidatif stres indüksiyonu yoluyla sıçanlarda testis fonksiyonunu bozduğu öte yandan, HES'in, DEHP tarafından indüklenen testis toksisitesi üzerinde potansiyel koruyucu etkiler gösterdiği kanısına varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan, Diethyl hekzil ftalat, Hesperedin, Oksidatif Stres, Testis.

#### ABSTRACT

Phthalates are synthetic chemicals commonly used as plasticizers in plastics because of their flexibility. Human populations maybe exposed to phthalates through direct contact or environmental contamination. Most studies have focused on the effects of phthalates on the reproductive system and classified these compounds as endocrine disruptors. Hesperidin is a naturally occurring flavonoid abundantly found in citrus peels, known for its potent antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective properties. In this study, we aimed to investigate the possible oxidative damage induced by diethyl hexyl phthalate (DEHP) in rat testis and to evaluate the regulatory effects of hesperidin (HES). For this purpose, 35 male rats were divided into 5 experimental groups. Group I was treated as control, Group II HES 200 mg/kg, Group III DEHP (1 g/kg), Group IV DEHP+HES 100 and Group V DEHP+HES 200. All applications were administered orally. Malondialdehyde (MDA) level, Advanced Oxidation Protein Products (AOPP), glutathione level (GSH), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (KAT) activities were determined in rats. Our findings showed that DEHP significantly increased MDA levels, while GSH levels, GPx, SOD and KAT activities were significantly decreased. Interestingly, MDA levels decreased and GSH and antioxidant enzyme activities increased as a result of HES treatment. In conclusion, DEHP impairs testicular function in rats, at least in part through the induction of oxidative stress. On the other hand, HES exhibits potential protective effects on DEHP-induced testicular toxicity.

**Keywords:** Antioxidant, Diethyl hexyl phthalate, Hesperidin, Oxidative Stress, Testis.

## Giriş

Kısırlık, üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %12.6 ila %17.5'ini etkileyen, yarısı sperm kalitesindeki düşüş gibi erkek faktörlerinden kaynaklanan, oldukça yaygın bir küresel sağlık sorunudur. Çalışmalar kısırlığın çevresel faktörlerle yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Yang ve ark., 2020).

Di-(2-etilhekzil) ftalat (DEHP), yaygın bir çevresel endokrin bozucu kimyasal olup, oyuncaklar, bebek ürünleri, paketlenmiş yiyecekler, kan torbaları, intravenöz torbalar ve infüzyon tüpleri gibi polivinil klorür (PVC) içerikli tıbbi cihazlar gibi plastik ürünlerde dünya genelinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hong ve ark., 2021a). Giderek artan kanıtlar, DEHP'nin diğer çevresel endokrin bozucu kimyasallar gibi, birden fazla organa zarar verdiğini ve endokrin bozukluklarına, testis hasarına, endometriozise, kronik ilerleyici nefropatiye ve kardiyak mekanik ve elektriksel aktivitede azalmaya neden olabileceğini göstermektedir (Lin ve ark., 2023a). Son zamanlarda yapılan bir epidemiyolojik çalışmada, ftalatlara (özellikle DEHP ve dibütil ftalat (DBP)) günlük maruz kalmanın, erkek üreme sistemi üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceği bildirilmiştir (Hong ve ark., 2024). Erkek üreme sistemi üzerine yapılan çalışmalar, DEHP'nin testosteron sentezini azaltabileceğini, sperm hareketliliğini düşürebileceğini, germ hücreleri apoptozunu artırabileceğini ve seminifer tübüllerin dejenerasyonuna yol açabileceğini göstermiştir. Bu etkiler, oligospermi veya kısırlığa da yol açabilir. Olgunlaşmamış testisler, yüksek duyarlılıkları ve düşük adaptasyon kapasiteleri nedeniyle, çeşitli toksik maddelere karşı daha savunmasızdır. Bu nedenle, ergenlik döneminde DEHP'ye maruz kalmak, testosteron üretiminin azalması, kan-testis bariyerinin (BTB) hasar görmesi ve germ hücrelerinin zarar görmesi nedeniyle erkek üreme bozukluklarına yol açabilir (Chen ve ark., 2024; Hong ve ark., 2021a, 2024).

Hesperedin, turunçgillerde doğal olarak bol miktarda bulunan bitki kaynaklı bir biyoflavonoiddir (Nabil ve ark., 2024). Antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik özellikleri nedeniyle ilgi görmüştür. Hesperedin, bir antioksidan olarak yalnızca serbest radikalleri temizlemekle kalmaz, aynı zamanda metal şelatlama maddesi olarak da görev yapar, prooksidan enzimleri inhibe eder ve oksidatif strese karşı hücrel savunmayı artırır (Pandey & Khan, 2021). Hesperedin'in, kolistin (Çomaklı ve ark., 2020) , sisplatin (Asejeje ve ark., 2024) ve vanadyum (Vijaya

Bharathi ve ark., 2015) gibi toksik bileşiklerin testis dokusunda neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Ayrıca, varikosel, testis torsiyonu ve iskemi/reperfüzyon yaralanmaları gibi testisleri etkileyen patolojik durumlarda koruyucu etkisi vurgulanmıştır (Baralić ve ark., 2021; Celik ve ark., 2016).

Bu çalışmanın amacı, hesperedinin yetişkin erkek Sprague Dawley sıçanlarının testisleri üzerindeki DEHP kaynaklı oksidatif stresin yol açtığı değişikliklere karşı olası koruyucu etkisini incelemektir.

## Yöntemler

### Kimyasallar

Hesperedin (Katalog No:17304, St. Louis, MO, ABD) diğer tüm kimyasallar Sigma-Aldrich Chemicals'dan temin edildi.

### Deneysel Hayvanları ve Barındırılma Koşulları

Çalışmaya 10-12 haftalık, ağırlıkları 225-250 gram arasında değişen 35 adet erkek *Sprague Dawley* sıçanı Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Sıçanlar, sıcaklığı  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  ve nemi  $55 \pm 5$  olan kontrollü bir ortamda barındırıldı. 12 saatlik ışık-karanlık döngüsü sağlandı. Araştırma Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneysel Yönetim Kurulu'ndan 23.07.2024 tarih ve 169 nolu etik kurul onayı aldı.

### Deneysel Grupları

Ratlar her grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Bu gruplar;

- 1. Grup (Kontrol):** Ratlara 10 gün boyunca her gün serum fizyolojik çözeltisi oral olarak verildi.
- 2. Grup (HES 200mg/kg):** Ratlara 10 gün boyunca 200 mg/kg/vücut ağırlığı dozda hesperedin oral olarak verildi (Aksu ve ark., 2021).
- 3. Grup (DEHP 1 g/kg):** Ratlara nefrotoksisite oluşturmak için 10 gün boyunca 1 g/kg/vücut ağırlığı dozda DEHP oral olarak verildi (Erkekoglu ve ark., 2011).
- 4. Grup (DEHP+HES 100 mg/kg):** Ratlara 10 gün boyunca 1 g/kg/vücut ağırlığı dozunda DEHP oral olarak verildikten sonra HES 100 mg/kg/vücut ağırlığı dozunda oral olarak verildi.
- 5. Grup (DEHP+HES 200 mg/kg):** Ratlara 10 gün boyunca 1

g/kg/vücut ağırlığı dozunda DEHP oral olarak verildikten sonra HES 200 mg/kg/vücut ağırlığı dozunda oral olarak verildi.

Son hesperedin uygulamasından 24 saat sonra (11. gün) ratlar genel anestezisi altında dekapite edilerek testis dokuları kan ve phtıdan temizlendikten sonra serum fizyolojik ile yıkanarak, filtre kağıdında kurutulduktan sonra gelişmiş analizler için -80 °C'de saklandı. Alınan dokularda biyokimyasal analizler ile DEHP'nin neden olduğu doku hasarının azaltılmasında hesperedinin koruyucu etkilerinin olup olmadığı belirlemek amacıyla çeşitli analizler ile aydınlatılması gerçekleştirildi.

### Testis Dokusunda Malondialdehit (MDA), İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve AOPP Ölçümü

Testis dokusunda MDA seviyesi (nmol/g doku) Placer yöntemine göre manuel olarak ölçüldü (Placer ve ark., 1966). Bu yöntemde göre doku homojenatına tiyobarbiturik asit eklendi ve bir su banyosunda kaynatıldı ve ardından elde edilen renk n-bütanol ile çıkarıldı ve 532 nm'de spektrofotometrede ölçüldü.

GSH seviyesi (nmol/g doku) Ellman tarafından belirlenen yöntemde göre gerçekleştirildi (Ball, 1966). Bu analiz, disülfür reaktifinin 2-nitro-5-merkaptobenzoik asit oluşturmak üzere indirgenmesine dayanıyordu. Elde edilen sarı rengin absorbansı spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçüldü.

AOPP seviyeleri (Witko ve ark., 1992) Biotek ELISA Reader (Bio Tek  $\mu$ Quant MQX200 ELISA reader/ABD) ile ölçüldü. Ölçülen AOPP konsantrasyonları, 261 mmol'lük sönüm katsayısı kullanılarak Kloramin-T ile beyin dokusundaki AOPP düzeyi hesaplanarak  $\mu$ mol/mg protein cinsinden ifade edildi.

### Testis Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GPx), Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçümü

-80 °C'de saklanan testis dokuları sıvı nitrojen kullanılarak toz haline getirildi ve 0.5 g'a kadar tartıldı. Tartılan testis dokuları, 1:10 (w/v) homojenat elde etmek için QIAGEN TissueLyser LT kullanılarak 0.1 mL fosfat tamponu (pH 7,4) ile homojenize edildi ve 4 °C'de 30 dakika boyunca 11.000 rpm'de santrifüj edildi. Üstteki sıvı GPx, SOD ve KAT aktivitelerini ölçmek için kullanıldı. Total protein seviyeleri Lowry yöntemi kullanılarak belirlendi (Lowry ve ark., 1951). Testis dokusu GPx aktivitesi Rotruck'a göre belirlendi (Rotruck ve ark., 1973). GPx aktivitesi U/g doku olarak ifade edildi. Testis dokusu SOD aktivitesi Sun ve ark. göre belirlendi (Sun ve ark., 1988). SOD aktivitesi U/g dokusunda

ifade edildi. Testis dokusu KAT aktivitesi Goth'a göre ölçüldü (Góth, 1991). CAT aktivitesi U/g dokusunda ifade edildi.

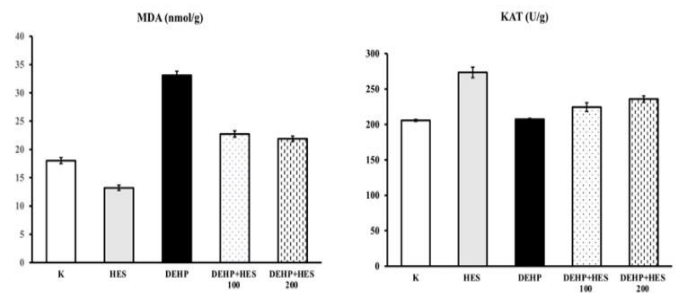
### İstatistiksel Analizler

GSH, SOD, GPx ve AOPP verilerinin normal dağılım gösterdiği Shapiro-wilk testi ile ve varyansların homojen olduğu Levene testi ile belirlendikten sonra gruplar arası farklılıkların tespiti için tek yönlü ANOVA ve Tukey's post hoc testleri kullanıldı. MDA ve KAT değişkenleri normal dağılım göstermediği için Tek Yönlü Varyans Analizi'nin nonparametrik karşılığı olan Kruskal-Wallis testi uygulanmış olup, farklı olan grupları belirlemek için Mann-Whitney U testi yapıldı. Verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS 28.1.1. paket programı kullanılarak yapıldı.  $p < ,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

#### DEHP ve HES Uygulamasının Testis Dokusundaki MDA Seviyesi ve KAT Aktiviteleri Üzerindeki Etkileri

DEHP'nin testis dokusundaki MDA seviyeleri ve KAT aktivitesi üzerindeki etkileri değerlendirilerek bulgular Şekil 1 ve Tablo 1 de gösterilmiştir. Bulgulara göre DEHP uygulanan grubun kontrol grubu değerlerine kıyasla MDA seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir ( $p < .001$ ). DEHP grubunda yükselen MDA seviyelerinin DEHP ile HES uygulanan gruplardan özellikle HES 200 mg/kg grubunda azaldığı tespit edildi ( $p < .001$ ). Antioksidan enzim olan KAT aktivitesi ise DEHP uygulanan grupta önemli oranda azaldığı ancak HES tedavisi özellikle 200 mg/kg dozda önemli miktarda arttığı görüldü.



**Şekil 1.** Testis Dokusu; Malondialdehit (MDA) Malondialdehit (MDA) seviyesi ve Katalaz (KAT) aktiviteleri: K: Kontrol, DEHP: di etilhekzil ftalat, HES: Hesperedin.

**Figure 1.** Testicular Tissue; Malondialdehyde (MDA) Malondialdehyde (MDA) level and Catalase (KAT) activities: K: Control, DEHP: diethylhexyl phthalate, HES: Hesperidin.

**Tablo 1.** DEHP ve HES uygulamalarının oksidatif stres belirteçleri üzerine etkileri.

**Table 1.** Effects of DEHP and HES administrations on oxidative stress markers.

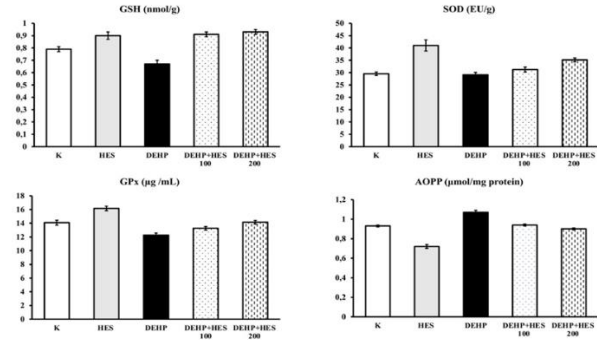
Gruplar	MDA (nmol/g) MED±SD	KAT (U/g) MED±SD
Kontrol	18,3±1,41 <sup>b</sup>	206,68±3,41 <sup>a</sup>
HES 200	13,4±01,21 <sup>a</sup>	271,73±19,77 <sup>d</sup>
DEHP	32,8±1,81 <sup>c</sup>	205,91 ± 3,35 <sup>a</sup>
DEHP+HES 100	23,1±1,48 <sup>c</sup>	221,37±16,57 <sup>b</sup>
DEHP+HES 200	21,2±1,28 <sup>c</sup>	230,01±11,94 <sup>c</sup>
<i>p</i> -	<0,001	<0,001

Aynı sütundaki farklı harfler (a, b, c,d), gruplar arası önemli bir fark olduğunu ifade eder. Testis Dokusu; Malondialdehit (MDA) seviyesi ve Katalaz (KAT) aktiviteleri: K: Kontrol, DEHP: di etilhekzil ftalat, HES: Hesperedin.

**DEHP ve HES Uygulamasının Testis Dokusundaki GSH ve AOPP Seviyesi ve GPx, SOD Aktiviteleri Üzerindeki Etkileri**

DEHP'nin testis dokusunda oluşturduğu oksidatif hasara karşı HES'in etkileri antioksidan enzimler olan GPx ve SOD aktiviteleri ve non-enzimatik bir belirteç olan GSH analizi ile değerlendirilerek bulgular Şekil 2 ve Tablo 2 de gösterilmiştir. Bulgulara göre DEHP tek başına kontrol grubuna kıyasla SOD ve GPx'in önemli ölçüde azalmasına neden olurken, özellikle HES 100 ve HES 200 mg/kg ile ön tedavi SOD ve GPx aktivitesini geri kazandırdı. Non-enzimatik bir antioksidan olan GSH seviyeleri kontrol ve HES uygulanan gruplara göre DEHP grubunda azalırken ( $p < .001$ ), DEHP ile uygulanan HES antioksidanı ile hem 100 mg/kg hem de 200 mg/kg dozunda arttığı tespit edildi ( $p < .001$ ). DEHP'nin testis dokusunda oluşturduğu oksidatif hasara karşı HES'in etkileri oksidan AOPP miktarları değerlendirilerek bulgular Şekil 2 ve Tablo 2'de gösterilmiştir. Bulgulara göre DEHP uygulanan grubun kontrol grubu değerlerine kıyasla AOPP seviyelerini önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir ( $p < .001$ ). DEHP grubunda

yükselen AOPP seviyelerinin DEHP ile beraber uygulanan HES antioksidanı ile özellikle azaldığı tespit edildi ( $p < .001$ ).



**Şekil 2.** Testis Dokusu; Glutasyon (GSH) Düzeyi, Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (KAT), Glutasyon Peroksidaz (GPX) Aktiviteleri ve İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP) düzeyi: K: Kontrol, DEHP: di etilhekzil ftalat, HES: Hesperedin.

**Figure 2.** Testicular Tissue; Glutathione (GSH) Level, Superoxide Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPX) Activities and Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) Level: K: Control, DEHP: diethylhexyl phthalate, HES: Hesperedin.

**Tablo 2.** DEHP ve HES uygulamalarının oksidatif stres belirteçleri üzerine etkileri.

**Table 2.** Effects of DEHP and HES administrations on oxidative stress markers.

Gruplar	GSH (nmol/g) $\bar{x} \pm SE$	SOD (EU/protein) $\bar{x} \pm SE$	GPx (U/mL) $\bar{x} \pm SE$	AOPP $\mu\text{mol/mg}$ protein $\bar{x} \pm SE$
Kontrol	0,79±0,02 <sup>b</sup>	29,54±0,68 <sup>b</sup>	14,08±0,36 <sup>b</sup>	0,93±0,01 <sup>b</sup>
HES 200	0,9±0,03 <sup>a</sup>	41,01±2,25 <sup>b</sup>	16,16±0,33 <sup>a</sup>	0,72±0,02 <sup>c</sup>
DEHP	0,67±0,03 <sup>c</sup>	29,13 ± 0,95 <sup>a</sup>	12,25±0,32 <sup>c</sup>	1,07±0,02 <sup>a</sup>
DEHP+HES 100	0,91±0,02 <sup>a</sup>	31,24±1,04 <sup>c</sup>	13,26±0,26 <sup>bc</sup>	0,94±0,01 <sup>b</sup>
DEHP+HES 200	0,93±0,02 <sup>a</sup>	35,16±0,82 <sup>b</sup>	14,14±0,27 <sup>b</sup>	0,9±0,11 <sup>b</sup>
<i>p</i> -	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Aynı sütundaki farklı harfler (a, b, c), gruplar arası önemli bir fark olduğunu ifade eder. Testis Dokusu; Glutasyon (GSH) Düzeyi, Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GPX) Aktiviteleri ve İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP) düzeyi: K: Kontrol, DEHP: di etilhekzil ftalat, HES: Hesperedin.

## Tartışma

Son yıllarda, insan DEHP'ye maruziyeti ve insan plazmasındaki konsantrasyonu sürekli olarak artmıştır. İnsanların DEHP'ye maruziyeti esas olarak gıda alımı, hava inhalasyonu, dermal emilim ve günlük gıda maruziyetini içerir (Mondal & Bandyopadhyay, 2024). Küçük yaşta çocuklar, ağızlarına götürme davranışları, yere yakın oynamaları ve vücut ağırlıkları ve fizyolojik aşamalarına göre nispeten yüksek gıda kaynaklı maruziyet nedeniyle daha ağır bir yük altında görünmektedir. Çocuklarda plastikleştiricilere, özellikle DEHP'ye maruziyet önemli ölçüde artmıştır (Ma ve ark., 2021). Bebeklerde, DEHP miktarı kg vücut ağırlığı başına 1,7 ila 4,2 mg arasında değişmektedir (Hong ve ark., 2021b). Olgunlaşmamış erkek üreme sistemi, özellikle DEHP olmak üzere EEDC'lere karşı hassastır. Dahası, DEHP'nin olgunlaşmamış testislerde toksik hasara neden olduğu gösterilmiştir (Hong ve ark., 2021b; Ma ve ark., 2021; Mondal & Bandyopadhyay, 2024). Ancak, DEHP kaynaklı testis hasarının kesin mekanizması belirsizdir.

Birçok çalışma, DEHP'nin antioksidan enzim aktivitelerini azalttığını ve bunun da testis hücrelerinde hasara neden olduğunu göstermiştir (Mondal & Bandyopadhyay, 2024). DEHP'nin Leydig hücreleri, germ hücreleri ve sertoli hücrelerinin antioksidan savunma mekanizmalarında bozulmalara neden olduğu, Reaktif oksijen türleri (ROS) içeriğini artırdığı bilinmektedir (Lin ve ark., 2023b). Mevcut çalışmada, DEHP'nin neden olduğu antioksidan enzim aktivitelerindeki azalma, testis dokularında HES tedavisi ile önlenmiştir. Önceki çalışmalar, HES'in antioksidan özellikleri nedeniyle ROS'u temizleyebileceğini, AOPP ve hidroksil radikal oluşumunu önleyebileceğini göstermiştir.

AOPP'nin daha düşük bazal seviyesi, relaps sonrası daha iyi klinik sonuçla ilişkilendirilen tek araştırılan pro-oksidandır (Li ve ark., 2024). İleri oksidasyon protein ürünleri, özellikle albümin olmak üzere, yüksek oranda oksitlenmiş proteinlerin bir ölçüsüdür (Obradovic ve ark., 2021). DEHP grubundaki ratlarda kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek AOPP seviyeleri bulduk. MDA, oksidatif stresin bir biyobelirteci olarak kullanılabilir. Normal fizyolojik koşullar altında, vücudun antioksidan sistemi ROS'u ortadan kaldırabilir. ROS birikimi vücudun temizleme kapasitesini aşarsa, oksidasyon ve antioksidan sistem arasındaki denge bozulur ve oksidatif hasara yol açar. Çalışmalar, DEHP maruziyetinin antioksidan enzim seviyelerini engellediğini ve testislerdeki ROS ve MDA içeriğinin konsantrasyonunu artırdığını göstermiştir (Lin ve ark., 2023b; Mondal & Bandyopadhyay, 2024). Yapılan çalışmada DEHP'in MDA ve AOPP seviyelerini artırdığı daha önceki çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür.

ROS hücre zarlarındaki doymamış yağ asitlerinde peroksidasyona, proteinlerde denatürasyona ve nükleik asitlerde hasara neden olarak hücre yapısının bozulmasına ve sonrasında doku fonksiyonunun kaybına yol açar (Dalkılıç ve ark., 2024). Vücutta ROS'a karşı savunma yapan antioksidan sistemler bulunur. GPx, SOD ve KAT gibi enzimler oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturur. SOD süperoksit radikalinin hidrojen peroksit'e dönüşümünden sorumluyken, hücreler için oldukça toksik bir bileşik olan peroksit, CAT ve GPx tarafından su ve moleküler oksijene parçalanır (Dalkılıç ve ark., 2024). Diğer savunma hattı GSH'dir. GSH oksidatif metabolizma sonucu oluşan serbest radikallere bağlanır ve sonuç olarak oksitlenmiş forma (GSSG) dönüşür ve vücudu oksidatif hasardan korur. ROS'un aşırı üretimi antioksidan kapasitenin aşılmasına ve sonuç olarak oksidatif strese yol açar. Oksidatif stresin DEHP toksisitesindeki ana faktörlerden biri olduğu gerçeği çok sayıda çalışmada varılan ortak bir sonuçtur. Örneğin Helmy ve ark., tarafından yürütülen bir çalışmada DEHP'in antioksidan enzim aktivitelerini inhibe ettiği ve böylece lipid peroksidasyonunu artırarak oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, mevcut çalışmada DEHP'in SOD, CAT ve GPx ile MDA seviyeleri arasında ters korelasyona neden olarak testis dokusunda oksidatif hasarı tetiklediği gözlenmiştir. Öte yandan HES'in serbest radikalleri temizleyerek oksidan kapasitenin aşılmasını önlediği ve antioksidan enzim aktivitelerini geri kazandırarak ve GSH depolarını yenileyerek MDA seviyelerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Helmy ve ark., 2020).

Sunulan çalışmamızdaki bulgularımız mevcut literatür bilgilerini destekleyerek, DEHP'in testis dokusundaki SOD, KAT, GPx aktivitelerini ve GSH seviyelerini azalttığını, MDA ve AOPP seviyelerini ise yükselterek oksidatif hasara yol açtığını göstermiş ve HES tedavisinin bu seviyeleri önemli ölçüde azaltarak oksidatif stres hasarına karşı düzenleyici etkisi olduğu belirlenmiştir. Önceki çalışmalara benzer şekilde mevcut çalışmada, HES'in antioksidan özelliğe sahip olduğu ve oksidatif strese karşı önleyici etkisi olduğu görülmüştür.

Gelecekteki araştırmalar, hesperedinin DEHP kaynaklı testis toksisitesine karşı koruyucu mekanizmalarını daha ayrıntılı olarak incelemelidir. Özellikle, hücresel sinyal yolları, gen ekspresyonu ve epigenetik değişiklikler üzerindeki etkileri araştırılmalıdır. Ayrıca, farklı doz ve uygulama sürelerinin yanı sıra, insan çalışmalarına yönelik transkripsiyonel araştırmalar da önemlidir. Bu tür kapsamlı çalışmalar, hesperedinin DEHP kaynaklı testis toksisitesine karşı potansiyel terapötik kullanımını daha iyi anlamamıza ve insan sağlığına yönelik güvenli ve etkili stratejiler

geliştirmemize katkı sağlayacaktır.

### Sonuç

Sonuç olarak, DEHP'in testis dokusunda oksidatif strese sebep olarak hasara yol açtığını ve HES'in bu zararları hafifletici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, testis dokusunda DEHP kaynaklı hasarı önlemek amacıyla HES'in 200 mg/kg'lık dozunun kullanımının etkili olduğu tespit edildi.

**Etik Komite Onayı:** Etik kurul onayı Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Sayı: 23.07.2024 tarih ve 169 nolu karar) alınmıştır.

**Yazar Katkıları:** Fikir, Veri Toplanması ve/veya İşlemesi; Analiz ve/veya Yorum T.D., Ö.A., Literatür Taraması T.D., Ö.A., Yazıyı Yazan–T.D.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız

**Finansal Destek:** Yazarlar, bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar, çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Teşekkür:** Katkılarından dolayı Prof. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM'a teşekkür ederim.

**Ethics Committee Approval:** Ethics committee approval was obtained from Atatürk University Animal Experiments Local Ethics Committee (Number: 23.07.2024 dated and 169 numbered).

**Author Contributions:** Conception, Data Collection and/or Processing; Analysis and/or Interpretation T.D., Ö.A., Literature Review T.D., Ö.A., Manuscript Writing- T.D.

**Peer-Review:** Externally peer-reviewed.

**Funding:** The authors declared that they received no financial support for this study.

**Declaration of Interests:** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements:** I would like to thank Prof. Dr Betül APAYDIN YILDIRIM for her contributions.

### Kaynaklar

- Aksu, E. H., Kandemir, F. M., & Küçükler, S. (2021). Ameliorative effect of hesperidin on streptozotocin-diabetes mellitus-induced testicular DNA damage and sperm quality degradation in Sprague–Dawley rats. *Journal of Food Biochemistry*, 45(10), e13938. <https://doi.org/10.1111/JFBC.13938>
- Asejeje, F. O., Akano, O. P., Ajiboye, E. O., Adeyemo, O. A., & Ogunro, O. B. (2024). Antioxidant and anti-inflammatory effects of hesperetin in cisplatin-induced male reproductive toxicity in mice. *Comparative Clinical Pathology*, 33(5), 693–704. <https://doi.org/10.1007/S00580-024-03587-1>
- Ball, C. R. (1966). Estimation and identification of thiols in rat spleen after cysteine or glutathione treatment: Relevance to protection against nitrogen mustards. *Biochemical Pharmacology*, 15(7), 809–816. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(66\)90157-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(66)90157-2)
- Baralić, K., Jorgovanović, D., Živančević, K., Buha Djordjević, A., Antonijević Miljković, E., Miljković, M., Kotur-Stevuljević, J., Antonijević, B., & Đukić-Čosić, D. (2021). Combining in vivo pathohistological and redox status analysis with in silico toxicogenomic study to explore the

- phthalates and bisphenol A mixture-induced testicular toxicity. *Chemosphere*, 267, 129296. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.129296>
- Celik, E., Oguzturk, H., Sahin, N., Turtay, M. G., Oguz, F., & Ciftci, O. (2016). Protective effects of hesperidin in experimental testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Archives of Medical Science : AMS*, 12(5), 928. <https://doi.org/10.5114/AOMS.2015.47697>
- Chen, J., Zhao, T., Zheng, X., Kang, L., Wang, J., Wei, Y., Wu, Y., Shen, L., Long, C., Wei, G., & Wu, S. (2024). Protective effects of melatonin on DEHP-induced apoptosis and oxidative stress in prepubertal testes via the PI3K/AKT pathway. *Environmental Toxicology*, 39(2), 952–964. <https://doi.org/10.1002/TOX.24029>
- Çomaklı, S., İleritürk, M., Manavoğlu Kirman, E., Üniversitesi, A., Fakültesi, V., Bölümü, P., Bölümü, B., & Selim, T. (2020). Rutinin Ratlarda Kolistin Kaynaklı Testis Hasarında Oksidatif DNA Hasarı, NF-κB Aracılı Enflamasyon ve Apoptoz Üzerindeki Koruyucu Etkileri. *Turkish Journal of Nature and Science*, 9(2), 83–90. <https://doi.org/10.46810/TDFD.809231>
- Dalkılıç, E., Küçükler, S., & Aydın, Ş. (2024). Kurşun Kaynaklı Oluşan Dalak Toksisitesine Karşı Sinapik Asitin Etkilerinin İncelenmesi. *Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi*, 4(2), 72–77. <https://doi.org/10.62425/JLASP.1418923>
- Erkekoglu, P., Zeybek, N. D., Giray, B., Asan, E., Arnaud, J., & Hincal, F. (2011). Reproductive toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate in selenium-supplemented and selenium-deficient rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 34(4), 379–389. <https://doi.org/10.3109/01480545.2010.547499>
- Góth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196(2–3), 143–151. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90067-M](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90067-M)
- Helmy, H. S., Senousy, M. A., El-Sahar, A. E., Sayed, R. H., Saad, M. A., & Elbaz, E. M. (2020). Aberrations of miR-126-3p, miR-181a and sirtuin1 network mediate Di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced testicular damage in rats: The protective role of hesperidin. *Toxicology*, 433–434, 152406. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2020.152406>
- Hong, Y., Zhou, X., Li, Q., Chen, J., Wei, Y., Long, C., Shen, L., Zheng, X., Li, D., Wang, X., Yu, C., Wu, S., & Wei, G. (2024). X-box binding protein 1 caused an imbalance in pyroptosis and mitophagy in immature rats with di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced testis toxicity. *Genes & Diseases*, 11(2), 935–951. <https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2023.02.030>
- Hong, Y., Zhou, Y., Shen, L., Wei, Y., Long, C., Fu, Y., Wu, H., Wang, J., Wu, Y., Wu, S., & Wei, G. (2021a). Exposure to DEHP induces testis toxicity and injury through the ROS/mTOR/NLRP3 signaling pathway in immature rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 227, 112889. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112889>
- Hong, Y., Zhou, Y., Shen, L., Wei, Y., Long, C., Fu, Y., Wu, H.,

- Wang, J., Wu, Y., Wu, S., & Wei, G. (2021b). Exposure to DEHP induces testis toxicity and injury through the ROS/mTOR/NLRP3 signaling pathway in immature rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *227*, 112889. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112889>
- Li, X., Liu, W., Wang, Y., Zhao, C., Zhu, Q., Dong, Z., & Ma, C. (2024). Incremental values of AOPP, IL-6, and GDF15 for identifying arteriosclerosis in patients with obstructive sleep apnea. *European Journal of Medical Research*, *29*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40001-024-01723-9>
- Lin, Y., Xu, W., Yang, L., Chen, Z., Zhai, J., zhu, Q., Guo, Z., Wang, N., Zhang, C., Deng, H., Wang, S., & Yang, G. (2023a). Mechanism of testicular injury induced by Diethylhexyl phthalate and its protective agents. *Chemico-Biological Interactions*, *381*, 110575. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2023.110575>
- Lin, Y., Xu, W., Yang, L., Chen, Z., Zhai, J., zhu, Q., Guo, Z., Wang, N., Zhang, C., Deng, H., Wang, S., & Yang, G. (2023b). Mechanism of testicular injury induced by Diethylhexyl phthalate and its protective agents. *Chemico-Biological Interactions*, *381*, 110575. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2023.110575>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*, *193*(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Ma, Y. B., Manzoor, R., Jia, P. P., Bian, W. P., Hamid, N., Xie, Z. Y., & Pei, D. S. (2021). Transcriptome and in silico approaches provide new insights into the mechanism of male reproductive toxicity induced by chronic exposure to DEHP. *Environmental Pollution*, *289*, 117944. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.117944>
- Mondal, S., & Bandyopadhyay, A. (2024). Antioxidants in mitigating phthalate-induced male reproductive toxicity: A comprehensive review. *Chemosphere*, *364*, 143297. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2024.143297>
- Nabil, I., Eid, A. A., Yassin, H. A., Abouelrous, R. A., & Solaiman, A. A. (2024). Protective role of hesperidin in finasteride-induced testicular toxicity in adult male Wistar rats: Insights into oxidative stress, apoptosis, and ultrastructure of seminiferous tubules. *Reproductive Toxicology*, *124*, 108535. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2024.108535>
- Obradovic, D., Andjelic, T., Ninkovic, M., Dejanovic, B., & Kotur-Stevuljevic, J. (2021). Superoxide dismutase (SOD), advanced oxidation protein products (AOPP), and disease-modifying treatment are related to better relapse recovery after corticosteroid treatment in multiple sclerosis. *Neurological Sciences*, *42*(8), 3241–3247. <https://doi.org/10.1007/S10072-020-04928-Y>
- Pandey, P., & Khan, F. (2021). A mechanistic review of the anticancer potential of hesperidin, a natural flavonoid from citrus fruits. *Nutrition Research*, *92*, 21–31. <https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2021.05.011>
- Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, *16*(2), 359–364. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90167-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90167-9)
- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., & Hoekstra, W. G. (1973). Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. *Science*, *179*(4073), 588–590. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.179.4073.588>
- Sun, Y., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, *34*(3), 497–500. <https://doi.org/10.1093/CLINCHEM/34.3.497>
- Vijaya Bharathi, B., Jaya Prakash, G., Krishna, K. M., Ravi Krishna, C. H., Sivanarayana, T., Madan, K., Rama Raju, G. A., & Annapurna, A. (2015). Protective effect of alpha glucosyl hesperidin (G-hesperidin) on chronic vanadium induced testicular toxicity and sperm nuclear DNA damage in male Sprague Dawley rats. *Andrologia*, *47*(5), 568–578. <https://doi.org/10.1111/AND.12304>
- Witko, V., Nguyen, A. T., & Descamps-Latscha, B. (1992). Microtiter plate assay for phagocyte-derived Taurine-chloramines. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *6*(1), 47–53. <https://doi.org/10.1002/JCLA.1860060110>
- Yang, L., Yang, B., Lu, D., Peng, Z., Ren, Z., Fang, K., Liu, S., Wang, L., Zhou, J., & Dong, Q. (2020). The dynamic assessment of toxicity and pathological process of DEHP in germ cells of male Sprague Dawley rats. *Reproductive Biology*, *20*(4), 465–473. <https://doi.org/10.1016/J.REPBIO.2020.07.005>