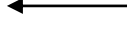


YAĞMUR EMRE ARICAN



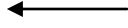
Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak.



DOKTORA TEZİ



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2017



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**NEONİKOTİNOİD GRUBU İNSEKTİSİTLERDEN
ASETAMİPRİD'İN ERKEK ÜREME SİSTEMİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YAĞMUR EMRE ARICAN

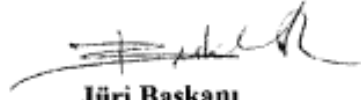
**DANIŞMAN
PROF. DR. GÜL ÖZHAN**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, DOKTORA Programında Doktora öğrencisi Yağmur Emre ARICAN tarafından Prof.Dr. Gül ÖZHAN'ın danışmanlığında hazırlanan "Neonikotinoid Grubu İnsektisitlerden Asetamiprid'in Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 22 /11/ 2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



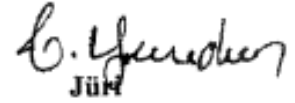
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Buket ALPERTUNGA
İstanbul Üniv. Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı



Jüri-Danışman

Prof.Dr. Gül ÖZHAN
İstanbul Üniv. Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı



Jüri

Prof. Dr. Türkan YURDUN
Marmara Üniv.Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı



Jüri

Prof. Dr. Feriha ERCAN
Marmara Üniv. Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

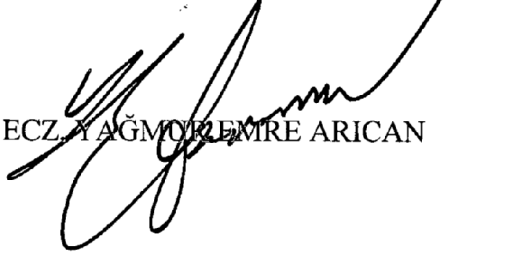


Jüri

Doç. Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI
İstanbul Üniv. Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



ECZ. YAĞMUR EMRE ARICAN



İTHAF

Rahmetli anneannem Sevim ADALIYILMAZ'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli ve sevgili danışmanım Prof. Dr. Gül ÖZHAN'a,

Deneylerimin histoloji ayağının yürütülmesini sağlayan Prof. Dr. Feriha ERCAN ve Bio. Damla GÖKÇEOĞLU KAYALI'ya,

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Buket ALPERTUNGA'ya,

Bilgi ve desteğini esirgemeyen Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sibel ÖZDEN ve Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Alper OKYAR'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında destek olan Doç. Dr. Engin KAPTAN, Ecz. Bahar ULUS, Araş. Gör. Dr. Ezgi ÖZTAŞ, Araş. Gör. Dr. Mehtap VEFAİ, Arş. Gör. Dr. Narin ÖZTÜRK, Ecz. Müzeyyen ÇELİKSÖZ, Bio. Merve ARICI, Bio. Mine ŞENYILDIZ, Bio. Ecem KARAMAN, Kimy. Fatih Mehmet SARI'ya,

Hayvanların temini, bakımı ve uygulamalar sırasında yardımcı olan İ. Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı akademik kadro ve personeline,

Her zaman desteklerini gösteren arkadaşlarım Psk. Uğur SALMAN, Fehmi Tuna ŞAHİN, Abdullah SAVAŞCI, Hüseyin PAMUK'a,

Hayatım boyunca ihtiyaç duyduğum desteği ve sevgiyi sağlayan kız kardeşim Dyt. Sevim ARICAN, annem Gülsün ARICAN, babam Abdullah ARICAN, teyzem Fisun TELAŞ'a,

Çalışmamdaki desteklerinden dolayı teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-22054

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
FORMÜLLER	Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XVİİİ
ABSTRACT.....	XİX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pestisitler.....	3
2.1.1. İnsektisitler.....	7
2.1.2. Asetamiprid.....	11
2.2. Erkek Üreme Sistemi	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Sarflar	24
3.2. Kullanılan Kitler	26
3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler	27
3.4. Deney Hayvanları ve Maruziyet Koşulları	28
3.5. Kan Örneklerinin Toplanması.....	30
3.6. Testislerin Çıkarılması ve Makroskopik İnceleme	31
3.7. Sperm Sayımı ve Morfolojik İnceleme.....	31
3.8. Plazmada Hormon Analizi	34
3.8.1. Testosteron Tayini.....	34
3.8.2. Luteinize Edici Hormon (LH) Tayini	36
3.8.3. Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) Tayini	38
3.8.4. Gonadotropin Salgılayıcı Hormon (GnRH) Tayini	40

3.8.5. İnhibin-B (INHB) Tayini	42
3.8.6. Kolesterol Tayini.....	44
3.9. Plazmada ve Testis Dokusunda Oksidatif Hasar Tespiti	46
3.9.1. Glutasyon (GSH) Tayini.....	47
3.9.2. Malondialdehid (MDA) Tayini	50
3.9.3. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Tayini	52
3.9.4. Total Oksidan Seviye (TOS) Tayini	54
3.9.5. Protein Tayini.....	56
3.10. Testis Dokusunda Histolojik İncelemeler	57
3.10.1. Işık Mikroskopik Preparasyon ve Histolojik Skarlama	57
3.10.2. Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) İmmunohistokimyası.....	58
3.10.3. TUNEL Yöntemi.....	59
3.11. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirmesi	60
4. BULGULAR.....	61
4.1. Genel Etkiler	61
4.1.1. Vücut Ağırlığı	61
4.1.2. Testis Ağırlığı ve Makroskopik İnceleme.....	63
4.1.3. Sperm Sayımı	66
4.1.4. Sperm Morfolojisi	67
4.2. Hormon Seviyeleri Üzerine Etkiler	69
4.2.1. Plazma Testosteron Seviyeleri	69
4.2.2. Plazma LH Seviyeleri	71
4.2.3. Plazma FSH Seviyeleri	73
4.2.4. Plazma GnRH Seviyeleri	76
4.2.5. Plazma İnhibin B (INHB) Seviyeleri	78
4.2.6. Plazma Kolesterol Seviyeleri	80
4.3. Oksidatif Hasar Oluşturma Potansiyelin Değerlendirilmesi.....	83
4.3.1. Plazma ve Dokuda Protein Seviyeleri.....	83
4.3.2. Plazma ve Doku GSH Seviyeleri	84
4.3.3. Plazma ve Doku MDA Seviyeleri.....	87
4.3.4. Plazma ve Doku TAS Düzeyleri	90
4.3.5. Plazma ve Doku TOS Düzeyleri	93
4.4. Histolojik İnceleme	96

4.4.1. Histopatolojik Bulgular ve Seminifer Tübül Skorlaması.....	96
4.4.2. Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) İmmunohistokimyası.....	100
4.4.3. TUNEL Hücre Sayımı	103
5. TARTIŞMA	107
KAYNAKLAR	117
FORMLAR	127
ETİK KURUL KARARI	128
İNTİHAL RAPOR FORMU.....	129
ÖZGEÇMİŞ	130



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Pestisitlerin hedeflerine göre sınıflandırılması (Delaplane 1996).....	3
Tablo 2-2: Türkiye için pestisit kullanım miktarı (Türkiye İstatistik Kurumu-TÜİK 2015).....	6
Tablo 2-3: Başlıca insektisit sınıflarının moleküler hedefleri (Costa 2008).....	7
Tablo 3-1: Deney süresince takip edilen vücut ağırlığı-doz cetveli.	29
Tablo 3-2: Testosteron ELISA kit içeriği.	34
Tablo 3-3: LH ELISA kit içeriği.....	36
Tablo 3-4: LH standart seri hazırlanması.	36
Tablo 3-5: FSH ELISA kit içeriği.....	38
Tablo 3-6: FSH standart seri hazırlanması.	38
Tablo 3-7: GnRH ELISA kit içeriği.	40
Tablo 3-8: GnRH standart seri hazırlanması.	40
Tablo 3-9: INHB ELISA kit içeriği.	42
Tablo 3-10: INHB standart seri hazırlanması.	42
Tablo 3-11: Kolesterol ELISA kit içeriği.	44
Tablo 3-12: Kolesterol standart seri hazırlanması.	44
Tablo 3-13: GSH ELISA kit içeriği.	47
Tablo 3-14: GSH standart seri hazırlanması.	48
Tablo 3-15: MDA ELISA kit içeriği.....	50
Tablo 3-16: MDA standart seri hazırlanması.	50
Tablo 3-17: TAS ELISA kit içeriği.	52
Tablo 3-18: TAS standart seri hazırlanması.	53
Tablo 3-19: TOS ELISA kit içeriği.	54
Tablo 3-20: TOS standart seri hazırlanması.	55
Tablo 3-21: Protein tayin kit içeriği.....	56
Tablo 3-22: Protein tayini standart seri hazırlanması.	57
Tablo 3-23: Modifiye Johnson skorlaması.	58
Tablo 3-24: ApopTag [®] Plus Peroxidaz In Situ Apoptoz kiti içeriği.....	59
Tablo 4-1: Deney hayvanlarının çalışma süresince tespit edilen vücut ağırlıklarındaki değişim.....	62

Tablo 4-2: Deney gruplarının testis ağırlıklarındaki değişim.	64
Tablo 4-3: Testis ağırlıkları için hesaplanan somatik indeks.	65
Tablo 4-4: Deney gruplarının sperm sayıları.	66
Tablo 4-5: Sperm morfoloji sonuçları.	68
Tablo 4-6: 60. Gündeki testosteron seviyeleri.	69
Tablo 4-7: 90. Gündeki testosteron seviyeleri.	70
Tablo 4-8: 60. Gündeki LH seviyeleri.	71
Tablo 4-9: 90. Gündeki LH seviyeleri.	72
Tablo 4-10: 60. Gündeki FSH seviyeleri.	74
Tablo 4-11: 90. Gündeki FSH seviyeleri.	75
Tablo 4-12: 60. Gündeki GnRH seviyeleri.	77
Tablo 4-13: 90. Gündeki GnRH seviyeleri.	77
Tablo 4-14: 60. Gündeki INHB seviyeleri.	79
Tablo 4-15: 90. Gündeki INHB seviyeleri.	79
Tablo 4-16: 60. Gündeki kolesterol seviyeleri.	81
Tablo 4-17: 90. Gündeki kolesterol seviyeleri.	82
Tablo 4-18: Doku protein seviyeleri.	83
Tablo 4-19: Plazma protein seviyeleri.	84
Tablo 4-20: Plazma GSH seviyeleri.	85
Tablo 4-21: Doku GSH seviyeleri.	86
Tablo 4-22: Plazma MDA seviyeleri.	88
Tablo 4-23: Doku MDA seviyeleri.	89
Tablo 4-24: Plazma TAS düzeyleri.	91
Tablo 4-25: Doku TAS düzeyleri.	92
Tablo 4-26: Plazma TOS düzeyleri.	94
Tablo 4-27: Doku TOS seviyeleri.	95
Tablo 4-28: Seminifer tübül skorum sonuçları.	98
Tablo 4-29: Proliferasyon indeksi sonuçları.	100
Tablo 4-30: TUNEL hücre sayımı sonuçları.	103
Tablo 4-31: Apoptotik indeks düzeyleri.	105

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Asetamipridin kimyasal yapısı (Kanungo & Solecki, 2011).	11
Şekil 2-2: Asetamiprid metabolizmasının sıçanlardaki ana yolağı (Kanungo ve Solecki 2011; EFSA 2013).	13
Şekil 2-3: Erkek üreme sistemi (Gümüşel 2013; Öztaş, 2016).	16
Şekil 2-4: Testisin (a), seminifer tübülün (b) ve seminifer tübülde sıralanmış germ hücrelerinin (c) şematik gösterimi (Öztaş 2016).	18
Şekil 2-5: Spermatogenezin şematik gösterimi (Gümüşel 2013; Mescher 2015; Öztaş 2016).	20
Şekil 2-6: Spermiyogenez sırasında gerçekleşen değişimlerin şematik gösterimi (Gümüşel 2013; Öztaş 2016)	21
Şekil 3-1: Deney hayvanı bakım ünitesi.	28
Şekil 3-2: Normal ve anomalili spermlerin morfolojik farklılıkları (Şekiller tez çalışmasındaki verilerden alınmıştır).	33
Şekil 4-1: Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarındaki değişim.	61
Şekil 4-2: Deney hayvanlarının ilk ve son tartımlarındaki vücut ağırlıkları.	63
Şekil 4-3: Testis ağırlıklarının deney gruplarındaki somatik indeksi.	65
Şekil 4-4: Deney gruplarındaki ortalama sperm sayıları.	67
Şekil 4-5: Anomalili sperm düzeyleri (%).	68
Şekil 4-6: Testosteron tayini için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.	69
Şekil 4-7: Plazma testosteron seviyelerinin karşılaştırılması.	70
Şekil 4-8: LH'a ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.	71
Şekil 4-9: Plazma LH seviyelerinin karşılaştırılması.	73
Şekil 4-10: FSH'a ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.	73
Şekil 4-11: Plazma FSH seviyelerinin karşılaştırılması.	75
Şekil 4-12: GnRH'a ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.	76
Şekil 4-13: Plazma GnRH seviyelerinin karşılaştırılması.	78
Şekil 4-14: INHB'ye ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.	78
Şekil 4-15: Plazma INHB seviyelerinin karşılaştırılması.	80
Şekil 4-16: Kolesterolle ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.	80
Şekil 4-17: Plazma kolesterol seviyelerinin karşılaştırılması.	82

Şekil 4-18: GSH'a ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.	84
Şekil 4-19:Plazma GSH seviyelerinin karşılaştırılması.	85
Şekil 4-20: Doku GSH seviyelerinin karşılaştırılması.	87
Şekil 4-21: MDA'ya ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.	87
Şekil 4-22: Plazma MDA seviyelerinin karşılaştırılması.	88
Şekil 4-23: Doku MDA seviyelerinin karşılaştırılması.	90
Şekil 4-24: TAS'a ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.	90
Şekil 4-25: Plazma TAS düzeylerinin karşılaştırılması.	91
Şekil 4-26: Doku TAS düzeylerinin karşılaştırılması.	93
Şekil 4-27: TOS'a ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.	93
Şekil 4-28: Plazma TOS düzeylerinin karşılaştırılması.	94
Şekil 4-29: Doku TOS seviyelerinin karşılaştırılması.	96
Şekil 4-30: H&E boyası ile seminifer tübül histopatolojik görüntüleme.	97
Şekil 4-31: Seminifer tübül skorlamalarının karşılaştırılması.	98
Şekil 4-32: PAS boyası ile seminifer tübül histopatolojik görüntüleme.	99
Şekil 4-33: PCNA immünohistokimyası ile görüntüleme.	101
Şekil 4-34: Proliferasyon indeksi karşılaştırılması.	102
Şekil 4-35: TUNEL boyama ile seminifer tübül histopatolojik görüntüleme.	104
Şekil 4-36: TUNEL değerlerinin karşılaştırılması.	105
Şekil 4-37: Apoptotik indeks düzeylerinin karşılaştırılması.	106

FORMÜLLER

Formül 3-1: Proliferasyon indeksi	59
Formül4-1: Somatik indeks (Nelli ve ark., 2013; Öztaş, 2016).....	64



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KISALTMA	AÇIKLAMA
%	Yüzde oran
×g	Kütle çekim ivmesi
°C	Santigrat derece
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
4-HNE	4-Hidroksinonenal
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABP	Androjen bağlayıcı proteinleri
ADI	Kabul edilebilir günlük alım
ALP	Alkalın fosfataz
ALT	Alanin transaminaz
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
BHC	Benzen heksaklorid
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CASA Group	Bilgisayar destekli sperm analiz (Computer Asisted Sperm Analysis) grubu
CAT	Katalaz
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DDT	Dikloro difenil trikloroetan
DHT	5α-Dihidrotestosteron
dk	Dakika
DMEM-F12	Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri:Besleyici karışım F-12
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dUTP	Deoksiuridin trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit

EEC	Avrupa Ekonomi Topluluğu
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu
ELISA	Enzim-bağı İmmün Yöntem
EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
EtBr	Etidyum bromür
FBS	Fetal sığır serumu
FSH	Folikül stimüle edici hormon
g	gram
GABA	Gamma-aminobütirik asit
GnRH	Gonadotropin salgılayıcı hormon
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyonun redüktaz
GSH	Glutasyon
H&E	Hematoksilin ve Eosin
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCH	Heksakloroheksan
HCl	Hidroklorik asit
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HPG	Hipotalamik-pitüitar-gonadal
HRP	Horseradish peroksidaz
IC-O	6-Kloronikotinik asid
IC-O-Gly	6-Kloronikotinik asid-glisin
IgG	Immunoglobülin G
IM-1-3	N-[(6-kloro-3-piridil) metil]-N-metilasetamid
IM-1-4	N-metil (6-kloro-3-piridil) metilamin
IM-2-1	N1-[(6-kloro-3-piridil) metil]-N2-siyanoasetamidine
IM-2-3	N-[(6-kloro-3-piridil) metil] asetamid
IM-2-4	(6-kloro-3-piridil) metilamin
IM-O	(6-kloro-3-piridil) metanol
INHB	İnhibin B
IS-2-1	N-siyanoasetamidin
IU	Uluslararası ünite
IUPAC	Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği

LD ₅₀	Letal doz 50
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LH	Luteinize edici hormon
LMA	Düşük kaynama dereceli agar
M	Molar
MDA	Malondialdehid
MeS-IC-O	Mesitilen-6-kloronikotinik asid
ml	Mililitre
NaCl	Sodyum klorür
NADH-CoQ redüktaz	Okside nikotinamid adenin dinükleotid-koenzim Q redüktaz
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
NIH	Ulusal Sağlık Enstitüsü
nm	Nanometre
NMA	Normal kaynama dereceli agar
NOAEL	Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz
NTP	Nükleotid trifosfatlar
One Way ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
<i>p</i>	Olasılık değeri (probability)
PAS	Periodik asit schiff
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCNA	Prolifere hücre çekirdek antijeni
ppm	Milyonda bir (Parts per million)
PPR	Bitki koruma ürünleri ve kalıntıları üzerine panel
ROS	Reaktif oksijen türü
Rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
sER	Granülsüz endoplazmik retikulum (smooth endoplasmic reticulum)
sn	Saniye
SOD	Süperoksit dismutaz
Str-HRP	Streptavidin-horseradish peroksidaz
T	Testosteron
TAS	Total antioksidan seviyesi

TdT	Terminal deoksinükleotidil transferaz
TEPP	Tetraetilpirofosfat
TİSİT	Tarım İlaçları Sanayici, İthalatçı ve Temsilcileri Derneği
TMB	Tetrametilbenzidin
TOS	Total oksidan seviyesi
TUNEL	dUTP belirteçliğinde TdT enzimi ile DNA çentik uçların etiketlenmesi (TdT dUTP Nick End Labelling)
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
U	Unite
v.a.	Vücut ağırlığı
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
α -GSU	α -Glikoprotein alt birimi

ÖZET

Arıcan, Y.E. (2017). Neonikotinoid Grubu İnsektisitlerden Asetamiprid'in Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Neonikotinoid grubu pestisitlerden asetamiprid Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Asetamipridin sinir, solunum, üreme ve bağışıklık sistemi bozukluklarına, karaciğer ve böbrekte tümör gelişimine sebep olduğu rapor edilmiş, ancak, mesleki maruziyet ve günlük yaşamda tüketilmesi ile uzun süreli ve düşük düzeylerde maruziyette erkek üreme sistemine etkileri açıklık kazanmamıştır.

Çalışmamızda; erkek Sprague-Dawley cinsi sıçanların asetamipride düşük dozlarda (12,5; 25 ve 35 mg/kg vücut ağırlığı) ve 90 günlük subkronik maruziyetinin erkek üreme sistemi üzerine toksik etkileri ve etki mekanizmaları araştırılmıştır. Plazma ve testiste oksidatif hasar ve biyokimyasal parametreler, histolojik incelemeler ve sperm kalitesi değerlendirilmiştir. Sperm sayısı doza bağlı düşerken anomalili sperm sayısında paralel artış gözlemlendi. Luteinize edici hormon (LH), folikül stimüle edici hormon (FSH), gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH) ve inhibin-B (INHB) seviyeleri düşük ve orta doz grubunda artarken yüksek doz grubunda azaldı. Testosteron ve kolesterol seviyeleri doza bağımlı azaldı. Maruziyet konsantrasyonlarına bağlı olarak oksidatif hasar göstergelerinden Total antioksidan seviyesi (TAS) ve glutatyon (GSH) seviyeleri düşüş gösterirken, total oksidan seviyesi (TOS) ve malondialdehit (MDA) seviyelerinde artış tespit edildi. Oksidatif hasar göstergelerinde plazma ve doku düzeyleri paralellik gösterdi. Histolojik verilere göre ise; apoptoz seviyeleri doza bağımlı şekilde artarken düşük düzey seminifer tübül skoru ve proliferasyon indeks seviyesi gözlemlendi.

Asetamipridin testislerde oksidatif hasara bağlı olarak sperm seviyesi ve kalitesini düşürdüğü, hormon seviyelerini bozduğu, apoptoza gidişi indüklediği, proliferasyonu önlediği gözlemlendi. Erkek üreme sistemi üzerine toksik etki potansiyeli ile ilgili araştırmaların yeterli olmaması sebebiyle elde edilen verilerin literatüre önemli katkı sağlayacağına inanılmakta olup çevresel ve mesleki maruziyetlere karşı gerekli önlemlerin alınmasının yerinde olacağı açıkça görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Asetamiprid, Erkek Üreme Sistemi, Oksidatif Hasar, Apoptoz, Testis.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-22054.

ABSTRACT

Arıcan, Y.E. (2017). Investigation of Effects of Acetamiprid, a Neonicotinoid Insecticide, on Male Reproductive System. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Doctorate Thesis. İstanbul.

Acetamiprid is one of the most preferred and widely used neonicotinoids in Turkey. Several studies showed that acetamiprid may cause toxic effects on several organ systems including nervous, respiratory, reproductive, and immune as well as may play role in tumour development in liver and kidney. The toxic effects and mechanism of acetamiprid have not been clarified on male reproductive system in both agriculture labourers and food consumers.

In our study, after 90 daily subchronic exposure of male Sprague-Dawley rats to acetamiprid in low doses (12,5; 25 and 35 mg/kg body weight), the toxic effects and mechanisms of acetamiprid were researched. In blood and testis, oxidative damage, biochemical and histological parameters, and sperm quality were evaluated.

Acetamipride caused to increase the sperm anomalies. The luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), gonadotropin releasing hormone (GnRH), and inhibin-B (INH-B) levels were decreased in the high dose group. The cholesterol level decreased while testosterone level increased with dose-dependent pattern. The plasma total antioxidant status (TAS) and glutathione (GSH) levels fall in a dose-dependent manner, while total oxidant status (TOS) and malondialdehyde (MDA) levels are elevated. Apoptosis increased, and seminiferous tubule scoring and proliferation index levels decreased. Acetamiprid caused increasing oxidative damages, lowering sperm level and quality, breaking hormone levels, accelerating apoptosis. It would be appropriate to take the necessary measures against environmental and occupational exposures that acetamiprid could exert toxic effects on the male reproductive system. The data would contribute to the literature about the toxic effects of acetamiprid on male fertility.

Key Words: Acetamiprid, Male Reproductive System, Oxidative Damage, Apoptosis, Testis.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: TDK-2016-22054.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endüstriyel ve teknolojik gelişmeler hayatı kolaylaştırmakla birlikte insan sağlığı üzerine olumsuz etkilere de sebep olmaktadır. Çevresel kirleticilerin uzun süreli ve tekrarlanan maruziyet durumlarında gelişim ve üreme sistemi üzerine toksik etki potansiyellerinin olması her geçen gün araştırmacıların dikkatini çekmekte ve özellikle günümüzde oldukça sık görülen infertilite nedenlerinin önemli bir kısmını oluşturduğu düşünülmektedir. Önemli çevresel kirleticilerden olan pestisitlerin hava, su ve toprak ile besin zinciri yoluyla insanlara önemli düzeylere ulaşmakta olduğu bilinmektedir. Sıklıkla kullanılan organofosfat ve karbamat grubu pestisitler, yerini son yıllarda ışığa dayanıklı olmaları ve memelilere oranla böceklerde daha yüksek toksisite göstererek yüksek selektiviteye sahip olmaları nedeniyle neonikotinoidlere bırakmakta ve neonikotinoidler başta bu özellikleri nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedirler.

Nikotinik asetilkolin resöptörlerinin selektif agonisti olan neonikotinoid grubu insektisitlerden asetamiprid; Çukurova başta olmak üzere Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde kullanımı oldukça yaygın bir pestisittir. Yapılan çalışmalarda; oral uygulama sonrası hızlı ve geniş çapta absorbe olan, karaciğer, böbrek, adrenal ve tiroid bezlerinde yüksek konsantrasyona ulaşarak tüm vücuda dağılan ve %90'dan fazlası idrarla atılan asetamipridin yüksek oranda metabolize olduğu gözlenmiştir. Doza bağlı genel toksisite belirtileri; kaşıntı, titreme, konvülsiyon, midriyazis ve lateral pozisyon, salivasyonda artış ve ataksi olmakla birlikte uzun dönemli çalışmalarda vücut ağırlığında azalma, yiyecek tüketimi, serum total kolesterol seviyesinde artış gibi etkilere gözlemlendiği tespit edilmiştir. Genotoksik, nörotoksik ve sitotoksik etkileri de gözlenmiş olan asetamipridin etkili olduğu hedef organın esas olarak karaciğer ve böbrek olduğu gözlenmiştir. Ancak, uzun süreli, tekrarlanan ve düşük dozlarda maruziyet durumlarında çevresel ksenobiyotiklerin endokrin ve üreme sistemini potansiyel etkili olduklarının göz ardı edilmemesi gerektiği düşünüldükçe asetamipridin üreme sistemi üzerine etkilerinin değerlendirilmesinin yerinde olacağı kanatine varılmıştır.

Asetamipridin uzun dönem maruziyetlerinde erkek üreme sistemini etkileyebileceği yönünde bazı veriler rapor edilmiş olmakla birlikte henüz netlik kazanmamıştır. "Neonikotinoid Grubu İnsektisitlerden Asetamiprid'in Erkek Üreme

Sistemi Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez projesinde bu konu toksik etkiler yanı sıra etki mekanizmaları yönünden de araştırılmıştır. Doksan günlük subkronik maruziyet süresinde düşük, orta ve yüksek doz olmak üzere üç ayrı doz grubunda asetamipride maruz bırakılan Sprague-Dawley türü erkek sıçanlarda üreme sistemi üzerine toksik etkilerinin ve olası etki mekanizmalarının rutin ve histolojik gözlemler, ilgili hormon düzeylerinin, sperm kalitesinin, oksidatif hasar ve apoptoz parametrelerinin tetkiki ile asetamipride maruz kalmayan kontrol grubuna kıyaslama yapılarak aydınlatılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pestisitler

İnsanoğlu tarih boyunca yenilebilir bitki ve hayvanlar konusunda edindikleri bilgi ve teknoloji sayesinde yüksek üretkenliği elde etmiş; hastalıkları, böcek, kemirgen gibi zararlıları kontrol ederek artan nüfusa rağmen gıda gereksinimlerini karşılamayı başarmıştır. Bilindiği üzere insanların gıda kaynaklarını, sağlıklarını ve konforlarını tehlikeye atan böcek, kemirici, yabancı ot, mantar, parazit gibi canlılara pest, bu zararlılarla mücadelede zararlıların çoğalmasını önleyen, uzaklaştıran veya popülasyonlarını azaltan ürünlere ise pestisit denir (Table 2-1) (Delaplane 1996). Pestisitler genel olarak tarım alanlarında kullanıldıkları gibi ayrıca evlerde, açık ve kamusal alanlarda da kullanılmaktadır. Pestisitler sıvı, toz, granül, pellet, çözünebilir toz, gaz gibi değişik formlarda piyasada bulunmaktadır (Schwartz ve ark. 2004). Hastalıklar ve zararlılar ile mücadelede, gıda üretiminin ve verimliliğin artırılmasında, ekosistemdeki dengenin korunmasında pestisit kullanımı vazgeçilmez olarak değerlendirilmekle birlikte ulusal ve uluslararası kurum ve kuruluşlar tarafından yapılan çalışmalarda çok sayıda araştırmacı tarafından riskleri rapor edilmiştir (Delaplane 1996). Bu sebeple; daha güvenli, zararlıya selektif etkili pestisitler üretilmesi, daha iyi uygulama yöntemlerinin geliştirilmesi, pestisit kullanımı ve üretimine dair yönetmeliklerin çıkarılması ile pestisit kullanımından kaynaklanan risklerin minimuma indirilmesi asıl amaçtır.

Tablo 2-1: Pestisitlerin hedeflerine göre sınıflandırılması (Delaplane 1996).

Pestisit tipi	Hedef zararlı
Akarisit	Akar, kene ve örümcekler
Herbisit	Yabancı otlar
İnsektisit	Böcekler
Mollusisit	Salyangozlar, yumuşakcalar
Nematisit	Nematodlar
Rodensit	Kemirgenler
Fungisit	Mantarlar, küfler

Pestisitler tarih boyunca kullanılmıştır (Delaplane 1996; Costa 2008). M.Ö. 1500’lerde yazılmış olan Ebers papirüslerinde pirelere karşı hazırlanan preparat listeleri bulunmaktadır (Costa 2008). M.Ö. 1000 dolaylarında Aristoteles, Homer ve Kato’nun eserlerinde çeşitli yağ spreyleri, sülfür merhemleri, tuz ve fumigantların tarımda kullanıldığına dair ibareler vardır (Delaplane 1996; Costa 2008). Plinius’un 23-79 yılları arasındaki uygulamaların anlatıldığı *Doğa Tarihi* isimli kitabında pestisit kullanımıyla ilgili çok sayıda anekdotlar verilmiştir. Yunan hekim Dioscorides (40-90) tarafından kükürt ve arseniğin toksik özellikleri olduğu bildirilmiştir. Çin’de bulunan 900’lü yıllara dayanan kayıtlara göre arsenik sülfid bahçe zararlılarına karşı kullanılmıştır (Costa 2008). 17. Yüzyıldaki tarım devrimiyle kullanılan kimyasalların sayısı ve çeşidi 1940’lı yıllara kadar her geçen gün artmaya başlamıştır. 1600’lerde karıncalara karşı bal ve arsenikten yapılan bir karışım, bitki bitine karşı tütün kullanılmıştır (Delaplane 1996; Costa 2008). Bakırın fungisidal etkisi 1800’lerin başlarından beri bilinmekte olup Bourdeaux karışımı olarak 1883’de Fransa’da kullanılmaya başlanmıştır. 1890’lı yıllardan sonra cva türevleri fungusit olarak kullanılmıştır (Costa 2008). 19. Yüzyılın sonlarına doğru bakır arsetoarsenit, kalsiyum arsenat, nikotin sülfat ve sülfür gibi kimyasallar Amerikalı çiftçiler tarafından tarlalarda kullanılmış, ancak ilkel kimya ve uygulama metodları yüzünden tatmin edici sonuçlar alınamamıştır (Delaplane 1996; Yu 2008).

Pestisit kullanımında artış 2. Dünya Savaşı sonrasında diklorodifeniltrikloroetan (DDT), benzen heksaklorid (BHC), aldrin, dieldrin, endrin ve 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D)’nin piyasaya sürülmesine rastlar. Bu kimyasallar ucuz ve etkili olmalarından dolayı son derece rağbet görmüştür. Özellikle DDT, zararlılara karşı olağanüstü geniş spektruma sahip olması sayesinde, piyasada geniş bir yer bulmuştur. Ancak, DDT’nin kontrolsüz ve sürekli kullanımı zararlıların direnç kazanmasına, hedef dışı bitki ve hayvanların zarar görmesine, pestisit kalıntılarının risk oluşturmaya yol açmıştır (Delaplane 1996; Yu 2008). 1930’larda organofosfatlı insektisitler, 1950’lerde karbamat türevi insektisitler ve sonrasında da yüzlerce değişik yapıda insektisit geliştirilmiş olup organofosfatlardan ilk olarak tetraetilpirofosfat (TEPP) 1944 yılında piyasaya sürülmüştür (Costa 2008).

Günümüzde kimyasal kullanımını azaltmak amacıyla değişik teknikler denenmektedir. Örneğin; *Bacillus thuringiensis*’in salgıladığı δ -endotoksin isimli

protein yapısındaki maddeyi kodlayan genlerin zararlıların hedefindeki bitkilere aktarılması yönünde biyoteknolojik yöntemlerin de devreye girmesi ile zararlılarla mücadelede farklı bir yola girilmiştir (Ford 2008). Ancak maliyet, etkinlik ve kullanım alanının darlığı gibi sebeplerle kimyasal mücadelelerden daha ileri bir teknik olarak değerlendirilememektedir.

Rachel Carson'un 1962'de yayımlanan *Sessiz Bahar* adlı kitabı halk arasında geniş bir etki yaratmış, pestisit kullanımı konusunda bilinçlenmeye yol açmıştır. Konu ile ilgili yapılan çalışmaların zararlıya hedeflenmiş pestisit geliştirilmesi, pestisit kullanımının azaltılarak doğru ekim metotlarının kullanımın yaygınlaştırılması, entegre zararlı yönetimi gibi akılcı yöntemlerin kullanımının oturtulmasına odaklanmasına sebep olmuştur (Delaplane 1996). Literatür bilgisine göre; 2025'e kadar sekiz milyarı geçeceği tahmin edilen dünya nüfusunun gerek gıda gereksiniminin karşılanması gerekse de tekstil ihtiyaçlarının giderilmesi için daha fazla tarımsal ürüne gereksinim duyulacaktır. Bu da gittikçe pestisit kullanımının daha da artacağına işaret olarak değerlendirilebilir (Yu 2008). Ancak, pestisitlerin insan ve çevre sağlığı üzerine akut veya kronik toksik etkilerinin olabileceği çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmektedir (Delaplane 1996). Bu iki durum bir arada değerlendirilmelidir.

Pestisitlerin zararları kimyasalın tipine ve konsantrasyonlarına göre değişim gösterecektir. Aynı zamanda, maruziyet miktarı, süresi ve yolu toksik etkiyi belirleyen ana faktörlerdir. Pestisitlere başlıca maruziyet yolu; oral, inhalasyon ve dermal yoldur (Schwartz ve ark. 2004). Oral maruziyet genelde özkıyım amaçlı ya da uygun olmayan yerlerde saklanması sebebiyle kaza ile meydana gelmektedir (Costa 2008). Bununla birlikte solunum ve deri yolu ile pestisit uygulayıcıları, tarım işçileri yüksek risk altındadır. Pestisitlerin zararlı etkilerine karşı yeni doğanlar, küçük çocuklar, yaşlılar ve kronik rahatsızlığı olanlar daha da duyarlıdır (Schwartz ve ark. 2004).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde pestisitlerle ilgili kontroller Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (US Environmental Protection Agency, EPA) tarafından yapılmaktadır (Delaplane 1996). EPA tarafından kullanımı onaylanan yaklaşık 900 aktif bileşiğin %28'i herbisit, %25'i insektisit, %20'si fungusit/nematosit, %4 rodentisit ve %23'ü biosittir (Yu 2008). Avrupa Birliği'nin Eurostat verilerine göre (http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=aei_fm_salpest09&lang=en) en çok fungusit ve bakterisit tüketimi İtalya'da, herbisit tüketimi Fransa'da, insektisit ve

akarisit tüketimi İspanya’da, mollusit tüketimi Fransa’da, bitki büyüme düzenleyicisi tüketimi Almanya’da ve diğer bitki koruyucu ürünlerin tüketimi ise İspanya’da bulunmaktadır (Eurostat 2017). Avrupa Birliğinde pestisitlerin ruhsatlandırılması dual bir sisteme dayanmaktadır. Öncelikle etken maddelerin Avrupa Komisyonuna bağlı Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (European Food Safety Authority, EFSA) tarafından onaylanması gerekmektedir. Ticari ürünlerin piyasaya çıkması için piyasaya çıkacağı ülkenin kendi ulusal yasalarıyla düzenlenmiş otoriteleri tarafından onaylanması gerekmektedir (Erbach 2012; EFSA). EFSA veritabanında pestisit olarak kullanımı onaylanmış 491 etken madde bulunmaktadır (European Commission 2016). Kabul edilebilir günlük alım (Acceptable daily intake, ADI) değeri pestisitler için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ, World Health Organisation, WHO) tarafından ilan edilmiştir (Costa 2008; Kanungo ve Solecki 2011).

Türkiye’de pestisitlerin ruhsatlandırılması Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına 5996 sayılı yasa ile verilmiştir (Tarım İlaçları Sanayici, İthalatçı ve Temsilcileri Derneği (TİSİT); Resmî Gazete 2010). Bakanlığın veritabanı kontrol edildiğinde 574 ruhsatlı aktif madde grubu ve 4.768 ruhsatlı tarım ilacı bulunmaktadır (Bitki Koruma Ürünleri Daire Başkanlığı 2015-2017). Türkiye’de pestisit kullanımı Tablo 2-2’de görüldüğü üzere 2011’den itibaren düşme eğiliminde olup en yüksek kullanım fungusitlerdedir (TÜİK 2015).

Tablo 2-2: Türkiye için pestisit kullanım miktarı (Türkiye İstatistik Kurumu-TÜİK 2015)

Kullanım miktarı (Ton)							
	İnsektisit	Fungusit	Herbisit	Akarisit	Rodentisit	Diğer	Toplam
2006	7 628	19 900	6 956	902	3	9 987	45 376
2007	21 046	16 707	6 669	966	51	3 277	48 716
2008	9 251	17 863	6 177	737	351	5 613	39 992
2009	9 914	17 396	5 961	1 533	78	2 302	37 184
2010	7 176	17 546	7 452	1 040	147	5 344	38 705
2011	6 120	18 124	7 407	1 062	421	6 978	40 112
2012	7 264	15 525	7 351	859	247	8 766	40 012
2013	7 741	16 248	7 336	858	129	7 128	39 439
2014	7 586	16 674	7 794	1 513	149	6 007	39 722
2015	8 117	15 984	7 825	1 576	197	5 327	39 026

2.1.1. İnsektisitler

İnsektisitler; böcekleri öldürerek veya onların zararlı olduğu varsayılan davranışlarına karşı mücadeleyle karşı konulmasını sağlayarak kontrol eden kimyasal veya biyolojik ajanlardır (Ford 2008). Her insektisit bir genel ada, bir ticari ve kimyasal isme sahiptir. Genel isim profesyonel bilim toplulukları tarafından aktif bileşiği belirtmek amacıyla verilir. Piyasaya ticari isimleriyle sürülürler ve bir aktif bileşiği içeren eşdeğer veya eşdeğer olmayan bir çok ticari ürün piyasada bulunabilir. Kimyasal adlandırma IUPAC kurallarına göre yapılır (Yu 2008). Bugün kullanılan tüm insektisitler; hedef organizmanın sinir sistemini zehirleyerek etkisini gösteren nörotoksikan maddelerdir (Costa 2008). Son yıllarda nikotin gibi doğal kaynaklı veya neonikotinoidler gibi sentez ürünü kimyasalların kullanımı oldukça artmış durumdadır (Ford 2008).

Tablo 2-3: Başlıca insektisit sınıflarının moleküler hedefleri (Costa 2008).

Hedef	Grup	Etkisi
Asetilkolinesteraz enzimi	Organofosfatlar	İnhibisyon
	Karbamatlar	İnhibisyon
Sodyum kanalları	Piretroitler (Tip 1 ve 2)	Aktivasyon
	DDT	Aktivasyon
	Dihidropirazollar	İnhibisyon
Nikotinik asetilkolin reseptörleri	Nikotin	Aktivasyon
	Neonikotinoidler	Aktivasyon
GABA reseptör kapılı klorür kanalları	Siklodienler	İnhibisyon
	Fenilpirazoller	İnhibisyon
	Piretroitler (Tip 2)	İnhibisyon
Glutamat kapılı klorür kanalları	Avermektinler	Aktivasyon
Oktopamin reseptörleri	Formamidinler	Aktivasyon
Mitokondriyel kompleks I	Rotenitler	İnhibisyon

Başlıca insektisit grupları;

Organoklorlu insektisitler; genel olarak sinir sisteminde uyarıyı bloke ederek etki gösterirler. Heksaklororoheksan (HCH), aldrin gibi siklodienler, toksafen gibi polikloroterpenler bu gruba örnek pestisitlerdir. En bilineni DDT'dir ve ilk modern insektisittir (Yu 2008). Alman kimyacı Othmar Zeidler tarafından 1874'de keşfedilen DDT'nin 1939'da insektisit özelliğini ortaya koyan Dr. Paul Muller; malarya, tifüs, sarıhumma ve diğer böcekler tarafından taşınan hastalıkların kontrolünde etkili bir

şekilde DDT'nin kullanılmasından ötürü 1948'de Nobel'in tıp alanındaki ödülünü almıştır (Whitacre ve Ware 2004; Ford 2008; Yu 2008). Bu grubun toksisitesi; organofosfatlar ve karbamatlar gibi diğer insektisitlerle karşılaştırıldığında daha düşük olmakla birlikte düşük suda çözünürlük ve buhar basıncı ile güneş ışığına dayanıklılığı sayesinde sahip olduğu çevre kalıcılığı ve yüksek lipofilik özelliği ve metabolik stabilitesi sayesinde hedef olmayan organizmalardaki biyobirikimi ile kullanımı yasaklanmıştır (Ford 2008; Yu 2008).

Organofosfatlı insektisitler; asetil kolin esterase enzimini pratikte geri dönüşümsüz inhibe ederler. 2. Dünya Savaşı sırasında Almanya'nın çok zehirli olması nedeniyle üzerinde çalıştığı sarin, soman ve tabun sinir gazları olarak kimyasal silah şeklinde kullanılmış olup yapılan çalışmalar sırasında insektisit özelliklerinin de olduğu görülmüştür (Whitacre ve Ware 2004). Malation gibi alifatikler, profenos gibi fenil türevleri, diazinon gibi heterosiklik türevleri bu gruba örnek olabilecek insektisitlerdir. Bu sınıfın genel özellikleri; omurgalılar için en toksik sınıf olmakla birlikte stabil ve kalıcı olmamalarıdır (Whitacre ve Ware 2004; Ford 2008).

Karbamatlar; karbamik asit esterleridir. Memelilere karşı çok düşük oral ve dermal toksisite gösterirler ve böceklerle karşı geniş spektruma sahiptirler. Kolinesteraz enziminin karbamilasyonu ile organofosfatlı insektisitlerin aksine enzim inhibisyonları geri dönüşümlüdür. Karbaril, metiokarb, primikarb bu gruba örnek verilebilir (Whitacre ve Ware 2004; Yu, 2008).

Piretroitler; Krizantem cinsi bitkilerin (*Chrysanthemum cinerariaefolium* ve *Chrysanthemum coccineum*) çiçeklerinden elde edilen doğal piretrinler pahalı ve güneş ışığına karşı dayanıksız olmaları sebebiyle tarımda kullanılmaz (Whitacre ve Ware 2004; Ford 2008; Yu 2008). Öğütülmüş kuru çiçekler 19. yüzyılın başlarında Napolyon Savaşlarında vücut bitinin kontrolünde bit tozu olarak kullanılmıştır. 6 etkin madde içerir; önem arz edenleri piretrin I, II ve sinerin I, II'dir. Piretrum analogu sentetik piretroitler; hem güneş ışığına dayanıklıdır hem de birçok tarım zararlısı böceğe karşı etkilidir. DDT benzeri etki gösteren aksonik zehir olan pretroidler nöron membranında sodyum kanallarının devamlı açık kalmasına sebep olurlar. Böceklerin hem periferik hem de merkezi sinir sistemini etkilerler. Sinir hücrelerinin tekrarlayan deşarjlar üreterek paralyze olmasına sebep olur. Alletrin (1. kuşak), tetrametrin (2. kuşak), permetrin (3.

kuşak), sipermetrin, teflutrın (4. kuşak) bu gruba örnek verilebilir (Whitacre ve Ware 2004; Yu 2008).

Diğer grup insektisitler; amitraz, foretanat gibi formamidin grubu insektisitler, norepinefrin ve serotoninin yıkımında görev alan monoaminoksidaz enzimini inhibe ederek biyogen aminlerin birikimine, dolayısıyla da böceklerin hareketsiz kalarak ölmesine sebep olurlar. Özellikle organofosfat ve karbamat grubu insektisitlere dirençli zararlıların kontrolünde kullanılırlar. Dinokap gibi dinitrofenol grubu insektisitler aynı zamanda herbisit, fungusit ve ovisit etkilidirler, ancak, yüksek toksisiteleri nedeniyle kullanılmamaktadır. Oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek ATP oluşumunu önlerler. Tebufenpirad gibi pirazol grubu insektisitler NADH-CoQ redüktaz bölgesinde mitokondriyal elektron transportunu inhibe ederek ATP yapımını bozarlar (Whitacre ve Ware 2004). Piretrin ve nikotin yanısıra *Derris* ve *Lonchocarpus* cinsi bitkilerin köklerinden elde edilen rotenon solunumla ilgili enzimleri inhibe ederek solunum fonksiyonlarında kayba, turuncgillerin kabuğundan elde edilen limonen periferel sinir sisteminin duyu sinirlerini etkiler (Whitacre ve Ware 2004).

Bazı grup kimyasallar insektisit özellikte olmamakla birlikte sinerjik etki ile insektisit özelliği arttırmak amacıyla da kullanılmaktadır. Örneğin; oksidatif enzimlere bağlanan piperonil butoksit (Whitacre ve Ware 2004).

Biorasyonel insektisitler; doğal kaynaklı ve EPA tarafından biopestisit olarak isimlendirilen ve üç gruba ayrılan insektisitler de bulunmaktadır. Örneğin; mikrobiyal pestisitler (*Bacillus thuringiensis*, *Hirsutella thompsonii*, *Nosema locustae*, *Neoplectana carpocapsae*), biyokimyasallar ve bitkiye birleştirilmiş koruyucular. Zararlıya karşı direnç sağlayacak genin bitkiye aktarılması ilkesine dayanan transgenik pestisitler de diğer bir grup biorasyonel insektisittir (Whitacre ve Ware 2004).

Nikotinoid/Neonikotinoidler; neonikotinoidlerin keşfi modern böcek kontrol tarihinde bir dönüm noktasıdır. Doğal nikotine benzerler ve nikotin baz alınarak modellendirilmişlerdir. Tütünden ekstre ile elde edilen nikotin alkaloidi uzun yıllardan beri çoğu böcek zararlısına karşı etkili olmakla birlikte özellikle yumuşak vücutlu tırtıl ve yaprak bitine karşı sıklıkla kullanılmıştır. Ancak, günümüzde yüksek memeli toksisitesi sebebiyle yerini neonikotinoidler gibi yeni sentetik insektisitlere bırakmıştır. Total insektisit piyasasının %15'in üzerinde bir hacme sahiptirler. Dünyada ve ülkemizde sık kullanılan organofosfat ve karbamat grubu pestisitlerin yerini ışığa

dayanıklı olmaları ve böceklerde memelilere oranla yüksek toksisite göstermelerinden dolayı alan bu grup insektisitler, dünyada hayvan sağlığı ve ürün korunmasında sıklıkla kullanılan en yeni insektisit sınıfı olup EPA tarafından 2. ve 3. sınıf toksinler grubunda sınıflandırılmıştır (EPA 2003; Casida ve Quistad 2004). Neonikotinoid grubu insektisitler; N-nitroguanidinler (imidakloprid, tiyametoksam, dinotefuran ve klotianidin) ve N-siyano-aminidler (asetamiprid ve tiakloprid) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır (Bolboaca ve Jaentschi 2005).

Neonikotinoid grubu insektisitler nikotinik asetilkolin reseptörlerinin selektif agonistleridir. Memelilerde ve böceklerde post-sinaptik membranda nikotinik asetilkolin reseptörlerine bağlanarak agonist etki gösterirler (Tomizawa ve Casida 2003; Whitacre ve Ware 2004; Ford 2008; Yu 2008). Memelilerde nikotinik asetil kolin reseptörlerine ilgisi böceklerdekine göre daha düşük olduğundan böceklerle karşı yüksek toksisiteye, memelilere ve sucül organizmalara karşı düşük toksisiteye sahiptirler (Kiriya ve ark. 2003; Tomizawa ve Casida 2003).

Neonikotinoid grubu insektisitlerin özellikle DNA hasarı (Bull ve ark. 2006), kardeş kromatid değişimi (Rupa ve ark. 1991), mikroçekirdek oluşumu (Maele-Fabry ve ark. 2007), kromozal anomalileri (Rupa ve ark. 1988), DNA kırıkları ve DNA eklentilerine (Peluso ve ark. 1996) neden olduğu rapor edilmiştir. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar DNA hasarının sinir, solunum, üreme ve bağışıklık sistemi bozukluklarına (Colosio ve ark. 2005), tümör gelişimine (Dich ve ark. 1997) sebep olduğunu göstermiştir. Özellikle, tiaklopridin karsinojen etkili olduğu ve farelerde yumurtalık tümörü oluşturduğu tespit edilmiştir (EPA 2003). Tiyametoksam karsinojenik etkili olup dişi ve erkek farelerde karaciğer tümörlerine neden olduğu rapor edilmiştir (Green ve ark. 2005). Asetamipridin de kardeş kromatid değişimine, kan lenfositlerinde mikroçekirdek oluşumuna ve kromozal anormalliklere neden olduğu gözlenmiştir (Kocaman ve Topaktaş 2007).

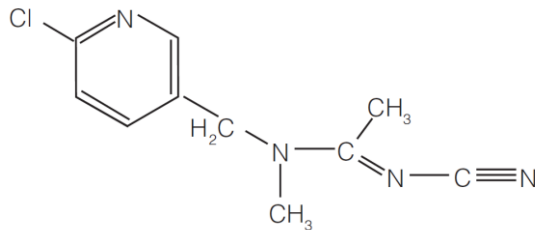
Neonikotinoid grubu insektisitler ile zehirlenme olguları rapor edilmiştir. Mesleki maruziyetlerle yaşanan olgu raporları limitli olsa da imidakloprid ile özkıyım amaçlı 13 vaka (Mohamed ve ark. 2009), asetamiprid ile 2 akut zehirlenme vakası (Imamura ve ark. 2010) mevcuttur. Yüksek serum asetamiprid konsantrasyonuna rastlanan bu olgularda bulantı, kusma, kas zayıflığı, hipotermi, konvülsiyon ve klinik belirtilerle beraber taşikardi, hipotansiyon, elektrokardiyogram değişiklikleri, hipoksi ve

susuzluk gibi akut organofosfat zehirlenmesine benzer semptomlar gözlenmiştir. Görülen bu semptomlar için destek tedavi uygulanmış olup her iki olgu da herhangi bir komplikasyon gelişmeden 2 gün sonra hastalar taburcu edilmiştir (Imamura ve ark. 2010).

2.1.2. Asetamiprid

Asetamiprid, imidakloprid sonrası ikinci üretilen neonikotinoid grubu pestisitlerdendir. İlk kez Mospilan ticari adı ile Japonya'da satışa sunulmuştur (Yamamoto ve Casida 1999; Ünver ve Uysal, 2014). Asetamiprid; Mosetam, Malcon, Hekplan, Akira, Neoplan, Mostar olarak piyasada ticari müstahzarları halinde bulunmaktadır (Kocaman ve Topaktas 2007).

Asetamipridin kimyasal adı (E)-N¹-[(6-kloro-3-piridil)metil]-N²-siyano-N¹-metil asetamidin ve kapalı formülü C₁₀H₁₁ClN₄'dür (Şekil 2-1). Asetamipridin (CAS No: 135410-20-7) erime noktası 98,9 °C ve molekül ağırlığı 222,68'dir (Kocaman ve Topaktas 2007). Beyaz veya çok soluk sarı ince toz kristal halinde bulunur ve kokusuzdur. Su, aseton, metanol, etanol, diklorometan, kloroform, asetonitril ve tetrahidrofuranda çözünür. 20 °C'de yoğunluğu 1,330g/cm³'tür. pH 4-7'de stabildir, pH 9 ve 45 °C'de ise yavaş yavaş degrade olur. Güneş ışığına karşı dayanıklıdır. Atmosferde fotokimyasal olarak üretilen hidroksil radikalleriyle buhar haldeki asetamiprid reaksiyona girerek bozunur; havada gerçekleşen reaksiyona göre yarılanma ömrünün 5 saat olduğu tahmin edilmektedir. Asetamipridin 34 gün olarak rapor edilen sudaki fotoliz yarılanma ömrü temel alındığında atmosferde doğrudan fotolize uğrayabileceği bildirilmektedir. Aerobik toprak metabolizması çalışmalarından bildirilen asetamipridin yarılanma ömrü; <1 günden 8,2 güne kadar değişir. Buna dayanılarak asetamipridin suda biyodegrede olması beklenir (European Commission 2004; National Center for Biotechnology Information 2005; Kanungo & Solecki 2011).



Şekil 2-1:Asetamipridin kimyasal yapısı (Kanungo & Solecki, 2011).

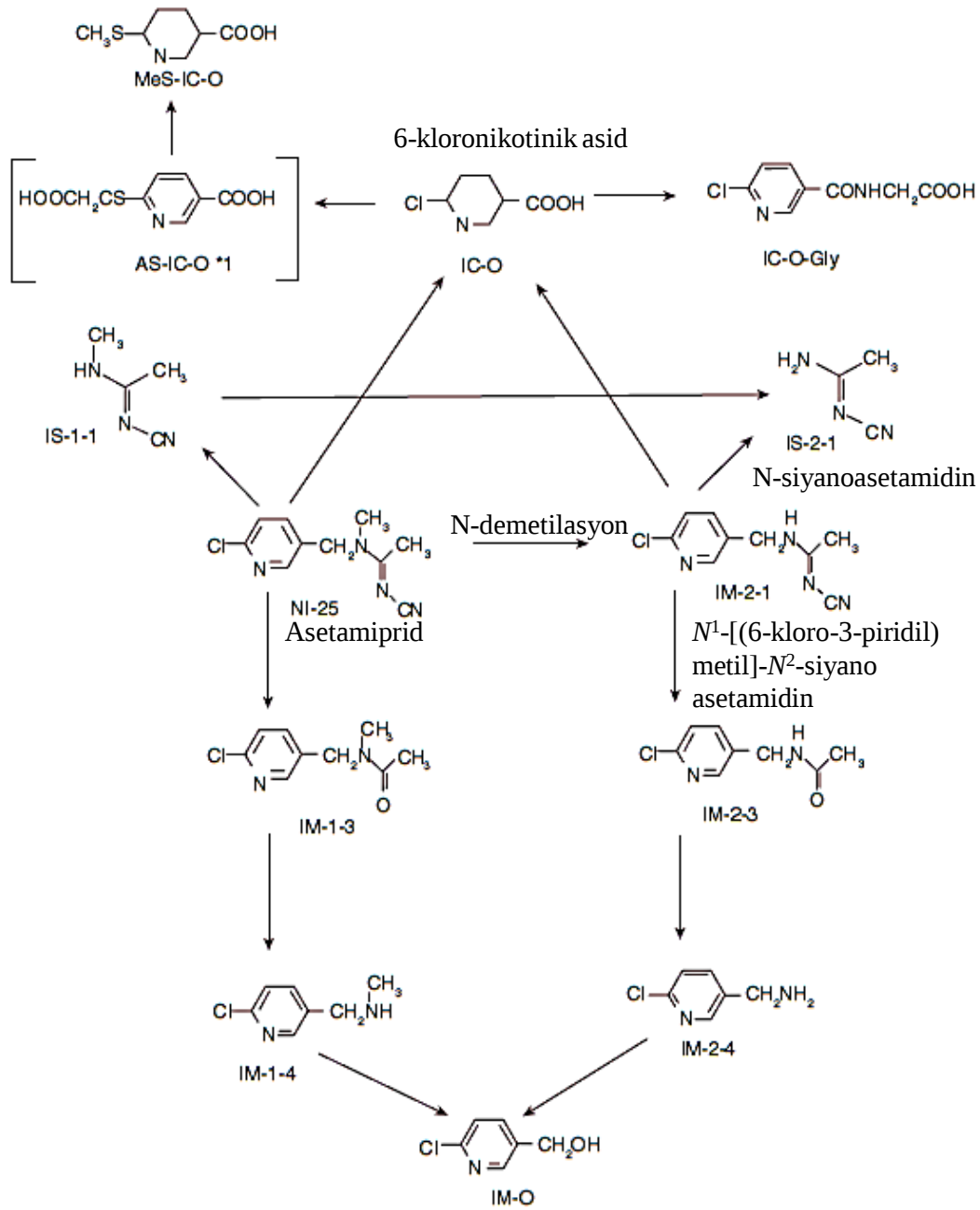
En önemli tarımsal bölgelerimizden olan ve toplam pestisit tüketiminin %42'sinin olduğu Çukurova bölgesi başta olmak üzere Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde kullanımı oldukça yaygın bir insektisit olan asetamiprid; pamuk, tütün, patates, domates, biber, fındık, turunçgil gibi ürünlerde zararlılar ile mücadelede kullanılır. Örneğin: pamuk tarlalarında, yaprak biti (*Aphis gossypii*), yaprak piresi (*Empoasca spp.*), beyaz sinek (*Bemisia tabaci*) vb böceklerin bertarafında kullanılmaktadır (Kocaman ve Topaktas 2007).

Asetamiprid; Avrupa komisyonun 91/414 / EEC (31 Mayıs 2009) sayılı Konsey Direktifinde dahil edilen pestisit etkin maddeleri için EFSA'ya gönderilmek üzere hazırlanan harici bilimsel rapor kapsamında hazırlanan ortak değerlendirme gruplarından “seviye 1” üreme ve gelişimsel toksisite ve üreme organlarında tümör, “seviye 2a” gecikmiş gelişim ve düşmüş vücut ağırlığı, “seviye 2a2a” prenatal vücut ağırlığı azalması (maternal etki gösteren dozlardaki bileşikler dahil), “seviye 2a2b” postnatal vücut ağırlığı düşmesi (etkinin prenatal ve/veya postnatal sebepleri), “seviye 2c” prenatal ve postnatal ölüm, “seviye 2c2” postnatal ölüm, “seviye 2d” yavruda diğer etkiler, “seviye 2d4a” yavrunun diğer organlarında değişimler, “seviye 2e” doğurganlık, “seviye 2e1a” erkek üreme organlarında değişimler, “seviye 2e1a1” üreme organlarının azalmış ağırlığı ve küçük erkek üreme organları, “seviye 3a” antiandrojenik etki mekanizması tablolarında yer almıştır (Nielsen ve ark. 2014).

Asetamiprid ile yapılan çalışmalarda tek 1-50 mg/kg vücut ağırlığı v.a. (yaklaşık %96 saflık) ve tekrarlayan 1 mg/kg v.a. (minimum %60 saflık) dozlarda oral uygulama sonrası hızlı ve geniş çapta absorbe olduğu tespit edilmiştir. Asetamiprid özellikle karaciğer, böbrek, adrenal ve tiroid bezlerinde yüksek konsantrasyona ulaşarak tüm vücuda dağılım gösterir. Uygulama sonrası 24 saat içinde ana yolak olarak idrarla hızlı bir şekilde atılır ve 96 saat içinde %90'ından fazlası elimine olur (EFSA 2013). Kemirgenlerde tek doz (1 veya 50 mg/kg v.a.) oral uygulama sonrası asetamipridin geniş çapta metabolize olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan dozun %50-70'i metabolitleri halinde idrar ve feçes ile atılırken tekrarlayan uygulamalarda dozun %90'dan fazlası metabolitleri halinde atılmaktadır (EFSA 2013).

Sıçanlarda ana metabolik yolak N^1 -[(6-kloro-3-piridil) metil]- N^2 -siyano asetamidin (IM-2-1)'e demetilasyonudur. Bu metabolit daha sonra zincir kısmından ayrılarak 6-kloronikotinik asid (IC-O) ve N-siyanoasetamidin (IS-2-1)'e dönüşür. IC-O

glisinle konjugat oluşturarak IC-O-Gly'e dönüşür. Ayrıca, verilen dozun %2'sinden daha az miktarı Şekil 2-2'de de görüldüğü üzere çeşitli metabolitler (MeS-IC-O, IM-1-4, IM-2-4, IM-O, IM-1-3 ve IM-2-3) olarak tespit edilmiştir (Kanungo ve Solecki 2011; EFSA 2013).



Şekil 2-2: Asetamiprid metabolizmasının sıçanlardaki ana yolağı (Kanungo ve Solecki 2011; EFSA 2013).

Farklı sıçan türlerinde yapılan çalışmalar neticesinde asetamiprid için medyan letal doz (LD₅₀) değeri 140-417 mg/kg v.a. olarak tespit edilmiştir. Doza bağlı toksik belirtiler; başlıca kaşıntı, titreme, konvülsiyon, 10 dk-3 saatlik süre içinde midriyazis ve lateral pozisyon, salivasyonda artış ve ataksi ile kendini gösteren hassasiyettir. Bu belirtiler yaklaşık 1 gün sürer (Kanungo ve Solecki 2011). Sıçanlarda 13 hafta süre ile yapılan oral toksisite çalışması neticesinde vücut ağırlığında azalma, yiyecek tüketimi, serum total kolesterol seviyesinde artış gibi etkiler saptanmıştır. Bu etkiler göz önünde bulundurularak hiçbir advers etkinin tespit edilmediği en yüksek doz (NOAEL) değeri 200 ppm (12,4 mg/kg v.a./gün) olarak tespit edilmiştir (Nukui ve Ikeyama 1997).

Asetamiprid ile ilgili yapılan toksisite çalışmalarında;

- Sıçanlara 0, 10, 30 and 100 mg/kg v.a. dozlarında akut ve tekrarlanan maruziyet sürelerinde asetamiprid uygulandığında her iki cinsiyette de yüksek dozlarda (30 ve 100 mg/kg v.a.) tremor, yürüyüş ve postür anomalileri, azalmış kavrama gücü ve düşmüş lokomotor aktivite şeklinde klinik bulgular elde edilmiştir (EFSA Panel on Plant Protection Products and Their Residues (PPR) 2013).

- Erkek sıçanlara akut ve tekrarlanan maruziyet sürelerinde 0; 7,4; 14,8; 59,7 ve 118 mg/kg v.a. ve dişi sıçanlara 0; 8,5; 16,3; 67,6 ve 134 mg/kg v.a. şeklinde doz uygulanmış, yüksek doz seviyesinde vücut kitle indeksinde ve besin tüketiminde düşüş gözlenirken bu düşüşün geri dönüşümsüz olmadığı tespit edilmiştir (EFSA Panel on Plant Protection Products and Their Residues (PPR) 2013).

- Tekrarlanan maruziyet çalışmalarında 1000 ppm dozlarında karaciğer ve böbreğin hedef organ olduğu ve karsinojenik etki potansiyelinin olmadığına tespit edildiği dozlarda uygulama kaynaklı olarak meme bezi hiperplazisi oluşturduğu gözlenmiştir (European Commission 2004).

- *In vitro* çalışmalarda klastojenik potansiyeli olduğuna dair kanıtlar elde edilmiş, ancak bu sonuçların *in vivo* şartlarda negatif fare mikroçekirdek testi ve sıçan kemik iliği metafaz analizi ile değerlendirildiğinde gözlenmediği rapor edilmiştir (European Commission 2004).

- Sıçanlarda üreme toksisite testlerinde ebeveynlere verilen toksik doz seviyelerinde (6,5 mg/kg v.a. ve üzeri) doğum sonrası hayatta kalma oranının ve yavrusu vücut kitlesinin düştüğü gözlenmiştir (European Commission 2016).

- *In vitro* koşullarda sağlıklı insan akciğer hücrelerinde 100-1600 μM dozlarında, periferik lenfositlerinde 157,2-179,6 μM dozlarında ve kolorektal adenokarsinoma hücrelerinde 75-350 μM dozlarında sitotoksik ve genotoksik olduğu tespit edilmiştir (Kocaman ve Topaktaş 2007; Çavaş ve ark. 2012; 2014). Bu etkilerden özellikle reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna bağlı oksidatif hasarın neden olduğu düşünülmüş olup soya fasülyesi, *Escherichia coli* K12 and *Bacillus subtilis* B19 bakterisi suşları, sıçan testisi gibi çeşitli örneklerde oksidan/antioksidan dengesinin bozulduğu gösterilmiştir (Yao, Jin ve Lv 2006; Ford ve ark. 2011; Zhang ve ark. 2011).

- Pisi Balığı (*Paralichthys olivaceus*) solungacından elde edilen hücre kültüründe 0,1-80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ doz aralığında akut sitotoksikite çalışmasında hücre üremesinin durduğu ve mitokondride bazı hasarlar görüldüğü rapor edilmiş, bu durumun asetamipridin mitokondri yapısındaki ultra değişiklikler sonucu enerji üretimini etkilemesi ile hücre gelişimi ve üremesini yavaşlatması şeklinde meydana gelmiş olabileceği bildirilmiştir (Su ve ark. 2006).

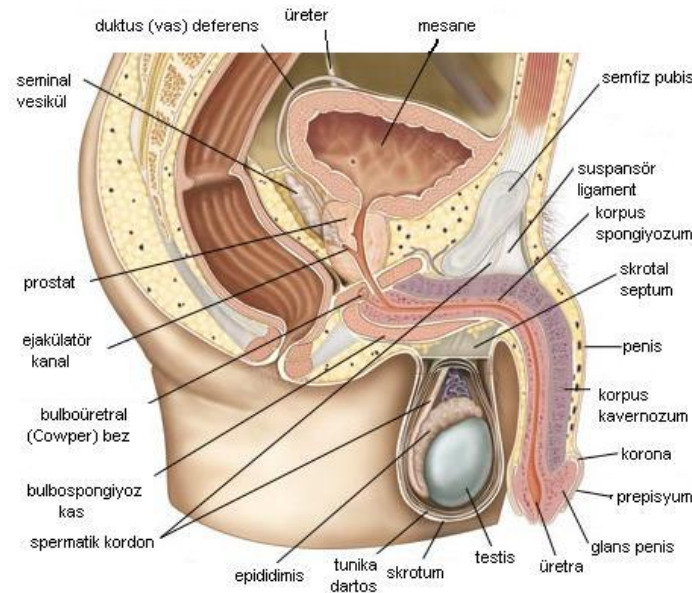
- Erkek üreme sisteminde ROS üretimine bağlı olarak steriodegenezi ve spermatogenezi bozulduğu, T biyosentezindeki enzimlerin aktivitesinde, dolayısıyla da T biyosentezinde azalma olduğu, testislerde proliferasyon, apoptoz ve transkripsiyonun düzenlenmesinde görev alan inhibitörlerde düşüş olduğu rapor edilmiştir (Chainy ve ark. 1997; Glade ve Smith 2015; Li ve ark. 2016).

- Ağırlığı 25-30 g arasında değişen Kunning ırkı yetişkin erkek fare üzerinde yapılan bir çalışmada günlük 30 mg/kg dozlarındaki maruziyet durumunda serum karaciğer parametrelerinin değiştiği, serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin transaminaz (ALT) ve alkalik fosfat (ALP) değerlerinde anlamlı bir artış görüldüğü rapor edilmiştir (Yi-Wang ve ark. 2012). Benzer şekilde, Wistar ırkı sıçanlarda asetamipridin subkronik oral toksisite çalışmasında 11 mg/kg v.a. doz ve üzerinde AST, ALT ve kolesterol seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla her iki cinsiyette de oldukça arttığı gözlemlenmiştir (Devan, Mishra ve ark. 2015).

Asetamiprid için verilen ADI değeri 2 yıllık sıçan çalışması ile 2 jenerasyonlu sıçan üreme çalışmasına dayanılarak günlük 0-0,07 mg/kg olarak belirlenmiştir (European Commission 2004; Kanungo ve Solecki 2011).

2.2. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi; sperm üretimi (spermatogenez) ile endokrin hücreler sayesinde erkek üreme fizyolojisi için gerekli testosteron başta olmak üzere hormon üretimi (androjen biyosentezi) üzerine kuruludur. Erkek üreme sistemi; (i) spermatogenez ve androjen biyosentezinde görev alan testisler, (ii) sperm aktivitesi (olgunlaşması, depolanması, taşınması) için gerekli genital kanallar, (iii) seminal salgıları üreten ve spermatazoonlar ile seminal salgıların oluşturduğu semen ve yardımcı (aksesuar) bezler ile (iv) penisten meydana gelir (Şekil 2-2) (Mescher 2015; Öztaş 2016; Ross ve Pawlina, 2016).



Şekil 2-3: Erkek üreme sistemi (Gümüsel 2013; Öztaş, 2016).

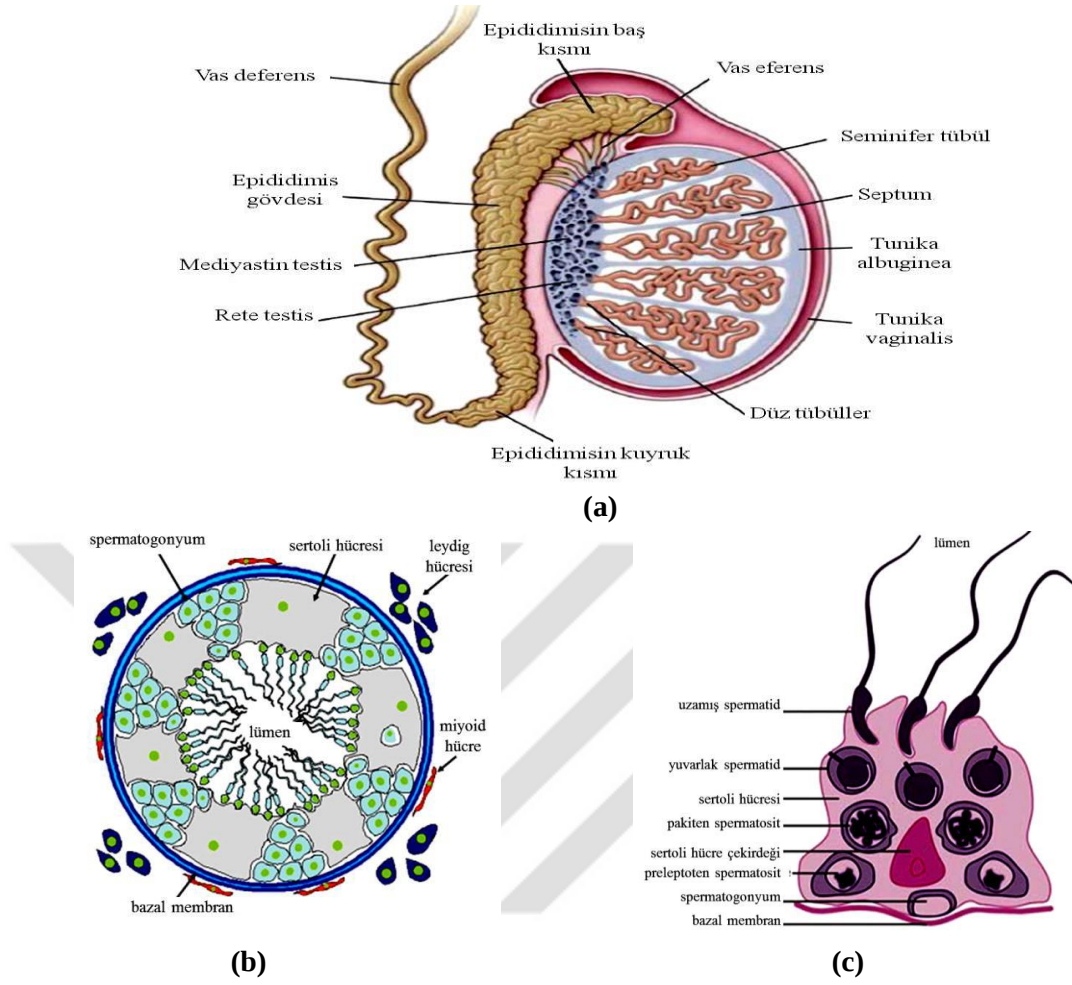
Testis; vücut boşluğunun dışında sağ ve sol olmak üzere iki parçalı ovoid şekilde epididimle beraber skrotum ile çevrilmiştir (Costabile 2013; Heffner ve Schust 2014; Ross ve Pawlina 2016). Her bir testis, anterior karın duvarının katmanlarıyla kesintisiz olarak devam eden ve skrotuma doğru uzanan uzunlamasına bir kas-fasiyal kese bitiminde askıda durmaktadır (Ross ve Pawlina 2016). Testisin içinde bulunduğu kese penisin altında uzanır (Heffner ve Schust 2014). Testisler, spermatic kordlarla karın duvarına bağlanır ve gubernakulumun kalıntıları olan skrotum bağları ile skrotuma bağlanır. Spermatogenesis vücut sıcaklığının altında gerçekleştiği için testisler vücut boşluğu dışında bulunur (Ross ve Pawlina 2016). Testisler erkek üreme sisteminin gelişimi sürecinde; kan damarları, lenfatik damarlar, otonom sinirler ve testisin

anterolateral yüzeyini örten abdominal peritonun bir uzantısı olan tunika vajinalis ile karın boşluğundan skrotuma iner (Şekil 2-3) (Heffner ve Schust 2014; Ross ve Pawlina 2016).

Skrotum, epididimisle testisleri fiziksel darbelere karşı koruyan ve testis sıcaklığının düzenlenmesinde görev alan özelleşmiş bir deri kesedir (Heffner ve Schust 2014). Spermatozoaların ısıya aşırı hassas olması nedeniyle testisin yüksek sıcaklıkta bulunması sperm üretimini engeller (Heffner ve Schust 2014; Ross ve Pawlina 2016).

Her bir testis *tunica albuginea* denen yoğun ve kalın bağ dokusu kapsülle çevrilidir. Bu kapsülün iç kısmı olan *tunica vasküloza* kan damarları içeren gevşek bağ dokusu bir tabakadır (Ross ve Pawlina 2016). Her testis septumlarla aşağı yukarı 250-300 piramid şekilli loba ayrılmıştır (Smith ve Turek 2011; White ve Porterfield 2013; Jones ve Lopez 2014; Öztaş 2016; Ross ve Pawlina 2016). Her lobül çok sayıda kıvrımlı seminifer tübülünden oluşur (Ross ve Pawlina 2016) (Şekil 2-3).

Testisin her lobülü, androjen ve testosteron üreten Leydig hücrelerinin bulunduğu bir bağ dokusu ve spermilerin üretildiği 1-4 adet kıvrımlı seminifer tübül içerir (Heffner ve Schust 2014; Mescher 2015; Ross ve Pawlina 2016). Interstisyel doku; Leydig hücreleri, kan damarları, lenfatikler, mast hücreleri, sinirler ve makrofajlardan oluşur. Seminifer tübül ise Sertoli hücreleri, germ hücreleri ve peritübüler miyoid hücrelerden oluşur (Costabile 2013). Seminifer tübüller kalın bir bazal lamina ve miyoid hücrelerle sarılmış olup testis hacminin %80'ini oluştururlar (Öztaş 2016). Seminifer epitelyum; ergenlikten sonra çoğalmasa duran destekleyici Sertoli hücreleri ve olgun spermilerin oluşumuna kaynaklık eden spermatojenik hücrelerden meydana gelir (Ross ve Pawlina 2016). Testiste meydana gelen spermatozoa zayıf ve hareketsizdir (Smith ve Turek 2011). Epididimise testiküler sıvı ile beraber geçen spermatozoa burada hareketli ve fonksiyonel hale geçer (Smith ve Turek 2011; Costabile 2013). Spermatogenesis ve seks steroidlerinin üretimi testislerde gerçekleşir (Smith ve Turek 2011; Heffner ve Schust 2014) (Şekil 2-3).



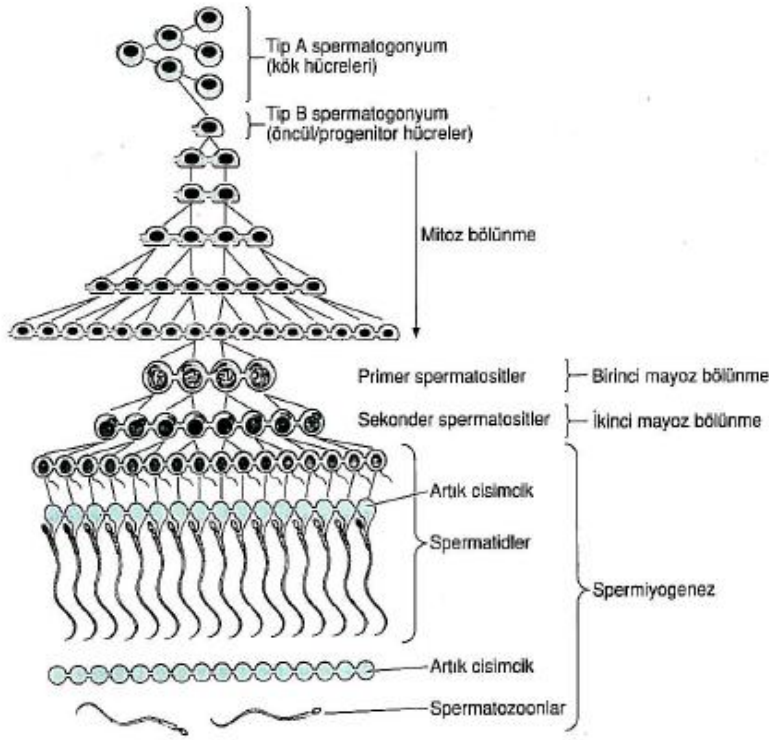
Şekil 2-4: Testisin (a), seminifer tübülün (b) ve seminifer tübülde sıralanmış germ hücrelerinin (c) şematik gösterimi (Öztaş 2016).

Sertoli hücreleri; destekleyici veya sustentaküler hücreler olarak bilinir (Jones ve Lopez 2014; Ross ve Pawlina 2016). Sertoli hücreleri seminifer epitelin gerçek epitelinin oluşturur ve seminifer epiteldeki tek nongerminal hücrelerdir (Heffner ve Schust 2014; Ross ve Pawlina 2016). Spermatogenik hücreleri saran ve tübüller arası boşluk ile seminifer tübül lümeni arasında köprü ve destek görevi gören sertoli hücreleri spermatogenik hücrelerin beslenmesi, desteklenmesi, korunması ile testiküler sıvının tübüller boşluğa salınması ve spermiyogenez sonrası artık cisimciklerin fagositozunu sağlar, seminer epitelin pH'sını kontrol eder. Fetüste müller kanallarının gerilemesini sağlayan anti-müllerian hormon geri bildirim ile ön hipofiz bezinden FSH sentezini önleyen INHB ve aktivini salgılar. INHB düzeyi özellikle total sperm sayısı ve testiküler volüm ile korelasyon gösterir ve spermatogenez indeksi olarak kullanılabilir (Molina 2013). Testosteronu östrojen estradiol-17 β 'ye metabolize eden Sitokrom P₄₅₀

(CYP19, aromataz), testosteronu 5 α -dihidrotestosteron (DHT)'a metabolize eden 5 α -redüktaz, adluminal kompartman, seminifer tübül lümeni ile erkek üreme sisteminin proksimal kısmının yüksek androjen seviyelerinin korunmasını sağlayan androjen bağlayıcı protein ve INHB aktivitesini inhibe ederek FSH salımına neden olan aktivin ile proteazlar, proteaz inhibitörlerini salgılayarak germ hücrelerinin normal gelişmesini ve hayatta kalmasını sağlar (Molina 2013; White ve Porterfield 2013; Jones ve Lopez 2014; Mescher 2015; Öztaş 2016).

Sertoli hücrelerinin birbirine bağlantıları kendilerine has özelleşmiş membran ve sitoplazmalarının eşsiz yapısal kombinasyonu ile olur. Sertoli hücreleri birleşik kompleksi, sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarla kan-testis bariyerini oluşturarak moleküllerin selektif geçişine izin verip spermatogenezde immünolojik koruma sağlar (Jones ve Lopez 2014; Öztaş 2016; Ross ve Pawlina 2016). Kan-testis bariyeri, interstiyel alandan lümene sıvı transferini, testiküler sıvının kimyasal kompozisyonunun korunmasını, ve spermilerin testisten epididimise geçişini sağlar (Jones ve Lopez 2014; Mescher 2015; Öztaş 2016). Sertoli hücreleri ayrıca hem ekzokrin hem de endokrin salgı işlevlerine sahiptir (Ross ve Pawlina 2016).

Spermatogenez ve spermatogenik hücreler; spermatogenezis, tamamen farklılaşmış ve özelleşmiş hareketli haploid spermilerin gelişimi ile sonuçlanan hücre farklılaşmasının ayrıntılı bir işlemidir (Şekil 2-4) (Costabile 2013). En yetişkin germ hücresi olan spermatogonia, bazal kompartmandaki seminifer tübülün bazal membranının hemen üstünde bulunur (Costabile 2013; Mescher 2015). Spermatogoninin özelleşmiş sperme dönüşmesi yaklaşık 64-72 gün sürer (Costabile 2013; White ve Porterfield 2013). İlk mitotik bölünmeler, doğumda var olan spermatogonia ve primer spermatositleri üreten fetal testiste ortaya çıkar. Ergenlik çağının başlangıcına kadar ileri gelişimde çok az etkinlik meydana gelir (Costabile 2013). Puberteden kısa bir süre önce hipofiz bezinden salınan gonadotropinler ile başlayarak sürer (Öztaş 2016). Spermatogenesis ergenlikte spermatogonyumların proliferasyonu ile başlar (Jones ve Lopez 2014; Mescher 2015). 70-80 Yaşlarında Leydig hücrelerinin androjen üretimini azaltması sonucu oluşan andropoz ile spermatogenesis miktarı azalır (Smith ve Turek 2011).

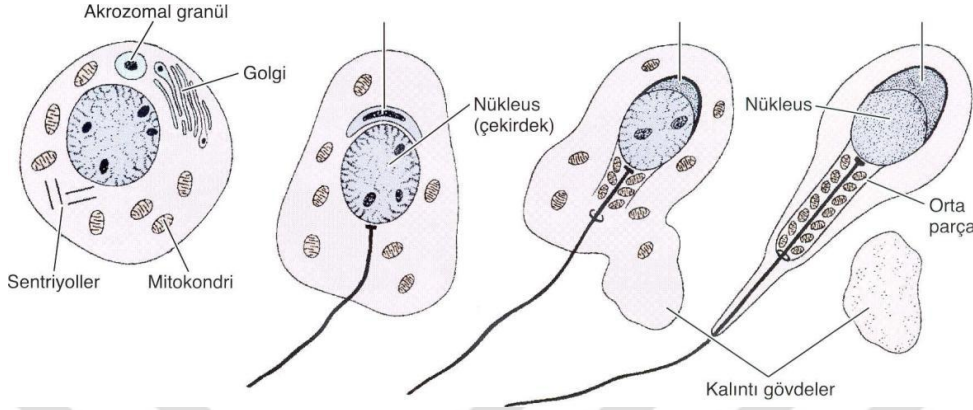


Şekil 2-5: Spermatogenezin şematik gösterimi (Gümüsel 2013; Mescher 2015; Öztaş 2016)

Normal spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesi FSH ve testosteronun sinerjik etkisine bağlı olup testosteron üretimi LH'ı uyarır (Costabile 2013; Molina 2013). Germ hücreleri için bu hormonlar gerekirken, bu hücreler FSH veya testosteron reseptörlerine sahip değildir. Sertoli hücreleri ise bu iki reseptöre de sahiptir ve FSH ile testosteronun etkinliğine Sertoli hücrelerinin aracılık ettiği düşünülmektedir (Costabile 2013). FSH, Sertoli hücrelerindeki FSH reseptörlerini aktive edip Sertoli hücrelerinin proliferasyon ve sekretuar faaliyetini uyarak intrasellüler androjen reseptörlerinin ve androjen bağlayıcı proteinlerinin (ABP) sentezini sağlar (Molina 2013; Heffner ve Schust 2014). ABP, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır ve Leydig hücreleri tarafından üretilen ve üretildiği interstisiyal bölgeden seminifer tübüle difüze olan testosteron ve androjenlere bağlanırlar. ABP, androjenleri germ hücrelerine taşır. Böylece androjenler, androjen reseptörü içeren pro-mayotik germ hücrelerinin içine alınır. FSH spermatogenez başlattıktan sonra, yeterli ve kesintisiz bir testosteron kaynağı olduğu sürece kadar devam eder (Heffner ve Schust 2014).

Sperm kafası; esas olarak yoğunlaşmış kromatin materyali ve akrozom içeren bir çekirdekten oluşur (Costabile 2013) (Şekil 2-5). Akrozom, yumurtayı döllemeden önce

nüfuz etmesi için gerekli olan hidrolitik enzimleri içeren, ayrıca dölleme için gerekli enzimleri ihtiva eden zara bağlı bir organeldir (Costabile 2013; Molina 2013).



Şekil 2-6: Spermiyogenez sırasında gerçekleşen değişimlerin şematik gösterimi (Gümüşel 2013; Öztaş 2016)

Leydig hücresi; testis interstisyumundaki konumlarına göre tanımlanıp seminifer tübüller arasında kan damarları ve lenfatik kanalların yakınında bulunur (Costabile 2013; Öztaş 2016). Testiküler kitlenin %10'undan daha az yer kaplarlar (Heffner ve Schust 2014). Leydig hücreleri tipik olarak lipid damlacıkları içeren büyük, poligon, eozinofilik, steroidogenik stromal hücrelerdir (White ve Porterfield 2013; Öztaş 2016; Ross ve Pawlina 2016). Leydig hücresi androjen steroid üretiminin çoğunluğundan sorumludur. Serumdaki testosteron seviyeleri yaşam döngüsü boyunca sabit kalmaz. Testosteron maksimum konsantrasyona 20'li ve 30'lu yaşlarda ulaşır. Belli bir platoya ulaşıp sonrasında düşmeye başlar. Leydig hücre fonksiyonu, seminifer tübüllerdeki hücreler tarafından salgılanan parakrin faktörler ile otoregülatör faktörler tarafından düzenlenir (Costabile 2013). Erken fetal yaşam boyunca Leydig hücreleri farklılaşır ve testosteron salgırlar. Embriyonik gelişme, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu oluşumu sırasında testosteron salgılanması gereklidir (Ross ve Pawlina 2016). Plazmadaki testosteronun % 90-95'i Leydig hücreleri tarafından üretilip geri kalan kısım adrenal kortisol sentezinde kullanılmak üzere başlangıç maddesi olması için üretilir (Öztaş 2016).

Diğer steroid salgılayan hücreler gibi Leydig hücreleri de ayrıntılı, düzgün granülsüz endoplazmik retikulum (sER) içerir. Kolesterolde testosteron sentezi için gerekli enzimler sER ile ilişkilidir. Leydig hücrelerinde steroid salgılayan hücrelerin

başka bir özelliği olan tubulovesiküler kristalli mitokondride bulunur (Ross ve Pawlina 2016).

Leydig hücreleri, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörleri ve daha düşük ölçüde de yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) reseptörleri yoluyla yeniden kolesterol sentezler, ve adrenokortikal hücrelerinde olduğu gibi kolestrol esterleri olarak kolesterolü depolar. Serbest kolesterol, kolesterol hormon duyarlı lipaz tarafından üretilip dış mitokondriyal membrana, daha sonra da bir steroidojenik akut düzenleyici protein bağımlı biçimde iç mitokondriyal membrana aktarılır. Tüm steroidojenik hücrelerde olduğu gibi kolestrol CYP11A1 ile pregnenolona dönüştürülür (White ve Porterfield 2013). Pregnenolon daha sonra 3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz tip 2 ve CYP17 tarafından progesteron, 17 α -hidroksiprogesteron ve androstenedion'a dönüştürülür (Molina 2013; White ve Porterfield 2013). CYP17, 17-hidroksilaz aktivitesi ve 17,20-liyaz aktivitesi olan iki fonksiyonlu bir enzimdir. CYP17, Leydig hücresindeki her iki fonksiyonunu da yüksek seviyelerde gösterir (White ve Porterfield 2013).

Hipotalamik-Pitüituar-Gonadal (HPG) eksen; testis, parvisellüler hipotalamik GnRH salgılayıcı nöronlar ile hem LH hem de FSH üreten pitüiter gonadotropların dahil olduğu bir endokrin eksen tarafından düzenlenir. LH ve FSH, ortak α -alt birimi (α -glikoprotein alt birimi, α GSU) ve özel β -alt biriminden teşekkül heterodimer ile pitüiter glikoprotein hormonlardır (White ve Porterfield 2013).

Testiküler fonksiyonu düzenleyen nöroendokrin mekanizmalar, yumurtalık fonksiyonlarını düzenleyen mekanizmalara temel olarak benzerdir. Hipofiz portal sistemine pulsatil şekilde salgılanan hipotalamik GnRH, birer gonadotropin olan FSH ve LH sentezini ve salınmasını uyarmak için hipofize etki eder. Bu iki gonadotropin testisin spermatogenik ve endokrin aktivitelerini düzenler. Erkek ve kadın bireyler tarafından hipofizden gonadotropin salınımı önlemek için aynı negatif geri bildirim mekanizmaları kullanılır. Bununla birlikte, erkek ve dişi HPG sistemlerinin düzenlenmesi arasında büyük bir fark vardır; postpubertal erkek sürekli gametogeneze ve testosteron üretimine devam ederken, postpubertal dişi periyodik fonksiyonlara sahiptir. Erkeklerde üreme hücresi üretimi için aylık bir periyodun olmaması, androjenlerin gonadotropin salınımı üzerinde pozitif geri bildirim vermemesi nedeninden kaynaklanır (Heffner ve Schust 2014).

Testosteron, erkekte LH sekresyonunun başlıca düzenleyicisidir. GnRH atımındaki aralıkta bir miktar azalma olmasına rağmen, testosteronun negatif geri bildirim etkisi, esasen hipotalamus tarafından salınan GnRH atımlarının sıklığını azaltarak başarılır. Testosteron, FSH salınımını da inhibe eder ancak etkileri LH'de olduğu kadar belirgin değildir. Testosteron ve Sertoli hücre hormonu inhibinin kombinasyonları, maksimum FSH baskılanmasını meydana getirmek için gereklidir (Heffner ve Schust 2014).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Sarflar

Absolu alkol	Sigma-Aldrich (32221)
Asetamiprid (%97)	Hektaş
Cam şişe (250 mL; 500 mL; 1 L)	Isolab
Cerrahi set	Piyasa ürünü
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Biomatik (A2424)
Doku kabı	Nest
Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle besiyeri:	Multicell (319-075-CL)
Besleyici karışımı F-12 (DMEM-F12)	
Düşük kaynama dereceli agar (LMA)	Himedia (RM 861)
EDTA'lı tüp (10 mL)	BD Vacutainer (REF367525)
Enjektör (10 mL)	Set inject
Entellan	Merck (1.07961.0100)
Eter	Merck (100921)
Etidyum bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich (E1510)
Etil alkol	Merck (K38999227)
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	Multicell (625 060 CG)
Falkon (15 mL; 50 mL)	Isolab
Falkon tüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Filtre kağıdı (110 mm)	Schleicher&Schvell
Formalin	Merck (104002)
Fosfat tampon çözeltisi (PBS) divalent kanyonları (Ca^{++} , Mg^{++}) içermeyen, pH 7,4; 10X	Multicell (311415CL)
Gliserin	Merck (1.04093.1000)
Gluteraldehit	Sigma-Aldrich (G5882)
Hematoksilin ve Eosin (H&E)	Merck (1.09253)
Hidroklorik asit (HCl)	Merck (137007)

Kapiler tüp	Isotherm
Kriyo vial (2 mL)	Greiner bio-one
Ksilen	Merck (108665)
Lateks eldiven	Broche
Metanol	Merck (100986)
Metil selüloz	Fluka (64632)
Mikroplaka (96 kuyucuklu)	Nest
Mikrotüp (0,5 mL; 1,5 mL)	Greiner bio-one
Mikrotüp için uygun portüp	Greiner bio-one
Nitril eldiven	Broche
Normal kaynama dereceli agar (NMA)	Himedia (MB002)
Otoklav bandı	Sussex
Parafin 56-58, in pastille form	Merck - cas no: 8002-74-2
PBS 10X	Multicell (311-012-CL)
Periodik asit schiff (PAS) boyası	GBL (5023)
Pipet ucu (0,1-10 µL; 30-300 µL; 100-1000 µL)	Eppendorf, Nest
Pozitif şarjlı lam	Thermo (071112-9)
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck (106469)
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich (S7653)
Sodyum sitrat	Bio-Optica (15-M103)
Streptoavidin peroksidaz	Invitrogen (SA10001)
Toluidin mavisi	Sigma-Aldrich (89640)
Tripan mavisi	Fluka (93595)
Tripan mavisi	Fluka 93595
Tripsin (1:250)	Multicell (625-035-TG)
Triton X-100	Biomatik (A4025)
Trizma baz	Multicell (600 127 CG)

3.2. Kullanılan Kitler

Anti-PCNA biotinlenmiş sekonder antikor	Invitrogen PCNA staining kit (Cat. No: 93-1143)
Bloklama Kiti	Invitrogen PCNA staining kit (Cat. No: 93-1143)
DAB Kromojen	Invitrogen (Cat.No: 002020)
Diff-Quick Boyama Kiti	ADR [®] Diagnostik Tanı Kitleri - Mediko Kimya [®] Ltd. Şti. (Cat. No: 5001001)
In Situ Apoptoz Kiti	ApopTag [®] Plus Peroxidaz In Situ Apoptosis Detection Kit, S7101, Millipore
Mayer Hematoksilin	Merck (109253)
Protein Tayin Kiti	Bio-Rad [®] Kit II (Cat. No: 500-0002)
Sıçan FSH ELISA Kiti	SunRed [®] Bioteknoloji (Cat. No: 201-11-0183)
Sıçan GnRH ELISA Kiti	SunRed [®] Bioteknoloji (Cat. No: 201-11-0187)
Sıçan INHB ELISA Kiti	SunRed [®] Bioteknoloji (Cat. No: 201-11-0729)
Sıçan Kolesterol ELISA Kiti	SunRed [®] Bioteknoloji (Cat. No: 201-11-0198)
Sıçan LH ELISA Kiti	SunRed [®] Bioteknoloji (Cat. No: 201-11-0180)
Sıçan TAS ELISA Kiti	SunRed [®] Bioteknoloji (Cat. No: 201-11-2672)
Sıçan TOS ELISA Kiti	SunRed [®] Bioteknoloji (Cat. No: 201-11-1669)
Üniversal GSH ELISA Kiti	Elabscience [®] (Cat. No: E-EL-0026)
Üniversal MDA ELISA Kiti	Elabscience [®] (Cat. No: E-EL-0060)
Üniversal Testosteron ELISA Kiti	Elabscience [®] (Cat. No: E-EL-0072)

3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,1-2,5 μ L; 0,5-10 μ L; 2-20 μ L; 20-200 μ L; 100-1000 μ L ve 8 kanallı 30-300 μ L)	Eppendorf
Bidistile su cihazı	Milipore Gradient
Blok ısıtıcı	Stuart (SBH130D)
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik (5231NFY)
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik (2041D)
Derin dondurucu (-80 °C)	Daihan-Scientific Wisecry
El homojenitörü	Kontes Glass Company Pellet Pestle Motor (749521-1500)
Etüv	Nüve
Gömme cihazı	Leica (EG1150 H)
Hassas terazi	Precisa (XB220A)
Homojenizatör	Active Motif (CL-18)
Işık mikroskobu	Leica (DM 500)
İnkübatör	Techne Hibrigene (TLK38)
Kesit alma cihazı	Leica (RM 2125 RT Microtome)
Mikrodalga fırın	Beko (MD1510S)
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Epoch Biotek
Mikrosantrifüj aleti	Hettich (Micro-120)
Otoklav	Hirayama (HV-50L)
pH metre	Hanna (HI1131B)
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich Micro (200R)
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Universal (32R)
Su banyosu	Memmert (WB14)
Vorteks	Ika (NC 28405)

3.4. Deney Hayvanları ve Maruziyet Koşulları

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 31.03.16 tarih ve 2016/35 sayılı kararı ile çalışma için etik kurul onayı alınmış olup tüm çalışma etik kurallara uygun olarak gerçekleştirildi. İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünden 48 adet 250-375 g ağırlığındaki sağlıklı genç erişkin erkek Sprague-Dawley türü sıçan temin edilerek maruziyetler aynı imkanların sağlandığı Enstitünün Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalında gerçekleştirildi (Şekil 3-1). Deney hayvanlarının bakım ve kullanım aşamalarında National Institute of Health kılavuzu (Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011) takip edildi.



Şekil 3-1: Deney hayvanı bakım ünitesi.

Deney hayvanları 50 ± 10 nem ve $22-24$ °C sıcaklığına sahip kontrollü odada temiz paslanmaz çelik kafeslerde, randomize bir şekilde dağıtılarak her kafeste 4-5 hayvan olacak şekilde ve 12/12 saat aydınlık/karanlık fotoperiyotta barındırıldı. Deney hayvanları bu süreçte *ad libitum* standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi.

Asetamiprit etken maddesi %97 saflıktaki numune şeklinde Hektaş firmasından Deniz Gürçay aracılığıyla temin edildi. Asetamiprit %0,5'lik metil selülozun sudaki çözeltisi içerisinde hazırlandı ve bu karışım vehikül (kontrol) olarak kullanıldı. Uygulamalar ucu bilyeli metal gavaj tüpü ve 2 mL'lik cam enjektör yardımıyla günde 1 defa olmak üzere sabah saat 9:00-11:00 arasında oral gavaj yolu ile vücut ağırlığına orantılı dozlama yapılarak gerçekleştirildi. Kontrol (vehikül), düşük, orta ve yüksek doz asetamiprid uygulaması olmak üzere 4 deney grubu tercih edildi. Deney grupları için

toplamda 48 deney hayvanı olmak üzere 90 gün boyunca¹ %0,5'lik metil selülozun sudaki çözeltisi ve %0,5'lik metil selülozun sudaki çözeltisi içinde hazırlanan asetamipridin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakıldı. Deney grupları, gruplardaki hayvan sayıları ve çalışma süresince oral gavaj yöntemi ile uygulanan maruziyet koşulları aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi;

Kontrol Grubu: 11 hayvan, %0,5'lik metil selüloz verilen grup.

Düşük Doz Grubu: 12 hayvan, %0,5'lik metil selülozda hazırlanan 4,375 mg/mL asetamiprid çözeltisi ile 12,5 mg asetamiprid/kg v.a. olacak şekilde dozlama yapılan grup.

Orta Doz Grubu: 12 hayvan, %0,5'lik metil selülozda hazırlanan 8,75 mg/mL asetamiprid çözeltisi ile 25 mg/kg asetamiprid/kg v.a. olacak şekilde dozlama yapılan grup.

Yüksek Doz Grubu: 13 hayvan, %0,5'lik metil selülozda hazırlanan 12,25 mg/mL asetamiprid çözeltisi ile 35 mg/kg asetamiprid/kg v.a. olacak şekilde dozlama yapılan grup.

Dozlama vücut ağırlığına orantılı olarak uygulama öncesi hazırlanmış olan vücut ağırlığı-doz cetveline göre gerçekleştirildi (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Deney süresince takip edilen vücut ağırlığı-doz cetveli.

Vücut ağırlığı (g)	Verilen çözelti miktarı (mL)
371-380	1,09
361-370	1,06
351-360	1,03
341-350	1,00
331-340	0,97
321-330	0,94
311-320	0,91
301-310	0,89
291-300	0,86
280-290	0,83

¹ Doksan günlük maruziyet süresince haftada bir gün (pazar günleri) dozlama yapılmamış olup bu doz maruziyet süresine ilave edilmiştir. Bu sebeple çalışmada dozlama 105 gün sürmüştür, ancak 90 gün ifadesi maruziyet günlerinin toplamı olarak ifade edilmiştir.

Deney hayvanının sağlıklı durumunu koruyup korumadığı hakkında bilgi edinmek üzere (EPA 1996) deney hayvanlarının teslim alındığı gün vücut ağırlıkları kaydedildi ve tartımlar tüm maruziyet süresince haftada 3 gün (pazartesi-çarşamba-cuma) olacak şekilde düzenli olarak gerçekleştirildi. Aseatmipridin üreme sistemi üzerine etkisini tespit için vücut ağırlığı yanı sıra testis ağırlıkları da değerlendirilmek üzere kaydedilmiştir (EPA 1996).

Maruziyet bitimini takiben T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığınca ruhsatlı İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Bakım Ünitesi'ne getirilen deney hayvanlarının yeni ortama alışmaları için herhangi bir maruziyet yapılmaksızın sakrifikasyona kadar 2 gün süresince beklendi. Sakrifikasyondan önceki 12 saat süresince deney hayvanları aç bırakıldı. Deney hayvanlarının sakrifikasyonu eter haznesinde kısa süreli bekletilmelerinin ardından gerçekleştirildi. Sakrifikasyon sonrası plazma, doku ve sperm örnekleri alınıp örneğe ve deneye uygun şartlarda saklandı.

Bazı biyokimyasal parametrelerin maruziyet süresince durumlarının değerlendirilmesi için maruziyet bitiminde alınan kan örneklerinin yanı sıra 45. ve 60. günlerde gözden de kan örnekleri alındı. 45. Günde alınan örnekler deney optimizasyonu esnasında kullanılmış olup tekrar sayıları diğer örneklerle göre daha az sayıda gerçekleştirilebilmiştir. Elde edilen verilere göre 45. ve 60. günlerde alınan örneklerdeki analizler sonuçlarının benzerlik göstermesi sebebiyle tezde sadece 60. gün örneklerinin detaylarına yer verilmiştir.

Tedarik edilen örnekler üzerinde gerçekleştirilen deneyler İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmış olup histolojik incelemeler Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.5. Kan Örneklerinin Toplanması

Maruziyetin 60. ve 90. (sacrifikasyon günü) günlerinde kapiler tüp yardımı ile deney hayvanlarının orbital ven pleksuslarından kan örnekleri toplandı ve örneklerde biyokimyasal analizler gerçekleştirildi. 60. Günde 2 mL kan alınırken sacrifikasyon sonrası 10 mL kan örneği alındı. Uygun hacimdeki EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 20 dk süre ile santrifüj edildi ve aynı gün içerisinde plazmaları ayrıldı. Örnekler 3 parça şeklinde porsiyonlanarak kapaklı tüplerde deney günü kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.6. Testislerin Çıkarılması ve Makroskopik İnceleme

Cerrahi operasyonla çıkarılan testislerde makroskopik olarak herhangi büyüme, küçülme, doku kaybına bağlı boşluklar, doku yumuşaması, doku sertleşmesi, doku koyulaşması, doku soluklaşması, yabancı renk alma ve içerik değişmesi olup olmadığı gözle tespit edildi. Testis ağırlıkları önceden darası alınmış saat camları üzerinde hassas terazide ölçüldü. Biyokimyasal incelemelerde kullanılmak üzere sol testis yeterli miktardaki PBS (1X) içine alınarak deney gününe kadar -80 °C’de saklandı. Sağ testis ise histolojik incelemelerde kullanılmak üzere yeterli miktardaki %10’luk nötral tamponlu formalin içine alındı ve deney gününe kadar oda sıcaklığında saklandı.

3.7. Sperm Sayımı ve Morfolojik İnceleme

Sperm morfolojisindeki anomalilerin ve sperm sayısının düşük üreme oranıyla alakalı olması, sadece sperm sayısının tespitinin semen kalitesi hakkında kesin bilgi vermemesi sebebiyle sperm sayısının kaydı yanı sıra sperm morfolojisi de çalışmada değerlendirildi (Karabulut ve Tekin 2013).

Sperm sayısı ve morfolojisi için sol testis kaudal epididimi kullanıldı. Tartılan dokular 1 mL %10 FBS’li DMEM-F12 besiyerine alınıp makasla yaklaşık 70 kere parçalandı. Eppendorf içerisine alınan süspansiyon 2230 rpm 3 dk süre ile santrifüj edildi. Pellet ile süpernatant arasındaki spermlerin yoğun bulunduğu kısımdan 100 µL alındı. Alınan sıvı kısım 2230 rpm 3 dk süre ile santrifüj edildi. Süpernatantın 15 µL’si temiz bir eppendorfa alındı ve üzerine 15 µL tripan mavisi ilave edildi. Karışım pipetajlanarak iyice karıştırıldı. Karışımın 10 µL’si alınıp Thoma lamına yayıldı. Mikroskopta 20X büyütülüp Thoma lamındaki 4 kare içindeki sperm sayıları belirlendi. Her bir örnek için Thoma lamındaki sayım 3 kez tekrarlandı ve sonuçların ortalaması alındı.

Sol testis kaudal epididimi ayrıca sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için de kullanıldı. %10 FBS’li DMEM-F12 besiyeri içerisinde makasla ile parçalanan epididim süspansiyonundan 1 damla alınarak lama yayım yapıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Deney gününe kadar saklanan yayma örneklerinin morfolojik incelemeleri 1 haftalık süre içinde tamamlandı. Örnekler Diff-Quick boyama ile morfolojik incelemeleri her bir örnek için 3 ayrı yayma, her bir preparat için de 200 sperm değerlendirilmek üzere gerçekleştirildi.

Diff-Quick boyama protokolü; Havada kurutulan yayma örnekler için tercih edilen protokol hücre tarafından çabuk absorbe edilen aktif boyama molekülleri eosin ve tiazinden faydalanılarak gerçekleştirildi. Tez çalışmalarında kit kullanılmış olup üretim firması tarafından bildirilen protokol kullanıldı.

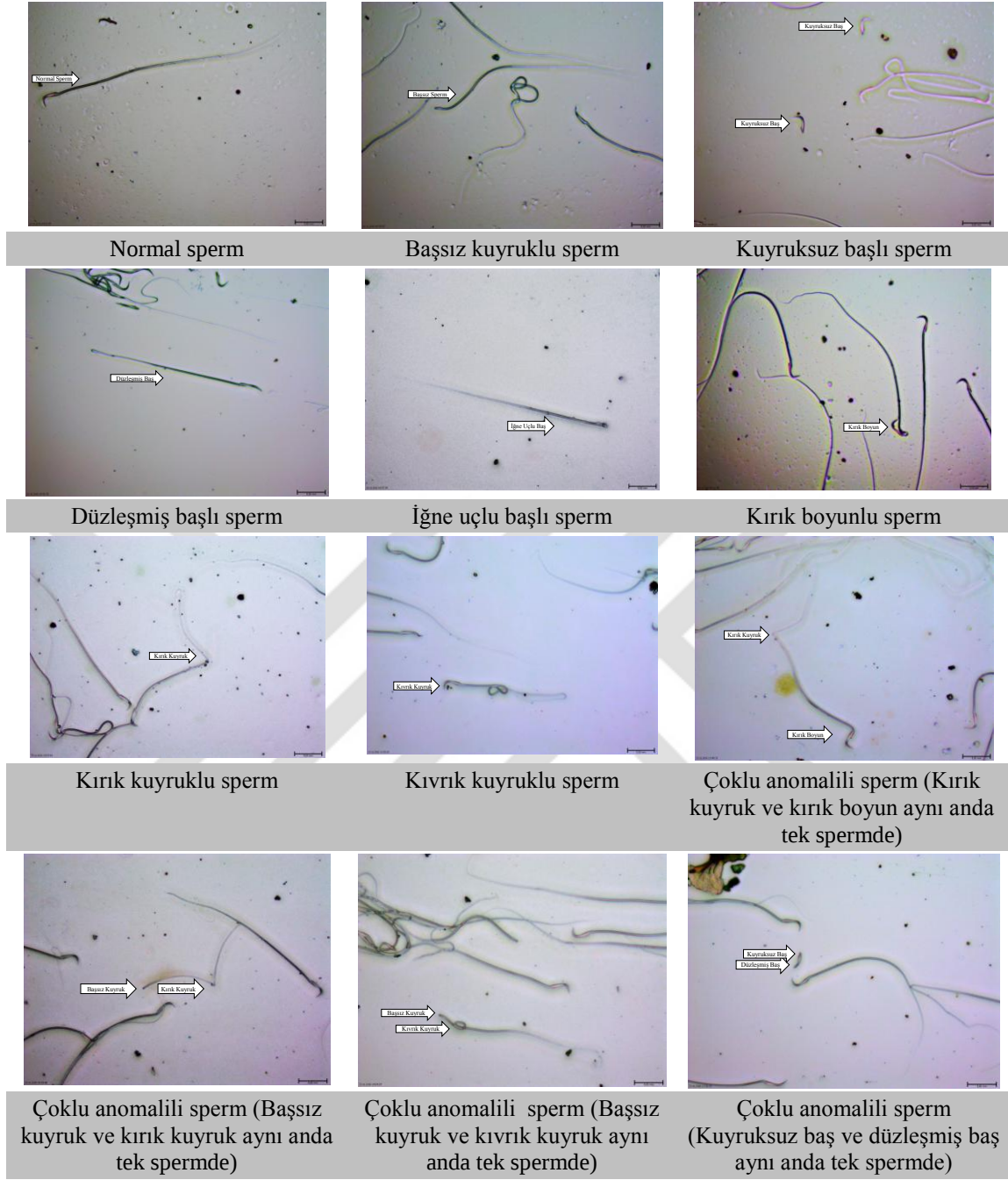
Kit içeriği;

- ADR[®] Fiksatif çözeltisi (A)
- ADR[®] Eosin reaktif çözeltisi (B)
- ADR[®] Thiazin reaktif çözeltisi (C)

Çalışma Yöntemi;

- Lam üzerine yayılan preparat havada kurutuldu.
- Lam, her defasında 1 sn olacak şekilde 5 kez A çözeltisine daldırılıp çıkartıldı. Her daldırma sonrası lam üzerindeki fazla çözeltinin akması beklendi.
- Lam, her defasında 1 sn olacak şekilde 5 kez B çözeltisine daldırılıp çıkartıldı. Her daldırma sonrası lam üzerindeki fazla çözeltinin akması beklendi.
- Lam, her defasında 1 sn olacak şekilde 5 kez C çözeltisine daldırılıp çıkartıldı. Her daldırma sonrası lam üzerindeki fazla çözeltinin akması beklendi.
- Çeşme suyu içerisinde yıkandı.
- Preparatlar 30 dk içinde incelendi.

Morfolojik değerlendirmede spermiler normal sperm, başsız kuyruklu sperm, kuyruksuz başlı sperm, düzleşmiş başlı sperm, iğne uçlu başlı sperm, kırık boyunlu sperm, kırık kuyruklu sperm, çoklu anomalili sperm şeklinde değerlendirildi (Şekil 3-2) (Computer Asisted Sperm Analysis (CASA) Group 2000; Horst ve ark. 2011; Öztaş 2016).



Şekil 3-2: Normal ve anomalili spermilerin morfolojik farklılıkları (Şekiller tez çalışmasındaki verilerden alınmıştır).

3.8. Plazmada Hormon Analizi

Bölüm 3.5’de bahsedildiği üzere porsiyonlanarak -20 °C’de saklanan plazma örneklerinde kit protokollerine uygun şekilde testosteron, LH, FSH, GnRH ve INHB miktar tayinleri gerçekleştirildi.

3.8.1. Testosteron Tayini

Testosteron tayini, ELISA kit (Elabscience®, Wuhan, Hubei, Çin) protokolüne göre gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 3-2’de ayrıntılı olarak verilmiştir;

Tablo 3-2: Testosteron ELISA kit içeriği.

ELISA mikrolaka	96 kuyucuk
Referans Testosteron standartı (6 tüp)	0.5 mL/tüp*
Belirleme antikoru (Anti-Testosteron antikoru)	6 mL
Horseradish peroksidaz (HRP) etiketli Testosteron	6 mL
Konsantre yıkama çözeltisi (20X)	15 mL
Substrat reaktifi A (Tetrametilbenzidin (TMB) substrat çözeltisi)	7 mL
Substrat reaktifi B (TMB substrat çözeltisi hazırlama reaktifi)	7 mL
Durdurma çözeltisi (Sülfürik asit çözeltisi)	7 mL

*Standart seri konsantrasyonları; 0 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0,4 ng/mL, 1,6 ng/mL, 5 ng/mL, 20 ng/mL

Kit içeriğinde bulunan mikrolakadaki her bir kuyucuk katı faz ikincil antikoru sağlayan anti-tavşan IgG ile önceden kaplanmıştır. HRP etiketli testosteron ve anti-testosteron antikorları kuyucuğa eklenerek kaplı ikincil antikor-anti-testosteron antikoru-HRP etiketli testosteron kompleksi oluşturuldu. Kuyucuktaki bağlı etiketlenmiş testosteron ile örnekteki testosteron arasında ters orantı mevcuttur. Mikrolaka uygun yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa TMB substrat çözeltisi eklendi ve HRP’nin katalizlemesi ile TMB maviye döndü. Enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit çözeltisi eklenmesi ile durduruldu ve renk değişimi 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen standart eğriye göre örneklerin testosteron konsantrasyonları ng/mL cinsinden belirlendi. Standart serileri (0; 0,1; 0,4; 1,6; 5 ng/mL) kit içeriği olarak üretim firması tarafından tedarik edildi.

Kit prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- Kullanım öncesi tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına alındı.

- Kullanılacak tüm kit çözeltileri köpürmenin önlenmesi için yavaş ve nazik bir şekilde karıştırıldı.
- Mikroplakadaki kuyucukların hazırlanması için;
 - Blank: 50'şer μL belirleme antikor ve durdurma çözeltisi eklendi.
 - Standart: Kullanım öncesi $1000\times\text{g}$ 'de 1 dk süre ile santrifüj edilen standart seriden (0 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0,4 ng/mL, 1,6 ng/mL, 5 ng/mL, 20 ng/mL) 50 μL kuyucuklara ilave edildi. Sırayla, 50'şer μL HRP etiketli testosteron ve belirleme (anti-testosteron) antikor eklendi.
 - Örnek: Kuyucuklar 50 μL örnek ile dolduruldu. Sırayla, 50'şer μL HRP etiketli testosteron ve belirleme antikor eklendi.
- Mikroplaka hafifçe çalkalandı ve plaka folya ile kapatıldı.
- Mikroplaka 1 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve kurutuldu.
- Yıkama çözeltisi (20X) mili-Q su ile seyreltildi (1X).
- Kuyucuklara 350 μL yıkama çözeltisi (1X) ilave edildi. Hafifçe çalkalanarak 1-2 dk bekletildi ve kuyu içeriği boşaltıldı. Bu işlem 3 kere tekrar edildi. Son yıkama ile plaka ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde ve hafifçe vurarak kurutuldu.
- Kullanımdan 10 dk önce substrat reaktif A ve B 1:1 oranında karıştırıldı. Her bir kuyucuğa 100 μL karışımdan eklendi. 15-30 dk süre ile 37 °C'de inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa 50 μL durdurma çözeltisi ilave edildi ve kuyucuk içeriğinin sarıya dönmesi gözlemlendi.
- Kuyucuk içeriğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.
- Her bir deney 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart seriye ait konsantrasyon-absorbans eğrisi elde edildi. Standart seri eğrisi hazırlanmasında CurveExpert programı kullanıldı.
- Hazırlanan eğri ile elde edilen denkleme göre örnek değerleri belirlendi.

3.8.2. Luteinize Edici Hormon (LH) Tayini

LH tayini, ELISA kit (SunRed®, Şanghay, Çin) protokülüne göre gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 3-3’de ayrıntılı olarak verilmiştir;

Tablo 3-3: LH ELISA kit içeriği.

ELISA mikrolaka	96 kuyucuk
Konsantre standart çözeltisi (64 mIU/mL)	0,5 mL
Standart seyreltici	3 mL
Konsantre yıkama çözeltisi (30X)	20 mL
Biotin-LH aAntikoru	1 mL
Streptavidin (Str)-HRP konjuge reaktifi	6 mL
Kromojen çözelti A	6 mL
Kromojen çözelti B	6 mL
Durdurma çözeltisi (Sülfirik asit çözeltisi)	6 mL

Yöntem çift antikor sandviç teknolojisi ile hazırlanan ELISA yöntemine dayanır. LH monoklonal antikoru ile kaplı kuyucuklara LH eklendi ve inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklara biotinle etiketlenmiş ve immün kompleks oluşturmak için Str-HRP ile kombine edilmiş LH antikoru eklendi. Tekrar inkübasyona bırakılan kuyucuklar bağlı olmayan enzimleri uzaklaştırmak amacıyla yıkandı. Kromojen çözelti A ve B’nin eklenmesiyle rengin maviye dönmesi gözlemlendi. Reaksiyonu durdurmak üzere durdurma çözeltisinin eklenmesi ile mavi renk sarıya döndü. Kuyucuk içeriğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Oluşan rengin spektrofotometride verdiği absorbans değeri ile LH değerleri arasında pozitif korelasyon vardır. Kit prosedürüne göre standart serisi Tablo 3-4’e belirtildiği şekilde hazırlandı. Elde edilen standart eğriye göre örneklerin LH konsantrasyonları mIU/mL cinsinden belirlendi.

Tablo 3-4: LH standart seri hazırlanması.

Standart 5	32 mIU/mL	120 µL konsantre standart çözeltisi + 120 µL standart seyreltici
Standart 4	16 mIU/mL	120 µL standart 5 + 120 µL standart seyreltici
Standart 3	8 mIU/mL	120 µL standart 4 + 120 µL standart seyreltici
Standart 2	4 mIU/mL	120 µL standart 3 + 120 µL standart seyreltici
Standart 1	2 mIU/mL	120 µL standart 2 + 120 µL standart seyreltici

Kit prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- Mikroplakadaki kuyucukların hazırlanması için;
 - Blank: 50'şer μL Kromojen A ve B çözeltisi ile 50 μL durdurma çözeltisi eklenen kuyucuklar için diğer kuyucuklardaki uygulamalara benzer şekilde deneye devam edildi.
 - Standart: 50'şer μL standart ve Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
 - Örnek: 40 μL örnek, 10 μL biotin-LH antikoru ve 50 μL Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
- Mikroplaka hafifçe çalkalandı ve plaka folya ile kapatıldı.
- Mikroplaka 1 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve kurutuldu.
- Yıkama çözeltisi (30X) mili-Q su ile seyreltildi (1X).
- Kuyucuklara 350 μL yıkama çözeltisi (1X) ilave edildi. Hafifçe çalkalanarak 1-2 dk bekletildi ve kuyu içeriği boşaltıldı. Bu işlem 3 defa tekrar edildi. Son yıkama sonrası plaka ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde hafifçe vurularak kurutuldu.
- Her bir kuyucuğa 50'şer μL Kromojen A ve Kromojen B çözeltileri eklendi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dk 37 °C'de ışıksız ortamda inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kuyucuklara 50 μL durdurma çözeltisi eklendi. Kuyucuk içeriğinin maviden sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Kuyucuk içeriğinin absorbansı durdurma çözeltisinin ilavesini takiben 15 dk sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotomerik olarak ölçüldü.
- Her bir deney 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart seriye ait konsantrasyon-absorbans eğrisi elde edildi. Standart seri eğrisi hazırlanmasında Excel programı kullanıldı.
- Hazırlanan eğri ile elde edilen denkleme göre örnek değerleri belirlendi.

3.8.3. Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) Tayini

FSH tayini, ELISA (SunRed®, Şanghay, Çin) kit protokülüne göre gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 3-5’de ayrıntılı olarak verilmiştir;

Tablo 3-5: FSH ELISA kit içeriği.

ELISA mikrolaka	96 kuyucuk
Konsantre standart çözeltisi (80 IU/mL)	0,5 mL
Standart seyreltici	3 mL
Konsantre yıkama çözeltisi (30X)	20 mL
Biotin-FSH antikoru	1 mL
Str-HRP konjuge reaktifi	6 mL
Kromojen çözelti A	6 mL
Kromojen çözelti B	6 mL
Durdurma çözeltisi (Sülfirik asit çözeltisi)	6 mL

Yöntem çift antikor sandviç teknolojisi kullanılan ELISA yöntemine dayanır. FSH monoklonal antikoru ile kaplı kuyucuklara FSH eklendi ve inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında biotinle etiketlenmiş ve immün kompleks oluşturmak için Str-HRP ile kombine edilmiş FSH antikorları eklendi. Tekrar inkübasyona bırakılan kuyucuklar bağlı olmayan enzimleri uzaklaştırmak amacıyla yıkandı. Kromojen çözelti A ve B’nin eklenmesiyle rengin maviye dönmesi gözlemlendi. Reaksiyonu durdurmak üzere durdurma çözeltisinin eklenmesi ile mavi renk sarıya döndü. Kuyucuk içeriğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Oluşan rengin spektrofotometride verdiği absorbans değeri ile FSH değerleri arasında pozitif korelasyon vardır. Kit prosedürüne göre standart serisi Tablo 3-6’da belirtildiği şekilde hazırlandı. Elde edilen standart eğriye göre örneklerin FSH konsantrasyonları IU/mL cinsinden belirlendi.

Tablo 3-6: FSH standart seri hazırlanması.

Standart 5	40 IU/mL	120 µL konsantre standart çözeltisi + 120 µL standart seyreltici
Standart 4	20 IU/mL	120 µL standart 5 + 120 µL standart seyreltici
Standart 3	10 IU/mL	120 µL standart 4 + 120 µL standart seyreltici
Standart 2	5 IU/mL	120 µL standart 3 + 120 µL standart seyreltici
Standart 1	2,5 IU/mL	120 µL standart 2 + 120 µL standart seyreltici

Kit prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- Mikrolakadaki kuyucukların hazırlanması için;
 - Blank: 50'şer μL Kromojen A ve B çözeltisi ile 50 μL durdurma çözeltisi eklenen kuyucuklar için diğer kuyucuklardaki uygulamalara benzer şekilde deneye devam edildi.
 - Standart: 50'şer μL standart ve Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
 - Örnek: 40 μL örnek, 10 μL biotin-LH antikoru ve 50 μL Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
- Mikrolaka hafifçe çalkalandı ve plaka folia ile kapatıldı.
- Mikrolaka 1 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve kurutuldu.
- Yıkama çözeltisi (30X) mili-Q su ile seyreltildi (1X).
- Kuyucuklara 350 μL yıkama çözeltisi (1X) ilave edildi. Hafifçe çalkalanarak 1-2 dk bekletildi ve kuyu içeriği boşaltıldı. Bu işlem 3 defa tekrar edildi. Son yıkama sonrası plaka ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde hafifçe vurarak kurutuldu.
- Her bir kuyucuğa 50'şer μL Kromojen A ve Kromojen B çözeltileri eklendi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dk 37 °C'de ışıksız ortamda inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kuyucuklara 50 μL durdurma çözeltisi eklendi. Kuyucuk içeriğinin maviden sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Kuyucuk içeriğinin absorbansı durdurma çözeltisinin ilavesini takiben 15 dk sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotomerik olarak ölçüldü.
- Her bir deney 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart seriye ait konsantrasyon-absorbans eğrisi elde edildi. Standart seri eğrisi hazırlanmasında Excel programı kullanıldı.
- Hazırlanan eğri ile elde edilen denkleme göre örnek değerleri belirlendi.

3.8.4. Gonadotropin Salgılayıcı Hormon (GnRH) Tayini

GnRH tayini ELISA kit (SunRed®, Şanghay, Çin) protokülüne göre gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 3-7’de ayrıntılı olarak verilmiştir;

Tablo 3-7: GnRH ELISA kit içeriği.

ELISA mikrolaka	96 kuyucuk
Konsantre standart çözeltisi (1280 ng/L)	0,5 mL
Standart seyreltici	3 mL
Konsantre yıkama çözeltisi (30X)	20 mL
Biotin-GnRH antikoru	1 mL
Str-HRP konjuge reaktifi	6 mL
Kromojen çözelti A	6 mL
Kromojen çözelti B	6 mL
Durdurma çözeltisi (Sülfirik asit çözeltisi)	6 mL

Çift antikor sandviç teknolojisi kullanılan ELISA yöntemine dayanır. GnRH monoklonal antikoru ile önceden kaplanmış monoklonal antikor enzim kuyucuklarına GnRH eklendi ve inkübe edildi. Sonrasında biotinle etiketlenmiş ve immun kompleks oluşturmak için Str-HRP ile kombine edilmiş GnRH antikoru eklendi. İnkübasyona bırakılan kuyucuklar bağlı olmayan enzimleri uzaklaştırmak amacıyla yıkandı. Kromojen çözelti A ve B’nin eklenmesiyle renk maviye döndü. Eklenen asitin etkisiyle renk reaksiyon sonunda sarıya döndü. Kuyucuk içeriğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotomerik olarak ölçüldü. Oluşan rengin spektrofotometride verdiği absorbans değeri ile GnRH değerleri arasında pozitif korelasyon vardır. Kit prosedürüne göre standart serisi Tablo 3-8’de belirtildiği şekilde hazırlandı. Elde edilen standart eğriye göre örneklerin GnRH konsantrasyonları ng/L cinsinden belirlendi.

Tablo 3-8: GnRH standart seri hazırlanması.

Standart 5	640 ng/L	120 µL konsantre standart çözeltisi + 120 µL standart seyreltici
Standart 4	320 ng/L	120 µL standart 5 + 120 µL standart seyreltici
Standart 3	160 ng/L	120 µL standart 4 + 120 µL standart seyreltici
Standart 2	80 ng/L	120 µL standart 3 + 120 µL standart seyreltici
Standart 1	40 ng/L	120 µL standart 2 + 120 µL standart seyreltici

Kit prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- Mikroplakadaki kuyucukların hazırlanması için;
 - Blank: 50'şer μL Kromojen A ve B çözeltisi ile 50 μL durdurma çözeltisi eklenen kuyucuklarda diğer kuyucuklardaki uygulamalara benzer şekilde deneye devam edildi.
 - Standart: 50'şer μL standart ve Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
 - Örnek: 40 μL örnek, 10 μL biotin-GnRH antikoru ve 50 μL Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
- Mikroplaka hafifçe çalkalandı ve plaka folia ile kapatıldı.
- Mikroplaka 1 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve kurutuldu.
- Yıkama çözeltisi (30X) mili-Q su ile seyreltildi (1X).
- Kuyucuklara 350 μL yıkama çözeltisi (1X) ilave edildi. Hafifçe çalkalanarak 1-2 dk bekletildi ve kuyu içeriği boşaltıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Son yıkama sonrası plaka ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde hafifçe vurarak kurutuldu.
- Her bir kuyucuğa 50'şer μL Kromojen A ve Kromojen B çözeltileri eklendi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dk 37 °C'de ışıksız ortamda inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kuyucuklara 50 μL durdurma çözeltisi eklendi. Kuyucuk içeriğinin maviden sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Kuyucuk içeriğinin absorbansı durdurma çözeltisinin ilavesini takiben 15 dk sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotomerik olarak ölçüldü.
- Her bir deney 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart seriye ait konsantrasyon-absorbans eğrisi elde edildi. Standart seri eğrisi hazırlanmasında Excel programı kullanıldı.
- Hazırlanan eğri ile elde edilen denkleme göre örnek değerleri belirlendi.

3.8.5. İnhibin-B (INHB) Tayini

INHB tayini, ELISA kit (SunRed®, Şanghay, Çin) protokülüne göre gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 3-9’da ayrıntılı olarak verilmiştir;

Tablo 3-9: INHB ELISA kit içeriği.

ELISA mikrolaka	96 kuyucuk
Konsantre standart çözeltisi (32 ng/mL)	0,5 mL
Standart seyreltici	3 mL
Konsantre yıkama çözeltisi (30X)	20 mL
Biotin-INHB antikor	1 mL
Str-HRP konjuge reaktifi	6 mL
Kromojen çözelti A	6 mL
Kromojen çözelti B	6 mL
Durdurma çözeltisi (Sülfürik asit çözeltisi)	6 mL

Yöntem çift antikor sandviç teknolojisi kullanılan ELISA yöntemine dayanır. INHB monoklonal antikor ile kaplı kuyucuklara INHB eklendi ve inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında biotinle etiketlenmiş ve immun kompleks oluşturmak için Str-HRP ile kombine edilmiş INHB antikorları eklendi. İnkübasyona bırakılan kuyucuklar bağlı olmayan enzimleri uzaklaştırmak amacıyla yıkandı. Kromojen çözelti A ve B’nin eklenmesiyle renk maviye döndü. Eklenen asitin etkisiyle renk reaksiyon sonunda sarıya döndü. Kuyucuk içeriğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotomerik olarak ölçüldü. Oluşan rengin spektrofotometride verdiği absorbans değeri ile INHB değerleri arasında pozitif korelasyon vardır. Kit prosedürüne göre standart serisi Tablo 3-10’da belirtildiği şekilde hazırlandı. Elde edilen standart eğriye göre örneklerin INHB konsantrasyonları ng/mL cinsinden belirlendi.

Tablo 3-10: INHB standart seri hazırlanması.

Standart 5	16 ng/mL	120 µL konsantre standart çözeltisi + 120 µL standart seyreltici
Standart 4	8 ng/mL	120 µL standart 5 + 120 µL standart seyreltici
Standart 3	4 ng/mL	120 µL standart 4 + 120 µL standart seyreltici
Standart 2	2 ng/mL	120 µL standart 3 + 120 µL standart seyreltici
Standart 1	1 ng/mL	120 µL standart 2 + 120 µL standart seyreltici

Kit prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- Mikroplakadaki kuyucukların hazırlanması için;
 - Blank: 50'şer μL Kromojen A ve B çözeltisi ile 50 μL durdurma çözeltisi eklenen kuyucuklar için diğer kuyucuklardaki uygulamalara benzer şekilde deneye devam edildi.
 - Standart: 50'şer μL standart ve Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
 - Örnek: 40 μL örnek, 10 μL Biotin-INHB antikoru ve 50 μL Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
- Mikroplaka hafifçe çalkalandı ve plaka folia ile kapatıldı.
- Mikroplaka 1 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve kurutuldu.
- Yıkama çözeltisi (30X) mili-Q su ile seyreltildi (1X).
- Kuyucuklara 350 μL yıkama çözeltisi (1X) ilave edildi. Hafifçe çalkalanarak 1-2 dk bekletildi ve kuyu içeriği boşaltıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Son yıkama sonrası plaka ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde hafifçe vurularak kurutuldu.
- Her bir kuyucuğa 50'şer μL Kromojen A ve Kromojen B çözeltileri eklendi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dk 37 °C'de ışıksız ortamda inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kuyucuklara 50 μL durdurma çözeltisi eklendi. Kuyucuk içeriğinin maviden sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Kuyucuk içeriğinin absorbansı durdurma çözeltisinin ilavesini takiben 15 dk sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotomerik olarak ölçüldü.
- Her bir deney 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart seriye ait konsantrasyon-absorbans eğrisi elde edildi. Standart seri eğrisi hazırlanmasında Excel programı kullanıldı.
- Hazırlanan eğri ile elde edilen denkleme göre örnek değerleri belirlendi.

3.8.6. Kolesterol Tayini

Kolesterol tayini, ELISA kit (SunRed®, Şanghay, Çin) protokülüne göre gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 3-11’de ayrıntılı olarak verilmiştir;

Tablo 3-11: Kolesterol ELISA kit içeriği.

ELISA mikrolaka	96 kuyucuk
Konsantre standart çözeltisi (32 mmol/L)	0,5 mL
Standart seyreltici	3 mL
Konsantre yıkama çözeltisi (30X)	20 mL
Biotin-kolesterol antikoru	1 mL
Str-HRP konjuge reaktifi	6 mL
Kromojen çözelti A	6 mL
Kromojen çözelti B	6 mL
Durdurma çözeltisi (Sülfürik asit çözeltisi)	6 mL

Yöntem çift antikor sandviç teknolojisi kullanılan ELISA yöntemine dayanır. Kolesterol monoklonal antikoru ile kaplı kuyucuklara kolesterol eklendi ve inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında biotinle etiketlenmiş ve immun kompleks oluşturmak için Str-HRP ile kombine edilmiş kolesterol antikorları eklendi. İnkübasyona bırakılan kuyucuklar bağlı olmayan enzimleri uzaklaştırmak amacıyla yıkandı. Kromojen çözelti A ve B’nin eklenmesiyle renk maviye döndü. Eklenen asitin etkisiyle renk reaksiyon sonunda sarıya döndü. Kuyucuk içeriğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotomerik olarak ölçüldü. Oluşan rengin spektrofotometride verdiği absorbans değeri ile kolesterol değerleri arasında pozitif korelasyon vardır. Kit prosedürüne göre standart serisi Tablo 3-12’de belirtildiği şekilde hazırlandı. Elde edilen standart eğriye göre örneklerin kolesterol konsantrasyonları mmol/L cinsinden belirlendi.

Tablo 3-12: Kolesterol standart seri hazırlanması.

Standart 5	16 mmol/L	120 µL konsantre standart çözeltisi + 120 µL standart seyreltici
Standart 4	8 mmol/L	120 µL standart 5 + 120 µL standart seyreltici
Standart 3	4 mmol/L	120 µL standart 4 + 120 µL standart seyreltici
Standart 2	2 mmol/l	120 µL standart 3 + 120 µL standart seyreltici
Standart 1	1 mmol/L	120 µL standart 2 + 120 µL standart seyreltici

Kit prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- Mikroplakadaki kuyucukların hazırlanması için;
 - Blank: 50'şer μL Kromojen A ve B çözeltisi ile 50 μL durdurma çözeltisi eklenen kuyucuklar için diğer kuyucuklardaki uygulamalara benzer şekilde deneye devam edildi.
 - Standart: 50'şer μL standart ve Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
 - Örnek: 40 μL örnek, 10 μL biotin-kolesterol antikoru ve 50 μL Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
- Mikroplaka hafifçe çalkalandı ve plaka folia ile kapatıldı.
- Mikroplaka 1 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve kurutuldu.
- Yıkama çözeltisi (30X) mili-Q su ile seyreltildi (1X).
- Kuyucuklara 350 μL yıkama çözeltisi (1X) ilave edildi. Kibarca çalkalanarak 1-2 dk bekletildi ve kuyu içeriği boşaltıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Son yıkama sonrası plaka ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde hafifçe vurarak kurutuldu.
- Her bir kuyucuğa 50'şer μL Kromojen A ve Kromojen B çözeltileri eklendi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dk 37 °C'de ışıksız ortamda inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kuyucuklara 50 μL durdurma çözeltisi eklendi. Kuyucuk içeriğinin maviden sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Kuyucuk içeriğinin absorbansı durdurma çözeltisinin ilavesini takiben 15 dk sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotomerik olarak ölçüldü.
- Her bir deney 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart seriye ait konsantrasyon-absorbans eğrisi elde edildi. Standart seri eğrisi hazırlanmasında CurveExpert programı kullanıldı.
- Hazırlanan eğri ile elde edilen denkleme göre örnek değerleri belirlendi.

3.9. Plazmada ve Testis Dokusunda Oksidatif Hasar Tespiti

Oksidatif stres bilindiği üzere DNA hasarı ve mutasyonlardan, nekroz veya apoptoz ile hücre ölümüne kadar uzanan çeşitli ciddi sonuçlara yol açmaktadır. Çoğu patolojik olgunun özünde oksidatif stres yatmakta, oksidatif stres tayini de çeşitli biyokimyasal parametreler ile gerçekleştirilebilmektedir. Örn; lipidlerin peroksidasyonu malonaldehid (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) vb belirteçler ile, protein oksidasyonu protein karbonil ile, nükleik asit oksidatif DNA bazları ile ve karbonhidrat glikosilasyon ürünleri ile tespit edilebilmektedir. Araştırmacılar oksidatif hasar potansiyelini belirlemek üzere süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyonun redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimler, seruloplasmin ve metalotioninler gibi proteinlerin ölçümü gibi oksidatif strese bağlı doku hasarı ve antioksidan savunmanın birçok belirteçini de kullanmaktadır. Ancak, 1990'ların başında Miller ve ark. (1993) total antioksidan seviyesi (TAS) olarak belirlenen toplam antioksidan durumunu ölçmek için yeni bir test hazırladı. Bu testin en büyük avantajı, tek bir bileşiğin antioksidan kapasitesini değil aynı zamanda biyolojik bir numunedeki tüm antioksidanların antioksidan kapasitesini ölçmek mümkün olabilmektedir (Rice-Evans ve Miller 1994; Chiselli ve ark. 2000; Kusano ve Ferrari 2008). Benzer şekilde örnek içerisinde bulunan tüm oksidanların total miktarını gösteren bir parametre olarak da total oksidan seviyesi (TOS) ölçümü oksidatif durumun tahmini için sıklıkla kullanılan bir testtir (Erel 2005; Menteşe 2012; Ekuni ve ark. 2014).

Tez çalışmasında oksidatif hasar tespiti için plazma ve testis doku örneklerinde kit (Elabscience® ve SunRed®, Çin) protokollerine uygun olarak oksidatif hasar parametrelerinden GSH, MDA, TAS ve TOS için miktar tayini yapıldı. Plazma örnekleri -20 °C'de, testis doku örnekleri ise -80 °C'de saklandı. Plazma örnekleri testin yapılacağı zaman +4 °C'de bekletilmek suretiyle çözüldüler. Bir bütün halinde PBS (1X) içinde bulunan testisler PBS'den uzaklaştırıldı. Testisler, ağırlıklarının 5 katı hacimde PBS (1X) içine alınarak soğuk ortamda homojenitör ile homojenize edildi. Birer ml'lik hacimler halinde porsiyonlanan homojenatlar hızla -80 °C'ye alındı ve deneyin yapılacağı zaman +4 °C'de bekletilmek suretiyle çözüldüler. Tüm örnekler kit protokolüne uygun şekilde çalışıldı.

3.9.1. Glutatyon (GSH) Tayini

GSH tayini, ELISA kit (Elabscience®, Wuhan, Hubei, Çin) protokülüne göre gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 3-13’de ayrıntılı olarak verilmiştir;

Tablo 3-13: GSH ELISA kit içeriği.

ELISA mikrolaka	96 kuyucuk
Referans standartı	2 vial
Referans standart ve örnek seyreltici	2×20 mL
Konsantre biotin-GSH antikor	120 µL
Biotin-GSH antikor seyreltici	10 µL
Konsantre avidin-HRP konjugatı	120 µL
Avidin-HRP konjugat seyreltici	10 mL
Konsantre yıkama çözeltisi (25X)	30 mL
TMB substrat reaktifi	10 mL
Durdurma çözeltisi (Sülfürik asit çözeltisi)	10 mL

Yarışmalı ELISA yöntemi esasına dayanan testte kullanılan mikrolakalar GSH ile kaplanmıştır. Reaksiyon boyunca örnek ve standarttaki GSH, GSH’a özel biotinize belirleme antikorundaki katı faz destekleyici bölgesinde sabit miktardaki GSH ile yarışır. Fazla konjugat ve bağlanmamış GSH dışı örnek içeriği veya standart plakanın yıkanması ile uzaklaştırıldı. Avidin-HRP konjugatı tüm kuyucuklara eklendi ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan alınan plakadaki kuyucuklara TMB substrat reaktifi eklendi. Enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit çözeltisi eklenerek durduruldu. Renk değişikliği 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen verilerle standart eğri çizildi. Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla örneklerin GSH konsantrasyonları µg/mL cinsinden belirlendi. Örnekteki protein düzeyinin tespitinin ardından GSH seviyeleri mmol/mg protein cinsinden hesaplandı.

Kit prosedürüne göre standart serisi Tablo 3-14'te belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3-14: GSH standart seri hazırlanması.

Standart 1	100 µg/mL	500 µL konsantre standart çözeltisi
Standart 2	50 µg/mL	500 µL Standart 1 + 500 µL referans standart ve örnek seyreltici
Standart 3	25 µg/mL	500 µL Standart 2 + 500 µL referans standart ve örnek seyreltici
Standart 4	12,5 µg/mL	500 µL Standart 3 + 500 µL referans standart ve örnek seyreltici
Standart 5	6,25 µg/mL	500 µL Standart 4 + 500 µL referans standart ve örnek seyreltici
Standart 6	3,13 µg/mL	500 µL Standart 5 + 500 µL referans standart ve örnek seyreltici
Standart 7	1,56 µg/mL	500 µL Standart 6 + 500 µL referans standart ve örnek seyreltici
Standart 8	0 µg/mL	500 µL referans standart ve örnek seyreltici

Kit prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- Kullanım öncesi tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına alındı.
- Kullanılacak tüm kit çözeltileri köpürmenin önlenmesi için yavaş ve nazik bir şekilde karıştırıldı.
- Mikroplakadaki kuyucukların hazırlanması için;
 - Blank: 50'şer µL referans standart ve örnek seyreltici ile 50 µL biotin-GSH antikor çözeltisi eklendi.
 - Standart: Kullanım öncesi 10000×g'de 1 dk süre ile santrifüj edilen standart seriden 50 µL kuyucuklara ilave edildi. Ardından 50 µL biotin-GSH antikoru çalışma çözeltisi eklendi.
 - Örnek: Plazma örnekleri deney için direkt olarak kullanıldı. -80 °C'de homojenize olarak bekleyen doku örnekleri ise oda sıcaklığında 5000×g'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatantları kullanıldı. Örnek kuyucukları 50 µL örnek ile dolduruldu. Üzerine 50 µL biotin-GSH antikoru eklendi.
- Mikroplaka hafifce çalkalandı ve plaka folia ile kapatıldı.
- Mikroplaka 45 dk süre ile 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve kurutuldu.
- Yıkama çözeltisi (25X) mili-Q su ile 1:25 oranında seyreltildi.

- Kuyucuklara 350 μ L yıkama çözeltisi (1X) ilave edildi. Hafifçe çalkalanarak 1-2 dk bekletildi ve kuyu içeriği boşaltıldı. İşlem 3 kez tekrar edildi. Son yıkama sonrası plaka ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde hafifçe vurarak kurutuldu.
- Kullanımdan önce konsantre HRP konjugatının HRP konjugat seyreltici ile seyreltilmesiyle hazırlanan yeter miktar HRP konjugatı (1:100) çalışılan tüm kuyucuklara 100 μ L olacak şekilde ilave edildi.
- Mikroplaka hafifçe çalkalandı ve plaka folia ile kapatıldı.
- Mikroplaka 30 dk süre ile 37 °C’de inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve kurutuldu.
- Kuyucuklara 350 μ L yıkama çözeltisi (1X) ilave edildi. Hafifçe çalkalanarak 1-2 dk bekletildi ve kuyu içeriği boşaltıldı. İşlem 5 defa tekrar edildi. Son yıkama sonrası plaka ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde hafifçe vurarak kurutuldu.
- Her bir kuyucuğa 90 μ L substrat çözeltisi eklendi.
- Mikroplaka hafifçe çalkalandı ve plaka folia ile kapatıldı. Plaka, reaksiyon ışıktan ortamdan korunması gerektiği için alüminyum folia ile ayrıca kaplandı.
- Mikroplaka 15-30 dk süre ile 37 °C’de inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa 50 μ L durdurma çözeltisi ilave edildi ve kuyucuk içeriğinin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Kuyucuk içeriğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.
- Her bir deney 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart seriye ait konsantrasyon-absorbans eğrisi elde edildi. Standart seri eğrisi hazırlanmasında GraphPad Prism 7 programı kullanıldı.
- Hazırlanan eğri ile elde edilen denkleme göre örnek değerleri belirlendi.

3.9.2. Malondialdehid (MDA) Tayini

MDA tayini, ELISA kit (Elabscience®, Wuhan, Hubei, Çin) protokülüne göre gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 3-15’de ayrıntılı olarak verilmiştir;

Tablo 3-15: MDA ELISA kit içeriği.

ELISA Mikroplaka	96 kuyucuk
Referans Standartı	2 vial
Referans Standart ve Örnek Seyreltici	20 mL
Konsantre Biotin-MDA Belirleme Antikoru	120 µL
Biotin-MDA Belirleme Antikoru Seyreticisi	10 µL
Konsantre Avidin-HRP Konjugatı	120 µL
Avidin-HRP Konjugat Seyreltici	10 mL
Konsantre Yıkama Çözeltisi (25X)	30 mL
TMB Substrat Reaktifi	10 mL
Durdurma Çözeltisi (Sülfürik Asit Çözeltisi)	10 mL

Yarışmalı ELISA yöntemine dayanan testte mikroplakalar MDA ile önceden kaplanmıştır. Reaksiyon boyunca örnek ve standarttaki MDA; MDA’ya özel biotinize belirleme antikoruundaki katı faz destekleyici bölgesinde sabit miktardaki MDA ile yarışır. Fazla konjugat ve bağlanmamış MDA dışı örnek içeriği veya standart plakanın yıkanması ile uzaklaştırıldı. Avidin-HRP konjugatı tüm kuyucuklara eklendi ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklara TMB substrat reaktif eklendi. Enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit çözeltisi eklenerek durduruldu. Renk değişikliği 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen verilerle standart eğrisi çizildi. Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla örneklerin MDA konsantrasyonları ng/mL cinsinden belirlendi. Örnekteki protein düzeyinin tespitinin ardından MDA seviyeleri ng/mg protein üzerinden hesaplandı.

Kit prosedürüne göre standart serisi Tablo 3-16’da belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3-16: MDA standart seri hazırlanması.

Standart 1	2000 ng/mL 500 µL konsantre standart çözeltisi
Standart 2	1000 ng/mL 500 µL Standart 1 + 500 µL referans standart ve örnek seyreltici
Standart 3	500 ng/mL 500 µL Standart 2 + 500 µL referans standart ve örnek seyreltici
Standart 4	250 ng/mL 500 µL Standart 3 + 500 µL referans standart ve örnek seyreltici
Standart 5	125 ng/mL 500 µL Standart 4 + 500 µL referans standart ve örnek seyreltici
Standart 6	62,5 ng/mL 500 µL Standart 5 + 500 µL referans standart ve örnek seyreltici
Standart 7	31,25 ng/mL 500 µL Standart 6 + 500 µL referans standart ve örnek seyreltici
Standart 8	0 ng/mL 500 µL referans standart ve örnek seyreltici

Kit prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- Kullanım öncesi tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına alındı.
- Kullanılacak tüm kit çözeltileri köpürmenin önlenmesi için yavaş ve nazik bir şekilde karıştırıldı.
- Mikroplakadaki kuyucukların hazırlanması için;
 - Blank: 50 μ L referans standart ve örnek seyreltici ile 50 μ L biotin-MDA belirleme antikor çözeltisi eklendi.
 - Standart: Kullanım öncesi 10000 $\times$ g'de 1 dk süre ile santrifüj edilen standart seriden 50 μ L kuyucuklara ilave edilir. Ardından 50 μ L biotin-MDA belirleme antikor çözeltisi eklendi.
 - Örnek: Plazma örnekleri deney için direkt olarak kullanıldı. -80 °C'de homojenize olarak bekleyen doku örnekleri ise oda sıcaklığında 5000 $\times$ g'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatantları kullanıldı. Kuyucuk 50 μ L örnek ile dolduruldu. Üzerine 50 μ L biotin-MDA belirleme antikor eklendi.
- Mikroplaka hafifçe çalkalandı ve plaka kapatıcı ile kapatıldı.
- Mikroplaka 45 dk süre ile 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve kurutuldu.
- Yıkama çözeltisi (25X) mili-Q su ile seyreltildi (1X).
- Kuyucuklara 350 μ L yıkama çözeltisi (1X) ilave edildi. Hafifçe çalkalanarak 1-2 dk bekletildi ve kuyu içeriği boşaltıldı. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Son yıkama sonrası plaka ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde hafifçe vurarak kurutuldu.
- Kullanımdan önce konsantre HRP konjugatının HRP konjugat seyreltici ile seyreltilmesiyle hazırlanan yeter miktar HRP konjugatı (1:100) çalışılan tüm kuyucuklara 100 μ L olacak şekilde ilave edildi.
- Mikroplaka hafifçe çalkalandı ve plaka folia ile kapatıldı.
- Mikroplaka 30 dk süre ile 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve kurutuldu.

- Kuyucuklara 350 µL yıkama çözeltisi (1X) ilave edildi. Kibarca çalkalanarak 1-2 dk bekletildi ve kuyu içeriği boşaltıldı. Yıkama işlemi 5 kez tekrar edildi. Son yıkama sonrası plaka ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde hafifçe vurarak kurutuldu.
- Her bir kuyucuğa 90 µL substrat çözeltisi eklendi.
- Mikroplaka hafifçe çalkalandı ve plaka folia ile kapatıldı. Reaksiyon ışıktan ortamdan korunması gerektiği için plaka alüminyum folia ile kaplandı.
- Mikroplaka 15-30 dk süre ile 37 °C’de inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi ilave edildi ve kuyucuk içeriğinin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Kuyucuk içeriğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.
- Her bir deney 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart seriye ait konsantrasyon-absorbans eğrisi elde edildi. Standart seri eğrisi hazırlanmasında CurveExpert programı kullanıldı.
- Hazırlanan eğri ile elde edilen denkleme göre örnek değerleri belirlendi.

3.9.3. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Tayini

TAS tayini, ELISA kit (SunRed®, Şanghay, Çin) protokülüne göre gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 3-17’de ayrıntılı olarak verilmiştir;

Tablo 3-17: TAS ELISA kit içeriği.

ELISA mikroplaka	96 kuyucuk
Konsantre standart çözeltisi (64 U/ml)	0,5 mL
Standart seyreltici	3 mL
Konsantre yıkama çözeltisi (30X)	20 mL
Biotin-TAS antikor	1 mL
Str-HRP konjuge reaktifi	6 mL
Kromojen çözelti A	6 mL
Kromojen çözelti B	6 mL
Durdurma çözeltisi (Sülfirik asit çözeltisi)	6 mL

Yöntem, çift antikor sandviç teknolojisi kullanılan ELISA yöntemine dayanır. TAS monoklonal antikor ile kaplı kuyucuklara TAS ölçümü yapılacak örnekler eklendi ve inkübe edildi. İnkübasyon sonunda biotinle etiketlenmiş ve immun kompleks

oluşturmak için Str-HRP ile kombine edilmiş TAS antikorları eklendi. İnkübasyona bırakılan kuyucuklar bağlı olmayan enzimleri uzaklaştırmak amacıyla yıkandı. Kromojen çözelti A ve B'nin eklenmesiyle renk maviye döndü. Eklenen asitin etkisiyle renk reaksiyon sonunda sarıya döndü. Oluşan rengin 450 nm'de spektrofotometride verdiği absorbans değeri ile TAS arasında pozitif korelasyon vardır.

Kit prosedürüne göre standart serisi Tablo 3-18'de belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3-18: TAS standart seri hazırlanması.

Standart 5	32 U/mL	120 µL konsantre standart çözeltisi + 120 µL standart seyreltici
Standart 4	16 U/mL	120 µL standart 5 + 120 µL standart seyreltici
Standart 3	8 U/mL	120 µL standart 4 + 120 µL standart seyreltici
Standart 2	4 U/mL	120 µL standart 3 + 120 µL standart seyreltici
Standart 1	2 U/mL	120 µL standart 2 + 120 µL standart seyreltici

Kit prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- Mikroplakadaki kuyucukların hazırlanması için;
 - Blank: 50'şer µL Kromojen A ve Kromojen B çözeltisi ile 50 µL durdurma çözeltisi eklenen kuyucuklar için diğer kuyucuklardaki uygulamalara benzer şekilde deneye devam edildi.
 - Standart: 50'şer µL standart ve Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
 - Örnek: Plazma örnekleri deney için direkt olarak kullanıldı. -80 °C'de homojenize olarak bekleyen doku örnekleri ise oda sıcaklığında 5000×g'de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatantları kullanıldı. Örneğin 40 µL'si üzerine 10 µL biotin-TAS antikor ve 50 µL Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
- Mikroplaka hafifce çalkalandı ve plaka folia ile kapatıldı.
- Mikroplaka 1 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve kurutuldu.
- Yıkama çözeltisi (30X) mili-Q su ile seyreltildi (1X).

- Kuyucuklara 350 μ L yıkama çözeltisi (1X) ilave edildi. Hafifçe çalkalanarak 1-2 dk bekletildi ve kuyu içeriği boşaltıldı. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Son yıkama sonrası plaka ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde hafifçe vurarak kurutuldu.
- Her bir kuyucuğa 50'şer μ L Kromojen A ve Kromojen B çözeltileri eklendi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dk 37 °C'de ışıksız ortamda inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kuyucuklara 50 μ L durdurma çözeltisi eklendi. Kuyucuk içeriğinin maviden sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Kuyucuk içeriğinin absorbansı durdurma çözeltisinin ilavesini takiben 15 dk sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotomerik olarak ölçüldü.
- Her bir deney 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart seriye ait konsantrasyon-absorbans eğrisi elde edildi. Standart seri eğrisi hazırlanmasında CurveExpert programı kullanıldı.
- Hazırlanan eğri ile elde edilen denkleme göre örnek değerleri belirlendi. Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla örneklerin TAS düzeyi U/mL cinsinden belirlendi.

3.9.4. Total Oksidan Seviye (TOS) Tayini

TOS tayini, ELISA kit (SunRed®, Şanghay, Çin) protokülüne göre gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 3-19'da ayrıntılı olarak verilmiştir;

Tablo 3-19: TOS ELISA kit içeriği.

ELISA mikrolaka	96 kuyucuk
Konsantre standart çözeltisi (24 nmol/mL)	0,5 mL
Standart seyreltici	3 mL
Konsantre yıkama çözeltisi (30X)	20 mL
Biotin-TOS antikor	1 mL
Str-HRP konjuge reaktifi	6 mL
Kromojen çözelti A	6 mL
Kromojen çözelti B	6 mL
Durdurma çözeltisi (Sülfürik asit çözeltisi)	6 mL

Yöntem, çift antikor sandviç teknolojisi kullanılan ELISA yöntemine dayanır. TOS monoklonal antikor ile kaplı kuyucuklara TOS ölçümü yapılacak örnekler eklendi ve inkübe edildi. Sonrasında biotinle etiketlenmiş ve immun kompleks

oluşturmak için Str-HRP ile kombine edilmiş TOS antikoru eklendi. İnkübasyona bırakılan kuyucuklar bağlı olmayan enzimleri uzaklaştırmak amacıyla yıkandı. Kromojen çözelti A ve B'nin eklenmesiyle renk maviye döndü. Eklenen asitin etkisiyle renk reaksiyon sonunda sarıya döndü. Oluşan rengin spektrofotometride verdiği absorbans değeri ile TOS değerleri arasında pozitif korelasyon vardır. Kit prosedürüne göre standart serisi Tablo 3-20'de belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3-20: TOS standart seri hazırlanması.

Standart 5	12 nmol/mL	120 µL konsantre standart çözeltisi + 120 µL standart seyreltici
Standart 4	6 nmol/mL	120 µL standart 5 + 120 µL standart seyreltici
Standart 3	3 nmol/mL	120 µL standart 4 + 120 µL standart seyreltici
Standart 2	1,5 nmol/mL	120 µL standart 3 + 120 µL standart seyreltici
Standart 1	0,75 nmol/mL	120 µL standart 2 + 120 µL standart seyreltici

Kit prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- Mikroplakadaki kuyucukların hazırlanması için;
 - Blank: 50'şer µL Kromojen A ve Kromojen B çözeltisi ile 50 µL durdurma çözeltisi eklenen kuyucuklarda diğer kuyucuklardaki uygulamalara benzer şekilde deneye devam edildi.
 - Standart: 50'şer µL standart ve Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
 - Örnek: Plazma örnekleri deney için direkt olarak kullanıldı. -80 °C'de homojenize olarak bekleyen doku örnekleri ise oda sıcaklığında 5000×g'de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatantları kullanıldı. Örneğin 40 µL'si üzerine 10 µL biotin-TOS antikoru ve 50 µL Str-HRP konjuge reaktifi eklendi.
- Mikroplaka hafifce çalkalandı ve plaka folia ile kapatıldı.
- Mikroplaka 1 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve kurutuldu.
- Yıkama çözeltisi (30X) mili-Q su ile seyreltildi (1X).

- Kuyucuklara 350 µL yıkama çözeltisi (1X) ilave edildi. Hafifçe çalkalanarak 1-2 dk bekletildi ve kuyu içeriği boşaltıldı. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Son yıkama sonrası plaka ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde hafifçe vurarak kurutuldu.
- Her bir kuyucuğa 50'şer µL Kromojen A ve B çözeltileri eklendi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dk 37 °C'de ışıksız ortamda inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kuyucuklara 50 µL durdurma çözeltisi eklendi. Kuyucuk içeriğinin maviden sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Kuyucuk içeriğinin absorbansı durdurma çözeltisinin ilavesini takiben 15 dk sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.
- Her bir deney 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart seriye ait konsantrasyon-absorbans eğrisi elde edildi. Standart seri eğrisi hazırlanmasında GraphPad Prism 7 programı kullanıldı.
- Hazırlanan eğri ile elde edilen denkleme göre örnek değerleri belirlendi.

3.9.5. Protein Tayini

Protein tayini Bradford protein tayin yöntemine dayanan kit (Bio-Rad® protein tayini II kiti, California, USA) protokülüne göre gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 3-21'da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 3-21: Protein tayin kit içeriği.

Coomassie® Brilliant Blue G-250 reaktif konsantresi	450 mL
Sığır serum albümin standardı (BSA)	2,200 mL

Bio-Rad Protein Testi, proteinin çeşitli konsantrasyonlarına yanıt olarak bir Coomassie® Brilliant Blue G-250 boyasının diferansiyel renk değişiminin gerçekleştiği reaktif bağlama yöntemidir. Coomassie® Brilliant Blue G-250 boyasının asidik çözeltisi için maksimum absorbans, protein bağlanırken 465 nm'den 595 nm'ye kayar. Boya özellikle temel ve aromatik amino asit kalıntılarına (örn: arginin) bağlanır. Boya-albümin kompleks solüsyonunun tükenme katsayısının 10 kat konsantrasyon aralığında sabit olduğu esası göz önünde bulundurularak Beer yasasına göre boya hacmine uygun oran seçilmesi ve protein miktarının doğru bir şekilde belirlenmesi sağlanır.

- BSA ana stok çözeltisinden Tablo 3-22’de belirtildiği üzere standart çözeltiler taze olarak hazırlandı. Her bir konsantrasyon için deneyler 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart seriye ait konsantrasyon-absorbans eğrisi elde edildi. Hazırlanan eğri ile elde edilen denkleme göre örnek değerleri belirlendi.

Tablo 3-22: Protein tayini standart seri hazırlanması.

Standart 1	1000 µg/mL	70,92 mL BSA + 29,08 mL miliQ su
Standart 2	500 µg/mL	50 µL standart 1 + 50 µL miliQ su
Standart 3	250 µg/mL	50 µL standart 2 + 50 µL miliQ su
Standart 4	125 µg/mL	50 µL standart 3 + 50 µL miliQ su
Standart 5	62,5 µg/mL	50 µL standart 4 + 50 µL miliQ su
Standart 6	31,25 µg/mL	50 µL standart 5 + 50 µL miliQ su
Standart 7	15,63 µg/mL	50 µL standart 6 + 50 µL miliQ su
Standart 8	7,81 µg/mL	50 µL standart 7 + 50 µL miliQ su
Standart 9	3,91 µg/mL	50 µL standart 8 + 50 µL miliQ su

Plazma örnekleri 1:100, Doku örnekleri 1:20 oranında miliQ su ile seyreltildi. Örnek ve standartlardan 3 tekrar olacak şekilde kuyucuklara 10 µL konulmuş üzerine de 1:4 oranında mili-Q su ile seyreltilmiş ışığa hassas boyadan 200 µL eklendi. Beş dk’lık inkübasyondan sonra 595 nm’de spektrofotometrede absorbans ölçüldü. Hazırlanan lineer standart eğri yardımı ile örnek protein miktarı seyreltme faktörleri de göz önünde bulundurulacak şekilde hesaplandı (doku için 20X, plazma için 100X).

3.10. Testis Dokusunda Histolojik İncelemeler

3.10.1. Işık Mikroskopik Preparasyon ve Histolojik Skorlama

Deney gruplarından alınan sağ testislerin yarısı %10’luk nötral tamponlu formalin içerisinde 72 saat boyunca fikse edildi. Diğer kısım yedek olarak saklandı. Yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96 ve %100) geçirilerek dehidrate edildi. İki kere 10’ar dk süre ile ksilende tutularak şeffaflaştırıldı. 60 °C’lık etüvde parafin içerisinde gece boyunca bekletildikten sonra gömme cihazı ile kasetler içerisinde oda sıcaklığında bloklandı. Parafin bloklardan yaklaşık 4 µm kalınlığında alınan testisin orta kısım kesitlerine histopatolojik analiz yapabilmek için H&E, seminifer tübül bazal membran değişikliklerinin değerlendirilebilmesi için de PAS boyası uygulandı.

Her kesitte 30 adet seminifer tübül için 200X mikroskopik büyütme ile değerlendirme yapıldı. İlk değerlendirilen seminifer tübül tesadüfi olarak seçilmiş

olmakla beraber kesit saat yönünde kaydırılarak diğerlerinin değerlendirilmesine geçildi. Histopatolojik skorlama Tablo 3-21’de gösterilen modifiye Johnson skorlama yöntemi ile değerlendirildi (Gozen ve ark. 2013).

Tablo 3-23: Modifiye Johnson skorlaması.

Skor	Histolojik bulgular
10	Tam spermatogenez
9	Hafif bozulan spermatogenez, birçok geç spermatid, organize olmayan epitel
8	Tübül başına beşden daha az spermatozoa, az sayıda geç spermatid
7	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birçok erken spermatid
6	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid
5	Spermatozoa ve spermatid yok, birçok spermatosit
4	Spermatozoa ve spermatid yok, birkaç spermatosit
3	Sadece spermatogonyumlar
2	Germinal hücreler yok, sadece Sertoli hücreleri
1	Seminifer epitel yok

3.10.2. Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) İmmunohistokimyası

Alınan sağ testislerin yarısı immunohistokimya için %10’luk nötral tamponlu formalin içerisinde 72 saat fikse edildi. Diğer yarısı yedek olarak saklandı. Pozitif şarjlı lamlara alınan 4 µm kalınlığında parafin kesitler 1 gece boyunca 37 °C’lık etüvde bekletildikten sonra, deparafinize etmek amacıyla ksilende 3 kez 5’er dk olmak üzere bekletildi. %96’lık alkolde 2 kere 10 dk bekletildikten sonra endojen enzim blokajı yapmak için metanol ile hazırlanmış %3’lük H₂O₂ çözeltisinde 20 dk bekletildi. Önce musluk suyu sonra distile suda yıkama işleminden sonra antijen geri kazanımı için ısıtılmış 0,01 M sodyum sitrat tamponda (pH:6.0) 20 dk 300 W’luk mikrodalgaya maruz bırakıldı. Oda ısısında 20 dk soğumaya bırakılan kesitler PBS (1X) ile 2 kere 5’er dk yıkandıktan sonra bloklama solüsyonunda (Invitrogen PCNA staining kit, Kaliforniya, ABD) 10 dk bekletildi. Anti-PCNA biotinlenmiş sekonder antikorda (Invitrogen PCNA staining kit, Kaliforniya, ABD) 1 saat oda ısısında ve nemli ortamda bekletildi. Kesitler 3 kere 2’şer dk PBS ile yıkandıktan sonra 10 dk streptoavidin peroksidazda (Invitrogen, Kaliforniya, ABD) 10 dk bekletildi. Tekrar 3 kez 2’şer dk PBS ile yıkandıktan sonra, DAB kromojeninde 5 dk bekletilerek renk reaksiyonu mikroskopta gözlendi. Distile suda yıkanan kesitlere Mayer Hematoksilin ile zıt boyama yapıldı. Musluk suyu ve distile su ile yıkamanın ardından 2 kere 2’şer dk %96’lık alkolde bekletilen kesitler kurutulduktan sonra entellan ile kapatıldı. Proliferasyon

indeksi her kesitte 20 seminifer tübül incelenerek ve her bir seminifer tübülde PCNA pozitif hücre sayısı toplam hücre sayısına bölünerek belirlendi.

Formül 3-1: Proliferasyon indeksi

$X_n = \text{Aynı seminifer tübüldeki (PCNA pozitif hücre sayısı/toplam hücre sayısı)} \times 100$

$$\text{Proliferasyon indeksi} = (X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_{20}) / 20$$

3.10.3. TUNEL Yöntemi

Apoptik hücreler deoksiuridin trifosfat (dUTP) belirteçliğinde terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi ile DNA çentik uçların etiketlenmesine dayanan DNA kırıklarının tespit edilmesi yöntemi olan TUNEL (TdT dUTP Nick End Labelling, TUNEL) metodu ile değerlendirildi (Vatansever, 2016). TUNEL yönteminde ApopTag® Plus Peroxidaz In Situ Apoptoz Kiti (ApopTag Plus, In Situ Apoptosis Detection Kit, S7101, Millipore, Danvers, Massachusetts, USA) kullanıldı, ancak kit protokolünde bazı modifikasyonlar yapıldı.

Kit içeriği Tablo 3-24'de ayrıntılı olarak verilmiştir;

Tablo 3-24: ApopTag® Plus Peroxidaz In Situ Apoptoz kiti içeriği.

Dengeleme tamponu	3 mL
Reaksiyon tamponu	2 mL
TdT enzim	0,672 mL
Durdurma/Yıkama tamponu	20 mL
Anti-digoksinjenin-peroksidaz	3 mL
Plastik kapak	100 adet
Kontrol slaytı	2 adet
DAB substratı	130 µL
DAB seyreltme çözeltisi	6,5 mL

Formalinde fikse edilmiş parafine gömülü dokulardan parafini uzaklaştırmak amacıyla örnekler 3 defa 5'er dk ksilen ile muamele edildi. 2×5 dk %100'lük, 3 dk %95'lik ve 3 dk %70'lik alkolde sırayla oda sıcaklığında bekletilerek rehidrate edildi. Sırayla 2 kez deiyonize su ve PBS (1X) içinde ve her birinde 5'er dk olmak suretiyle çalkalanarak yıkandı. Apoptotik çekirdeklerdeki DNA'nın açık 3'-OH uçlarına daha iyi erişebilmek için çekirdek ve DNA etrafındaki proteinleri hafifce sindirmek amacıyla rehidratasyondan sonra kesitler 15 dk oda sıcaklığında 20 µg/mL proteinaz K ile muamele edildi. Proteinaz K ile enzimatik parçalamayı takiben endojen peroksidaz oda sıcaklığında 5 dk boyunca %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) (PBS içinde seyreltilmiş

%30'luk H_2O_2) ile inkübe edilerek maskelendi. H_2O_2 çözeltisinin PBS'de oda sıcaklığında 2×5 dk bekletilip yıkanması ile serbest 3'-OH DNA sonu digoksisinin konjugatı ile etiketlendi. Lamların etrafı dikkatlice kurularak kesitlerin üzerine 15 μ L dengeleyici tampon konulup, plastik lameller ile kapatıldı ve 30 dk oda ısısında inkübe edildi. Plastik lameller kaldırılarak dokunun etrafı kurulandı ve her lam üzerine 15 μ L TdT enzimi konuldu ve tekrar plastik lameller ile kapatıldı. Konjuge olmamış nükleotid trifosfatlar (NTP) 37 °C'de nemli odada 1 saat TdT'de bekletilerek parçalanmış DNA'ya eklendi. TdT enzim reaksiyonu 1 saat sonunda kesitlerin kit içinde tedarik edilen durdurma/yıkama tamponu ile muamelesiyle sonlandırıldı. Bunun için plastik lameller kaldırılarak kesitler durdurma/yıkama tamponu ile oda ısısında 10 dk yıkandı. Kesitler 3 kez 5'er dk PBS içinde yıkandı. 13 μ L peroksidaz konjüge anti-digoksisinin antikoru kesitlere eklendi ve kesitler nemli odada üzerlerine plastik lameller kapatılarak oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Bağlanmamış fazla antikorlar 3 kez 5'er dk PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Kesitlerin çevresi kurulandıktan sonra etiketli apoptotik hücreler, kit protokolünde belirtildiği gibi 15 μ L peroksidaz kromojenik substrat 3,3'-diaminobenzidin (DAB) ile muamele edilerek belirlendi. Boyanma için oda ısısında 5 dk bekletildi. Renk değişimi, beyaz bir kâğıt üzerine lamların yerleştirilmesi ile izlendi. Renk reaksiyonu, kesitler kahverengimsi bir renk aldığı anda deiyonize su ile muamele edilerek sonlandırıldı. Çekirdeklerin zıt boyaması, kesitlerin oda sıcaklığında 1 dk Mayer Hematoksilin ile inkübe ederek gerçekleştirildi. Daha sonra %96'lık alkolde 2×2 dk bekletildikten sonra kurumaya bırakıldı. Kesitler dehidrate edilip entellan kullanılarak lamelle kapatıldı. Boyalı kesitlerde 20 seminifer tübül incelendi. Üç veya daha fazla TUNEL⁺ hücre içeren seminifer tübüller sayıldı. Apoptotik indeks, 3 veya daha fazla TUNEL⁺ hücre içeren seminifer tübül sayısının toplam seminifer tübül sayısına oranlanmasıyla bulundu.

3.11. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirmesi

İstatistiksel analizler Statistical Package for Social Sciences (SPSS, v.20) programı ile yapıldı. Grup içi ve gruplar arası kıyaslamalar için Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) analizi ve Post-Hoc Tukey ve Dunnett t testi yapıldı. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel anlamlılık kendi içinde anlamlı ($*p < 0,05$), yüksek anlamlı ($**p < 0,005$) ve çok yüksek anlamlı ($***p < 0,0005$) olarak sınıflandırılmıştır.

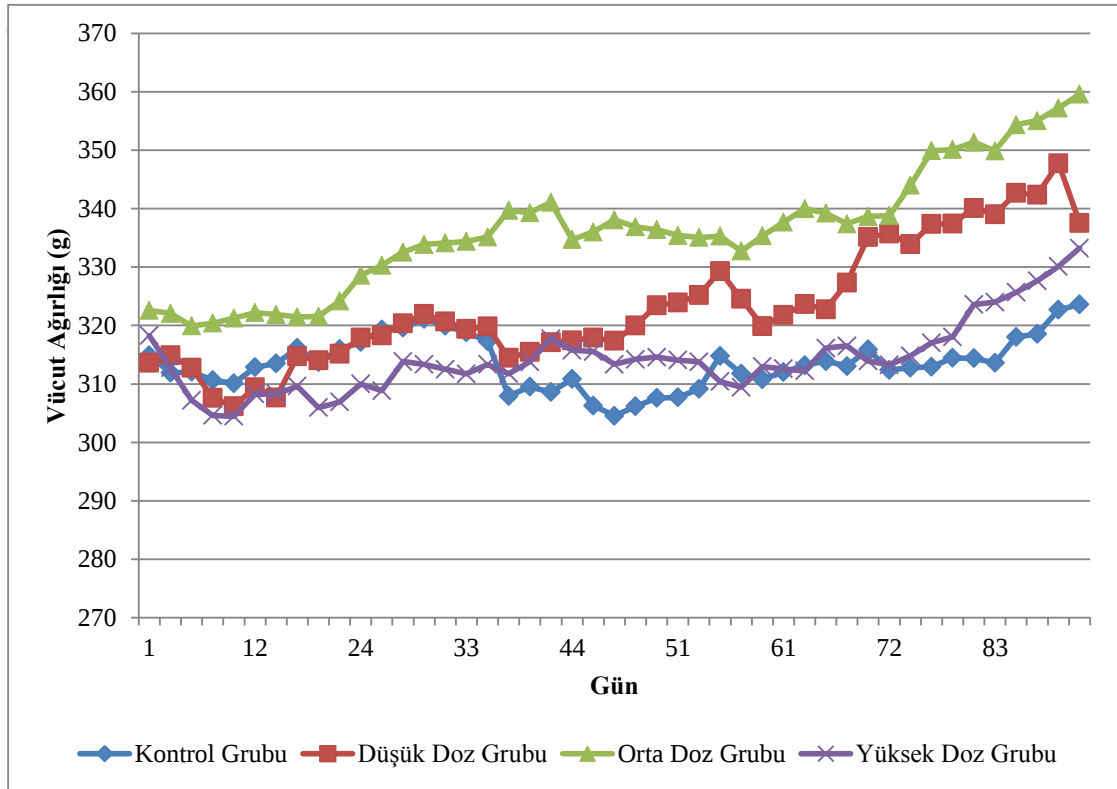
4. BULGULAR

4.1. Genel Etkiler

Toplam 48 deney hayvanı ile başlayan çalışmada toplamda 3 hayvan ölmüş olup 45 deney hayvanı ile çalışma tamamlanmıştır. Sağ kalım %93,75'dir.

4.1.1. Vücut Ağırlığı

Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları haftada 3'er defa (pazartesi, çarşamba, cuma) olmak üzere toplam 45 kere düzenli ölçüldü ve tartımlar kaydedildi (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarındaki değişim.

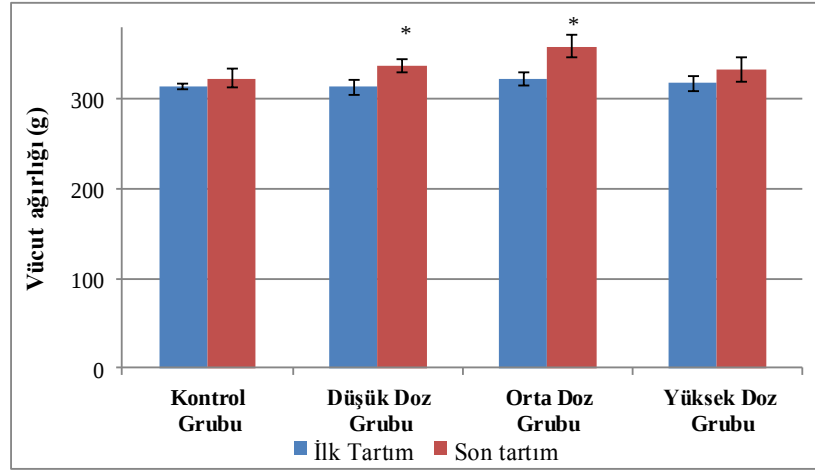
Vücut ağırlıklarındaki değişimin değerlendirilmesinde her bir tartım günündeki deney grubuna ait ortalama vücut ağırlıkları tespit edildi. İlk ve son tartımlar arasındaki farklar değerlendirildi. Kontrol, düşük doz, orta doz ve yüksek doz grupları için ortalama vücut ağırlıklarındaki artış yüzdesinin sırasıyla %2,76; 7,64; 11,47 ve 4,70 olduğu tespit edildi (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Deney hayvanlarının çalışma süresince tespit edilen vücut ağırlıklarındaki değişim.

VÜCUT AĞIRLIKLARI (g)				
TARTIM	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
1	314,90	313,59	322,58	318,29
5	310,10	306,18	321,25	304,46
10	315,95	315,18	324,17	306,92
15	319,95	320,68	334,13	312,53
20	308,60	317,14	341,08	317,71
25	307,60	323,45	336,42	314,58
30	310,80	319,91	335,33	312,96
35	315,90	335,14	338,67	313,92
40	314,40	340,09	351,38	323,58
45	323,60	337,55	359,58	333,25
İlk ve son tartım arasındaki fark	8,70	23,95*	37,00*	14,96
İlk ve son tartım arasındaki yüzde artış	2,76	7,64	11,47	4,70

* Düşük ve orta doz gruplarında gözlenen grup içindeki artış istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,05$).

Kontrol grubu da dahil tüm deney gruplarında grup içi vücut ağırlıklarındaki değişim değerlendirildiğinde düşük ve orta doz gruplarında gözlenen artışın istatistiksel anlamlılık düzeyinde olduğu (sırasıyla, $p:0,04$ ve $0,02$); ancak kontrol grubu ile maruziyet grupları kıyaslandığında maruziyet gruplarında gözlenen artışın anlamlılık düzeyinde olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$) (Şekil 4-2).



	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
İlk tartım (g) ^a	314,90 ±3,40	313,59 ±7,69	322,58 ±7,83	318,29 ±8,49
Son tartım (g) ^a	323,60 ±10,59	337,55 ±7,60	359,58 ±12,59	333,25 ±13,14

^a Ortalama ±standart hata

*Düşük ve orta doz grup içi istatistiksel değerlendirilmede gözlenen değişim anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,05$).

Şekil 4-2: Deney hayvanlarının ilk ve son tartımlarındaki vücut ağırlıkları.

4.1.2. Testis Ağırlığı ve Makroskopik İnceleme

Sakrifikasyon sonrası çıkarılan ve çevre dokulardan temizlenen sağ ve sol testislerin ağırlıkları tespit edildi ve makroskopik incelemeleri gerçekleştirildi. Makroskopik incelemede, testislerin renk ve görünüşlerinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi.

Kontrol grubu da dahil tüm deney gruplarında grup içi kıyaslamada sağ ve sol testis ağırlıklarında istatistiksel düzeyde anlamlı bir farklılık tespit edilmediğinden ($p \geq 0,295$) gruplar arası ve grup içi değerlendirmelerde sağ ve sol testis ayırımı yapılmadı. Kontrol grubu ile maruziyet grupları kıyaslandığında testis ağırlıklarında anlamlı bir değişiklik olmadığı saptandı ($p > 0,05$) (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Deney gruplarının testis ağırlıklarındaki değişim.

TESTİS AĞIRLIKLARI (g)								
	Kontrol Grubu (s:10)		Düşük Doz Grubu (s:11)		Orta Doz Grubu (s:12)		Yüksek Doz Grubu (s:12)	
	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis
	1,225	1,216	1,565	1,436	1,696	1,672	1,538	1,592
	1,505	1,436	1,536	1,486	1,534	1,576	1,076	1,112
	1,466	1,445	1,906	1,906	1,551	1,558	2,052	1,986
	1,572	1,606	1,866	1,786	1,675	1,656	1,656	1,552
	1,505	1,566	1,756	1,716	1,636	1,476	1,506	1,522
	1,482	1,565	1,572	1,602	1,548	1,506	1,522	1,616
	1,332	1,376	1,425	1,382	1,502	1,472	1,432	1,572
	1,496	1,488	1,452	1,512	1,438	1,522	1,645	1,615
	1,512	1,602	1,598	1,555	1,502	1,562	1,615	1,712
	1,465	2,242	1,585	1,556	1,468	1,508	1,856	1,776
			1,548	1,462	1,316	1,478	1,325	1,345
					1,665	1,706	1,455	1,266
Grup içi değerlendirme	<i>p</i> : 0,295		<i>p</i> : 0,587		<i>p</i> : 0,739		<i>p</i> : 0,992	
Ortalama testis ağırlıkları*	1,505 ±0,046		1,600 ±0,033		1,551 ±0,020		1,556 ±0,048	

* Ortalama ±standart hata

Testis ağırlıklarının vücut ağırlıklarına göre değişimleri somatik indeks kullanılarak değerlendirildi (Formül 4-1).

Formül4-1: Somatik indeks (Nelli ve ark., 2013; Öztaş, 2016)

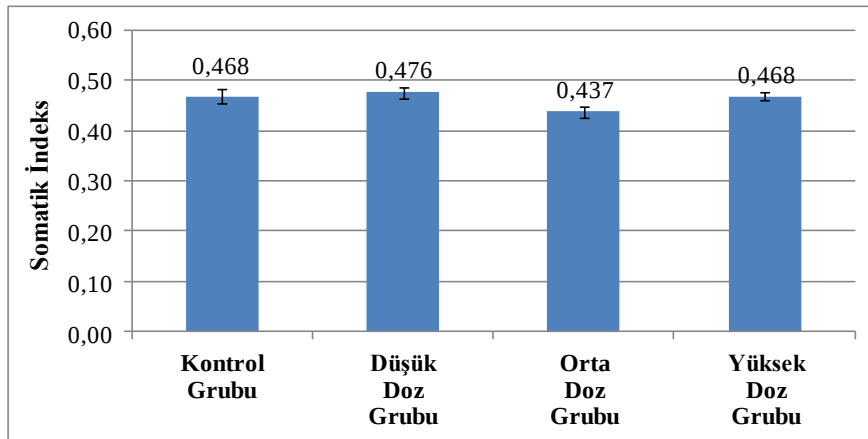
$$\text{Somatik indeks} = \text{Testis ağırlığı (g)} / \text{Vücut ağırlığı (g)} \times 100$$

Somatik indeks ile kıyaslamada da sağ ve sol testis ağırlıklarının ortalamaları kullanıldı. Kontrol grubu ile maruziyet grupları kıyaslandığında anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlendi ($p \geq 0,320$) (Tablo 4-3; Şekil 4-3).

Tablo 4-3: Testis ağırlıkları için hesaplanan somatik indeks.

SOMATİK İNDEKS								
	Kontrol Grubu (s:10)		Düşük Doz Grubu (s:11)		Orta Doz Grubu (s:12)		Yüksek Doz Grubu (s:12)	
	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis
	0,490	0,486	0,469	0,430	0,416	0,410	0,499	0,517
	0,425	0,406	0,521	0,504	0,485	0,499	0,427	0,441
	0,476	0,469	0,585	0,585	0,454	0,456	0,552	0,534
	0,434	0,444	0,544	0,521	0,441	0,436	0,443	0,415
	0,462	0,480	0,450	0,440	0,524	0,473	0,474	0,479
	0,407	0,430	0,448	0,456	0,508	0,494	0,473	0,502
	0,407	0,421	0,434	0,421	0,375	0,368	0,474	0,520
	0,478	0,475	0,401	0,418	0,467	0,494	0,440	0,432
	0,465	0,493	0,463	0,451	0,357	0,371	0,385	0,408
	0,477	0,730	0,503	0,494	0,434	0,446	0,533	0,510
			0,478	0,451	0,336	0,377	0,439	0,445
					0,424	0,434	0,474	0,412
Grup içi değerlendirme	p: 0,320		p: 0,614		p: 0,889		p: 0,993	
Ortalama somatik indeks*	0,468 ±0,015		0,476 ±0,011		0,437 ±0,011		0,468 ±0,009	

*Ortalama±standart hata



Şekil 4-3: Testis ağırlıklarının deney gruplarındaki somatik indeksi.

4.1.3. Sperm Sayımı

Kaudal epididimden alınan spermlerle hazırlanan preparatların Thoma lamı ile sayıları tespit edildi. Deney hayvanlarının sperm sayıları Tablo 4-4’de gösterilmiştir. Gruplar arası kıyaslamada istatistiksel anlamlılık tespit edilmiştir ($p:0,000$). Orta ve yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre sperm sayısındaki düşüşün istatistiksel düzeyde anlamlı olduğu gözlemlendi (sırasıyla, $p:0,004$ ve $p:0,000$) (Şekil 4-4).

Tablo 4-4: Deney gruplarının sperm sayıları.

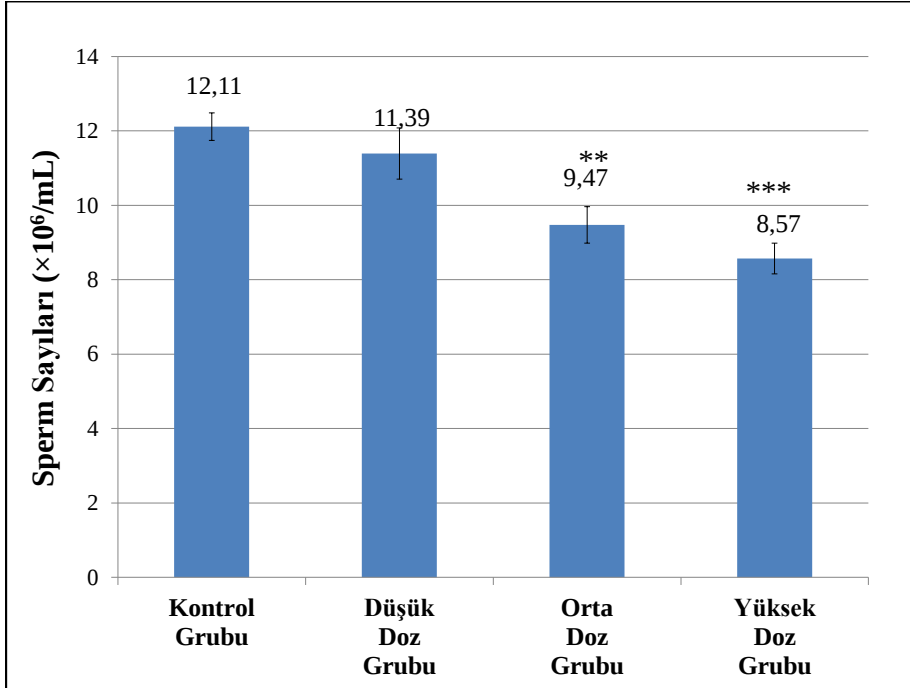
SPERM SAYISI ($\times 10^6/\text{mL}$) ^a				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	10,67	10,75	7,50	7,67
	14,27	12,65	8,76	6,25
	11,25	10,45	12,30	6,38
	12,20	8,76	6,70	7,50
	10,45	6,98	11,23	8,35
	12,56	13,40	10,20	8,75
	13,45	12,35	9,75	9,25
	11,95	14,67	9,45	9,10
	12,45	9,65	7,25	10,65
	11,80	13,45	11,20	10,50
		12,12	9,50	9,40
			9,76	9,08
Ortalama sperm sayıları^b	12,11 $\pm$ 0,37	11,39 $\pm$ 0,69	9,47 $\pm$ 0,49**	8,57 $\pm$ 0,41***

^a Değerler, epididimin 1 mL %10 FBS’li DMEM-F12 içerisindeki homojenatına aittir.

^b Ortalama $\pm$ standart hata

**Orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,005$).

***Yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).



**Orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,005$).

***Yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,0005$).

Şekil 4-4: Deney gruplarındaki ortalama sperm sayıları.

4.1.4. Sperm Morfolojisi

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde her deney hayvanı için 200 sperm içeren 3 preparat üzerinden değerlendirme yapıldı. Gözlenen normal ve anomalili sperm tipleri Şekil 3-2’de gösterilmiştir.

Her bir hayvan için normal sperm sayıları ile anomalili sperm sayı ve tipleri kaydedildi. Grup içi sperm tiplerinin sayıları için ortalama değerler hesaplandı. Gruplar arası kıyaslamada kullanılmak üzere her gruba ait toplam anomalili sperm sayısı ve yüzdesi belirlendi (Tablo 4-5).

Tüm maruziyet gruplarında iğne uçlu başlı spermilerin en az, kuyruksuz başlı spermilerin ise en fazla olduğu gözlemlendi. Normal sperm sayıları ile her bir anomalinin kendi içindeki sperm sayıları gruplar arası kıyaslandığında istatistiksel anlamlılık tespit edilmemiş olup ($p \geq 0,05$) sadece düzleşmiş baş anomalili sperm seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek doz maruziyet grubunda daha yüksek olduğu (2,4 kat) olduğu gözlemlendi ($p:0,046$) (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Sperm morfoloji sonuçları.

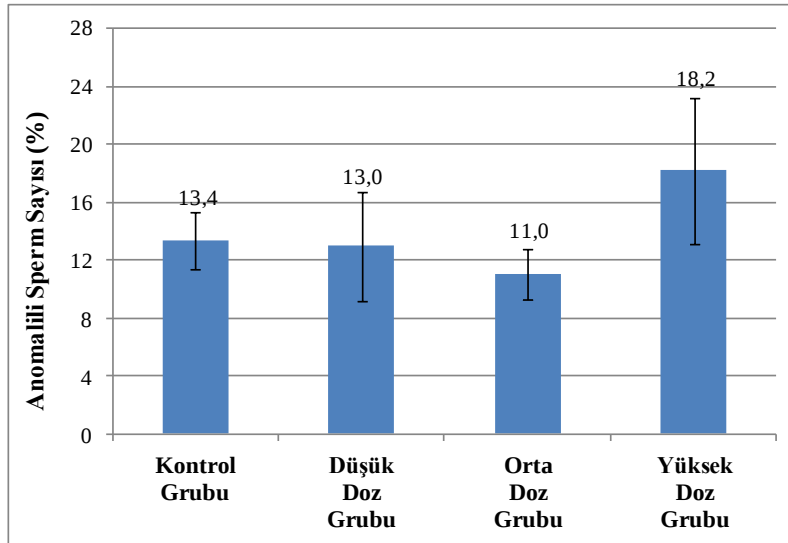
SPERM MORFOLOJİSİ ^a				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
Normal	Normal sperm sayısı (Ortalama ± standart Hata)			
Normal	173,2 ±3,8	174,0 ±7,5	178,0 ±3,5	163,6 ±10,0
Anomali	Anomalili sperm sayısı (Ortalama ±standart Hata)			
Başsız kuyruk	7,3 ±0,7	5,3 ±1,7	5,0 ±1,3	10,6 ±2,7
Kuyruksuz baş	13,1 ±0,7	13,6 ±1,7	10,3 ±1,3	15,8 ±2,7
Düzleşmiş baş	1,5 ±0,3	1,5 ±0,3	1,2 ±0,2	3,6 ±1,2*
İğne uçlu baş	0,1 ±0,1	0,3 ±0,2	0,3 ±0,1	0,3 ±0,2
Kırık boyun	2,6 ±0,3	2,7 ±0,8	2,7 ±0,6	3,7 ±0,7
Kırık kuyruk	1,1 ±0,2	1,2 ±0,6	1,4 ±0,5	1,1 ±0,3
Kıvrık kuyruk	0,7 ±0,2	1,2 ±0,4	0,9 ±0,6	0,9 ±0,3
Çoklu anomali	0,3 ±0,1	0,3 ±0,1	0,3 ±0,1	0,4 ±0,2
Toplam anomalili sperm sayısı	26,8 ±3,9	26,0 ±7,5	22,0 ±3,5	36,4 ±10,0
Anomalili sperm yüzdesi (%)	13,4 ±2,0	13,0 ±3,8	11,0 ±1,7	18,2 ±5,0
Normal sperm yüzdesi (%)	86,6 ±2,0	87,0 ±3,8	89,0 ±1,7	81,8 ±5,0

^a Her deney hayvanı için 200 sperm'lik 3 preparat üzerinden değerlendirme yapıldı.

* Düzleşmiş başlı sperm anomali yüksek doz grubunda kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,05$).

Ortalama ± standart hata

Kontrol grubu ile tüm maruziyet grupları toplam anomalili sperm sayıları açısından kıyaslandığında anomalili sperm sayılarında değişim gözlenirse de değişimin istatistiksel düzeyde anlamlılık ifade etmediği tespit edildi ($p\geq0,05$) (Şekil 4-5).



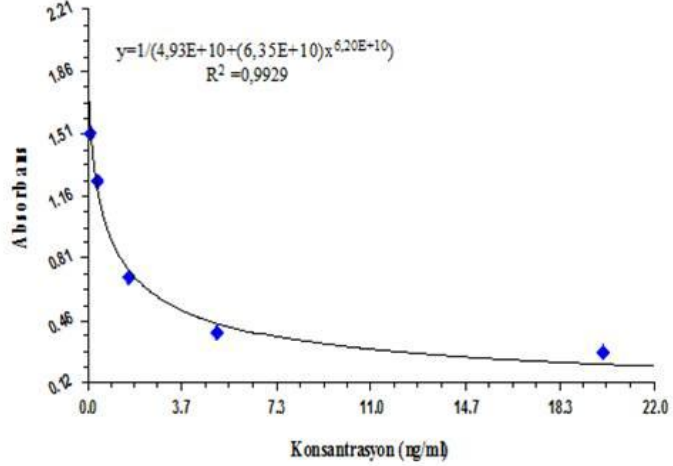
Şekil 4-5: Anomalili sperm düzeyleri (%).

4.2. Hormon Seviyeleri Üzerine Etkiler

4.2.1. Plazma Testosteron Seviyeleri

Plazma örneklerindeki testosteron seviyeleri için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hesaplandı (Şekil 4-6).

Standart seri (ng/mL)	Absorbans
0,00	2,0334
0,10	1,512
0,40	1,248
1,60	0,711
5,00	0,394
20,00	0,290



Şekil 4-6: Testosteron tayini için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.

Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla 60. gündeki (Tablo 4-6) ve 90. gündeki (Tablo 4-7) testosteron seviyeleri ng/mL cinsinden hesaplandı. Kontrol grubuna göre maruziyet gruplarının kıyaslanmasında ve grup içi değerlendirmelerde testosteron seviyelerindeki değişimin 60. ve 90. gün değerleri için istatistiksel anlamlılık taşımadığı gözlemlendi ($p \geq 0,05$).

Tablo 4-6: 60. Gündeki testosteron seviyeleri.

TESTOSTERON SEVİYELERİ (ng/mL)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	2,591	1,691	2,408	0,600
	1,870	2,585	1,825	0,944
	2,498	0,457	2,518	2,645
	2,358	3,571	1,329	2,032
	1,499	1,139	1,294	2,685
	1,890	5,021	1,680	1,361
	2,290	0,931	1,884	2,229
	2,495	3,020	2,330	2,354
	2,345	2,598	2,358	2,650
	2,954	2,154	2,860	2,655
		1,025	2,868	1,566
			2,645	2,555
Ortalama T seviyeleri ^a	2,279 ±0,133	2,199 ±0,407	2,167 ±0,159	2,023 ±0,211

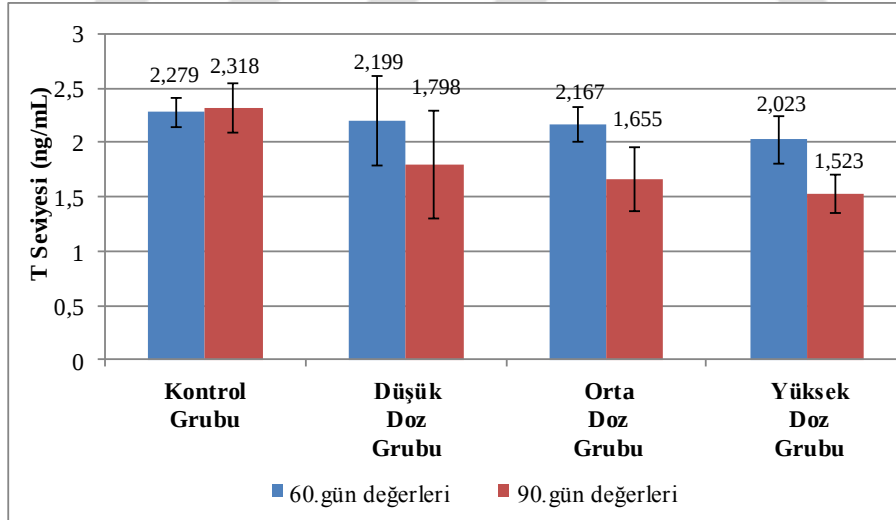
^a Ortalama ±standart hata

Tablo 4-7: 90. Gündeki testosteron seviyeleri.

TESTOSTERON SEVİYELERİ (ng/mL)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	2,736	0,233	0,902	1,498
	2,300	1,407	1,040	1,157
	1,769	1,050	0,480	1,719
	3,442	6,061	4,103	1,228
	1,347	1,505	0,844	1,001
	2,285	3,239	1,966	1,495
	2,051	0,309	1,972	2,312
	2,213	1,102	1,113	2,788
	1,542	1,278	0,726	1,975
	3,493	1,946	1,987	0,595
		1,649	2,249	1,153
			2,478	1,355
Ortalama T seviyeleri^a	2,318 ±0,230	1,798 ±0,491	1,655 ±0,295	1,523 ±0,174

^a Ortalama ±standart hata

Her bir grup için 60. ve 90. günlerde alınan ölçümlere ait özet durum Şekil 4-7'de belirtilmiş olup kontrol grubuna kıyasla maruziyet gruplarında gözlenen düşme eğiliminin ($\leq\%34,3$) istatistiksel anlamlılık düzeyinde olmadığı tespit edildi ($p\geq0,05$).

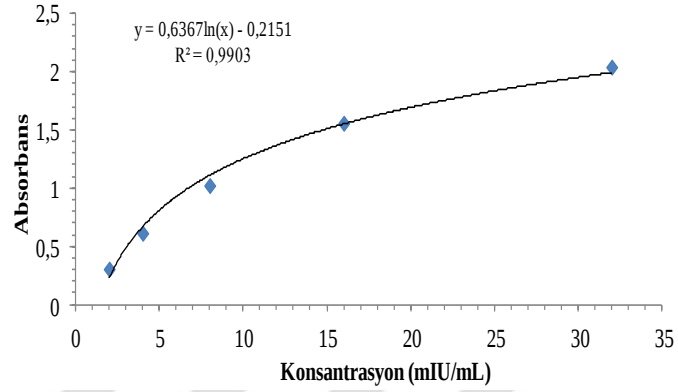


Şekil 4-7: Plazma testosteron seviyelerinin karşılaştırılması.

4.2.2. Plazma LH Seviyeleri

Plazma örneklerindeki LH seviyeleri için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hesaplandı (Şekil 4-8).

Standart Seri (mIU/mL)	Absorbans
32	2,0410
16	1,5590
8	1,0240
4	0,6145
2	0,3065



Şekil 4-8: LH'a ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.

Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla 60. gündeki (Tablo 4-8) ve 90. gündeki (Tablo 4-9) LH seviyeleri mIU/mL cinsinden hesaplandı. Sakrifikasyon öncesi alınan örneklerdeki LH düzeylerinin 60. gündeki değerlere göre paralellik göstermekle birlikte daha düşük seviyede olduğu gözlemlendi.

Tablo 4-8: 60. Gündeki LH seviyeleri.

LH SEVİYELERİ (mIU/mL)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	12,159	11,284	15,535	12,911
	14,255	16,390	18,632	10,818
	11,694	16,658	19,122	11,048
	12,701	14,968	13,229	16,631
	12,501	14,598	16,794	16,903
	12,902	15,152	16,383	10,489
	12,306	14,363	17,084	16,658
	13,104	15,267	16,196	13,588
	12,103	14,272	17,198	13,288
	13,301	15,598	16,012	14,119
		13,995	17,492	12,600
			15,884	14,592
Ortalama LH seviyeleri^a	12,703 ±0,232	14,777 ±0,432*	16,630 ±0,439***	13,637±0,652

^a Ortalama ±standart hata

*Düşük doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,05$).

***Orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,0005$).

Altmışıncı ve 90. günler için kontrol grubuna göre maruziyet gruplarında LH değerlerinde artış olduğu, düşük ve orta doz grubu için tespit edilen bu artışın istatistiksel anlamlılık düzeyinde olduğu gözlemlendi ($p \leq 0,030$) (Tablo 4-8; Tablo 4-9).

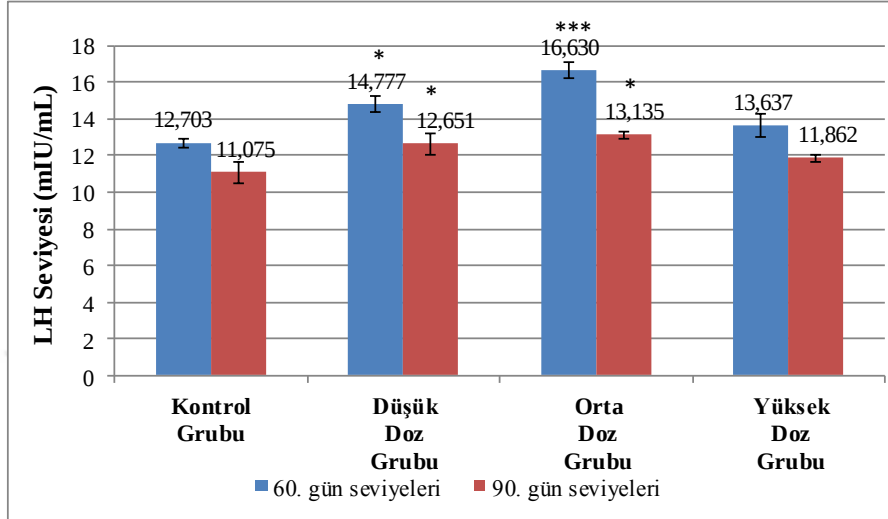
Tablo 4-9: 90. Gündeki LH seviyeleri.

LH SEVİYELERİ (mIU/mL)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	7,271	15,721	13,521	12,075
	11,999	8,296	14,084	12,878
	11,093	13,908	13,268	12,113
	12,132	14,694	12,898	12,018
	12,878	13,289	11,905	10,852
	11,298	11,924	13,322	11,058
	10,003	12,382	13,356	12,037
	12,005	11,286	12,802	11,756
	9,039	12,363	13,546	11,335
	13,030	13,136	12,565	12,326
		12,166	13,739	10,998
			12,614	12,896
Ortalama LH seviyeleri^a	11,075 ±0,575	12,651 ±0,584*	13,135 ±0,173*	11,862 ±0,198

^a Ortalama ±standart hata

*Düşük ve orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p \leq 0,05$).

Her bir grup için 60. ve 90. günlerde alınan ölçümlere ait özet durum Şekil 4-9'da belirtilmiş olup kontrol grubuna kıyasla gerek 60. gün gerekse de 90. gün için düşük ve orta doz gruplarında LH seviyesinin en az 1,14 oranında arttığı gözlemlendi.



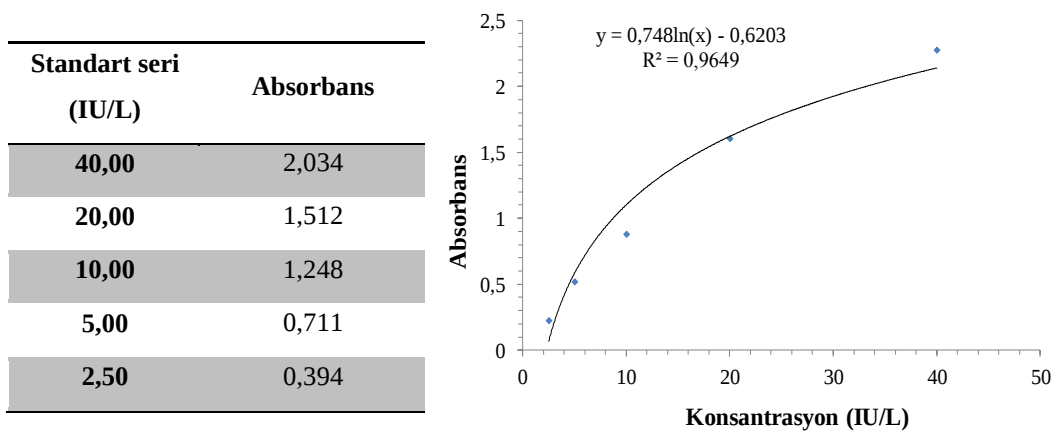
*60. Gün düşük doz grubu ile 90. gün düşük ve orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,05$).

***60. Gün orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,0005$).

Şekil 4-9: Plazma LH seviyelerinin karşılaştırılması.

4.2.3. Plazma FSH Seviyeleri

Plazma örneklerindeki FSH seviyeleri için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hesaplandı (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: FSH'a ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.

Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla 60. gündeki (Tablo 4-10) ve 90. gündeki (Tablo 4-11) FSH seviyeleri IU/L cinsinden hesaplandı. Altmışıncı ve 90. günde alınan örneklerdeki FSH seviyeleri paralellik gösterdi. Altmışıncı ve 90. günler için kontrol grubuna göre her üç maruziyet grubunda da FSH değerlerinde artış olduğu, artışların istatistiksel anlamlılık düzeyinde olduğu, ancak düşük ve orta doz gruplarına kıyasla yüksek doz grubunda artış oranının düşük olduğu gözlemlendi ($p<0,000$).

Tablo 4-10: 60. Gündeki FSH seviyeleri.

FSH SEVİYELERİ (IU/L)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	5,632	6,592	14,964	13,050
	7,427	9,207	12,053	13,841
	6,294	7,856	13,288	13,568
	6,690	8,126	13,634	13,335
	6,190	7,694	13,144	13,601
	6,880	8,303	13,812	13,288
	5,999	7,485	12,729	13,701
	7,098	8,582	14,354	13,131
	5,798	7,258	12,754	13,854
	7,295	8,707	14,239	13,033
		7,091	12,527	13,978
			14,599	12,960
Ortalama FSH seviyeleri^a	6,530 ±0,202	7,900 ±0,234***	13,508 ±0,263***	13,445 ±0,103***

^a Ortalama ±standart hata

*** Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).

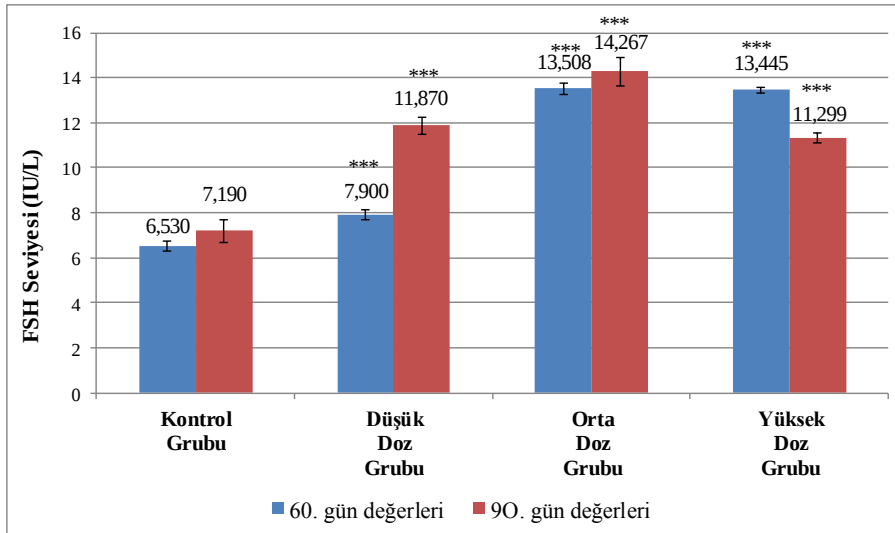
Tablo 4-11: 90. Gündeki FSH seviyeleri.

FSH SEVİYELERİ (IU/L)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	7,592	13,152	16,553	11,460
	7,777	9,880	10,563	12,585
	3,649	12,995	15,114	10,966
	5,486	10,662	18,996	9,619
	10,353	13,312	14,423	11,866
	6,933	10,367	13,276	11,25645
	8,540	12,720	12,857	11,133
	7,378	12,337	12,351	11,4967
	7,494	11,243	14,489	10,983
	6,698	12,988	14,055	11,863
		10,911	14,700	10,468
			13,823	11,892
Ortalama FSH seviyeleri^a	7,190 ±0,560	11,870 ±0,383***	14,267 ±0,610***	11,299 ±0,221***

^a Ortalama ±standart hata

*** Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).

Her bir grup için 60. ve 90. günlerde alınan ölçümlere ait özet durum Şekil 4-11'de belirtilmiş olup kontrol grubuna kıyasla FSH seviyelerindeki artış düşük, orta ve yüksek doz grupları için 60. günde sırasıyla 1,21, 2,07 ve 2,06 kat olarak, 90. günde ise sırasıyla 1,65, 1,98 ve 1,57 kat olarak tespit edildi.



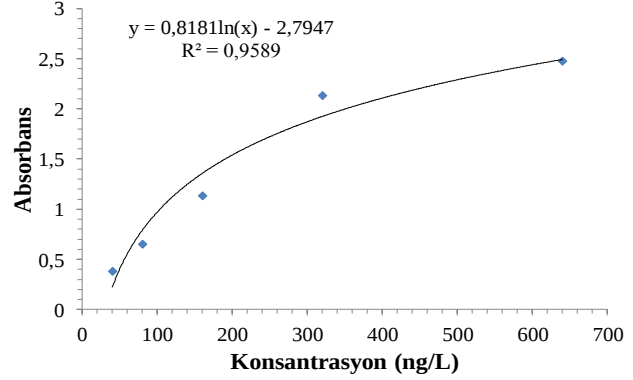
***60. ve 90. Gün maruziyet gruplarının kontrol gruplarına göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).

Şekil 4-11: Plazma FSH seviyelerinin karşılaştırılması.

4.2.4. Plazma GnRH Seviyeleri

Plazma örneklerindeki GnRH seviyeleri için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hesaplandı (Şekil 4-12).

Standart seri (ng/L)	Absorbans
640	2,478
320	2,135
160	1,136
80	0,654
40	0,384



Şekil 4-12: GnRH'a ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.

Standart konsantrasyon-absorbans eğrisi yardımıyla 60. gündeki (Tablo 4-12) ve 90. gündeki (Tablo 4-13) GnRH seviyeleri ng/L cinsinden hesaplandı. Sakrifikasyon öncesi alınan örneklerdeki GnRH düzeylerinin 60. gündeki değerlere göre daha düşük seviyede olduğu gözlemlendi (Şekil 4-13). Altmışıncı günde gruplar arası ve kontrol grubuna kıyasla orta ve yüksek doz gruplarının GnRH seviyelerinde istatistiksel düzeyde anlamlı değişim tespit edilirken ($p:0,000$); orta doz grubunda %13,8 oranında artış, yüksek doz grubunda ise %15,4 oranında azalma gözlemlendi (Tablo 4-12). Doksanıncı günde kontrol grubuna kıyasla maruziyet gruplarındaki değişimin benzer şekilde düşük ve orta doz gruplarında artış, yüksek doz grubunda ise azalma şeklinde iken değişim düzeyleri istatistiksel anlamlılık göstermedi ($p \geq 0,05$) (Tablo 4-13).

Tablo 4-12: 60. Gündeki GnRH seviyeleri.

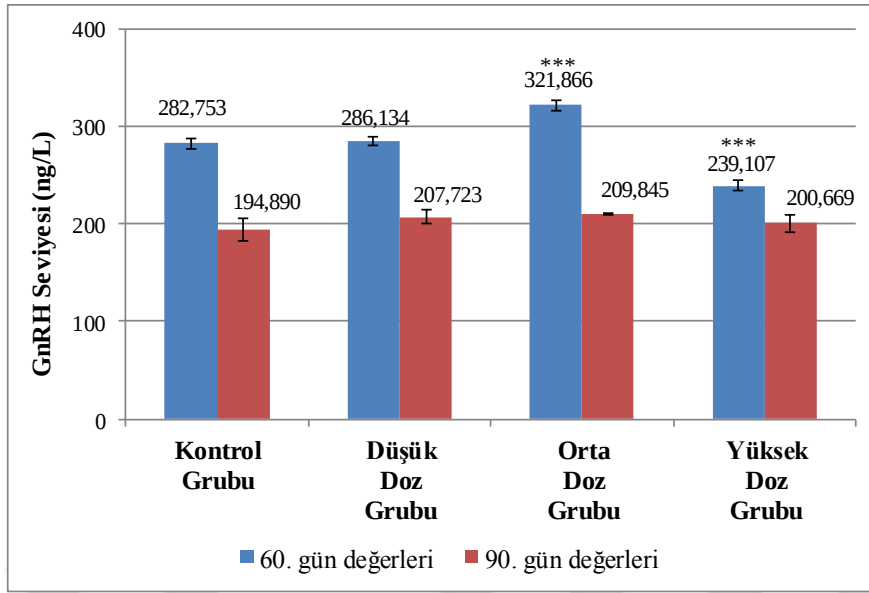
GnRH SEVİYELERİ (ng/L)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	262,397	264,651	333,839	254,811
	303,109	296,876	331,400	243,246
	277,894	296,876	333,839	192,598
	288,676	281,101	328,576	237,952
	271,890	292,545	281,675	266,926
	293,642	276,979	322,466	240,345
	266,099	297,234	317,122	233,230
	297,880	271,323	327,131	244,896
	261,078	301,667	311,323	229,236
	304,868	265,223	333,020	251,580
		303,001	306,223	223,565
			335,779	250,896
Ortalama GnRH seviyeleri^a	282,753 ±5,364	286,134 ±4,419	321,866 ±4,575***	239,107±5,439***

^a Ortalama değer ±standart hata***Orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).

Tablo 4-13: 90. Gündeki GnRH seviyeleri.

GnRH SEVİYELERİ (ng/L)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	162,702	234,774	214,732	224,118
	142,755	175,941	204,486	252,331
	260,479	199,547	210,316	243,841
	215,785	188,868	209,988	155,888
	229,384	248,353	208,645	166,321
	212,383	209,546	210,989	161,513
	179,855	228,266	207,787	206,358
	145,931	229,104	211,876	195,002
	204,736	174,656	206,454	211,143
	194,890	188,176	212,995	193,568
		207,723	205,887	214,366
			213,980	183,579
Ortalama GnRH seviyeleri^a	194,890 ±11,883	207,723 ±7,491	209,845 ±0,946	200,669 ±8,921

^a Ortalama değer ±standart hata



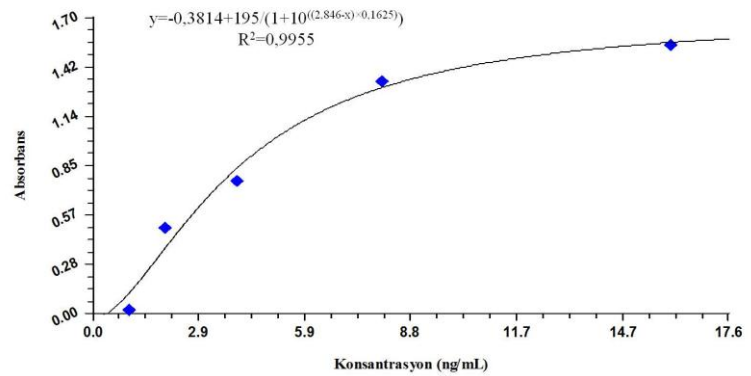
***60. Gün orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p \leq 0,0005$).

Şekil 4-13: Plazma GnRH seviyelerinin karşılaştırılması.

4.2.5. Plazma İnhibin B (INHB) Seviyeleri

Plazma örneklerindeki INHB seviyeleri için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hesaplandı (Şekil 4-14).

Standart seri (ng/mL)	Absorbans
16	1,548
8	1,339
4	0,765
2	0,496
1	0,241



Şekil 4-14: INHB'ye ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.

Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla 60. gündeki (Tablo 4-14) ve 90. gündeki (Tablo 4-15) INHB seviyeleri ng/mL cinsinden hesaplandı. Kontrol grubuna kıyasla maruziyet gruplarının 60. ve 90. günlerdeki düzeyler açısından paralel şekilde değişim gösterdiği tespit edildi. Kontrol gruplarına kıyasla 60. gün için orta ve

yüksek doz gruplarında ($p \leq 0,036$), 90. gün için ise sadece yüksek doz grubunda INHB seviyelerinde istatistiksel düzeyde anlamlı değişim tespit edildi ($p:0,005$).

Tablo 4-14: 60. Gündeki INHB seviyeleri.

İNHİBİN B SEVİYELERİ (ng/mL)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	7,686	6,12	8,570	3,043
	7,509	7,202	7,607	3,373
	7,237	7,562	8,123	3,120
	7,329	8,312	7,990	3,241
	7,546	6,459	8,934	3,223
	7,223	7,688	7,424	3,120
	7,756	6,465	8,646	3,343
	7,301	8,877	7,479	2,899
	7,671	8,312	8,957	3,645
	7,146	8,845	7,646	2,989
		8,201	8,246	3,457
			7,446	2,879
Ortalama INHB seviyeleri^a	7,440 ±0,070	7,640 ±0,294	8,089 ±0,167*	3,194 ±0,067***

^aOrtalama değer ±standart hata

*Orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,05$).

***Yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,0005$).

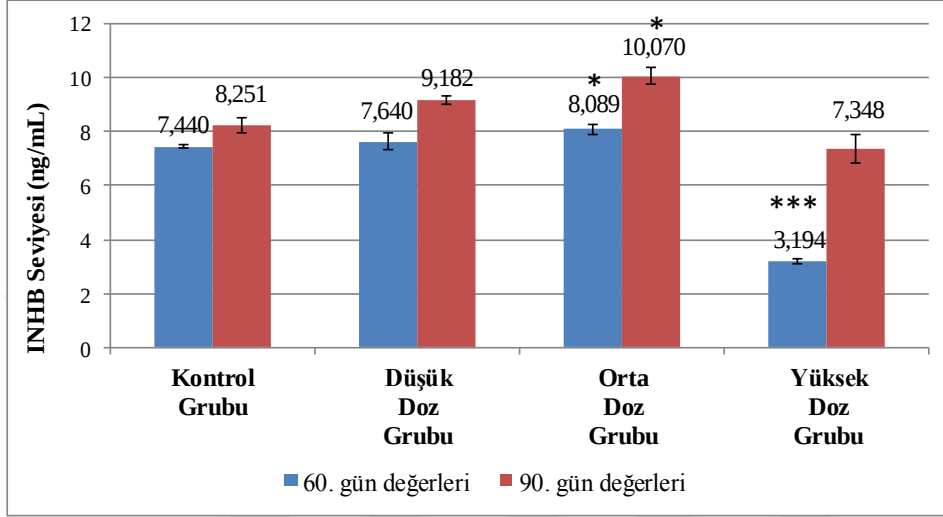
Tablo 4-15: 90. Gündeki INHB seviyeleri.

İNHİBİN B SEVİYELERİ (ng/mL)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	9,41	8,939	9,815	9,128
	7,888	9,010	10,111	9,922
	9,472	8,678	11,023	9,495
	9,235	9,543	11,675	7,636
	7,677	8,974	9,555	4,012
	8,757	9,969	8,927	6,878
	7,313	9,946	11,130	4,368
	7,101	9,555	8,323	7,222
	7,675	9,010	9,435	6,779
	7,985	8,193	10,512	7,979
		9,182	9,230	6,423
			11,101	8,343
Ortalama INHB seviyeleri^a	8,251 ±0,281	9,182 ±0,161	10,070 ±0,297*	7,348 ±0,532

^aOrtalama değer ±standart hata

*Orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,05$).

Altmışıncı günde kontrol grubuna kıyasla orta doz grubunda %8,72 oranında artış, yüksek doz grubunda ise %57,07 oranında azalma istatistiksel anlamlılık düzeyinde gözlemlendi. Sakrifikasyon günü alınan örneklerde ise orta doz grubunda %22,05 düzeyinde artış istatistiksel anlamlılık düzeyinde tespit edildi (Şekil 4-15).



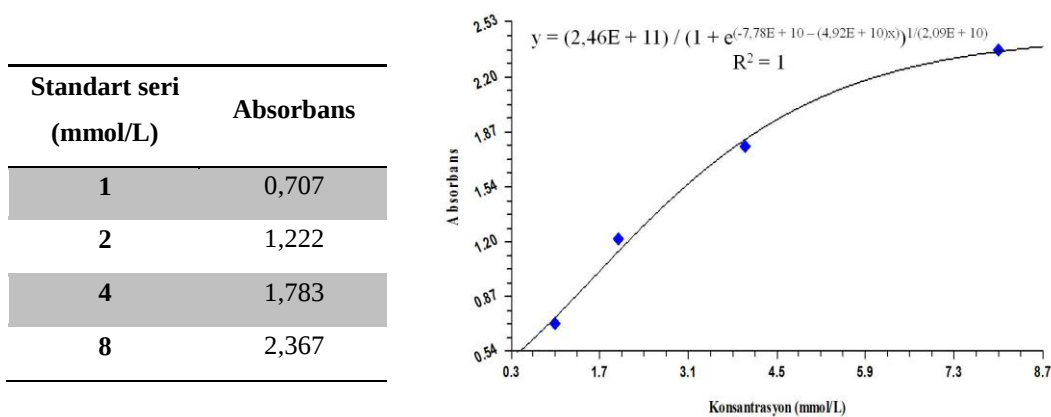
*60. ve 90. Gün orta doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,05$).

***60. Gün yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,0005$).

Şekil 4-15: Plazma INHB seviyelerinin karşılaştırılması.

4.2.6. Plazma Kolesterol Seviyeleri

Plazma örneklerindeki kolesterol seviyeleri için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hesaplandı (Şekil 4-16).



Şekil 4-16: Kolesterolle ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.

Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla 60. günde (Tablo 4-16) ve 90. günde (Tablo 4-17) kolesterol seviyeleri mmol/L cinsinden hesaplandı. Kontrol grubuna kıyasla maruziyet gruplarında kolesterol düzeylerinde azalma olduğu tespit edildi. Gruplar arası değişim istatistiksel düzeyde anlamlılık gözlemlendi ($p \leq 0,020$).

Tablo 4-16: 60. Gündeki kolesterol seviyeleri.

KOLESTEROL SEVİYELERİ (mmol/L)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	9,983	3,936	8,049	3,145
	5,509	3,955	4,188	5,662
	3,806	6,367	4,179	4,994
	5,872	5,236	3,928	4,768
	4,824	5,278	4,897	3,451
	6,001	5,404	4,669	5,170
	6,348	7,550	3,354	3,170
	5,547	4,899	5,483	4,235
	7,120	5,778	4,765	3,989
	4,979	4,333	5,655	4,889
		6,547	3,977	3,335
			4,977	5,235
Ortalama kolesterol seviyeleri^a	5,999±0,526	5,389±0,340	4,843±0,349	4,337±0,259*

^aOrtalama ±standart hata

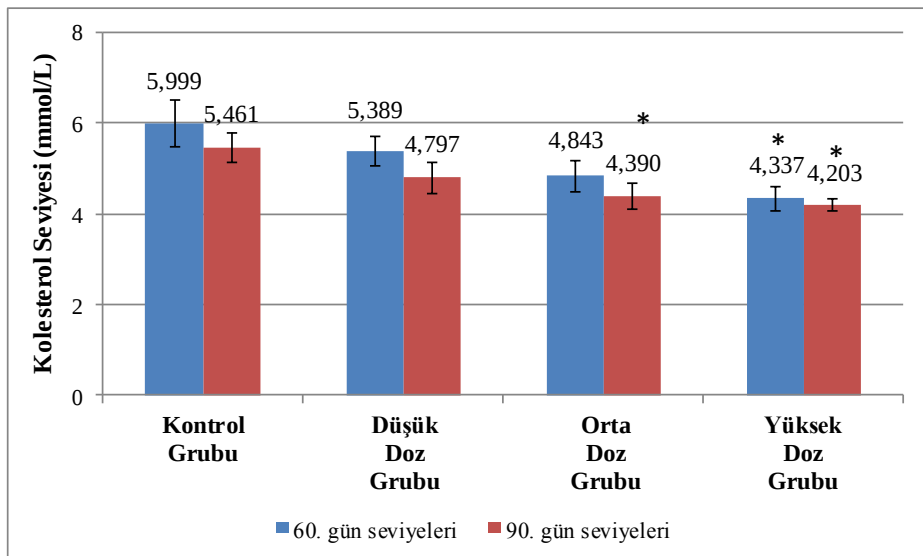
*Yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,05$).

Tablo 4-17: 90. Gündeki kolesterol seviyeleri.

KOLESTEROL SEVİYELERİ (mmol/L)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	5,278	3,997	4,271	3,300
	6,678	5,016	3,541	4,645
	4,418	3,487	3,136	4,246
	4,463	3,759	3,792	4,383
	4,793	5,543	3,121	4,063
	5,516	3,501	6,538	4,242
	7,258	5,242	4,400	4,414
	6,426	4,555	4,908	4,335
	4,322	4,824	5,706	4,412
	5,461	5,765	4,999	3,635
		7,078	3,671	4,899
			4,592	3,867
Ortalama kolesterol seviyeleri^a	5,461±0,526	4,797±0,340	4,390±0,349*	4,203±0,259*

^aOrtalama ±standart hata*Orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,05$).

Kontrol grubuna kıyasla maruziyet gruplarında kolesterol düzeylerinde gözlenen doza bağlı azalmanın yüksek doz maruziyet gruplarında 60. gün için %27,71 ($p:0,016$) ve 90. gün için %23,04 ($p:0,015$) oranında ve istatistiksel anlamlılık düzeyinde olduğu gözlemlendi. Orta doz grubunda 90. gün değerlerinde gözlenen %19,62 oranındaki azalma da istatistiksel anlamlılık düzeyindeydi ($p:0,049$) (Şekil 4-17).

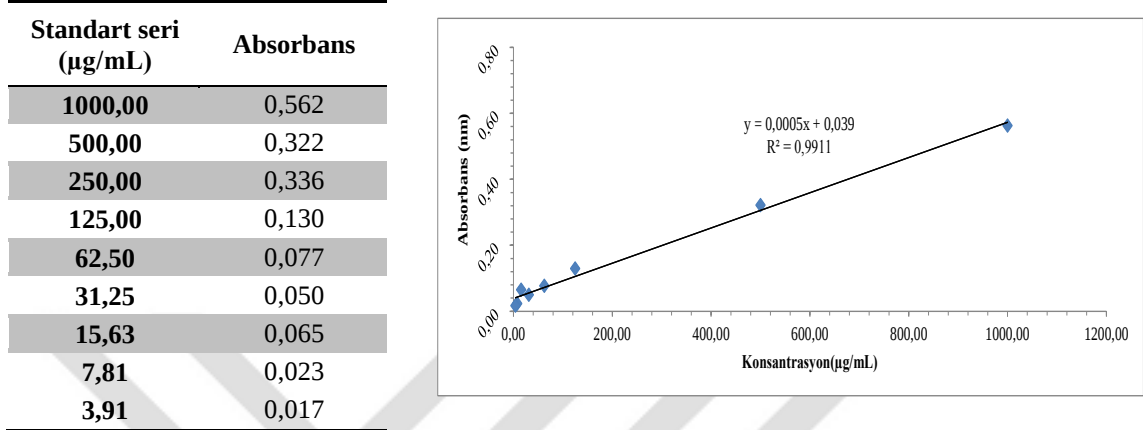
* 60. ve 90. Gün yüksek doz grupları ile 90. gün orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,05$).

Şekil 4-17: Plazma kolesterol seviyelerinin karşılaştırılması.

4.3. Oksidatif Hasar Oluşturma Potansiyelin Değerlendirilmesi

4.3.1. Plazma ve Dokuda Protein Seviyeleri

Plazma ve doku örneklerindeki protein seviyeleri için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hesaplandı (Şekil 4-18).



Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla µg/mL cinsinden bulunan plazma ve dokudaki protein seviyeleri mg/mL cinsinden hesaplanıp sırasıyla Tablo 4-18 ve Tablo 4-19’da gösterildi.

Tablo 4-18: Doku protein seviyeleri.

PROTEİN SEVİYELERİ (mg/mL)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	26,460	27,500	20,120	29,200
	22,280	22,800	20,420	20,900
	23,240	23,200	17,680	29,940
	24,180	24,980	12,740	25,180
	22,620	20,480	21,800	19,440
	25,920	20,040	19,860	18,420
	22,960	22,560	20,960	22,580
	20,420	21,120	25,820	29,080
	18,180	17,160	21,260	22,720
	24,020	19,720	29,340	28,220
		23,040	21,700	23,160
			29,680	25,080
Ortalama protein seviyeleri^a	23,028±0,771	22,055±0,843	21,782±1,359	24,493±1,140

^aOrtalama değer ±standart hata

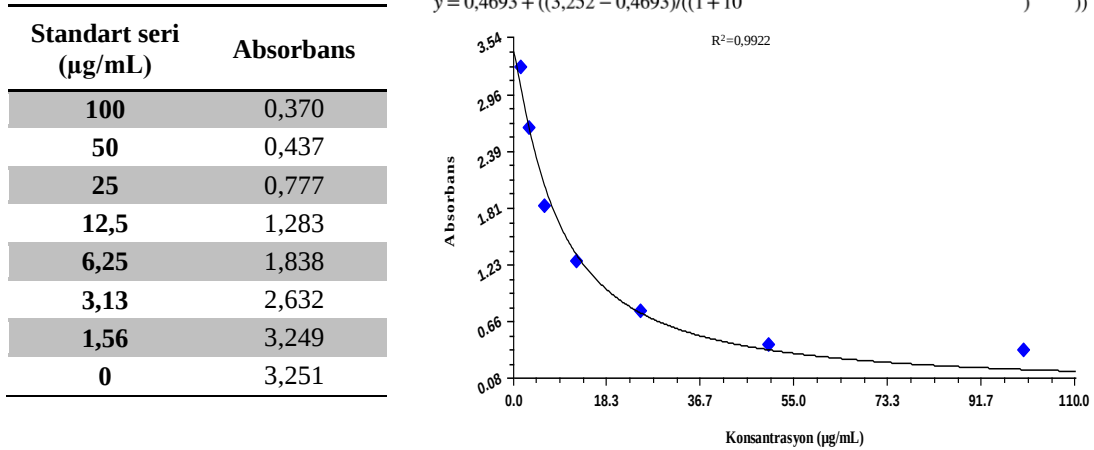
Tablo 4-19: Plazma protein seviyeleri.

PROTEİN SEVİYELERİ (mg/mL)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	161,5	143,9	33,9	85,6
	144,5	174,7	148,4	119,1
	102,1	169,4	142,9	145,3
	81,8	188,9	97,8	103,3
	167,5	149,6	143,2	129,4
	43,0	183,9	145,3	141,7
	163,1	157,9	157,6	25,9
	25,0	174,9	204,0	183,0
	49,0	156,0	175,1	160,3
	98,9	158,0	197,8	76,7
		121,1	56,1	173,3
			176,9	70,4
Ortalama protein seviyeleri^a	103,6±17,0	161,7±5,9	139,9±15,2	117,8±13,5

^aOrtalama değer ±standart hata

4.3.2. Plazma ve Doku GSH Seviyeleri

Plazma ve doku örneklerindeki GSH seviyeleri için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hesaplandı (Şekil 4-18).



Şekil 4-18: GSH'a ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.

Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla µg/mL cinsinden bulunan plazma ve dokudaki GSH seviyeleri protein seviyelerine göre mmol/mg protein cinsinden hesaplanıp sırasıyla Tablo 4-20 ve Tablo 4-21'de gösterildi.

Plazma GSH seviyesinin gruplar arası kıyaslamasında istatistiksel düzeyde anlamlılık gözlemlendi ($p:0,000$). Kontrol grubuna kıyasla düşük, orta ve yüksek doz

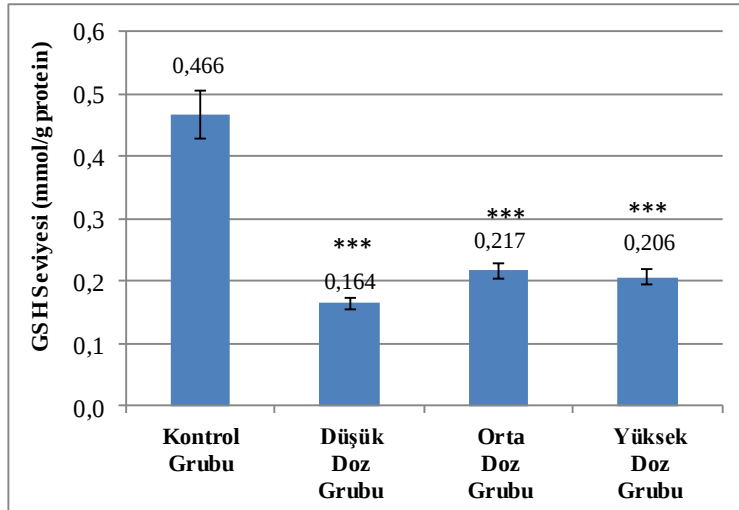
gruplarında sırasıyla %63,23, 51,35 ve 53,81 düzeylerinde GSH tüketimi tespit edildi. Gözlenen GSH düzeylerindeki düşüş istatistiksel düzeyde anlamlıdır ($p<0,000$) (Tablo 4-20; Şekil 4-19).

Tablo 4-20: Plazma GSH seviyeleri.

GSH SEVİYELERİ (mmol/mg protein)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	0,393	0,137	0,210	0,288
	0,626	0,155	0,260	0,178
	0,373	0,150	0,257	0,172
	0,472	0,212	0,130	0,245
	0,446	0,168	0,214	0,148
	0,545	0,179	0,229	0,201
	0,523	0,157	0,232	0,221
	0,323	0,198	0,201	0,199
	0,657	0,134	0,243	0,232
	0,301	0,189	0,190	0,178
		0,123	0,265	0,243
			0,168	0,167
Ortalama GSH seviyeleri^a	0,466 ±0,039	0,164 ±0,009***	0,217 ±0,012***	0,206 ±0,012***

^aOrtalama değer ±standart hata

***Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).



***Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).

Şekil 4-19: Plazma GSH seviyelerinin karşılaştırılması.

Benzer şekilde doku GSH seviyesinin gruplar arası kıyaslamasında istatistiksel düzeyde anlamlılık gözlemlendi ($p<0,000$). Kontrol grubuna kıyasla düşük, orta ve yüksek doz gruplarında sırasıyla %16,27, 16,27 ve 36,05 düzeylerinde GSH tüketimi tespit edildi. Gözlenen GSH düzeylerindeki düşüş istatistiksel düzeyde anlamlıdır ($p\leq 0,001$) (Tablo 4-21; Şekil 4-20).

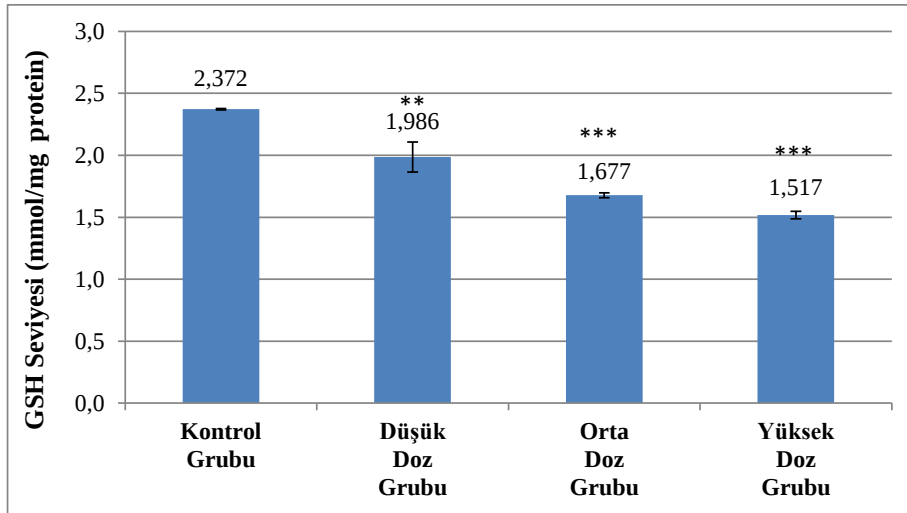
Tablo 4-21: Doku GSH seviyeleri.

GSH SEVİYELERİ (mmol/mg protein)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	2,398	2,498	1,793	1,619
	2,345	1,506	1,612	1,265
	2,377	1,392	1,627	1,668
	2,367	2,197	1,687	1,522
	2,382	2,344	1,691	1,544
	2,361	2,273	1,665	1,494
	2,387	1,692	1,720	1,565
	2,357	2,194	1,634	1,474
	2,393	1,789	1,743	1,574
	2,352	2,394	1,601	1,459
		1,565	1,765	1,591
			1,589	1,432
Ortalama GSH seviyeleri^a	2,372 $\pm$ 0,006	1,986 $\pm$ 0,121**	1,677 $\pm$ 0,020***	1,517 $\pm$ 0,030***

^aOrtalama değer $\pm$ standart hata

** Düşük doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,005$).

***Orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).



** Düşük doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,005$).

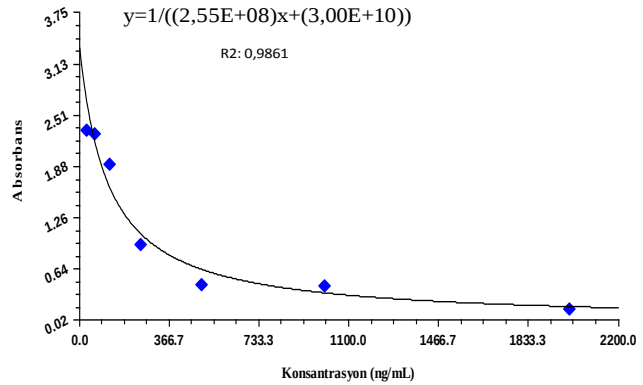
***Orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,0005$).

Şekil 4-20: Doku GSH seviyelerinin karşılaştırılması.

4.3.3. Plazma ve Doku MDA Seviyeleri

Plazma ve doku örneklerindeki MDA seviyeleri için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hesaplandı (Şekil 4-21).

Standart seri (ng/mL)	Absorbans
2000	0,157
1000	0,440
500	0,458
250	0,938
125	1,915
62,5	2,287
31,25	2,322
0	3,424



Şekil 4-21: MDA'ya ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.

Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla ng/mL cinsinden bulunan plazma ve dokudaki MDA seviyeleri protein seviyelerine göre ng/mg protein cinsinden hesaplanıp sırasıyla Tablo 4-22 ve Tablo 4-23'de gösterildi.

Plazma MDA seviyesinin gruplar arası kıyaslamasında istatistiksel düzeyde anlamlılık gözlemlendi ($p:0,000$). MDA düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla düşük, orta ve yüksek doz gruplarında sırasıyla 1,45, 1,82 ve 2,58 kat artış tespit edildi. Gözlenen

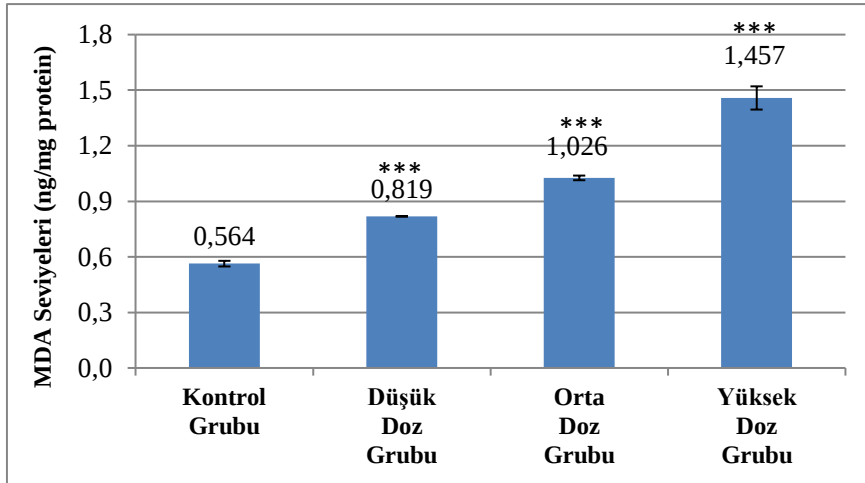
MDA düzeylerindeki artış istatistiksel düzeyde anlamlıdır ($p<0,000$) (Tablo 4-22; Şekil 4-22).

Tablo 4-22: Plazma MDA seviyeleri.

MDA SEVİYELERİ (ng/mg protein)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	0,546	0,819	1,088	1,267
	0,630	0,812	1,080	1,191
	0,515	0,834	0,910	1,848
	0,568	0,820	1,011	1,523
	0,583	0,817	1,033	1,576
	0,534	0,821	1,024	1,354
	0,604	0,816	1,037	1,567
	0,523	0,822	1,015	1,244
	0,629	0,815	1,055	1,687
	0,502	0,823	1,012	1,231
		0,813	1,046	1,677
			1,006	1,325
Ortalama MDA seviyeleri^a	0,564 ±0,015	0,819 ±0,002***	1,026 ±0,013***	1,457 ±0,063***

^aOrtalama değer ±standart hata

***Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).



***Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).

Şekil 4-22: Plazma MDA seviyelerinin karşılaştırılması.

Benzer şekilde doku MDA seviyesinin gruplar arası kıyaslamasında istatistiksel düzeyde anlamlılık gözlemlendi ($p<0,000$). MDA düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla düşük, orta ve yüksek doz gruplarında sırasıyla 1,05, 1,49 ve 1,72 kat artış tespit edildi. Gözlenen MDA düzeylerindeki artış orta ve yüksek doz grupları için istatistiksel düzeyde anlamlıdır ($p\leq 0,008$) (Tablo 4-23; Şekil 4-23).

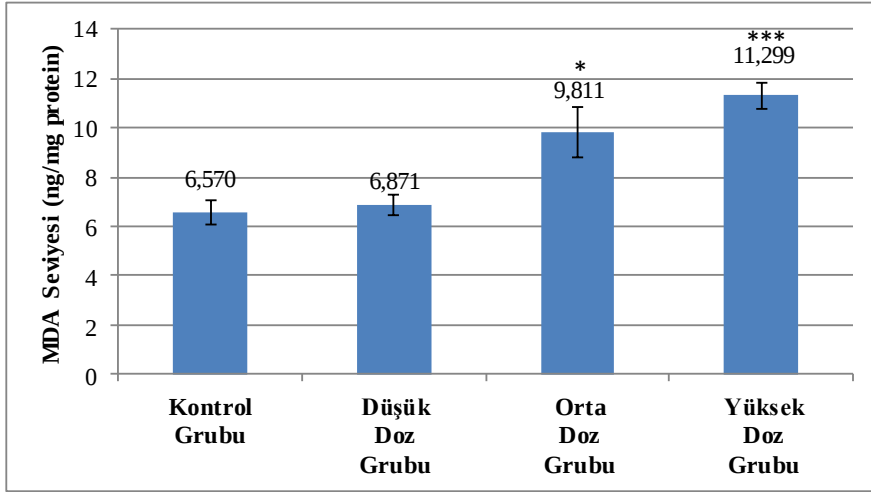
Tablo 4-23: Doku MDA seviyeleri.

MDA SEVİYELERİ (ng/mg protein)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	6,612	5,346	9,061	11,845
	7,882	7,101	6,303	8,734
	4,085	6,109	6,297	9,791
	4,846	7,602	10,042	15,628
	7,225	8,106	7,093	10,498
	8,768	8,150	7,769	11,312
	7,268	5,281	18,434	11,757
	6,001	5,174	11,393	10,765
	7,457	8,685	13,843	12,655
	5,556	7,931	7,872	10,312
		6,101	10,062	12,646
			9,560	9,646
Ortalama MDA seviyeleri^a	6,570 $\pm$ 0,457	6,871 $\pm$ 0,394	9,811 $\pm$ 1,007*	11,299 $\pm$ 0,525***

^aOrtalama $\pm$ standart hata

*Orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,05$).

***Yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).



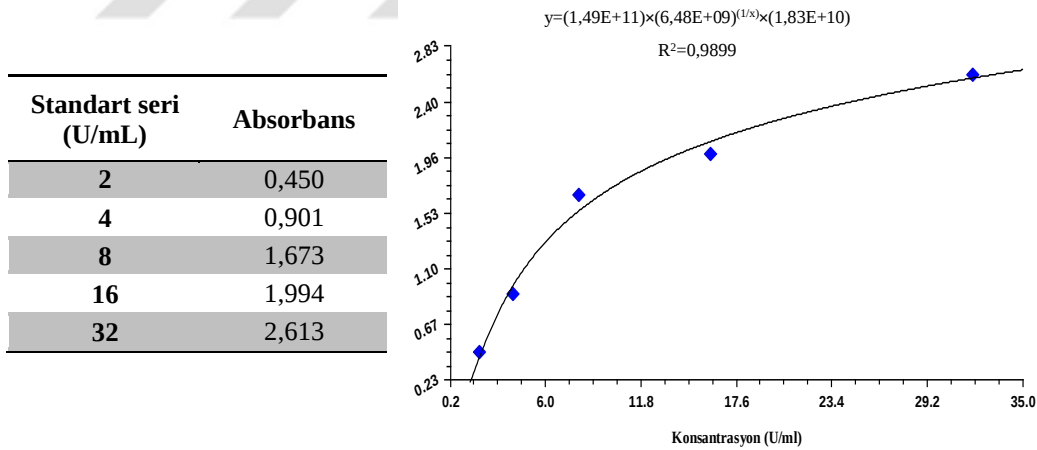
*Orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,05$).

***Yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).

Şekil 4-23: Doku MDA seviyelerinin karşılaştırılması.

4.3.4. Plazma ve Doku TAS Düzeyleri

Plazma ve doku örneklerindeki TAS düzeyleri için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hesaplandı (Şekil 4-24).



Şekil 4-24: TAS'a ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.

Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla U/mL cinsinden bulunan plazma ve doku örnekleri için TAS değerleri sırasıyla Tablo 4-24 ve Tablo 4-25'de gösterildi.

Plazma TAS düzeylerinin gruplar arası kıyaslamasında istatistiksel düzeyde anlamlılık gözlemlendi ($p<0,000$). TAS değerlerinde kontrol grubuna kıyasla düşük, orta ve yüksek doz gruplarında sırasıyla %52,46, 58,95 ve 70,47 oranında azalma tespit edildi.

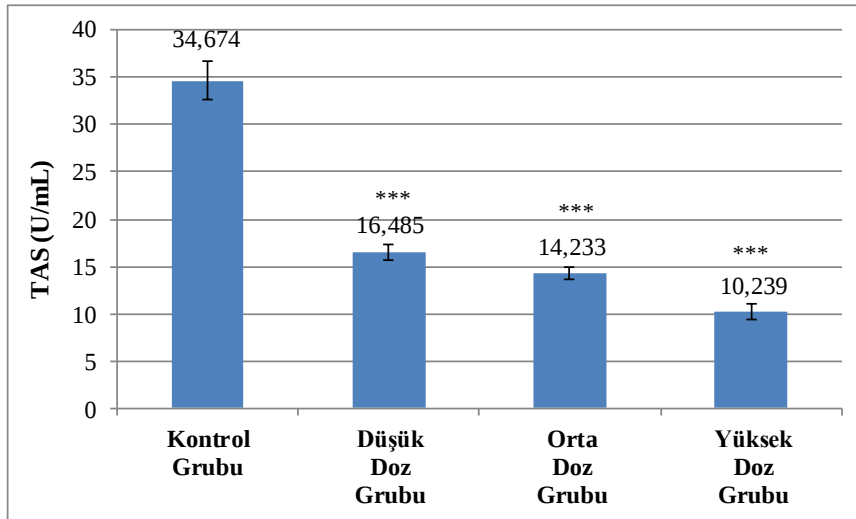
Gözlenen TAS düzeylerindeki düşüş istatistiksel düzeyde anlamlıdır ($p<0,000$) (Tablo 4-24; Şekil 4-25).

Tablo 4-24: Plazma TAS düzeyleri.

TAS DÜZEYLERİ (U/mL)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	35,961	12,701	12,635	13,948
	44,404	21,291	14,771	6,278
	36,859	17,092	12,651	9,421
	21,470	16,187	13,458	9,576
	36,757	15,152	16,952	11,610
	32,535	17,222	18,971	5,022
	38,978	15,445	12,373	11,655
	30,012	18,013	12,055	14,401
	40,867	14,979	15,466	11,244
	28,889	19,892	12,977	9,132
		13,355	16,365	12,234
			12,123	8,345
Ortalama TAS düzeyleri^a	34,673±2,099	16,484±0,782***	14,233±0,652***	10,239±0,820***

^aOrtalama değer ±standart hata

*** Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).



*** Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).

Şekil 4-25: Plazma TAS düzeylerinin karşılaştırılması.

Benzer şekilde doku TAS seviyesinin gruplar arası kıyaslamasında istatistiksel düzeyde anlamlılık gözlemlendi ($p:0,000$). TAS değerlerinde kontrol grubuna kıyasla düşük, orta ve yüksek doz gruplarında sırasıyla %14,83, 18,27 ve 34,37 oranında azalma tespit edildi. Gözlenen TAS düzeylerindeki düşüş istatistiksel düzeyde anlamlıdır ($p:0,006$) (Tablo 4-25; Şekil 4-26).

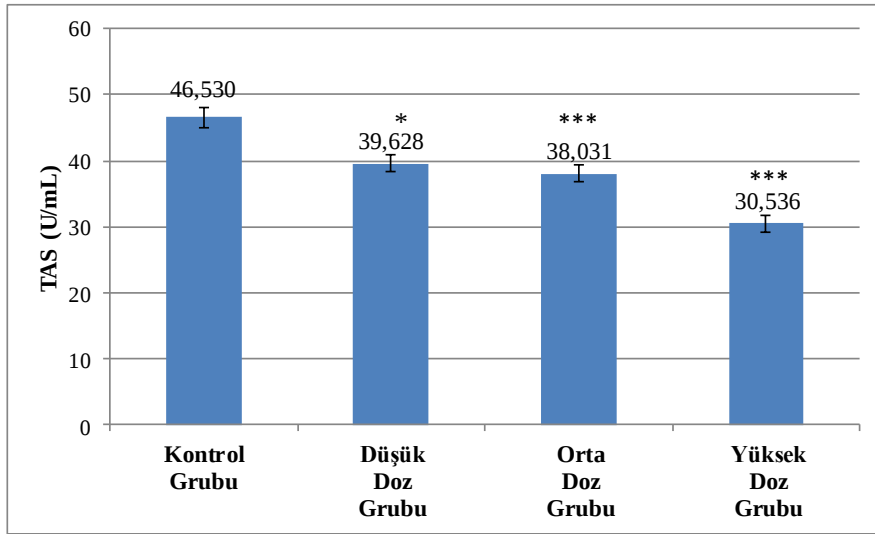
Tablo 4-25: Doku TAS düzeyleri.

TAS DÜZEYLERİ (U/mL)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	36,755	38,449	31,576	35,143
	43,272	30,465	35,270	28,131
	41,490	40,730	36,004	27,998
	46,517	42,057	42,792	36,179
	51,852	34,595	40,830	25,230
	48,242	39,450	38,922	30,543
	51,392	40,480	44,582	32,765
	52,718	42,266	41,902	28,332
	48,699	41,388	38,543	35,000
	44,359	46,400	29,889	26,432
		39,628	40,020	36,223
			36,042	24,454
Ortalama TAS düzeyleri^a	46,530±1,613	39,628±1,259*	38,031 ±1,282***	30,536 ±1,259***

^aOrtalama değer ±standart hata

*Düşük doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,05$).

***Orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).



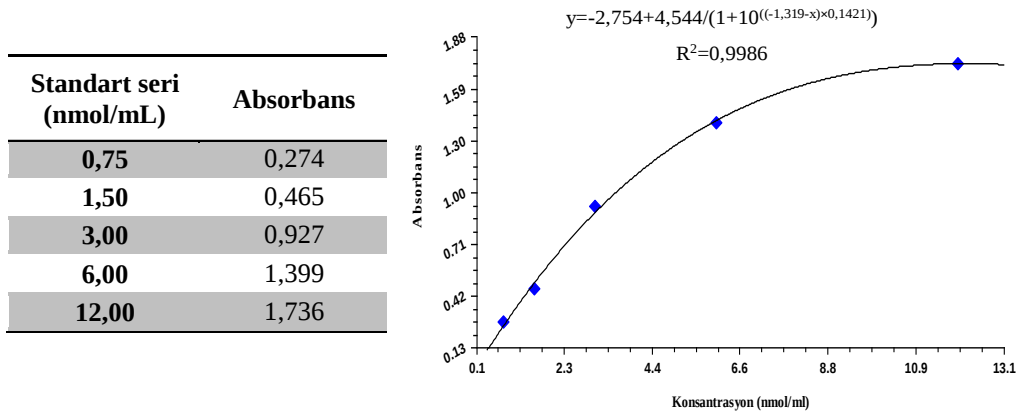
*Düşük doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,05$).

***Orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,0005$).

Şekil 4-26: Doku TAS düzeylerinin karşılaştırılması.

4.3.5. Plazma ve Doku TOS Düzeyleri

Plazma ve doku örneklerindeki TOS için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hesaplandı (Şekil 4-28).



Şekil 4-27: TOS'a ait standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi.

Standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi yardımıyla nmol/mL cinsinden bulunan plazma ve doku örnekleri için TOS değerleri sırasıyla Tablo 4-26 ve Tablo 4-27'de gösterildi.

Plazma TOS düzeylerinin gruplar arası kıyaslamasında istatistiksel düzeyde anlamlılık gözlemlendi ($p < 0,000$). TOS değerlerinde kontrol grubuna kıyasla sadece yüksek

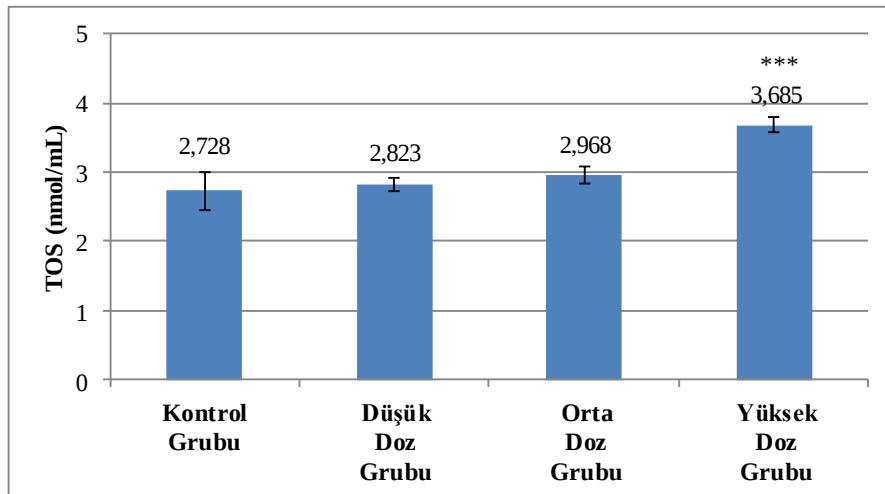
doz grubunda %35,08 oranında istatistiksel anlamlılık düzeyinde artış tespit edildi ($p<0,000$) (Tablo 4-26; Şekil 4-28).

Tablo 4-26: Plazma TOS düzeyleri.

TOS DÜZEYLERİ (nmol/mL)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	2,942	3,198	2,631	3,329
	3,670	3,185	3,769	3,189
	3,444	2,348	3,694	3,416
	0,622	2,875	2,486	3,315
	2,842	2,540	2,913	4,269
	2,846	2,792	2,513	3,996
	2,967	2,778	3,180	3,597
	2,545	2,556	2,524	4,152
	3,101	3,001	3,002	3,902
	2,301	2,534	2,987	3,645
		3,246	2,776	3,979
			3,142	3,432
Ortalama TOS düzeyleri^a	2,728±0,265	2,823±0,093	2,968±0,124	3,685±0,105***

^aOrtalama değer ±standart hata

***Yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).



***Yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).

Şekil 4-28: Plazma TOS düzeylerinin karşılaştırılması.

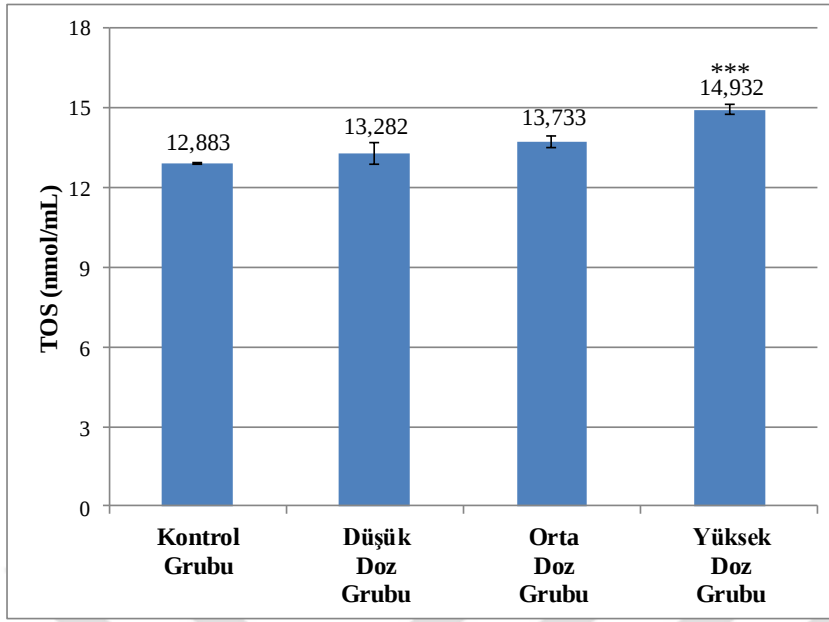
Benzer şekilde doku TOS seviyesinin gruplar arası kıyaslamasında istatistiksel düzeyde anlamlılık gözlemlendi ($p:0,000$). TOS değerlerinde kontrol grubuna kıyasla sadece yüksek doz grubunda %15,90 oranında istatistiksel anlamlılık düzeyinde artış tespit edildi ($p:0,000$) (Tablo 4-27; Şekil 4-29).

Tablo 4-27: Doku TOS seviyeleri.

TOS DEĞERLERİ (nmol/mL)				
	Kontrol Grubu (s:10)	Düşük Doz Grubu (s:11)	Orta Doz Grubu (s:12)	Yüksek Doz Grubu (s:12)
	12,857	13,941	13,094	14,480
	12,975	14,648	14,669	14,944
	12,818	14,044	14,606	16,280
	12,968	13,254	14,648	14,023
	12,968	9,642	13,015	15,011
	12,857	13,474	14,334	14,668
	12,980	14,564	14,396	15,435
	12,669	12,837	13,274	14,558
	12,980	13,134	13,454	15,556
	12,757	12,323	12,739	14,334
		14,241	12,837	15,778
			13,733	14,112
Ortalama TOS seviyeleri^a	12,883 ±0,035	13,282 ±0,425	13,733 ±0,218	14,932 ±0,203***

^aOrtalama değer ±standart hata

***Yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).



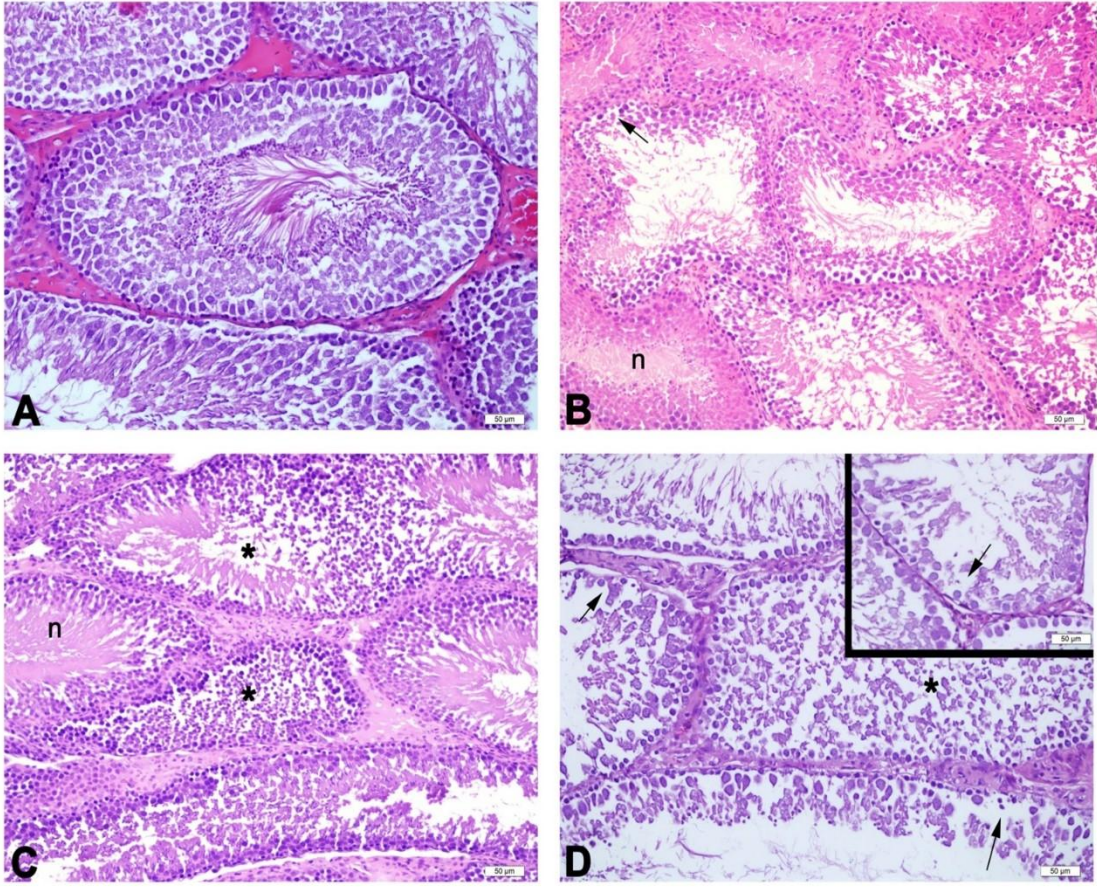
***Yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).

Şekil 4-29: Doku TOS seviyelerinin karşılaştırılması.

4.4. Histolojik İnceleme

4.4.1. Histopatolojik Bulgular ve Seminifer Tübül Skorlaması

Kontrol (A) grubunda düzenli spermatogenik hücreleri ve seminifer tübülleri olan normal testis morfolojisi gözlemlendi. Çoğu seminifer tübülde düzenli morfolojide spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatositler, erken spermatidler ve spermatozoa gözlemlendi. Düşük doz (B) grubunda (skor 7,6) bazı tübüllerin germinal epitelinde vakuol formasyonu gözlemlendi. Orta doz (C) grubunda (skor 7,9) birçok tübülün lümeninde olgunlaşmamış hücre gözlemlendi. Yüksek doz (D) grubunda (skor 8,1) çok sayıda seminifer tübülde, spermatogenik germ hücre sayısında azalma, vakuol formasyonu olan hasarlı spermatogenik hücreler, lümende olgunlaşmamış hücre döküntüleri olduğu gözlemlendi (Şekil 4-33).



Deney gruplarına ait temsili fotomikrografları. (A) Kontrol grubunda düzenli seminifer tübüleri olan normal testis morfolojisi; (B) düşük doz grubunda düzenli germinal epiteli olan normal seminifer tübüller (n) ve vakuol oluşumu (ok); (C) orta doz grubunda bazı seminifer tübüllerin lümeninde olgunlaşmamış hücreler ve düzenli seminifer tübüller (n); (D) yüksek doz grubunda bazı seminifer tübüllerin lümeninde olgunlaşmamış hücreler (*) ve germinal epitelde vakuol oluşumu (ok) gözlenmektedir.

Şekil 4-30: H&E boyası ile seminifer tübül histopatolojik görüntüleme.

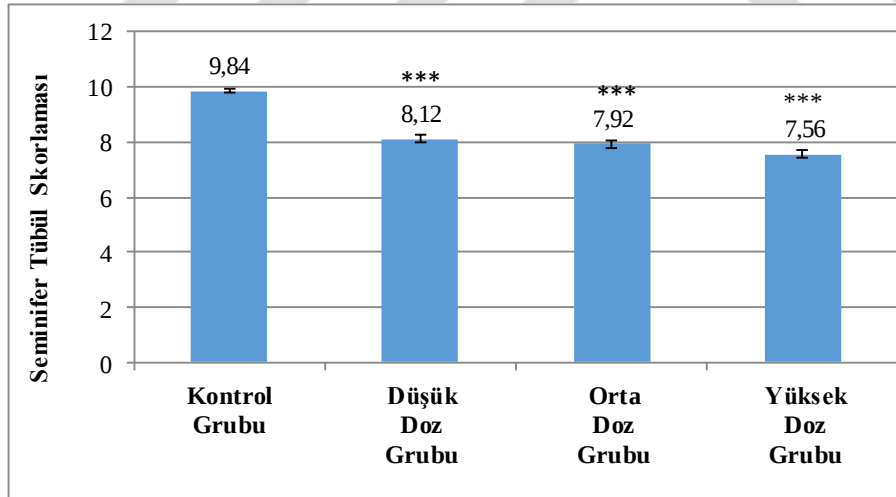
Seminifer tübül skorlaması için modifiye Johnson metodu kullanılmış olup elde edilen değerler Tablo 4-28’de gösterildi. Gruplar arası seminifer tübül skorlama değerlerinin kıyaslamasının istatistiksel düzeyde anlamlı olduğu tespit edildi ($p:0,000$). Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre seminifer tübül skorlama değerlerindeki düşüşün istatistiksel düzeyde anlamlı olduğu gözlemlendi ($p:0,000$) (Şekil 4-34).

Tablo 4-28: Seminifer tübül skorlama sonuçları.

SEMİNİFER TÜBÜL SKORLAMA				
	Kontrol Grubu (s:8)	Düşük Doz Grubu (s:8)	Orta Doz Grubu (s:8)	Yüksek Doz Grubu (s:8)
	9,85	8,80	8,05	8,00
	9,85	7,85	8,30	7,40
	9,45	8,00	7,10	7,30
	9,85	8,25	7,65	7,00
	9,95	7,60	8,20	7,40
	9,95	8,30	8,00	7,40
	9,85	8,20	8,40	8,05
	9,95	7,95	7,65	7,95
Ortalama seminifer tübül skorlama^a	9,84 ±0,06	8,12 ±0,13***	7,92 ±0,15***	7,56 ±0,14***
Histolojik bulgular	Tam spermatogenesis	Tübülde beşden az spermatozoa, birkaç geç spermatid	Tübülde beşden az spermatozoa, birkaç geç spermatid	Tübülde beşden az spermatozoa, birkaç geç spermatid

^a Ortalama değer ±standart hata

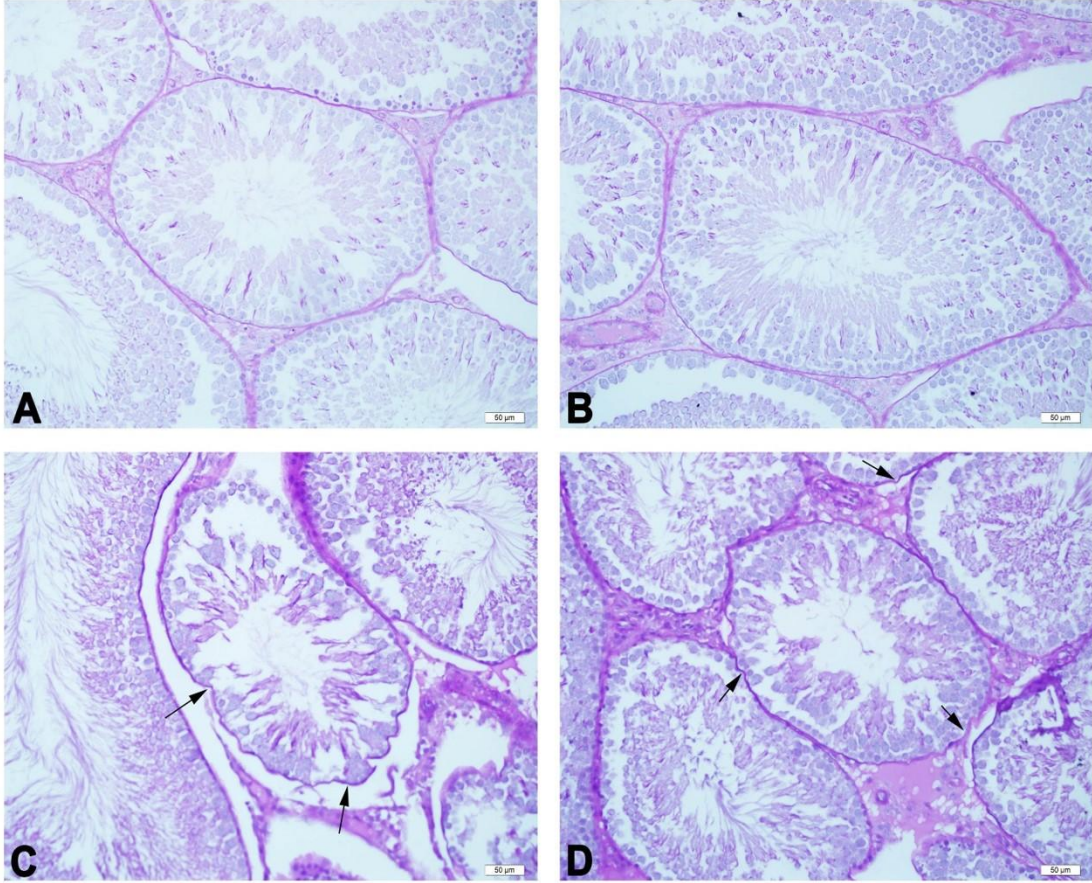
***Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).



***Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p<0,0005$).

Şekil 4-31: Seminifer tübül skorlamalarının karşılaştırılması.

Kontrol (A) ve düşük doz (B) gruplarında seminifer tübüllerinin bazal membranlarının düzenli olduğu ve PAS pozitif reaksiyon gösterdiği gözlemlendi. Orta doz (C) ve yüksek doz (D) gruplarında ise birçok seminifer tübülde düzensiz ve ondülasyon gösteren bazal membran yapısı olduğu ve düzensiz PAS pozitif reaksiyon gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4-35).



Deney gruplarına ait temsili fotomikrograflar. Kontrol (A) ve düşük doz (B) gruplarında seminifer tübüllerde düzenli morfolojide PAS pozitif reaksiyon gösteren bazal membran yapısı, orta doz (C) ve yüksek doz (D) gruplarında bazı seminifer tübüllerde düzensiz görülen bazal membran (ok) yapısı görülmektedir.

Şekil 4-32: PAS boyası ile seminifer tübül histopatolojik görüntüleme.

4.4.2. Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) İmmunohistokimyası

Her kesitte 20 seminifer tübül incelenerek ve her bir seminifer tübülde PCNA pozitif hücre sayısı toplam hücre sayısına bölünerek belirlenen proliferasyon indeksi Tablo 4-31’de gösterildi.

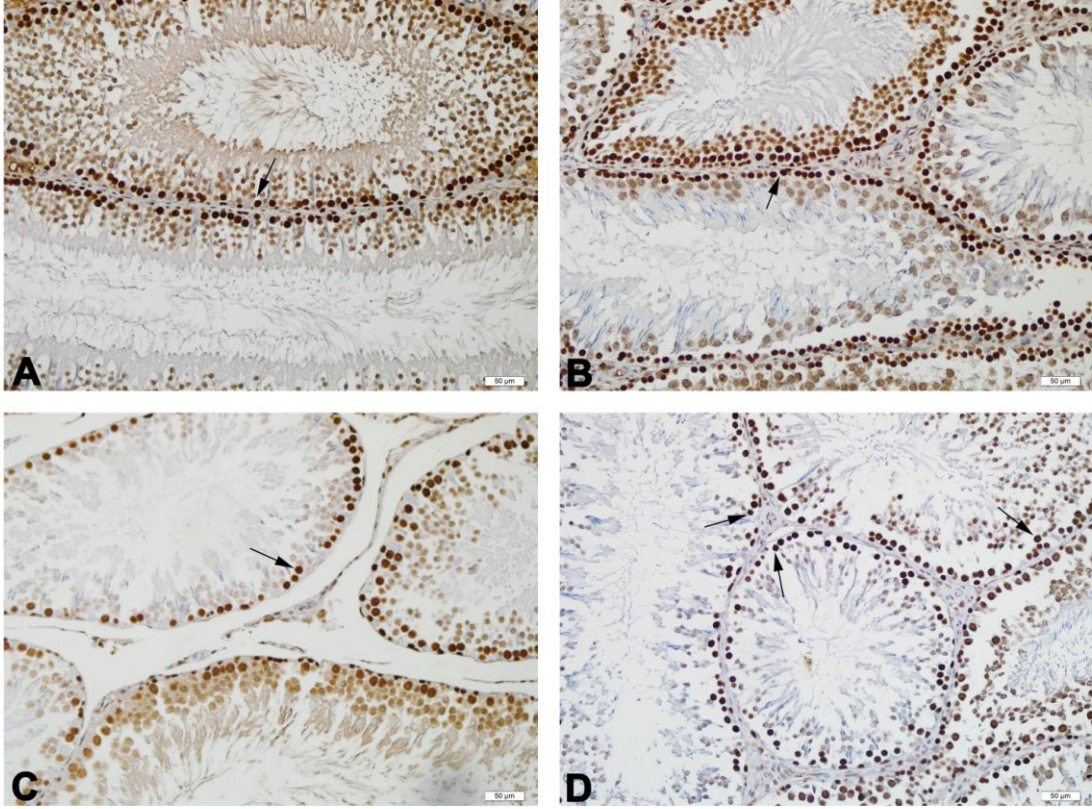
Tablo 4-29: Proliferasyon indeksi sonuçları.

PROLİFERASYON İNDEKSİ (%)				
	Kontrol Grubu (s:8)	Düşük Doz Grubu (s:8)	Orta Doz Grubu (s:8)	Yüksek Doz Grubu (s:8)
	42,487	37,264	31,896	24,286
	41,645	36,295	31,821	25,889
	40,729	35,258	29,620	26,176
	42,037	36,577	30,430	26,707
	42,972	38,369	30,130	24,433
	42,735	37,461	29,109	23,198
	43,029	38,153	30,645	23,127
	40,180	37,579	29,979	24,565
Ortalama proliferasyon indeksi^a	41,977 ±0,374	37,120 ±0,364***	30,454 ±0,349***	24,798 ±0,473***

^aOrtalama ±standart hata

***Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p \leq 0,0005$).

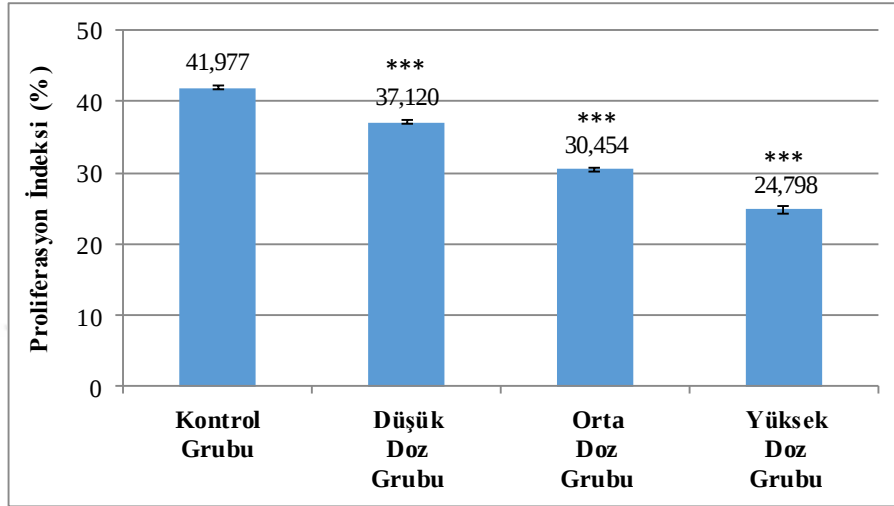
Tüm grupların seminifer tübüllerindeki PCNA pozitif hücreler koyu kahverengi olarak gözlemlendi. Kontrol (A) ve düşük doz (B) gruplarında seminifer tübüllerinde çok sayıda PCNA pozitif hücre, orta doz (C) grubunda orta düzeyde azalmış ve yüksek doz (D) grubunda ise ciddi düzeyde azalmış PCNA pozitif hücre gözlemlendi (Şekil 4-36).



Deney gruplarına ait PCNA pozitif hücreleri gösteren temsili fotomikrograflar. (A) Kontrol ve (B) düşük doz gruplarında seminifer tübüllerinde çok sayıda PCNA pozitif hücre gözlenirken, (C) orta doz grubunda orta düzeyde ve (D) yüksek doz grubunda ciddi düzeyde azalmış PCNA pozitif hücre görülmektedir.

Şekil 4-33: PCNA immünohistokimyası ile görüntüleme.

Proliferasyon indeksi değerlerinin gruplar arası değerlendirilmesi istatistiksel düzeyde anlamlılık gösterdi ($p:0.000$). Kontrol grubuna göre düşük, orta ve yüksek doz grubunun proliferasyon indeksi değerlerindeki düşüşlerin istatistiksel düzeyde anlamlı olduğu tespit edildi ($p\leq 0,001$) (Şekil 4-37).



***Düşük, orta ve yüksek doz gruplarının kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p\leq 0,0005$).

Şekil 4-34: Proliferasyon indeksi karşılaştırılması.

4.4.3. TUNEL Hücre Sayımı

Apoptoza gitmiş hücrelerin değerlendirilmesi TUNEL testi ile yapıldı. TUNEL⁺ 3 veya daha fazla apoptotik hücre içeren seminifer tübül sayısını gösterirken, TUNEL⁻ apoptoza gitmemiş ya da 3'den az apoptik hücre barındıran seminifer tübül sayısını göstermektedir. TUNEL hücre sayımı sonuçları Tablo 4-28'de gösterildi.

Tablo 4-30: TUNEL hücre sayımı sonuçları.

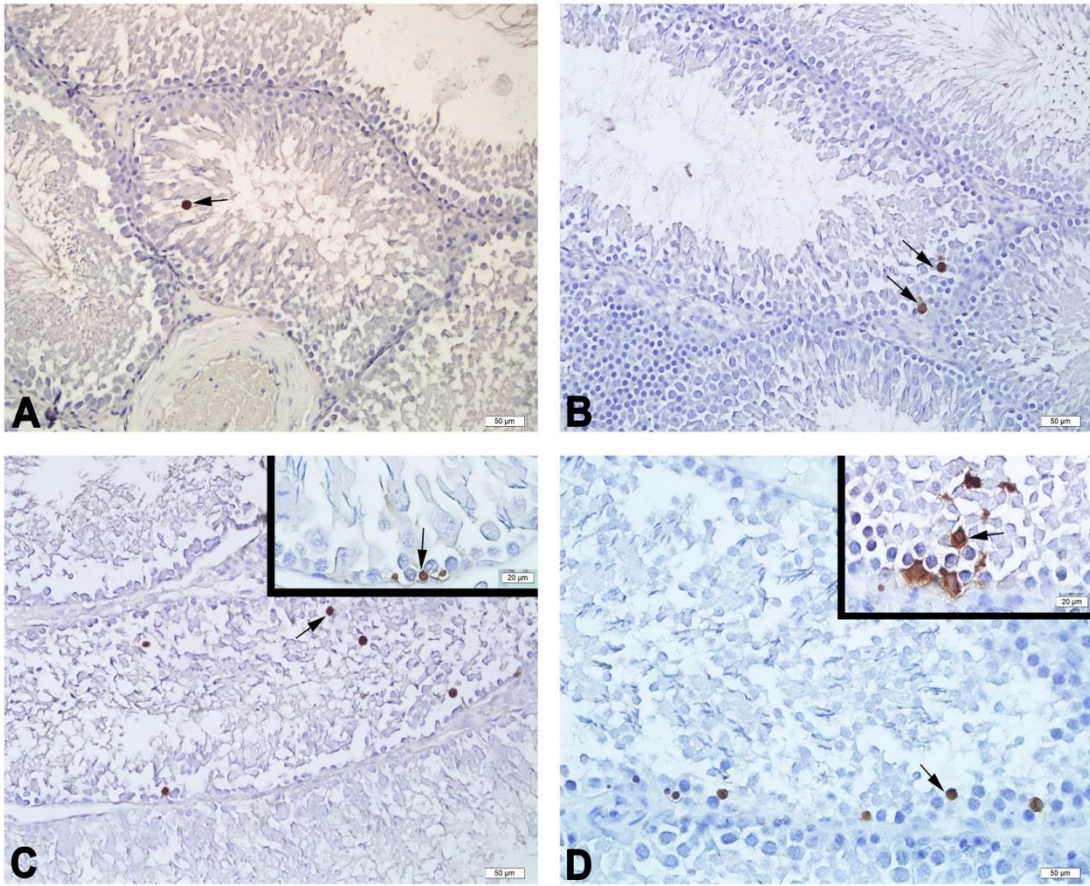
TUNEL HÜCRE SAYIMI (TUNEL +/-)								
Kontrol Grubu (s:8)		Düşük Doz Grubu (s:8)		Orta Doz Grubu (s:8)		Yüksek Doz Grubu (s:8)		
TUNEL ⁺	TUNEL ⁻	TUNEL ⁺	TUNEL ⁻	TUNEL ⁺	TUNEL ⁻	TUNEL ⁺	TUNEL ⁻	
0	20	0	20	5	15	15	5	
0	20	0	20	7	13	3	17	
0	20	0	20	5	15	14	6	
0	20	3	17	6	14	12	8	
0	20	4	16	5	15	11	9	
0	20	3	17	4	16	12	8	
0	20	0	20	5	15	14	6	
0	20	7	13	5	15	11	9	
Ortalama TUNEL ^{+/-a}	0	20	2,1 ±0,9	17,9 ±0,9	5,3±0,3**	14,8±0,3**	11,5±1,3***	8,5±1,3** *

^aOrtalama değer ±standart hata

**Orta doz grubu TUNEL^{+/-} değerlerinin kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,005$).

***Yüksek doz grubu TUNEL^{+/-} değerlerinin kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,0005$).

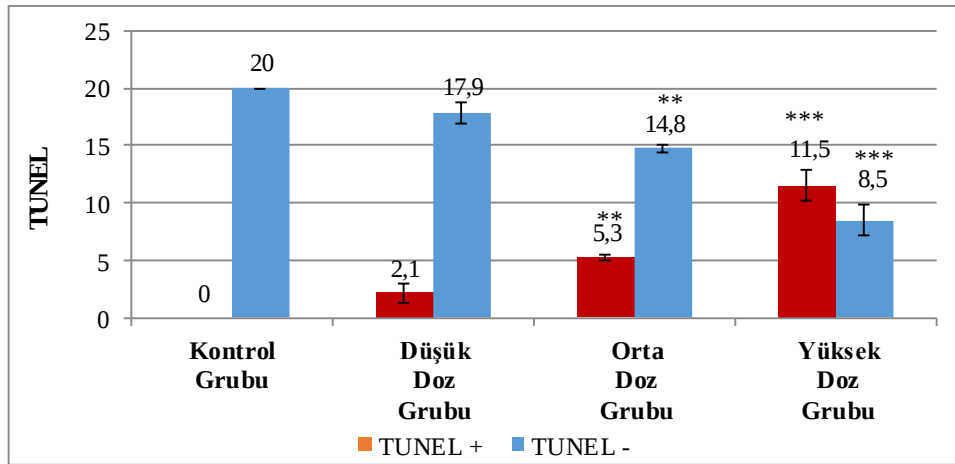
Tüm grupların seminifer tübüllerinde, kahverengi boyanmış TUNEL⁺ hücreler çoğunlukla spermatogonyumlarda ve primer spermatositlerde gözlemlendi. Kontrol (A) ve düşük doz (B) gruplarında seminifer tübüllerinde az sayıda (<3) apoptoza gitmiş hücre, orta doz (C) ve özellikle de yüksek doz (D) gruplarında ise 3 ve üzeri sayıda apoptoza gitmiş hücre olup TUNEL⁺ seminifer tübül sayısında artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4-30).



Deney gruplarına ait TUNEL⁺ hücreleri gösteren temsili fotomikrograflar. **(A)** Kontrol ve **(B)** düşük doz gruplarının seminifer tübüllerinde az sayıda TUNEL⁺ hücre, **(C)** orta ve **(D)** yüksek doz gruplarında ise seminifer tübüllerde artmış TUNEL⁺ hücreler görülmektedir.

Şekil 4-35: TUNEL boyama ile seminifer tübül histopatolojik görüntüleme.

TUNEL^{+/−} değerlerinin gruplar arası değerlendirilmesi istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi ($p:0.000$). Orta ve yüksek doz gruplarının TUNEL^{+/−} değerlerinin kontrol grubuna kıyasla değişimlerinin istatistiksel düzeyde anlamlı olduğu tespit edildi ($p \leq 0,001$) (Şekil 4-31).



**Orta doz grubu TUNEL^{+/−} değerlerinin kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,005$).

***Yüksek doz grubu TUNEL^{+/−} değerlerinin kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,0005$).

Şekil 4-36: TUNEL değerlerinin karşılaştırılması.

TUNEL⁺ hücre içeren seminifer tübüller göz önünde bulundurularak hesaplanan apoptotik indeks değerleri Tablo 4-29'da gösterildi. Apoptotik indeksin gruplar arası değerlendirilmesinde istatistiksel anlamlılık tespit edildi ($p:0.000$). Kontrol grubuna göre orta ve yüksek doz gruplarının apoptotik indeks düzeylerinde gözlenen artışın istatistiksel düzeyde anlamlı olduğu tespit edildi ($p \leq 0,05$) (Şekil 4-32).

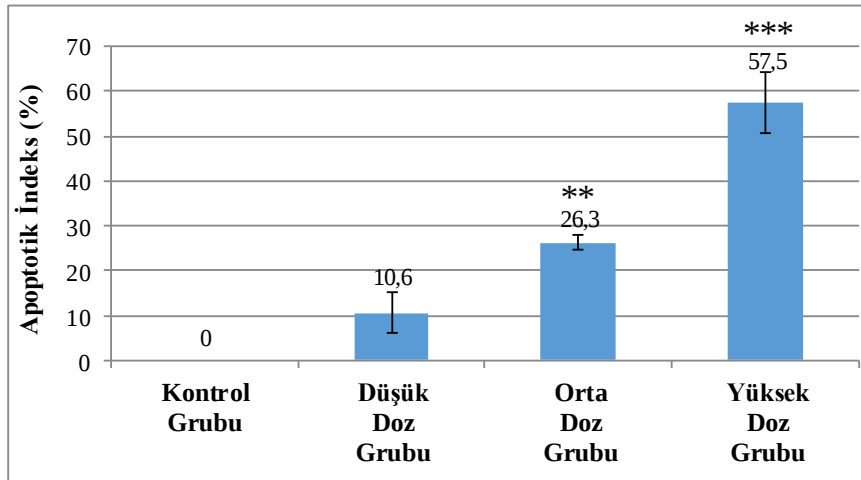
Tablo 4-31: Apoptotik indeks düzeyleri.

APOPTOTİK İNDEKS (%)				
	Kontrol Grubu (s:8)	Düşük Doz Grubu (s:8)	Orta Doz Grubu (s:8)	Yüksek Doz Grubu (s:8)
	0	0	25	75
	0	0	35	15
	0	0	25	70
	0	15	30	60
	0	20	25	55
	0	15	20	60
	0	0	25	70
	0	35	25	55
Ortalama apoptotik indeks^a	0	10,6 ±4,6	26,3 ±1,6**	57,5 ±6,6***

^aOrtalama değer ±standart hata

**Orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,005$).

***Yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,0005$).



**Orta doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,005$).

***Yüksek doz grubunun kontrol grubuna göre kıyaslanmasında gözlenen değişim çok yüksek derecede istatistiksel anlamlılık düzeyindedir ($p < 0,0005$).

Şekil 4-37: Apoptotik indeks düzeylerinin karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Asetamiprid ile kısa maruziyet süreli oral toksisite çalışmasında yem tüketimi ve vücut ağırlığında azalma olduğu rapor edilmiştir. Farelerde yapılan 13 haftalık çalışmada günde 106,1 mg/kg v.a. asetamiprid uygulandığında dişilerin kolesterol düzeylerinde belirgin azalma tespit edilmiş ve buna göre de NOAEL değeri günde 53,2 mg/kg v.a. olarak bildirilmiştir. Yüksek dozlarda titreme, vücut ağırlığında azalma, yem tüketiminde azalma, hemoglobin düzeyinde düşüş, serum kolesterol ve glikoz düzeylerinde azalma, üriner pH'da düşüş, sentrilobüler hipertrofi ve karaciğer ağırlığında artış gözlenmiştir (Nukui ve Ikeyama 1992a, Kaynak: Kanungo ve Solecki 2011 pp. 3-91). Sıçanlarda yapılan 2 yıl süreli maruziyet çalışmasında 17,5-22,6 mg/kg ve üzerinde asetamipride maruz kalan deney hayvanlarında hırıltı, kambur duruş ve zorlukla nefes alıp verme gibi klinik bulguların görülme sıklığında artış olduğu tespit edildi. Ancak, hırıltıların günde 7,1 mg/kg v.a. doz grubunda gözlenmemesi, zorlukla soluk alıp verme, nekahet, kambur duruş ve azalmış aktivite gibi diğer klinik bulgularla korelasyon görülmemesi nedeniyle NOAEL değeri hepatosit vakuolasyonuna dayanılarak günde 7,1 mg/kg olarak belirlenmiştir (Hatch 1994; Pallen 1999; Cunny 2000, Kaynak: Kanungo ve Solecki 2011 pp. 3-91). Kronik maruziyet süreli toksisite ve karsinogenisite ile ilgili 18 ay süreli maruziyetin gerçekleştirildiği bir çalışmada, 186,3-214,6 mg/kg'da azalmış yem tüketimi, erkeklerde 65,6-75,9 mg/kg'da vücut ağırlıklarında azalma, hepatoselüler hipertrofi ile ortalama bağıl karaciğer ağırlıklarında artış görülmüş, hepatoselüler hipertrofinin karaciğerin asetamiprid'e maruz kalmasına adaptif bir yanıt olabileceği rapor edilmiştir (Goldenthal 1994; Cunny 2000a; Gopinath 2001, Kaynak: Kanungo ve Solecki 2011 pp. 3-91).

Tez çalışmasında; asetamipridin 12,5, 25 ve 35 mg/kg v.a. konsantrasyonlarına 90 gün süre ile maruziyet gerçekleştirildi. Bu süreçte vücut ağırlığında azalma olmadığı gözlemlendi. Vücut ağırlıkları haftada 3 kez olacak şekilde kaydedildi. İlk ve son tartımlar arasındaki farklar değerlendirildiğinde kontrol, düşük doz, orta doz ve yüksek doz maruziyet grupları için ortalama vücut ağırlıklarında sırasıyla %2,76, 7,64, 11,47 ve 4,70 oranlarında artış tespit edildi (Tablo 4-1; Şekil 4-1; Şekil 4-2). Yüksek doz maruziyet grubunda vücut ağırlığındaki artışın diğer gruplara göre daha düşük düzeyde gözlenmesi, yukarıdaki çalışmalarda da bahsedildiği üzere, daha yüksek doza ve/veya

uzun süreli maruziyet süresine bağlı olarak vücut ağırlığında azalma gözlenebilme olasılığını düşündürmektedir.

Erkek sıçanlarda asetamipridin vücut ağırlığı, üreme organlarının (testis, epididimis ve seminal vezikül) bağlı ağırlıkları, spermatid sayısı, sperm sayısı, sperm motilitesi ve testosteron düzeylerinin azalması ile ortaya çıkan üreme toksisitesine neden olduğu rapor edilmiştir (Tavakkoli ve ark. 2017). Kunming türü erkek farelerde kontrol grubuna karşılık fıstık yağı, 30 mg/kg v.a. asetamiprid, 30 mg/kg v.a. asetamiprid ile 20 mg/kg v.a. vitamin E ve son olarak da 20 mg/kg v.a. vitamin E maruziyeti olarak dizayn edilen 29 günlük çalışmada asetamipridin vücut ağırlığını ve testis, epididim, seminal veziküllerle prostat bezinin ağırlığını ve somatik indeksi azalttığı ($p \leq 0.05$) belirlenmiştir. Aynı zamanda, asetamipridin akrozom deformitesinin hızını artırırken sperm sayısını, canlılığını ve hareketliliğini azalttığı ($p < 0,05$), E vitamininin ise asetamipridin yan etkilerini azalttığı, sperm sayısı ve hareketliliğini arttırdığı, spermatik malformasyon oranını düşürdüğü ($p \geq 0.05$) rapor edilmiştir (Zhang, et al., 2011). Bir başka çalışmada asetamipride 5,5 mg/kg, 11 mg/kg ve 22 mg/kg v.a. dozlarında 90 gün boyunca maruz bırakılan Wistar türü sıçanlarda testis mutlak organ ağırlığında düşüş (sırasıyla 3,7, 3,5, 3,5) ve somatik indekste artış (sırasıyla 0,92; 0,99; 1,02) olduğu ama bu değişikliklerin istatistiksel anlamlılık düzeyinde ($p \geq 0.05$) olmadığı tespit edilmiştir (Devan, Mishra ve ark. 2015). Bazı çalışmalarda asetamipride tekrarlanan dozlarda maruz bırakılan deney hayvanlarının testis ağırlıklarında artış gözlemlendiği rapor edilmiş olmakla birlikte testislerdeki bu artışın sebebi mikroskobik bulgularla teyit edilememiştir (Nukui ve Ikeyama 1992b, Kaynak: Kanungo ve Solecki 2011 pp. 3-91).

Tez çalışmasında; deney hayvanların sağ ve sol testisleri sakrifikasyon sonrası tartılmış olup makroskopik olarakta incelendi. Makroskopik incelemede herhangi bir renk ve görünüş değişimi gözlenmedi. Testis ağırlıkları kontrol grubu için 1,216-2,242 g, maruziyet grupları için ise benzer şekilde 1,112-2,052 g aralığında olup ortalama testis ağırlıklarının kontrol, düşük doz, orta doz ve yüksek doz maruziyet grupları için sırasıyla 1,505, 1,600, 1,551 ve 1,556 g olduğu tespit edildi (Tablo 4-2). Somatik indeks değerlendirmesinde de kontrol grubu ile maruziyet grupları kıyaslandığında anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlendi. Somatik indeks kontrol, düşük doz, orta doz ve yüksek doz

maruziyet grupları için sırasıyla 0,468, 0,476, 0,437 ve 0,468 olarak tespit edildi (Tablo 4-3).

Gu ve ark. (2013) tarafından yürütülen bir çalışmada; 0,111-1,114 mg/mL düzeylerinde asetamipride maruz bırakılan B6D2F1 türü farelerde sperm kalitesi, oosit içerisine sperm penetrasyonu ve preimplantasyon embriyonik gelişim üzerine negatif etkiler saptanmıştır. Rasgele (2014) tarafından *Mus musculus* fareleri üzerinde yapılan bir çalışmada 0,625; 1,25 ve 2,50 µg/mL dozlarda 24 ve 48 saat süreli maruziyette sperm anomali sıklığında artış meydana gelmiş, ancak DNA hasarı oluşturup oluşturmadığı kesinleştirilememiştir.

Asetamipridin nikotin türevi olması başlıca sebep olabileceği bildirilerek insan spermlerini etkileyebileceğine yönelik bildirimler mevcuttur (Gandini ve ark. 1997; Ishikawa ve ark. 2015). Kavar-İran'da 268 evli erkek bireyle gerçekleştirilen anket şeklindeki kesitsel çalışmada pestisitlere maruz kalan çiftçiler arasındaki infertilite düzeyi %7,4 olup, normal popülasyondan anlamlı derecede yüksek olduğu ve tarımsal aktivitelerinde sperm sayısını azaltan asetamiprid kullanımının da mevcut olduğu görülmüştür ($p<0.05$) (Neghab ve ark. 2014).

Tez çalışmasında; sperm sayılarının maruziyet dozuna bağlı olarak istatistiksel anlamlılık düzeyinde ($p\leq 0,004$) kontrol grubuna kıyasla doza bağımlı olarak %5,95-29,23 aralığında azalma tespit edildi (Tablo 4-4).

Mus musculus türü erkek farelerde intaperitoneal yol ile 24 ve 48 saat süresince 0,625, 1,25 ve 2,50 µg/mL dozlarda asetamiprid uygulaması yapıldığında tüm konsantrasyonlar için kontrole kıyasla "düzleşmiş baş", "muz", "iğne uçlu baş" ve "kıvrık kuyruklu" spermier gibi farklı sperm anomalilerine rastlanılmış ve anomali sperm türlerine neden olmuştur; ancak bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı rapor edilmiştir (Rasgele 2014).

Tez çalışmasında; iğne uçlu başlı sperm en az, kuyruksuz başlı sperm en fazla olmak üzere çeşitli sperm anomalilerine rastlandı (Tablo 4-5; Şekil 4-5). Kontrol ve her bir maruziyet grubu için yapılan istatistiksel değerlendirmede kontrol grubuna göre yüksek doz maruziyet grubunda düzleşmiş baş anomalili spermier başta olmak üzere anomalili sperm oranının daha yüksek olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda anomalili

sperm %13,4 düzeyinde iken yüksek doz maruziyet grubunda %18,2 düzeyinde idi (Tablo 4-5; Şekil 4-5).

Wistar türü sıçanlarda kontrol, asetamiprid (27 mg/kg), çörek otu yağı (1 mL/kg) ve kombinasyonuna 45 gün süreyle oral gavaj yolu ile maruz bırakıldığında testis, epididimis ve seminal veziküllerde vucut ağırlığına göre belirlenen nispi ağırlıkta azalma, spermatid sayısı, sperm sayısı, sperm hareketliliği ve testosteron seviyelerinde azalma, anomalili sperm sayısında artış, MDA düzeylerinde artış tespit edilmiştir (Rachid ve ark. 2013). Aynı çalışmada, ayrıca testislerde histopatolojik incelemeler yapılmış, bazı seminifer tübüllerde spermatogenezis düzeninin bozulması ve zayıf sperm ve lumenlerinde dökülen hücre parçacıklarının varlığı ile seminal epitelin tübül şeklinde atrofi, disorganizasyon ve dejeneratif yönü gözlenmiştir. Çörek otu yağı ile asetamiprid kaynaklı etkilerin geri döndürebilir ve/veya modüle edebilir olduğu, bu koruyucu rolünün çörek otunun antioksidan özelliklerine bağlı olabileceği rapor edilmiştir.

Gu ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada 1,113 mg/mL dozunda asetamiprid, imidakloprid ve nikotin'e maruz bırakılan hücre embriyoları sonucunda gelişen fare'de sperm kalitesinin, oositlere spermin nüfus etme potansiyelinin ve preimplantasyon embriyonik gelişimin değerlendirildiği bir test stratejisi kullanılmıştır. Sperm motilitesi ve DNA bütünlüğünün anlamlı derecede değişmediği, ancak in vitro fertilizasyon sürecinde dölleme yeteneğinin azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmada; neonikotinoid gurubu insektisitlerin memelilerde spermin dölleme yeteneğini ve embriyonik gelişimi tehlikeli düzeyde etkileyebileceği ve özellikle mesleki maruziyetlerin yüksek olduğu popülasyonlarda insan üreme sağlığı üzerine risk oluşturabileceği hususundaki endişelerin arttığı rapor edilmiştir (Gu ve ark. 2013).

Albino türü farelerde çeşme suyu, asetamipridin 100 ve 150 mg/kg dozları, glifosatın 5000 mg/kg ve 7500 mg/kg dozları ile 100 mg/kg asetamiprid + 5000 mg/kg glifosat ve 150 mg/kg asetamiprid + 7500 mg/kg glifosat karışımlarının 4 hafta süre ile oral maruziyeti durumunda kontrol grubuna kıyasla yüksek doz asetamiprid maruziyetinde serum testosteron düzeyinde anlamlı düşüş tespit edilirken düşük doz maruziyette testosteron seviyesinde artış olduğu gözlemlendi (Chawsheen 2011). Aynı çalışmada; kontrol grubundaki farelerin seminifer tübül çaplarının maruziyet gruplarına kıyasla anlamlı farklılıklar gösterdiği bildirildi.

Tez çalışmasında; deney hayvanlarının plazmalarında testosteron seviyesi değerlendirildiğinde 60. gün ve 90. gün için testosteron seviyelerinde doza bağımlı azalma olduğu görüldü (Tablo 4-6; Tablo 4-7; Şekil 4-7). Kontrol grubuna kıyasla yüksek doz maruziyet gruplarında testosteron seviyelerinin 60. gün ve 90. gün için sırasıyla %11,23 ve 34,31 oranında azaldığı tespit edildi. Yapılan tavinlerde ayrıca kolesterol düzeylerinin de gerek 60. günde gerekse de 90. günde yapılan ölçümlere göre doza bağımlı olarak azaldığı gözlemlendi (Tablo 4-16; Tablo 4-17; Şekil 4-17). Yüksek doz maruziyet grubunda kontrol grubuna kıyasla düşüşün %23,04 düzeyinde olduğu görüldü. Ancak tez çalışmasında elde edilen sonuçların aksine; oral yol ile 90 gün boyunca günde 5,5 mg/kg, 11 mg/kg, 22 mg/kg v.a. dozlarında asetamipride maruz bırakılan Wistar türü sıçanlarda 22 mg/kg dozlarda kolesterolün kontrole kıyasla anlamlı düzeyde arttığı rapor edilmiştir (Devan, Mishra ve ark. 2015). Çalışmada, kolesterol seviyelerinde gözlenen bu düşüş eğilimindeki farkın kullanılan deney hayvanı türlerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Distile su (kontrol), mısır yağı (1 mL/kg), quersetin (20 mg/kg), asetamiprid (52,5 mg/kg; 26,25 mg/kg), asetamiprid + quersetin karışımı (52,5 mg/kg + 20 mg/kg ile 26,25 mg/kg + 20 mg/kg) Wistar türü sıçanlara oral yolla 60 gün boyunca uygulandığında serum ve testiküler homojenatta testosteron seviyelerinde kontrol gruba kıyasla anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir (Awasthy 2013). Gruplardaki hayvanların testislerinde histolojik incelemeler yapılmış, seminifer tübüllerin çoğunda az sayıda spermatosit varlığı ile azalmış spermatogenez olduğu gözlenmiş, seminifer tübüllerde, germinal epitelde vakuol varlığı ve sperm yokluğu ile dejenerasyon ve nekroz görülmüş, tübüllerin lümeninde birkaç ölü piknotik hücre bulunmuştur. Benzer şekilde Keshta ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada Swiss albino türü sıçanlarda oral yolla 30 gün süreli maruziyette testosteron seviyeleri kontrol grubuna (3,48 ng/mL) kıyasla 10 gün (2,48 ng/mL), 20 gün (1,55 ng/mL) ve 30 gün (0,85 ng/mL) sonunda kademeli bir şekilde anlamlı derecede düşmüş, yine kontrol gruba kıyasla MDA ve nitrik oksit düzeylerini anlamlı derecede artırmış, ancak aksine CAT ve SOD aktivitelerini önemli ölçüde azaltmıştır ($p<0,001$).

Yetişkin Sprague Dawley türü sıçanlara oral yolla asetamiprid tek başına veya E vitamini 35 gün boyunca verildiğinde LH düzeyleri arttıkça, plazma testosteron konsantrasyonu ve sperm kalitesinin önemli ölçüde azaldığı, Leydig hücrelerinde MDA

ve nitrik oksit düzeylerinin arttığı, asetamipridin Leydig hücrelerinde oksidatif strese ve mitokondriyal hasara neden olduğu, testiküler ATP ve cAMP sentezinin inhibe olduğu rapor edilmiştir. Asetamiprid kolesterolün testosterona dönüşme oranını düşürüp Leydig hücrelerinde kolesterolün mitokondriye girmesini önleyerek testosteron biyosentezini bozduğu bildirilmiştir (Kong ve ark. 2017). Sıçanlar günde 3,1; 6,0; 12,4; 50,8 ve 99,9 mg/kg v.a. dozlarında asetamiprit ile subkronik sürede maruz bırakıldığında kolesterol düzeyinde artış, glukoz düzeylerinde düşüş gibi karaciğer fonksiyon parametrelerinde değişiklikler gözlenmiştir (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR) 2013).

Tez çalışmasında; plazmada LH, FSH, GnRH ve INHB seviyeleri hem 60. gün hem de 90. gün için tayin edildi. Elde edilen sonuçlara göre; azalan testosteron ve kolesterol seviyelerine karşılık kontrol grubuna kıyasla maruziyet gruplarında LH, FSH, GnRH ve INHB seviyelerinde artış tespit edildi; ancak yüksek doz maruziyet grubundaki artış oranının düşük ve orta doz maruziyet gruplarına göre daha az olduğu gözlemlendi (Şekil 4-9; Şekil 4-11; Şekil 4-13; Şekil 4-15).

Oksidatif stres erkek infertilitesinde majör etiyolojik faktörlerden biridir (Aitken ve Roman 2008). Testislerde ROS üretimi süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimlerinin aktivitesini etkileyerek steroidogenezi ve spermatogenezi bozar (Chainy ve ark. 1997). ROS'nin başlattığı lipid peroksidasyonu riski özellikle steroid biyosentezinde moleküler oksijen kullanan hücrelerde daha fazladır (Zaidi ve ark. 2012). Oksidatif stresin etkisi ile testislerde proliferasyon, apoptoz ve transkripsiyonun düzenlenmesinde görev alan inhibitörlerde düşüş gözlenmiştir (Li ve ark. 2016). Ayrıca oksidatif stres Leydig hücrelerini LH'a daha az hassas hale getirir. Böylece testosteron biyosentezindeki enzimlerin aktivitesi, dolayısıyla da testosteron biyosentezi azalır (Glade ve Smith 2015).

Yao, Min ve Lv (2006) *Escherichia coli* K12, *Pse.FH2* ve *Bacillus subtilis* bakterileri üzerinde yaptıkları çalışmada asetamipridin bakterilerde ROS üretimini indükleyebileceğini göstermiştir. Zhang ve ark. (2011) tarafından asetamipride 30 mg/kg v.a. dozunda 35 gün süre ile maruziyette semifer tübüllerde ve Leydig hücrelerinde hasar, Leydig hücrelerinde mitokondri ve endoplazmik retikulumda dejenerasyon, oksidatif hasarın indüklenmesi ile testislerde nitrik oksit ve MDA düzeylerinde artış, CAT, GPx, SOD seviyelerinde azalma ve p38'in aktivasyonunda

artış tespit edilmiştir. Çalışmada; testis, epididimis, seminifer tübül ve prostat bezi ağırlığı azalmış, serum testosteron, sperm sayısı, hareketliliği, bozulmamış akrozom oranı azalmış, spermatojenez olumsuz etkilenmiş ve Leydig hücrelerinin mitokondri ve endoplazmik retikulumunda hasar meydana getirdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, asetamipride maruz bırakılan hayvanların testislerinde karaciğerlerine göre çok daha düşük düzeylerde asetamipride rastlanılmasına rağmen testislerde hasar tespit edilmesi, metabolitleri yoluyla erkek üreme fonksiyonlarını etkilediği ve oksidatif hasarı indüklüebileceği şeklinde rapor edilmiştir.

Albino türü sıçanlara 3,14 mg/kg v.a. asetamiprid oral olarak 90 gün boyunca uygulandığında asetamipridin genel bir pro-oksidan etkiye sahip olup, beyinde azalmış GSH ve GPx ile CAT aktivite düzeyinin düştüğü, glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesinde ve MDA düzeyinde artış olduğu bildirimiştir (Gasmi ve ark. 2016).

Awasthy (2013) tarafından yapılan çalışmada ayrıca testislerde oksidatif strese bağlı endekslerde, epididim, karaciğer ve böbrek dokularında önemli değişikliklere sebep olduğu da bildirilmiştir. Genel olarak, lipid peroksidasyonunda artış, GSH, CAT, SOD ve GPx seviyelerinde azalma kontrol grubuna kıyasla doz bağımlı olarak gözlenmiştir. Quersetin ile birlikte uygulandığında ise değerlerin normal düzeye geri döndüğü tespit edilmiştir.

Yıldıztekin ve ark. (2015) tarafından yürütülen bir çalışmada; abamektin, tiametoksamin, piriproksifen ve asetamiprid gibi ekzojen uygulanan insektisitlerin oksidatif savunma sistemi üzerindeki etkilerini ve domates (*Solanum lycopersicum* L.)'deki bazı önemli fizyolojik özelliklerin değerlendirilebilmesi için sera deneyi dizayn edilmiş, 120 or 240 mg/L dozlarında MDA düzeylerinde artış tespit edilmiştir (Yıldıztekin ve ark. 2015).

Dhalla ve Sharma (2016) tarafından gerçekleştirilen pestisitlerin kronik etkilerinin serum MDA değerleri ölçülerek değerlendirildiği çalışmada kırsal Punjabi bölgesinde çalışan spray işçilerinin serum MDA düzeyleri belirlenmiş olup kontrol grubundaki MDA aktivitesi 6,24 nmol/mL olarak bulunmuş, tüm pestisit maruziyet gruplarında spray çalışanlarının MDA aktivitesinde belirgin bir yükselme gözlenmiş, asetamiprid tozuna maruziyet durumunda MDA değeri 12,61 nmol/mL seviyesine yükselmiş olmakla beraber kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p<0,0001$).

Yetişkin erkek Wistar cinsi sıçanlara 60 gün boyunca 10,85 mg/kg; 21,7 mg/kg; 43,4 mg/kg v.a. asetamiprid verildiğinde hepatik SOD, CAT düzeylerinde azalma, MDA düzeyinde artma gözlenmiştir ($p \leq 0,05$) (Chakroun ve ark. 2016).

Tez çalışmasında da yukarıda bildirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edildi. Plazma ve testis dokusunda oksidatif hasar parametrelerinden GSH, MDA, TAS ve TOS seviyeleri tespit edildi. Asetamipridin doza bağlı olarak oksidatif hasar oluşturma potansiyelinin olduğu ve gözlenen sonuçların plazma ve doku örneklerinde paralellik gösterdiği gözlemlendi. Plazma ve doku örneklerinde kontrol grubuna kıyasla; GSH tüketimi sırasıyla $\leq 63,23$ ve $36,05$ düzeylerinde artış (Tablo 4-18; Tablo 4-19; Şekil 4-19; Şekil 4-20) ve MDA düzeyleri sırasıyla $\leq 2,58$ ve $1,72$ kat artış (Tablo 4-20; Tablo 4-21; Şekil 4-22; Şekil 4-23) gösterdi. Plazma ve doku örneklerinde kontrol grubuna kıyasla TAS düzeyleri sırasıyla $\leq 70,47$ ve $34,37$ olarak tayin edildi (Tablo 4-22; Tablo 4-23; Şekil 4-25; Şekil 4-26). TOS düzeyleri ise kontrol grubuna kıyasla sadece yüksek doz maruziyet grubunda istatistiksel anlamlılık düzeyinde artış göstermiş olup plazma ve doku için yüksek doz maruziyet grubundaki artış yüzdesinin kontrol grubuna kıyasla sırasıyla $35,08$ ve $15,90$ olarak tespit edildi (Tablo 4-24; Tablo 4-25; Şekil 4-28; Şekil 4-29).

Bal ve ark (2012) tarafından sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada; neonikotinoid grubundan imidaklopride 90 gün boyunca oral maruziyet sonucu (0,5; 2 ve 8 mg/kg v.a.) TUNEL⁺ hücrelerde artış, kromatin yoğunlaşması, sitoplazmik tomurcuklanma ve apoptotik cisimler gibi apoptozun tipik morfolojik özellikleri gözlenmiştir.

Tez çalışmasında; asetamipridin erkek üreme sistemi üzerine olumsuz etki potansiyelinin olduğu yönündeki biyokimyasal parametreler ve sperm kalitesi üzerine elde edilen sonuçlar aynı zamanda histolojik incelemeler ile de konfirme edildi. TUNEL hücre sayımı ve apoptotik indeks ile apoptoza giden hücreler değerlendirildi. Apoptotik hücre barındıran seminifer tübül sayılarının doza bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla maruziyet gruplarında artış gösterdiği (Tablo 4-26; Şekil 4-31), apoptotik indeks düzeylerinin düşük doz, orta doz ve yüksek doz maruziyet gruplarında sırasıyla 10,6, 26,3 ve 57,5 düzeylerinde olduğu (Tablo 4-27; Şekil 4-32) tespti edildi. Histopatolojik incelemede tüm maruziyet gruplarının tübüllerinde apoptotik hücreler çoğunlukla

spermatogonyumlarda ve primer spermatositlerde gözlemlendi. Apoptotik hücreler benzer şekilde doza bağlı olarak artan oranlarda gözlemlendi (Şekil 4-30).

Tez çalışmasında yapılan seminifer tübül skorlama ve histopatolojik inceleme sonuçlarına göre; kontrol ve düşük doz maruziyet gruplarında seminifer tübüllerin bazal membranlarının düzenli olduğu, orta ve yüksek doz maruziyet gruplarında ise çok sayıda seminifer tübülde düzensiz ve ondülasyon yapısı gösteren bazal membran varlığı tespit edildi (Tablo 4-28; Şekil 4-34; Şekil 4-35). Yüksek doz grubunda çok sayıda seminifer tübülde spermatogenik germ hücre sayısında azalma, vakuol formasyona sahip spermatogenik hücreler, lümende olgunlaşmamış hücre döküntüleri gözlemlendi (Şekil 4-33).

Swiss Albino erkek farelerde asetamipridin genotoksik ve immünotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada; kontrol olarak %3 akasya sakızı kullanılmış ve iki ayrı gruba 2,3 mg/kg ve 4,6 mg/kg v.a. asetamiprid 30, 60 ve 90 gün süreyle uygulanmıştır. Asetamipride maruz kalan farelerin testislerinde seminifer tübüllerin azalmış spermatogenik aktivitesi ile ayrıldığı, seminifer tübüllerde ödemli değişiklikler, spermatogonyumda dejenerasyon ile ayrılma ve interstisyel boşlukta kan damarlarında tıkanıklık olduğunun gözlemlendiği rapor edilmiştir (Preeti, 2015).

Kocaman (2007) tarafından tarımda artan bir hızla insektisit olarak kullanılan asetamipridin tek başına ve α -sipermetrin ile karışım halinin insanlarda genotoksik risk oluşturup oluşturmadığı insan periferik lenfositlerinde in vitro kardeş kromatid değişimi, kromozom anormallliği ve mikronükleus testleri ile değerlendirilmiştir. Hücreler 25-40 μ g/mL asetamiprid ile tek başına ve α -sipermetrinin 5-20 μ g/mL kombinasyonları ile 24 ve 48 saat süre ile muamele edilmiş, asetamipridin tüm süre ve dozlarda genotoksisiteye sebep olabileceği saptanmıştır. Kombinasyonun ise tek başlarına olduğu kadar ya da daha fazla genotoksik etkiye sebep olabileceği rapor edilmiştir.

Tez çalışmasında ayrıca PCNA immunohistokimya tekniği ile asetamidridin proliferasyon indeksi üzerine etkisi incelendi. Doza bağlı olarak proliferasyon indeksinin özellikle yüksek doz maruziyet grubunda ciddi oranda olmak üzere azaldığı tespit edildi (Tablo 4-29; Şekil 4-36; Şekil 4-37).

Sonuç olarak; sıklıkla kullanılan neonikotinoid grubu pestisitlerden biri olan asetamipridin erkek üreme sistemi üzerine hasar oluşturma potansiyelinin olduğu

gözlenmiştir. Asetamiprid için literatürde bildirilen 0-0,07 mg/kg ADI değeri göz önünde bulundurulduğunda; erkek üreme sistemi üzerine günde 12,5, 25 ve 35 mg/kg maruziyet dozlarının apoptozu indükleyerek ve oksidatif stres oluşturarak üremeyi düzenleyen hormon dengesini bozacağı, testislerde histolojik düzeyde gözlenen bozukluklara bağlı olarak erkek üreme sistemi potansiyel riskinin söz konusu olabileceği açıkça görülmektedir. Asetamipridin toksik etki potansiyeline rağmen konu ile ilgili araştırmaların yeterli olmaması, elde edilen sonuçların insan sağlığı, özellikle erkek üreme sistemi bozuklukları, açısından ne kadar önem taşıdığını ortaya koymaktadır. Bu sebeple, tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçların, tarım ilaçlarına çevresel ve mesleki maruziyetlere karşı gerekli önlemlerin alınmasının öneminin vurgulanması açısından katkı sağlayacağına inanılmaktadır.

KAYNAKLAR

- Aitken, R. J., ve Roman, S. D. (2008). Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes. C. Y. Cheng içinde, *Advances in Experimental Medicine and Biology, Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* (Cilt 636, s. 154-171). New York, USA: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
- Awasthy, V. (2013). *Evaluation of Acetamiprid-Induced Reproductive Toxicity in Male Rats and Its Amelioration by Quercetin*. Doctor of Philosophy Thesis (Veterinary Pharmacology), Deemed University, Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, India.
- Bal, R., Naziroğlu, M., Türk, G., Yilmaz, Ö., Kuloğlu, T., Etem, E., ve Baydas, G. (2012). Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochemistry and Function*, 1-8.
- Bitki Koruma Ürünleri Daire Başkanlığı. (2015-2017). *BKU Veri Tabanı Programı*. (T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Bitki Koruma Ürünleri Daire Başkanlığı) 05 23, 2017 tarihinde BKU Veri Tabanı Programı Web Sitesi. adresinden alındı.
- Bolboaca, S. D., ve Jaentschi, L. (2005). Molecular descriptors family on structure activity relationships. 2. Insecticidal activity of neonicotinoid compounds. *Journal of Pesticide Science*, 4, 78-85.
- Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A. R., ve Battershill, J. M. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis*, 21(2), 93-103.
- Casida, J., ve Quistad, G. B. (2004). Why insecticides are more toxic to insect than people: the unique toxicology of insects. *Journal of Pesticide Science*, 29, 81-86.
- Chainy, G. B., Samantaray, S., ve Samanta, L. (1997). Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. *Andrologia* (29), 343-349.
- Chakraborty, S., Ezzi, L., Grissa, I., Kerkeni, E., Neffati, F., Bhouari, R., ve ark. (2016). Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 25191-25199.

- Chawsheen, M. A. (2011). Effects of acetamiprid and glyphosate pesticides on testis and serum testosterone level in male mice. *Journal of Duhok University Pure and Engineering Sciences*, 14(1), 299-306 .
- Colosio, C., Birindelli, S., Corsini, E., Galli, C. L., ve Maroni, M. (2005). Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), 320-328.
- Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies, Institute for Laboratory Animal Research. Washington, DC; USA: the National Academy of Sciences.
- Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) Group. (2000). *Rat Sperm Morphological Assessment*. Industrial Reproductive Toxicology Discussion Group (IRDG).
- Costa, L. G. (2008). Toxic Effect of Pesticides. C. D. Klaassen içinde, *Casarett ve Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons* (s. 883-930). USA: The McGraw-Hill Companies Medical Publishing Division.
- Costabile, R. (2013). Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System. M. Goldstein, P. N. Schlegel, M. Goldstein, ve P. N. Schlegel (Dü) içinde, *Surgical and Medical Management of Male Infertility* (2013 b., s. 1-7). New York, USA: Cambridge University Press.
- Cunney, H. C. (2000). *Supplemental historical background data for the acetamiprid two-year study in rats*. Aventis Crop Science and Nippon Soda Co., Ltd. . NC, USA and Tokyo, Japan: Submitted to WHO by Nippon Soda Co., Ltd, Tokyo, Japan.
- Çavaş, T., Çinkılıç, N., Vatan, Ö., ve Yılmaz, D. (2014, September). Effects of fullerene nanoparticles on acetamiprid induced cytotoxicity and genotoxicity in cultured human lung fibroblasts. *Pesticide Biochemistry and Physiology* , 114, 1-7.
- Çavaş, T., Çinkılıç, N., Vatan, Ö., Yılmaz, D., ve Coşkun, M. (2012). In vitro genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and cH2AX foci assays. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104, 212–217.
- Delaplane, K. S. (1996). Pesticide Usage In The United States: History, Benefits, Risks and Trends. Georgia, Athens, USA: Southern Extension and Research Activity -

- Information Exchange Group 1 (Southern Region Pesticide Impact Assessment Program).
- Devan, R. K., Prabu, P. C., ve Panchapakesan, S. (2015). Immunotoxicity assessment of sub-chronic oral administration of acetamiprid in Wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(3), 328–336.
- Devan, R. S., Mishra, A., Prabu, P., Mandal, T., ve Panchapakesan, S. (2015). Sub-chronic oral toxicity of acetamiprid in Wistar rats. *Toxicological ve Environmental Chemistry*, 97(9), 1236-1252.
- Dhalla, A. S., ve Sharma, S. (2016). Assessment of serum malondialdehyde among Rural Punjabi pesticide sprayers. *Online International Interdisciplinary Research Journal*, 6(3), 68-78.
- Dich, J., Zahm, S. H., Hanberg, A., ve Adami, H. O. (1997). Pesticides and cancer. *Cancer Causes and Control*, 8(3), 420-443.
- EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). (2013). Scientific Opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. *Scientific Opinion* (s. 1-47). Parma, Italy: European Food Safety Authority (EFSA) Journal.
- EFSA. (tarih yok). *Pesticides*. (European Union) 05 23, 2017 tarihinde EFSA: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/pesticides> adresinden alındı.
- Ekuni, D., Battino, M., Tomofuji, T., ve Putnins, E. E. (2014). *Studies on Periodontal Disease*. New York, USA: Humana Press, Springer.
- Erbach, G. (2012, Mart 29). Pesticide Legislation in The EU. (Library of The European Parliament, Dü.) *Library Briefing*, 1-6.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38, 1103–1111.
- European Commission. (2004). *Review report for the active substance acetamiprid*. European Commission, Health ve Consumer Protection Directorate-General. Brüksel: The Standing Committee on the Food Chain and Animal Health.
- European Commission. (2016, Nisan 7). *Plants-Search Active Substances*. Mayıs 23, 2017 tarihinde EU Pesticides Database: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN> adresinden alındı.

- Eurostat. (2017, 03 20). *Pesticide Sales*. 05 23, 2017 tarihinde Eurostat Your Key to European Statistics Database: http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=aei_fm_salpest09&lang=en adresinden alındı.
- Ford, K. A. (2008). Metabolism, Pharmacokinetics and Toxicology of the Neonicotinoid Insecticides in Mice. 1-7. Berkeley, ABD: University of California, Molecular Toxicology.
- Ford, K. A., Gulevich, A. G., Swenson, T. L., ve Casida, J. E. (2011). Neonicotinoid insecticides: oxidative stress in planta and metallo-oxidase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4860-4867.
- Gandini, L., Lombardo, F., Lenzi, A., Culasso, F., Pacifici, R., Zuccaro, P., ve Dondero, F. (1997). The in-vitro effects of nicotine and cotinine on sperm motility. *Human Reproduction*, 12(4), 727-733.
- Gasmi, S., Rouabhi, R., Kebieche, M., Salmi, A., Boussekine, S., Toualbia, N., ve ark. (2016). Neurotoxicity of acetamiprid in male Albino rats and the opposite effect of quercetin. *Bio Technology: A Indian Journal*, 12(7), 113.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., ve Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(11), 1106-1114.
- Glade, M. J., ve Smith, K. (2015, February 25). Oxidative stress, nutritional antioxidants, and testosterone secretion in men. *Annals of Nutritional Disorders & Therapy*, 2(1), 1-21.
- Gozen, A., Demiryürek, S., Taşkın, A., Ciralık, H., Bilinç, H., Kara, S., ve ark. (2013, Haziran). Protective activity of ischemic preconditioning on rat testicular ischemia: effects of Y-27632 and 5-hydroxydecanoic acid. *Journal Pediatric Surgery*, 48(7), 1565-1572.
- Green, T., Toghil, A., Lee, R., Waechter, F., Weber, E., ve Noakes, J. (2005). Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans part 1: mode of action studies in the mouse. *Toxicological Sciences*, 86(1), 36-47.
- Gu, Y.-h., Li, Y., Huang, X.-f., Zheng, J.-f., Yang, J., Diao, H., ve ark. (2013, July 1). Reproductive effects of two neonicotinoid insecticides on mouse sperm function and early embryonic development in vitro. *PLoS ONE*, 8(7), 1-7.
- Gümüşel, A. (2013). Doktora Tezi. *Adolesan çağıdaki sıçanların epididiminden alınan spermlere ve testis Leydig hücrelerine sigara dumanının ve kurkumin*

- antioksidanının etkilerinin mikroskopik incelenmesi.* İstanbul, Türkiye Cumhuriyeti: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji A.D.
- Hatch, R. C. (1994). *NI-25: two year dietary toxicity and oncogenicity study in rats.* MPI Research, Inc. Mattawan, MI, USA : Submitted to WHO by Nippon Soda Co., Ltd, Tokyo, Japan.
- Heffner, L. J., ve Schust, D. J. (2014). *The Reproductive System at a Glance* (4. b.). Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons.
- Horst, G. v., Maree, L., Kotzé, S. H., ve O’Riain, M. J. (2011, Ekim). Sperm structure and motility in the eusocial naked mole-rat, *Heterocephalus glaber*: a case of degenerative orthogenesis in the absence of sperm competition? *BMC Evolutionary Biology*, XI(351), 1-11.
- Imamura, T., Yanagawa, Y., Nishikawa, K., Matsumoto, N., ve Sakamoto, T. (2010). Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans. *Journal of Clinical Toxicology*, 48(8), 851-853.
- Ishikawa, S., Hiraga, K., Hiradate, Y., ve Tanemura, K. (2015, Feb 6). The effects analysis of two neonicotinoid insecticides on in vitro maturation of porcine oocytes using hanging drop monoculture method. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 1-15.
- Jones, R. E., ve Lopez, K. H. (2014). *Human Reproductive Biology.* San Diego, USA: Elsevier Academic Press.
- Kanungo, D., ve Solecki, R. (2011). Pesticide Residues in Food Toxicological Evaluations. WHO, & FAO (Dü.), *Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues.* içinde II, s. 3-92. Geneva, Switzerland,: World Health Organization.
- Karabulut, A., ve Tekin, A. (2013). Alterations in the morphology and motility of spermatozoa: relation with total sperm count. *Pamukkale Medical Journal*, 6(1), 1-4.
- Keshta, A. T., Hataba, A. A., Mead, H. M., ve El-Shafey, N. M. (2016). Oxidative stress and biochemical changes induced by thiamethoxam and acetamiprid insecticides in rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(6), 44-60.

- Kiriyama, K., Itazu, Y., Kagabu, S., ve Nishimura, K. (2003). Insecticidal and neuroblocking activities of acetamiprid and related compounds. *Journal of Pesticide Science*, 28(1), 8-17.
- Kocaman, A. Y. (2007). *Acetamiprid Ve Alpha-Cypermethrin Pestisidlerinin Tek Başına ve Karışım Halinde Kullanıldıkları Zaman İnsan Periferik Lenfositlerindeki In Vitro Genotoksik Etkileri*. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Kocaman, A. Y., ve Topaktaş, M. (2007). In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48, 483-490.
- Kong, D., Zhang, J., Hou, X., Zhang, S., Tan, J., Chen, Y., ve ark. (2017). Acetamiprid inhibits testosterone synthesis by affecting the mitochondrial function and cytoplasmic adenosine triphosphate production in rat Leydig cells. *Biology of Reproduction*, 96(1), 254-265.
- Kusano, C., ve Ferrari, B. (2008). Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 7(1), 1-15.
- Li, Y., Wang, H. Y., Liu, J., Li, N., Wang, Y. W., Wang, W. T., ve Li, J. Y. (2016, April). Characterization of prohibitins in male reproductive system and their expression under oxidative stress. *The Journal of Urology*, 195, 1160-1167.
- Maele-Fabry, G. V., Duhayon, S., ve Lison, D. (2007). A systematic review of myeloid leukemias and occupational pesticide exposure. *Cancer Causes and Control*, 18, 457-478.
- Menteşe, S. Ö. (2012). *Deneyisel Mezenter İskemi Modelinde Oksidatif Stres Parametrelerinin İncelenmesi (Scube-1, TAS, TOS, OSI, MDA)*. Uzmanlık Tezi, T.C. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Acil Tıp Anabilim Dalı, Trabzon.
- Mescher, A. L. (2015). *Junqueira's Temel Histoloji, Atlas Kitap* (13. b.). (S. Solakoğlu, Çev.) İstanbul, Esenyurt, Türkiye Cumhuriyeti: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Mohamed, F., Gawarammana, I., Robertson, T. A., Roberts, M. S., Palangasinghe, C., Zawahir, S., ve ark. (2009, April). Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. *PLoS ONE*, 4(4), 1-5.
- Molina, P. E. (2013). *Endocrine Physiology*. New York, USA: McGraw-Hill Lange Medical.

- National Center for Biotechnology Information. (2005, Ağustos 8). *Acetamiprid* CID=213021, 18.11.2017 Sürüm. (U.S. National Library of Medicine; NIH) Kasım 24, 2017 tarihinde PubChem Compound Database: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/213021> adresinden alındı.
- Neghab, M., Momenbella-Fard, M., Naziaghdam, R., Salahshour, N., Kazemi, M., ve Alipour, H. (2014). The effects of exposure to pesticides on the fecundity status of farm workers resident in a rural region of Fars Province, Southern Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(4), 324-328.
- Nelli, G. B., Solomon, A., ve Kilari, E. K. (2013). Antidiabetic effect of α -mangostin and its protective role in sexual dysfunction of streptozotocin induced diabetic male rats. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 59(6), 319-328.
- Nielsen, E., Nørhede, P., Boberg, J., Isling, L. K., Kroghsbo, S., Hadrup, N., ve ark. (2014). *Identification of Cumulative Assessment Groups of Pesticides*. Technical University of Denmark, National Food Institute. Kgs. Lyngby: submitted to European Food Safety Authority.
- Nukui, T., ve Ikeyama, S. (1992). *Acetamiprid thirteen-week dietary subchronic toxicity study in mice*. Nippon Soda Co., Ltd, Odawara Research Center. Odawara, Kanagawa, Japan: Submitted to WHO by Nippon Soda Co., Ltd, Tokyo, Japan.
- Nukui, T., ve Ikeyama, S. (1992). *Acetamiprid thirteen-week dietary subchronic toxicity study in rats*. Nippon Soda Co., Ltd, Odawara Research Center. Odawara, Kanagawa, Japan: Submitted to WHO by Nippon Soda Co., Ltd, Tokyo, Japan.
- Nukui, T., ve Ikeyama, S. (1997). *IM-O 13-week dietary subchronic toxicity study in rats*. Nippon Soda Co., Ltd , Odawara Research Center . Odawara, Kanagawa, Japan.: Submitted to WHO by Nippon Soda Co., Ltd, Tokyo, Japan.
- Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances . (2003). *Pesticide Thiacloprid Fact Sheet* . Environmental Protection Agency (EPA). Washington, DC: United States.
- Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. (2003). *Pesticide Clothianidin Fact Sheet* . Environmental Protection Agency (EPA). Washington, DC: United States.
- Öztaş, E. (2016). Doktora Tezi. *Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Gliklazid ve Atorvastatin Kombinasyon Tedavisinin Erkek Üreme Sistemi*

Üzerine Etkilerinin Araştırılması. İstanbul, Fatih, Türkiye Cumhuriyeti: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji A.B.D.

- Pallen, C. (1999). *Acetamiprid (NI-25): statistical evaluation of some clinical signs in male rats observed in the lifetime oncogenicity study.* Rhone-Pourenc AGRO. Sophia-Antipolis Cedex, France: Submitted to WHO by Nippon Soda Co., Ltd, Tokyo, Japan.
- Peluso, M., Merlo, F., Munnia, A., Bolognesi, C., Puntoni, R., ve Parodi, S. (1996). 32P-postlabeling detection of DNA adducts in peripheral white blood cells of greenhouse floriculturists from Western Liguria, Italy. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 5(5).
- Preeti. (2015). *Studies on genotoxicity and immunotoxicity of acetamiprid - a pyridyl methylamine neonicotinoid insecticide in mice.* the Thesis of Doctor of Philosophy in the subject of Veterinary Pharmacology & Toxicology, The Lala Lajpat Rai University, Veterinary and Animal Sciences, College of Veterinary Sciences, Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology, Hisar, Haryana, India.
- Rachid, M., Ibrahim, Y. M., ve Aziez, C. (2013). Nigella sativa oil protects against reproductive toxicity of acetamiprid insecticide in male rats. *Toxicology Letters*, 221, 2018.
- Rasgele, P. G. (2014). Abnormal sperm morphology in mouse germ cells after short-term exposures to acetamiprid, propineb, and their mixture. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 65, 47-56.
- Resmî Gazete. (2010, Haziran 13). *Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu.* Temmuz 5, 2017 tarihinde T.C. Resmî Gazete: <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/06/20100613-12.htm> adresinden alındı.
- Rice-Evans, C., ve Miller, N. J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234(24), 279-293.
- Ross, M. H., ve Pawlina, W. (2016). Male Reproductive System. M. H. Ross, W. Pawlina, M. H. Ross, & W. Pawlina (Dü) içinde, *Histology A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology* (7. b., s. 790-833). China: Wolters Kluwer Health.

- Rupa, D. S., Reddy, P. P., Sreemannarayana, K., ve Reddi, O. S. (1991). Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18(2), 136-138.
- Rupa, D. S., Rita, P., Reddy, R. R., ve Reddi, O. S. (1988). Screening of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of vegetable garden workers. *Human and Experimental Toxicology*, 7(4), 333-336.
- Schwartz, A., Stanbury, M., ve Granger, J. (2004, Ağustos). What You Need To Know About Pesticides And Your Health. (J. D. Olszewski, Dü.) The State Of Michigan, USA: Michigan Department of Community Health - Division of Environmental and Occupational Epidemiology.
- Smith, R. P., ve Turek, P. J. (2011). *The Netter Collection of Medical Illustrations Reproductive System* (2. b., Cilt 1). Philadelphia, USA: Elsevier Saunders.
- Su, F., Zhang, S., Yang, M., ve Li, H. (2006, June 27). In vitro acute cytotoxicity of the neonicotinoid insecticide acetamiprid to FG cells, the Gill cell line of flounder paralichthy olivaceus. *Acta Oceanologica Sinica*, 25(5), 135-140.
- Tarım İlaçları Sanayici, İthalatçı ve Temsilcileri Derneği (TİSİT). (2017). *Bilgi Merkezi*. 05 23, 2017 tarihinde TİSİT Web Sitesi: <http://tisit.org.tr/tr-TR/page/8/bilgi-merkezi> adresinden alındı.
- Tavakkoli, A., Ahmadi, A., Razavi, B. M., ve Hosseinzadeh, H. (2017). Black seed (*Nigella Sativa*) and its constituent thymoquinone as an antidote or a protective agent against natural or chemical toxicities. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2-23.
- Tomizawa, M., ve Casida, J. E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, 48, 339-364.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). (2015). *Bitkisel Üretim İstatistikleri*. (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Dü.) 05 23, 2017 tarihinde TÜİK Web Sitesi: http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 adresinden alındı.
- U.S. Environmental Protection Agency. (1996, Ekim 31). Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. (U. E. Agency, Dü.) Washington, DC, U.S.A.: Risk Assessment Forum.
- Ünver, S., ve Uysal, H. (2014). Neonikotinoid insektisitlere bağlı olarak *Drosophila melanogaster*'in AChE aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin bitkisel

- ekstraktlar ile giderilmesi üzerine arařtırmalar. *Fen Bilimleri Dergisi (CFD)*, 35(4).
- Whitacre, D. M., ve Ware, G. W. (2004). *An Introduction to Insecticides*. (E. B. Radcliffe, W. D. Hutchison, Düzenleyenler, & University of Minnesota; Department of Entomology; College of Food, Agricultural, and Natural Resource Sciences) 03 13, 2017 tarihinde Radcliffe's IPM World Textbook: <https://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides> adresinden alındı.
- White, B. A., ve Porterfield, S. P. (2013). *Endocrine and Reproductive Physiology*. Philadelphia, USA: Elsevier Mosby.
- Yamamoto, I., ve Casida, J. E. (1999). *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor*. Tokyo: Springer-Verlag.
- Yao, X.-H., Jin, S., ve Lv, Z.-M. (2006, September). Response of superoxide dismutase, catalase, and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. *Biomedical and Environmental Sciences*, 19(4), 309-314.
- Yıldıztekin, M., Kaya, C., Tuna, A. L., ve Ashraf, M. (2015). Oxidative stress and antioxidative mechanisms in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants sprayed with different pesticides. *Pakistan Journal of Botany*, 47(2), 717-721.
- Yi-Wang, Zhang, J.-J., Xiang, H.-Y., Jia-Hua, Zhang, ve Wang, X.-Z. (2012). Acetamiprid residues in male mice and its effect on liver function. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(15), 2706-2710.
- Yu, S. J. (2008). The Classification of Insecticides. S. J. Yu içinde, *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides* (1. b., s. 25-85). New York, ABD: CRC Press.
- Yu, S. J. (2008). The Need for Pesticides and Their Pattern of Use. S. J. Yu içinde, *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides* (s. 1-6). New York, ABD: CRC Press.
- Zaidi, S. K., Shen, W.-J., ve Azhar, S. (2012). Impact of aging on steroid hormone biosynthesis and secretion. *Open Longevity Science*, 6, 1-30.
- Zhang, J.-j., Wang, Y., Xiang, H.-y., Li, M.-x., Li, W.-h., Ma, K.-g., ve ark. (2011, May). Oxidative stress: role in acetamiprid-induced impairment of the male mice reproductive system. *Agricultural Sciences in China*, 10(5), 786-796.

FORMLAR

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

05.05.2016

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Enstitünüz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Yağmur Emre ARICAN'ın "Neonikotinoid Grubu İnsektisidlerden Asetonipridin Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisinin Araştırılması" isimli doktora tez çalışmasının histolojik değerlendirmesinin Anabilim Dalımızda yapılması uygundur.

Gereğini bilgilerinize saygılarımla arz ederim.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. ERCAN'.

Prof. Dr. Feriha ERCAN
Histoloji ve Embriyoloji ABD Bşk

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2016/ 35

31 /03 / 2016

Sayın Prof. Dr. Gül ÖZHAN
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Karar No 2016/ 35

Başvuru : 25.03.2016

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, **Eczacı Yağmur Emre ARICAN'a** ait "Neonikotinoid Grubu İnsektisitlerden Asetamiprid'in Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisinin Araştırılması" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	48
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	Mayıs 2016/ Temmuz 2017	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof.Dr. İlhan İLKILIÇ
Üye

Doç.Dr. Alper OKYAR
Üye

Yard.Doç.Dr Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak.Yük. Müh.
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İNTİHAL RAPOR FORMU

NEONİKOTİNOİD GRUBU İNSEKTİSİTLERDEN ASETAMİPRİD'İN ERKEK ÜREME SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

%**4**

BENZERLİK İNDEKSİ

%**3**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

<%**1**

library.cu.edu.tr

İnternet Kaynağı

2

<%**1**